Potencial anti-inflamatório *in vitro* do polissacarídeo bruto extraído de amora-preta *(Rubus fruticosus)*

Adriana Rute Cordeiro[1]; Iglesias de Lacerda Bezerra[1]; Ana Flávia de Oliveira[1]; Guilherme Lanzi Sassaki[1].
[1] Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, 81.531-980, Brasil.
Autor correspondente: adriana.rcordeiro@gmail.com

Resumo: O objetivo do estudo foi analisar os polissacarídeos extraídos da amora-preta (*Rubus fruticosus*) e avaliar quanto a sua atividade anti-inflamatória na linhagem celular RAW 264.7 estimuladas com LPS (2 μg/mL). Observou-se que os polissacarídeos reduziram acentuadamente a produção de óxido nítrico (NO) e citocinas pró-inflamatórias (TNF-α e IL-1β) nas células tratadas com LPS.

Palavras-chave: Polissacarídeos; anti-inflamatório; citocinas.

Introdução

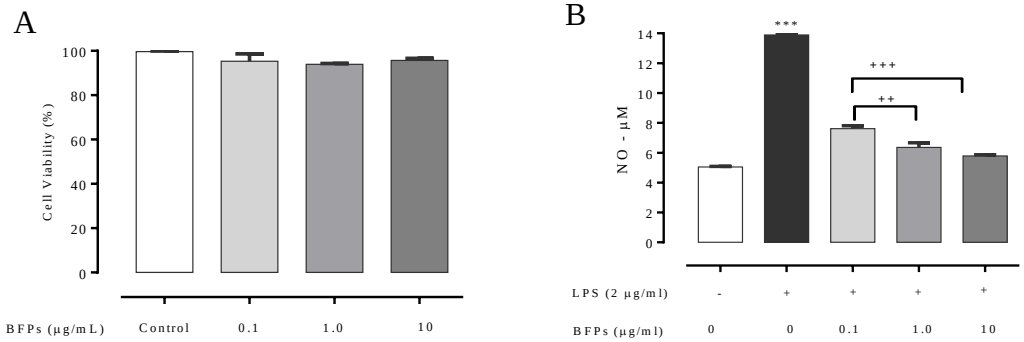
Por centenas de milhares de anos, os seres humanos têm usado os recursos naturais para diferentes fins, inclusive medicinais e nutricionais (Weli et al., 2020). O consumo regular de frutas é vital para uma dieta equilibrada e nutritiva e está associado ao risco reduzido de várias doenças, como inflamação, diabetes, câncer, doenças cardiovasculares, aterosclerose, cataratas entre outras (Schulz and Chim, 2019). *Rubus fruticosus* (Rosaceae) é um arbusto medicinal chamado de amoreira, é uma árvore conhecida sazonalmente devido aos seus famosos frutos. Dependendo da espécie a planta produz frutos vermelhos, violetas, brancos ou pretos, que são chamados de amora. É uma cultura comercializada em todo o mundo por causa do sabor agradável, a fruta tem valor medicinal, cosmético e nutritivo. É uma fonte concentrada de nutrientes valiosos, além de constituintes bioativos de interesse terapêutico, destacando sua importância como alimento funcional (Gomar et al., 2014). Além de ser usado como fruta fresca, também é usado como ingrediente em pratos cozidos, saladas e produtos de panificação, como geléias, lanches, sobremesas e conservas de frutas. *R. fruticosus* contém vitaminas, esteróides e lipídios em óleos e minerais de sementes, flavonóides, glicosídeos, terpenos, ácidos, taninos e polissacarídeos que possuem diversas atividades farmacológicas, como antioxidante, anti-carcinogênico, antimicrobiano, antidiabético, antidiarréico, antiviral e anti-inflamatório (Rao and Snyder, 2010). Os polissacarídeos estão presentes na amora-preta e tem influência importante nas suas ações farmacológicas diversos estudos relatam que polissacarídeos de fontes naturais são substâncias não-toxicas e que apresentam uma variedade de atividades farmacológicas como: anti-oxidadante (Pristov et al., 2011), immunomoduladora (Ding et al., 2015), antinociceptiva (do Nascimento et al., 2015), gastroprotetora (Cantu-Jungles et al., 2014), e anti-inflamatória (Cordeiro Caillot et al., 2018). O objetivo desse estudo foi realizar a extração dos polissacarídeos da *R. fruticosus* e avaliar sua atividade anti-inflamatória. A avaliação da atividade anti-inflamatória foi realizada com LPS estimulando macrófagos murinhos RAW 264.7 *in vitro*.

Metodologia

500g amora foram liofilizados e moídos. Os frutos secos foram desengordurados com clorofórmio-metanol (2:1) para remover lipídios, pigmentos e outros materiais hidrofóbicos. Os polissacarídeos foram extraídos do resíduo com água a 100 ° C por 2h. Os extratos aquosos foram combinados e concentrados sob pressão reduzida. Os polissacarídeos foram recuperados por precipitação com etanol (3:1). Coletados por centrifugação (2800 × g, 20 min a 4 ° C) e liofilizados. Em seguida foi realizado um tratamento de congelamento e descongelamento para gerar BFPs (Polissacarídeos brutos da amora solúveis em água fria) essa fração foi testada em uma linhagem de macrófagos murinos RAW 264.7 e cultivada em meio de cultura DMEM (Invitrogen, San Diego, CA , EUA) contendo 10% de soro bovino fetal (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) e 20 mM de bicarbonato de sódio. Os macrófagos RAW 264,7 murinos foram tratados com diferentes concentrações de BFPs (0,1, 1,0 e 10 µg/mL) e, depois de uma hora, induzidos com LPS (2 µg/mL). A atividade foi avaliada em sobrenadantes da cultura usando 100 µl do sobrenadante da cultura e submetidos a ensaios de citocinas e NO. Os níveis de citocina interleucina-1β (IL-1β) e fator de necrose tumoral (TNF-α) foram avaliados usando um kit de ensaio imunoenzimático (ELISA) (eBioscience), de acordo com as recomendações do fabricante. A concentração de nitrito foi utilizada para quantificar a produção de NO. O reagente de Griess (50 µl) foi adicionado a 50 µl do sobrenadante coletado e a absorbância foi lida a 545 nm.

Resultados e Conclusões

Para avaliar o efeito atividade anti-inflamatória da fração polissacarídica testada BFPs foram avaliados a viabilidade de celular por meio do ensaio de MTT, observando que não houve diferença significativa das doses testadas, os níveis afetados de NO após a estimulação de LPS (2 µg/mL). Sem LPS, o nível de NO nos macrófagos era baixo e com LPS 56% maior. As amostras tratadas com BFPs nas concentrações de 0,1, 1 e 10 µg/mL diminuíram significativamente a produção de NO induzido por LPS em 46,8%, 54,9% e 58,0%. Os macrófagos ativados podem produzir citocinas pró-inflamatórias, como TNF-α e IL-1β, que desempenham um papel importante no início, desenvolvimento e resolução da inflamação (Koh and DiPietro, 2011). Os efeitos da fração BFPs na secreção de TNF-α e IL-1β foram investigados cultivando os macrófagos RAW 264.7 com uma combinação de amostras de LPS (2 µg/mL) e BFPs (0,1, 1 e 10 µg/mL). BFPs inibiu a produção de TNF-α e IL-1β induzida por LPS, em comparação com o controle LPS com inibição máxima de TNF-α (48,4%, 47,9% e 60,6%) e IL-1β (36,8%, 42,8% e 53,8%) todos os resultados são apresentados na figura 1.



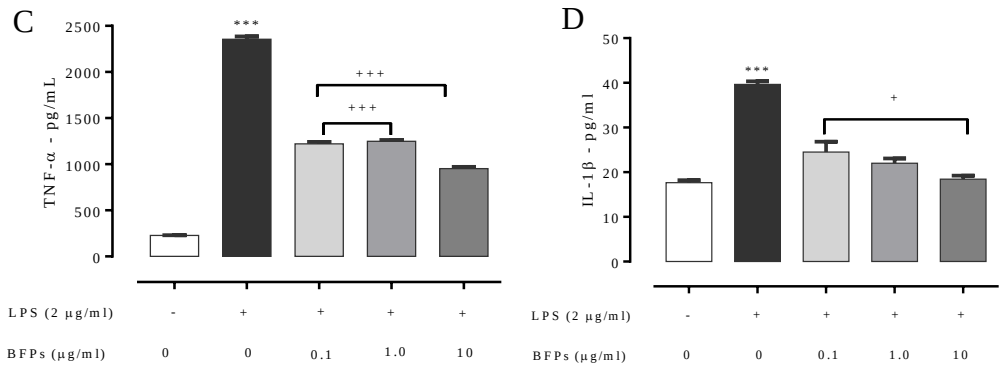


Fig. 1. A viabilidade celular de polissacarídeos se apresenta em amora tratada com células RAW 264.7 na presença de LPS. A viabilidade de células sem amostra e LPS foi tomada como referência (100%) - controle positivo (A). A concentração de NO no sobrenadante da cultura foi determinada pelo ensaio de Griess usando a curva padrão de nitrito de sódio (B). A concentração de TNF-in no sobrenadante da cultura foi determinada por ELISA usando a curva padrão (C). A concentração de IL-1β no sobrenadante da cultura foi determinada por ELISA usando a curva padrão (D).

Todos os dados são apresentados como média ± DP de três conjuntos de experimentos independentes. * $p < 0,05$ representa diferença significativa com células tratadas apenas com LPS (controle positivo) em comparação com frações. + $p < 0,05$ representa diferença significativa entre as frações.

Os resultados indicam que o tratamento com BFPs em células estimuladas por LPS inibiu significativamente os níveis de NO, TNF-α e IL-1β de maneira dose-dependente, comprovando assim a atividade anti-inflamatória na fração polissacarídica testada.

Referencias:

Cantu-Jungles, T.M., Maria-Ferreira, D., da Silva, L.M., Baggio, C.H., Werner, M.F.d.P., Iacomini, M., Cipriani, T.R., and Cordeiro, L.M.C. (2014). Polysaccharides from prunes: Gastroprotective activity and structural elucidation of bioactive pectins. Food Chemistry *146*, 492-499.

Cordeiro Caillot, A.R., de Lacerda Bezerra, I., Palhares, L.C.G.F., Santana-Filho, A.P., Chavante, S.F., and Sassaki, G.L. (2018). Structural characterization of blackberry wine polysaccharides and immunomodulatory effects on LPS-activated RAW 264.7 macrophages. Food Chemistry *257*, 143-149.

Ding, H.H., Cui, S.W., Goff, H.D., Chen, J., Wang, Q., and Han, N.F. (2015). Arabinan-rich rhamnogalacturonan-I from flaxseed kernel cell wall. Food Hydrocolloids *47*, 158-167.

do Nascimento, G.E., Corso, C.R., de Paula Werner, M.F., Baggio, C.H., Iacomini, M., and Cordeiro, L.M.C. (2015). Structure of an arabinogalactan from the edible tropical fruit tamarillo (Solanum betaceum) and its antinociceptive activity. Carbohydrate Polymers *116*, 300-306.

Gomar, A., Hosseini, A., and Mirazi, N. (2014). Preventive effect of Rubus fruticosus on learning and memory impairment in an experimental model of diabetic neuropathy in male rats. PharmaNutrition *2*, 155-160.

Koh, T.J., and DiPietro, L.A. (2011). Inflammation and wound healing: the role of the macrophage. Expert Reviews in Molecular Medicine *13*.
Pristov, J.B., Mitrović, A., and Spasojević, I. (2011). A comparative study of antioxidative activities of cell-wall polysaccharides. Carbohydrate Research *346*, 2255-2259.
Rao, A.V., and Snyder, D.M. (2010). Raspberries and human health: a review. J Agric Food Chem *58*, 3871-3883.
Schulz, M., and Chim, J.F. (2019). Nutritional and bioactive value of Rubus berries. Food Bioscience *31*, 100438.
Weli, A.M., Al-Saadi, H.S., Al-Fudhaili, R.S., Hossain, A., Putit, Z.B., and Jasim, M.K. (2020). Cytotoxic and antimicrobial potential of different leaves extracts of R. fruticosus used traditionally to treat diabetes. Toxicology Reports *7*, 183-187.