



Universidade de Brasília

Faculdade de Ciências da Saúde

Pós-Graduação em Nutrição Humana

**ANÁLISE DA PROTEÇÃO ANTIOXIDANTE PROMOVIDA POR EXTRATOS
DE TUCUM-DO-CERRADO (*Bactris setosa*)**

VIVIANE YLLENA VIEIRA DE SOUZA

BRASÍLIA, DF

2013

VIVIANE YLLENA VIEIRA DE SOUZA

**ANÁLISE DA PROTEÇÃO ANTIOXIDANTE PROMOVIDA POR EXTRATOS
DE TUCUM-DO-CERRADO (*Bactris setosa*)**

Dissertação apresentada como requisito parcial
à obtenção do grau de Mestre em Nutrição
Humana - Linha de pesquisa em Bioquímica
Nutricional pelo programa de Pós graduação em
Nutrição Humana da Universidade de Brasília

Orientadora: Dra. Élide Geralda Campos

Co-orientador: Dr. Túlio César Ferreira

BRASÍLIA, DF

2013

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Élide Geralda Campos

(Orientadora – IB/ UnB)

Prof. Dr. Túlio César Ferreira

(Co-orientador – IB/UnB)

Prof. Dra. Carolina Madeira Lucci

(IB – UnB)

Prof. Dra. Sandra Fernandes Arruda

(IB – UnB)

Prof. Dra Vera Pelussi Polez

(Embrapa)

Dedico este trabalho primeiramente a Deus por iluminar e abençoar meus caminhos, e aos meus pais, que estiveram ao meu lado durante todo esse trajeto, sempre promovendo força, carinho e dedicação.

**“A grandeza não consiste em receber
honras, mas sim em merecê-las...”**

(Aristóteles)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a **Deus** por tudo.

Aos meus pais, **Betanea** e **Vieira**, por todas as oportunidades que me proporcionaram até hoje, pela força que me deram para crescer em minha vida acadêmica, confiança, conselhos, brigas que me ajudaram a amadurecer, pelo carinho, amizade sem fim e principalmente pelo eterno amor.

Aos meus irmãos Jeferson (Esso) e Eliane, por toda união, amor e compreensão, que me proporcionaram ao longo de minha jornada, pela força nas horas difíceis e pela amizade eterna e ao meu amigo Jean pelas brincadeiras, apoio aos meus estudos e principalmente pelo amor que demonstra com minha família.

Aos meus sobrinhos Jéssica, Gustavo e Leandro pelo amor puro e verdadeiro que me motiva e proporciona vontade de continuar nessa caminhada.

Agradeço aos meus familiares pela força e compreensão.

Aos meus Orientadores, Élide Campos e Túlio César Ferreira pelas orientações e oportunidade ao início do meu conhecimento científico, pela amizade, carinho, compreensão, pelos ensinamentos e “puxões de orelha” (quando precisei).

À minha “amiga-irmã” Pollyana Cardoso, por me proporcionar grandes ensinamentos e lições de vida que me ajudou a continuar nessa trajetória, pela compreensão e ajuda emocional durante todos os momentos da minha vida, pela amizade pura, verdadeira e muito especial que construímos durante muito tempo, pelo carinho e amor de irmã que sempre me deu.

Ao anjo Cezar Vieira, pelo carinho, amizade linda, compreensão e apoio aos meus estudos.

Ao meu amigo companheiro do coração Raphael Fagundes Rosa (Raphuxo), pelas várias discussões sobre ciência que ajudaram a sanar dúvidas e também acrescentar meus conhecimentos, pelos momentos inesquecíveis de descontração e risadas e acima de tudo pela amizade verdadeira que construímos durante esse período.

Aos meus eternos amigos do coração Daniela Aquino, Renata Timbó, Samuel Brasileiro, Davi Loures, Taynara Rabelo pelas colaborações, carinho, amizade e apoio que me ajudaram a chegar até aqui.

Aos meus amigos e companheiros de trabalho do grupo de Estresse Oxidativo do Laboratório de Biologia Molecular da UnB pelas várias discussões sobre ciência e troca de experiências que muito me ajudaram a concluir este trabalho, em especial a Diana pela amizade verdadeira que construímos, carinho e companheirismo; Greice (Preta) pela amizade e sinceridade, orientações e ajuda na construção aos meus conhecimentos, pelo imenso carinho e pelas brincadeiras e risadas tão gostosas; Layane (Lay) pela amizade, companheirismo e carinho; Walyson (Wally) pela amizade linda que construímos, companheirismo e ajuda sempre que precisei; Nestor e Carlos Eduardo (Cadu), pelas brincadeiras, amizade e carinho; Rafael Burtet e Marciano pelas amizade; Aos novatos do laboratório Lucas e Bruno que apesar da pouca convivência me apoiaram na conclusão deste trabalho.

Agradeço também ao Grupo de Radicais Livres do Prof. Marcelos Hermes, em especial a Luana Dalvi e Daniel pelas orientações, paciência e ajuda em meus experimentos.

À Dr. Patrícia Albuquerque e Dr. Otávio Franco da UnB e Universidade Católica de Brasília que me ajudou na realização dos meus experimentos, abrindo as portas do seu laboratório de pesquisa para que eu pudesse utilizar os equipamentos.

À Dona Fátima, Dona Ivonildes e Ivone (técnicas dos laboratórios) pelo apoio a minha pesquisa e carinho.

À CAPES pela concessão de bolsa de pesquisa.

Aos meus amigos aqui não citados, agradeço também pela compreensão e pelo apoio.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	04
2.1 Radicais livres e espécies reativas de oxigênio (EROs).....	04
2.2 Estresse oxidativo e efeitos biológicos das EROs.....	08
2.3 Defesas antioxidantes.....	11
2.3.1 Defesas antioxidantes enzimáticas.....	12
2.3.2 Defesas antioxidantes não enzimáticas.....	14
2.3.3 Compostos fenólicos.....	16
2.4 Tucum-do-cerrado (<i>Bactris setosa</i>)	18
2.5 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	20
2.6 Maçã.....	22
3. OBJETIVOS.....	24
3.1 Objetivo Geral.....	24
2.2 Objetivos Específicos.....	24
Capítulo 1 - Análise da proteção antioxidante promovida por extratos de Tucum-do-cerrado (<i>Bactris setosa</i>) em leveduras <i>Saccharomyces cerevisiae</i>.....	25
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
4.1 Amostras de Tucum-do-cerrado.....	25
4.2 Preparo dos extratos das amostras de Tucum-do-cerrado.....	25
4.2.1 Extrato aquoso das amostras de Tucum-do-cerrado.....	25
4.2.2 Extrato etanólico das amostras de Tucum-do-cerrado.....	26
4.3 Ensaio utilizando leveduras <i>Saccharomyces cerevisiae</i> para avaliar as propriedades antioxidantes do Tucum-do-cerrado.....	26
4.3.1 Linhagem de levedura.....	26
4.3.2 Meios de crescimento e condições de cultura.....	27
4.3.3 Antioxidantes e oxidantes comerciais utilizados nos ensaios.....	27
4.3.4 Ensaio de crescimento das <i>S. cerevisiae</i> em microplaca para determinação da concentração não letal dos oxidantes.....	28
4.3.5 Ensaio de crescimento das <i>S. cerevisiae</i> em microplaca utilizando oxidantes e extratos de Tucum-do-cerrado.....	29
4.3.6 Ensaio de crescimento das <i>S. cerevisiae</i> em microplaca utilizando oxidantes e diferentes concentrações de casca de Tucum-do-cerrado como antioxidante.....	29

4.3.7 Ensaio de crescimento das <i>S. cerevisiae</i> em microplaca utilizando antioxidantes comerciais.....	30
4.3.8 Análise estatística dos dados e número de repetições dos experimentos.....	30
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO DO CAPÍTULO 1.....	31
Capítulo 2 - Análise da proteção antioxidante promovida por extratos de Tucum-do-cerrado contra a peroxidação lipídica e dano oxidativo a proteína (<i>Bactris setosa</i>).....	44
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	44
4.1 Amostras de Tucum-do-cerrado.....	44
4.2 Preparo dos extratos das amostras de Tucum-do-cerrado.....	44
4.2.1 Extrato aquoso das amostras de Tucum-do-cerrado.....	44
4.2.2 Extrato etanólico das amostras de Tucum-do-cerrado.....	44
4.3 Ensaio de TBARS (Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico)	45
4.3.1 Tecidos de Fígado.....	45
4.3.2 Preparo dos extratos de fígado.....	45
4.3.3 Metodologia de TBARS.....	46
4.4 Medida de dano oxidativo à proteína.....	47
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO DO CAPÍTULO 2.....	49
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	58
7. PERSPECTIVAS.....	59
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação de um fagócito.....	02
Figura 2. Distribuição eletrônica do O ₂ em seu estado fundamental e do O ₂ singleto...06	
Figura 3. Sequência de reações da peroxidação lipídica.....	09
Figura 4. Formação do radical hidroxil via reação de fenton.....	11
Figura 5. Mecanismo de defesa enzimático.....	14
Figura 6. Representação da manutenção da glutathiona na forma reduzida.....	15
Figura 7. Frutos do tucum-do-cerrado, <i>Bactris setosa</i>	19
Figura 8. Imagem gerada por meio do software “Google Earth” a partir da localização geográfica do local da coleta do Tucum-do-cerrado em Terezópolis de Goiás.....	25
Figura 9. Estruturas químicas dos oxidantes utilizados neste estudo.....	27
Figura 10. Estruturas químicas dos antioxidantes comerciais utilizados neste estudo...28	
Figura 11. Curva de crescimento da levedura <i>S. cerevisiae</i> EG 103 com Tucum-do-cerrado.....	32
Figura 12. Crescimento de leveduras <i>S. cerevisiae</i> expostas a diferentes oxidantes....34	
Figura 13. Crescimento da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> EG 103 com oxidantes em concentrações distintas e Tucum-do-cerrado em diferentes extratos (aquoso, etanólico 95%, 50% e 70%).....	37
Figura 14. Crescimento da levedura <i>S. cerevisiae</i> EG 103 com diferentes oxidantes e extrato aquoso de casca de Tucum-do-cerrado em diferentes concentrações.....	39
Figura 15. Crescimento da levedura <i>S. cerevisiae</i> EG 103 horas com ácido ascórbico e ácido gálico.....	41
Figura 16. Ensaio de TBARS, utilizando extratos aquosos de casca, polpa, casca mais polpa de Tucum e a maçã Fuji.....	50
Figura 17. IC ₅₀ dos extratos aquosos de Tucum-do-cerrado e Maçã Fuji.....	52
Figura 18. Ensaio de TBARS, utilizando extratos etanólicos de casca, polpa, casca mais polpa de Tucum e a maçã Fuji.....	53
Figura 19. IC ₅₀ dos extratos etanólicos de Tucum-do-cerrado e Maçã Fuji.....	54
Figura 20. Dano a Proteína BSA utilizando Tucum-do-cerrado em diferentes extratos (aquoso e etanólico 95%,).....	56

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABS	Absorbância
BSA	Albumina do soro bovino
CAT	Catalase
CHP	Hidroperóxido de cumene
CTE	Cadeia transportadora de elétrons
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EROs	Espécies reativas de oxigênio
G6PDH	Glicose-6-fosfato desidrogenase
GPX	Glutaciona peroxidase
GST	Glutaciona-S-transferase
GR	Glutaciona redutase
GSH	Glutaciona reduzida
GSSG	Glutaciona oxidada
HEPES	Ácido n-(2-hidroxietil)piperazina-n'-(2-etenosulfônico)
HOCl	Ácido hipocloroso
H ₂ O	Água
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
LH	Ácido graxo poliinsaturado
LO [•]	Radical alcolxil
LOO [•]	Radical peroxil
LOOH	Radical hidroperóxido
MDA	Malonaldeído (ou manildialdeído)
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
O ₂	Oxigênio
O ₂ ^{•-}	Radical superóxido
OD	Densidade óptica
•OH	Radical hidroxil
⁻ OH	Ânion hidroxila
SOD	Superóxido dismutase
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Exemplos de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs).....	05
Tabela 2. Características de algumas EROs que possui relevância biológica.....	07
Tabela 3. Classes de polifenóis.....	16
Tabela 4. Aumento do crescimento celular de <i>S. cerevisiae</i> promovido por extratos de tucum-do-cerrado.....	38
Tabela 5. Descrição dos reagentes utilizados no ensaio de dano à proteína.....	48

RESUMO

Muitos autores definem “radicais livres” como “espécies que têm um ou mais elétrons desemparelhados”. As Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), incluem os radicais livres e outras que, embora não possuam elétrons desemparelhados, são muito reativas em decorrência de sua instabilidade. Os antioxidantes protegem os organismos ao inibirem reações ligadas à ação de EROs e com isso impedem a perda da integridade celular. Os frutos do cerrado são ricos em fibras, vitaminas, minerais e antioxidantes, o que caracteriza sua potencial função diferenciada no adequado desenvolvimento e funcionamento do organismo. O Tucum-do-cerrado (*Bactris setosa*) é um fruto produzido por palmeiras de médio porte e quando estão maduros são comestíveis e podem ser consumidos in natura ou em forma de sucos, sorvetes, geleias, vinhos e vinagres. O presente trabalho teve dois objetivos principais: primeiro analisar a proteção antioxidante promovida por extratos de Tucum-do-cerrado em leveduras *Saccharomyces cerevisiae*; segundo analisar a proteção antioxidante promovida por extratos de Tucum-do-cerrado contra a peroxidação lipídica e o dano oxidativo a proteínas. Extratos aquosos e etanólicos da casca, polpa, e casca mais polpa foram testados. O extrato aquoso da casca do tucum apresentou maior ação antioxidante quando comparado aos demais extratos aquosos. Causou aumento de 42,6%, 45% e 28,4% no crescimento das leveduras quando comparados com o crescimento na presença dos antioxidantes peróxido de hidrogênio (1 mM), hidroperóxido de cumeno (150 μ M) ou menadiona 150 μ M, respectivamente. Os resultados do ensaio de peroxidação lipídica pela metodologia de TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) mostraram que os extratos aquosos da casca e casca mais polpa em diferentes diluições foram capazes de proteger contra a peroxidação lipídica nas reações incubadas por 30 a 120 minutos. Os extratos etanólicos da casca de Tucum protegeram contra a peroxidação lipídica em todas as concentrações e tempos de reação testados. Foi realizado também o ensaio de dano à proteína albumina do soro bovino (BSA) e apenas o extrato aquoso da casca do Tucum foi capaz de proteger o dano oxidativo. Em conclusão, os extratos do tucum-do-cerrado foram capazes de proteger células vivas, lipídios e proteínas contra o insulto oxidativo. Tal proteção antioxidante predominou na casca do fruto.

Palavras-chave: Radicais livres, antioxidantes, frutas, Tucum-do-cerrado.

ABSTRACT

Many authors define "free radicals" as "species that have one or more unpaired electrons". Reactive Oxygen Species (ROS) include free radicals and others that, while not possessing unpaired electrons, are highly reactive due to their instability. Antioxidants protect organisms by inhibiting reactions linked to the action of ROS and thereby prevent loss of cellular integrity. The fruits of the Brazilian savannah are rich in fiber, vitamins, minerals and antioxidants, which characterizes their potential distinctive role in the proper development and functioning of the body. Tucum- do-cerrado (*Bactris setosa*) is a palm fruit that is edible when and can be eaten raw or in the form of juices, ice creams, jellies, wines and vinegars. The present study had two main objectives: first to analyze the antioxidant protection promoted by extracts of Tucum-do-cerrado in yeast *Saccharomyces cerevisiae*, secondly to analyze the antioxidant protection promoted by extracts of Tucum-do-cerrado against lipid peroxidation and oxidative damage to proteins. Water and ethanol extracts of peel, pulp, and peel and pulp were tested. Peel aqueous extract showed the highest antioxidant activity when compared to other aqueous extracts. It caused increases of 42.6 %, 45 % and 28.4 % in the yeast growth when compared with growth in the presence of the antioxidants hydrogen peroxide (1 mM), cumene hydroperoxide (150 μ M) or menadione (150 μ M), respectively. The test results of lipid peroxidation measured by the methodology of TBARS (thiobarbituric acid reactive substances) showed that aqueous extracts of peel and peel plus pulp, in different dilutions, were able to protect against lipid peroxidation in the reactions incubated for 30 to 120 minutes. Peel ethanol extracts protected against lipid peroxidation at all concentrations and reaction times tested. The test for damage to the protein bovine serum albumin (BSA) was performed and only the aqueous extract of the bark of Tucum was able to protect oxidative damage. In conclusion, extracts of tucum-do-cerrado were able to protect living cells, lipids and proteins against oxidative insult. Such antioxidant protection predominated in the fruit peel.

Keywords: Free radicals, antioxidants, fruits, Tucum-do-cerrado.

1. INTRODUÇÃO

Radicais livres são átomos ou moléculas, contendo um ou mais elétrons não pareados nos orbitais externos, com capacidade de reagir com qualquer composto que esteja próximo à sua órbita externa (Halliwell, 2006; Gomes *et al.*, 2012; Halliwell, 2012). As espécies reativas de oxigênio (EROs) incluem as espécies radicalares (radicais livres), como por exemplo o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e o radical hidroxil (HO^{\bullet}) e espécies não radicalares, porém com alta capacidade oxidativa, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Kohen and Nyska, 2002). O radical hidroxil é o mais poderoso oxidante entre as várias espécies reativas de oxigênio, sendo capaz de oxidar compostos orgânicos, como a maioria dos lipídeos e proteínas (Kocha *et al.*, 1997).

O H_2O_2 possui um número par de elétrons, não possui carga e é pequeno, podendo atravessar membranas biológicas com rapidez. Reage na presença de íons ferrosos (Fe^{2+}) e metais de transição e sofre cisão homolítica, a qual produz um ânion hidroxila (HO^-) e um radical hidroxil (HO^{\bullet}). O radical hidroxil é bastante reativo e reage com biomoléculas com grande rapidez a uma velocidade de cerca de $10^{10} M^{-1} s^{-1}$ (Rhee *et al.*, 2003; Cardoso *et al.*, 2006; Kalyanaraman, 2013).

A formação de radicais livres ocorre principalmente na cadeia de transporte de elétrons mitocondrial (Glasauer and Chandel, 2013) ou por meio de fatores exógenos como, por exemplo, exposições a radiações gama e ultravioleta (Dato *et al.*, 2013). A geração de EROs é muito importante para a defesa do sistema imunológico, onde os fagócitos (neutrófilos, monócitos, eosinófilos) defendem o organismo de patógenos por meio da geração de oxidantes antimicrobianos, como por exemplo $O_2^{\bullet-}$. Os fagócitos encontram antígenos, marcados como externos (isto é, marcado pelo sistema complemento), e os englobam para um vacúolo fagocitário (figura 1), onde enzimas (NADPH-oxidase) são ativadas na parede do vacúolo, gerando $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 , que na presença de ferro forma o radical hidroxil, um oxidante potente, por meio da reação de Fenton ($Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + \bullet OH + OH^-$) ou reação de Haber-Weiss ($H_2O_2 + O_2^{\bullet-} \rightarrow O_2 + OH^{\bullet} + OH^-$), que causa a morte de patógenos por meio de danos irreversíveis à proteínas, ácidos nucleicos e lipídeos (Kalyanaraman, 2013). A enzima mieloperoxidase (MPO), também é liberada para dentro do vacúolo e oxida íons, como por exemplo cloretos e iodetos, na presença de H_2O_2 , formando o ácido hipocloroso (HOCl). O HOCl mata muitas bactérias e fungos *in vitro* e *in vivo*, é muito reativo e causa oxidação de moléculas biológicas (Kalyanaraman, 2013).

A representação esquemática do processo de fagocitose está mostrada na figura abaixo.

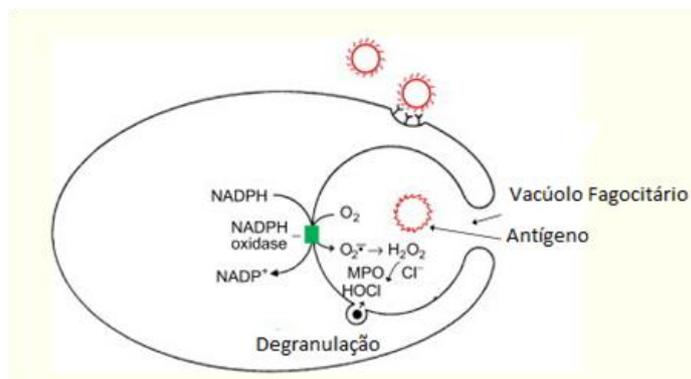


Figura 1. Representação de um fagócito. A NADPH-oxidase é ativada na parede do vacúolo, gerando superóxido e H_2O_2 no lúmen vacuolar. As enzimas também são liberadas no vacúolo pela degranulação de grânulos citoplasmáticos. Fonte: Adaptado de Kalyanaraman, 2013.

A concentração de EROs pode aumentar devido à deficiência de mecanismos antioxidantes ou maior geração intracelular desses radicais, portanto, o desequilíbrio entre moléculas oxidantes e antioxidantes é chamado de estresse oxidativo. Um dos principais danos causados pelas EROs é a lipoperoxidação, ou seja, a oxidação da camada lipídica da membrana celular, além disso, o estresse oxidativo pode gerar danos a proteínas e ao DNA, provocando diversas alterações na função celular (Gandhi and Abramov, 2012; Gomes *et al.*, 2012).

Os compostos antioxidantes protegem os sistemas biológicos contra os danos causados por EROs. A definição de antioxidante segundo Barreiros *et al.*, 2006 é: “...qualquer substância que, quando presente em baixa concentração comparada à do substrato oxidável, previne significativamente a oxidação dos mesmos”. Os sistemas de defesa antioxidante são formados por sistemas enzimáticos (composto por enzimas como, por exemplo, superóxido dismutase e catalase), produzidas pelo organismo e não enzimáticos (vitamina C, vitamina E, β -caroteno e grupos fenólicos de plantas), os quais podem ser facilmente obtidos por meio da dieta. Portanto, alimentos que contém quantidades significativas de antioxidantes naturais como por exemplo, café, tomate, laranja, uva e morango (Manach *et al.*, 2004) são muito importantes na manutenção da saúde, prevenção de algumas doenças humanas (Barreiros *et al.*, 2006; Dato *et al.*, 2013).

O consumo de vinho tinto, rico em antioxidantes como o resveratrol, possui efeito protetor contra danos oxidativos (Dato *et al.*, 2013). No estudo de Covas, *et al.*,

2009 o consumo de vinho foi considerado protetor contra o desenvolvimento de doenças coronárias, estresse oxidativo e doenças associadas. O vinho contém polifenóis que apresentam propriedades antioxidantes testadas *in vitro* e *in vivo*. Portanto, existe um consenso geral, que o vinho (particularmente o vinho tinto), é uma bebida que possui propriedades antioxidantes (Covas *et al.*, 2010). Em geral, as pessoas que consomem grandes quantidades de frutas e vegetais têm uma menor incidência de doenças cardiovasculares, acidente vascular cerebral e tumores (Dato *et al.*, 2013). O consumo regular de frutas, legumes, grãos integrais e outros alimentos vegetais foram negativamente correlacionados com o risco de desenvolvimento de doenças crônicas (Dato *et al.*, 2013). Frutas e vegetais são ricos em fitoquímicos que funcionam como antioxidantes, vitaminas, minerais e constituem fontes de agentes anti-inflamatórios. Desta forma, a importância da pesquisa por antioxidantes naturais tem aumentado muito nos últimos anos (Roesler *et al.*, 2007; Dato *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2013).

O crescente aumento do consumo de frutas do cerrado, ricos em fibras, vitaminas, minerais e antioxidantes caracterizam a função diferenciada que as frutas exercem sobre o adequado desenvolvimento e funcionamento do organismo (Pereira *et al.*, 2010). O tucum do cerrado (*Bactris setosa*) é produzido por palmeiras de médio porte e possui tronco coberto de espinhos muito finos e agudos e frutos redondos. Quando maduros, os frutos ficam roxos e tem a polpa comestível que pode ser consumida *in natura* ou em forma de sucos, sorvetes, geleias, vinhos e vinagres (Silva *et al.*, 2001).

Tendo em vista a importância dos antioxidantes na prevenção de danos oxidativos causados por EROs, este trabalho visou avaliar a atividade dos extratos de Tucum-do-cerrado. No estudo de Siqueira *et al.*, 2013, o tucum representa uma excelente fonte de compostos bioativos como flavonóides, antocianinas e vitamina C, em comparação com outras amostras, incluindo a maçã Red Delicious.

Este trabalho foi dividido em dois capítulos. O primeiro capítulo aborda a análise *in vivo* da proteção antioxidante promovida por extratos de Tucum do Cerrado (*Bactris setosa*) em leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e o segundo capítulo aborda análise *in vitro* da proteção antioxidante promovida por extratos de Tucum-do-Cerrado (*Bactris setosa*).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Radicais livres e espécies reativas de oxigênio (EROs)

Na estrutura de átomos e moléculas, os elétrons geralmente associam-se em pares, e cada par pode mover-se dentro de uma região definida em torno do núcleo. Este espaço é referido como orbital atômico ou molecular (Halliwell, 1994, 2012). Radical livre é qualquer espécie que contém um ou mais elétrons desemparelhados, podendo ser reativo e com capacidade de reagir com qualquer composto que esteja próximo à sua órbita externa de modo a tornar-se estabilizado (Halliwell, 1994; Gomes *et al.*, 2012; Halliwell, 2012).

As espécies reativas de oxigênio (EROs) são moléculas que contém um oxigênio em estado altamente reativo e com capacidade oxidativa. EROs incluem as espécies radicalares (radicais livres), como por exemplo o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e o radical hidroxil (HO^{\bullet}) e também as espécies não radicalares, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). (Kohen and Nyska, 2002). EROs podem ser formados na cadeia de transporte de elétrons mitocondrial. Durante o metabolismo aeróbico normal, o oxigênio é reduzido à água na cadeia respiratória mitocondrial, porém uma pequena porcentagem dos elétrons podem escapar principalmente do complexo I e III da cadeia transportadora de elétrons (CTE), que ao reagir com o oxigênio forma o radical superóxido, ou seja, se um único elétron é fornecido ao oxigênio, o produto é radical superóxido, contendo um elétron não emparelhado. Aproximadamente 1% do O_2 utilizado na respiração é convertido a $O_2^{\bullet-}$ e estes são transformados em H_2O_2 por meio das ações catalíticas das enzimas superóxido dismutases (Kowaltowski *et al.*, 2009; Alzoghaibi, 2013).

EROs são essenciais no metabolismo normal das células, tendo várias funções reguladoras. Por exemplo, EROs são produzidas por células imunológicas, tais como neutrófilos e macrófagos, a fim de eliminar antígenos (Ribeiro *et al.*, 2005). Eles também servem como sinalizadores estimulantes de vários genes que codificam fatores de transcrição, diferenciação e desenvolvimento, bem como, participação na vaso-regulação e proliferação de fibroblastos e aumento da expressão de algumas enzimas (Ribeiro *et al.*, 2005; Gomes *et al.*, 2012).

Apesar das funções essenciais e benéficas de algumas EROs no organismo, estes podem representar um risco (em concentrações não fisiológicas), especialmente para macromoléculas, como por exemplo ácidos nucleicos, proteínas e lipídeos que são

preferencialmente danificados por espécies reativas de oxigênio (Rios-Arrabal *et al.*, 2013). Em condições de estresse oxidativo, ocorre o desequilíbrio entre a produção de EROs e o nível de defesas antioxidantes, e estas espécies reativas de oxigênio podem participar de uma variedade de reações químicas que estão envolvidas no dano celular, necrose e apoptose, e podem também provocar a disfunção endotelial, a infiltração e ativação de células inflamatórias (De Marchi *et al.*, 2013). Portanto, EROs estão associadas a diversos processos patológicos, como acidentes vasculares cerebrais, fibrose pulmonar, infarto do miocárdio, alzheimer e vários tipos de câncer (Day, 2008; Gandhi and Abramov, 2012; Gomes *et al.*, 2012; De Marchi *et al.*, 2013). A tabela 1 mostra alguns exemplos de espécies de oxigênio radicalares e não radicalares.

Tabela 1. Exemplos de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)

Espécies Radicalares	Espécies não-radicalares
Superóxido ($O_2^{\bullet-}$)	Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2)
Hidroperoxil (HOO^{\bullet})	Hidroperóxido (LOOH)
Peroxil (LOO^{\bullet})	Oxigênio Singleto (1O_2)
Alcolxil (LO^{\bullet})	Ozônio (O_3)
Hidroxil (HO^{\bullet})	

Fonte: (Halliwell, 2006) com adaptações.

O oxigênio em seu estado fundamental é uma espécie radicalar com dois elétrons desemparelhados e com spins paralelos (figura 2a), o que restringe sua reatividade porque não é possível receber um par de elétrons de spins opostos. A restrição de spin da molécula de oxigênio pode deixar de existir quando um dos elétrons desemparelhados sofre uma inversão de spin e assim, os dois elétrons (que estavam desemparelhados e em spins paralelos) passam a emparelhar-se (figura 2b) (Ribeiro *et al.*, 2005; Halliwell, 2006). O oxigênio singleto pode ser gerado por meio de reações fotoquímicas, por exemplo, quando radiação UVA interage com cromóforos intracelulares, como as porfirinas, apontadas como cromóforos importantes da pele. Assim a exposição à luz do sol pode ser uma importante fonte de EROs em seres humanos (Ryter and Tyrrell, 1998; Arruda, 2004).

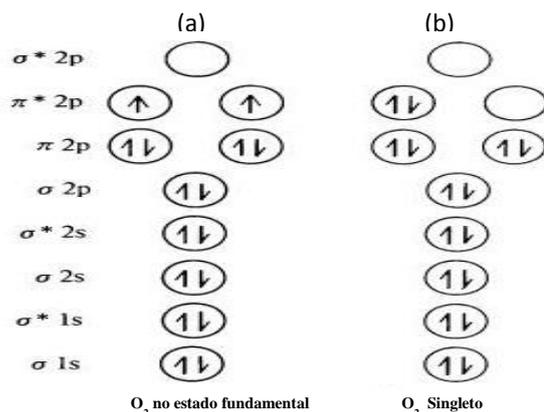
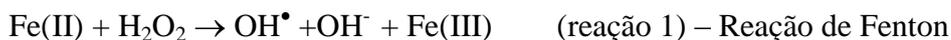


Figura 2. Distribuição eletrônica do oxigênio em seu estado fundamental e do oxigênio singlete.

Fonte: (Halliwell, 2006) com adaptações.

O radical superóxido pode ser produzido também durante a ativação de neutrófilos, monócitos, macrófagos e eosinófilos para inativação de antígenos. É considerado pouco reativo em soluções, mas com maior meia vida (10^{-6} s) quando comparado ao radical hidroxil HO^\bullet (10^{-9} s). O $O_2^{\bullet-}$ ao receber um elétron e dois hidrogênios forma o H_2O_2 através do processo dismutação catalisada pela enzima superóxido dismutase (Ribeiro *et al.*, 2005; Kalyanaraman, 2013; Rios-Arrabal *et al.*, 2013).

O H_2O_2 apresenta uma grande difusibilidade dentro e entre as células (Halliwell and Gutteridge, 2007) e representa uma fonte potencial de produção de radicais. Ele pode combinar-se com íons metálicos (ferro ou cobre) na reação de Fenton (reação 1), gerando o radical hidroxil, reconhecidamente tóxico, apresentando alta reatividade, podendo reagir facilmente com qualquer molécula, como por exemplo DNA, proteínas e lipídeos. O radical hidroxil pode ser formado também por meio da reação do H_2O_2 com $O_2^{\bullet-}$ (reação 3, conhecida como reação de Haber-Weiss), a qual é o somatório da reação de fenton (reação 1) e a reação de reciclagem do ferro (II) (reação 2) (Liochev and Fridovich, 2002; Genestra, 2007; Kowaltowski *et al.*, 2009; Cardoso *et al.*, 2012).



Fonte: (Liochev and Fridovich, 2002; Dalvi, 2008).

Na tabela 2 são mostradas algumas características biologicamente relevantes e muito estudadas de EROs

Tabela 2. Características de EROs biologicamente relevantes. Adaptado de Genestra, 2007.

EROs	Representação	Características
Radical Superóxido	$O_2^{\bullet-}$	- Estado monoelétrônico do oxigênio - Formado em reações de autoxidação
Peróxido de Hidrogênio	H_2O_2	- Estado dieletrônico do oxigênio - Formado por meio da dismutação do $O_2^{\bullet-}$ - Lipossolúvel, capaz de atravessar membranas celulares - Em solução aquosa é capaz de reduzir e oxidar uma variedade de íons inorgânicos
Radical Hidroxil	HO^{\bullet}	- Formado por meio da reação de Fenton e da decomposição de peroxinitritos. - Possui curta meia-vida, cerca de 10^{-9} s. - Possui alta reatividade, podendo danificar praticamente todos os tipos de macromoléculas: carboidratos, ácidos nucléicos, lipídeo e aminoácidos.
Hidroperóxido orgânico	$ROOH$	- Formado por reações de EROs com componentes celulares, tais como lipídeos e aminoácidos.
Radical alcoxil e radical peroxil	$RO^{\bullet}, ROO^{\bullet}$	- Participam da cadeia de reações da peroxidação lipídica . - Produzidos na presença de oxigênio pela adição de radicais de duplas ligações ou pela abstração do hidrogênio.
Hipoclorito	$HOCl$	- Lipossolúvel e altamente reativo, podendo oxidar constituintes proteicos, incluindo grupamentos tióis, amino e metionina. - Produzido a partir do H_2O_2 pela mieloperoxidase.
Peroxinitrito	$ONOO^-$	- Agente oxidante e de nitração, formado em uma reação rápida entre $O_2^{\bullet-}$ e NO^{\bullet} . - Lipossolúvel e possui reatividade semelhante ao hipoclorito. Pode danificar uma grande variedade de biomoléculas, incluindo o DNA e as proteínas. Após protonação forma o ácido peroxinitroso, que podem sofrer hemólise para formar radical hidroxil

2.2 Estresse oxidativo e efeitos biológicos das EROs

Estresse oxidativo é uma condição na qual ocorre o desequilíbrio entre a produção de EROs e o nível de defesas antioxidantes, que causam danos à biomoléculas de DNA, proteínas e lipídeos (Gandhi and Abramov, 2012). Os principais alvos de ataque das EROs são os lipídeos insaturados, o que causa a peroxidação lipídica e leva à formação de hidroperóxidos de ácidos graxos e lipídeos reativos tais como aldeídos e alcanos que contribuem pra o processo de autooxidação. A oxidação de lipídeos pode estar envolvida na etiologia de várias doenças e deteriorações funcionais, incluindo aterosclerose, câncer e envelhecimento (Nam, 2011; Sultana *et al.*, 2013; Zambo *et al.*, 2013). A peroxidação lipídica pode contribuir de maneira significativa para a perda da função celular em situações de estresse oxidativo. Por exemplo, ruptura das membranas celulares, mutações do DNA, oxidação dos lipídeos insaturados, formação de resíduos químicos e comprometimento da matriz extracelular. Além disso, o acúmulo de produtos da lipoperoxidação em certas condições patológicas de mamíferos é indicativo de envolvimento de radicais de oxigênio em mecanismos moleculares dessas doenças (Hermes-Lima *et al.*, 1995; Nam, 2011; Sultana *et al.*, 2013).

Todos os componentes celulares são suscetíveis à ação das EROs, porém a membrana é um dos mais atingidos em decorrência da peroxidação lipídica, que acarreta alterações na estrutura e na permeabilidade das membranas celulares. Portanto, há perda da seletividade na troca iônica e liberação do conteúdo de organelas, como as enzimas hidrolíticas dos lisossomas, e formação de produtos citotóxicos (como o malonaldeído), culminando com a morte celular. A lipoperoxidação também pode estar associada aos mecanismos de envelhecimento e câncer (Ferreira and Matsubara, 1997; Nam, 2011).

A oxidação de lipídeos (LH) leva à formação de hidroperóxido (LOOH) e pode ser resumida na figura abaixo:

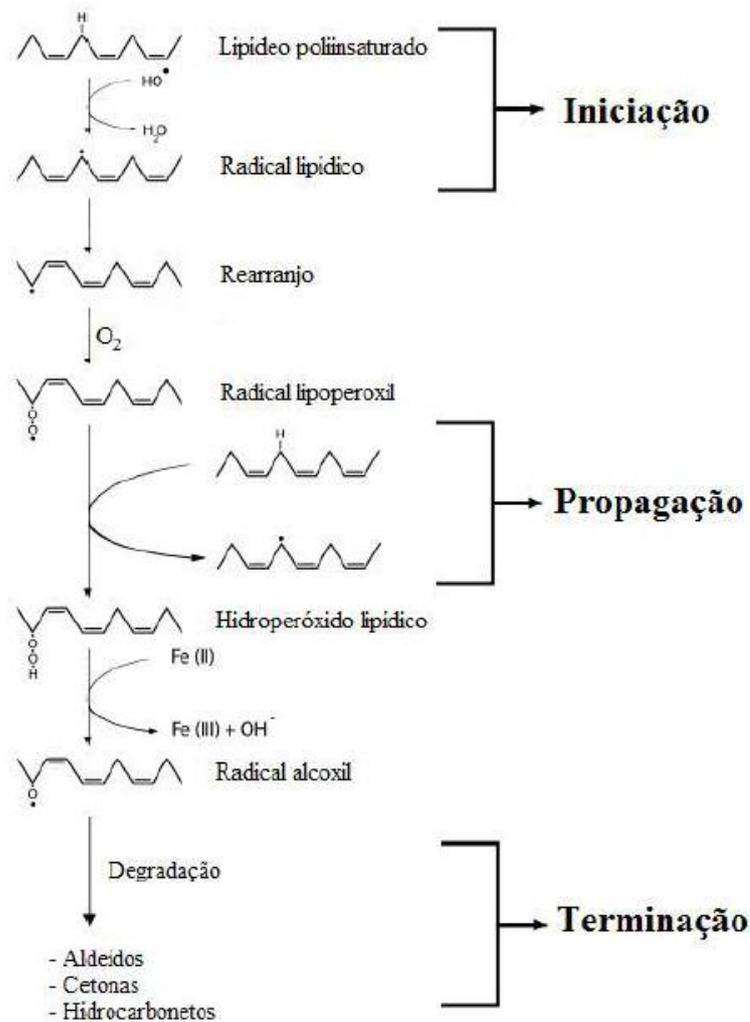


Figura 3. Sequência de reações da peroxidação lipídica. O radical hidroxil abstrai um hidrogênio e um elétron (H^\bullet) de um ácido graxo poliinsaturado (LH) ao reagir com os fosfolípídeos das membranas celulares (fase de iniciação). A abstração do H^\bullet leva a formação de H_2O e de um radical lipídico (L^\bullet), que sofre um rearranjo formando um dieno conjugado que ao reagir com oxigênio presente no meio, produz o radical lipoperoxil (LOO^\bullet) (fase de propagação). O LOO^\bullet pode reagir com outro ácido graxo presente na membrana celular e abstrai um hidrogênio, produzindo hidroperóxido lipídico (LOOH) e um L^\bullet . A fase de terminação pode ocorrer por meio da decomposição de LOOH , LO^\bullet e LOO^\bullet , formando aldeídos, como por exemplo MDA (Malonildialdeído), cetonas e outros hidrocarbonetos (Hermes-Lima, 2004; Mattos, 2009).

Medidas de consumo de O_2 , dienos conjugados e produtos de decomposição de LOOH (como malondialdeído e alcenos), têm sido amplamente utilizadas como marcadores de peroxidação lipídica. Estudos mostram que produtos da peroxidação lipídica são tóxicos ao organismo e estão relacionados ao envelhecimento e diversas

patologias (Nam, 2011; Pizzimenti *et al.*, 2013; Sultana *et al.*, 2013). O MDA (malondialdeído) é o mais utilizado como marcador de peroxidação lipídica, medido pela determinação química de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). As proteínas podem ser oxidadas pelas EROS e modificadas pela reação de produtos de peroxidação lipídica (Kocha *et al.*, 1997; Pizzimenti *et al.*, 2013).

Modificações estruturais em proteínas podem ocorrer em função de processos de oxidação produzidos por radicais livres. A oxidação de proteínas pode resultar no aparecimento de grupos carbonílicos e na perda da sua função. Os resíduos carbonílicos são produtos da oxidação de proteínas, gerados pela quebra e oxidação da cadeia polipeptídica ou pela oxidação das cadeias laterais dos aminoácidos como arginina, lisina, prolina e treonina. Proteínas carboniladas têm sido utilizadas como um dos marcadores de estresse oxidativo (Lopaczynskia and Zeisel, 2001). Um estudo clássico de Szweda, 1992 demonstrou efeitos de espécies reativas de oxigênio na atividade da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase e observaram a formação de um resíduo carbonílico na estrutura da enzima e inativação da mesma (Szweda and Stadtman, 1992; Hermes-Lima, 2004). Os danos causados às proteínas podem ser muito deletérios ao organismo, pois ocasionam danos em receptores, enzimas e proteínas transportadoras. Outro estudo mais recente (Nuss *et al.*, 2009) demonstrou que a atividade enzimática da creatina quinase em músculo esquelético de ratos diminuiu significativamente quando tinham resíduos carbonílicos em sua estrutura.

A oxidação de enzimas reparadoras do DNA, por exemplo, pode aumentar a frequência de mutações (Halliwell and Gutteridge, 2007). A oxidação dos ácidos nucleicos pode causar danos nas bases nitrogenadas, desoxirribose (açúcar), quebras de cadeia simples, ruptura de filamentos e outros. Entre os danos oxidativos ao DNA, a modificação nas bases pode causar lesões graves, letais ou mutagênicas. A incapacidade de manter o genoma intacto tem sido associada a várias doenças degenerativas, incluindo o câncer (Costa and Moradas-Ferreira, 2001; Hermes-Lima, 2004).

As EROs podem ter os seguintes efeitos no DNA: (1) causam alterações estruturais, como por exemplo mutações de bases, rearranjos, deleções e inserções, podendo produzir alterações cromossômicas e estarem envolvidos na inativação ou mutação de proto-oncogenes ou genes supressores de tumor; (2) modulam atividades das proteínas e genes que respondem ao estresse oxidativo e que agem na regulação de genes que estão relacionados à proliferação celular, diferenciação e apoptose (Wiseman and Halliwell, 1996).

Reações do tipo Fenton podem ocorrer constantemente ao redor do DNA, e o radical hidroxil (produto da reação de Fenton) pode reagir, em sítios específicos, provocando danos às bases purinas e pirimidinas, produzindo compostos, como por exemplo 8-hidroxi-guanina (quando o radical danifica o carbono C-8 da guanina) e também o MDA, produto tóxico, utilizado como marcador de estresse oxidativo (Hermes-Lima, 2004; Neofytou *et al.*, 2012; Kalyanaraman, 2013).

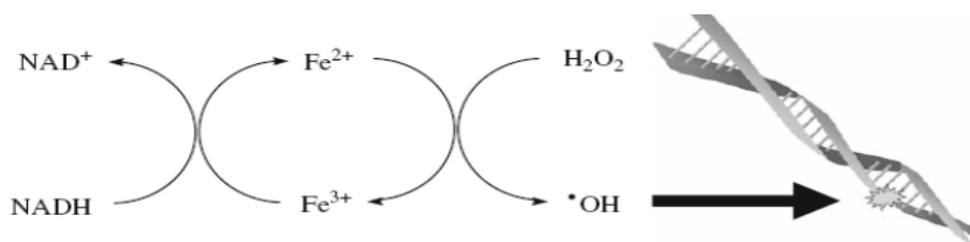


Figura 4. Formação do radical hidroxil via reação de Fenton e subsequente ataque ao DNA. O Fe(III) pode ser reciclado por redutores biológicos (NADH). Fonte: (Mattos, 2009).

2.3 Defesas antioxidantes

Um bom antioxidante é aquele que, mesmo em baixas concentrações frente a um substrato oxidável, retarda ou previne a oxidação de tal substrato (Barreiros *et al.*, 2006). Os antioxidantes protegem o organismo porque inibem reações ligadas à ação de radicais livres, e assim impedem a perda da integridade celular. Dependendo da forma como os antioxidantes agem sobre os radicais livres, eles podem ser denominados de *scavengers*, que são “sequestradores” ou “limpadores” quando agem transformando um radical livre em outro menos reativo ou neutralizando um radical já formado, e quelantes, quando complexam íons metálicos, principalmente cobre e ferro, que catalisam reações de oxidação (Andrade-Jr *et al.*, 2005; Ribeiro *et al.*, 2005; Day, 2008).

A capacidade antioxidante é definida como a capacidade de um composto de proteger o organismo da agressão oxidativa (Roesler *et al.*, 2007). O uso de células vivas representa o melhor modelo para determinar a capacidade antioxidante de um composto teste, no entanto, a maioria dos ensaios atuais são baseados na química dos radicais livres e realizados *in vitro*. Três métodos muito utilizados são o método do

difenilpicril-hidrazil (DPPH), o ensaio de azino etilbenzotiazilina-6-sulfonato (ABTS), e o ensaio de TBARS (Substâncias reativas ao ácido Tiobarbitúrico). O método difenilpicril-hidrazil (DPPH) investiga a capacidade de antioxidantes naturais em sequestrar o radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil, utilizando espectrofotometria (Roesler *et al.*, 2007). Vários trabalhos utilizam o método DPPH como por exemplo o estudo de Siqueira *et al.*, 2013, utilizaram a referida metodologia para quantificar a eliminação de radicais livres através da ação antioxidante de frutos do cerrado, provando que o tucumdo-cerrado e outros frutos são capazes de eliminar radicais livres e também o estudo de Zhou, *et al.*, 2011 que analisaram a atividade antioxidante de extratos de sementes de mamão indicando a presença de compostos antioxidantes.

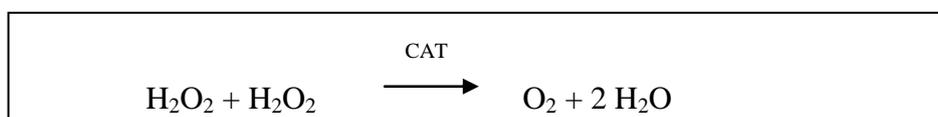
O ensaio de azinoetilbenzotiazilina-6-sulfonato (ABTS) é um método colorimétrico amplamente utilizado, baseado na captura do radical 2,2-azinobis gerado por meio de uma reação enzimática, o trabalho de Zhou, *et al.*, 2011, além do método de DPPH também utilizaram a metodologia de ABTS para mostrar que as sementes de mamão possuem atividade antioxidante e indicam que a fração acetato de etila dos extratos de sementes de mamão apresentaram maior atividade antioxidante, e que as sementes de mamão podem ser utilizadas como antioxidantes naturais. O ensaio de TBARS consiste em um sistema gerador de radicais formado por Fe^{2+} e H_2O_2 , os quais desencadeiam a reação de Fenton, e geram como produto final o radical hidroxil, que danifica o alvo (lipídio, carboidrato ou proteína) gerando produtos que reagem com o ácido tiobarbitúrico (Mayo *et al.*, 2003; Ramos-Vasconcelos *et al.*, 2005). Lee, *et al.*, 2009, utilizaram a metodologia de TBARS para investigar o efeito do consumo da casca da uva contra a peroxidação lipídica em ratos alimentados com dieta rica em gordura e mostraram que o consumo da casca de uva diminuiu a concentração hepática de TBARS nos grupos controle e grupos alimentados com alto teor de gordura (Lee *et al.*, 2009).

2.3.1 Defesas antioxidantes enzimáticas

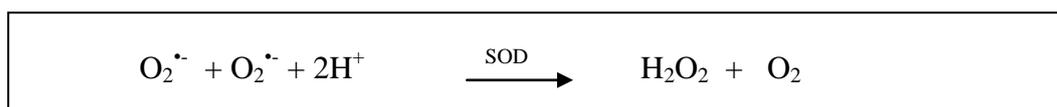
O sistema de defesa antioxidante enzimático é composto por enzimas como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutatona peroxidase (GPX). Tais enzimas encontram-se em diferentes compartimentos celulares para garantir a proteção celular contra o insulto oxidativo. Essas enzimas são consideradas a primeira linha de defesa contra os oxidantes porque atuam diretamente sobre EROs.

Catalases são enzimas que desempenham função contra os efeitos tóxicos do H_2O_2 , gerado por outras enzimas para oxidar substratos por meio de uma reação, formando água e oxigênio (Goyal and Basak, 2010). É uma proteína homotetramérica, localizada principalmente nos peroxissomos, mas pequenas quantidades são encontradas em mitocôndrias, onde há intensa produção de H_2O_2 . A catalase está presente também em muitos organismos, incluindo vertebrados, invertebrados, plantas, fungos, e bactérias. Nos vertebrados, a catalase está presente em todos os tecidos, com alta atividade particularmente nos eritrócitos, fígado, rim e tecido adiposo, porém, a atividade no cérebro é muito baixa (Hermes-Lima, 2004; Goyal and Basak, 2010).

A catalase converte H_2O_2 em H_2O , por meio da reação descrita abaixo:



Outra enzima muito importante para o organismo é a superóxido dismutase (SOD), que compreende uma família de enzimas com diferentes grupos prostéticos em sua composição. Nos eucariotos existem algumas isoformas de SOD. Está presente no citosol, na mitocôndria e meio extracelular. A forma contendo cobre e zinco está presente principalmente no citosol, enquanto que a forma contendo manganês está localizada na mitocôndria. A enzima SOD catalisa a dismutação do radical superóxido em H_2O_2 e O_2 , na presença do próton H^+ . A SOD atua como um inibidor preventivo, reduzindo o radical superóxido ao H_2O_2 , que pode ser posteriormente degradado pela catalase ou peroxidases, ou seja, a ação dessa enzima reduz a toxicidade das EROs, transformando uma espécie reativa (radical superóxido) em uma forma menos danosa às células (H_2O_2). Na presença de íons H^+ , a SOD dismuta o radical superóxido em H_2O_2 e oxigênio (Ribeiro *et al.*, 2005).



A glutathiona peroxidase (GPx) é responsável pela destoxificação de peróxidos orgânicos e inorgânicos (como o H_2O_2). Sua atividade depende da glutathiona reduzida (GSH), que é oxidada em glutathiona oxidada (GSSG). A GPx tem uma papel importante

na destoxificação do H_2O_2 , formando água (Fang *et al.*, 2002; Ribeiro *et al.*, 2005; Valko *et al.*, 2007).

Glutationa S-transferase (GST), são peroxidases, utilizadas para remoção de hidroperóxidos orgânicos e catalisam reações de conjugação entre glutatona (GSH) e moléculas oxidadas (Ribeiro *et al.*, 2005). É uma enzima destoxicante de fase II, desempenha papel fisiológico na destoxificação de compostos gerados intracelularmente ou encontrados na forma de xenobióticos. A reação de conjugação do grupo sulfidrílico da glutatona com grupos eletrofílicos de compostos xenobióticos, catalisada pela GST, torna os produtos da reação menos tóxicos e mais solúveis em água, facilitando a excreção (Fang *et al.*, 2002; Ribeiro *et al.*, 2005; Valko *et al.*, 2007).

A figura abaixo mostra o mecanismo de defesa enzimático:

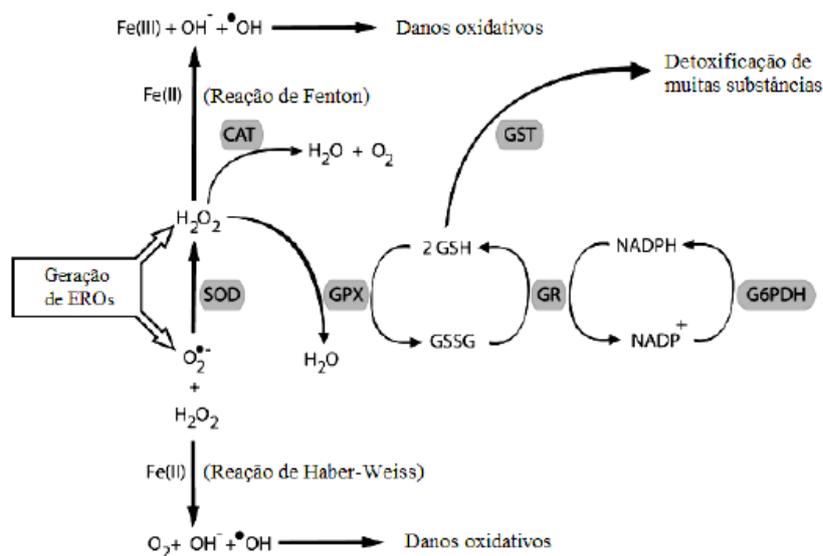


Figura 5. Mecanismo de defesa enzimático. Adaptado de (Hermes-Lima, 2004). A SOD dismuta $\text{O}_2^{\bullet-}$ e forma H_2O_2 e O_2 , enquanto a CAT converte o H_2O_2 em H_2O e O_2 . A GPx remove o H_2O_2 utilizando como substrato a GSH (glutationa reduzida). A GST é responsável pela destoxificação principalmente de hidroperóxidos orgânicos e a GR (glutationa redutase), dependente de NADPH recicla a glutatona oxidada (GSSH) em GSH. A G6PDH recicla NADP^+ em NADPH.

2.3.2 Defesas antioxidantes não enzimáticas

O sistema de defesa antioxidante não enzimático inclui compostos sintetizados pelo organismo humano como glutatona, bilirrubina, ceruloplasmina, hormônios sexuais, melatonina, coenzima Q, ácido úrico, e outros, ingeridos por meio da dieta

regular ou via suplementação como o ácido ascórbico (vitamina C), α -tocoferol (vitamina E), β -caroteno (precursor de vitamina A) e grupos fenóis de plantas (flavonóides) (Enns and Tiidus, 2010).

Os carotenóides são compostos de plantas e representam um grupo de pigmentos naturais lipossolúveis com tonalidades que variam do amarelo ao vermelho. Os seres humanos não podem sintetizar carotenóides e dependem exclusivamente da ingestão destes micronutrientes. O β -caroteno é o principal carotenóide da dieta e um potente antioxidante, principalmente pela captação do radical peroxil. O β -caroteno pode ser convertido em vitamina A, que quando encontrada em produtos de origem animal, incluindo carnes orgânicas, peixes, gema de ovo e leite fortificado ocorre na forma de retinil (molécula de retinol esterificada a uma molécula de ácido graxo) e nos alimentos de origem vegetal na forma pró-vitamínica (Thomas, 2006).

A glutathiona reduzida (GSH) é um tripeptídeo, formado pelos aminoácidos glicina, ácido glutâmico e cisteína, constitui o tiol redutor mais abundante no meio intracelular. A glutathiona está envolvida na sua função como antioxidante, mais especificamente como um redutor intracelular, sendo capaz, por exemplo, de reagir com um elétron não pareado de um radical livre, produzindo GSSG (glutathiona oxidada). A GSSG é, então, reduzida pela glutathiona redutase (GR), regenerando GSH, num processo dependente de NADPH (Ribeiro *et al.*, 2005).

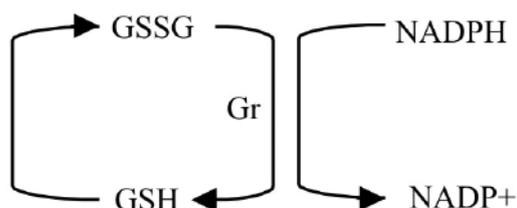


Figura 6. Representação da manutenção da glutathiona na forma reduzida. Gr (glutathiona redutase). Adaptado de Ribeiro *et al.*, 2005.

Alimentos que contêm grandes quantidades de antioxidantes naturais são muito importantes na manutenção da saúde e prevenção de doenças, evitando o estresse oxidativo (Roesler *et al.*, 2007). Estudos clínicos têm mostrado evidências de que antioxidantes fenólicos de cereais, frutas e vegetais são os principais fatores que contribuem para a baixa e significativa redução da incidência de doenças crônicas e degenerativas encontradas em populações cujas dietas são altas na ingestão desses

alimentos. Desta forma, a importância da pesquisa por antioxidantes naturais tem aumentado muito nos últimos anos (Roesler *et al.*, 2007). O consumo de frutas e hortaliças tem sido associado positivamente ao aumento da capacidade antioxidante total do organismo e a redução de algumas doenças (Wolfe *et al.*, 2008). Os efeitos benéficos desses alimentos são atribuídos à presença de compostos antioxidantes como fenóis, ácidos fenólicos e seus derivados, flavonóides, tocoferóis, fosfolipídios, aminoácidos, ácido fítico e ácido ascórbico (Roesler *et al.*, 2007; Wolfe *et al.*, 2008).

2.3.3 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos, ou polifenóis, são micronutrientes naturais produzidos no metabolismo secundário das plantas e presentes em nossa dieta, muitos deles são classificados como antioxidantes naturais, presentes em alimentos e plantas medicinais (Malaguti *et al.*, 2013). Diversos estudos mostram seu papel na prevenção de doenças degenerativas, câncer e doenças cardiovasculares. Os efeitos dos polifenóis para a saúde, dependem da quantidade consumida e sua biodisponibilidade. Os polifenóis podem ser classificados em quatro categorias: 1) ácidos fenólicos, 2) flavonóides, 3) estilbenos e 4) lignanos (Manach *et al.*, 2004; Malaguti *et al.*, 2013). Exemplos desses compostos podem ser encontrados na tabela abaixo:

Tabela 3. Classes de polifenóis (adaptado de Manach, 2004)

Classes/subclasses	Exemplos	Fontes Alimentares
Ácidos Fenólicos		
• Ácidos Hidroxibenzóico	Ácido gálico Ácido Vanílico	Morango, amora, caqui, framboesa
• Ácidos Hidroxicinâmico	Ácido Cumárico Ácido Cafêico Ácido Ferúlico	Café, Kiwi, cereja, berinjela
Estilbenos	Resveratrol	Vinho tinto
Lignanos	Secoisolariciresinol	Linhaça
Flavonóides		
• Flanonóis	Kaempferol	Cebola, brócolis, tomate, cereja,

	Quercetina	alho poró
• Flavonas	Luteolina Apigenina	Salsa, aipo
• Isoflavonas	Daidzeína Genisteína	Soja
• Flavanonas	Naringenina Hesperetina	Laranja, limão
• Antocianidinas	Cianidina Malvidina	Amora, jabuticaba, cereja, morango
• Flavonóis	Catequina Galocatequina	Chocolate, chá verde, vinho tinto, damasco

Antocianidinas são compostos pertencentes ao grupo de flavonóides, responsáveis pela pigmentação de frutas, flores e folhas que vão do vermelho-alaranjado, ao vermelho vivo, roxo e azul. Quando estão associadas a moléculas de açúcar, denominam-se antocianinas (Zhang *et al.*, 2005; Wang and Stoner, 2008). A estrutura fenólica das antocianinas é responsável por sua atividade antioxidante, ou seja, a capacidade de eliminar EROs, como superóxido, oxigênio singleto, H₂O₂ e o radical hidroxil. Os efeitos antioxidantes de antocianinas *in vitro* tem sido demonstrados utilizando vários sistemas de cultura de células, incluindo as do cólon, do endotélio, fígado, mama e células leucêmicas. Nestes sistemas de cultura, as antocianinas têm demonstrado múltiplos efeitos anti-tóxicos e anti-cancerígenos, tais como: atividade *scavenger* contra espécies reativas de oxigênio (EROs), estímulo da expressão de enzimas de destoxificação, diminuição da peroxidação lipídica, e redução da proliferação celular de câncer (Zhang *et al.*, 2005; Wang and Stoner, 2008).

O amplo consumo de antocianinas e antocianidinas determinou efeitos inibitórios na proliferação celular de câncer. Cinco antocianidinas (cianidina, delfinidina, a pelargonidina, petunidina, e a malvidina), e quatro antocianinas (cianidina-3-glucósido, cianidina-3-galactósido, delfinidina-3-galactósido e pelargonidina-3-galactósido) foram testadas para inibição da proliferação celular de células de câncer humanas das seguintes linhagens: AGS (estômago), HCT-116 (cólon), MCF-7 (mama), NCI H460 (pulmão), e SF-268 (Sistema nervoso central). Antocianidinas (Malvidina, pelargonidina) mostraram atividade inibitória significativa

da proliferação celular, em relação a todas as linhagens de células cancerígenas (Zhang *et al.*, 2005).

Fitoquímicos especiais desempenham um importante potencial preventivo de doenças causadas pelo estresse oxidativo, que incluem distúrbios cardiovasculares, cânceres, cataratas e outras doenças causadas pelo estresse oxidativo (Pereira *et al.*, 2010). Numerosos estudos epidemiológicos têm sugerido que os compostos polifenólicos estão envolvidos na prevenção de doenças degenerativas, tais como câncer e doenças cardiovasculares, diabetes tipo-2, acidente vascular cerebral trombótico, obesidade, doenças neurodegenerativas associadas ao envelhecimento e infecções (Chagne *et al.*, 2012).

2.4 Tucum-do-cerrado (*Bactris setosa*)

O cerrado Brasileiro está inserido predominantemente no planalto central do Brasil. Ocupa cerca de 23% do território nacional e é o segundo maior bioma do País (Pereira *et al.*, 2010). Apresenta uma flora muito rica dentre as savanas do mundo com 12 mil espécies de plantas vasculares. As frutas nativas são muito utilizadas para o consumo *in natura* ou para produção de doces, geleias, sucos e licores, e são, assim importantes para famílias que se favorecem com o ecoturismo regional (prática crescente na região centro-oeste). O crescente aumento do consumo de frutas do cerrado, os quais são ricos em fibras, vitaminas, minerais e antioxidantes caracterizam a função diferenciada que as frutas exercem sobre o adequado desenvolvimento e funcionamento do organismo (Pereira *et al.*, 2010).

O tucum-do-cerrado (*Bactris setosa*) é produzido por palmeiras de médio porte (4 a 6 metros de altura) e possui tronco coberto de espinhos muito finos e agudos e frutos redondos. Quando maduros, tem a polpa comestível que pode ser consumida *in natura* ou em forma de sucos, sorvetes, geléias, vinhos e vinagres (Silva *et al.*, 2001). Representa uma excelente fonte de compostos bioativos como flavonóides, antocianinas e vitamina C (Siqueira *et al.*, 2013). Possui os seguintes nomes populares: coco-de-natal, coco-de-tucum, tucum (nome mais comum), tucum-bravo, tucum-do-brejo, uva-do-mato, uva-da-terra (Reis, 2006).

O tucum-do-cerrado é um fruto com casca de coloração roxa quando maduro, de difícil coleta por apresentar espinhos pontiagudos no tronco, encontrados em cachos e em áreas de solo drenado. Frutifica no período de Janeiro a abril. O fruto é comestível,

possui casca rígida muito semelhante ao da jabuticaba e polpa suculenta, fibrosa e com gosto azedo. É consumido pela população de Terezópolis de Goiás na forma de deliciosos sucos, doces, licores e muito utilizados em infusão na cachaça. São usados também para pesca de peixes grandes, principalmente no norte do Estado de Goiás.



Figura 7. Frutos do tucum-do-cerrado, *Bactris setosa* coletados na cidade de Terezópolis de Goiás – GO em fevereiro de 2012.

Existem alguns estudos que pesquisam frutos do gênero *Bactris* como fonte de antioxidantes, por exemplo uma análise do teor de carotenóides totais e composição de seis variedades de *Bactris gasipaes* por meio de espectrofotometria e HPLC, observando como resultado a presença de β -caroteno, gama-caroteno e licopeno. Quando a atividade antioxidante foi avaliada utilizando DPPH, observou-se que o β -caroteno apresentou a maior atividade (Jatunov *et al.*, 2010). Foi obtido também em frutos de *B. gasipaes*, quantidades significativas de ácido palmítico e ácido linoleico (Blanco and Munoz, 1992; Yuyama *et al.*, 2003). Frutos de *Bactris guineensis* analisados por HPLC apresentaram alto teor de antocianinas (Osorio *et al.*, 2010).

2.5 *Saccharomyces cerevisiae*

Ensaio *in vitro*, embora importantes na avaliação do potencial antioxidante de componentes diversos, compartilham um inconveniente na medida em que não medem o efeito de um antioxidante sobre a fisiologia da célula. Esta deficiência pode ser resolvida por meio do uso de células vivas e oxidantes fisiologicamente relevantes (Wu *et al.*, 2011). A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é um eucarioto unicelular que tem semelhanças com células de mamíferos em níveis de macromoléculas e organelas. É um organismo de fácil cultivo sendo, portanto, amplamente utilizado como sistema modelo para muitas pesquisas, devido aos mecanismos celulares básicos e metabolismo (Costa and Moradas-Ferreira, 2001). *S. cerevisiae* se adapta a uma dose não-letal de oxidante exógeno por meio de parada temporária do ciclo celular. A parada do crescimento é um mecanismo pelo qual as leveduras se adaptam ao estresse oxidativo (Alic *et al.*, 2001). *S. Cerevisiae* é um dos eucariotos melhor caracterizados a níveis moleculares, serve como paradigma para eucariotos superiores, como plantas e animais em estudos celulares fundamentais. Essa característica serviu de base para fazermos ensaios fisiológicos de atividade antioxidante como relatado recentemente por pesquisadores da Austrália (Wu *et al.*, 2011).

A sensibilidade das leveduras em geral ao estresse depende do estado funcional dos organismos. Em experiências com culturas de microrganismos são conhecidos vários estágios: fase lag (células em adaptação às condições de cultura e se preparando para dividir), fase logarítmica ou exponencial (células em divisão), fase estacionária (o número de células permanece estável), e fase de morte da cultura (número de células mortas é mais elevada do que as recentemente novas). Na maioria dos casos, as culturas nas fases exponencial e estacionária são utilizadas nos estudos científicos (Lushchak, 2009).

Quando a glicose é usada como a fonte de energia e carbono, o metabolismo de *S. cerevisiae* em fase exponencial é essencialmente anaeróbico, isto é, a maior parte da energia é produzida pela glicólise ou fermentação. O envolvimento da mitocôndria e o consumo de oxigênio é mínimo, resultando em baixa capacidade de produção de EROs. Por estas razões, a atividade das enzimas antioxidantes em fase exponencial de cultura de levedura é baixa. A transição da cultura de *S. cerevisiae* em fase estacionária é caracterizada por uma maior utilização de etanol, formada na fase anterior, como fonte

de carbono e energia. A oxidação completa de etanol em leveduras, o que exige o funcionamento da mitocôndria, intensifica a geração de EROs que é seguido por um aumento da atividade de enzimas antioxidantes, fazendo com que exista uma capacidade de manter níveis de EROs dentro de limites seguros (Lushchak, 2009).

As levedura também utilizam enzimas destinadas à desintoxicação de EROs, e muitas delas são induzidas não só pelas condições que infligem danos oxidativos, mas também em resposta a diversos estresses ambientais. Os genes que codificam a superóxido dismutase citosólica e também a catalase que reduzem superóxido e H_2O_2 , respectivamente, são induzidos durante situações de estresse. Enquanto a catalase reduz o H_2O_2 especificamente, a glutatona peroxidase pode agir sobre os peróxidos orgânicos como substratos, e o gene que codificam a glutatona peroxidase é também induzido em resposta ao estresse (Hohmann and Mager, 2003).

Em condições de crescimento normais, EROs endógenos são gerados principalmente pela fuga de elétrons da cadeia de transporte de elétrons em mitocôndrias, portanto, não é surpreendente que esta organela abriga os seus próprios sistemas locais de proteção relacionadas as EROs. Citocromo b5 redutase e citocromo c peroxidase, ambos parecem proteger contra o estresse oxidativo, tal como a eliminação de qualquer um dos seus genes aumenta a sensibilidade de células de levedura quando expostas a drogas que induzem danos oxidativos, e ambos os genes são induzidos quando a célula está em condição de estresse. Além disso, os genes que codificam enzimas que catalisam as etapas de geração de NADPH da via pentose fosfato também são induzidos como parte da resposta ao estresse (Hohmann and Mager, 2003).

O estudo de WU *et al.*, 2011, descreve um sistema de análise biológica para medir a capacidade antioxidante de diferentes compostos usando a resposta de diminuição do crescimento induzida por oxidante apresentada por *S. cerevisiae*. O método pode medir a capacidade de um componente de proteger as células contra um oxidante evitando a parada do crescimento celular (medida por meio da absorbância a 600 nm). Pode também medir a capacidade de um componente de induzir uma resistência celular aos efeitos danosos de diferentes oxidantes. Por meio deste método os autores mostraram que o ascorbato e o ácido gálico possuem atividade de “scavenging” de EROs e induzem uma resistência de *S. cerevisiae* a vários oxidantes.

2.7 Maçã

Nutricionistas têm recomendado um consumo maior de frutas e legumes, como fontes de compostos alimentares, tais como fibras, micronutrientes e compostos antioxidantes que são benéficos para a saúde humana. A maçã é considerada como parte de uma dieta saudável, sendo muito baixa em calorias totais e uma boa fonte de fibra dietética. Apesar das maçãs possuírem baixos teores em vitamina C do que outras frutas, elas têm concentrações muito elevadas de fitoquímicos e outros antioxidantes, especialmente compostos polifenólicos, como a quercetina, epicatequina, e polímeros procianidina (Chagne *et al.*, 2012). O estudo de Manzoor, *et al.*, 2012 mostram a presença de ácido gálico e catequinas e também atividade antioxidante da maçã em ensaios *in vitro*. Os resultados deste estudo revelaram que as cascas de maçã tinham capacidade antioxidante superior a da polpa, sugerindo que o consumo da maçã, juntamente com a casca pode ser recomendado para obtenção de melhores benefícios nutritivos (Manzoor *et al.*, 2012).

As maçãs são uma fonte muito significativa de flavonóides na dieta das pessoas nos EUA e na Europa. Nos Estados Unidos, 22% dos compostos fenólicos consumidos a partir de frutos são a partir de maçãs, tornando-as a maior fonte de compostos fenólicos (Boyer and Liu, 2004). Na Finlândia, as maçãs e as cebolas são principais fontes de flavonóides na dieta. Em um estudo de coorte finlandês, a ingestão de flavonóides foi associada com uma menor mortalidade total da população estudada, neste trabalho, a relação entre a ingestão de antioxidantes provenientes de flavonóides e o risco de câncer foi estudado entre 9959 indivíduos finlandeses, inicialmente, não portadores de câncer. O consumo alimentar foi estimado pelo método de história alimentar durante um acompanhamento de 24 anos, onde foram diagnosticados 997 casos de câncer e observado uma associação inversa entre a ingestão de flavonóides e incidência de todos os tipos de câncer diagnosticados, indicando a maçã como principal fonte de flavonóides (Knekt *et al.*, 1997; Boyer and Liu, 2004).

Um estudo recente de Siqueira, *et al.*, 2013, analisaram a presença de compostos bioativos e a atividade antioxidante de 12 frutos do cerrado e revelaram que o tucum-do-cerrado possui alto teor de compostos bioativos (flavanóis, antocianinas e vitamina C) em relação às maçãs. Os resultados deste estudo devem estimular a demanda, consumo e cultivo de frutas do cerrado e resultar no desenvolvimento sustentável da região onde esse bioma domina.

Por existirem diversos estudos mostrando que a maçã possui altas concentrações de antioxidantes, foi estabelecido o uso de maçã como controle em alguns experimentos desse estudo apenas para comparação em relação às propriedades antioxidantes do nosso fruto de interesse.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Analisar o potencial antioxidante de extratos do fruto de tucum-do-cerrado por meio de ensaios usando células da levedura *Saccharomyces cerevisiae* e por meio de metodologias para medida da proteção contra a peroxidação lipídica e danos oxidativos à proteína.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar os efeitos de amostras a do fruto tucum-do-cerrado (extratos aquosos e etanólicos) sobre a parada do crescimento de leveduras *S. cerevisiae* provocada por oxidantes fisiologicamente relevantes (peróxido de hidrogênio, hidroperóxido de cumene, menadiona).
- Analisar os efeitos de amostras de tucum-do-cerrado em ensaios de TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico).
- Verificar os efeitos de amostras de tucum-do-cerrado em ensaios de proteção ao dano à proteína.

Capítulo 1

Análise da proteção antioxidante promovida por extratos de tucum-do-cerrado (*Bactris setosa*) em leveduras *Saccharomyces cerevisiae*

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Amostras de Tucum-do-cerrado

Os frutos de tucum-do-cerrado da espécie *Bactris setosa* foram coletados em fevereiro de 2012 em uma chácara localizada na cidade de Terezópolis – GO com localização geográfica (Obtida por meio de GPS): Latitude: 16°28'46.67"S Longitude: 49° 5'23.05"O. Os frutos foram retirados em “cachos”, e levados para o laboratório onde foram retirados dos “cachos”, lavados em água destilada e secos à temperatura ambiente. Posteriormente os frutos foram colocados em sacos plásticos e armazenados no freezer -80°C até a extração e análises do potencial antioxidante.



Figura 8. Imagem gerada por meio do software “Google Earth” a partir da localização geográfica do local da coleta do Tucum-do-cerrado em Terezópolis de Goiás. O “alfinete amarelo” indica o ponto aproximado (raio de 600 m) via GPS do local da coleta.

4.2 Preparo dos extratos dos frutos de tucum-do-cerrado

4.2.1 Extrato aquoso das amostras de tucum-do-cerrado

As frutas congeladas foram cortadas em pequenos pedaços contendo casca e polpa juntos, e casca e polpa separados. Os pedaços foram obtidos por meio de cortes ao redor do caroço feitos com uma faca de aço inox. A seguir os fragmentos foram macerados em almofariz de porcelana na presença de nitrogênio líquido. Dez

miligramas do macerado congelado foram homogeneizados em 1 ml de água deionizada (diluição 1:100). O extrato foi preparado homogeneizando as amostras em homogeneizador de vidro tipo Dounce. Posteriormente, as amostras foram submetidas à centrifugação a 10.000 xg por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi transferido para um tubo novo e a partir dessa amostra inicial (1:100), o extrato foi diluído em 1:200, 1:500 e 1:1000 em água deionizada e utilizados nos ensaios.

4.2.2 Extrato etanólico dos frutos de Tucum-do-cerrado

As frutas congeladas foram cortadas em pequenos pedaços contendo casca e polpa juntos, e casca e polpa separados. Os pedaços foram obtidos por meio de cortes ao redor do caroço feitos com uma faca de aço inox. A seguir os fragmentos foram macerados em almofariz de porcelana na presença de nitrogênio líquido. Cem miligramas do macerado foi colocado em um tubo de ensaio com tampa e adicionados 5 ml de etanol em concentrações distintas (etanol 95, 70 e 50%) para cada parte da fruta, ou seja, foi preparado um total de 3 extratos para cada parte da fruta. Após adição do etanol, as amostras foram colocadas em uma plataforma agitadora (200 r.p.m) e incubadas por 2 horas à temperatura ambiente. O extrato foi centrifugado a 10.000 xg por 30 minutos e o sobrenadante foi recolhido e submetido à secagem a vácuo (Equipamento - SpeedVac Savant - B446 -) à temperatura ambiente. Após a secagem, o extrato foi pesado e ressuspenso em água deionizada para que fosse obtida uma concentração estoque de 10 mg/ml. Os extratos foram esterilizados por meio da filtração em filtro com membrana de 0,25 µm.

4.3 Ensaios utilizando leveduras *Saccharomyces cerevisiae* para avaliar as propriedades antioxidantes do tucum-do-cerrado

4.3.1 Linhagem de levedura

Foram utilizadas leveduras *Saccharomyces cerevisiae* da linhagem EG 103 (MAT α , leu2-3, 11 his3 Δ 1, trp-289a, ura3-52), disponíveis no laboratório de biologia molecular da Universidade de Brasília.

4.3.2 Meios de crescimento e condições de cultura

As leveduras EG 103 estavam armazenadas em freezer -80° em meio YEPD e glicerol 50% e a partir desse estoque, as leveduras foram semeadas em placas contendo meio YEPD (1% p/v de extrato de levedura, 2% p/v de peptona de caseína, 2% p/v de glicose e 2% p/v de ágar) e cresceram a 28°C por 48 horas. A cultura de leveduras utilizadas nos experimentos foi iniciada por meio da inoculação de uma colônia presente na placa descrita anteriormente, em meio líquido mínimo sintético, no qual denominamos SC, composto por 5% de YNB 20X, 2% de glicose, 0,008% de uracila, 0,008% de adenina, 0,008% de metionina, 0,008% de histidina, 0,04% de leucina, 0,008% de triptofano e 70,6% de água destilada estéril. A cultura foi incubada durante a noite com agitação de 200 r.p.m em 28°C .

4.3.3 Antioxidantes e oxidantes comerciais utilizados nos ensaios

Os antioxidantes e oxidantes usados neste estudo foram adquiridos da empresa Sigma Aldrich. Os antioxidantes ácido ascórbico e ácido gálico utilizados foram dissolvidos em água e usados na concentração final de 8mM e 2mM respectivamente. O oxidante H_2O_2 foi preparado em água e utilizado nas concentrações finais de 0,5 e 1 mM. O hidroperóxido de cumene (CHP) preparado em água e a menadiona preparada em etanol 95% foram utilizados nas concentrações finais de 100 e 150 μM . A figura 9 mostra a estrutura dos compostos oxidantes utilizados e a figura 10 mostra a estrutura dos compostos antioxidantes.

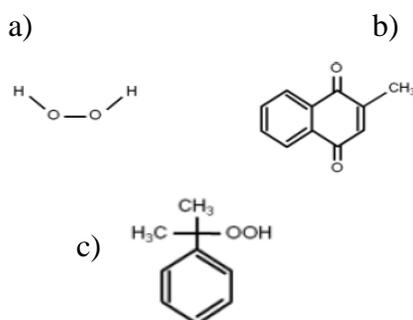


Figura 9. Estrutura química dos oxidantes utilizados neste estudo. a) H_2O_2 , b) menadiona, c) CHP.
Fonte: Wu, et al., 2011 com adaptações.

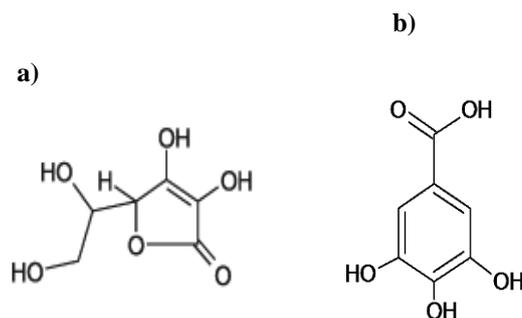


Figura 10. Estrutura química dos antioxidantes comerciais utilizados neste estudo. a) Ácido ascórbico, b) ácido gálico. Fonte: Scotti, et al., 2007 com adaptações.

4.3.4 Ensaio de crescimento das *S. cerevisiae* em microplaca para determinação da concentração não letal dos oxidantes

Os ensaios tiveram como objetivo determinar a concentração de cada oxidante que causava diminuição do crescimento das leveduras. Portanto, curvas de crescimento de leveduras foram realizadas com controle sem o tratamento (controle positivo, contendo apenas as células e meio de cultura) e também curvas utilizando cada oxidante, determinando assim as concentrações dos oxidantes que não fossem letais às células.

Para realização deste ensaio uma colônia de EG103 foi inoculada em meio SC e a cultura foi então incubada com agitação a 200 r.p.m a 28°C durante a noite. O pré-inóculo foi então diluído para uma absorbância a 600 nm de 0,4 em meio SC, o que possibilitou uma OD 600 nm inicial de 0,1 nas culturas em placa de 96 poços. Diferentes concentrações de cada oxidante foram testadas, adicionando-os na placa junto com a pré-cultura. A mistura (150 µL contendo meio SC, pré-cultura e o oxidante) foi realizada em duplicata em cada experimento. As placas foram incubadas a 28°C com agitação a 500 r.p.m. e o crescimento de leveduras foi monitorizado através da leitura da OD 600nm no início de incubação e, em seguida, em intervalos de uma hora durante 8h utilizando um leitor de placa de 96 poços (Espectrofotômetro de Microplacas Eon™ - BioTek - Software Gen5™).

Após testar diferentes concentrações dos oxidantes, decidimos utilizá-los nos ensaios nas seguintes concentrações: H₂O₂ nas concentrações de 0,5 e 1 mM, CHP 100 e 150 µM e menadiona nas concentrações de 100 e 150 µM.

4.3.5 Ensaio de crescimento das *S. cerevisiae* em microplaca utilizando oxidantes e extratos de Tucum-do-cerrado

Uma vez que as concentrações dos oxidantes foram determinadas, testes foram realizados para análise das propriedades antioxidantes dos extratos aquoso e etanólico dos frutos de tucum-do-cerrado. Para realização deste ensaio uma colônia de EG103 foi inoculada em meio SC com agitação de 200 rpm a 28°C durante a noite. O pré-inóculo foi então diluído a uma OD 600nm de 0,4 em meio SC, que possibilitou uma OD 600 nm inicial de 0,1 numa placa de 96 poços. Junto com o pré-inóculo diluído, foi adicionado na placa de 96 poços os oxidantes de interesse em suas concentrações já estabelecidas e os extratos de tucum-do-cerrado (os extratos de tucum foram adicionados primeiro na placa): extrato aquoso na diluição 1:100 e os extratos etanólicos na concentração final de 100 µg/ml para cada parte da fruta (casca e polpa juntos e caca e polpa separados). A mistura (150 µL) para cada oxidante e para cada parte da fruta foi realizada em duplicata. As placas foram incubadas a 28°C com agitação a 500 r.p.m e o crescimento de leveduras foi monitorado através da leitura da OD 600nm no início da incubação e, em seguida, em intervalos de 1 hora durante 8 h utilizando um leitor de placa de 96 poços (Espectrofotômetro de Microplacas Eon™ - BioTek - Software Gen5™). O controle positivo (sem os oxidantes) e testes com oxidantes foram incluídos em cada experimento.

4.3.6 Ensaio de crescimento das *S. cerevisiae* em microplaca utilizando oxidantes e diferentes concentrações de casca de tucum-do-cerrado como antioxidante

Ensaio realizado utilizando a mesma metodologia do ensaio de crescimento das *S. cerevisiae* em microplaca utilizando oxidantes e tucum-do-cerrado como antioxidante, entretanto utilizando apenas o extrato etanólico 95% da casca de tucum-do-cerrado em diferentes concentrações (30, 50, 100 e 150 µg/ml).

4.3.7 Ensaio de crescimento das *S. cerevisiae* em microplaca utilizando antioxidantes comerciais

Ensaio realizado utilizando a mesma metodologia do ensaio de crescimento das *S. cerevisiae* em microplaca utilizando oxidantes e Tucum-do-cerrado como antioxidante, entretanto usando ácido ascórbico ou ácido gálico como antioxidantes. .

4.3.8 Análise estatística dos dados e número de repetições dos experimentos

As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do software MYNOVA, e aplicado o teste Dunnett's para comparação entre dois ou mais pontos. Os ensaios foram realizados com repetição em triplicata (N=3) e os dados foram descritos com o valor da média e erro padrão.

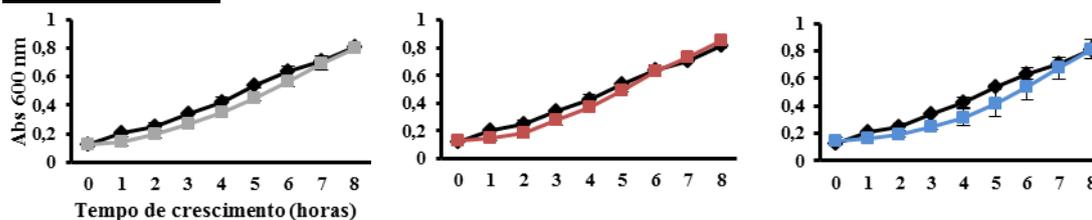
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO DO CAPÍTULO 1

O ensaio do crescimento das leveduras *S. cerevisiae* na presença de extratos do fruto do tucum-do-cerrado teve como objetivo verificar se estes extratos tinham algum efeito sobre o crescimento das leveduras. Os resultados mostrados na figura 11 indicaram que os extratos de tucum-do-cerrado não alteraram o crescimento das leveduras em relação ao controle positivo (sem adição de extrato de tucum), ou seja, compostos bioativos presentes nos extratos de tucum-do-cerrado não apresentaram toxicidade para leveduras *S. cerevisiae*.

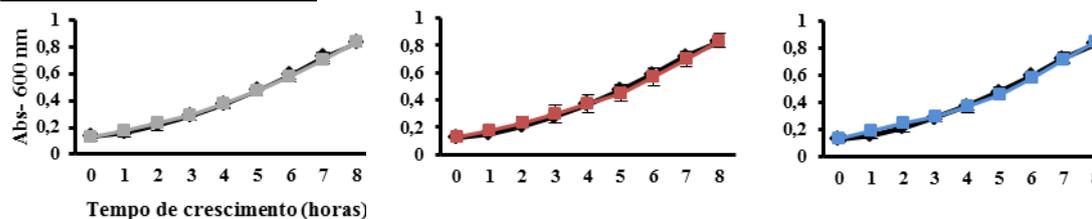
Em um estudo realizado no sul da China, foram analisadas as atividades antioxidantes de 56 frutos silvestres. A capacidade antioxidante dos extratos foi avaliada usando a metodologia da capacidade antioxidante total por redução de ferro (FRAP) e método de Trolox (mede a capacidade antioxidante de uma determinada substância, em comparação com o padrão, Trolox). A correlação significativa entre o valor de FRAP e o valor do método de trolox sugeriu que os componentes antioxidantes nestes frutos foram capazes de reduzir oxidantes e eliminar radicais livres. A alta correlação entre a capacidade antioxidante e teor de fenólicos totais indicaram que os compostos fenólicos podem ser os principais contribuintes para a atividade antioxidante medida. Os resultados mostraram que os frutos de *Eucalyptus robusta*, *Eurya nitida*, *Melastoma sanguineum*, *Melaleuca leucadendron*, *Lagerstroemia indica*, *Caryota mitis*, *Lagerstroemia speciosa* e *Gordonia axillaris* possuíam as mais altas capacidades antioxidantes e teor de fenólicos totais (Fu *et al.*, 2010).

Existem poucos dados na literatura da composição química do tucum-do-cerrado, porém sabe-se que o Tucum é rico em compostos fenólicos, antocianinas, carotenóides, vitamina C e flavonóides (Siqueira *et al.*, 2013). Sabe-se também que frutas e vegetais possuem diferentes compostos antioxidantes, cuja atividade têm sido muito estudada atualmente, sugerindo como compostos bioativos e essenciais por fornecem benefícios à saúde. A presença de compostos fenólicos, tais como flavonóides, ácidos fenólicos, antocianinas e carotenóides contribuem para os efeitos benéficos destes alimentos. No grupo dos compostos fenólicos, os flavonóides e os ácidos fenólicos são os que mais se destacam e são considerados os antioxidantes mais comuns de fontes naturais, encontrados em frutos e vegetais (Karakaya, 2004; Ninfali *et al.*, 2005).

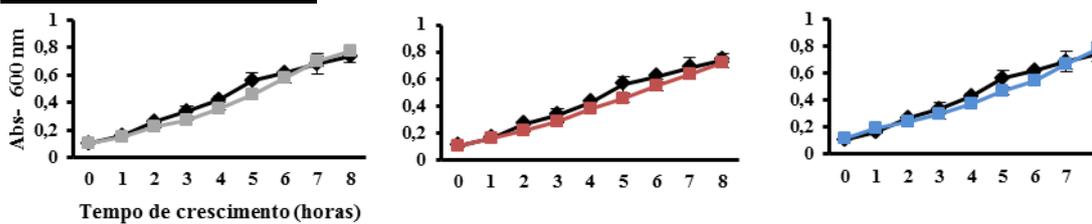
Extrato Aquoso



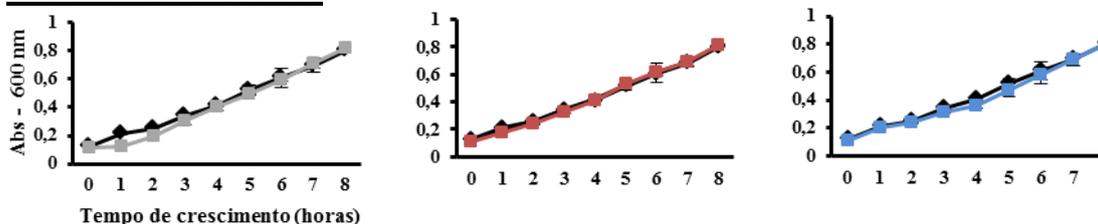
Extrato Etanólico 95%



Extrato Etanólico 70%



Extrato Etanólico 50%



-♦- Controle positivo (células e meio de cultura) -■- Teste com extratos de casca -■- Testes com extrato de polpa -■- Testes com extratos de polpa e casca

Figura 11. Curva de crescimento da levedura *S. cerevisiae* EG 103 em meio mínimo analisadas em OD_{600nm}: (-♦-) curva controle positivo (células e meio de cultura), (-■-) curva com adição de casca de Tucum, (-■-) curva com adição de extrato de polpa de Tucum e (-■-) curva com adição de extrato de casca e polpa de Tucum. Curvas de crescimento analisadas usando diferentes extratos: aquoso na diluição 1: 100 e etanólico 95%, 50% e 70% na concentração final de 100 µg/ml. Os valores são apresentados como média ± erro padrão da média. N = 3. Não houve diferença estatisticamente significativa entre as curvas.

A seguir foram feitos experimentos para determinar a concentração não letal de diferentes oxidantes (H_2O_2 , CHP e menadiona) em *S. cerevisiae* (Figura 12). Os oxidantes testados diminuíram o crescimento de *S. cerevisiae* de modo dose dependente.

A levedura *S. cerevisiae*, como outros organismos, é capaz de responder ao estresse oxidativo. A resposta à doses não letais de oxidantes, ou produtos de oxidação, leva à parada temporária do ciclo celular, adaptação e indução da resistência a doses maiores de oxidantes. A parada do ciclo celular constitui uma parte da resposta fisiológica geral das células ao estresse e ocorre quando as células são expostas a agentes que danificam o DNA, metais pesados, estresse oxidativo, hipertermia e fome, bem como outros tipos de estresse (Alic *et al.*, 2001; Fong *et al.*, 2008).

Segundo Wu, *et al.*, 2011, uma das principais conclusões em estudos anteriores é que leveduras *S. cerevisiae* se adaptam a uma dose não letal de oxidante exógeno submetendo-se a uma parada do ciclo celular temporário. Estudos mostram que após a exposição a uma baixa concentração de hidroperóxido do ácido linoleico (LAH), células de levedura exibem uma parada na fase G1 ou um atraso na progressão do ciclo celular. Esta condição induzida por oxidantes estende-se para o H_2O_2 , o qual resulta em um atraso na fase G2, e menadiona, provocando atraso na fase G1 do ciclo celular, atraso semelhante a LAH (Fong *et al.*, 2008).

Um estudo sobre a resposta de *S. cerevisiae* ao CHP (190 μ M) (Sha *et al.*, 2013) indicou que as culturas de leveduras mostram uma resposta eficaz ao estresse, pela remoção da maior parte do oxidante dentro de 20 minutos transformando-o em um oxidante menos prejudicial (COH – álcool Cumil). A análise transcricional dessa resposta fisiológica das leveduras revelou um conjunto de genes expressos, como por exemplo o da glutatona, tiorredoxinas, e fatores de transcrição, indicando que existe uma regulação em cascata complexa que conduz a resposta ao estresse durante os primeiros 20 minutos depois da adição do oxidante. O trabalho de (Munhoz and Netto, 2004) com leveduras expostas ao H_2O_2 mostrou que a atividade de catalase e tiorredoxinas foram significativamente aumentadas, e que essas enzimas parecem estar relacionadas com a resistência desta levedura ao H_2O_2 .

A investigação da resistência de *Candida glabrata* e *S. cerevisiae* expostas à menadiona e CHP em um trabalho mostra que *C. glabrata* possui maior resistência à menadiona, crescendo em uma concentração de até 1,2 mM deste oxidante, quando comparada com a *Saccharomyces cerevisiae* que cresce em concentrações de até 0,2

mM. Entretanto, mostraram a mesma resistência quando expostas a CHP, podendo crescer em concentração de até 0,4 mM deste oxidante (Cuellar-Cruz *et al.*, 2009).

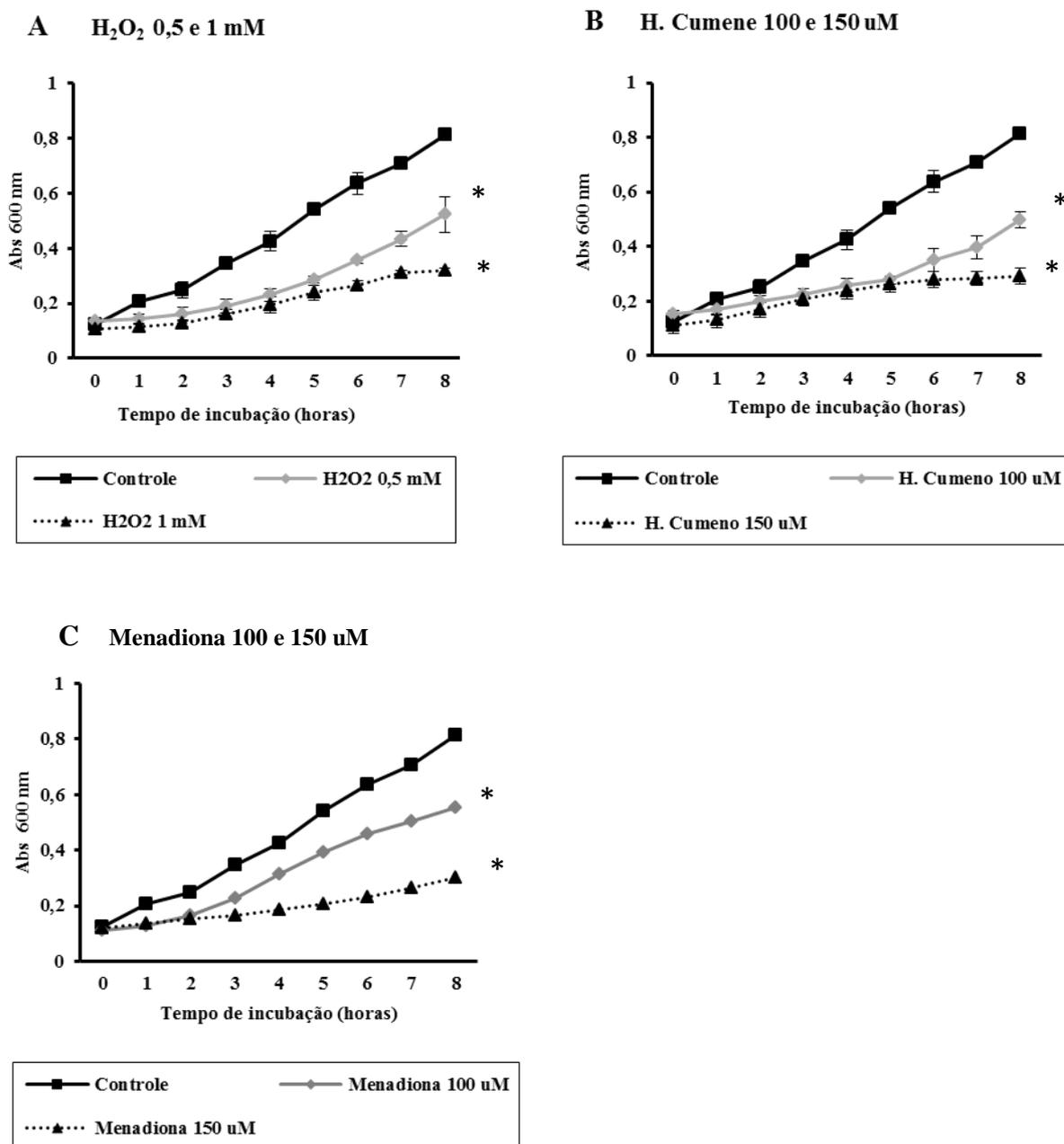


Figura 12. Crescimento de leveduras *S. cerevisiae* expostas a diferentes oxidantes. A) Curva de crescimento com leveduras expostas ao H₂O₂ 0,5 e 1 mM e controle positivo (sem adição de oxidante), B) Curva de crescimento com leveduras expostas H. cumene 100 e 150 μ M e controle positivo, C) Curva de crescimento com leveduras expostas a menadiona 100 e 150 μ M e controle positivo. O crescimento foi monitorado em OD_{600nm} durante 8 horas. N = 6. Os valores são apresentados como média \pm erro padrão da média. O controle positivo foi utilizado sem adição de oxidante. * representa diferença estatística significativa em relação ao controle positivo ($p \leq 0,05$).

Ensaios realizados para medida de inibição de crescimento de leveduras mediado por H_2O_2 , menadiona e CHP, revelaram que *S. cerevisiae* é sensível a H_2O_2 0,5 e 1 mM, menadiona 100 e 150 μM e CHP 100 e 150 μM e que a sensibilidade à menadiona ocorre quando as células são cultivadas aerobicamente, sugerindo que este composto é tóxico por causa da produção de superóxidos. Quando culturas se aproximam da fase estacionária e são expostas a estes oxidantes, as células de levedura se tornam cada vez mais resistentes (Jamieson, 1992; Sha *et al.*, 2013).

A partir da literatura estudada (Hohmann and Mager, 2003; Lushchak, 2009), podemos sugerir que na figura 12, quando as leveduras foram expostas aos oxidantes em uma dose não letal houve uma diminuição do seu crescimento durante aproximadamente 8 horas para que talvez fossem produzidas defesas antioxidantes, como por exemplo, catalase, superóxido dismutase, glutatona e também NADPH (substrato de algumas enzimas antioxidantes) como resposta ao estresse, resultando em uma resistência a esse estresse.

O ensaio de crescimento das *S. cerevisiae* em microplaca utilizando diferentes oxidantes e extratos de tucum-do-cerrado foi realizado para analisar as propriedades antioxidantes deste fruto. As leveduras foram expostas aos extratos de tucum-do-cerrado e oxidantes com concentrações não letais estabelecidas anteriormente. Na figura 13 e tabela 4 foi possível verificar por meio de análise estatística um aumento significativo (expresso em percentual \pm erro padrão da média) do crescimento celular, utilizando os extratos aquoso e etanólicos da casca de tucum quando comparadas com curvas de crescimento do controle oxidante em todas as condições realizadas, ou seja, quando leveduras foram expostas ao H_2O_2 0,5 e 1 mM, menadiona 100 e 150 μM e hidroperóxido de cumene 100 e 150 μM .

Os extratos aquosos e etanólicos da polpa do Tucum não foram capazes de aumentar o crescimento celular em nenhuma condição estudada. Todos os extratos etanólicos de casca mais polpa mostraram capacidade antioxidante, aumentando o crescimento celular em ambas concentrações de H_2O_2 e CHP utilizados. Os extratos etanólicos de casca e polpa juntos do tucum não mostraram ação antioxidante quando leveduras foram expostas à menadiona. Entretanto, o extrato aquoso da casca e polpa do Tucum promoveu uma diminuição do crescimento celular quando comparados com o controle oxidante, na presença de 100 μM de menadiona.

Neste estudo os extratos da casca do tucum-do-cerrado apresentaram maior atividade antioxidante, seguido pelo extrato de casca mais polpa, porém os extratos da

polpa não apresentaram atividade antioxidante, ou seja, não foram capazes de promover um “resgate do crescimento celular”. Esse comportamento dos extratos foi igual em relação aos três oxidantes utilizados no estudo, indicando que compostos bioativos estão presentes na casca do Tucum, uma vez que estes extratos são ricos em antocianinas, apresentando coloração roxa.

Na tabela 4 é possível observar o aumento do crescimento das leveduras *S. cerevisiae* expostas aos extratos de tucum-do-cerrado e oxidantes com concentrações não letais quando comparadas ao controle (sem adição do tucum)

Um método de HPLC simples e rápido para determinação de ácido clorogênico (ácido 5-O-cafeoilquínico) em extratos de chá foi desenvolvido. A análise dos compostos extraídos dos extratos de chá mate apresentou uma grande diferença de acordo com o solvente utilizado na extração. Foram preparados 9 extratos de chá diferentes, variando a concentração de etanol (40, 50 e 60%) e variando também a presença de CO₂ líquido em 2 pressões distintas. O solvente de extração mais eficiente foi o etanólico aquoso (40%) com CO₂ líquido, apresentando maior extração de compostos fenólicos totais, maior teor de flavonóides e ácidos clorogênicos e apresentando também maior atividade scavenger de radicais livres (Grujic *et al.*, 2012).

Os extratos etanólicos do Tucum-do-cerrado foram preparados em diferentes concentrações de etanol (95, 70 e 50%), entretanto, não mostraram diferença significativa em relação à capacidade antioxidante analisadas, sugerindo extração de moléculas bioativas com capacidade antioxidante semelhante nas 3 variações das concentrações de etanol. Os extratos aquosos e etanólicos do tucum realizados nessa pesquisa provavelmente apresentam flavonóides, antocianinas e vitamina C, uma vez que o trabalho de Siqueira, *et al.*, 2013 realizaram extração aquosa e com acetato de etila do tucum e obtiveram esses compostos.

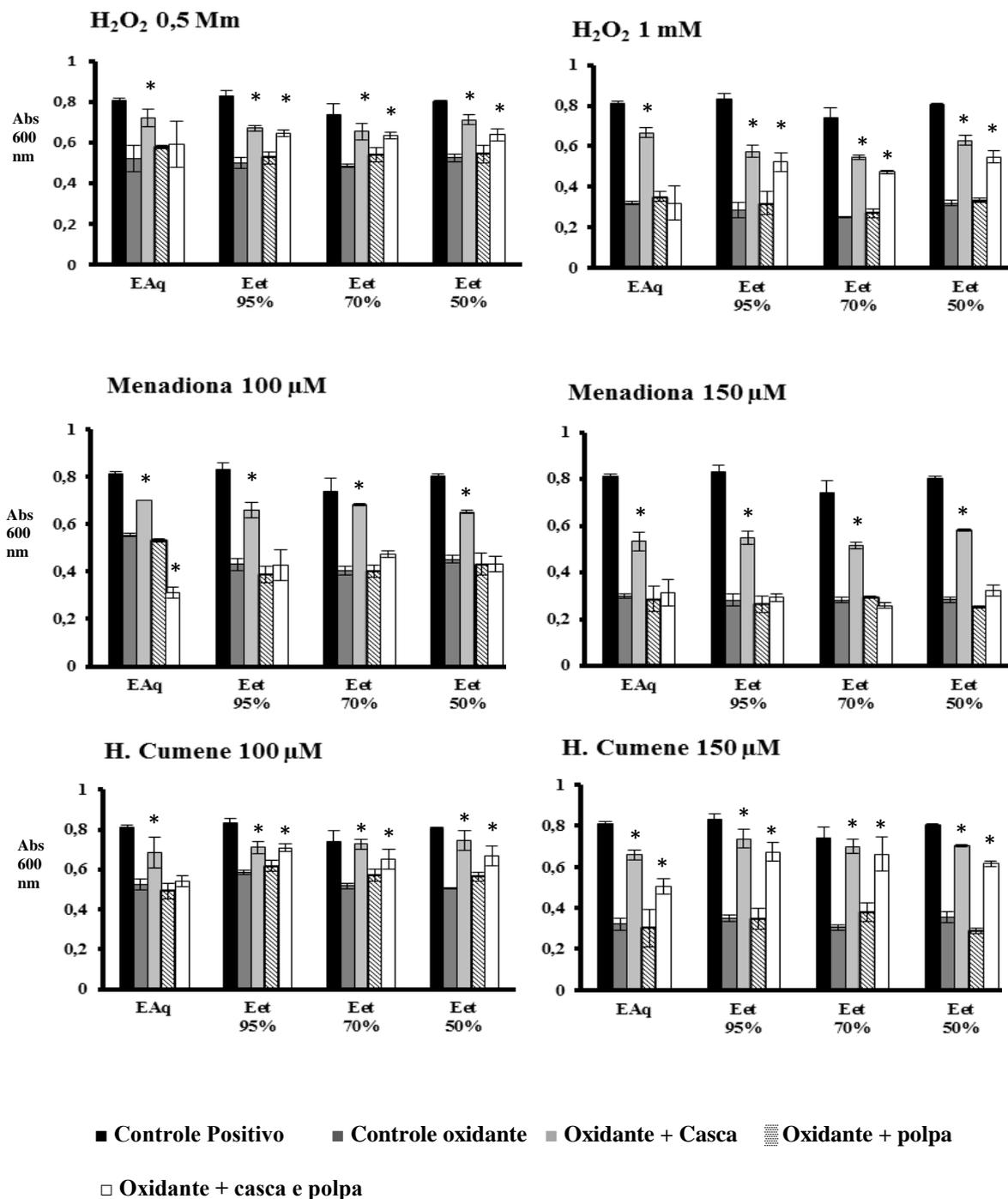


Figura 13. Crescimento da levedura *Saccharomyces cerevisiae* EG 103 em meio mínimo analisadas em OD_{600nm} após 8 horas com oxidantes em concentrações distintas e Tucum-do-cerrado em diferentes extratos (aquoso, etanólico 95%, 50% e 70%). N = 3. Os valores são apresentados como média ± erro padrão da média. * representa diferença estatística significativa em relação ao controle oxidante, (p ≤ 0,05). (EAq – extrato aquoso, EEt – extrato etanólico). ■ Controle Positivo, ■ Controle oxidante, ■ Oxidante + Casca, ▨ Oxidante + polpa, □ Oxidante + casca e polpa.

Tabela 4. Aumento do crescimento das leveduras *S. cerevisiae*, expostas a diferentes oxidantes), promovido por extratos de Tucum-do-cerrado quando comparadas ao controle oxidante (sem adição de extrato de tucum, somente com oxidante). Valores apresentados em %.

Extrato Aquoso						
	H ₂ O ₂ 0,5 mM	H ₂ O ₂ 1mM	CHP 100 µM	CHP 150 µM	Menadiona 100 µM	Menadiona 150 µM
Casca	24,5	42,6	23,05	45,0	17,8	28,4
Casca e polpa	8,6					
Extrato Etanólico 95%						
	H ₂ O ₂ 0,5 mM	H ₂ O ₂ 1mM	CHP 100 µM	CHP 150 µM	Menadiona 100 µM	Menadiona 150 µM
Casca	20,4	34,5	15,1	46,6	27,7	32,1
Casca e polpa	17,05	28,3	14,9	38,8		
Extrato Etanólico 70%						
	H ₂ O ₂ 0,5 mM	H ₂ O ₂ 1mM	CHP 100 µM	CHP 150 µM	Menadiona 100 µM	Menadiona 150 µM
Casca	22,7	39,6	28,3	53,3	37,4	28,7
Casca e polpa	20,3	29,7	17,9	48,3		
Extrato Etanólico 50%						
	H ₂ O ₂ 0,5 mM	H ₂ O ₂ 1mM	CHP 100 µM	CHP 150 µM	Menadiona 100 µM	Menadiona 150 µM
Casca	23,3	38,4	29,6	43,3	24,8	36,9
Casca e polpa	21,2	28,3	20,1	32,4		

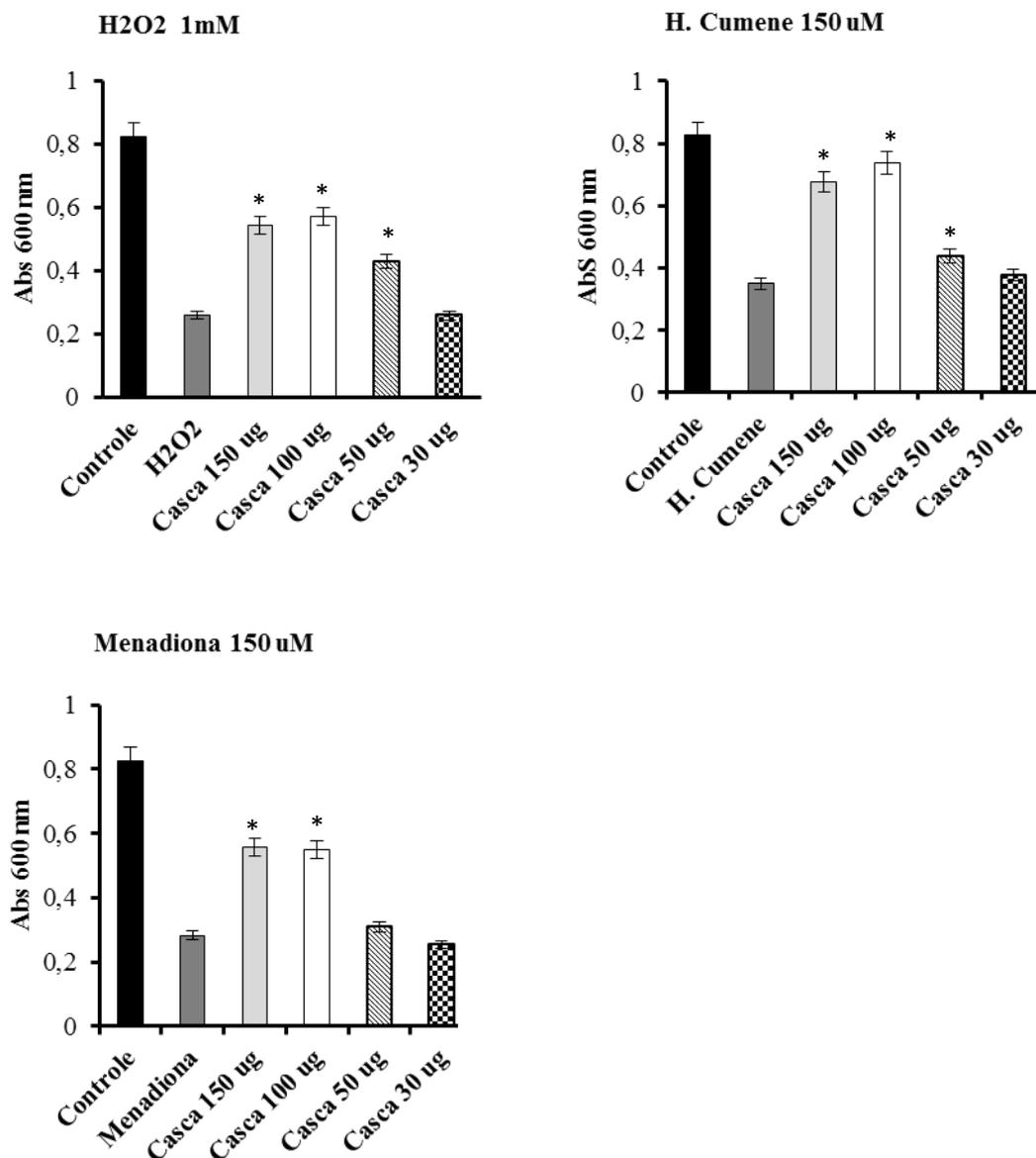


Figura 14. Crescimento da levedura *Saccharomyces cerevisiae* EG 103 em meio mínimo analisadas em OD_{600nm} após 8 horas com diferentes oxidantes e extrato etanólico de casca de Tucum-do-cerrado em diferentes concentrações. N = 3. Os valores são apresentados como média ± erro padrão da média. * representa diferença estatística significativa em relação ao controle oxidante, (p ≤ 0,05).

O ensaio de crescimento de leveduras em microplaca utilizando diferentes concentrações do extrato etanólico de casca de Tucum-do-cerrado teve como objetivo analisar o extrato etanólico da casca em diferentes concentrações, uma vez que a casca foi a parte do fruto que mais apresentou ação antioxidante nos ensaios realizados. Portanto na figura 14 podemos observar que o extrato etanólico da casca do Tucum foi capaz de aumentar o crescimento celular em relação ao controle oxidante nas concentrações de 50 µg/ml (20,4% ± 3,2), 100 µg/ml (37,8% ± 2,6) e 150 µg/ml (37,5%

$\pm 4,2$) quando utilizados o oxidante H_2O_2 1 mM. Extrato etanólico de casca de tucum também foi capaz de aumentar o crescimento celular em relação ao controle oxidante CHP 150 μM nas concentrações de 50 $\mu\text{g/ml}$ ($10,8\% \pm 3,4$), 100 $\mu\text{g/ml}$ ($46,9\% \pm 2,9$) e 150 $\mu\text{g/ml}$ ($39,5\% \pm 3,7$). Quando utilizado o oxidante menadiona 150 $\mu\text{g/ml}$, extratos etanólicos de casca de tucum aumentaram o crescimento celular nas concentrações de 100 $\mu\text{g/ml}$ ($32,2\% \pm 5,3$) e 150 $\mu\text{g/ml}$ ($33,2\% \pm 3,6$).

Experimentos de fracionamento do tucum-do-cerrado não foram realizados nessa pesquisa, entretanto, a forte coloração roxa dos extratos sugerem a presença de antocianinas, uma vez que estes flavonóides estão presentes no reino vegetal, principalmente em alimentos (frutas e hortaliças) de cores vermelho brilhante, roxas e azuis, como por exemplo o repolho roxo, uva e maçã. As antocianinas com concentração relativamente elevada na dieta têm importância potencial para a saúde humana. A ingestão diária das antocianinas na dieta dos EUA estima-se estar entre 180 e 215 mg enquanto que, a ingestão de outros flavonóides alimentares, tais como genisteína, quercetina e apigenina é somente de 20-25 mg/dia. Estudos epidemiológicos sugerem que o consumo de antocianinas reduz o risco de doença cardiovascular, diabetes, artrite e câncer, devido a suas atividades antioxidantes e anti-inflamatórias (Wang and Stoner, 2008; Wallace, 2011).

A uva contém um grande número de classes de metabolitos secundários: em particular, a composição de polifenóis é qualitativamente e quantitativamente muito rica. Os principais polifenóis são as antocianinas, flavonóis e estilbenos. Devido às suas características biológicas, as antocianinas, flavonóis e estilbenos desempenham um papel fundamental na qualidade do vinho, e extratos de uva são usados como fontes de compostos naturais nas indústrias farmacêuticas, alimentícias e tem efeitos benéficos sobre vários aspectos da saúde humana, principalmente por suas ações antioxidantes (Flamini *et al.*, 2013). O Tucum-do-cerrado possui aspecto semelhante ao da uva roxa, uma vez que são frutos redondos de cor escura e são produzidos em cachos, portanto podem ter composição química parecida, uma vez que o tucum mostrou resultados com ação antioxidantes promissores para estudos de sua composição química.

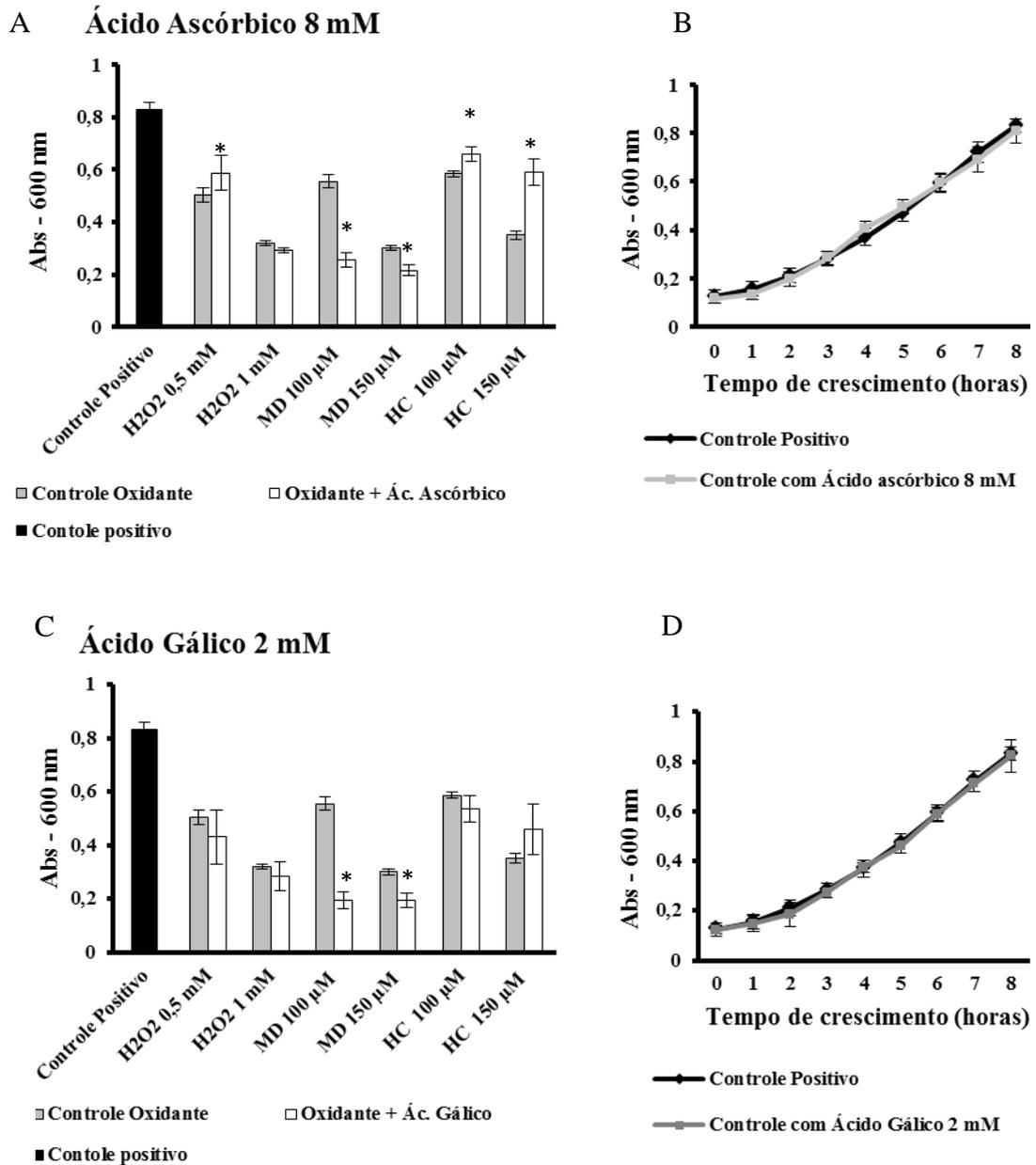


Figura 15. Crescimento da levedura *S. cerevisiae* EG 103 em meio mínimo analisadas em OD_{600nm} após 8 horas. **A)** Crescimento da *S. cerevisiae* com oxidantes em concentrações distintas e ác. ascórbico 8mM. **B)** Curvas de crescimento: (-♦-) curva controle positivo (células e meio de cultura), (-■-) curva com adição de ác. ascórbico 8 mM. **C)** Crescimento da *S. cerevisiae* com oxidantes em concentrações distintas e ác. gálico 2 mM. **D)** Curvas de crescimento: (-♦-) curva controle positivo, (-■-) curva com adição de ácido Gálico 2 mM. N= 3. Os valores são apresentados como média ± erro padrão da média. * representa diferença estatística significativa em relação ao controle oxidante, (p≤ 0,05). H2O2 – Peróxido de Hidrogênio, MD – Menadiona e HC – Hidroperóxido de Cumene.

Também foram realizados ensaios de crescimento das *S. cerevisiae* em microplaca utilizando ácido ascórbico e ácido gálico como antioxidantes em sistemas

onde leveduras foram expostas à oxidantes. Foi utilizado o ácido ascórbico e ácido gálico, uma vez que estes compostos já foram descritos no trabalho de Wu, 2011 como antioxidantes em curvas de crescimento com leveduras expostas a oxidantes.

A vitamina C (ácido ascórbico) é um antioxidante solúvel em água, obtido a partir de uma grande variedade de fontes dietéticas, como por exemplo em frutas (laranja, acerola, morango, mamão e kiwi) e hortaliças. Recomenda-se 90 mg/dia de vitamina C para homens adultos e 75 mg/dia para mulheres adultas (Li and Schellhorn, 2007; Gallie, 2013).

Curvas de crescimento foram realizadas apenas com leveduras expostas ao ácido ascórbico 8 mM e ácido Gálico 2 mM para verificar se estes extratos tinham algum efeito sobre o crescimento das leveduras. Portanto, foi possível observar na figura 15 B e D que o ácido ascórbico 8 mM e ácido Gálico 2 mM não proporcionam alterações no crescimento das leveduras quando comparadas com o controle positivo. Posteriormente foi realizado o ensaio utilizado ácido ascórbico 8 mM e ácido Gálico 2 mM como antioxidantes quando leveduras foram expostas a diferentes oxidantes.

O ácido ascórbico foi capaz de promover um aumento do crescimento celular quando as leveduras foram expostas ao H_2O_2 0,5 mM ($10,2\% \pm 0,51$), e ao CHP 100 μ M ($8,9\% \pm 0,75$) e 150 μ M ($42,1\% \pm 4,5$) quando comparado com o controle oxidante. O ácido ascórbico é bastante estudado e funciona como um agente redutor, ajudando na eliminação de EROs que são produzidos pela cadeia transportadora de elétrons, capaz de reduzir a maioria das EROs fisiologicamente relevantes. Os produtos da oxidação do ácido ascorbico por um elétron e por dois elétrons são, respectivamente, radical ascorbila e ácido desidroascórbico. O radical ascorbila, entretanto, é relativamente não reativo, quando comparado a outros radicais livres. Esta propriedade torna o ácido ascórbico um eficiente antioxidante, capaz de eliminar espécies altamente reativas e formar um radical de reatividade baixa e que pode ser convertido novamente em ácido ascórbico por redutases dependentes de NADH ou por dismutação de duas moléculas do radical em uma de ácido ascórbico e uma de ácido desidroascórbico. Este último é pouco estável em pH fisiológico, geralmente é reduzido a ácido ascórbico, ou hidrolisado irreversivelmente (Cerqueira, 2007; Li and Schellhorn, 2007; Gallie, 2013). Quando as leveduras foram expostas a menadiona, o ácido ascórbico promoveu uma diminuição do crescimento celular.

O ácido gálico não foi capaz de promover um aumento do crescimento celular, e quando as leveduras foram expostas a menadiona, promoveu uma diminuição do

crescimento celular. O ácido gálico é um composto fenólico presente em diversas plantas. Seus ésteres, também conhecidos como galatos, em especial o galato de propila, octila e dodecila, são utilizados como aditivos antioxidantes em alimentos, para prevenir mudanças no sabor e no valor nutritivo devido à oxidação de gorduras insaturadas. Entretanto, a sua quantidade utilizada deve permanecer dentro de limites estabelecidos principalmente devido a estudos anteriores a década de 60, onde o perfil toxicológico destas substâncias foi traçado, e aos diversos relatos de sensibilização e dermatite de contato. A ação destes compostos sobre os radicais livres já foi bastante estudada, e algumas destas moléculas podem agir tanto como antioxidantes como pró-oxidantes. Sua atividade benéfica está relacionada com a prevenção da formação de radicais superóxido e de ácido úrico através da inibição da enzima xantina oxidase, além da modulação da atividade da mieloperoxidase e sequestro de ácido hipocloroso . Já a ação pró-oxidante é cobre-dependente, e resulta em quebras na molécula de DNA e formação de 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina, dano reconhecidamente provocado por espécies reativas de oxigênio (Kratz, 2007). De acordo com o trabalho de Kratz, 2007 podemos relacionar com os resultados da figura 15, onde o ácido gálico não conseguiu aumentar o crescimento das leveduras expostas a oxidantes, uma vez que o ácido gálico pode ser tóxico ou agir como pró-oxidante. Utilizamos a concentração de ácido gálico de 2 mM nos ensaios seguindo a metodologia de Wu, 2011. Porém Wu, 2011 utiliza outra cepa de leveduras (BY4743), que pode ser mais resistente à concentração de 2 mM de ácido gálico do que a EG103. Portanto, o experimento deverá ser repetido com concentrações mais baixas de ácido gálico para analisar se o mesmo consegue agir como antioxidante promovendo aumento no crescimento das leveduras.

Capítulo 2

Análise da proteção antioxidante promovida por extratos de Tucum-do-cerrado contra a peroxidação lipídica e dano oxidativo a proteína (*Bactris setosa*)

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Amostras de Tucum-do-cerrado

Os frutos de tucum-do-cerrado da espécie *Bactris setosa* foram coletados em fevereiro de 2012 em uma chácara localizada na cidade de Terezópolis. Os dados relacionados com a coleta do tucum estão descritos no capítulo 1 (item 4.1).

4.2 Preparo dos extratos dos frutos de tucum-do-cerrado

4.2.1 Extrato aquoso das amostras de Tucum-do-cerrado

As frutas congeladas foram cortadas em pequenos pedaços contendo casca e polpa juntos e casca e polpa separados. Os pedaços foram obtidos por meio de cortes ao redor do caroço feitos com uma faca de aço inox. A seguir os fragmentos foram macerados em almofariz de porcelana na presença de nitrogênio líquido. Dez miligramas do macerado congelado foram homogeneizados em 1 ml de água deionizada (diluição 1:100). O extrato foi preparado homogeneizando as amostras em homogeneizador de vidro tipo Dounce. Posteriormente, as amostras foram submetidas à centrifugação a 10.000 xg por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi transferido para um tubo novo e a partir dessa diluição estoque (1:100), o extrato foi diluído em 1:200, 1:500 e 1:1000 em água deionizada e utilizados nos ensaios.

O extrato aquoso da maçã Fuji foi preparado da mesma forma que os extratos do tucum. Porém os extratos da maçã foram com casca e polpa juntos.

4.2.2 Extrato etanólico das amostras de Tucum-do-cerrado

As frutas congeladas foram cortadas em pequenos pedaços contendo casca e polpa juntos e casca e polpa separados. Os pedaços foram obtidos por meio de cortes ao

redor do caroço feitos com uma faca de aço inox. A seguir os fragmentos foram macerados em almofariz de porcelana na presença de nitrogênio líquido. Cem mg do macerado foram colocados em um tubo de ensaio com tampa e adicionados 5 ml de etanol em concentrações distintas (etanol 95, 70 e 50%) para cada parte da fruta, ou seja, foi preparado um total de 3 extratos para cada parte da fruta. Após adição do etanol, as amostras foram colocadas em uma plataforma agitadora (200 r.p.m) e incubadas por 2 horas à temperatura ambiente. O extrato foi centrifugado a 10.000 xg por 30 minutos e apenas o sobrenadante foi recolhido e submetido à secagem a vácuo (speed vac). Após a secagem, o extrato foi pesado e ressuspenso em água deionizada para que fosse obtida uma concentração estoque de 10 mg/ml.

O extrato etanólico da maçã Fuji foi preparado da mesma forma que os extratos do tucum. Porém os extratos da maçã foram com casca e polpa juntos.

4.3 Ensaio de TBARS (Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico)

4.3.1 Tecidos de Fígado

Foram utilizados fígados coletados de ratos Wistar machos, 2 meses, provenientes do Biotério da Faculdade de Medicina/Ciências da Saúde da Universidade de Brasília (UnB), e congelados à -80°C até o dia do experimento. Para a realização deste projeto, o tecido de fígado foi escolhido por ser a principal fonte de lipídios para a realização da metodologia estudada. Os tecidos foram obtidos por meio de uma doação da Dr^a Greice Maria Rodrigues de Souza que realizou parte do seu projeto de doutorado no nosso laboratório, com projeto intitulado “Efeitos da *Cipura paludosa* nos déficits comportamentais de ratos adultos expostos ao etanol e/ou metilmercúrio durante o desenvolvimento do SNC” apresentado no programa de pós graduação em Ciências da Saúde, aprovado pelo comitê de ética animal da Universidade de Brasília.

4.3.2 Preparo dos extratos de fígado

Inicialmente pequenos pedaços de fígado de rato congelados a -80°C foram macerados em almofariz de porcelana na presença de N_2 líquido. Cem mg do pó macerado foram colocados em um tubo do tipo eppendorf previamente resfriado em N_2 líquido. Foram adicionados 100 μL de tampão Hepes 100 mM, pH 7,4 e 100 μL de

cloreto de potássio (KCl) 125 mM no macerado de fígado. A mistura resultante foi homogeneizada em homogeneizador de vidro, centrifugada à 10.000 r.p.m (xg) durante 15 min a 4°C. Após a centrifugação o precipitado foi descartado e o sobrenadante foi transferido para um tubo eppendorf limpo e imediatamente utilizados na reação.

4.3.3 Metodologia de TBARS

Os ensaios de TBARS consistem de um sistema gerador de radicais que é iniciado pela adição de ferro (Fe^{2+}) e H_2O_2 os quais desencadeiam a reação de Fenton, gerando como produto final o radical hidroxil, que danifica os lipídios presentes no homogeneizado de fígado de rato produzindo compostos que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBA) presente na reação teste. A prevenção do dano oxidativo à moléculas de lipídios, por amostras de tucum-do-cerrado, foi avaliada usando ensaios *in vitro*.

O ensaio foi realizado para cada amostra de extrato aquoso de tucum-do-cerrado, nas diluições 1:100, 1:200, 1:500, 1:1000 e amostras de extrato etanólico na concentração final de 1 e 2 mg/ml. Foram usados 4 controles: controle homogeneizado (Hgto – sem o homogeneizado de fígado de rato), controle $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ (sem Fe^{2+} e H_2O_2) e controle positivo (sem tucum), mais controle tempo zero, em duplicata. Esse estudo foi realizado com as diferentes partes do fruto de tucum (polpa e casca separados e casca e polpa juntos).

Após a identificação dos tubos, foram adicionados na reação a amostra de tucum em diferentes diluições, homogeneizado de fígado de rato, e os seguintes reagentes: tampão Hepes 100 mM, pH 7,4; KCl 125 mM; citrato de sódio 10 mM; H_2O_2 10 mM e $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 2mM, sendo que o ferro e o H_2O_2 foram os últimos a serem adicionados para dar início à reação e contado o tempo de incubação para o experimento de TBARS. A reação do controle tempo 0 foi parada com a adição de ácido fosfórico 7% e de TBA 1% imediatamente ao término da pipetagem das reações.

As reações foram então incubadas por 15, 30, 45, 60, 90 e 120 min à temperatura ambiente e paradas pela adição de ácido fosfórico 7% e de TBA 1%. As reações foram incubadas a 98 °C por 15 min. Em seguida foram diluídas 1:2 em H_2O Milli-Q e lidas no espectrofotômetro (Shimadzu- UV-1800) nos comprimentos de onda de 532 nm e

600 nm. Para a obtenção do resultado final, as leituras a 600 nm foram subtraídas das leituras a 532 nm e a absorção final calculada usando a seguinte fórmula:

$$\text{Abs Ensaio} - [(\text{AbsFeSO}_4 / \text{H}_2\text{O}_2 + \text{AbsTempo zero})/2]$$

Onde, $\text{AbsFeSO}_4 / \text{H}_2\text{O}_2$ se refere a absorbância do controle negativo (sem adição de ferro e H_2O_2) e AbsTempo zero se refere à absorbância da amostra de tempo zero.

As análises estatísticas foram feitas por meio de programa estatístico MYNOVA versão 1.3, usando o Dunnett's test.

Após verificarmos que a proteção ao dano oxidativo da polpa não foi muito alta, decidimos usar o extrato da polpa do tucum mais concentrada para realização do mesmo experimento, buscando uma maior proteção do dano oxidativo. A metodologia foi feita da mesma forma como descrito acima, porém mudando a concentração da polpa do extrato aquoso do Tucum-do-cerrado. Foi pesado 0,5 g de polpa de tucum, homogeneizada em 1 ml de água deionizada (diluição 1:2) e a partir dessa diluição estoque, o extrato foi diluído em 1:3, e 1:5.

4.4 Medida de dano oxidativo à proteína

Para analisar o potencial do tucum-do-cerrado em proteger o dano oxidativo à proteína albumina do soro bovino (BSA), utilizamos uma metodologia semelhante ao ensaio de TBARS, entretanto o alvo dos radicais livres nessa nova metodologia é a proteína BSA. Os ensaios de medida de dano oxidativo à proteína consistem de um sistema gerador de radicais que é iniciado pela adição de Fe^{2+} e H_2O_2 os quais desencadeiam a reação de Fenton, gerando como produto final o radical hidroxil, que danifica a proteína BSA. As amostras são então submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida para análise do dano oxidativo após coloração com Comassie blue.

O experimento foi realizado contendo um controle positivo (apenas com a proteína BSA), um controle negativo (com a proteína BSA, ferro e H_2O_2), e o teste (contendo proteína BSA, ferro, H_2O_2 e extratos aquosos de Tucum na diluição 1:100 ou extratos etanólicos de Tucum na concentração de 100 $\mu\text{g/ml}$).

Tabela 5. Descrição dos reagentes utilizados no ensaio de dano à proteína.

Reagentes	Concentração
BSA	(2mg/ml)
Fe(NH₄)₂(SO₄)₂.6H₂O	(2mM)
H₂O₂	(10mM)
Extrato aquoso de Tucum	Diluição 1:100
Extrato etanólico de Tucum	100 µg/ml

Após a mistura dos reagentes, as reações foram incubadas a temperatura ambiente por 30 min. Posteriormente foi adicionado tampão de amostra para eletroforese e as amostras foram aquecidas a 95°C por 5 min. As amostras foram aplicadas em gel de poliacrilamida 12% e submetidas à eletroforese a 100 Volts. Os géis foram corados com o corante Coomassie Blue para serem fotografados e as bandas quantificadas pelo software ImageJ.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO DO CAPÍTULO 2

5.1 Ensaio de TBARS com extrato aquoso do Tucum-do-cerrado

Os resultados de proteção à peroxidação lipídica utilizando extrato aquoso da casca do tucum (figura 16) mostraram que nas reações de 30, 45 e 60, 90 e 120 minutos todos os tratamentos são significativamente diferentes em relação ao seu respectivo controle, inibindo parcialmente a peroxidação lipídica. Os resultados obtidos usando extrato aquoso da casca e polpa do Tucum-do-cerrado mostraram que na reação de 15 minutos os tratamentos 1/100, 1/200 e 1/500 apresentam diferença estatisticamente significativa em relação ao controle e nas reações de 30,45, 60, 90 e 120 minutos, todos os tratamentos apresentaram diferença em relação ao seu respectivo controle ($p < 0,05$).

Utilizando o extrato aquoso de polpa do Tucum para os experimentos de proteção a peroxidação lipídica (figura 16), a reação de 15 minutos mostra que todos os tratamentos são diferentes em relação ao controle, mostrando uma proteção ao dano oxidativo. Na reação de 30, 45 e 60 minutos os tratamentos 1/100, 1/200 e 1/500 também são diferentes do controle ($p < 0,05$). As reações de 90 e 120 minutos não mostraram inibição da peroxidação lipídica.

Após verificar que a proteção ao dano oxidativo da polpa não foi muito alta, decidimos usar o extrato da polpa do tucum mais concentrada para realização do mesmo experimento, buscando uma maior proteção do dano oxidativo. Portanto, foi utilizado extrato aquoso da polpa do tucum mais concentrada e foi observado que na reação de 15 e 30 minutos todos os tratamentos são estatisticamente diferentes do controle e que na reação de 120 minutos os tratamentos 1/2 e 1/3 também são estatisticamente diferentes do controle com $p < 0,05$.

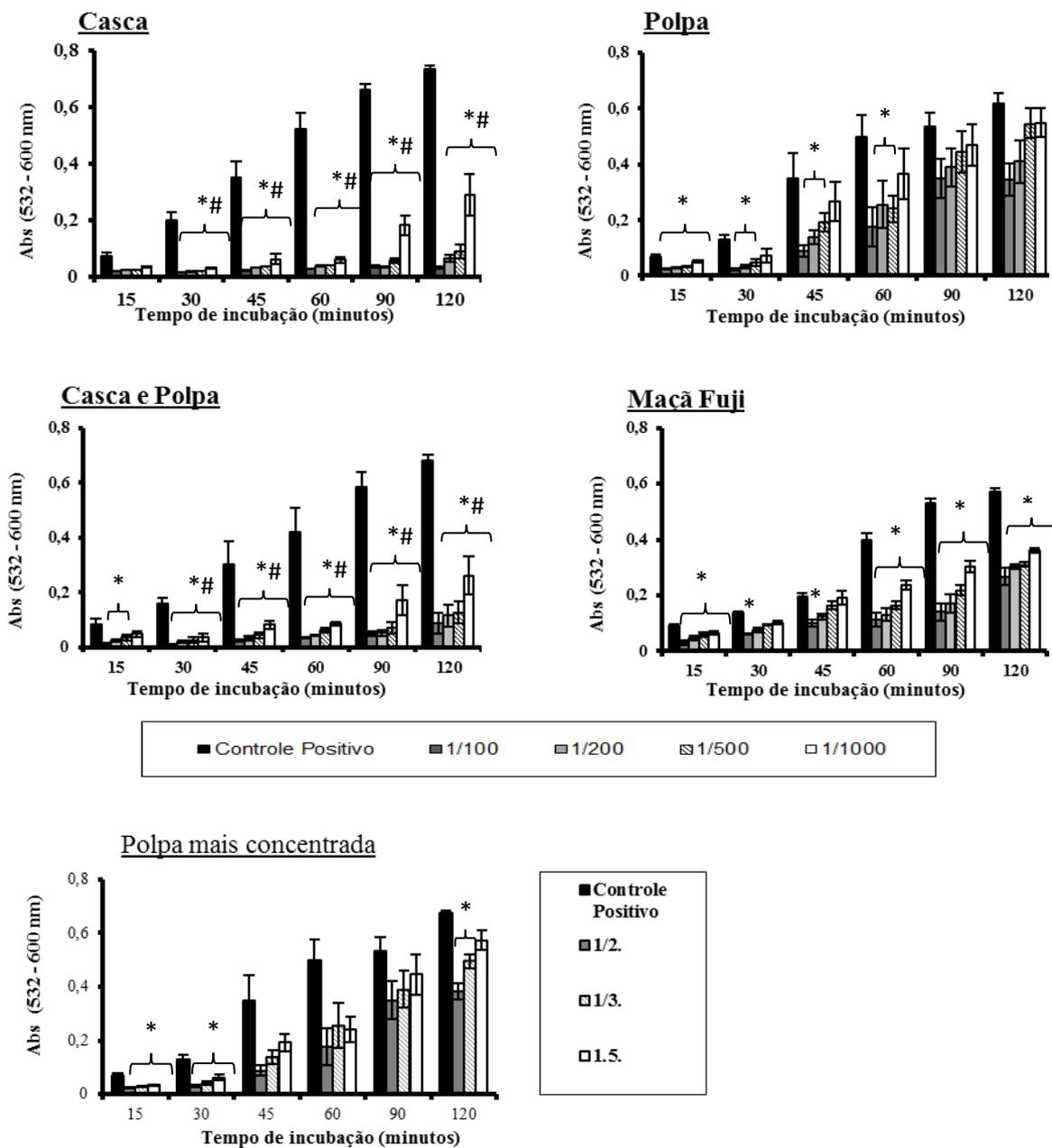


Figura 16: Ensaio de TBARS, utilizando extratos de casca, polpa e casca/polpa de Tucum e da maçã Fuji, nas diluições de 1:100, 1:200, 1:500 1:1000 e extrato de polpa mais concentrado (1/2, 1/3 e 1/5) em diferentes tempos de incubação (15, 30, 45, 60, 90 e 120 min). O controle positivo foi utilizado sem adição de amostra Tucum ou maçã. N = 3. A análise estatística foi feita para cada intervalo de tempo individualmente. Os valores são apresentados como média \pm erro padrão da média. * representa diferença significativa dos tratamentos em relação ao seu controle em cada intervalo de tempo e # representa diferença significativa em relação aos extratos da maçã em cada intervalo de tempo. ($p < 0,05$).

Foi utilizada a maçã como um controle para comparação, visto que é uma fonte de antioxidantes já bastante estudada (Boyer and Liu, 2004; Chagne *et al.*, 2012). Foi verificado que na reação de 15, 90 e 120 minutos do TBARS que todos os tratamentos são estatisticamente diferentes do controle. Na reação de 30 minutos os tratamentos 1/100 e 1/200 também são estatisticamente diferentes do controle.

Estudos já demonstraram que a maçã inibe o dano oxidativo. Pearson *et al.*, 1999, analisou os efeitos de seis sucos de maçã comerciais e maçã Red Delicious (maçãs inteiras, cascas e polpa) na oxidação do LDL humano *in vitro*. A oxidação de LDL foi medida utilizando a análise de hexanos produzidos a partir de cobre induzindo a oxidação lipídica *in vitro*. A inibição da oxidação do LDL variou muito entre as marcas de suco de frutas, com inibição de 9 a 34% e, no caso de amostras de maçãs inteiras a inibição da oxidação do LDL foi de 34%. Extratos de cascas de maçã inibiram a oxidação do LDL em 34%, enquanto a polpas mostraram inibição significativamente menor (21%) (Pearson *et al.*, 1999).

A jabuticaba é um fruto pouco estudado, porém muito consumido em todo o Brasil. As cascas das jabuticabas são ricas em antocianinas e possuem elevada capacidade antioxidante. Isto foi demonstrado tanto em testes de captura de radicais livres, quanto em testes que medem a proteção contra a peroxidação lipídica. A jabuticaba tem potencial para ser utilizada na indústria alimentícia, com possíveis benefícios ao consumidor (Lima, 2009). O Tucum-do-cerrado é semelhante à jabuticaba, uma vez que contém a casca rígida e de coloração roxa com poupa suculenta e são capazes de apresentar ação antioxidante.

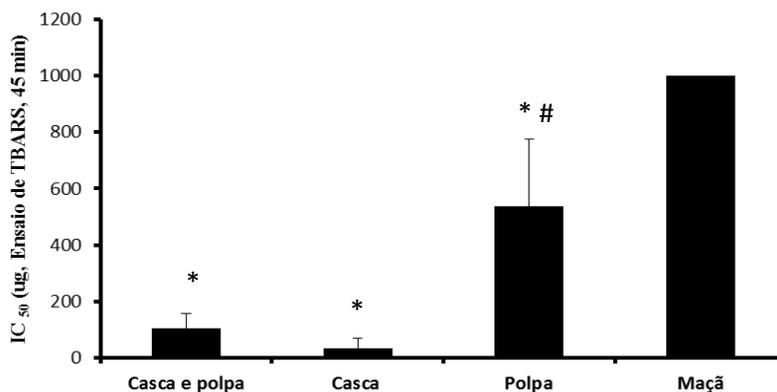


Figura 17. IC₅₀ (a massa de amostra de extrato que inibe em 50% a peroxidação lipídica no ensaio de TBARS) no tempo de incubação de 45 min do extrato aquoso. N = 3. Os valores são apresentados como média ± erro padrão da média. * representa diferença significativa dos tratamentos de Tucum em relação a maçã. # representam diferença significativa da polpa do Tucum com os demais tratamentos. (p<0,05).

A partir dos resultados de TBARS foram calculados os valores de IC₅₀ (a massa de amostra de extrato que inibe em 50% a peroxidação lipídica no ensaio de TBARS) para cada parte da fruta do tucum e da maçã Fuji. Os resultados estão apresentados na figura 17. Neste caso, quanto menor o IC₅₀, melhor a capacidade protetora da amostra. O extrato da maçã, utilizada como controle, foi significativamente diferente de todas as amostras de tucum. Com a análise estatística, ainda foi possível observar que a polpa de tucum também apresentou diferença entre a casca e polpa juntos e somente casca do tucum com p<0,05. Portanto, o extrato aquoso de casca e casca e polpa possuem melhor ação antioxidante quando comparadas com extrato de polpa de tucum e maçã.

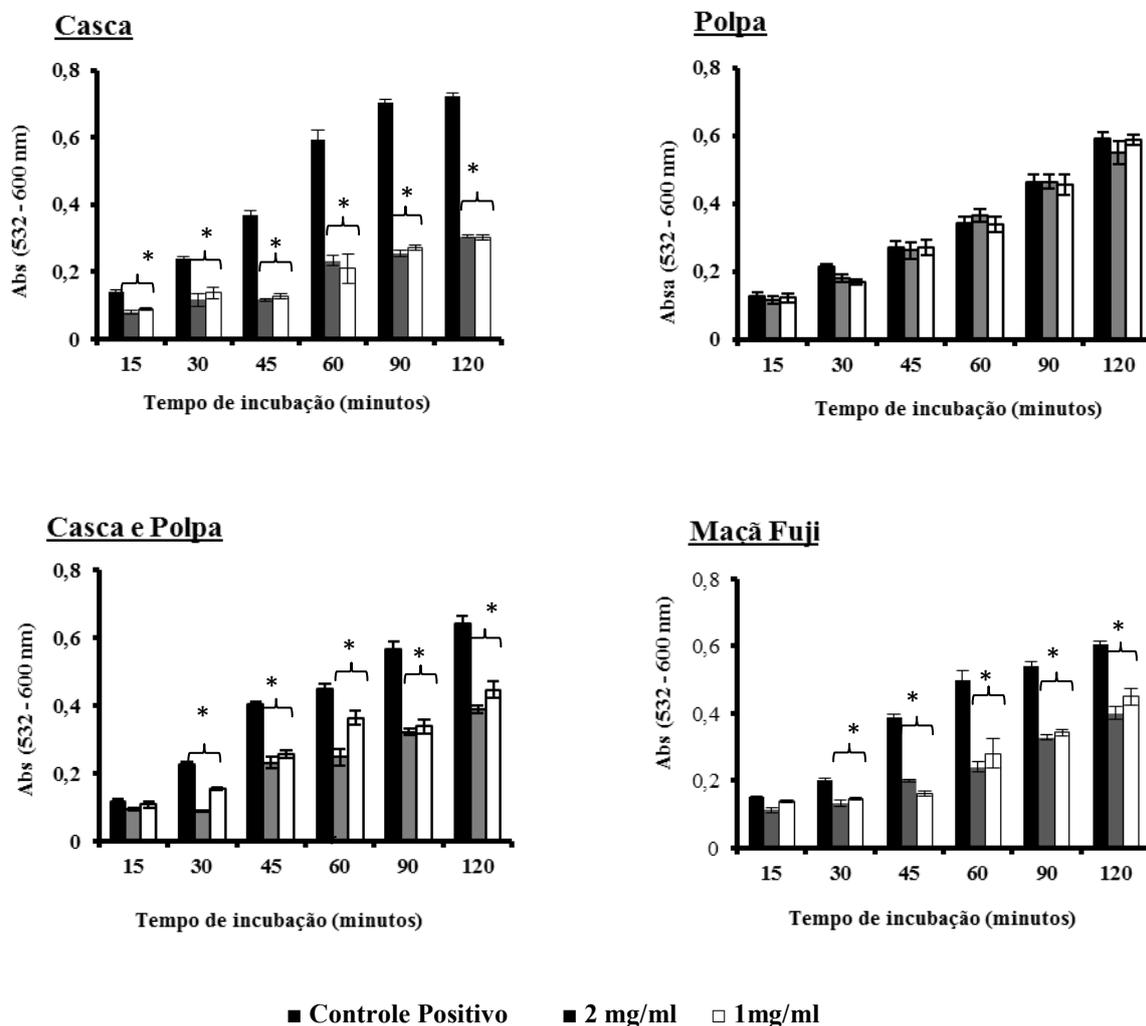


Figura 18. Ensaio de TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico), utilizando extrato etanólico 95% de casca, polpa e casca/polpa de Tucum e maçã Fuji, (concentrações de 2 e 1 mg/ml) em diferentes tempos de incubação (15, 30, 45, 60, 90 e 120 minutos). O controle positivo foi utilizado sem adição de amostra de Tucum ou maçã Fuji. As amostras foram analisadas em repetição com N = 3. A análise estatística foi feita para cada intervalo de tempo individualmente. Os valores são apresentados como média \pm erro padrão da média. * representa diferença significativa dos tratamentos em relação ao seu controle em cada intervalo de tempo. ($p < 0,05$).

Os resultados de proteção à peroxidação lipídica utilizando extrato etanólico 95% da casca do tucum 1 e 2 mg/ml (figura 18) mostraram que em todas as reações os tratamentos são significativamente diferentes em relação ao seu respectivo controle, inibindo parcialmente a peroxidação lipídica. Os resultados obtidos usando extrato

etanólico da casca e polpa do Tucum-do-cerrado como antioxidante mostraram que nas reações de 30, 45, 60 90 e 120 minutos os tratamentos de 1 e 2 mg/ml apresentam diferença estatisticamente significativa em relação ao controle ($p < 0,05$). O extrato etanólico da polpa do Tucum não foi capaz de proteger a peroxidação lipídica em nenhuma das reações.

Foi utilizado a maçã como um controle para comparação e os resultados mostraram que nas reações de 30, 45, 60 90 e 120 minutos os tratamentos de 1 e 2 mg/ml apresentam diferença estatisticamente significativa em relação ao controle ($p < 0,05$).

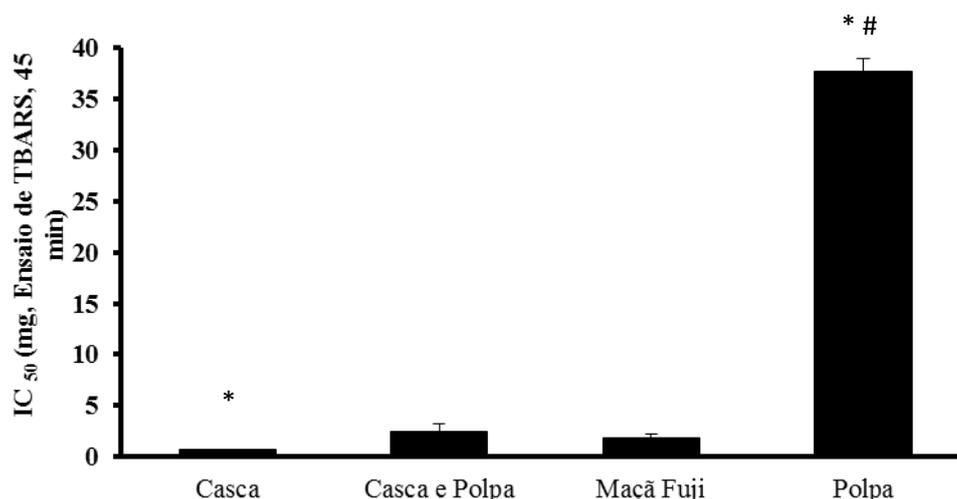
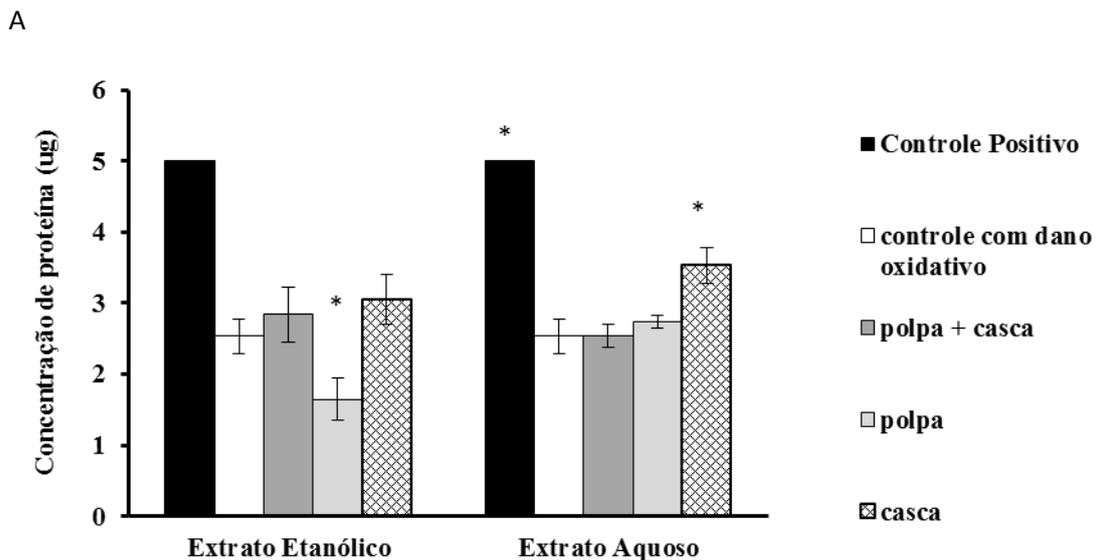


Figura 19. Valores de IC₅₀ (a massa de amostra de extrato que inibe em 50% a peroxidação lipídica no ensaio de TBARS) no tempo de incubação de 45 min do extrato etanólico 95%. Amostras: casca, polpa, casca+polpa de tucum e maçã Fuji. N = 3. Os valores são apresentados como média \pm erro padrão da média. * representa diferença significativa dos tratamentos de Tucum (casca, polpa e casca e polpa juntos) em relação a maçã. # representam diferença significativa da polpa do Tucum com os demais tratamentos. ($p < 0,05$).

Os valores de IC₅₀ das amostras de Tucum e maçã analisadas na figura 19 mostram que a maçã, utilizada como controle comparativo, foi significativamente diferente da casca e da polpa tucum. Com a análise estatística, ainda foi possível observar que a polpa de tucum também apresentou diferença em relação a todas as amostras do ensaio com $p < 0,05$.

Os efeitos benéficos dos polifenóis para diminuir as EROs são bem documentados. No trabalho de Ramos-Escudero, 2012 os resultados sugerem que ratos tratados com dieta rica em extrato de milho roxo (que contém antocianinas e outros polifenóis) tem um efeito protetor na manutenção da homeostase celular. O estresse oxidativo em órgãos isolados de rato foi induzido por H_2O_2 como uma fonte de EROs. O valor de MDA neste trabalho (medido pelo ensaio TBARS) atinge os seus níveis mais elevados em órgãos tratados com H_2O_2 , provavelmente devido a uma rápida progressão da peroxidação lipídica por H_2O_2 , do que em órgãos tratados com extratos de milho roxo, provavelmente devido à presença de polifenóis, que têm a capacidade de sequestrar radicais livres e aumentar os níveis de enzimas antioxidantes endógenas (Ramos-Escudero *et al.*, 2012). Podemos relacionar o trabalho de Ramos-Escudero, *et al.*, 2012 com os resultados obtidos com os extratos de Tucum-do-cerrado uma vez que, foi utilizado a metodologia de TBARS para quantificação de produtos da peroxidação lipídica (principalmente MDA), onde os extratos de Tucum foram capazes de proteger o dano oxidativo utilizando fígado de rato como fonte de lipídeos. A coloração escura (roxa ou vermelho bem escuro) pode está relacionada com a presença de antioxidantes, presentes em diversas frutas e hortaliças de mesma coloração.

A principal bioatividade de compostos fenólicos de uvas é sua ação antioxidante, a qual têm sido amplamente estudada. Esta ação envolve a eliminação de radicais livres, inibição da peroxidação de lipídeos e a redução da formação de hidroperóxidos. Tais atividades antioxidantes foram encontradas em vinho, suco de uva e extratos de diferentes partes da uva. Nos diferentes extratos, a maior capacidade antioxidante foi encontrada em sementes de uva, seguido de casca, sendo que a polpa apresentou menor capacidade antioxidante (Xia *et al.*, 2010). Os resultados de Xia *et al.*, 2010 realizados com os extratos de uva são semelhante aos resultados deste trabalho, uma vez que a casca do Tucum apresentou maior atividade antioxidante quando comparado a poupa. Não foram realizados nessa pesquisa ensaios com a semente do Tucum, mas estudos com a semente poderão ser realizados futuramente.



B

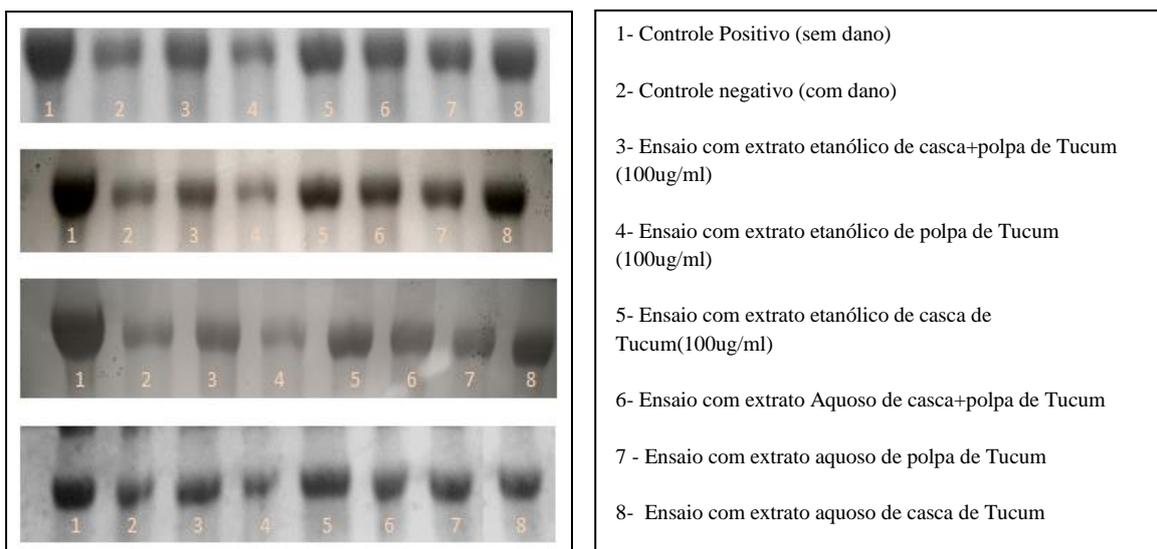


Figura 20. A - Dano a Proteína BSA (proteína do soro bovino) analisadas em gel de poliacrilamida utilizando Tucum-do-cerrado em diferentes extratos (aquoso, etanólico 95%). N = 4. Os valores são apresentados como média \pm erro padrão da média. * representa diferença estatística significativa em relação ao controle com dano oxidativo, ($p \leq 0,05$). **B** – Imagem ilustrativa do dano a proteína BSA (proteína do soro bovino) analisadas em gel de poliacrilamida utilizando Tucum-do-cerrado em diferentes extratos (aquoso, etanólico 95%). As amostras foram analisadas em repetição com N = 4

O ensaio de dano à proteína teve como objetivo analisar a proteção dos extratos de Tucum-do-cerrado contra o dano oxidativo na proteína BSA. O resultado da figura 20 mostra que apenas o extrato aquoso da casca do tucum foi capaz de proteger o dano oxidativo da proteína BSA. O extrato etanólico da polpa do Tucum favoreceu o dano

oxidativo da proteína. Entretanto, é perfeitamente possível que um antioxidante atue como protetor em determinado sistema, mas que falhe na proteção, ou mesmo que aumente as lesões induzidas em outros sistemas, ou tecidos (Halliwell and Gutteridge, 2007).

Siqueira, et al., 2013, analisaram a capacidade antioxidante de 12 frutos do cerrado (inclusive do tucum-do-cerrado), e os resultados indicaram a presença de diferentes compostos químicos nos diferentes frutos. O tucum apresentou 77,9% de umidade (o teor de umidade foi definido como a diferença entre o peso seco e o peso úmido do fruto), compostos fenólicos totais (540mg/100g de tucum no extrato com acetato de etila (EtOAc) e 3343 mg/100g no extrato aquoso), 12 vezes maior quando comparados com o extrato aquoso da maçã. O Tucum apresentou também a presença de antocianinas (83 mg/100g do fruto), vitamina C (78 mg/100g) e carotenóides (0,148mg/100g). A quantidade de antocianinas no Tucum foi 35 vezes maior quando comparadas com a maçã. Esse estudo também analisou outros frutos do cerrado e observou que comparando com a maçã Red Delicious, nove dos doze frutos do Cerrado estudados, araticum, cagaita, cajuzinho, ingá, jenipapo, jurubeba, lobeira, mangaba e tucum mostraram altos níveis de compostos fenólicos. O araticum e tucum são ricos em flavonóides. O cajuzinho, jatobá, jurubeba e tucum apresentaram altos teores de antocianinas. Cagaita, cajuzinho, lobeira, mangaba e tucum mostraram altos níveis de vitamina C. O alto teor de compostos bioativos encontrados no araticum, cagaita, cajuzinho, jurubeba, lobeira, mangaba e tucum corresponderam à alta atividade antioxidante desses frutos, sugerindo que, esses frutos podem fornecer uma fonte de compostos bioativos com propriedades funcionais benéficas à saúde, o que deve estimular as indústrias farmacêuticas e de alimentos para o desenvolvimento de novos produtos, promovendo o desenvolvimento sustentável das regiões com as características do Cerrado.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os extratos de casca e casca mais polpa do tucum-do-cerrado apresentaram atividade antioxidante tanto nos ensaios utilizado leveduras *S. cerevisie* expostas a oxidantes quanto em ensaios *in vitro* de peroxidação lipídica, indicando a presença de antioxidantes e/ou quelantes de ferro. Os extratos da casca apresentaram maior atividade antioxidante, indicando presença de moléculas biotivas, a qual sugerimos que sejam principalmente antocianinas por sua coloração roxa escura e trabalhos científicos existentes sobre os compostos presentes nesse fruto. A polpa do tucum só apresentou atividade antioxidante nos ensaios de TBARS em extrato aquoso, indicando uma baixíssima atividade antioxidante. A maçã foi utilizada como um controle comparativo nos ensaios *in vitro* deste trabalho, uma vez que já é conhecido o seu alto teor de antioxidantes. Quando comparados aos extratos de maçã Fuji, verificamos que os valores de IC₅₀ dos extratos de casca e casca mais polpa do Tucum-do-cerrado foram menores, indicando uma ação antioxidante dos extratos de Tucum maior que os da maçã.

Existem poucos trabalhos na literatura que documentam a importância nutricional do tucum-do-cerrado, portanto a importância farmacologia, biológica e nutricional não são muito conhecidos, o que reforça a investigação por meio de metodologias *in vitro* e *in vivo*, com objetivo de conhecer prováveis benefícios do Tucum, incentivando o consumo deste fruto.

7. PERSPECTIVAS

- Repetir alguns testes da ação antioxidante em curvas de crescimento das leveduras *S. cerevisiae* utilizando ácido ascórbico e ácido gálico com diferentes concentrações.
- Investigar a atividade de enzimas antioxidantes das leveduras *S. cerevisiae* expostas a oxidantes e antioxidantes
- Investigar os mecanismos da ação antioxidante do Tucum-do-cerrado (ação quelante ou sequestrador de radicais).
- Analisar a composição química do Tucum-do-cerrado.
- Analisar frações isoladas do Tucum-do-cerrado.
- Avaliação *in vivo* (animais) da ação antioxidante do Tucum-do-cerrado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alic, N., Higgins, V.J., Dawes, I.W., 2001. Identification of a *Saccharomyces cerevisiae* gene that is required for G1 arrest in response to the lipid oxidation product linoleic acid hydroperoxide. *Mol Biol Cell* 12, 1801-1810.
- Alzogaibi, M.A., 2013. Concepts of oxidative stress and antioxidant defense in Crohn's disease. *World journal of gastroenterology : WJG* 19, 6540-6547.
- Andrade-Jr, D.R.A., Souza, R.B., Santos, S.A., Andrade, D.R., 2005. Os radicais livres de oxigênio e as doenças pulmonares. *Jornal Brasileiro de Pneumologia* 31, 60-68.
- Arruda, S.F., 2004. Potencial antioxidante de vegetais folhosos *in vitro*. Tese de doutorado., Departamento de Biologia celular. Universidade de Brasília.
- Barreiros, A.L.B.S., DAVID, J.M., DAVID, J.P., 2006. Oxidative stress: relations between the formation of reactive species and the organism's defense. *Quim. Nova* 29, 113-123.
- Blanco, A., Munoz, L., 1992. [Content and bioavailability of carotenoids from peach palm fruit (*Bactris gasipaes*) as a source of vitamin A]. *Archivos latinoamericanos de nutricion* 42, 146-154.
- Boyer, J., Liu, R.H., 2004. Apple phytochemicals and their health benefits. *Nutr J* 3, 5.
- Cardoso, A.R., Chausse, B., da Cunha, F.M., Luevano-Martinez, L.A., Marazzi, T.B., Pessoa, P.S., Queliconi, B.B., Kowaltowski, A.J., 2012. Mitochondrial compartmentalization of redox processes. *Free radical biology & medicine* 52, 2201-2208.
- Cardoso, L.M., Colombari, D.S.A., Menani, J.V., Paula, P.M.P., Chianca-Jr, D.A., Colombari, E., 2006. Espécies reativas de Oxigênio no controle neurodegenerativo da pressão arterial. *Medicina (Ribeirão Preto)* 1, 77-88.
- Cerqueira, F.M.M., M. H. G.; Augusto, O., 2007. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. *Química Nova*. São Paulo 30, 441-449.
- Chagne, D., Krieger, C., Rassam, M., Sullivan, M., Fraser, J., Andre, C., Pindo, M., Troggo, M., Gardiner, S.E., Henry, R.A., Allan, A.C., McGhie, T.K., Laing, W.A., 2012. QTL and candidate gene mapping for polyphenolic composition in apple fruit. *BMC Plant Biol* 12, 12.
- Costa, V., Moradas-Ferreira, P., 2001. Oxidative stress and signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*: insights into ageing, apoptosis and diseases. *Mol Aspects Med* 22, 217-246.
- Covas, M.I., Gambert, P., Fito, M., de la Torre, R., 2010. Wine and oxidative stress: up-to-date evidence of the effects of moderate wine consumption on oxidative damage in humans. *Atherosclerosis* 208, 297-304.

- Cuellar-Cruz, M., Castano, I., Arroyo-Helguera, O., De Las Penas, A., 2009. Oxidative stress response to menadione and cumene hydroperoxide in the opportunistic fungal pathogen *Candida glabrata*. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 104, 649-654.
- Dalvi, L.T., 2008. Mecanismo de ação de antioxidantes de origem vegetal: estudo do polifenol ácido elágico e do extrato de caqui (*Diospyros kaki*). Dissertação de mestrado em Nutrição Humana, UnB, Brasil.
- Dato, S., Crocco, P., D'Aquila, P., de Rango, F., Bellizzi, D., Rose, G., Passarino, G., 2013. Exploring the role of genetic variability and lifestyle in oxidative stress response for healthy aging and longevity. *International journal of molecular sciences* 14, 16443-16472.
- Day, B.J., 2008. Antioxidants as potential therapeutics for lung fibrosis. *Antioxidants & redox signaling* 10, 355-370.
- De Marchi, E., Baldassari, F., Bononi, A., Wieckowski, M.R., Pinton, P., 2013. Oxidative stress in cardiovascular diseases and obesity: role of p66Shc and protein kinase C. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2013, 564961.
- Enns, D.L., Tiidus, P.M., 2010. The influence of estrogen on skeletal muscle: sex matters. *Sports Med* 40, 41-58.
- Fang, Y.Z., Yang, S., Wu, G., 2002. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition* 18, 872-879.
- Ferreira, A.L.A., Matsubara, L.S., 1997. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Revista de Associação Médica Brasileira* 43, 61-68.
- Flamini, R., Mattivi, F., Rosso, M.D., Arapitsas, P., Bavaresco, L., 2013. Advanced knowledge of three important classes of grape phenolics: anthocyanins, stilbenes and flavonols. *International journal of molecular sciences* 14, 19651-19669.
- Fong, C.S., Temple, M.D., Alic, N., Chiu, J., Durchdewald, M., Thorpe, G.W., Higgins, V.J., Dawes, I.W., 2008. Oxidant-induced cell-cycle delay in *Saccharomyces cerevisiae*: the involvement of the SWI6 transcription factor. *FEMS yeast research* 8, 386-399.
- Fu, L., Xu, B.T., Xu, X.R., Qin, X.S., Gan, R.Y., Li, H.B., 2010. Antioxidant capacities and total phenolic contents of 56 wild fruits from South China. *Molecules* 15, 8602-8617.
- Gallie, D.R., 2013. Increasing vitamin C content in plant foods to improve their nutritional value-successes and challenges. *Nutrients* 5, 3424-3446.
- Gandhi, S., Abramov, A.Y., 2012. Mechanism of oxidative stress in neurodegeneration. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2012, 428010.

- Genestra, M., 2007. Oxyl radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants. *Cellular signalling* 19, 1807-1819.
- Glasauer, A., Chandel, N.S., 2013. Ros. *Current biology* : CB 23, R100-102.
- Gomes, E.C., Silva, A.N., de Oliveira, M.R., 2012. Oxidants, antioxidants, and the beneficial roles of exercise-induced production of reactive species. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2012, 756132.
- Goyal, M.M., Basak, A., 2010. Human catalase: looking for complete identity. *Protein & cell* 1, 888-897.
- Grujic, N., Lepojevic, Z., Srdjenovic, B., Vladic, J., Sudji, J., 2012. Effects of different extraction methods and conditions on the phenolic composition of mate tea extracts. *Molecules* 17, 2518-2528.
- Halliwell, B., 1994. Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutr Rev* 52, 253-265.
- Halliwell, B., 2006. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant physiology* 141, 312-322.
- Halliwell, B., 2012. Free radicals and antioxidants: updating a personal view. *Nutr Rev* 70, 257-265.
- Halliwell, B., Gutteridge, J., 2007. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford, New York
- Hermes-Lima, M., 2004. *Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals*. Nova Iorque: John Wiley & Sons.
- Hermes-Lima, M., Willmore, W.G., Storey, K.B., 1995. Quantification of lipid peroxidation in tissue extracts based on Fe(III)xylenol orange complex formation. *Free radical biology & medicine* 19, 271-280.
- Hohmann, S., Mager, W.H., 2003. Yeast stress responses - Topics in current Genetics.
- Jamieson, D.J., 1992. *Saccharomyces cerevisiae* has distinct adaptive responses to both hydrogen peroxide and menadione. *Journal of bacteriology* 174, 6678-6681.
- Jatunov, S., Quesada, S., Diaz, C., Murillo, E., 2010. Carotenoid composition and antioxidant activity of the raw and boiled fruit mesocarp of six varieties of *Bactris gasipaes*. *Archivos latinoamericanos de nutricion* 60, 99-104.
- Kalyanaraman, B., 2013. Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students: Oxidants, antioxidants and disease mechanisms. *Redox biology* 1, 244-257.
- Karakaya, S., 2004. Bioavailability of phenolic compounds. *Critical reviews in food science and nutrition* 44, 453-464.
- Knekt, P., Jarvinen, R., Seppanen, R., Hellovaara, M., Teppo, L., Pukkala, E., Aromaa, A., 1997. Dietary flavonoids and the risk of lung cancer and other malignant neoplasms. *American journal of epidemiology* 146, 223-230.

Kocha, T., Yamaguchi, M., Ohtaki, H., Fukuda, T., Aoyagi, T., 1997. Hydrogen peroxide-mediated degradation of protein: different oxidation modes of copper- and iron-dependent hydroxyl radicals on the degradation of albumin. *Biochimica et biophysica acta* 1337, 319-326.

Kohen, R., Nyska, A., 2002. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol Pathol* 30, 620-650.

Kowaltowski, A.J., de Souza-Pinto, N.C., Castilho, R.F., Vercesi, A.E., 2009. Mitochondria and reactive oxygen species. *Free radical biology & medicine* 47, 333-343.

Kratz, J.M., 2007. Estudo do mecanismo da ação anti-herpética do ácido gálico e do galato de pentila. Dissertação de mestrado. Departamento de Ciências Farmaceuticas Universidade Federal de Santa Catarina, p. 80.

Lee, S.J., Choi, S.K., Seo, J.S., 2009. Grape skin improves antioxidant capacity in rats fed a high fat diet. *Nutrition research and practice* 3, 279-285.

Li, Y., Schellhorn, H.E., 2007. New developments and novel therapeutic perspectives for vitamin C. *The Journal of nutrition* 137, 2171-2184.

Lima, A.G.B., 2009. Caracterização e atividade antioxidante da Jabuticaba - Tese de Doutorado. Departamento de Agroquímica Universidade Federal de Lavras - MG, p. 174.

Liochev, S.I., Fridovich, I., 2002. The Haber-Weiss cycle -- 70 years later: an alternative view. *Redox report : communications in free radical research* 7, 55-57; author reply 59-60.

Lopaczynskia, W., Zeisel, S.H., 2001. Antioxidants, programmed cell death, and cancer. *Nutr Res.* 21, 295-307.

Lushchak, V.I., 2009. Oxidative Stress in Yeast. *BIOCHEMISTRY (Moscow)* 75, 346-364.

Malaguti, M., Angeloni, C., Hrelia, S., 2013. Polyphenols in exercise performance and prevention of exercise-induced muscle damage. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2013, 825928.

Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C., Jimenez, L., 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American journal of clinical nutrition* 79, 727-747.

Manzoor, M., Anwar, F., Saari, N., Ashraf, M., 2012. Variations of antioxidant characteristics and mineral contents in pulp and peel of different apple (*Malus domestica* Borkh.) cultivars from Pakistan. *Molecules* 17, 390-407.

- Mattos, T.C.G., 2009. Mecanismo da ação antioxidante dos ácidos caféico e tânico em sistemas contendo íons ferro. Dissertação de mestrado em Química, UnB, Brasil.
- Mayo, J.C., Tan, D.X., Sainz, R.M., Natarajan, M., Lopez-Burillo, S., Reiter, R.J., 2003. Protection against oxidative protein damage induced by metal-catalyzed reaction of alkylperoxyl radicals: comparative effects of melatonin and other antioxidants. *Biochimica et biophysica acta* 1620, 139-150.
- Munhoz, D.C., Netto, L.E., 2004. Cytosolic thioredoxin peroxidase I and II are important defenses of yeast against organic hydroperoxide insult: catalases and peroxiredoxins cooperate in the decomposition of H₂O₂ by yeast. *The Journal of biological chemistry* 279, 35219-35227.
- Nam, T.G., 2011. Lipid Peroxidation and Its Toxicological Implications. *Toxicological research* 27, 1-6.
- Neofytou, E., Tzortzaki, E.G., Chatziantoniou, A., Siafakas, N.M., 2012. DNA Damage Due to Oxidative Stress in Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD). *International journal of molecular sciences* 13, 16853-16864.
- Ninfali, P., Mea, G., Giorgini, S., Rocchi, M., Bacchiocca, M., 2005. Antioxidant capacity of vegetables, spices and dressings relevant to nutrition. *The British journal of nutrition* 93, 257-266.
- Nuss, J.E., Amaning, J.K., Bailey, C.E., DeFord, J.H., Dimayuga, V.L., Rabek, J.P., Papaconstantinou, J., 2009. Oxidative modification and aggregation of creatine kinase from aged mouse skeletal muscle. *Aging* 1, 557-572.
- Osorio, C., Acevedo, B., Hillebrand, S., Carriazo, J., Winterhalter, P., Morales, A.L., 2010. Microencapsulation by spray-drying of anthocyanin pigments from Corozo (*Bactris guineensis*) fruit. *Journal of agricultural and food chemistry* 58, 6977-6985.
- Pearson, D.A., Tan, C.H., German, J.B., Davis, P.A., Gershwin, M.E., 1999. Apple juice inhibits human low density lipoprotein oxidation. *Life sciences* 64, 1913-1920.
- Pereira, A.V., Fávero, A.P., Porto, A.C., Gulias, A.S.M., Salomão, A.N., Jorge, C.L., Proença, C.E.B., Silva, D.B., Pereira, E.B.C., Martins, E.R., Faleiro, F.B., 2010. Frutas nativas da região Centro-oeste do Brasil.
- Pizzimenti, S., Ciamporcerio, E., Daga, M., Pettazzoni, P., Arcaro, A., Cetrangolo, G., Minelli, R., Dianzani, C., Lepore, A., Gentile, F., Barrera, G., 2013. Interaction of aldehydes derived from lipid peroxidation and membrane proteins. *Frontiers in physiology* 4, 242.
- Ramos-Escudero, F., Munoz, A.M., Alvarado-Ortiz, C., Alvarado, A., Yanez, J.A., 2012. Purple corn (*Zea mays* L.) phenolic compounds profile and its assessment as an agent against oxidative stress in isolated mouse organs. *Journal of medicinal food* 15, 206-215.

Ramos-Vasconcelos, G.R., Cardoso, L.A., Hermes-Lima, M., 2005. Seasonal modulation of free radical metabolism in estivating land snails *Helix aspersa*. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 140, 165-174.

Reis, R.C.C., 2006 *Palmeiras (Arecaceae) das Restingas do Estado do Rio de Janeiro, Brasil*. *Acta Bot. Bras* 20(3), , 501-512.

Rhee, S.G., Chang, T.S., Bae, Y.S., Lee, S.R., Kang, S.W., 2003. Cellular regulation by hydrogen peroxide. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 14, S211-215.

Ribeiro, S.M.R., Queiroz, J.H., Pelúzo, M.C.G., Costa, N.M.B., Mata, S.L.P., Queiroz, M.E.L.R., 2005. A Formação e os Efeitos das Espécies Reativas de Oxigênio no Meio Biológico. *Biosci. J.* 21, 133-149.

Rios-Arrabal, S., Artacho-Cordon, F., Leon, J., Roman-Marinetto, E., Del Mar Salinas-Asensio, M., Calvente, I., Nunez, M.I., 2013. Involvement of free radicals in breast cancer. *SpringerPlus* 2, 404.

Roesler, R., Malta, L.G., Carrasco, L.C., Holanda, R.B., Sousa, C.A.S., Pastore, G.M., 2007. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. *Ciênc. Tecnol. Aliment* 27 (1), 53-60.

Ryter, S.W., Tyrrell, R.M., 1998. Singlet molecular oxygen ((1)O₂): a possible effector of eukaryotic gene expression. *Free radical biology & medicine* 24, 1520-1534.

Sha, W., Martins, A.M., Laubenbacher, R., Mendes, P., Shulaev, V., 2013. The genome-wide early temporal response of *Saccharomyces cerevisiae* to oxidative stress induced by cumene hydroperoxide. *PloS one* 8, e74939.

Silva, B.S., Silva, J.A., Junqueira, N.T.V., Andrade, L.R.M., 2001. Frutas do cerrado. Siqueira, E.M., Rosa, F.R., Fustinoni, A.M., de Sant'Ana, L.P., Arruda, S.F., 2013. Brazilian savanna fruits contain higher bioactive compounds content and higher antioxidant activity relative to the conventional red delicious apple. *PloS one* 8, e72826.

Sultana, R., Perluigi, M., Allan Butterfield, D., 2013. Lipid peroxidation triggers neurodegeneration: a redox proteomics view into the Alzheimer disease brain. *Free radical biology & medicine* 62, 157-169.

Szweda, L.I., Stadtman, E.R., 1992. Iron-catalyzed oxidative modification of glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Leuconostoc mesenteroides*. Structural and functional changes. *The Journal of biological chemistry* 267, 3096-3100.

Thomas, D.R., 2006. Vitamins in aging, health, and longevity. *Clinical interventions in aging* 1, 81-91.

Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T., Mazur, M., Telser, J., 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology* 39, 44-84.

- Wallace, T.C., 2011. Anthocyanins in cardiovascular disease. *Adv Nutr* 2, 1-7.
- Wang, L.S., Stoner, G.D., 2008. Anthocyanins and their role in cancer prevention. *Cancer letters* 269, 281-290.
- Wang, Y., Chun, O.K., Song, W.O., 2013. Plasma and dietary antioxidant status as cardiovascular disease risk factors: a review of human studies. *Nutrients* 5, 2969-3004.
- Wiseman, H., Halliwell, B., 1996. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem J* 313 (Pt 1), 17-29.
- Wolfe, K.L., Kang, X., He, X., Dong, M., Zhang, Q., Liu, R.H., 2008. Cellular antioxidant activity of common fruits. *Journal of agricultural and food chemistry* 56, 8418-8426.
- Wu, M.J., O'Doherty, P.J., Fernandez, H.R., Lyons, V., Rogers, P.J., Dawes, I.W., Higgins, V.J., 2011. An antioxidant screening assay based on oxidant-induced growth arrest in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS yeast research* 11, 379-387.
- Xia, E.Q., Deng, G.F., Guo, Y.J., Li, H.B., 2010. Biological activities of polyphenols from grapes. *International journal of molecular sciences* 11, 622-646.
- Yuyama, L.K., Aguiar, J.P., Yuyama, K., Clement, C.R., Macedo, S.H., Favaro, D.I., Afonso, C., Vasconcellos, M.B., Pimentel, S.A., Badolato, E.S., Vannucchi, H., 2003. Chemical composition of the fruit mesocarp of three peach palm (*Bactris gasipaes*) populations grown in central Amazonia, Brazil. *International journal of food sciences and nutrition* 54, 49-56.
- Zambo, V., Simon-Szabo, L., Szelenyi, P., Kereszturi, E., Banhegyi, G., Csala, M., 2013. Lipotoxicity in the liver. *World journal of hepatology* 5, 550-557.
- Zhang, Y., Vareed, S.K., Nair, M.G., 2005. Human tumor cell growth inhibition by nontoxic anthocyanidins, the pigments in fruits and vegetables. *Life sciences* 76, 1465-1472.
- Zhou, K., Wang, H., Mei, W., Li, X., Luo, Y., Dai, H., 2011. Antioxidant activity of papaya seed extracts. *Molecules* 16, 6179-6192.