

EFEITO NEUROPROTETOR DA ASSOCIAÇÃO DE EXTRATO DE AÇAÍ (*Euterpe oleracea* Mart.) E ÁCIDO VALPROICO EM NEURÔNIOS COM DISFUNÇÃO MITOCONDRIAL¹

NEUROPROTECTIVE EFFECT OF AÇAÍ (*Euterpe oleracea* Mart.) EXTRACT ASSOCIATED TO VALPHORIC ACID IN NEURONS WITH MITOCHONDRIAL DYSFUNCTION¹

**Mariana Ribeiro², Gabriela Geraldo Sangoi³, Thuany Lura Bandeira⁴,
Renata Schio⁵, Rafaela Dornelles⁶, Diulie Valente de Souza⁷, Tuyla Fontana⁸,
Michele Rorato Sagrillo⁹, Aline Ferreira Ourique¹⁰ e Alencar Kolinski Machado¹¹**

RESUMO

As doenças neuropsiquiátricas têm sido de grande preocupação para a saúde mundial devido a seus elevados índices nos últimos anos. Diversos estudos sugerem que há uma relação entre essas doenças e a disfunção mitocondrial que desempenha um papel crítico na progressão dessas patologias. Já existem protocolos medicamentosos bem estabelecidos para o tratamento desses distúrbios, como o uso de fármacos antipsicóticos e estabilizadores do humor, a exemplo do ácido valproico. Todavia, os efeitos adversos indesejados acabam, em muitos casos, comprometendo a assiduidade do indivíduo ao tratamento. Diante disso, é importante a busca por novas alternativas com caráter terapêutico que minimizem esses efeitos danosos. O *Euterpe oleracea* Mart., conhecido como açaí, é um fruto encontrado na região amazônica brasileira, utilizado também como produto medicinal e que vem sendo estudado por conter propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias. Dada essa associação proposta, este estudo analisou o potencial efeito neurofarmacológico *in vitro* de *Euterpe oleracea* na modulação da função mitocondrial e no metabolismo oxidativo juntamente do ácido valproico em células SH-SY5Y, tratadas com rotenona para a indução da disfunção mitocondrial. Os resultados mostraram que o extrato de açaí por si próprio ou em associação com o ácido valproico é capaz de manter a viabilidade celular, diminuir os níveis de óxido nítrico (ON) e manter os níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO) de maneira basal, sendo sugestivo como produto natural de associação coadjuvante no tratamento de sujeitos acometidos por doenças psiquiátricas.

Palavras-chave: Alimentos funcionais, doenças neuropsiquiátricas, estabilizadores do humor.

ABSTRACT

Neuropsychiatric diseases have been of great concern to world health due to their high rates in recent years. Several studies suggest that there is a relationship between these diseases and mitochondrial dysfunction

1 Trabalho Final de Graduação - TFG.

2 Egressa do curso de Biomedicina da Universidade Franciscana.

3 Discente a nível de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Nanociências da Universidade Franciscana.

4 Discente a nível de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Nanociências da Universidade Franciscana.

5 Egressa do curso de Biomedicina da Universidade Franciscana.

6 Discente a nível de doutorado do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Maria.

7 Discente a nível de doutorado do Programa de Pós-Graduação em Nanociências da Universidade Franciscana.

8 Discente do curso de Biomedicina da Universidade Franciscana.

9 Docente do Programa de Pós-Graduação em Nanociências da Universidade Franciscana.

10 Docente do Programa de Pós-Graduação em Nanociências da Universidade Franciscana.

11 Docente do Programa de Pós-Graduação em Nanociências da Universidade Franciscana e Pesquisador do Departamento de Farmacologia e Toxicologia da University of Toronto.

playing a critical role in the progression of these pathologies. There are already established protocols drugs for the treatment of such diseases as the use of antipsychotic drugs and mood stabilizers such as valproic acid that may contribute their properties in the treatment of these diseases. However, undesirable side effects end up, in many cases, compromising the individual's attendance to treatment. In view of this, it is important to search for new therapeutic alternatives that minimize these harmful effects. Euterpe oleracea Mart., Known as açai, is a fruit found in the Brazilian Amazon region, also used as a medicinal product and has been studied for its antioxidant and anti-inflammatory properties. Given this proposed association, this study analyzed the potential in vitro neuropharmacological effect of Euterpe oleracea on the modulation of mitochondrial function and oxidative metabolism together with valproic acid in SY5Y SH cells treated with rotenone for the induction of mitochondrial dysfunction. The results showed that açai extract by itself or in combination with valproic acid is able to keep cellular viability, decrease nitric oxide (ON) levels by maintaining the levels of reactive oxygen species (ROS) in a basal manner, being suggestive as a potential natural product in the supporting therapy of subjects with psychiatric diseases.

Keywords: *functional foods, mood stabilizers, neuropsychiatric diseases.*

INTRODUÇÃO

Os problemas de saúde mental são responsáveis por uma morbidade significativa no mundo, ocupando o primeiro lugar entre a classificação de doenças mais prevalentes, superando, por exemplo, várias doenças crônicas não transmissíveis. Dentre as doenças mentais mais comuns encontram-se a depressão e o transtorno de ansiedade, seguindo pela esquizofrenia e pelo transtorno bipolar (TB) (ROCHA e PAPROCKI, 2015). Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (2002), os transtornos mentais ou problemas psicossociais, assim como os relacionados a álcool e drogas, atingem cerca de 450 milhões de pessoas. Apesar dos elevados índices de prevalência, ainda não há total entendimento dos aspectos fisiopatológicos e da progressão das doenças neuropsiquiátricas. No entanto, pesquisas recentes vêm buscando avançar nesse sentido. Há evidências, por exemplo, de que os indivíduos com transtornos psiquiátricos apresentam desequilíbrios mitocondriais a nível estrutural e funcional, o que pode comprometer o funcionamento da organela (SHAO *et al.*, 2008).

Sabe-se que as mitocôndrias executam funções importantes no metabolismo energético das células, incluindo os neurônios, sendo mais de 90% da adenosina trifosfato (ATP), necessária para diversos propósitos biológicos e produzida por essa organela através do processo de fosforilação oxidativa. Com a produção de ATP, a cadeia de transporte de elétrons acaba também produzindo radicais livres, os quais são necessários para alguns propósitos específicos intracelulares e para mediar processos de sinalização (NASSEH *et al.*, 2001). Porém, quando há alguma falha nesse mecanismo, pode haver uma grave deficiência de energia, gerando como consequência a redução dos canais de cálcio e a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) e/ou de nitrogênio (ERN) nos neurônios, conduzindo ao desequilíbrio chamado estresse oxidativo (RAJASEKARAN *et al.*, 2015). Logo, essa disfunção mitocondrial resulta em alterações na cascata bioquímica, bem como do funcionamento celular, conduzindo a uma perda da homeostase celular. O dano a cadeia de transporte de elétrons tem sido sugerido como um fator

de impacto na patogênese de muitos distúrbios psiquiátricos, como o transtorno depressivo, a esquizofrenia e o TB (CHANG *et al.*, 2015; ANDREAZZA *et al.*, 2007; ANDREAZZA *et al.*, 2010). Sendo assim, diversas evidências vêm demonstrando que o tecido cerebral é bastante sensível ao estresse oxidativo, o qual pode desencadear os transtornos de humor (STRECK *et al.*, 2013).

Existem relatos de que fármacos estabilizadores do humor e antipsicóticos possuem capacidade de produzir efeitos antioxidantes que podem contribuir para suas propriedades neuromoduladoras funcionais (CHIU *et al.*, 2013). Apesar disso, sabe-se que esses fármacos possuem a capacidade de provocar muitos efeitos adversos importantes em alguns indivíduos, o que pode causar outros danos na saúde do paciente (ZAGO *et al.*, 2015). Dentre os mais utilizados, pode-se citar o ácido valproico, um medicamento de primeira linha no tratamento de mania aguda e na prevenção de mania (ROSENBERG, 2007), fármaco estabilizador do humor muito prescrito por psiquiatras. Entretanto, seu uso tem acarretado em preocupações relacionadas à toxicidade, à teratogenicidade, a comorbidades e à estabilidade do paciente, ou seja, esses efeitos devem ser criteriosamente considerados (CHIU *et al.*, 2013). Diante disso, alguns estudos relatam seus efeitos adversos, quais sejam: aumento de peso corporal, defeitos cardíacos e congênitos, diminuição do potencial reprodutivo, entre outros, devido ao seu uso em doses elevadas durante longos períodos (CHATEAUVIEUX *et al.*, 2010). Uma pesquisa realizada por Finsterer e Scorza (2017) descreve que o ácido valproico possui capacidade de por si próprio atuar a nível mitocondrial, causando efeitos danosos; sendo assim, esse fármaco é classificado como possuidor de efeito de toxicidade mitocondrial. Logo, a busca por potenciais alternativas terapêuticas e/ou que possam ser utilizadas no intuito de reduzir a concentração de tal fármaco, mantendo o efeito positivo, é de grande interesse científico. Nesse campo destacam-se os produtos naturais com potenciais neuroprotetores.

O *Euterpe oleracea* Mart., conhecido popularmente como açaí, é um fruto encontrado na região amazônica, utilizado como produto natural medicinal e também alimento básico em muitas regiões do Brasil. Ultimamente, a polpa desse fruto ganhou grande atenção como alimento funcional por causa de seus benefícios nutricionais e terapêuticos. O extrato seco de açaí é composto por muitos nutrientes, o que inclui principalmente lignanas, fibras e polifenóis (POULOSE *et al.*, 2014; BONOMO *et al.*, 2014). A presença de compostos bioativos, principalmente de fenólicos, tem sido associada ao poder antioxidante e anti-inflamatório do açaí, pois tem a função de prevenir a produção e neutralizar ERO e ERN, podendo estar relacionado à prevenção de várias doenças (BARBOSA *et al.*, 2016).

Levando isso em consideração, este estudo foi desenvolvido para fins de avaliação dos efeitos do extrato hidroalcoólico liofilizado do açaí sobre células SH-SY5Y com deficiência do complexo mitocondrial I induzido por rotenona. O principal objetivo desta pesquisa é analisar se o extrato de *Euterpe oleracea* Mart. tem capacidade de reverter a disfunção mitocondrial induzida pela exposição à rotenona, protegendo contra os efeitos do desequilíbrio celular, como também minimizar os efeitos causados pelo fármaco ácido valproico quanto ao metabolismo oxidativo celular.

METODOLOGIA

PRODUÇÃO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE AÇAÍ

Os frutos de açaí foram provenientes de uma região de colheita próxima ao município de Manaus, no Amazonas (AM). Tais frutos foram transportados até o laboratório sob-refrigeração para que não houvesse perda das características funcionais. No laboratório, os frutos foram completamente macerados para a remoção das sementes e logo após dispostos em frascos âmbar na concentração de 300 µg/mL, utilizando como solvente o etanol 70%, conforme Bittencourt e colaboradores (2013). Após 21 dias totais de extração, os filtrados obtidos foram rotaevaporados para a remoção do etanol e liofilizados para obtenção do extrato em pó.

O extrato em pó, por sua vez, foi conduzido para caracterização, através do método de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), sendo injetado no aparelho o extrato diluído na concentração de 10 mg/mL. O aparelho utilizado foi SIL-20^A Shimadzu *Auto Sampler*, especificamente a coluna de separação Phenomenex C₁₈. Os padrões aplicados foram: ácido gálico, catequina, ácido clorogênico, ácido cafeico, ácido *p*-cumárico, epicatequina, orientina, cianeto-3-0-glicosídeo, luteolina e apigenina. Logo, a matriz química do extrato foi determinada através da comparação com os picos de leitura de tais padrões.

CULTURA CELULAR E TRATAMENTOS

Para a realização da cultura celular foram utilizadas células neuronais-*like* (SH-SY5Y) (ATCC® CRL-2266TM; Manassas, VA, EUA) obtidas comercialmente a partir do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ, Universidade do Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e cultivadas em condições ideais. O meio de cultura escolhido foi o Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)/F12 (Sigma-Aldrich, D0547, São Paulo, SP, Brasil), contendo 10% de soro fetal bovino (SFB) (Sigma-Aldrich, F2442, São Paulo, SP, Brasil) e suplementado com 1% de antibióticos (penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 mg /mL) - Gibco®Thermo Fisher, 15140122, São Paulo, SP, Brasil).

As células foram mantidas em incubadora de CO₂, com saturação de 5% de CO₂ e 37°C até a obtenção do número de células ideal para a realização de todos os tratamentos e ensaios experimentais. Em seguida, as células neuronais-*like* foram plaqueadas na concentração de 2,5X10⁵ células/mL e tratadas com uma curva concentração-efeito de rotenona (5, 15, 30, 60, 120, 200, 240, 300, 400 e 500 nM) durante 24h, conforme Kim e colaboradores (2015), para determinar a concentração mais eficaz quanto a redução da viabilidade celular (reflexo da disfunção mitocondrial induzida).

Além disso, as células foram também expostas a diferentes concentrações do extrato hidroalcoólico de açaí (0,001; 0,005; 0,01; 0,05; 0,1; 1; 10; 500; e 1,000 µg/mL) durante 24, 48 e 72h, como sugerido por Machado e colaboradores (2016), com o intuito de detectar a concentração mais citoprotetora e também o melhor período de incubação. Após a realização das curvas, as células foram testadas quanto à viabilidade celular e à produção de óxido nítrico por meio de ensaios colorimétricos.

Com a detecção das concentrações mais efetivas de rotenona e do extrato do açaí, foram repetidos os tratamentos com tais concentrações em associação com 0,5 mM de ácido valproico, conforme Zhang e colaboradores (2017). A ordem dos tratamentos desenvolvidos nesta etapa do estudo está descrita abaixo:

- GRUPO 1 - Controle Negativo: células neuronais-*like* em condições ideais de cultivo celular;
- GRUPO 2 - Controle Positivo de Rotenona: células neuronais-*like* expostas apenas à rotenona (concentração ideal);
- GRUPO 3 - Controle Positivo de Ácido valproico: células neuronais-*like* expostas apenas ao ácido valproico na concentração de 0,5 mM;
- GRUPO 4 - Controle positivo de extrato hidroalcoólico de açaí: células neuronais-*like* expostas apenas ao extrato hidroalcoólico de açaí (concentração e período de incubação ideais);
- GRUPO 5 - Associação: células neuronais-*like* expostas à rotenona (concentração ideal) e à associação de ácido valproico (0,5 mM) e extrato hidroalcoólico de açaí (concentração ideal).

Após os tratamentos, foram realizados ensaios colorimétricos e fluorimétricos de avaliação da viabilidade celular e de parâmetros do metabolismo oxidativo.

ENSAIO DE DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR

As células SH-SY5Y expostas às diferentes curvas concentração-efeito de rotenona e de extrato de açaí foram submetidas à avaliação de viabilidade celular pelo ensaio colorimétrico de MTT (do inglês *3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide*), de acordo as instruções de Kang e colaboradores (2010). Através dessa técnica, o MTT de coloração amarela é capaz de penetrar o meio intracelular. Células viáveis conseguem metabolizar esse reagente através de desidrogenases celulares, havendo a formação de cristais de formazan que possuem coloração púrpura. Os cristais são solubilizados com a adição de dimetilsulfóxido (DMSO), sendo a absorbância mensurada em leitora de placas Anthos 2010 (Biochrom® Anthos 2010, Londres, Inglaterra) a 570 nm.

MENSURAÇÃO DA TAXA TOTAL DE ÓXIDO NÍTRICO

Além dos padrões de viabilidade celular, as curvas desenvolvidas foram também avaliadas quanto a taxa total de produção de óxido nítrico (ON). Essa mensuração foi conduzida com base em

um método colorimétrico de quantificação indireta via determinação de nitrato e nitrito, utilizando para isso o reagente de Greiss, conforme Choi e colaboradores (2012). A intensidade de coloração formada foi mensurada a 540 nm em equipamento leitor de placas Anthos 2010 (Biochrom® Anthos 2010, Londres, Inglaterra).

MENSURAÇÃO DA TAXA TOTAL DE ERO

Após os tratamentos finais, incluindo a associação das concentrações mais efetivas de cada variável em teste e o ácido valproico, os níveis totais de ERO foram determinados a partir do ensaio da 2,7 diclorodihidrofluoresceínadiacetato (DCFH-DA) (Sigma-Aldrich-D6883; St. Louis, MO, EUA), como descrito por Costa e colaboradores (2012). Este reagente é um composto não fluorescente que é desacetilado pelas enzimas esterase mitocondriais em diclorodihidrofluoresceína (DCFH) que reage com as moléculas ERO e se torna diclorofluoresceína (DCF), um composto fluorescente. Logo, quanto maior a intensidade da fluorescência emitida, maior é a taxa total de ERO produzida. Logo, a fluorescência foi medida a um comprimento de onda de excitação de 488 nm e de emissão de 525 nm, utilizando o aparelho leitor de placas SpetraMax i3 (Molecular Devices, San Jose, CA, USA).

QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS DE dsDNA EXTRACELULAR

Após os tratamentos finais, incluindo a associação das concentrações mais efetivas de cada variável em teste e o ácido valproico, foi determinada a quantidade de DNA dupla fita (ds) presente no meio extracelular. Nessa mensuração, fez-se uso do corante fluorimétrico DNAPicoGreen®, conforme Cadoná e colaboradores (2014). Este reagente possui alta afinidade pelo dsDNA e, ao se intercalar com esta molécula, há a emissão de fluorescência. Dessa forma, quando utilizado o meio extracelular como amostra, quanto maior a fluorescência emitida, maior é a taxa de mortalidade celular por rompimento de membranas. A leitura final foi realizada a 480 nm de excitação e 520 nm de emissão no aparelho leitor de placas SpetraMax i3 (Molecular Devices, San Jose, CA, USA).

ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Todos os resultados obtidos foram primeiramente tabelados em planilha do programa *Microsoft Excel*, versão 2010, e transformados em porcentagem em relação ao controle negativo. Os dados foram estatisticamente analisados através de análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias,

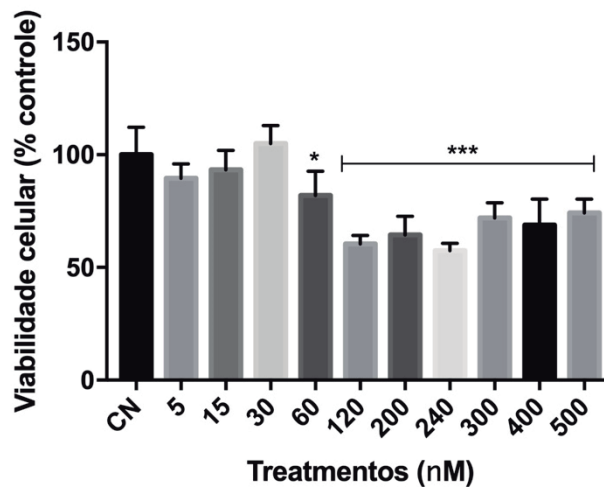
seguido de *post hoc*, de Tukey, valendo-se do programa de produção de gráficos e análises estatísticas *GraphPad Prism*, versão 5.0 (GraphPad Prism, La Jolla, CA, USA). Resultados de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este estudo *in vitro* foi desenvolvido com o objetivo de avaliar o efeito neuromolador do extrato de açaí em associação com o ácido valproico. Para isso, inicialmente foi produzido e caracterizado o extrato hidroalcoólico de açaí. Através da CLAE foram detectadas dez diferentes moléculas compondo a matriz química do extrato. A caracterização completa do extrato hidroalcoólico de açaí foi previamente publicada por nosso grupo de pesquisa, de autoria de Souza e colaboradores (2020). Foi possível observar que a matriz química do fruto é constituída por diferentes compostos com efeitos bioativos conhecidos, principalmente compostos fenólicos e flavanóides (orientina, ácido *p*-cumárico e a apigenina). Muitos estudos realizados com produtos naturais vêm sugerindo que a matriz química de alimentos funcionais está diretamente relacionada aos potenciais efeitos biológicos observados (MACHADO *et al.*, 2015; SAGRILLO *et al.*, 2015). A orientina, por exemplo, é conhecida por ser um importante composto fenólico encontrado em diferentes frutos (BRAZIER-HICKS *et al.*, 2009; YOO *et al.*, 2014). Já foi relatado que esta molécula possui efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios e neuroprotetores significativos. O ácido *p*-cumárico, por vez, é outro composto fenólico com considerável capacidade antioxidante, entretanto a apigenina também demonstra atividade antioxidante como importante competência neuroprotetora devido à sua capacidade de atravessar a barreira sangue-cérebro (POPOVIĆ *et al.*, 2014; MATHEW *et al.*, 2015).

Assim como esperado, a exposição à rotenona durante 24h levou a uma redução da viabilidade celular quando comparada ao controle negativo, especialmente nas concentrações a partir de 60 nM (figura 1). A rotenona é uma molécula química capaz de interagir diretamente com a mitocôndria celular, especificamente levando à disfunção mitocondrial no complexo I. Desse modo, a partir do uso experimental de tal agente estressor, há a indução de desbalanço oxidativo que, por conseguinte, causa a redução da viabilidade celular. Kim e colaboradores (2015) apontaram uma redução significativa na viabilidade celular de células neuronais-*like* expostas a 30 nM de rotenona.

Figura 1 - Células SH-SY5Y expostas a diferentes concentrações de rotenona avaliadas quanto a viabilidade celular (24h) via ensaio colorimétrico MTT. Análise estatística realizada via ANOVA de uma via, seguido de *post hoc* de Tukey. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

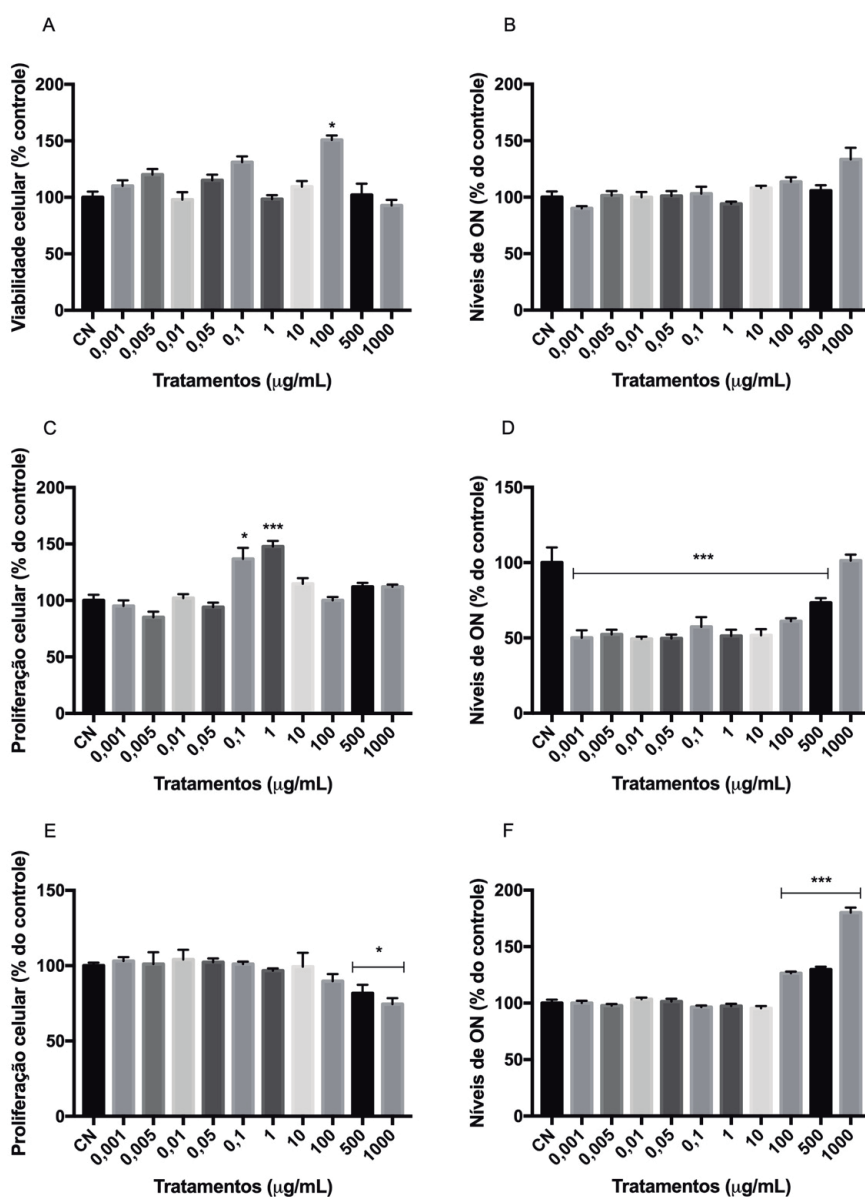


Fonte: Construção do autor.

O mesmo perfil foi também observado na pesquisa de Machado e colaboradores (2016). Neste estudo, a concentração de 30 nM não causou redução da viabilidade das células SH-SY5Y, havendo comprometimento celular apenas a partir da concentração de 60 nM. Esses resultados corroboram com a necessidade de sempre se repetir as curvas concentração-efeito, pois nem sempre as condições de cultivo celular ou aspectos ambientais serão os mesmos de outros locais de pesquisa, isto é, pode existir variabilidade entre resultados e concentrações de uso. Todavia, apesar de ser observado um efeito hormético quanto à exposição à rotenona, a concentração de 120 nM foi selecionada para a realização dos demais tratamentos celulares, visto que essa foi a concentração mínima capaz de reduzir 60% a viabilidade celular.

Em relação à avaliação do efeito *per se* do extrato hidroalcoólico de açaí sobre células neuro-nais-like foi percebido que, durante 24 e 48h (figura 2A e 2C, respectivamente) de exposição, não houve modulação negativa da viabilidade e proliferação celular. Na exposição de 48h, houve um aumento considerável na viabilidade das células quando expostas a 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, demonstrando que, nesse tempo de incubação, essa concentração apresenta potencial efeito neuroprotetor. Por outro lado, as concentrações de 500 e 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ induziram a redução da proliferação celular durante 72h (figura 2E) de tratamento *in vitro*. Os resultados obtidos corroboram com os achados de Machado e colaboradores (2016), a partir dos quais os autores descreveram também um efeito citoprotetor do extrato de açaí sobre células SH-SY5Y durante 48h de exposição, especialmente na concentração de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Figura 2 - Células SH-SY5Y expostas a diferentes concentrações de extrato hidroalcoólico de açaí avaliadas quanto a viabilidade, proliferação celular e níveis de óxido nítrico via ensaio colorimétrico MTT e ON. Onde: A) MTT de 24h; B) ON de 24h; C) MTT de 48h; D) ON de 48h; E) MTT de 72h; e F) ON de 72h. Análise estatística realizada via ANOVA de uma via, seguido de post hoc de Tukey. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.



Fonte: Construção do autor.

Considerando que o ON é um agente sinalizador de vários processos celulares, incluindo neurotransmissão, e que está envolvido em processos de desbalanço oxidativo, após os devidos tratamentos e períodos de incubação, as células neuronais-*like* foram também avaliadas indiretamente quanto aos níveis de ON. Os resultados obtidos demonstraram que o extrato do açaí não induziu modulação dos níveis de ON durante 24 h de exposição (figura 2B). Todavia, durante 48h de tratamento (figura 2D),

a grande maioria das concentrações do extrato foi capaz de reduzir a quantidade de ON, quando comparado ao controle negativo. Já após 72h de exposição (figura 2F), as células neuronais-*like* apresentaram aumento dos níveis de ON nas concentrações de 100, 500 e 1000 µg/mL. Esses resultados são de relevância, pois se sabe da existência da correlação entre os níveis de ON e o estresse oxidativo (CHOI *et al.*, 2006). Logo, espera-se que uma molécula com potencial efeito citoprotetor e capacidade de modular positivamente a função mitocondrial não seja capaz de induzir por si só a produção de qualquer molécula estressora.

A partir dos resultados obtidos via curvas concentração-efeito, foram repetidos os tratamentos utilizando apenas a concentração de 1 µg/mL do extrato de açaí. Além disso, foi avaliado o efeito *per se* de 0,5 mM de ácido valproico e também do fármaco em associação ao extrato do fruto em investigação. A quantificação de ERO via DCFH-DA (figura 3A) demonstrou que, ao passo que a rotenona e o ácido valproico induzem a um desbalanço oxidativo, o açaí por si próprio ou em associação com a rotenona e com o fármaco é capaz de manter os níveis de ERO de maneira basal, similar ao controle negativo. Assim como esperado, foi observado que, através do ensaio de quantificação de dsDNA no meio extracelular (figura 3B), as células expostas somente à rotenona apresentaram aumento significativo na liberação de dsDNA quando comparado ao controle negativo. Adicionalmente, a exposição apenas ao ácido valproico induziu efeito similar a rotenona. Por outro lado, células tratadas apenas com o extrato de açaí apresentaram perfil de liberação de dsDNA similar ao controle negativo. Perfil semelhante ao controle negativo foi ainda encontrado em neurônios-*like* expostos à rotenona, ao ácido valproico e ao extrato de açaí de modo concomitante, o que comprova o efeito neuroprotetor do extrato, mesmo em associação com o ácido valproico. Esses resultados possuem grande relevância, visto que sujeitos com TB, por exemplo, apresentam desbalanço oxidativo neuronal e periférico em decorrência da disfunção mitocondrial (ANDREAZZA *et al.*, 2007). Ademais, sabe-se que o ácido valproico é um fármaco que, apesar de bastante prescrito, possui mecanismo de ação ainda não completamente conhecido e que pode atuar a ponto de causar desbalanço mitocondrial, especialmente em tratamentos de longo prazo (CHUI *et al.*, 2013). Portanto, sendo o extrato de açaí um produto natural, que parece ser eficaz na modulação mitocondrial e que possivelmente apresenta efeitos adversos reduzidos ou nulos, acredita-se que seja uma excelente alternativa a investigações futuras com modelos experimentais mais complexos, pois as limitações dos estudos *in vitro* são conhecidos.

CONCLUSÃO

Já existem vários estudos que sugerem que a suplementação dietética pode ser uma alternativa para recuperar o funcionamento ideal do metabolismo oxidativo celular e melhorar as defesas antioxidantes corporais por conter moléculas bioativas com potencial antioxidante e anti-inflamatória que

podem prevenir e até mesmo reverter o dano celular a nível mitocondrial. Considerando que muitos indivíduos acometidos por doenças neuropsiquiátricas apresentam característico estresse oxidativo e que este desbalanço está relacionado à disfunção mitocondrial, assim como partindo do princípio de que o ácido valproico pode induzir o mal funcionamento da mitocôndria em tratamentos a longo prazo, pode-se dizer que os resultados obtidos são de grande validade para a progressão científica e também são sugestivos de que o extrato de açaí possa ser uma alternativa natural coadjuvante em tratamentos de sujeitos acometidos pelo TB, por exemplo. Além disso, acredita-se que os efeitos positivos observados sejam fidedignamente vinculados à matriz química que compõe o fruto, pois várias moléculas conhecidas por seus efeitos benéficos foram detectadas. Todavia, estudos complementares são necessários para comprovar tais efeitos, principalmente aqueles que utilizem modelos experimentais mais complexos, como *ex vivo* e *in vivo*.

REFERÊNCIAS

ANDREAZZA, Ana Cristina; PharmD; SHAO, Li; WANG, Jun-Feng; YOUNG, L. Trevor. Mitochondrial complex I activity and oxidative damage to mitochondrial proteins in the prefrontal cortex of patients with bipolar disorder. **Archives of General Psychiatry**, v. 67, n. 4, p. 360-368, 2010.

ANDREAZZA, Ana Cristina; FREY, Benicio; ERDTMANN, Bernardo; SALVADOR, Mirian; ROMBALDI, Fernanda; SANTIN, Aínda; GONÇALVES, Carlos Alberto; KAPCZINSKI, Flavio. DNA Damage In Bipolar Disorder. **Psychiatry Research**, v. 153, p. 27-32, 2007.

BARBOSA, Priscila; PALA, Daniela; SILVA, Carla, SOUZA, Melina; AMARAL, Joana; VIEIRA, Renata; FOLLY, Gilce; VOLP, Ana Carolina; FREITAS Renata. Açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp dietary intake improves cellular antioxidant enzymes and biomarkers of serum in healthy women. **Nutrition**, v. 32, n. 6, p. 674-680, 2016.

BITTENCOURT, L.; MACHADO, D; MACHADO, M; DOS SANTOS, G.; ALGARVE, T.; MARINOWIC, D.; RIBEIRO, E.; SOARES, F.; BARBISAN, F.; ATHAYDE, M; CRUZ, I. B. The protective effect of guaraná extract (*Paullinia cupana*) on fibroblast NIH-3T3 cells exposed to sodium nitroprusside. **Food Chemical Toxicology**, v. 53, p. 119-125, 2013.

BONOMO, Larissa de Freitas. **O extrato aquoso de açaí (*Euterpe oleracea* Mart) modula a resistência ao estresse oxidativo no organismo modelo *Caenorhabditis elegans* através de mecanismos diretos e indiretos**. Tese (Doutorado em ciências biológicas) - Núcleo de pesquisas em ciências biológicas programa de pós-graduação em ciências biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2014.

BRAZIER-HICKS, Melissa; EVANS, Kathryn; GERSHATER, Markus; PUSCHMANN, Horst; STEEL, Patrick; EDWARDS, Robert. The C-glycosylation of flavonoids in cereals. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 27, p. 17926-17934, 2009.

CADONÁ, Francine Carla; MÂNICA-CATTANI, Maria; MACHADO, Alencar; OLIVEIRA, Raul; FLORES, Eliza Ribas Silveira, ASSMANN, Charles; ALGARVE, Thais; DA CRUZ, Ivana Beatrice Mânica. Genomodifier capacity assay: a non-cell test using dsDNA molecules to evaluate the genotoxic/genoprotective properties of chemical compounds. **Analytical Methods**, v. 6, n. 21, p. 8559-8568, 2014.

CHANG, Cheng-Chen; JOU, Shaw-Hwa; LIN, Ta-Tsung; LAI, Te-Jen; LIU, Chin-San. Mitochondria DNA change and oxidative damage in clinically stable patients with major depressive disorder. **PloSone**, v. 10, n. 5, p. e0125855, 2015.

CHATEAUVIEUX, Sébastien; MORCEAU, Franck; DICATO, Mario; DIEDERICH, Marc. Molecular and therapeutic potential and toxicity of valproic acid. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2010, 2010.

CHOI, Woo-Suk; SHIN, Pyung-Gyun; LEE, Jong-Hwan; KIM, Gun-Do. The regulatory effect of veratric acid on NO production in LPS-stimulated RAW264.7 macrophage cells. **Cellular immunology**, v. 280, n. 2, p. 164-170, 2012.

CHIU, Chi-Tso; WANG, Zhifei; HUN Joshua G. H.; CHUANG, De-Maw. Therapeutic potential of mood stabilizers lithium and valproic acid: beyond bipolar disorder. **Pharmacological reviews**, v. 65, n. 1, p. 105-142, 2013.

COSTA, Felipe; DORNELLES, Eduardo; MANICA-CATTANI, Maria Fernanda; ALGARVE, Thais; FILHO, Olmiro; SAGRILLO, Michele; GARCIA, Luiz Felipe; CRUZ, Ivana. Influence of Val16Ala SOD2 polymorphism on the in-vitro effect of clomiphene citrate in oxidative metabolism. **Reproductive biomedicine online**, v. 24, n. 4, p. 474-481, 2012.

SOUZA, Diulie Valente; PAPPIS, Lauren; BANDEIRA, Thuany Teixeira; SANGOI, Gabriela Geraldo; FONTANA, Tuyla; RISSI, Vitor Braga; SAGRILLO, Michele Rorato; DUARTE, Marta Maria; DUARTE, Thiago; BODESTEIN David Frederick; ANDREAZZA, Anna Cristina; DA CRUZ, Ivana Beatrice Mânica; RIBEIRO, Euler Esteves; ANTONIAZZI, Alfredo; OURIQUE, Aline Ferreira; MACHADO, Alencar Kolinski. Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) presents anti-neuroinflammatory capacity in LPS-activated microglia cells. **Nutritional Neuroscience**, v. 2020, p. 1-12, 2020.

FINSTERER, Josef; SCORZA, Fulvio. Effects of antiepileptic drugs on mitochondrial functions, morphology, kinetics, biogenesis, and survival. **Epilepsy Research**, v. 136, p. 5-11, 2017.

KANG, Jie; LI, Zhimin; WU, Tong; JENSEN, Gitte; SCHAUSS, Alexander; WU, Xianli. Anti-oxidante capacities of flavonoid compounds isolated from acai pulp (*Euterpe oleracea* Mart.). **Food Chemistry**, v. 122, p. 610-617, 2010.

KIM, Helena; MENDONÇA, Karina; HOWSON, Patrick; BROTCHE, Jonathan; ANDREAZZA, Ana C. The link between mitochondrial complex I and brain-derived neurotrophic factor in SH-SY5Y cells—The potential of JNX1001 as a therapeutic agent. **European journal of pharmacology**, v. 764, p. 379-384, 2015.

MACHADO, Alencar Kolinski; CADONÁ, Francine Carla; AZZOLIN, Verônica Farina; DORNELLES, Eduardo Bortoluzzi; BARBISAN, Fernanda; RIBEIRO, Euler Esteves; MÂNICA-CATTANI, Maria Fernanda; DUARTE, Marta Maria Medeiros Frescura; SALDANHA, José Raul Pinto; DA CRUZ, Ivana Beatrice Mânica. Guaraná (*Paullinia cupana*) improves the proliferation and oxidative metabolism of senescent adipocyte stem cells derived from human lipoaspirates. **Food Research International**, v. 67, p. 426-433, 2015.

MACHADO, Alencar; ANDREAZZA, Ana Cristina; DA SILVA, Tatiane Morgana; BOLIGON, Aline; DO NASCIMENTO, Vanusa; SCOLA, Gustavo; DUONG, Angela; CADONÁ, Francine; RIBEIRO, Euler Esteves; DA CRUZ, Ivana Beatrice. Neuroprotective effects of Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) against rotenone in vitro exposure. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2016, 2016.

MATHEW, Sindhu; ABRAHAM, T. Emilia; ZAKARIA, ZainulAkmar. Reactivity of phenolic compounds towards free radicals under in vitro conditions. **Journal of food science and technology**, v. 52, n. 9, p. 5790-5798, 2015.

NASSEH, Ibrahim E; TENGAN, Célia H.; KIYMOTO, Beatriz H.; GABBAI, Alberto A. Doenças mitocondriais. **Revista Neurociências**, v. 9, n. 2, p. 60-9, 2001.

Organização Mundial da Saúde. Relatório Mundial da Saúde. Saúde Mental: Nova concepção, Nova Esperança. Lisboa; 2002. Disponível em: <https://bit.ly/3FbshwZ>. Acesso em 04 de junho de 2018.

POPOVIĆ, Miroļjub; CABALLERO-BLEDA, Maria; BENAVENTE-GARCÍA, Obdulio; CATILLO, Julián. The flavonoid apigenin delays forgetting of passive avoidance conditioning in rats. **Journal of Psychopharmacology**, v. 28, n. 5, p. 498-501, 2014.

POULOSE, Shibu M; FISHER, Derek; BIELINSKI, Donna; RIMANDO, Agnes; GOMES, Stacey; SCHAUSS, Alexander; SHUKITT-HALE, SHUKITT-HALE, Bárbara. Restoration of stressor-induced calcium dysregulation and autophagy inhibition by polyphenol-rich açai (*Euterpe spp.*) fruit pulp extracts in rodent brain cells in vitro. **Nutrition**, v. 30, n. 7, p. 853-862, 2014.

RAJASEKARAN, Ashwini; VENKATASUBRAMANIAN, Ganesan; BERK, Michael; DEBNATH, Monojit. Mitochondrial dysfunction in schizophrenia: pathways, mechanisms and implications. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 48, p. 10-21, 2015

ROCHA, Fábio Lopes; PAPROCKI, Cláudia Hara Jorge. Doença mental e estigma. **Revista Medicina Minas Gerais**, vol. 25, n.4, p. 590-596, 2015.

ROSENBERG, G. The mechanisms of action of valproate in neuropsychiatric disorders: can we see the forest for the trees?. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 64, n. 16, p. 2090-2103, 2007.

SAGRILLO, Michele Rorato; GARCIA, Luiz Felipe Machado; DE SOUZA FILHO, Olmiro Cenzimbra; DUARTE, Marta Maria Frescura; RIBEIRO, Euler Esteves; CADONÁ, Francine Carla; DA CRUZ, Ivana Beatrice Mânica. Tucumã fruit extracts (*Astrocaryum aculeatum Meyer*) decrease cytotoxic effects of hydrogen peroxide on human lymphocytes. **Food Chemistry**, v. 173, p. 741-748, 2015.

SHAO, Ling; MARTIN, Maureen; WATSON, Stanley; SCHATZBERG, Alan; AKIL, Huda; MYERS, Richard; JONES, Edward; BUNNERY, William; VAWTER, Marquis. Mitochondrial involvement in psychiatric disorders. **Annals of medicine**, v. 40, n. 4, p. 281-295, 2008.

STRECK, Emilio; CZAPSKI, Grzegorz; DA SILVA, Cleide. Neurodegeneration, mitochondrial dysfunction, and oxidative stress. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2013, 2013.

ZAGO, Ana Carolina; TOMASI, Elaine; CARBONELL DEMORI, Carolina. Adesão ao tratamento medicamentoso dos usuários de centros de atenção psicossocial com transtornos de humor e esquizofrenia. **SMAD, Revista Electrónica en Salud Mental, Alcohol y Drogas**, v. 11, n. 4, 2015.

ZHANG, Y; WENG, L.H; LI, X.X; YU, L.J; WU, J.Y; XU, Y.. Valproic acid protects against MPP⁺-mediated neurotoxicity in SH-SY5Y Cells through autophagy. **Neuroscience letters**, v. 638, p. 60-68, 2017.

YOO, Hayoung; KU, Sae-Kwang; LEE, Taeho; BAE, Jong-Sup. Orientin inhibits HMGB1-induced inflammatory responses in HUVECs and in murine polymicrobial sepsis. **Inflammation**, v. 37, n. 5, p. 1705-1717, 2014.