

Poder antioxidante dos pequenos frutos e seus efeitos benéficos para a saúde humana

Cláudia N. Santos¹, Lucélia Tavares¹, Vera Pontes¹, Pedro Oliveira³ & Ricardo B. Ferreira^{1,4}

¹Disease and Stress Biology Laboratory – Instituto de Tecnologia Química e Biológica, Av. da República, 2780-157 Oeiras, Portugal. csantos@itqb.unl.pt

²Instituto de Biologia Experimental e Tecnológica, Apartado 12, 2781-901 Oeiras, Portugal

³Unidade de Sistemas Agrários, Instituto Nacional de Recursos Biológicos, Oeiras, Portugal

⁴Departamento de Botânica e Engenharia Biológica – Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa, Tapada da Ajuda, 1349-017 Lisboa, Portugal

Resumo

Os frutos assim como outros órgãos das plantas têm na sua constituição diversos fitoquímicos, entre os quais os polifenóis, das moléculas antioxidantes mais abundantes dos alimentos. Apesar da sua ubiquidade, os seus benefícios para a saúde humana apenas começaram a ser avaliados por volta dos anos 90, e continua-se a revelar um interesse crescente, principalmente devido aos estudos epidemiológicos que sugerem a existência de uma ligação entre o consumo de alimentos e bebidas ricas em polifenóis e a redução da incidência e/ou iniciação de doenças crónicas e degenerativas, tais como as doenças cardiovasculares, ateroscleroses e alguns cancros. A investigação dos seus efeitos neuroprotectores também tem sido muito desenvolvida nos últimos 10 anos, em que se tem demonstrado claramente a sua capacidade de proteger as células neuronais em modelos *in vitro* e os seus efeitos intracelulares *in vivo*.

Será apresentada uma revisão destas evidências e em particular serão apresentados os trabalhos a decorrer no laboratório da Biologia da Doença e do Stresse sobre o poder antioxidante de pequenos frutos como as amoras silvestres, framboesa e medronho, tal como das respectivas folhas.

Palavras-chave: *Rubus* sp; *Arbustus unedo*; antioxidante intracelular; neurodegeneração.

Abstract

Antioxidant power of small fruits and its beneficial effects to human health

The fruits as well as other organs of plants in its constitution have various phytochemicals, including polyphenols, the antioxidant molecules highly abundant in foods. Despite its ubiquity, its benefits to human health only start to be evaluated in 90's, and it continues to reveal a growing interest, mainly due to epidemiological studies suggesting a link between the consumption of food and beverages rich in polyphenols and the reducing of the incidence and/or initiation of chronic and degenerative diseases such as cardiovascular disease, atherosclerosis, and some cancers. The investigation of its neuroprotective effects have being developed in the past 10 years, and it have been clearly demonstrated their ability to protect the cells either in neuronal models *in vitro* and their *in vivo* intracellular effects.

A review of the evidences will be presented and in particular the work being conducted in the laboratory of Disease and Stress Biology on the antioxidant power of

berries such as wild blackberries, raspberry and strawberry tree fruit as well as their leaves.

Keywords: *Rubus* sp; *Arbustus unedo*; intracellular antioxidant; neurodegeneration.

Introdução

Hoje em dia é frequente surgirem apelos nos meios de comunicação social e na publicidade para o consumo de alimentos ricos em antioxidantes. Tal facto deve-se aos efeitos benéficos que os compostos antioxidantes têm para a saúde humana.

No organismo, em condições normais, ocorrem reacções que originam radicais livres de oxigénio, espécies muito reactivas que causam stresse oxidativo nas células. Esta situação provoca muitos danos ao nível das várias biomoléculas existentes dentro das células e essências à vida. Normalmente este efeito é compensado pela acção de agentes e sistemas antioxidantes produzidos pelo próprio organismo e que impedem a reactividade dos radicais livres. É mantida, assim a homeostase redox no organismo. Perante uma situação de doença, este equilíbrio é frequentemente destabilizado, podendo o consumo de antioxidantes na dieta contribuir para o restabelecer do equilíbrio. Encontram-se entre os alimentos mais ricos em antioxidantes os frutos, vegetais, vinho tinto, chá, café, chocolate e as ervas aromáticas.

Os efeitos benéficos para a saúde humana do consumo de antioxidantes pensa-se, presentemente, que está para além da sua actividade antioxidante. Fala-se hoje de compostos com efeitos nutracêuticos e cujos benefícios são descritos em várias patologias: doenças cardiovasculares (relaciona-se o consumo de vinho tinto com uma baixa incidência de problemas cardiovasculares); ateroscleroses; certos tipos de cancro; obesidade; envelhecimento (associa-se a longevidade dos chineses ao consumo de chá); doenças neurodegenerativas, em que estudos epidemiológicos indiciam que o consumo de antioxidantes na dieta pode influenciar a incidência de doenças como Alzheimer e Parkinson. Os pequenos frutos são dos principais alimentos com actividade antioxidante já relacionada com efeitos benéficos nas patologias descritas.

Estão presentemente a decorrer no laboratório da Biologia da Doença e do Stress estudos sobre o poder antioxidante de pequenos frutos como a framboesa, amoras silvestres e medronho e também das respectivas folhas. Numa primeira fase é feita a pesquisa de extractos que exibam bioactividade por métodos químicos/bioquímicos: fenóis totais; flavonóides; capacidade antioxidante (para os radicais hidroxilo e para os radicais peroxilo); perfil de HPLC; e a capacidade inibitória de metaloproteases. Os extractos com bioactividade são sujeitos a uma confirmação dos seus efeitos bioactivos (neuroprotector, anticancerígeno) em linhas celulares humanas. Irão apenas ser apresentados os estudos que incidem na capacidade antioxidante dos extractos das plantas e avaliado o seu efeito neuroprotector.

Material e métodos

Material vegetal: Frutos e folhas de *Rubus idaeus*, *Rubus vigoii*, *Rubus sampaioanus*, *Rubus brigantinus*, *Rubus genevieri* e *Arbustus unedo* foram colhidos e mantidos a -80 °C até serem analisados.

Extracção dos fenóis: Os frutos e as folhas foram macerados a um pó fino e foi feita uma extracção hidroetanólica na proporção 6 mL. g⁻¹ peso fresco. A mistura foi agitada durante 30 min à temperatura ambiente, centrifugada a 12400 g durante 10 min e o sobrenadante filtrado com uma membrana de acetato de celulose de 0.20 µm e guardado a -80 °C.

Determinação dos fenóis totais: A determinação dos fenóis totais foi realizada pelo método Folin-Ciocalteu [1]. O ácido gálico (GA) foi utilizado como padrão e os resultados expressos como mg GAE. g⁻¹ peso seco (GAE-“gallic acid equivalent”).

Capacidade antioxidante *in vitro*: A capacidade de captar radicais peróxido foi determinada pelo método ORAC (do inglês “Oxygen Radical Absorbance Capacity”) [3, 4]. Os resultados foram expressos como mmol TE. 100 g⁻¹ peso seco (TE-“trolox equivalent”), sendo utilizado o Trolox como padrão.

Capacidade antioxidante intracelular: Células de neuroblastomas foram pré-incubadas durante 1 hora com os extractos das plantas e depois foram incubadas com H₂O₂ (1 mM) durante 1 hora. A viabilidade celular foi posteriormente avaliada com o kit CellTiter-Blue®. O efeito antioxidante foi analisado pelo incremento na % de viabilidade celular, em que no controlo do stresse oxidativo com 1 mM H₂O₂ durante 1 hora obteve-se apenas 25 % de células viáveis.

Resultados e discussão

Monitorizou-se o conteúdo em fenóis totais e actividade antioxidante para os frutos e folhas de *Rubus* endémicos do Norte de Portugal colhidos nas zonas indicadas na Figura 1 e sempre comparados com a uma espécie de *Rubus* cultivada (*Rubus idaeus*), a framboesa, oriunda da Herdade Experimental da Fataca, Odemira. Como se pode constatar na Figura 2 os frutos dos *Rubus* endémicos, com excepção do *R. genevieri*, são comparativamente a uma espécie de *Rubus* cultivada (*Rubus idaeus*) mais ricos em compostos fenólicos, o que se reflecte numa maior capacidade antioxidante para captar os radicais peróxido. O *R. genevieri* apresenta um conteúdo em fenóis totais consideravelmente mais elevado que o detectado na framboesa o que não se reflecte numa maior capacidade antioxidante para captar os radicais peróxido. Poderá ser interessante a avaliação deste extracto para a capacidade de captar outras espécies reactivas com importância biológica como o radical hidroxilo.

O medronho (*Arbutus unedo*) foi igualmente avaliado para a bioactividade de antioxidante. Este fruto, colhido na Serra da Arrábida, é característico das regiões mediterrâneas embora não esteja introduzido directamente na dieta alimentar. A avaliação química dos fenóis totais e da actividade antioxidante foi realizada para os frutos e folhas. No que respeita aos frutos e comparativamente à framboesa, o medronho tem níveis totais em fenóis e uma actividade antioxidante equivalente (Figura 2).

No que respeita à avaliação das folhas de género *Rubus* (Figura 3), curiosamente, os níveis de fenóis totais são aproximados entre as várias espécies, mas existe uma grande variação na actividade antioxidante detectada e significativamente superior à da folha de framboesa. Os resultados indicam que os frutos de *Rubus* endémicos de Portugal são muito ricos em antioxidantes e as folhas das mesmas espécies apresentam níveis ainda mais elevados de capacidade antioxidante. Torna-se no entanto necessário confirmar o potencial genético destas plantas como fontes ricas de antioxidantes submetendo as plantas às mesmas condições edafoclimáticas. Para o efeito já se iniciou a sua adaptação em estufa (Figura 4) e já se encontram presentemente num campo experimental e aguarda-se a produção de frutos para nova avaliação dos parâmetros

O medronho não apresentou nos testes efectuados uma capacidade antioxidante notória, mas em contrapartida as suas folhas revelaram-se uma fonte promissora de um extracto natural enriquecido em fitoquímicos antioxidantes (Figura 3).

Após os testes de avaliação da capacidade antioxidante *in vitro*, procedeu-se à avaliação da capacidade antioxidante intracelular numa linha celular de neurónios

humanos, os neuroblastomas SK-N-MC. Optou-se por uma linha de neuroblastomas já que nas doenças neurodegenerativas, um dos factores preponderantes é o aumento da produção de espécies reactivas intracelulares. A capacidade antioxidante intracelular foi avaliada pelo aumento percentual da sobrevivência das células perante um stresse oxidativo quando pré-incubadas com os extractos com os fitoquímicos das plantas comparativamente a quando não incubadas (*vide* métodos). As concentrações em fenóis que foram testadas neste teste foram previamente definidas por testes de citotoxicidade obtidos pela incubação com concentrações crescentes em fenóis e para os quais a viabilidade celular é avaliada pelo kit CellTiter-Blue®.

Os testes à capacidade antioxidante intracelular foram apenas realizados nesta fase para a framboesa e medronho e para as folhas de medronheiro. Na figura 5 pode-se constatar que a actividade antioxidante detectada *in vitro* para a framboesa confirma-se no modelo celular, já que uma pré-incubação destes extractos consegue aumentar significativamente a percentagem de sobrevivência dos neuroblastoma perante um stresse oxidativo. Relativamente ao medronho, o extracto deste fruto não revelou qualquer eficácia perante este teste ou seja não alterou a taxa de sobrevivência das células (dados não mostrados). Por outro lado a folha de medronheiro (Figura 6) apresentou uma actividade neuroprotectora muito significativa, verificou-se que a pré-incubação com 30 g de GAE.ml⁻¹ consegue aumentar cerca de em 86% a viabilidade celular das células após um stresse oxidativo.

Estes resultados preliminares são bons indicadores do potencial que os extractos estudados têm como fontes em compostos fitoquímicos antioxidantes naturais. A actividade antioxidante intracelular deverá ser confirmada por citometria de fluxo. Este e outros estudos serão realizados para confirmar o potencial destes compostos como ingredientes activos na formulação de suplementos alimentares, cosméticos ou em produtos farmacêuticos.

Agradecimentos

Pela recolha do material na Serra da Nogueira e Parque natural de Montesinho o Eng. Carlos Aguiar do Centro de Investigação da Montanha, Instituto Politécnico de Bragança. Pela identificação botânica e arquivo de espécime em herbário à Doutora Dalila Espírito Santo do Jardim Botânico da Ajuda do Instituto Superior de Agronomia.

À FCT pelo apoio financeiro dado a C. Santos (SRFH/BPD/26562/2006) e L. Tavares (SFRH/BD/37382/2007).

Referências

- Cao G, Alessio HM & Cutler RG. (1993) Oxygen radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Radic Biol Med.* 14:303-311.
- Michalska, A. Ceglinska, A. Zielinski, H. (2007) Bioactive compounds in rye flours with different extraction rates. *Eur Food Res Technol* 225:545-551.
- Singleton V. L. & Rossi JA. (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* 16:144-158.
- Wang SY & LinHS. (2000) Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry and strawberry varies with cultivar and developmental stage. *J Agric Food Chem.* 48:140-146.

Quadros e figuras

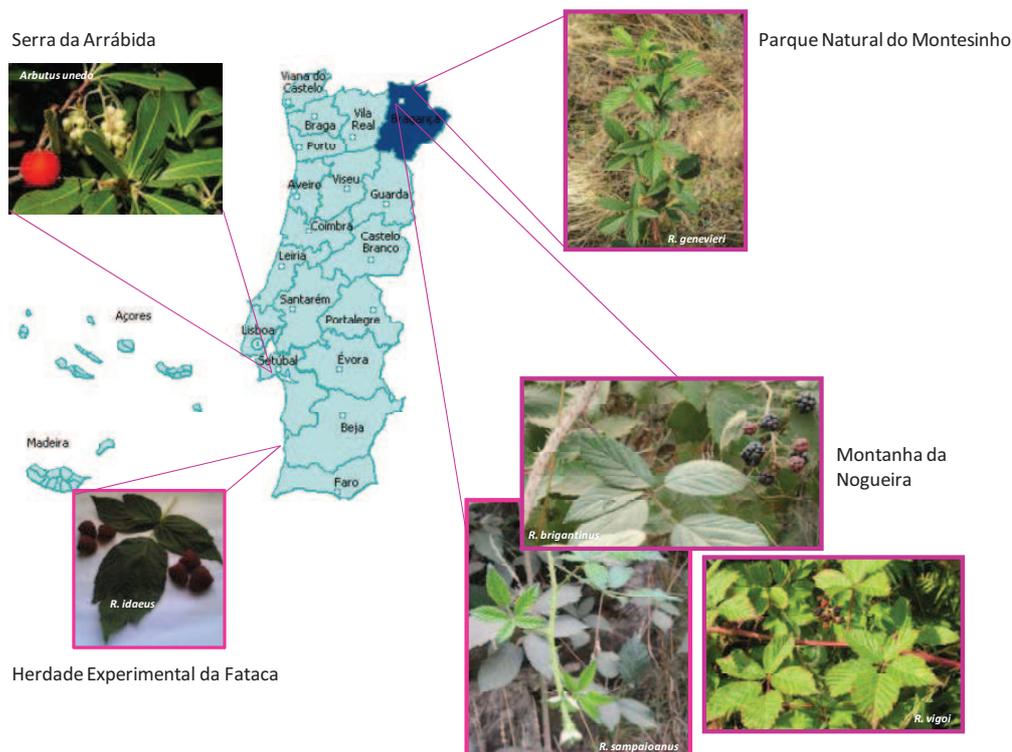


Figura 1 – Localização aproximada e fotos no local de colheita das espécies de *Rubus* endémicas indicadas, *Rubus idaeus* e de *Arbutus unedo*.

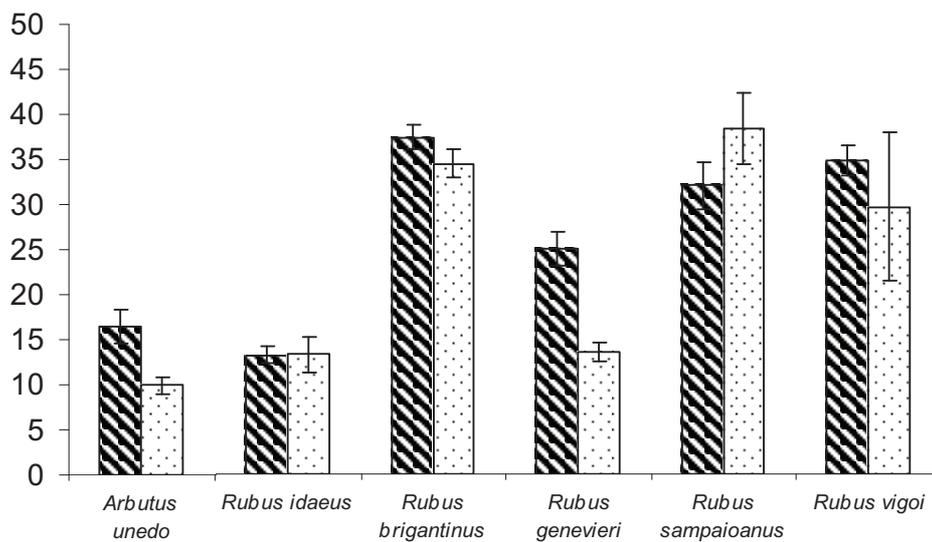


Figura 2 – Conteúdo em fenóis totais e capacidade antioxidante *in vitro* dos extractos de frutos das espécies indicadas. Valores obtidos do doseamento dos fenóis totais (mg GAE g⁻¹ ps) , e do método ORAC (mmol TE 100 g⁻¹ ps) (vide métodos).

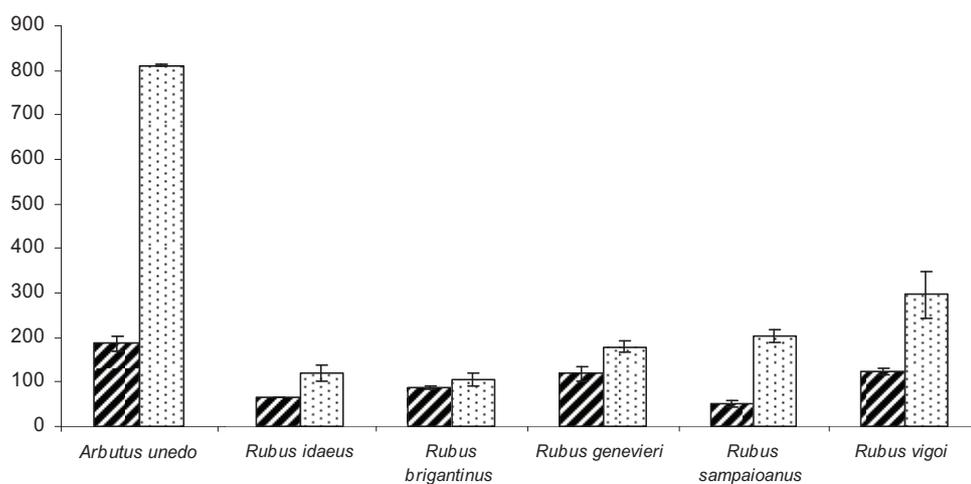


Figura 3 – Conteúdo em fenóis totais e capacidade antioxidante *in vitro* dos extractos de folhas das espécies indicadas. Valores obtidos do doseamento dos fenóis totais (mg GAE g⁻¹ ps) e do método ORAC (mmol TE 100 g⁻¹ ps) (vide métodos).



Figura 4 - Aclimatização em estufa dos *Rubus* endémicos da zona envolvente da área de Bragança

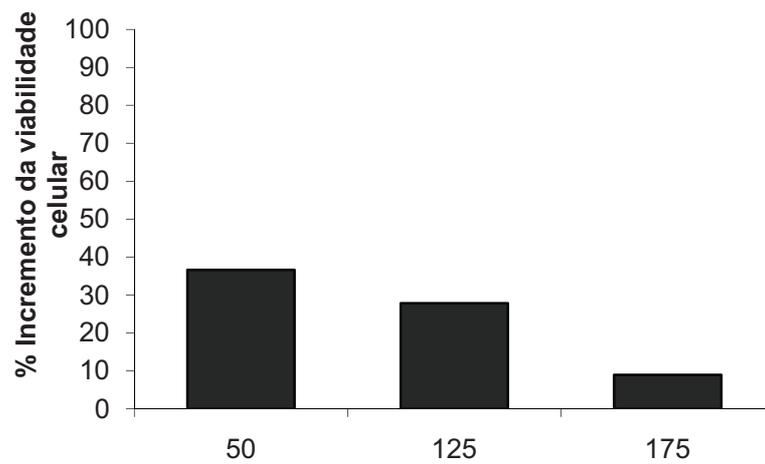


Figura 5 - Incremento da % de viabilidade celular do neuroblastoma SK-N-MC perante um stress oxidativo induzido após a pré-incubação com extractos de framboesa (*Rubus idaeus*) (vide métodos).

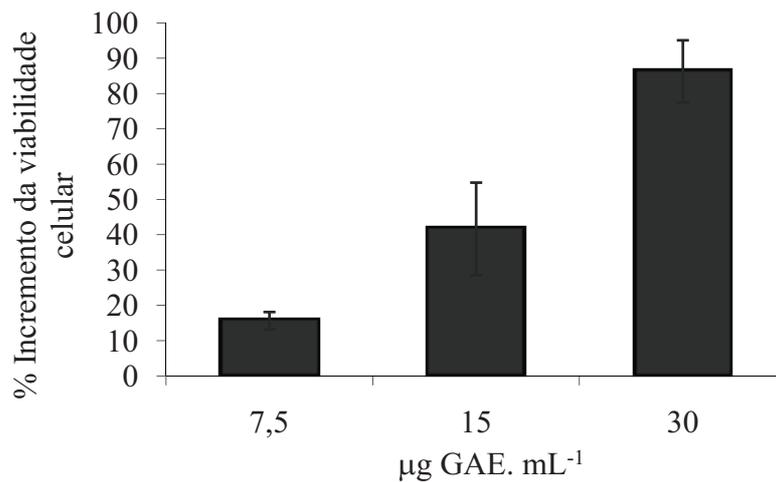


Figura 6 - Incremento da % de viabilidade celular do neuroblastoma SK-N-MC perante um stress oxidativo induzido após a pré-incubação dos extractos de folhas de medronheiro (*Arbustus unedo*) (vide métodos).