

INFLUÊNCIA DE EXTRATOS DE AÇAÍ (*EUTERPE OLERACEA* MART.) E PITANGA (*EUGENIA UNIFLORA* L.) NA ATIVIDADE DE CATALASE CITOSÓLICA CEREBRAL DE RATOS

INFLUENCE OF AÇAÍ (*EUTERPE OLERACEA* MART.) AND BRAZILIAN CHERRY (*EUGENIA UNIFLORA* L.) EXTRACTS ON CEREBRAL CYTOSOLIC CATALASE ACTIVITY IN RATS

Taís da Silva Rosa^{1*}; Sabrina Coelho Costa²; Soraia John da Silva³; Jeferson Maia⁴; Cristiane Martins Cardoso⁵.

1. Msc., Doutoranda do curso de Pós graduação em Química da UFRRJ.

2. Graduada em Química pela UFRRJ.

3. Msc., Doutoranda do curso de Pós graduação em Química da UFRRJ.

4. Graduando do curso de Zootecnia do IFMT – campus Alta Floresta.

5. Prof. Doc. Da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

*Autora correspondente: tais.rosa@alf.ifmt.edu.br

Recebido: 20/04/2018; aceito 14/09/2018

RESUMO:

Espécies reativas de oxigênio são formadas nas células durante as reações metabólicas aeróbicas e quando produzidas em grande quantidade ou não eliminadas de forma eficaz podem prejudicar o funcionamento ou danificar a célula causando sua morte. Para manter a viabilidade celular é indispensável a manutenção do equilíbrio entre a quantidade de espécies reativas de oxigênio e a ação das defesas que a célula dispõe. No aparato de defesa celular estão compostos e enzimas com atividade antioxidante. Entre as enzimas está a catalase, que catalisa a reação que inativa o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) impedindo a formação do radical hidroxila ($OH\cdot$), uma das espécies reativas que mais danos causa a célula. Compostos bioativos com capacidade de modulação da atividade enzimática podem aumentar a capacidade de defesa celular contra espécies reativas de oxigênio a partir do aumento da atividade de enzimas como a catalase. O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência de extratos obtidos de açaí e pitanga, contendo compostos bioativos, sobre a atividade da enzima catalase. Os extratos das duas frutas foram capazes de modular a atividade enzimática, porém só os extratos etéreo e aquoso de pitanga aumentaram essa atividade, sendo a maior proporcionada pelo extrato etéreo. Os resultados indicam a possibilidade de modular a atividade da catalase e, com isso, permitir maior capacidade de defesa celular contra espécies reativas de oxigênio.

Palavras-chave: Espécies reativas de oxigênio, catalase, atividade, açaí, pitanga.

ABSTRACT

Reactive oxygen species are formed in cells during the aerobic metabolic reactions and when large quantities are produced or not effectively eliminated can impair the functioning or damage the cell causing its death. To keep the cell viability is essential to maintaining the balance between the amount of reactive oxygen species and the action of defenses of the cell. In cellular defense apparatus are compounds and enzymes with antioxidant activity. Among the enzymes is catalase, which catalyses the reaction that inactivates the hydrogen peroxide (H_2O_2) preventing the formation of hydroxyl radical ($OH\cdot$), the reactive species most damage to the cell. Bio-active compounds are capable of modulation of enzyme activity that

can increase cellular defense capability against reactive oxygen species from the increased activity of enzymes such as catalase. The aim of this work was to evaluate the influence of extracts obtained from açai and Brazilian cherry, containing bio-active compounds on the activity of the enzyme catalase. The extracts of the fruits were able to modulate the enzymatic activity, however only the ethereal extracts and aqueous Brazilian cherry increased such activity, being the largest provided by ether extract. The results indicate the possibility to modulate the activity of catalase and thus allow more cellular defense capability against reactive species of oxygen.

Keywords: Reactive oxygen species, catalase, activity, açai, brasilian cherry.

1. INTRODUÇÃO

As espécies reativas de oxigênio (ERO) são produzidas endogenamente como consequência direta de reações metabólicas que necessitam de oxigênio e, também em situações específicas como a exposição da célula a compostos xenobióticos que podem provocar a redução incompleta de O_2 [1].

O acúmulo de EROs pode ser extremamente tóxico para as células. Estudos publicados evidenciam o dano gerado pelo acúmulo de EROs e sua relação com doenças neurodegenerativas, crônico inflamatórias, vasculares e câncer [2;3]. Em sistemas aeróbicos, o equilíbrio entre a quantidade de espécies reativas de oxigênio e o sistema de defesa é imprescindível para manutenção da viabilidade celular.

O sistema de defesa celular pode atuar antes ou após a ação deletéria das espécies reativas de oxigênio. Para agir de forma detoxificadora, antes que as lesões à célula ocorram, há um aparato que conta, além de substâncias antioxidantes, com a ação de enzimas como superóxido-dismutase (SOD), glutathiona-peroxidase (GSH-Px) e catalase [1].

A catalase, especificamente, é uma hemeproteína citoplasmática encontrada em maior quantidade no sangue, medula óssea, mucosas, rim e fígado. Esta enzima catalisa a inativação, no interior da célula, do peróxido de hidrogênio (formando H_2O e O_2), impedindo a continuidade das reações e a formação de radicais livres como o radical hidroxila (OH^\cdot), considerado o mais deletério ao organismo [1; 4; 5].

Ao passo que, por fatores como a diabetes ou a exposição a compostos xenobióticos, a quantidade de espécies reativas de oxigênio aumenta, as defesas antioxidantes endógenas se tornam insuficientes para manter o equilíbrio [6]. Contudo, estudos indicam que extratos de plantas que contenham compostos bioativos capazes de modular a atividade de enzimas permitem uma ação antioxidante significativa, capaz de diminuir os efeitos nocivos gerados por estas espécies reativas de oxigênio [7].

Muita atenção tem sido dada ao açai (*Euterpe oleracea* Mart.), por sua capacidade antioxidante associada ao potencial benefício a saúde [8]. O açazeiro é

uma palmeira amplamente distribuída no norte da América do Sul com a sua maior ocorrência e importância econômica nas planícies de inundação do estado brasileiro amazônico do Pará [9]. O açaí de diferentes ecossistemas amazônicos reúne características essenciais para a nutrição humana como fonte de energia, fibra alimentar, antocianinas, minerais, particularmente, cálcio e potássio [10]. Foram identificados pelo menos cinco esteróis incluindo β -sitosterol (78%), estigmasterol (6,5%), δ 5-avenasterol (6,5%), campesterol (6,0%), e de colesterol (2,0%). Contém ainda ácidos fenólicos como o ácido vanílico, ácido sirínico, ácido p-hidroxibenzóico, ácido ferúlico, catequinas e cianidinas além de flavonoides, com destaque para a quercetina, orientina e seus derivados, e proantocianidinas [8; 11].

Segundo estudos, extratos vegetais ricos em antocianinas, como o açaí, apresentaram atividade antioxidante considerável e aumentaram significativamente a atividade de enzimas celulares com ação antioxidante de Células Caco-2 [12].

Já a pitanga, fruto da pitangueira (*Eugenia uniflora* L.), pertencente à família das Myrtaceae, e que é nativa do Brasil até o Norte da Argentina e Uruguai. É largamente consumida como frutas frescas, suco de frutas, polpa congelada e geleia [13].

Dentre os compostos fitoquímicos presentes na pitanga estão compostos fenólicos, quercetina, kaempferol e miricetina, leucoantocianidinas e esteroides e triterpenos. No óleo essencial obtido da fruta são encontrados ácidos fenólicos, β -pireno, limoneno e cineol [14; 15]. Em pitanga fresca foram identificados o licopeno (73,0 ng / g), γ -caroteno (52,7 ug / g), β -criptoxantina (47,0 ug / g), rubixantina (23,0 ug / g), fitoflueno (13,1 ug / g), β -caroteno (9,5 ug / g) e ζ -caroteno (4,7 ug / g) [13].

Segundo Schapoval et al. (1994) [16], o extrato de pitanga teve ação inibitória sobre a atividade da enzima xantina oxidase e aumentou o metabolismo de lipídios. Em outros testes, um dos resultados obtidos foi, a verificação da ação antioxidante através da diminuição da peroxidação lipídica em ratos a partir da utilização de óleos essenciais de pitanga [17].

Nesse sentido, crescem os estudos sobre a ação e efeito de substâncias com propriedades antioxidantes, sejam essas com ação direta ou indireta, como na modulação da atividade de enzimas antioxidantes [7; 12; 18]. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência de compostos bioativos presentes em extratos produzidos a partir de açaí e pitanga, na atividade da enzima antioxidante catalase de fração citosólica de células cerebrais de ratos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. OBTENÇÃO DE FRAÇÃO ENZIMÁTICA CEREBRAL DE RATOS

As amostras de cérebro de ratos Wistar machos foram descongeladas, pesadas e homogeneizadas em homogeneizador Potter-Elvehjem teflon/vidro, numa proporção de 1,0 g de cérebro para 4,0 mL de solução tampão gelada (fosfato de potássio 0,1 M, de pH 7,0, contendo sacarose 0,25 M). Os homogeneizados foram centrifugados a 9.000 x g por 45 minutos a 4 °C. Os sobrenadantes desta primeira centrifugação foram transferidos para novos tubos e ultracentrifugados em ultracentrífuga Hitachi, a 100.000 x g por 90 minutos a 4 °C. O sobrenadante, fração citosólica, foi recolhido, aliquoteado e armazenado em freezer (aproximadamente -20°C) até sua utilização na determinação de atividade de catalase.

2.2. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO PROTEICA NA FRAÇÃO SOLÚVEL DE CÉREBRO DE RATO.

A determinação da concentração proteica foi realizada segundo método Peterson (1977) [19]. Os resultados foram expressos em atividade específica, padronizado para a concentração de proteínas solúveis estimada, utilizando como padrão 10µg e 100µg de albumina sérica bovina

(BSA) e utilizados no cálculo das atividades enzimáticas específicas.

2.3. OBTENÇÃO DOS EXTRATOS DE PITANGA E AÇAÍ.

2.3.1. Obtenção dos extratos brutos de pitanga e açaí

Os compostos bioativos presentes na polpa “*in natura*” triturada de açaí e de pitanga foram extraídos com água destilada na proporção de 1:5 (g da amostra: mL de água) durante 1 hora em agitador magnético à temperatura ambiente. A solução foi filtrada a vácuo em funil de Büchner e o resíduo líquido centrifugado a 3.000 rpm por 2 minutos para decantação de sólidos mais finos. Os extratos brutos obtidos foram utilizados no estudo da influência sobre a atividade enzimática [20].

2.3.2. Obtenção dos extratos etéreo, aquoso e alcoólico de pitanga e açaí

As polpas de açaí e pitanga foram expostas a calor seco durante cinco dias para retirada da máxima quantidade de água possível, e então utilizadas como matéria-prima para obtenção dos extratos.

A polpas secas e trituradas foram adicionadas de éter etílico na proporção 1:5 e mantidas sob agitação durante 1 hora a temperatura ambiente. Após o tempo de extração, as misturas foram filtradas e armazenadas até sua utilização

nos testes enzimáticos. Os sólidos resultantes do processo, foram utilizados para obtenção dos extratos aquoso (água destilada) e alcoólico (éter etílico) seguindo a mesma metodologia.

2.4. ATIVIDADE DE CATALASE CITOSÓLICA CEREBRAL

Os ensaios para determinação da atividade da catalase foram conduzidos segundo protocolo de Zoppi *et al.* (2003) [21], a partir do consumo do substrato. Os ensaios foram realizados na ausência e na presença dos extratos das frutas, sendo os primeiros tidos como atividade controle. Foram utilizados 10 µL dos extratos brutos, etéreos, alcoólicos e aquosos de açaí e pitanga.

2.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

O tratamento estatístico dos resultados obtidos foi realizado utilizando o teste t de Student para comparação de

médias, tendo como parâmetro o valor de p 5%.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A enzima catalase decompõe o peróxido de hidrogênio resultante do metabolismo celular cuja ação oxidativa é tóxica para algumas células, sendo necessária sua degradação para evitar danos que comprometam a viabilidade celular [22].

Os ensaios foram realizados para avaliar a influência dos compostos bioativos, obtidos a partir dos diferentes extratos de frutas, sobre a atividade da enzima catalase citosólica de cérebro de ratos. Com os resultados obtidos, foi possível observar uma concentração de catalase citosólica cerebral passível de ser avaliada quanto a sua atividade e modulação a partir dos compostos bioativos de extratos de frutas, nas condições dos ensaios realizados.

A Tabela 1 apresenta os resultados de atividade de catalase citosólica cerebral de rato, na presença dos diversos extratos obtidos de açaí e pitanga.

Tabela 1. Atividade de catalase cerebral de ratos na ausência (controle) e presença dos extratos bruto, etéreo, aquoso e alcoólico de pitanga.

Atividade de catalase (mmol/min/mg)					
	Controle	Extrato Bruto	Extrato etéreo	Extrato Alcoólico	Extrato aquoso
Açaí	0,0035± 0,00001	0,0011± 0,00013	0,0019± 0,00008	0,0004± 0,00023	0,0001± 0,00009
Pitanga	0,0035± 0,00001	0,0026± 0,00059	0,00087± 0,000130	0,00058± 0,000070	0,0021± 0,00039

A análise estatística foi realizada através do teste *t Student* e os valores considerados significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Apesar da atividade de catalase cerebral relativamente baixa, esta foi suficiente para observar a influencia dos extratos de frutas. Na presença dos extratos de açaí houve inibição da atividade enzimática sendo a maior induzida pela ação do extrato aquoso de açaí (aproximadamente 97%). Os extratos bruto, etéreo e alcoólico também promoveram inibição considerável da atividade, sendo 69%, 46% e 88%, respectivamente.

Apesar de estudos relatados na literatura terem indicado uma possível melhora na atividade de enzimas antioxidantes por ação de compostos como as antocianinas [12], a mesma resposta não foi obtida em observação a ação dos compostos bioativos existentes no açaí, incluindo antocianinas, sobre a catalase cerebral de ratos. Ao contrário, pode-se observar uma forte diminuição dessa atividade o que pode de forma geral, prejudicar a defesa celular contra as EROs ou exigir desta um mecanismo compensatório, como aumento da atividade de outras enzimas a fim de evitar danos [3].

Os extratos de pitanga também influenciaram diretamente a atividade de catalase cerebral de ratos, porém o extrato etéreo e o extrato alcoólico induziram aumento na atividade enzimática, com ativação de cerca de 148% e 66%, respectivamente. Sendo o extrato etéreo obtido a partir do do uso de

solvente apolar (éter etílico), apenas compostos solúveis são extraídos e possivelmente, compostos que favorecem a atividade da catalase. Já os extratos bruto e aquoso, promoveram inibição da atividade (aproximadamente 26% e 40%, respectivamente).

A modulação na atividade da catalase indica que compostos bioativos presentes em frutas como a pitanga, podem melhorar a resposta celular frente ao estresse oxidativo causado pelo aumento da quantidade de EROs.

A presença de um ou mais compostos bioativos podem modular a atividade da catalase e, variações na concentração e na estrutura destes compostos podem influenciar o tipo de modulação sucedida. O conhecimento sobre esse potencial de modulação pode facilitar o uso desses compostos em estudos direcionados sobre a capacidade de defesa de diferentes células contra EROs.

4. CONCLUSÕES

A partir dos testes realizados foi possível determinar a atividade da enzima antioxidante catalase em fração citosólica cerebral de ratos e avaliar como extratos contendo compostos bioativos de açaí e pitanga influenciam a atividade dessa enzima.

Todos os extratos de açaí testados (bruto, etéreo, aquoso e alcoólico) diminuíram a atividade da catalase. A maior inibição da atividade enzimática ocorreu com a utilização do extrato aquoso de açaí. Apesar de muitos estudos se referirem ao açaí como contendo grande teor de compostos antioxidantes, incluindo as antocianinas que por polaridade tendem a ser extraídas em meio aquoso, esses compostos não atuaram aumentando a atividade da catalase. Isso indica que a atividade antioxidante dos compostos presentes no açaí vem de atividade do composto em reação direta com as espécies reativas de oxigênio ou por ativação de outras enzimas que fazem parte do aporte celular de sistema de defesa antioxidante.

Quanto aos resultados obtidos nos ensaios com extratos de pitanga, o extrato etéreo promoveu ativação da catalase, aumentando expressivamente sua atividade. Os resultados indicam que um ou mais compostos bioativos extraídos em fase etérea, podem aumentar a capacidade de defesa antioxidante celular, a partir do aumento da atividade da enzima catalase.

O foco de futuros estudos nos compostos bioativos obtidos de pitanga e outros vegetais pode revelar caminhos alternativos e promissores na diminuição dos efeitos negativos das espécies

reativas de oxigênio e aumento da viabilidade celular.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev Ass Med Brasil**, v. 43, p. 61-68, 1997.
- [2] SHANGARI, N.; O'BRIEN, P. J. Catalase Activity Assays. **Current Protocols in Toxicology**, v 27, p. 1-16, 2006.
- [3] ARBO, M.D.; LUDWIG, M.; LUDWIG, L.S.; ALANO, A.S.; ZARDO V; STEFFEN, V.M. Efeito tóxico dos praguicidas maneb e paraquat sobre a atividade da enzima antioxidante catalase em ratos. **Rev. Ci-ênc. Farm. Básica Apl.**, v. 27, n.1, p. 57-61, 2006.
- [4] BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quim. Nova**, v. 29, n. 1, p.113-123, 2006.
- [5] FERRO, C.O.; CHAGAS, V.L.A.; OLIVEIRA, M.F.; OLIVEIRA, P.L.; SCHANAI-DER, A. Atividade da catalase no pulmão, rim e intestino delgado não isquemiado de ratos após reperfusão intestinal. **Rev. Col. Bras. Cir.**, n. 37(1), p. 31-38, 2010.
- [6] RODRIGUES, G.R.; FONSECA, S.M.D.; BONA, S.; PORAWSKI, M.; MAR- RONI, N.A.P. Efeito da administração do extrato do Croton cajucara Benth em ratos normais. **Revista de Iniciação Científica da ULBRA** - n.3, p. 125-134, 2004.
- [7] CALADO, J.C.P.; PAULA, A.A.; OLIVEIRA, E.A.; LETRA, M.H.S.; SAWAYA, A.C.H.F.; MARCUCCI, M.C. Flavonoid Contents and Antioxidant Activity in Fruit, Vegetables and Other Types of Food. **Agricultural Sciences**, v. 6, p. 426-435, 2015.

- [8] PACHECO-PALENCIA, L.A.; MERTENS-TALCOTT, S.; TALCOTT, S.T. Chemical Composition, Antioxidant Properties, and Thermal Stability of a Phytochemical Enriched Oil from Açai (*Euterpe oleracea* Mart.). **J. Agric. Food Chem.**, v. 56, p. 4631–4636, 2008.
- [9] SCHAUSS, A.G.; WU, X.; PRIOR, R.L.; OU, B.; PATEL, D.; HUANG, D.; KABA-BICK, J.P. Phytochemical and Nutrient Composition of the Freeze-Dried Amazonian Palm Berry, *Euterpe oleracea* Mart. (Acai). **J. Agric. Food Chem.**, v. 54, p. 8598-8603, 2006.
- [10] YUYAMA, L.K.O.; AGUIAR, J.P.L.; SILVA FILHO, D.F.; YUYAMA, K.; VAREJÃO, M.J.; FÁVARO, D.I.T.; VASCONCELLOS, M.B.A.; PIMENTEL, S.A.; CARUSO, M.S.F. Caracterização físico-química do suco de açai de *Euterpe precatoria* Mart. oriundo de diferentes ecossistemas amazônicos. **Acta Amazônica.**, v. 41(4), p. 545 – 552, 2011.
- [11] HEINRICH, M.; DHANJI, T.; CASSELMAN, I. Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) – A phytochemical and pharmacological assessment of the species' health claims. **Phytochemistry Letters**, v. 4, p. 10- 21, 2011.
- [12] ZHANG, H., LIU, R.; TSAO, R. Anthocyanin-rich phenolic extracts of purple root vegetables inhibit pro-inflammatory cytokines induced by H₂O₂ and enhance antioxidant enzyme activities in Caco-2 cells. **Journal of Functional Foods**, v.22, p. 363-375, 2016.
- [13] PORCU, O.M. & RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Variation in the Carotenoid Composition of the Lycopene-Rich Brazilian Fruit *Eugenia uniflora* L. **Plant Foods Hum Nutr**, v. 63, p.195–199, 2008.
- [14] VIZZOTTO, M. Fitoquímicos em pitanga (*Eugenia uniflora* L.): seu potencial na prevenção e combate à doenças. III **Simpósio nacional do morango II Encontro sobre pequenas frutas e Frutas nativas do Mercosul**. Pelotas, RS 2006.
- [15] HUBER, L. S.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Flavonóis e flavonas: fontes brasileiras e fatores que influenciam a composição em Alimentos. **Alim. Nutr.**, v.19, n. 1, p. 97- 108, 2008.
- [16] SCHAPOVAL, E.E.S.; SILVEIRA, S.M.; MIRANDA, M.L.; ALICE, C.B.; HENRIQUES, A.T. Evaluation of some pharmacological activities of *Eugenia uniflora* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 44, p. 137-142, 1994.
- [17] VICTORIA, F.N.; LENARDÃO, E.J.; SAVEGNAGO, L.; PERIN, G.; JACOB, R.G.; ALVES, D.; SILVA, W.P.; MOTTA, A.S.; NASCENTE, P.S. Essential oil of the leaves of *Eugenia uniflora* L.: Antioxidant and antimicrobial properties. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, p. 2668–2674, 2012.
- [18] SILVA, A.M.O.; ANDRADE-WARTHA, E.R.S.; CARVALHO, E.B.T.; LIMA, A.; NOVOA, A.V.; MANCINI-FILHO, J. Efeito do extrato aquoso de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) sobre o estresse oxidativo em ratos diabéticos. **Rev. Nutr.**, n. 24(1), p. 121-130, 2011.
- [19] PETERSON, G. L. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. **Analytical Biochemistry**, v. 83, n. 2, p. 346-356, 1977.
- [20] BROINIZI, P. R. B.; ANDRADE-WARTHA, E. R. S.; SILVA, A. M. O.; NOVOA, A. J. V.; TORRES, R. P.; AZEREDO, H. M. C.; ALVES, R. E.; MANCINI-FILHO, J. Avaliação da atividade antioxidante dos compostos fenólicos naturalmente presentes em subprodutos do pseudofruto de caju (*Anacardium occidentale* L.). **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 27(4), p. 902-908, 2007.

[21] ZOPPI, C. C.; ANTUNES-NETO, J.; CATTANHO, F. O.; GOULART, L. F.; MOTTA E MOURA, N.; MACEDO, D. V. Alterações e lesão muscular em jogadores de futebol durante uma temporada competitiva. **Rev. paul. Educ. Fis.**, n. 17, p. 119- 130, 2003.

[22] RODRIGUES, A.A.A.O. & BARBONI, S.A.V. Revisão bibliográfica sobre a ausência de atividade de catalase em humanos: importância deste conhecimento para cirurgiões-dentistas. **Sitentibus**, Feira de Santana, n. 19, p. 87-98, 1998.