



XXV Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos

Alimentação: a árvore que sustenta a vida

X CIGR Section IV International Technical Symposium

Food: the tree that sustains life

24 a 27 de outubro de 2016 • FAURGS • GRAMADO/RS

## AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DE EXTRATOS HIDROETANÓLICOS DE GENÓTIPOS DE AÇAÍ (*Euterpe oleracea*) EM CÉLULAS SH-SY5Y

P. R. Augusti<sup>1</sup>, P. C. M. R. Torma<sup>2</sup>, A. V. Brasil<sup>3</sup>, A.V. Carvalho<sup>4</sup>, T. K. Rabelo<sup>5</sup>, A. de O. Rios<sup>6</sup>.

1- Departamento de Ciência dos Alimentos - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos - CEP 91501-970 - Porto Alegre - RS - Brasil. Telefone: 55 (51) 3308-6676 - Fax: 55 (51) 3308-6684 - e-mail: (paula.augusti@ufrgs.br)

2- Departamento de Ciência dos Alimentos - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos - CEP 91501-970 - Porto Alegre - RS - Brasil. Telefone: 55 (51) 3308-9787 - Fax: 55 (51) 3308-6684 - e-mail: (praupp.rs@gmail.com)

3- Departamento de Ciência dos Alimentos - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos - CEP 91501-970 - Porto Alegre - RS - Brasil. Telefone: 55 (51) 3308-9787 - Fax: 55 (51) 3308-6684 - e-mail: (allanavons@gmail.com)

4- Embrapa Amazônia Oriental - CEP: 66095-100 - Belém - PA - Brasil. Telefone: 55 (91) 3204-1130 - Fax: 55 (91) 3276-9845 - e-mail: (ana-vania.carvalho@embrapa.br)

5- Centro de Estudo em Estresse Oxidativo - Departamento de Bioquímica - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde - CEP 90035-003 - Porto Alegre - RS - Brasil. Telefone: 55 (51) 3308-5538 - Fax: 55 (51) 3308-5540 - e-mail: (talitabioq@gmail.com)

6- Departamento de Ciência dos Alimentos - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos - CEP 91501-970 - Porto Alegre - RS - Brasil. Telefone: 55 (51) 3308-9787 - Fax: 55 (51) 3308-6684 - e-mail: (alessandro.rios@ufrgs.br)

**RESUMO** – Danos oxidativos induzidos pelo desequilíbrio entre a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) e sistemas antioxidantes estão associados a diversas doenças, entre as quais as doenças neurodegenerativas. O sistema nervoso é particularmente suscetível a danos oxidativos devido ao alto consumo de oxigênio e baixo nível de antioxidantes. Assim, a inserção na dieta de alimentos que possuam compostos antioxidantes podem ser uma alternativa para a contenção de danos oxidativos aos tecidos biológicos, entre estes, o tecido nervoso. O objetivo deste estudo foi avaliar a toxicidade de seis diferentes genótipos de açaí (*Euterpe oleracea*) do programa de melhoramento genético desenvolvido pela Embrapa Amazônia Oriental em células SH-SY5Y. Os resultados demonstram que, em geral, os genótipos não induziram citotoxicidade podendo ser uma alternativa para fins nutricionais.

**ABSTRACT** – Oxidative damages induced by the imbalance between reactive oxygen species (ROS) generation and antioxidant system are associated to several diseases, among them neurodegenerative diseases. The nervous system is particularly susceptible to oxidative damages due to the high demand for oxygen and low antioxidant levels. Thus, the inclusion in the diet of foods with antioxidant compounds can be an option to contain these damage to biological tissues, among them, nervous tissue. The aim of this study was to evaluate the toxicity of six genotypes of açaí (*Euterpe oleracea*) from the breeding program developed by Embrapa Amazônia Oriental in SH-SY5Y cells. The results showed that, in general, genotypes did not induce cytotoxicity, allowing their application for nutritional purposes.

**PALAVRAS-CHAVE:** estresse oxidativo; antioxidantes; programa de melhoramento; células SH-SY5Y.

**KEYWORDS:** oxidative stress; antioxidants; breeding program; SH-SY5Y cells.



XXV Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos

Alimentação: a árvore que sustenta a vida

X CIGR Section IV International Technical Symposium

Food: the tree that sustains life

24 a 27 de outubro de 2016 • FAURGS • GRAMADO/RS

## 1. INTRODUÇÃO

Todas as formas de vida aeróbica estão sujeitas aos efeitos oxidantes, em função da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) durante o metabolismo (Warner, 1994). As EROs estão envolvidas em diversos processos biológicos e, em condições fisiológicas, são formadas de forma controlada devido à existência de sistemas antioxidantes (Halliwell, 2015). Entretanto, quando ocorre um desequilíbrio entre a geração de EROs e o sistema antioxidante estabelece-se uma condição de estresse oxidativo, levando a danos oxidativos às membranas celulares e associado a doenças como o diabetes, câncer e doenças neurodegenerativas (Dugo; Negis; Azzi, 2011; Rao et al., 2011; Halliwell, 2015). Com relação às doenças neurodegenerativas, como Parkinson e Alzheimer, as células neuronais são mais sensíveis ao estresse oxidativo gerado pelas EROs, pois além da natureza não replicativa, apresentam uma elevada atividade metabólica e uma baixa concentração de antioxidantes (Sayre; Perry; Smith, 2008).

Por definição, antioxidante é qualquer substância que em baixas concentrações em comparação ao substrato oxidável, regenera o substrato ou previne a oxidação do mesmo (Halliwell; Gutteridge, 1995). Estes antioxidantes podem ser de origem endógena como a superóxido dismutase, a catalase e a glutatona peroxidase, ou de origem exógena que podem ser encontrados nos alimentos como compostos fenólicos, carotenoides e vitaminas (C e E) (Galotta; Boaventura; Lima, 2008; Dugo; Negis; Azzi, 2011). Os antioxidantes exógenos podem apresentar propriedade inibitória frente a geração de EROs e ainda uma capacidade de eliminação direta, inibindo assim sua reatividade e formando produtos estáveis (Bourne; Rice-Evans, 1999).

O açaí (*Euterpe oleracea*) apresenta em sua composição concentrações de antocianinas, flavonas, ácidos fenólicos (Gordon et al., 2012) e carotenoides (Ribeiro et al., 2010), sendo a presença destes compostos bioativos associada a efeitos anti-inflamatório, anti-proliferativo e cardioprotetor relatados para o açaí (Poulose et al., 2012; Del Pozo-Insfran et al., 2006; Hogan et al., 2010; Zapata-Sudo et al., 2014). Apesar dos efeitos positivos do açaí, poucos estudos avaliaram o efeito do melhoramento genético dessa fruta sobre o teor de compostos bioativos e possível toxicidade em células. Assim o objetivo deste trabalho foi investigar o efeito de extratos hidroetanólicos de açaí melhorados geneticamente sobre a viabilidade de células SH-SY5Y.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Compostos Bioativos do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos (ICTA) e no Centro de Estudo em Estresse Oxidativo do Departamento de Bioquímica (ICBS), da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Foram utilizadas as polpas liofilizadas de seis genótipos de açaí (*E. oleracea*), provenientes do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) da Embrapa Amazônia Oriental (Belém-PA), cujos frutos foram colhidos entre novembro/2014 e fevereiro/2015, no estágio completo de maturação, quando apresentaram uma coloração roxo-escuro e uma mucilagem branca sobre a superfície. Os genótipos foram identificados como L09P09, L22P13, L11P09, L06P13, L04P16 e BRS-PA<sub>MISTA</sub>. Uma amostra comercial obtida no comércio de Belém/PA foi utilizada como amostra controle.

Com o intuito de obter extratos que futuramente pudessem ser aplicados em alimentos, utilizou-se uma solução hidroetanólica (50%) acidificada com ácido clorídrico (0,1%), como solução extratora de grau alimentício (Gómez-Plaza; Miñano; López-Roca, 2006). Assim 0,5g de cada polpa



lioofilizada foram homogeneizadas com 25 mL da solução extratora, mantidas sob agitação mecânica por 40 min, e posterior filtração à vácuo. Estas etapas foram repetidas por 3 vezes, totalizando 2 h de extração e 75 mL de extrato, que posteriormente foram ajustados a 100 mL em um balão volumétrico. Os extratos foram acondicionados em frascos âmbar e mantidos sob refrigeração até o momento da análise (Rockenbach et al., 2008).

Para a avaliação da citotoxicidade dos extratos hidroetanólicos (50%) de açaí foram utilizadas células SH-SY5Y, uma linhagem derivada de neuroblastoma humano. Esta linhagem exibe propriedades bioquímicas e funcionais semelhantes a neurônios humanos e tem sido utilizada como modelo celular *in vitro* para estudo de possíveis mecanismos de neurotoxicidade (Rabelo et al., 2012). Estas células foram obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ, RJ, Brasil). As células SH-SY5Y foram cultivadas em meio DMEM/F12 (1:1) acrescido de 10% de soro fetal bovino, mantidas a 37 °C em ambiente umidificado com 5% de CO<sub>2</sub>. O meio de crescimento celular foi substituído a cada 2 dias e os tratamentos foram realizados quando as células atingiram 90% de confluência. Após descarte do meio, as células foram tratadas com extratos hidroetanólicos dos genótipos avaliados de açaí na concentração de 50 µg/mL. Após 1 h de incubação a 37 °C, o tratamento foi removido e as células foram submetidas ao ensaio da Sulforrodamina B (SRB). Este método baseia-se na quantificação do teor de proteínas celulares (células viáveis) por coloração utilizando o corante SRB (Sigma Chemical, EUA) (Skehan et al., 1990). Os resultados foram expressos como porcentagem de incorporação da SRB. A morfologia celular também foi analisada em microscópio (Nikon Eclipse TE 300) por profissional sem conhecimentos dos grupos experimentais. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Statistica 12 (Statsoft Inc., Tulsa, USA) e resultados foram considerados significativos quando  $p < 0,05$ .

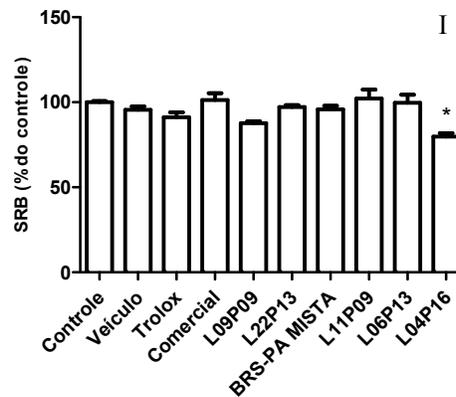
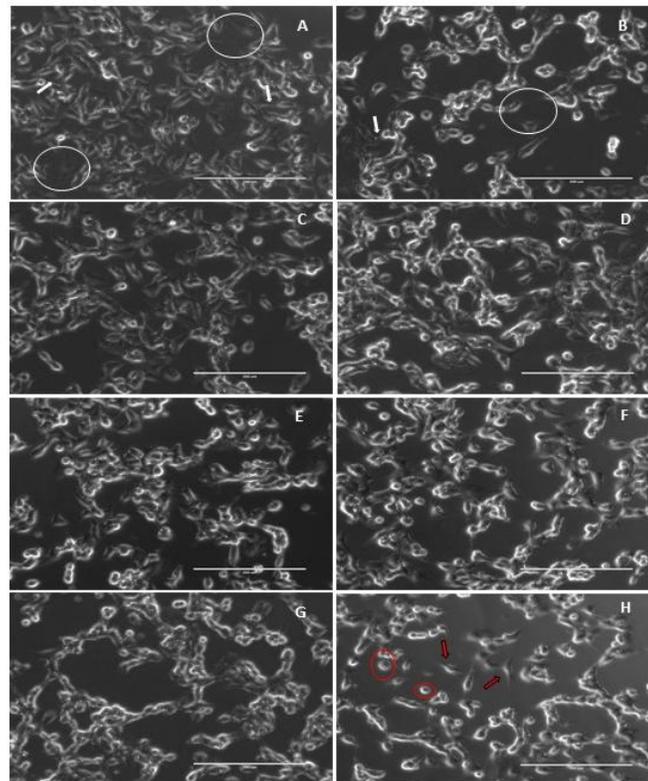
### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente estudo, a possível toxicidade de extratos hidroetanólicos de açaí (*E. oleraceae*) modificados geneticamente em células SH-SY5Y foi avaliada. Todos os genótipos (exceto L04P16) mostraram-se livres de toxicidade em células SH-SY5Y no presente estudo ( $P > 0,05$ , Fig. 1C-G, 1I). De acordo, extratos etanólicos de *Morus Alba* (70%, 0-100 µg/mL) não induziram citotoxicidade em células SH-SY5Y tratadas por 24h (Kim et al., 2010). Apenas o extrato hidroetanólico do genótipo L04P16 causou uma redução na viabilidade ( $p < 0,05$ , Fig. 1I) e alterações na morfologia celular (Fig. 1H) quando comparados as células não tratadas (Fig. 1A) e amostra comercial (Fig. 1B). Tal razão para a perda de viabilidade está possivelmente associada à modificação genética, uma vez que todos os genótipos foram cultivados sob as mesmas condições. Apesar do extrato hidroetanólico do genótipo L04P16 ter apresentado teor de antocianinas totais 4-7 vezes menores que os demais genótipos e a amostra comercial (Torma et al., 2016), os mecanismos relacionados a esse efeito ainda são desconhecidos, uma vez que as células não foram submetidas a nenhum insulto tóxico prévio. Assim, estudos adicionais devem ser conduzidos antes de conclusões acerca da toxicidade do extrato hidroetanólico do genótipo L04P16.

Figura 1 - Efeito de extratos hidroetanólicos de açaí sobre a morfologia (A-H) e viabilidade (I, 200x) de células SH-SY5Y. (A) = Células não tratadas; (B) = Amostra comercial; (C) = L09P09; (D) = L22P13; (E) = BRS-PAMISTA; (F) = L11P09; (G) = L06P13; (H) = L04P16. Dados são expressos como média ± E.P. (n=6). Células não tratadas = células sem extratos de açaí/veículo/Trolox®; Trolox = células incubadas com Trolox® 250 µM (antioxidante positivo); Açaí = células incubadas com 50 µg/mL de extrato hidroetanólico dos genótipos avaliados. Veículo = células incubadas com veículo (ácido clorídrico 0,1%/ solução hidroetanólica 50%) equivalente a concentração de 50 µg/mL;



As células em A e B (não tratadas e amostra comercial, respectivamente) apresentam arquitetura preservada com pequenas neurites (finas extensões citoplasmáticas, círculos brancos) e aglomerados celulares (setas brancas). Em C a G, a morfologia das células tratadas com extratos dos genótipos permanece inalterada e similar as células não tratadas, o que é confirmada pelo ensaio SRB (I). Em H, células tratadas com extrato hidroetanólico do genótipo L04P16 estão arredondadas (círculos vermelhos) e o processo neurítico parece ter cessado (seta vermelha).



Fonte: autor



## 4. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos sugerem que a maioria dos genótipos avaliados na forma de extrato hidroetanólico (concentração de 50 µg/mL) apresentam-se seguros para aplicações práticas, uma vez que não induziram toxicidade *per se* em células SH-SY5Y, células com características semelhantes a neurônios. A citotoxicidade apresentada pelo genótipo L04P16 necessita de futuras investigações para a continuidade do programa de melhoramento genético.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bourne, L. C., & Rice-Evans, C. A. (1999). Detecting and measuring bioavailability of phenolic and flavonoids in humans: pharmacokinetics of urinary excretion of dietary ferulic acid. *Methods in Enzymology*, 299, 91-151.
- Del Pozo-Insfran, D., Percival, S. S., & Talcott, S. T. (2006). Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) polyphenolics in their glycoside and aglycone forms induce apoptosis of HL-60 leukemia cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 4, 1222-1229.
- Dugo, L., Negis, Y., & Azzi, A. (2011). Antioxidants. *Encyclopedia of Life Sciences* (ELS), 1-9.
- Galotta, A.L.Q.A., Boaventura, M.A.D., & Lima, L.A.R.S. (2008). Antioxidant and cytotoxic activities of 'açai' (*Euterpe precatoria* Mart.). *Química Nova*, 31, 6, 1427-1430.
- Gordon, A., Cruz, A. P. G., Cabral, L. M. C., Freitas, S. C., Taxi, C. M. A. D., Donangelo, C. M., Mattietto, R. A., Friedrich, M.; Matta, V. M., & Marx, F. (2012). Chemical characterization and evaluation of antioxidant properties of Açai fruits (*Euterpe oleraceae* Mart.) during ripening. *Food Chemistry*, 133, 256-263.
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (1995). The definition and measurement of antioxidants in biological systems. *Free Radical Biology & Medicine*, 18, 1, 125-126.
- Halliwell, B. (2015). Free radicals and other reactive species in disease. *Encyclopedia of Life Sciences* (ELS), 1-9.
- Hogan, S. et al. (2010). Antiproliferative and antioxidant properties of anthocyanin-rich extract from açai. *Food Chemistry*, 118, 2, 208-214.
- Gómez-Plaza, E., Miñano, A., & López-Roca, M. (2006). Comparison of chromatic properties, stability and antioxidant capacity of anthocyanin-based aqueous extracts from grape pomace obtained from different vinification methods. *Food Chemistry*, 97, 87-94.
- Kim, H. G., Ju, M. S., Shim, J. S., Kim, M. C., Lee, S.; Huh, Y., Kim, S. Y., & Oh, M. S. (2010). Mulberry fruit protects dopaminergic neurons in toxin-induced Parkinson's disease models. *British Journal of Nutrition*, 104, 8-16.
- Poulose, S. M. et al. (2012). Anthocyanin-rich açai (*Euterpe oleracea* Mart.) fruit pulp fractions attenuate inflammatory stress signaling in mouse brain BV-2 microglial cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 1084-1093.
- Rabelo, T. K., Zeidán-Chuliá, F., Vasques, L. M., Santos, J. P. A., Rocha, R. F., Pasquali, M. A. B., Rybarczyk-Filho, J. L., Araújo, A. A. S., Moreira, J. C. F., & Gelain, D. P. (2012). Redox characterization of usnic acid and its cytotoxic effect on human neuron-like cells (SH-SY5Y). *Toxicology in Vitro*, 26, 304-314.
- Rao, S. et al. (2011). Free radicals and tissue damage: Role of antioxidants. *Free Radicals and Antioxidants*, 1, 4, 2-7.
- Ribeiro, J. C. et al. (2010). Evaluation of the genotoxic and antigenotoxic effects after acute and subacute treatments with açai pulp (*Euterpe oleracea* Mart.) on mice using the erythrocytes



XXV Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos

Alimentação: a árvore que sustenta a vida

X CIGR Section IV International Technical Symposium

Food: the tree that sustains life

24 a 27 de outubro de 2016 • FAURGS • GRAMADO/RS

micronucleus test and the comet assay. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 695, 1–2, 22-28.

Rockenbach, I. I. et al. (2008). Solvent Influence on total polyphenol content, anthocyanins, and antioxidant activity of grape (*Vitis vinifera*) bagasse extracts from Tannat and Ancelota - different varieties of *Vitis vinifera* varieties. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 28, 238-244.

Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., Warren, J. T., Bokesch, H., Kenney, S., & Boyd, M. R. (1990). New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *Journal of the National Cancer Institute*, 82, 1107–1112.

Torma, P. C. M., Carvalho, A. V., Flôres, S. H., Augusti, P. R., & Rios, A. O. (2016) in press. Hydroethanolic extraction of bioactive compounds from açai (*Euterpe oleracea*) genotypes. 18<sup>th</sup> World Congress of Food Science and Technology. Dublin, Ireland, 21 a 25 de Agosto de 2016.

Zapata-Sudo, G. et al. (2014). Oral treatment with *Euterpe oleracea* Mart. (açai) extract improves cardiac dysfunction and exercise intolerance in rats subjected to myocardial infarction. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 227, 14, 1-6.

