

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO* DE EXTRATOS ETANÓLICOS DE CEREJA-DO-RIO-GRANDE (*Eugenia involucrata* DC)

TAIANE MOTA CAMARGO¹; MARJANA RADÜNZ²; MARCIA VIZZOTTO FOSTER³; PATRÍCIA SILVA DIAZ⁴

¹Universidade Federal de Pelotas - PPGCTA – taianemcamargo@gmail.com

² Universidade Federal de Pelotas - PPGCTA – marjanaradunz@gmail.com

³Embrapa Clima Temperado – marcia.vizzotto@embrapa.br

⁴Universidade Federal de Pelotas – CDTec – bilicadiaz@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

A família Myrtaceae têm recebido destaque em estudos nos últimos anos, já que oferece uma gama variada de frutas com potenciais biológicos, como por exemplo, a capacidade antioxidante. A cereja-do-rio-grande (*Eugenia involucrata* DC), pertencente a esta família, é uma fruta nativa encontrada principalmente nas regiões Sul e Sudeste do Brasil. A mesma é consumida predominantemente *in natura*, porém possui capacidade para ser utilizada em inúmeras preparações, como sucos, geleias, licores, dentre outros (GOLLE ET AL., 2013; GIRARDELO ET AL., 2020).

Esta fruta é rica em compostos fenólicos, que são popularmente conhecidos por sua capacidade antioxidante. Dentre eles estão o ácido p-cumárico, ácido ferúlico, quercetina, miricetina, ácido gálico, dentre outros. A obtenção de compostos antioxidantes provenientes da dieta é benéfica ao organismo, pois os mesmos neutralizam compostos oxidantes, evitando assim o estresse oxidativo, que ocorre quando as espécies reativas de oxigênio (ERO'S) são produzidas em excesso, causando um desequilíbrio entre espécies antioxidantes e oxidantes, resultando, assim, em lesões em biomoléculas que ocasionam inúmeras distúrbios em nosso organismo (HALLIWELL & GUTRIDGE, 2015; NICACIO ET AL. 2017; GIRARDELO ET AL. 2020).

O estudo da atividade antioxidante, principalmente de radicais produzidos em nosso organismo, como é o caso da hidroxila (OH) e óxido nítrico (ON) se faz muito importante, visto seu importante papel no organismo, para que possa ser mensurado o efeito dos extratos, como a da cereja-do-rio-grande frente os mesmos. Porém, estudos que avaliem estes parâmetros ainda são escassos na literatura, evidenciando a importância da quantificação dos mesmos. Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antioxidante *in vitro* de extratos etanólicos de cereja-do-rio-grande (*Eugenia involucrata* DC) frente à três diferentes radicais: 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), hidroxila (OH) e óxido nítrico (ON).

2. METODOLOGIA

2.1 Aquisição da amostra

As frutas de cereja-do-rio-grande foram obtidas do campo experimental da Embrapa Clima Temperado, RS. Foram coletadas frutas completamente maduras, considerando-se a ausência de lesões e infecções visíveis, além de uniformidade de cor e tamanho. Após, as frutas foram congeladas à uma temperatura de -20 °C e posteriormente liofilizadas em liofilizador (Liobrás - L101), sendo, em seguida, trituradas em moinho de bolas (Marconi - MA 350) e armazenadas em ultra-freezer (-80°C) até o momento de análise.

2.2 Preparação do extrato

As amostras de cereja-do-rio-grande liofilizadas foram pesadas em tubos falcon e extraídas utilizando etanol 98% (concentração de 250mg/mL). Após, foram homogeneizadas utilizando homogeneizador Ultra-Turrax (Ika, Artur Nogueira, São Paulo, Brasil). Após, o mesmo foi levado ao ultrassom por 15 minutos. Posteriormente, realizou-se a filtração utilizando filtros de papel (Whatman no 4), e armazenadas a -20 °C, protegidas da incidência de luz até a análise. As extrações foram realizadas em triplicata.

2.3 Atividade sequestrante do radical 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)

A capacidade de doação de átomos de hidrogênio pelos compostos presentes nos extratos de cereja-do-rio-grande foi determinada por métodos já citados na literatura com algumas adaptações (Vinholes et al., 2011; Vinholes et al., 2014). Para tal, em uma microplaca de 96 poços foi adicionado 25 µL do extrato e 250 µL de solução de DPPH 0.6 mM. As placas foram agitadas e incubadas no escuro por 30 minutos e posteriormente foi realizada leitura em leitora de placas Spectra Max 190, em comprimento de onda de 515 nm.

2.4 Atividade sequestrante do radical hidroxila (OH)

A capacidade de captura do radical hidroxila foi avaliada de acordo com a metodologia proposta por Vinholes et al., (2014) com adaptações. À uma placa de 96 poços foram adicionados 25 µL de extrato, 110 µL de solução de sulfato de ferro heptahidratado 8 mM, 50 µL de solução de peróxido de hidrogênio 7,18 mM, e posteriormente 74,2 µL de solução de ácido salicílico 3 mM. A placa foi agitada e incubada durante 30 minutos em uma temperatura de 37°C e após procedeu-se a leitura em leitora de placas Spectra Max 190, no comprimento de onda de 515 nm.

2.5 Atividade sequestrante do radical óxido nítrico (ON)

A capacidade de captura do radical óxido nítrico foi determinada de acordo com o procedimento descrito por Vinholes e al., (2011). À uma placa de 96 poços foram adicionados 50 µL de nitroprussiato de sódio (SNP 20 mM) e 50 µL do extrato. A mistura foi incubada em temperatura ambiente, sob efeito de luz por 60 minutos. Após, foi adicionado 50 µL de solução de ácido fosfórico 2% e 50 µL do reagente de Griess. A microplaca foi incubada durante 10 minutos no escuro a temperatura ambiente e após procedeu-se a leitura em leitora de placas Spectra Max 190, no comprimento de onda de 562 nm.

2.6 Análise estatística

Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) pelo teste Tukey à 5% de significância, com o auxílio do software STATISTICA versão 6.1 (StatSoft, França).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados de atividade antioxidante, obtidas através do percentual de captura dos radicais livres DPPH, OH e ON são apresentados na Tabela 1.

Conforme observado, o radical DPPH teve a capacidade de capturar o radical com uma menor concentração de extrato ($IC_{50} = 135,33$ mg/mL). Este radical não é encontrado no organismo, porém é amplamente utilizado para medir a atividade antioxidante devido à sua estabilidade. INFANTE et al. (2016) avaliou a polpa de frutas de cereja do rio-grande observando que na concentração de 988,52

µg/mL o extrato foi capaz de capturar 50% do radical. NICÁCIO et al. (2017) também avaliou extratos de cereja-do-rio-grande frente a este radical, observando que as sementes inibem mais fortemente do que a polpa este radical.

Tabela 1. Atividade antioxidante frente aos radicais DPPH, OH e ON de extratos etanólicos de cereja-do-rio-grande (*Eugenia involucrata* DC)

Radicais	Atividade antioxidante (IC ₅₀ em mg/mL)
DPPH	135,33 ^c
OH	183,20 ^b
ON	248,46 ^a

*Letras minúsculas diferentes na coluna indicam diferença estatística.

No caso do radical OH, segundo radical mais fortemente capturado pelos extratos, a concentração necessária para capturar 50% do mesmo foi de 183,20 mg/mL. Já o radical ON foi capaz de capturar 50% do radical em uma concentração de 248,46 mg/mL. Estudos que avaliem a capacidade de captura dos radicais OH e ON por extratos de cereja-do-rio-grande são escassos na literatura, porém, tornam-se extremamente importantes já que os mesmos são produzidos em nosso organismo. O radical hidroxila (OH) é a principal espécie reativa de oxigênio, induzindo à peroxidação lipídica e causando efeitos danosos ao organismo, podendo atacar as bases nitrogenadas do DNA quando produzido em excesso (HAZRA ET AL., 2020; RADÜNZ ET AL., 2021). Também muito importante, o radical óxido nítrico (ON) é um meio de sinalização em processos inflamatórios. Porém, quando produzido em excesso, o que ocorre em condições patológicas, gera efeitos tóxicos levando à fragmentação do DNA, dano celular, e morte celular. O radical ON também atua como mediador patológico em doenças como isquemia cerebral, epilepsia, doença de Alzheimer, doença de Parkinson e outras doenças neurodegenerativas (MAIA ET AL., 2010; MOLLER ET AL., 2019).

4. CONCLUSÕES

A cereja-do-rio-grande apresentou atividade antioxidante *in vitro* frente à todos os radicais testados, sendo capaz de capturar 50% dos radicais na faixa de concentração avaliada. O melhor resultado foi observado para o radical DPPH, seguido do radical OH e ON. Estes resultados se mostram muito promissores, podendo ser um precursor para testes *in vivo*.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

GIRARDELO, J. R., MUNARI, E. L., DALLORSOLETA, J. C., CECHINEL, G., GOETTEN, A. L., SALES, L. R., ... & CONTERATO, G. M. Bioactive compounds, antioxidant capacity and antitumoral activity of ethanolic extracts from fruits and seeds of *Eugenia involucrata* DC. **Food Research International**, v. 137, p. 109615, 2020.

GOLLE, D. P., REINIGER, L. R. S., BELLÉ, R. A., & CURTI, A. R. Desinfestação superficial de explantes isolados de ramos semilenhosos e herbáceos de *Eugenia involucrata* DC.(Myrtaceae). **Cerne**, v. 19, p. 77-82, 2013.

HALLIWELL, Barry; GUTTERIDGE, John MC. **Free radicals in biology and medicine**. Oxford university press, USA, 2015.

HAZRA, B., SARKAR, R., BISWAS, S., & MANDAL, N. Comparative study of the antioxidant and reactive oxygen species scavenging properties in the extracts of the fruits of Terminalia chebula, Terminalia bellerica and Emblica officinalis. **BMC Complementary and alternative medicine**, v. 10(1), p. 20, 2010.

INFANTE, J., ROSALEN, P. L., LAZARINI, J. G., FRANCHIN, M., & ALENCAR, S. M. D. Antioxidant and anti-inflammatory activities of unexplored Brazilian native fruits. **PLoS One**, v. 11(4), p. e0152974, 2016.

MAIA, R. M., MOURA, C. W., BISPO, V. S., SANTOS, J. L., SANTANA, R. S., & MATOS, H. R. Avaliação do sequestro do óxido nítrico (NO) pelo extrato metanólico da alga Bryothamnion triquetrum (Gmelin) Howe. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, p. 489-493, 2010

MÖLLER, M. N., RIOS, N., TRUJILLO, M., RADI, R., DENICOLA, A., & ALVAREZ, B. Detection and quantification of nitric oxide-derived oxidants in biological systems. **Journal of Biological Chemistry**, v. 294(40), p. 14776-14802, 2019.

NICACIO, A. E., ROTTA, E. M., BOEING, J. S., BARIZAO, E. O., KIMURA, E., VISENTAINER, J. V., & MALDANER, L. Antioxidant activity and determination of phenolic compounds from Eugenia involucrata DC. Fruits by UHPLC-MS/MS. **Food Analytical Methods**, v. 10(8), p. 2718-2728, 2017.

RADÜNZ, M., CAMARGO, T. M., DOS SANTOS HACKBART, H. C., BLANK, J. P., HOFFMANN, J. F., STEFANELLO, F. M., & DA ROSA ZAVAREZE, E. Encapsulation of broccoli extract by electrospraying: Influence of in vitro simulated digestion on phenolic and glucosinolate contents, and on antioxidant and antihyperglycemic activities. **Food Chemistry**, V. 339, p. 128075, 2021.

VINHOLES, J., GROSSO, C., ANDRADE, P. B., GIL-IZQUIERDO, A., VALENTÃO, P., PINHO, P. G. D., & FERRERES, F. In vitro studies to assess the antidiabetic, anti-cholinesterase and antioxidant potential of Spergularia rubra. **Food Chemistry**, v. 129(2), p. 454–462, 2011.

VINHOLES, J., GONÇALVES, P., MARTEL, F., COIMBRA, M. A., & ROCHA, S. M. Assessment of the antioxidant and antiproliferative effects of sesquiterpenic compounds in in vitro Caco-2 cell models. **Food Chemistry**, v. 156, p. 204–211, 2014.