

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**ANÁLISE DA RELAÇÃO ENTRE O POTENCIAL
ANTIOXIDANTE DOS ÁCIDOS FERÚLICO E *P*-CUMÁRICO E A
ENZIMA CATALASE DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE***

Rodrigo de Paulo Osorio

2021



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**ANÁLISE DA RELAÇÃO ENTRE O POTENCIAL
ANTIOXIDANTE DOS ÁCIDOS FERÚLICO E *P*-CUMÁRICO
E A ENZIMA CATALASE DE *SACCHAROMYCES*
*CEREVISIAE***

RODRIGO DE PAULO OSORIO

Orientador:

Dr. Cristiano Jorge Riger

Co-orientador:

Dr. Carlos Mauricio Rabello de Sant'Anna

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Química**, no Programa de Pós-Graduação em Química, Área de Concentração Química.

SEROPÉDICA, RJ

Setembro 2021

FICHA CATALOGRÁFICA

UFRRJ / Biblioteca Central / Divisão de Processamentos Técnicos

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

O83a Osorio, Rodrigo de Paulo, 1995-
Análise da relação entre o potencial antioxidante dos ácidos ferúlico e *p*-cumárico e a enzima catalase de *Saccharomyces cerevisiae* / Rodrigo de Paulo Osorio. – Seropédica, RJ: 2021. 71 f.: il.

Orientador: Cristiano Jorge Riger.

Coorientador: Carlos Maurício Rabello de Santa'Anna.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Química.

1. Catalase. 2. *Saccharomyces cerevisiae*. 3. Ácidos Fenólicos. 4. Modelagem Molecular. 5. Estresse Oxidativo. I. Riger, Cristiano Jorge, 1972-, II. Sant'Anna, Carlos Maurício Rabello de, 1965-, III. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Instituto de Química. V. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

RODRIGO DE PAULO OSÓRIO

Dissertação submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Química**, no Programa de Pós-Graduação em Química, Área de concentração em Química.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 28/09/2021

Conforme deliberação número 001/2020 da PROPPG, de 30/06/2020, tendo em vista a implementação de trabalho remoto e durante a vigência do período de suspensão das atividades acadêmicas presenciais, em virtude das medidas adotadas para reduzir a propagação da pandemia de Covid-19, nas versões finais das teses e dissertações as assinaturas originais dos membros da banca examinadora poderão ser substituídas por documento(s) com assinaturas eletrônicas. Estas devem ser feitas na própria folha de assinaturas, através do SIPAC, ou do Sistema Eletrônico de Informações (SEI) e neste caso a folha com a assinatura deve constar como anexo ao final da tese / dissertação.

Membros da banca:

Cristiano Jorge Riger. Dr. PPGQ-UFRRJ
(Orientador)

Carmelita Gomes da Silva. Dr^a. IFRJ

Cristiane Martins Cardoso de Salles. Dr^a. PPGQ-UFRRJ



Emitido em 28/09/2021

DELIBERAÇÃO Nº 347/2021 - PPGQ (12.28.01.00.00.60)

(Nº do Protocolo: NÃO PROTOCOLADO)

(Assinado digitalmente em 28/09/2021 16:18)
CRISTIANE MARTINS CARDOSO DE SALLES
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
CoordCGQ (12.28.01.00.00.58)
Matrícula: 1681790

(Assinado digitalmente em 28/09/2021 17:33)
CRISTIANO JORGE RIGER
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DBQ (11.39.00.24)
Matrícula: 1844240

(Assinado digitalmente em 29/09/2021 22:54)
CARMELITA GOMES DA SILVA
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 074.918.587-24

Para verificar a autenticidade deste documento entre em <https://sipac.ufrrj.br/documentos/> informando seu número:
347, ano: **2021**, tipo: **DELIBERAÇÃO**, data de emissão: **28/09/2021** e o código de verificação: **71c34b6832**

AGRADECIMENTOS

Diante de todas as dificuldades e desmotivações atravessadas, conseguir seguir e concluir esse desafio é uma conquista não só minha, mas de todos que me cercam e me motivam também. Por conta disso tenho muitos a agradecer por estar no final de mais essa etapa.

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus, pois sinto que além de me possibilitar chegar até aqui, muitas vezes me indicou o caminho.

Gostaria de agradecer também à minha mãe, Marta Mimosa de Paulo, por ser uma grande referência na minha vida, além de me motivar e sempre acreditar em mim. Minha namorada, Tayna de Melo Amaro, também foi muito importante para mim, sempre me apoiando e tornando o trajeto menos pesado. Em especial, meus avós Geraldo Osorio, Adelaide Rosa Teixeira Osorio e Maria Mimosa de Paulo têm sido uma motivação para ser melhor cada dia.

Ser orientado pelo professor Cristiano Riger foi uma grande sorte na minha trajetória acadêmica. Todos seus orientandos sabem como somos inspirados e motivados por ele. Na vida nem todas as pessoas nos deixam muitas contribuições no que diz respeito a sobre como somos ou queremos ser, entretanto, tenho certeza que meu orientador agregou muito a mim. Sei que profissional quero ser!

Meus amigos de laboratório e da vida também foram essenciais para minha construção acadêmica e como ser humano. Por tudo isso, sou muito grato!

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Val – Valina
Pro – Prolina
Phe – Fenilalanina
Ile – Isoleucina
His – Histidina
Asn – Asparagina
Asp – Aspartato
Gly – Glicina
Gln – Glutamina
Arg – Arginina
EROs – Espécies Reativas de Oxigênio
LH – Ácido graxo poliinsaturado
GPx – Glutathione Peroxidase
SOD – Superóxido Dismutase
CAT – Catalase
GSH – Glutathione reduzida
GSSG – Glutathione oxidada
Grd – Glutathione reduzida
Cpd I – Composto I
Cpd II – Composto II
Cpd III – Composto III
PM3 – Parametric Method 3
PM6 – Parametric Method 6
PM7 – Parametric Method 7
RM1 – Recife Model 1
DFT – Density functional theory
DM – Dinâmica Molecular
DMSO – Dimetilsulfóxido
YPD – Yeast Extract Peptone Dextrose
SOD2 – Superóxido Dismutase 2
CAPE – Éster fenetil do ácido cafeico

ÍNDICE DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Etapas da peroxidação lipídica (LIMA, SAES, et al., 2001)	5
Figura 2: Reações de Fenton e Haber-Weiss de formação de espécies reativas (FERREIRA e MATSUBARA, 1997)	6
Figura 3: Atividade de enzimas do sistema antioxidante no combate a espécies reativas (BARBOSA, COSTA, et al., 2010)	8
Figura 4: Estruturas base dos ácidos fenólicos. Ácidos (a) hidroxibenzoicos e (b) hidroxicinâmicos (ANGELO e JORGE, 2007)	10
Figura 5: Estrutura química do ácido ferúlico	11
Figura 6: Estrutura química do ácido <i>p</i> -cumárico	13
Figura 7: Catálises das catalase-peroxidases (GLORIEUX e CALDERON, 2017)	14
Figura 8: Reação de catálise da eliminação de H ₂ O ₂ realizada pelas catalases que utilizam manganês (GLORIEUX e CALDERON, 2017)	14
Figura 9: Primeira e segunda reações das catalases heme com H ₂ O ₂ (PUTNAM, ARVAI, et al., 2000)	16
Figura 10: Reações de formação de Cpd II e Cpd III sofridas pelas catalases (GLORIEUX e CALDERON, 2017)	17
Figura 11: Fases de crescimento de células de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (HERMAN, 2002)	20
Figura 12: Reação de mudança de coloração da resazurina quando em contato com produtos do metabolismo celular	28
Figura 13: Resultado dos testes de toxicidade com resazurina para os ácidos ferúlico e <i>p</i> -cumárico (linhas horizontais A e B, respectivamente)	32
Figura 14: Percentual de células vivas da cepa BY4741 no ensaio com a substância azul de metileno. CN: controle negativo, CP: controle positivo, AF: ácido ferúlico e AC: ácido <i>p</i> -cumárico	34
Figura 15: Percentual de células vivas da cepa <i>Δctt1</i> no ensaio com substância azul de metileno. CN: controle negativo, CP: controle positivo, AF: ácido ferúlico e AC: ácido <i>p</i> -cumárico	35
Figura 16: Comparativo entre a atividade antioxidante das cepas no ensaio de sobrevivência. CN: controle negativo, CP: controle positivo. AF: ácido ferúlico e AC: ácido <i>p</i> -cumárico. O aumento percentual do número de células vivas foi obtido a partir da diferença entre os	

percentuais de células vivas de cada tratamento (AF e AC) e o percentual de células vivas no controle positivo da respectiva cepa	37
Figura 17: Atividade percentual da catalase na cepa BY4741 em células sob estresse com peróxido (2,5 mM). CN: controle negativo, CP: controle positivo, AF: ácido ferúlico e AC: ácido <i>p</i> -cumárico	40
Figura 18: Atividade percentual da catalase na cepa BY4741 em células sob estresse com peróxido (0,5 mM). CN: controle negativo, CP: controle positivo, AF: ácido ferúlico, AC: ácido <i>p</i> -cumárico, AFS: ácido ferúlico sem tratamento com H ₂ O ₂ e ACS: ácido <i>p</i> -cumárico sem tratamento com H ₂ O ₂	41
Figura 19: Estrutura química das moléculas (A) guaiacol; (B) ácido ferúlico; e (C) ácido <i>p</i> -cumárico	44
Figura 20: Sítio de ligação da catalase utilizado na docagem molecular. A: Comparação entre a conformação do Phe159 da docagem com cadeias rígidas (vermelho) e a conformação do Phe159 da docagem com liberdade para a cadeia lateral (azul). B: Comparação entre os sítios quando realizada a docagem com cadeias rígidas (verde) e com liberdade das principais cadeias laterais (azul)	48
Figura 21: Redução da atividade catalásica por mol de composto utilizado. AF: ácido ferúlico e AC: ácido <i>p</i> -cumárico. A redução da atividade foi obtida a partir da diferença da atividade da catalase observado entre o controle negativo e o tratamento com ácido ferúlico (AFS), ou entre o controle negativo e o tratamento com ácido <i>p</i> -cumárico (ACS) e dividida pela concentração molar do ácido fenólico empregada no ensaio	50

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Resultado do ensaio de toxidez das amostras no ensaio da resazurina. (++) alta toxidez, (+) moderada toxidez e (-) baixa ou inexistente toxidez	33
Tabela 2: Pontuações de ajuste geradas pela docagem molecular dos ligantes guaiacol, ácido ferúlico e ácido <i>p</i> -cumárico na catalase de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> com cadeias laterais rígidas através da função CHEMSCORE	44
Tabela 3: Interações com os resíduos de aminoácidos observadas pela docagem molecular dos ligantes guaiacol, ácido ferúlico e ácido <i>p</i> -cumárico na catalase de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> com cadeias laterais rígidas	45
Tabela 4: Pontuações geradas pela docagem molecular dos ligantes guaiacol, ácido ferúlico e ácido <i>p</i> -cumárico na catalase de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> com cadeias laterais livres através da função CHEMSCORE. A cada uma das cadeias laterais envolvidas na interação entre os ligantes e a catalase foi dada mobilidade na docagem molecular e também foi feita a docagem molecular com todas essas cadeias laterais com mobilidade ao mesmo tempo. Δp corresponde a diferença de pontuação entre cada docagem molecular flexível e a docagem com cadeias laterais rígidas	47
Tabela 5: Interações com os resíduos de aminoácidos observadas pela docagem molecular dos ligantes guaiacol, ácido ferúlico e ácido <i>p</i> -cumárico na catalase de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> com cadeias laterais flexíveis	49

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	4
2.1. Estresse oxidativo	4
2.2. Ácidos fenólicos.....	8
2.2.1. Ácido ferúlico	11
2.2.2. Ácido <i>p</i> -cumárico	12
2.3. Catalase.....	13
2.3.1. Mecanismo de ação da catalase	15
2.3.2. Catalase humana.....	17
2.3.3. Cinética.....	17
2.3.4. Inibidores e ativadores.....	18
2.4. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	19
2.4.1. Catalase de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	20
2.5. Modelagem molecular	21
2.5.1. Principais modelos	22
2.5.2. Docagem molecular	23
3. OBJETIVOS.....	25
3.1. Objetivo geral	25
3.2. Objetivos específicos	25
4. MATERIAIS E MÉTODOS	26
4.1. Materiais	26
4.1.1. Meios de cultura.....	26
4.1.2. Microrganismos	26
4.1.3. Repique.....	26
4.1.4. Inóculo.....	27
4.1.5. Preparo das soluções das substâncias analisadas	27
4.2. Métodos.....	27
4.2.1. Fator de conversão	27
4.2.2. Toxidez das amostras	28
4.2.3. Atividade antioxidante por sobrevivência celular	29
4.2.4. Atividade da enzima catalase.....	29
4.2.5. Modelagem molecular.....	31
4.2.6. Análise estatística	31

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
5.1. Toxicidade dos ácidos ferúlico e <i>p</i> -cumárico em <i>S. cerevisiae</i>	32
5.2. Potencial antioxidante dos ácidos ferúlico e <i>p</i> -cumárico	33
5.3. Análise da influência dos ácidos ferúlico e <i>p</i> -cumárico na atividade catalásica sob estresse oxidativo mais severo.....	39
5.4. Atividade catalásica na presença dos ácidos ferúlico e <i>p</i> -cumárico sob estresse oxidativo mais brando.....	41
5.5. Estudo <i>in silico</i> das possíveis interações dos ácidos <i>p</i> -cumárico e ferúlico com a enzima catalase	43
6. CONCLUSÃO	52
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

Resumo

OSORIO, Rodrigo de Paulo. **Análise da relação entre o potencial antioxidante dos ácidos ferúlico e *p*-cumárico e a enzima catalase de *Saccharomyces cerevisiae***. 2021. 71p. Dissertação (Mestrado em Química, Química Medicinal e Biológica). Instituto de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 2021.

O estresse oxidativo é uma condição gerada pela incapacidade do sistema de defesa antioxidante em controlar a ação dos oxidantes nas células, que podem reagir com lipídios, proteínas e DNA, prejudicando as propriedades das estruturas celulares. O estresse oxidativo tem sido associado a diversas patologias, como doenças neurodegenerativas, diabetes e câncer. Os ácidos ferúlico e *p*-cumárico são antioxidantes exógenos relacionados a efeitos positivos contra doenças neurodegenerativas. No entanto, é importante conhecer melhor os mecanismos de ação desses compostos. Assim, experimentos de viabilidade celular, atividade da catalase, atividade antioxidante e modelagem molecular foram realizados com o objetivo de analisar a relação entre o potencial antioxidante dos ácidos ferúlico e *p*-cumárico e a enzima catalase de *Saccharomyces cerevisiae*. Ambos os ácidos não apresentaram toxicidade na concentração de 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para células. A análise do efeito desses ácidos na atividade da catalase sob diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio (0,0 mM, 0,5 mM e 2,5 mM) revelou atividade catalásica de 77,76% e 53,63%; 127,52% e 104,39%; e 83,67% e 70,61% para os ácidos ferúlico e *p*-cumárico em relação ao controle negativo, respectivamente. Em relação ao potencial antioxidante, o pré-tratamento com ácidos mostrou aumento da viabilidade celular após estresse oxidativo com peróxido de hidrogênio (2,0 mM). Estes resultados foram observados no controle BY4741 (aumento maior que 20%) e mutante da cepa *Actt1* deficiente em catalase (aumento maior que 25%). Analisando por docagem molecular (GOLD), verificou-se que possivelmente os resíduos de aminoácido Val111, Pro124, Phe148, Phe149 e Phe159 são importantes para as interações de ambos os ácidos fenólicos com a enzima. Ao permitir a flexibilização das cadeias laterais com os resíduos de aminoácidos Val111, Phe148, Phe149, Phe156, Phe159 e Ile160 as pontuações para os ácidos fenólicos são elevadas, com destaque para a cadeia lateral do resíduo Phe159. Em conclusão, o ácido ferúlico e o ácido *p*-cumárico fornecem proteção celular contra o estresse oxidativo e essa proteção aparentemente não está relacionada ao seu efeito direto na catalase.

Palavras-chaves: Estresse oxidativo, ácidos fenólicos, catalase, *Saccharomyces cerevisiae*.

Abstract

OSORIO, Rodrigo de Paulo. **Analysis of the relationship between the antioxidant potential of ferulic and *p*-coumaric acids and the catalase enzyme from *Saccharomyces cerevisiae***. 2021. 71p. Dissertação (Mestrado em Química, Química Medicinal e Biológica). Instituto de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 2021.

Oxidative stress is a condition generated by the inability of the antioxidant defense system to control the action of oxidants in cells, which can react with lipids, proteins and DNA, damaging the properties of cells structures. Oxidative stress has been associated with several pathologies, such as neurodegenerative diseases, diabetes and cancer. Ferulic and *p*-coumaric acids are exogenous antioxidants related to positive effects against neurodegenerative diseases. However, it is important to understand better the action mechanisms of these compounds. Thus, cell viability, catalase activity, antioxidant activity and molecular modeling experiments were carried out in order to analyze the relationship between the antioxidant potential of ferulic and *p*-coumaric acids and the catalase enzyme from *Saccharomyces cerevisiae*. Both acids did not show toxicity at the concentration of 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ for cells. The analysis of the effect of these acids on catalase activity under different concentrations of hydrogen peroxide (0.0 mM, 0.5 mM and 2.5 mM) revealed catalase activity of 77.76% and 53.63%; 127.52% and 104.39%; and 83.67% and 70.61% for ferulic and *p*-coumaric acids in relation to the negative control, respectively. Regarding the antioxidant potential, pre-treatment with acids showed an increase in cell viability after oxidative stress with hydrogen peroxide (2.0 mM). These results were observed in the BY4741 control (greater than 20% increase) and the catalase deficient *Δctt1* strain mutant (greater than 25% increase). Analyzing by molecular docking (GOLD), it was found that possibly the amino acid residues Val111, Pro124, Phe148, Phe149 and Phe159 are important for the interactions of both phenolic acids with the enzyme. By allowing the flexibility of the side chains with amino acid residues Val111, Phe148, Phe149, Phe156, Phe159 and Ile160, the scores for phenolic acids are high, with an emphasis on the side chain of residue Phe159. In conclusion, ferulic acid and *p*-coumaric acid provide cellular protection against oxidative stress and this protection is apparently unrelated to their direct effect on catalase.

Key Word: Oxidative stress, phenolic acids, catalase, *Saccharomyces cerevisiae*.

1. INTRODUÇÃO

Diferentes patologias estão intrinsecamente associadas a um quadro de estresse oxidativo intracelular, onde os danos oxidativos que interferem nas funções de biomoléculas e consequentemente das estruturas celulares são catalisadores na progressão dessas doenças. Portanto, a necessidade das células de aumentarem a ação das suas defesas antioxidantes endógenas pode permitir que a velocidade desses danos seja diminuída evitando a progressão de patologias como diabetes, câncer, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas.

Algumas defesas endógenas compreendem a ação de enzimas antioxidantes, tais como as catalases peroxissomais e citossólicas, capazes de eliminar o peróxido de hidrogênio produzido inclusive pelo metabolismo aeróbico celular mediante sua transformação em água e oxigênio molecular. É de conhecimento a geração de danos oxidativos em membranas lipídicas e proteínas causados por esta espécie altamente reativa no ambiente celular; fazendo com que um aumento da atuação dessas enzimas, seja através de suas atividades, sínteses ou transcrições ligadas a fatores de transcrição, corresponda a uma resposta celular contra o estresse oxidativo.

Substâncias exógenas contendo moléculas que possam participar de reações redox nas células ganham enorme relevância nestes estudos, como as substâncias fenólicas constituintes de uma série de alimentos comuns presentes em nossa cultura alimentar. Muitos trabalhos publicados focam em estudos onde essas moléculas atuam direta ou indiretamente sobre as estruturas celulares, auxiliando as defesas endógenas no combate às espécies reativas. Estas substâncias fenólicas podem fornecer poder redutor capaz de diminuir a concentração de radicais livres, ou mobilizar íons de metais capazes de formar outras espécies reativas por reações do tipo Fenton; diminuindo, por conseguinte, o comprometimento de moléculas redutoras endógenas como no caso do tripeptídeo glutationa.

Embora o mecanismo pelo qual boa parte dessas moléculas obtidas de forma exógena atuem na proteção antioxidante dentro e fora das células nos organismos ainda careça de investigação, uma das hipóteses é a interferência direta dessas moléculas sobre a atividade de enzimas. Os ácidos fenólicos apresentam atividade de sequestro de radicais livres e mobilização de metais pró-oxidantes; e evidências sugerem que estes compostos atuam também modulando a atividade de diversas enzimas, interagindo com receptores em vias de transdução de sinais, podem regular o ciclo celular, dentre outros (OLIVEIRA e BASTOS, 2011).

Com o intuito de avaliar se existe alguma relação entre a atividade antioxidante endógena com estas substâncias exógenas, esse estudo foca suas análises na ação da enzima catalase. Assim como as catalases de mamíferos, a catalase da levedura *Saccharomyces cerevisiae* também apresenta-se como um tetrâmero, com elevada similaridade entre seus aminoácidos nos domínios contendo o anel porfirínico e o ferro heme; além dessas catalases também atuarem através do mesmo mecanismo reacional básico. Diante da grande ortologia entre os sistemas de defesa antioxidantes de *S. cerevisiae* com células de mamíferos superiores, com destaque para a similaridade estrutural entre a catalase deste fungo e as catalases de mamíferos; e a necessidade de estudos empregando testes *in vivo*, afim de não desconsiderar toda a complexidade celular nas análises; a *S. cerevisiae* destaca-se como um componente fundamental deste estudo (SOARES, ANDREAZZA e SALVADOR, 2004).

É importante ressaltar a importância celular da catalase em estudo com células de *Saccharomyces cerevisiae*, pois observou-se que cepas desta levedura deficientes em catalase são mais sensíveis a um estresse oxidativo provocado por peróxido de hidrogênio (FRANÇA, LIMA e ELEUTHERIO, 2017). A investigação de compostos fenólicos interagindo diretamente com a enzima catalase ainda requer uma gama de análises a fim de mapear se estes compostos modulam a atividade dessa enzima. Uma forma de avaliar esta relação é através de análises antioxidantes *in vivo* utilizando células eucarióticas de *Saccharomyces cerevisiae*, um modelo celular de estudo amplamente utilizado no que diz respeito à investigação dos mecanismos moleculares associados à proteção antioxidante, toxicidade de moléculas e a potencial atuação de substâncias como pré-candidatos a fármacos.

Outra ferramenta muito importante empregada para este fim é a modelagem molecular; que possibilita através de análises *in silico*, utilizando cálculos envolvendo interações entre os fenólicos e a catalase, analisar e prever o comportamento de estruturas moleculares no sítio catalítico ou em outro ponto da enzima (KORB, FINN e JONES, 2014). Através da modelagem molecular tem sido analisadas interações entre ligantes e enzimas, possibilitando uma melhor compreensão dos componentes estruturais importantes para que um ligante interaja em um determinado sítio enzimático (LOEWEN, VILLANUEVA, *et al.*, 2015).

Ácidos fenólicos como os ácidos ferúlico e *p*-cumárico já foram empregados em estudos com respostas positivas contra doenças neurodegenerativas associadas a um ambiente oxidativo em neurônio (GAY, PHOPIN, *et al.*, 2018, SAKAMULA e THONG-ASA, 2018).

Com isso, é importante a investigação para uma maior compreensão sobre os possíveis mecanismos envolvidos no papel de proteção gerado por esses compostos; portanto, neste estudo foram empregados experimentos de modelagem molecular, viabilidade celular, atividade antioxidante e atividade da catalase com o objetivo de estudar a influência do ácido ferúlico e do ácido *p*-cumárico sobre a catalase em células de *Saccharomyces cerevisiae* sob estresse oxidativo.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Estresse oxidativo

O estresse oxidativo é uma condição ocasionada por um desequilíbrio entre a geração de compostos oxidantes e a atuação do sistema de defesa antioxidante do organismo. O metabolismo celular do oxigênio gera espécies reativas, sendo estas radicalares ou não, conhecidas como espécies reativas de oxigênio (EROs). Essas espécies são produzidas principalmente na mitocôndria, por meio da cadeia transportadora de elétrons, etapa final da respiração celular; contudo, existem outras inúmeras fontes geradoras de EROs, como fatores exógenos e enzimas NADPH oxidases que estão ligadas a transferência de elétrons através da membrana celular onde normalmente apresentam como aceptor final o oxigênio molecular, podendo gerar assim espécies reativas (DONG, ZHANG e ZHANG, 2021).

Espécies reativas de oxigênio e radicais livres desenvolvem papel importante no metabolismo celular como mediadores para a transferência de elétrons em várias reações bioquímicas; porém, o excesso dessas espécies caracteriza uma situação prejudicial por conduzirem à oxidação de biomoléculas podendo ocasionar perda de função biológica resultando em danos oxidativos a células e tecidos (BARREIROS e DAVID, 2006). Como exemplos de compostos oxidantes presentes no meio celular tem-se o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), e os radicais ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peroxila (ROO^{\cdot}), alcoxila (RO^{\cdot}) e hidroxila (OH^{\cdot}); sendo o radical hidroxila o mais reativo, capaz de alterar qualquer estrutura celular próxima por conta do seu tempo de meia-vida muito curto e alta reatividade (MEHDI, SOLANKI e SINGH, 2021).

A importância da presença das EROs e/ou dos produtos de reações que as envolvem os meios intra e extracelular está no fato de que vários processos de sinalização celular são iniciados por estas espécies, inclusive de proteção e morte celulares; muitas das vezes associados a reações de óxido-redução tendo estas espécies como protagonistas. Essas espécies são produzidas nas células, tem ação em meio celular, e quando removidas revertem o sinal, representando assim seu potencial como moléculas sinalizadoras (RIBEIRO, QUEIROZ, *et al.*, 2005). As EROs também podem ser úteis contra invasores externos e auxiliar a célula em conter a proliferação do invasor (SOARES e MACHADO, 2007).

As espécies reativas podem reagir com os lipídios insaturados das membranas celulares, numa cascata de reações conhecida como peroxidação lipídica resultando na

degradação dessas estruturas com a formação principalmente de radical lipídico (L•), radical alcóxil (LO•) e radical peróxila (LOO•) (Figura 1); no comprometimento dos mecanismos de troca de metabólitos; e, em casos extremos, na morte celular. A peroxidação lipídica é constituída pelas etapas de iniciação, propagação e terminação. A reação começa com o sequestro do hidrogênio do ácido graxo poliinsaturado (LH) presente na membrana celular resultando na formação do L•. Na primeira parte da propagação o L• reage rapidamente com o O₂, resultando em LOO• que, por sua vez, retira um hidrogênio do ácido graxo poliinsaturado, podendo formar novamente o L• na segunda parte da propagação. O término da lipoperoxidação ocorre quando os radicais (L• e LOO•) produzidos nas etapas anteriores propagam-se até se destruírem. A peroxidação lipídica está relacionada a diversas lesões celulares. Os danos sofridos pela membrana celular resultam em transtornos de permeabilidade, alterando os fluxos iônicos e de outras substâncias, provocando perda da seletividade para entrada e saída de nutrientes e substâncias tóxicas à célula, alterações no DNA e comprometimento dos componentes da matriz extracelular (SU, ZHANG, *et al.*, 2019).

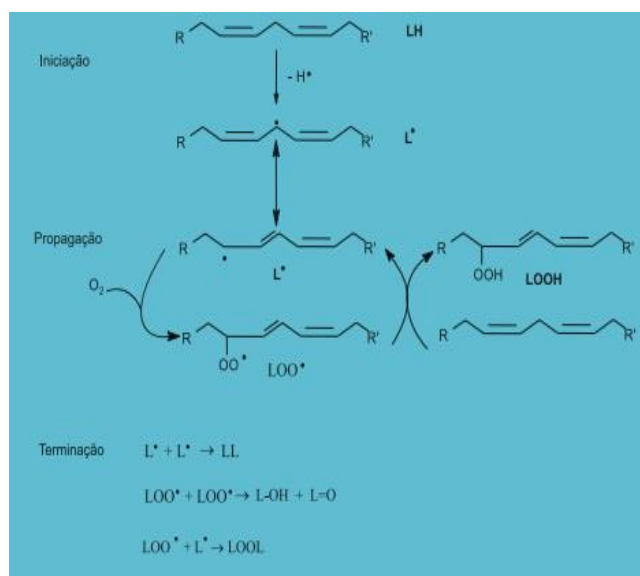


Figura 1: Etapas da peroxidação lipídica (LIMA, SAES, *et al.*, 2001).

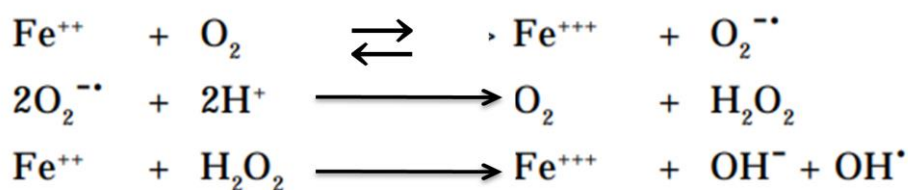
Estudos utilizando células de testículos, fígado e coração de ratos correlacionam a peroxidação lipídica à morte celular, realçando a problemática dos danos a membrana celular, além de ressaltar a importância da supressão da peroxidação dos lipídios para a sobrevivência das células. Também é observado que a deleção de enzimas antioxidantes importantes como a

glutathiona peroxidase torna as células muito mais sensíveis e o uso de antioxidantes exógenos como a vitamina E aumenta a resistência celular (IMAI, MATSUOKA, *et al.*, 2017).

O DNA é outro componente celular suscetível aos danos oxidativos. Os danos causados por espécies oxidantes podem comprometer a integridade e estrutura da molécula de DNA, através de quebras de moléculas de fita simples ou dupla, modificações de base nitrogenada e ligações cruzadas de DNA, apresentando o 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OH-dG) como um dos principais produtos da oxidação do DNA causada pelo radical hidroxila que induz modificações das bases de purina e pirimidina com a mutação simultânea da estrutura da desoxirribose. Concordante com isto, um aumento dos níveis de 8-OH-dG na urina foi relatado no linfoma maligno. As alterações do DNA decorrente do estresse oxidativo podem interromper ou induzir as vias de transdução de sinal, transcrição, erros de replicação e vários tipos de instabilidade genômica com capacidade carcinogênica. Com o envelhecimento, lesões mutagênicas mediadas por espécies reativas podem induzir várias doenças, incluindo câncer (MEHDI, SOLANKI e SINGH, 2021).

Íons de metais como ferro e cobre também podem participar cataliticamente das reações que resultam em lesões oxidativas (Figura 2). O papel de metais em reações de formação de EROs foi confirmado *in vitro* através das reações de Fenton e de Haber-Weiss que apresentam como produtos o radical hidroxila (QI, ZHANG, *et al.*, 2020).

Reação de Fenton:



Reação de Haber-Weiss:

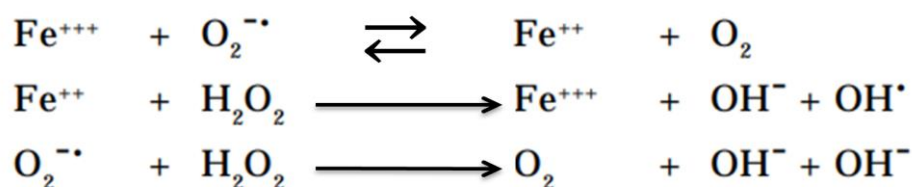


Figura 2: Reações de Fenton e Haber-Weiss de formação de espécies reativas (FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

O estresse oxidativo tem sido relacionado a diversas doenças como catarata, câncer, enfisema, esclerose múltipla, acidente vascular cerebral, Parkinson, doença de Alzheimer, entre muitas outras (YAN, WANG e ZHU, 2013). Estudos mostram que marcadores de estresse oxidativo como carbonilas proteicas, bases oxidadas de DNA e produtos da peroxidação lipídica são detectados em concentrações aumentadas em camundongos de modelo de estudo de Alzheimer e Parkinson (BARBOSA, MEDEIROS e AUGUSTO, 2006).

Ainda sobre a Doença de Alzheimer, pode-se observar a presença de proteínas oxidadas, formação de espécies tóxicas como peróxidos, aldeídos, cetonas e modificações oxidativas no DNA nuclear e mitocondrial. Na mitocôndria é provocada a inibição da cadeia transportadora de elétrons, redução do potencial de membrana, diminuição da taxa respiratória e aumento na liberação de espécies reativas, favorecendo a ocorrência de apoptose (GEMELLI, ANDRADE, *et al.*, 2013).

A fim de controlar os danos causados pela ação de espécies reativas, as células possuem sistemas de defesa antioxidante, os quais podem atuar impedindo a geração de radicais livres ou espécies reativas não-radicalares (sistema de prevenção); combatendo a ação dessas espécies (sistema varredor); ou ainda favorecendo o reparo e o restabelecimento das estruturas danificadas (sistema de reparo). Esse sistema de defesa antioxidante é dividido em sistema de defesa enzimático e não enzimático (BARBOSA, COSTA, *et al.*, 2010).

O sistema de defesa enzimático é constituído por diversas enzimas atuantes no combate aos compostos oxidantes, destacando-se as enzimas glutathione peroxidase (GPx), superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT). A enzima glutathione peroxidase promove a degradação do peróxido de hidrogênio produzindo água (H₂O) e oxigênio molecular (O₂), porém para este processo é necessária a conversão da glutathione reduzida (GSH) em glutathione oxidada (GSSG), sendo esse efeito da glutathione devido à ligação dissulfeto existente em sua estrutura. Portanto, para a manutenção da atividade da GPx é importante a existência de GSH, que pode ser gerada a partir da redução da GSSG promovida pela enzima glutathione reductase (Grd) e pela síntese de uma nova molécula de glutathione. A enzima superóxido dismutase catalisa a produção de peróxido de hidrogênio a partir do radical ânion superóxido, e a enzima catalase é responsável pela decomposição de peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular (Figura 3) (SU, ZHANG, *et al.*, 2019).

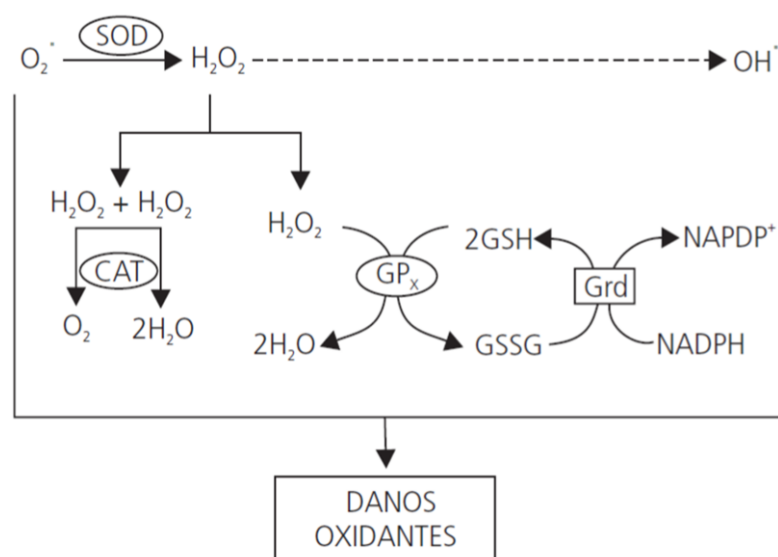


Figura 3: Atividade de enzimas do sistema antioxidante no combate a espécies reativas (BARBOSA, COSTA, *et al.*, 2010).

O sistema de defesa não enzimático é composto por diversas substâncias antioxidantes de origem endógena ou dietética, sendo compreendido como substância antioxidante qualquer composto que presente em menores concentrações que as do substrato oxidável seja capaz de atrasar ou inibir a oxidação deste. A vitamina E, a vitamina C e a glutathiona são substâncias constituintes do sistema de defesa antioxidante celular. Os polifenóis são os antioxidantes mais abundantes em nossa dieta; vale destacar dois conjuntos de antioxidantes dietéticos amplamente estudados devido ao seu potencial contra oxidantes, os flavonoides e os ácidos fenólicos (CERQUEIRA, MEDEIROS e AUGUSTO, 2007).

Diversos efeitos antioxidantes tem sido observados para polifenóis presentes na dieta, como no caso do estudo que observou que extratos de amora preta foram capazes de reduzir em mais de 30% os níveis de EROs usando *Caenorhabditis elegans* como modelo de estudo (MORAES, LOZANO-SÁNCHEZ, *et al.*, 2020).

2.2. Ácidos fenólicos

Compostos fenólicos estão bastante presentes em vegetais, frutas e em diversos alimentos derivados dos mesmos. Os grupos de compostos fenólicos mais abundantes nos alimentos são os flavonoides, os ácidos fenólicos e as lignanas. Estes compostos têm sido amplamente associados à diminuição do risco de surgimento de doenças cardiovasculares,

câncer e diversas outras doenças crônicas. O poder antioxidante não é o único fator responsável por essa associação dos fenólicos com a prevenção das doenças. Além da capacidade de sequestrar radicais livres ou mobilizar metais pró-oxidantes, evidências sugerem que estes compostos também podem atuar através de outros mecanismos, como a modulação da atividade de diversas enzimas, interações com receptores e vias de transdução de sinais, regulação do ciclo celular, dentre outros (OLIVEIRA e BASTOS, 2011).

Ácidos fenólicos é uma classe de compostos que apresenta grupamento fenol e carboxila e é dividida em ácidos hidroxibenzóicos e hidroxicinâmicos (Figura 4). Os ácidos hidroxibenzóicos são constituintes das estruturas complexas de taninos e são menos presentes nos vegetais consumidos pelos humanos. Como exemplo de derivados de ácidos hidroxibenzóicos destacam-se os ácidos salicílico, gálico, elágico, venílico e protocateico, que são encontrados em frutas como morango, uva, laranja, limão e tangerina (SILVA, COSTA, *et al.*, 2010). Os ácidos hidroxicinâmicos na maioria dos alimentos apresentam-se esterificados aos ácidos quínico, tartárico ou a carboidratos e seus derivados, e estão presentes em vários alimentos de origem vegetal, como maçã, erva-mate, café, outras frutas, cereais e crucíferas, tendo como exemplos comuns desses compostos os ácidos ferúlico, *p*-cumárico, cafeico e sinápico. Os ácidos hidroxicinâmicos também podem estar na forma livre em alimentos como o tomate e a cerveja (OLIVEIRA e BASTOS, 2011).

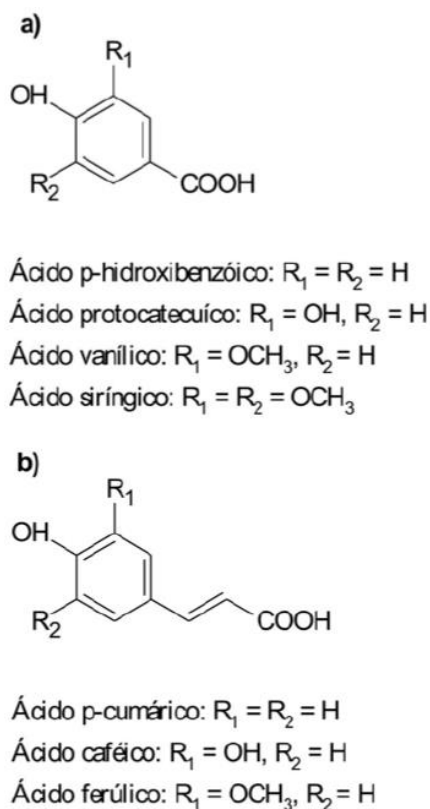


Figura 4: Estruturas base dos ácidos fenólicos. Ácidos (a) hidroxibenzoicos e (b) hidroxicinâmicos (ANGELO e JORGE, 2007).

Ácidos como o ferúlico e o *p*-cumárico são antioxidantes mais ativos que os derivados de ácido benzoico, como os ácidos siríngeo, procatecuico e vanílico. Este efeito desses ácidos hidroxicinâmicos deve-se à ligação dupla conjugada existente entre o grupo funcional ácido e o anel benzênico, que participa da estabilização do radical fenoxil por ressonância do deslocamento do elétron desemparelhado gerada da interação destes compostos com radicais livres; enquanto os derivados do ácido benzoico não apresentam essa ligação dupla (DEGÁSPARI e WASZCZYNSKYJ, 2004).

Os antioxidantes fenólicos podem atuar interrompendo a cadeia reacional através da doação de elétrons ou hidrogênio aos radicais livres, convertendo estes em produtos termodinamicamente mais estáveis; ou ainda retardando a etapa de iniciação por diferentes mecanismos, como a complexação de metais, desativação de oxigênio singlete (oxigênio molecular em forma mais oxidante pelo acréscimo de energia), sequestro de oxigênio, decomposição de hidroperóxidos para geração de espécies não radicalares e absorção de radiação ultravioleta. O radical peroxil reage preferencialmente com esses compostos por conta desse radical possuir menor energia do que outros radicais, fato que favorece a

abstração do hidrogênio desses fenólicos. Este mecanismo de ação antioxidante relacionado a esses compostos e por isso presente em extratos de plantas desenvolve um papel importante na redução da oxidação lipídica em tecidos vegetais e animais, pois quando incorporado na alimentação não apenas conserva a qualidade do alimento, como também previne o desenvolvimento de patologias associadas a danos oxidativos (ANGELO e JORGE, 2007).

2.2.1. Ácido ferúlico

O ácido ferúlico ou ácido (*E*)-3-(4-hidroxi-3-metoxi-fenil) prop-2-enoico (Figura 5) é um composto fenólico de massa molecular $194,18 \text{ g.mol}^{-1}$ pertencente à família do ácido cinâmico, naturalmente encontrado em folhas e sementes de várias plantas (MACHADO e FREITAS, 2013). Este ácido é comumente encontrado em grãos integrais, salsa, uvas, espinafre, ruibarbo e sementes de cereais, principalmente trigo, aveia, cevada e centeio. (ZDUNSKA, DANA, *et al.*, 2018).

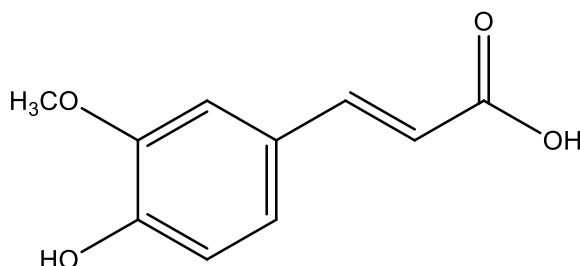


Figura 5: Estrutura química do ácido ferúlico.

Diversas atividades biológicas têm sido relatadas para este composto além da atividade antioxidante, como atividades anti-inflamatória, antimicrobiana, anticâncer, antitrombótica, antiarrítmica, antidiabética, propriedades imunoestimulantes e poder de redução de danos a células, além de apresentar baixa toxicidade. O ácido ferúlico ainda é mais facilmente absorvido e mantém-se no sangue mais tempo que qualquer outro ácido fenólico, podendo prolongar o tempo de ação do composto no organismo (ZDUNSKA, DANA, *et al.*, 2018).

O mecanismo de ação antioxidante do ácido ferúlico é principalmente baseado no combate a espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Este ácido também é responsável pela quelatação de íons metálicos relacionados à geração de espécies reativas, como os íons Cu(II) e Fe(II), relacionando-se assim com a prevenção da peroxidação lipídica (BEZERRA,

PEREIRA, *et al.*, 2016). O ácido ferúlico não apenas elimina radicais livres, como também é um inibidor de enzimas que catalisam a geração de radicais livres e estimulador da atividade de enzimas protetoras. Foi observado que este composto mostrou forte atividade inibitória da tirosinase e da superóxido dismutase e sua ingestão resultou em significativo aumento da atividade da glutathione s-transferase e da quinona redutase no fígado (OU e KWOK, 2004).

O poder antioxidante do ácido ferúlico está diretamente ligado à sua estrutura química. Pelo fato do ácido ferúlico apresentar uma hidroxila em posição orto com o grupo metoxila, doador de elétrons, a estabilidade do radical fenoxil é maior, significando um maior poder antioxidante (DEGÁSPARI e WASZCZYNSKYJ, 2004).

O ácido ferúlico mostrou-se muito eficiente no auxílio de células mononucleares do sangue contra o estresse oxidativo em concentração de aproximadamente 200 μM , ajudando as células na eliminação de espécies reativas de oxigênio e reduzindo a peroxidação lipídica. No mesmo estudo esse ácido foi capaz de elevar a atividade das enzimas SOD e CAT em hepatócitos e eritrócitos do sistema vascular de camundongos deficientes em apolipoproteína-E (MANCUSO e SANTANGELO, 2013). Em outros estudos o ác. ferúlico exerceu efeito neuroprotetor e foi eficiente contra a doença de Alzheimer, entretanto, o esclarecimento dos mecanismos de ação ainda precisam ser melhor elucidados (GAY, PHOPIN, *et al.*, 2018).

2.2.2. Ácido *p*-cumárico

O ácido *p*-cumárico ou ácido (*E*)-3-(4-hidroxifenil)-2-propenoico (Figura 6) é um ácido fenólico com massa molecular de 164,16 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ (FERREIRA, VICTORELLI, *et al.*, 2018) da família do ácido hidroxicinâmico, normalmente encontrado em cogumelos e plantas. Esse ácido em sua forma livre ou conjugada é amplamente presente em frutas como maçã, pera, uva, baga, laranja e tomate; e outros alimentos como feijão, batata e cebola; além de cereais como trigo, aveia e milho. Produzido em plantas pela via do chiquimato, tendo como precursores a fenilalanina e a tirosina, o ácido *p*-cumárico desempenha um papel relevante no metabolismo central de plantas, uma vez que pode ser convertido em outros ácidos fenólicos, como o ferúlico, cafeico, clorogênico e o sinápico, bem como flavonoides (PEI, OU, *et al.*, 2015).

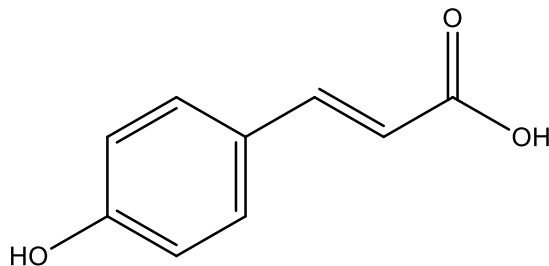


Figura 6: Estrutura química do ácido *p*-cumárico.

Em plantas o ácido *p*-cumárico pode apresentar-se conjugado a aminas, alcoóis, monossacarídeos, polissacarídeos, oligossacarídeos ou lignina em formas solúveis ou não em água. Tanto na forma livre quanto na forma conjugada o ácido *p*-cumárico tem apresentado atividades biológicas, tais como atividades antioxidante, anti-inflamatória, antimutagênica, anticâncer e anti-ulcerativa; além de atenuar a aterosclerose, danos cardíacos, danos induzidos por radiação ultravioleta, lesão neural, gota, diabetes e ansiedade (PEI, OU, *et al.*, 2015).

Na literatura o ácido *p*-cumárico apresenta atividade antioxidante em ensaios com o radical ABTS (*in vitro*), quelação de metais e eliminação de radicais ânion superóxido e peróxido de hidrogênio (KILIC e YESILOGLU, 2013). Além do aumento da atividade das enzimas catalase, superóxido dismutase e glutathione peroxidase a níveis comparáveis com os controles não submetidos a estresse, também foi observado poder neuroprotetor em camundongos, reafirmando o potencial deste ácido fenólico contra doenças neurodegenerativas (SAKAMULA e THONG-ASA, 2018).

2.3. Catalase

A catalase (CAT) é uma enzima antioxidante responsável por degradar peróxido de hidrogênio. Devido ao fato de existirem alguns tipos diferentes de catalase, essa pode ser classificada de acordo com sua função e estrutura em três grupos; sendo o primeiro e o segundo grupos formados por enzimas que apresentam grupamento heme, ou seja, catalases verdadeiras e catalases-peroxidases; e o terceiro grupo contendo catalases não-heme que utilizam manganês (GLORIEUX e CALDERON, 2017).

As catalases verdadeiras fazem parte do maior dos grupos e são encontradas em organismos que apresentam metabolismo aeróbico. Em sua maioria, essas catalases são homotetrâmeros com massa molecular entre 200 e 360 kDa, apresentando quatro grupos

prostéticos, sendo na maioria das catalases desse grupo uma ferriprotoporfirina IX encontrada no centro ativo. Muitas dessas enzimas, como a de fungos e a humana, apresentam NADPH como cofator (BELO e SOUZA, 2016).

Catalase-peroxidases foram encontradas em fungos, bactérias e arqueobactérias e possuem peso molecular entre 120 e 340 kDa, apresentando-se normalmente como homodímeros. Essas enzimas possuem menor eficiência para a degradação de H₂O₂, porém maior afinidade por este substrato (GLORIEUX e CALDERON, 2017). Através de atividade peroxidase podem reagir com doadores de hidrogênio como metanol, etanol, fenóis ou ácido fórmico (Figura 7) (MATES e PÉREZ-GÓMEZ, 1999). Esse tipo de CAT também apresenta maior sensibilidade à inativação por pH quando comparada com as típicas ou verdadeiras (GLORIEUX e CALDERON, 2017).

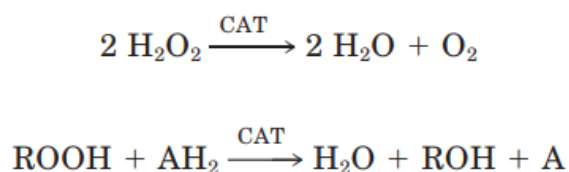


Figura 7: Catálises das catalase-peroxidases (GLORIEUX e CALDERON, 2017).

Catalases com mangânes foram encontradas apenas em bactérias. Esse tipo da catalase apresenta dois íons de manganês no centro ativo e pode apresentar-se na forma oligomérica, tendo massa molecular entre 170 e 210 kDa, não possuindo homologia significativa com os demais grupos de catalase. A reação catalítica dessas enzimas acontece de maneira completamente diferente, onde o núcleo dimanganês é igualmente estável e pode ser oxidado de Mn²⁺ para Mn³⁺ e reduzido de Mn³⁺ à Mn²⁺ na reação com o H₂O₂ (Figura 8) (WHITTAKER, 2012).

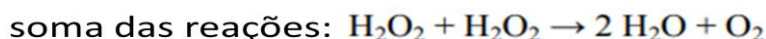
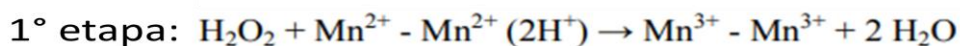


Figura 8: Reação de catálise da eliminação de H₂O₂ realizada pelas catalases que utilizam manganês (GLORIEUX e CALDERON, 2017).

As catalases mais comuns apresentam relevante estabilidade térmica, divergindo do esperado para um tetrâmero estabilizado por interações não covalentes; porém, suas subunidades entrelaçam-se com o C e o N terminal em cada subunidade sobrepondo-se, conferindo uma maior estabilidade térmica à enzima. Estudos confirmam a existência de canais que facilitam o transporte de H₂O₂ para o local ativo das enzimas através do direcionamento do peróxido de hidrogênio via dipolos de H₂O e ligação de hidrogênio. Através desta sua ação catalítica, a CAT pode a partir da diminuição dos níveis de H₂O₂ elevar a vida útil celular (TEHRANI e MOOSAVI-MOVAHEDI, 2018).

A catalase em células eucarióticas localiza-se principalmente em peroxissomos, tendo origem nuclear e sendo assim importada para estas organelas. Essa enzima antioxidante é enviada na forma monomérica sinalizada para o peroxissomo, onde ocorre a tetramerização; entretanto, a catalase também pode ser encontrada em sua conformação tetramérica ativa no citosol das células e em mitocôndrias (GOYAL e BASAK, 2010).

Em estudos com células da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, foi observado que as cepas deficientes em alguma das catalases são mais sensíveis. Tanto a cepa $\Delta ctt1$ (catalase citosólica) quanto a $\Delta ctal$ (catalase peroxissomal) apresentaram redução de viabilidade celular mais acentuada que o controle quando submetidas a agentes indutores de estresse oxidativo (FRANÇA, LIMA e ELEUTHERIO, 2017).

2.3.1. Mecanismo de ação da catalase

Nas reações de catálise da degradação do peróxido de hidrogênio, a catalase é oxidada a um intermediário de ferro hipervalente (composto I) para degradar a primeira molécula de H₂O₂, e é reduzida retornando ao estado de repouso na degradação de uma segunda molécula do substrato. O composto I (Cpd I) é formado a partir da oxidação sofrida pelo centro ativo da enzima, sendo caracterizado por um radical cátion oxoferril porfirina. Uma vez formado o composto I rapidamente ocorre a reação com a segunda molécula de H₂O₂, gerando H₂O e O₂ (Figura 9). É sugerido que o resíduo de histidina distal pode desempenhar importante na atividade da enzima (PUTNAM, ARVAI, *et al.*, 2000).

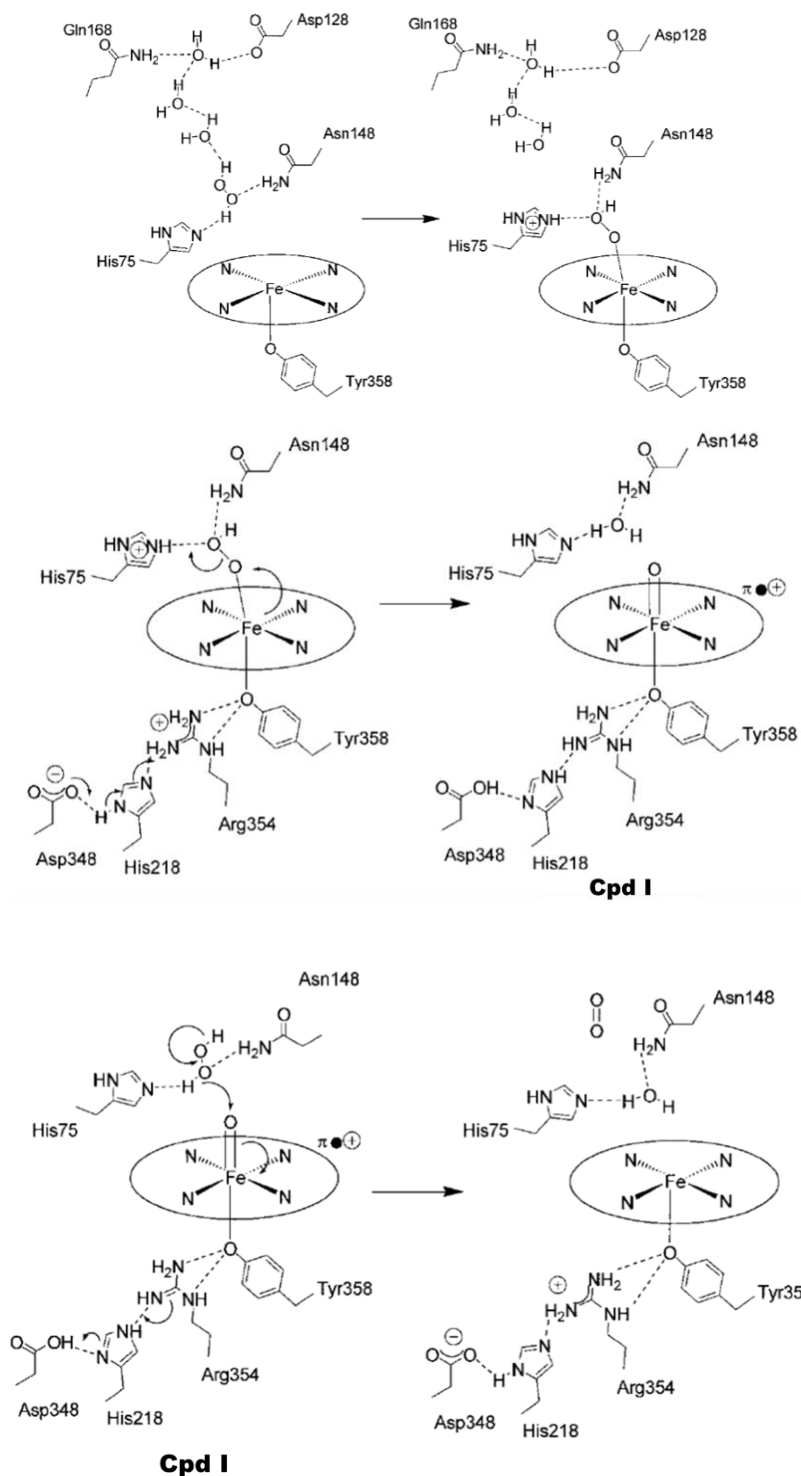


Figura 9: Primeira e segunda reações das catalases heme com H_2O_2 (PUTNAM, ARVAI, *et al.*, 2000).

Quando em presença de doadores de elétrons como fenóis, ácido salicílico, ferrocianeto, monóxido de nitrogênio e ânions superóxido, bem como em baixas concentrações do substrato H_2O_2 , o composto I pode sofrer uma redução de um elétron gerando o composto II (Cpd II), caracterizado como hidroxoferril; que retorna ao estado de

repouso após outra etapa através da transferência de um elétron. Na presença de outro doador de um elétron o Cpd II pode retornar ao estado de repouso, porém na presença de peróxido de hidrogênio o Cpd II pode ser transformado no composto III (Cpd III), que é caracterizado pelo ferro em um estado oxiferroso (O₂-Fe^{II}-heme); o qual pode retornar ao estado de repouso ou levar à inativação da enzima (Figura 10) (GLORIEUX e CALDERON, 2017).

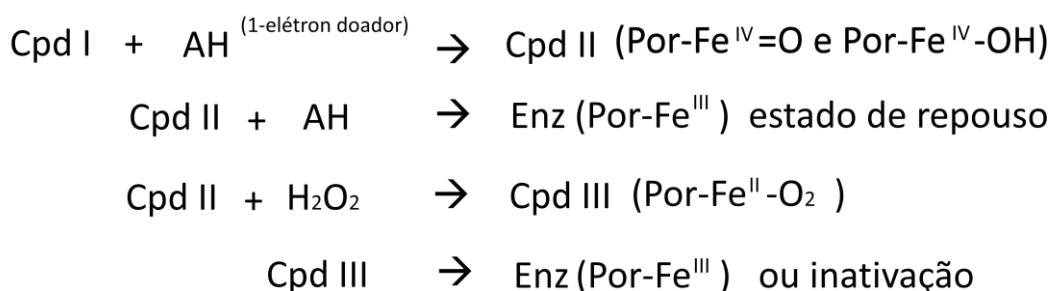


Figura 10: Rea\u00e7\u00f5es de forma\u00e7\u00e3o de Cpd II e Cpd III sofridas pelas catalases (GLORIEUX e CALDERON, 2017).

2.3.2. Catalase humana

A catalase humana possui quatro subunidades id\u00eênticas de 62 kDa, contendo cada uma dom\u00ednios distintos e um grupo heme prost\u00e9tico. Um dom\u00ednio inclui um bra\u00e7o do terminal N contendo uma histidina distal, essencial para a rea\u00e7\u00e3o da catalase; enquanto o outro dom\u00ednio cont\u00e9m oito estruturas β -barris dispostas de maneira antiparalela com seis inser\u00e7\u00f5es helicoidais α , garantindo o n\u00facleo hidrof\u00f3bico necess\u00e1rio para a estrutura tridimensional da enzima; j\u00e1 o terceiro \u00e9 um dom\u00ednio de conex\u00e3o contendo um res\u00edduo de tirosina que liga-se ao grupo heme; e o quarto um dom\u00ednio α -helicoidal, importante para a liga\u00e7\u00e3o ao cofator NADPH (GOYAL e BASAK, 2010).

Ainda que a sequ\u00eancia de amino\u00e1cidos entre todas as catalases verdadeiras n\u00e3o seja id\u00eêntica, a estrutura tridimensional, a estrutura terci\u00e1ria do dom\u00ednio β -barril, o dom\u00ednio de conex\u00e3o e a zona vizinha \u00e0 histidina distal s\u00e3o altamente conservados, enquanto o dom\u00ednio α -helicoidal apresenta moderado grau de conserva\u00e7\u00e3o (GLORIEUX e CALDERON, 2017).

2.3.3. Cin\u00e9tica

A catalase \u00e9 muito eficiente, apresentando taxas de convers\u00e3o de at\u00e9 40 milh\u00f5es de mol\u00e9culas por segundo. As catalases verdadeiras de mam\u00edferos n\u00e3o seguem a cin\u00e9tica de

Michaelis-Menten, pois a enzima não é saturada pelo peróxido de hidrogênio em concentrações viáveis de substrato de até 5,0 M e devido à natureza de duas etapas da reação catalisada (TEHRANI e MOOSAVI-MOVAHEDI, 2018); porém, pode ocorrer a rápida inativação da enzima em concentrações acima de 0,1 M de H₂O₂, quando o complexo da enzima ativa I é convertido nos complexos inativos II ou III (AEBI, 1984).

A reação predominante depende da concentração do substrato envolvido na reação e da concentração de H₂O₂ no sistema. De todo modo, o complexo ativo catalase-H₂O₂ é formado primeiro, e a decomposição de peróxido de hidrogênio na qual a segunda molécula de H₂O₂ serve como doadora de hidrogênio para o complexo I ocorre de maneira extremamente rápida ($k \sim 10^7$ litros.mol⁻¹.s⁻¹); enquanto que as reações peroxidativas ocorrem relativamente lentas ($k \sim 10^2$ - 10^3 litros.mol⁻¹.s⁻¹) (AEBI, 1984).

2.3.4. Inibidores e ativadores

Os ânions cianeto e azida podem ligar-se ao heme e promovem, assim, a inibição irreversível da enzima; eliminando, no caso da azida, também a atividade peroxidática por impedir a formação do composto II a partir do composto I; enquanto outros compostos também inibem a catalase irreversivelmente de forma lenta, como é o caso do surfactante dodecil sulfato de sódio (SDS) e o 2-mercaptoetanol. A lista de inibidores estende-se até a alguns antioxidantes, como alguns flavonoides (TEHRANI e MOOSAVI-MOVAHEDI, 2018).

O nitrogênio do cianeto bloqueia o acesso do heme a outros possíveis ligantes; interagindo com a histidina distal e um resíduo de asparagina, sugerindo que compete com o peróxido de hidrogênio pela ligação ao heme (GLORIEUX e CALDERON, 2017). Trabalhos indicam que compostos como a curcumina induzem mudanças conformacionais na CAT, melhorando a acessibilidade do substrato ao centro catalítico da enzima auxiliando assim no processo de sua ativação. A curcumina apresentou-se através da docagem molecular e da dinâmica molecular estabelecendo ligação de hidrogênio com os resíduos de aminoácidos Gly120 e His254 e provocando aumento de 190 Å no local de acesso do substrato à enzima (TEHRANI e MOOSAVI-MOVAHEDI, 2018).

2.4. *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae é uma espécie de levedura pertencente ao reino dos fungos, sendo um organismo eucarionte unicelular. Esse microrganismo é anaeróbico facultativo, podendo obter energia via respiração ou via fermentação de hexoses. Quando a levedura está frente a uma concentração de açúcares fermentescíveis superior a 0,2% a via de obtenção de energia utilizada é a fermentativa, a rota anaeróbica, onde os açúcares são convertidos a gás carbônico e etanol, sendo este processo denominado de fermentação alcoólica. Por outro lado, quando este organismo encontra-se em meio de concentração de açúcares inferior a 0,2% a via metabólica é a respiração celular, onde os açúcares são convertidos a gás carbônico e água, sendo ativados genes relacionados ao metabolismo aeróbico (MARIS, ASSUMPCÃO, *et al.*, 2001).

O microrganismo *S. cerevisiae* é um organismo celular eucarionte amplamente estudado que apresenta diversas organelas, vias metabólicas e sistemas de defesa antioxidantes similares aos de mamíferos superiores, podendo ser utilizado para diversos experimentos a fim de ampliar a compreensão sobre a natureza de determinadas doenças humanas e animais. A *S. cerevisiae* também possui a enzima catalase como um dos principais componentes de seu sistema de defesa antioxidante, assim como as enzimas superóxido dismutase e glutathione peroxidase; é facilmente manipulada em laboratório e é extremamente favorável para estudos de fenômenos genéticos pelo fato de seu genoma ter sido completamente sequenciado, sendo assim um modelo biológico de estudo de elevado valor (LUSHCHAK, 2006).

Há uma grande importância nos testes *in vivo*, ou seja, empregando células vivas e animais nos ensaios, com o objetivo de manter a inerente complexidade celular na análise (CRUZ, BARBOSA e PINTO, 2004). Devido às características apresentadas pela *S. cerevisiae*, este microrganismo pode ser empregado para estudos antioxidantes (SOARES, ANDREAZZA e SALVADOR, 2004); bem como como modelo de estudos para doenças como Alzheimer (BHARADWAJ, MARTINS e MACREADIE, 2010) e Huntington (HOFER, KAINZ, *et al.*, 2018) a partir da expressão heteróloga de proteínas humanas envolvidas nessas doenças.

O crescimento das células de *S. cerevisiae* segue uma tendência, durante a fase inicial em meio rico em hexoses a levedura cresce exponencialmente por fermentação da glicose disponível no meio de cultura, apresentando como característica elevada taxa de

divisão celular, grande consumo dos açúcares e formação de etanol como produto do processo fermentativo. Quando a glicose torna-se limitante, as células de *S. cerevisiae* têm seu crescimento fermentativo afetado, mudando sua produção de energia para um modo respiratório, sendo esse período de transição conhecido como “deslocamento diáuxico”. Após a troca de metabolismo as células retomam a divisão celular em ritmo mais desacelerado, utilizando o etanol produzido em fases anteriores como fonte de carbono, na fase pós-diáuxica; já com a falta de fontes de carbono para o crescimento celular, as células entram na fase estacionária, onde cessam o crescimento por falta de nutrientes (Figura 11) (LAVOVÁ, URMISKÁ e SILLEROVÁ, 2014).

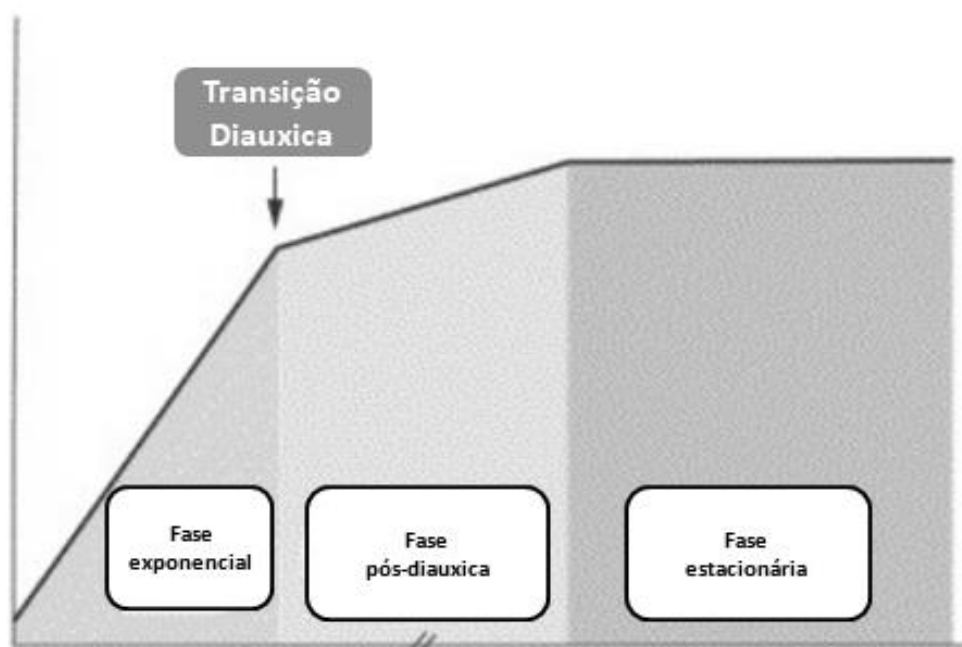


Figura 11: Fases de crescimento de células de *Saccharomyces cerevisiae* (HERMAN, 2002).

2.4.1. Catalase de *Saccharomyces cerevisiae*

S. cerevisiae apresenta duas catalases; uma peroxissômica conhecida como catalase A e uma catalase T citosólica (NISHIMOTO, FURUTA, *et al.*, 2015). A catalase peroxissômica A da levedura *S. cerevisiae* apresenta-se como um tetrâmero com cerca de 515 resíduos de aminoácidos por subunidade, com conformação do núcleo central semelhante a de catalases de organismos afins distantes. Os resíduos polares na proximidade da bolsa heme que estão presentes em todas as sequências da catalase, como os resíduos de aminoácidos

His70, Ser109, Asn143, Arg351 e Tyr355, têm disposições quase idênticas a uma catalase de fígado bovino (MATÉ, ZAMOCKY, *et al.*, 1999).

A catalase citosólica T é uma proteína homotetramérica de aproximadamente 562 aminoácidos (PETROVA, RASHEVA e KUJUMDZIEVA, 2002). A maioria dos aminoácidos da proximidade da porfirina e do ferro heme está conservada entre essa catalase e a catalase de fígado bovino, apresentando homologia de 52,2%, atuando ambas as catalases pelo mesmo mecanismo básico (HARTIG e RUIS, 1986).

2.5. Modelagem molecular

A modelagem molecular é uma ferramenta importante para o estudo da estrutura e propriedades das moléculas. Uma das suas principais aplicações atualmente é o auxílio na descoberta de fármacos, onde através de cálculos esta ferramenta possibilita prever e analisar comportamentos de estruturas moleculares (KORB, FINN e JONES, 2014), possibilitando análises de interações entre ligantes e proteínas (LOEWEN, VILLANUEVA, *et al.*, 2015).

Para o método de cálculo a ser empregado para a modelagem molecular há muitas opções, diferindo quanto às funções usadas para o cálculo de energia. Essas funções podem ser de natureza empírica, como as empregadas em mecânica molecular, ou puramente teórica, passando pelos ditos métodos semi-empíricos, sendo a escolha de métodos determinada pelo compromisso entre precisão dos resultados, tempo necessário para o cálculo e complexidade do sistema analisado (BARREIRO, RODRIGUES, *et al.*, 1997).

A modelagem molecular de uma estrutura possibilita que suas propriedades sejam modeladas com certa facilidade, possibilitando assim a análise das conformações preferenciais da molécula em diferentes condições. Além disso, os cálculos teóricos são utilizados também para avaliar propriedades como os calores de formação, energias eletrônicas, energias dos orbitais de fronteira HOMO (orbital mais energético ocupado) e LUMO (orbital menos energético desocupado), densidades eletrônicas atômicas, energias de ionização, cargas atômicas líquidas, ordens de ligação e momentos de dipolo, dentre outros. As energias do HOMO e do LUMO estão correlacionadas às habilidades de doar e receber elétrons, respectivamente, onde uma maior energia do orbital HOMO está relacionada à maior probabilidade de doar elétron; enquanto que uma menor energia do orbital LUMO está

relacionada a uma maior facilidade em aceitar elétron, podendo assim ser avaliado o potencial de transferência de elétrons de uma molécula (BARREIRO, RODRIGUES, *et al.*, 1997).

A modelagem molecular é um método poderoso para o estudo das correlações estrutura-atividade (FERREIRA, SANTOS, *et al.*, 2015). É possível ainda estudar através dessas técnicas mecanismos de ação de diversos fármacos no nível eletrônico e molecular, possibilitando a partir de estudos de propriedades e interações, um planejamento de novos fármacos numa base racional, com maior seletividade e ação (BARREIRO, RODRIGUES, *et al.*, 1997).

2.5.1. Principais modelos

O método de mecânica molecular está baseado na visão clássica da estrutura molecular, compreendendo as estruturas das moléculas como um conjunto de esferas unidas por molas com constantes de força características. O campo de forças é constituído pelo somatório de termos de energia relacionados às posições de equilíbrio do sistema (distâncias de ligação, ângulos de ligação e diedros, ligações de hidrogênio, interações de Van der Waals, interações eletrostáticas, etc.); às quais são associadas penalidades energéticas pelo seu afastamento. As constantes de força são, em geral, avaliadas por meio de dados de espectroscopia. A principal vantagem é a rapidez para a avaliação de sistemas moleculares complexos (BARREIRO, RODRIGUES, *et al.*, 1997).

Por outro lado, os métodos de mecânica quântica permitem maior precisão nos resultados e fornecem dados sobre a estrutura eletrônica que não é considerada na mecânica molecular. Para isso, uma maior quantidade de tempo e capacidade computacional são exigidos. A maior parte dos métodos quânticos estão baseados no formalismo de orbitais moleculares com abordagens distintas (RYAZANTSEV, NIKOLAEV, *et al.*, 2019).

Nos métodos *ab initio*, um modelo para uma função de onda particular é selecionado e os cálculos realizados sem simplificação, estando o erro associado ao conjunto de bases selecionado e ao nível de tratamento da correlação eletrônica. Os métodos semi-empíricos estão baseados nos mesmos fundamentos, porém com algumas aproximações na resolução das equações fundamentais e empregando parâmetros ajustados a dados experimentais, o que elevou significativamente a velocidade dos métodos baseados em orbitais moleculares. As

múltiplas aproximações desse método permitem simplificar o cálculo, evitando um grande número de integrais, possibilitando a aplicação destes a sistemas com um número maior de átomos (BARREIRO e RODRIGUES, 1997). Os métodos semi-empíricos de orbitais moleculares PM3 (Parametric Method 3), PM6 (Parametric Method 6), PM7 (Parametric Method 7) e RM1 (Recife Model 1) são os mais usados e apresentam algumas diferenças em relação às suas parametrizações (MACHADO, CASTRO e MARINHO, 2016). Outro modelo usado é a Teoria Funcional de Densidade (DFT, do inglês Density Functional Theory), que é um modelo alternativo baseado em orbitais moleculares que existe em versões *ab initio* e semi-empíricas, sendo o modelo do funcional de troca híbrido de 3 parâmetros (B3LYP) um dos modelos mais usados por conta da qualidade dos resultados obtidos, particularmente para moléculas orgânicas (SANT'ANNA, 2009).

2.5.2. Docagem molecular

A docagem molecular, como uma técnica de modelagem molecular, é um método *in silico* (através de simulação computacional) baseado na estrutura das moléculas, amplamente empregado na descoberta de novos medicamentos. A docagem possibilita prever o modo de interação (pose) do par ligante - biomacromolécula alvo (geralmente uma proteína). Muitos esforços têm sido feitos para o aprimoramento desta técnica devido ao seu grande potencial, como a melhoria dos algoritmos de docagem e a superação de suas limitações intrínsecas. As principais limitações desta técnica são uma amostragem restrita das conformações de receptores e ligantes na previsão de pose e o uso de funções de pontuação aproximadas. Porém, esses métodos também podem ser aplicados em conjunto com a dinâmica molecular (DM), a fim de se obter maior refinamento e validação para os complexos modelados *in silico*. A qualidade da previsão da interação ligante – molécula alvo pode ser medida, por exemplo, pela similaridade entre a conformação de ligação prevista na docagem e a estrutura experimentalmente observada de ligantes co-cristalizados à proteína (PINZI e RASTELLI, 2019).

O uso da técnica de docagem molecular ampliou os horizontes de descoberta de medicamentos ou moléculas biologicamente ativas. Devido ao poder de previsão e velocidade da técnica, protocolos de triagem em larga escala adotaram-na para análises como identificação de sítios de ligação à proteínas; identificação de novos alvos moleculares de

ligantes conhecidos; observação de reações adversas a medicamentos; e reconhecimento de ligantes com novos quimiotipos ativos contra um determinado alvo ou um conjunto de alvos desejados (PINZI e RASTELLI, 2019).

Na literatura a docagem molecular tem sido amplamente empregada para o estudo da interação proteína-ligante para diversos tipos de proteínas e ligantes (MEIRA, ALMEIDA e LAVORATO, 2018, NGUYEN, YU e KELLER, 2017, ATANASOVA, YORDANOV, *et al.*, 2015). Um exemplo é o estudo de atividades biológicas de extratos de folhas e galhos de *Glyphaea brevis* e dos componentes majoritários desses extratos, em que foram avaliadas por docagem molecular as possíveis interações entre importantes enzimas do sistema de defesa antioxidante e os ácidos ferúlico e *p*-cumárico, sendo observada interação desses compostos com enzimas como a superóxido dismutase (OLUGBODI, TINCHO, *et al.*, 2019). Outro exemplo é a utilização da docagem molecular num estudo com o composto natural Artepelin C e a proteína Albumina visando analisar a interação entre essas duas moléculas (CHAVES, PIRES, *et al.*, 2019).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

- Analisar a relação antioxidante dos ácidos ferúlico e *p*-cumárico e a enzima catalase de *Saccharomyces cerevisiae*.

3.2. Objetivos específicos

- Determinar qualitativa e quantitativamente o intervalo de concentração não-citotóxico dos ácidos ferúlico e *p*-cumárico em células de *S. cerevisiae*;
- Avaliar o poder antioxidante dos ácidos ferúlico e *p*-cumárico *in vivo*;
- Analisar a interação dos ácidos ferúlico e *p*-cumárico com a catalase;
- Relacionar os dados da atividade e interação dos ácidos *p*-cumárico e ferúlico com a enzima catalase *in vivo* e *in silico*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Materiais

4.1.1. Meios de cultura

Para a realização dos experimentos *in vivo* foram utilizados os meios de cultura YPD 2% líquido composto por 1% de extrato de levedura (Difco, EUA), 2% de peptona (Difco, EUA) e 2% de glicose (Vetec, Brasil); meio YPD líquido de concentração dobrada constituído de 2% de extrato de levedura, 4% de peptona e 4% de glicose e meio YPD 2% sólido formado por 1% de extrato de levedura, 2% de peptona, 2% de glicose e 2% ágar (Difco, EUA) empregado para solidificar o meio. Os meios de cultivo celular líquido e sólido, bem como materiais específicos dos experimentos, foram esterilizados em autoclave a 121 °C por 15 minutos.

4.1.2. Microrganismos

Neste estudo foram utilizadas duas cepas de *Saccharomyces cerevisiae*; uma cepa controle (BY4741) com seu genoma *MATa*; *his3Δ1*; *leu2Δ0*; *met15Δ0*; *ura3Δ0* intacto; e outra mutante (*Actt1*), deficiente no gene que codifica a enzima catalase citosólica, com genótipo idêntico ao da cepa BY4741, exceto por *YGR088w::kanMX4*. As cepas foram adquiridas através da companhia Euroscarf (<http://www.euroscarf.de/>), em Frankfurt, na Alemanha; e armazenadas em meio sólido YPD 2% a 4 °C.

4.1.3. Repique

Os repiques foram preparados por meio da transferência de alçada de cultura estoque do microrganismo para uma superfície de ágar contendo YPD 2% sólido inclinado em um tubo *viale*, e incubação a 28 °C por 24 horas em estufa incubadora refrigerada (BOD, Marca SOLAB®); sendo nos meios de armazenamento da cepa mutante adicionado geneticina (0,02%), uma vez que a mutação confere resistência a este antibiótico.

4.1.4. Inóculo

No preparo do inóculo, uma alçada com células do repique fresco foi transferida para o erlenmeyer contendo meio de cultura YPD líquido estéril. O inóculo foi incubado a 28 °C por 22 horas sob agitação de 160 rpm em incubadora tipo shaker (Incubadora orbital refrigerada, Marca NOVATECNICA®). Após o crescimento das células a concentração do meio de cultura foi determinada através da medida da absorvância em espectrofotômetro (UV/Vis, Marca Biospectro®) a 570 nm de uma suspensão celular convertida em massa de célula (mg de peso seco de células/mL de meio de cultura). O inóculo somente foi utilizado para o experimento quando a concentração celular atingia aproximadamente 2,00 mg.mL⁻¹, para garantir que as células do microrganismo estivessem na segunda fase de crescimento exponencial.

4.1.5. Preparo das soluções das substâncias analisadas

O ácido ferúlico e o ácido *p*-cumárico foram adquiridos pela Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim, Alemanha). As amostras de ácido ferúlico e *p*-cumárico foram pesadas e 0,0100 g de cada sólido foi diluída em 5,0 mL de solução de dimetilsulfóxido (DMSO) 50% em água destilada estéril, resultando em solução final de concentração 2000 µg.mL⁻¹.

A concentração do solvente DMSO não-tóxica às leveduras é de até 3% (SADOWSKA-BARTOSZ, PACZKA, *et al.*, 2013), sendo obedecida essa concentração máxima neste trabalho.

4.2. Métodos

4.2.1. Fator de conversão

Inicialmente preparou-se um inóculo a partir da transferência de uma alçada de repique fresco em 100 mL de meio YPD líquido 2% estéril. Após 24 h de incubação sob agitação a 160 rpm em shaker a 28 °C, uma alíquota de 10 mL foi transferida para tubo tipo falcon previamente tarado e reservou-se. Em seguida, efetuou-se diluições em água 1:10, 1:25, 1:50, 1:100, 1:200 e 1:250 do inóculo crescido, e as absorvâncias foram lidas em espectrofotômetro a 570 nm. A alíquota de 10 mL reservada foi centrifugada a 5000 rpm por

10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet (precipitado) lavado duas vezes com água estéril destilada. O sobrenadante foi descartado e o tubo de ensaio foi colocado em estufa a 60 °C por 72 h. A partir da massa de células obtida contida nos 10 mL de meio líquido foi calculada a concentração inicial do inóculo; e, com as absorvâncias das diluições, foi construída uma curva padrão e extraído o fator de conversão de absorvância em concentração (mg.mL^{-1}).

4.2.2. Toxidez das amostras

De um meio líquido de concentração dobrada foram transferidos 100 μL para todos os poços das linhas A e B em uma placa de cultivo celular de 96 poços; além dos dois primeiros poços da coluna H. O primeiro poço das linhas A e B recebeu 100 μL do inóculo e soluções das substâncias ácido ferúlico e ácido *p*-cumárico, permanecendo a uma concentração de 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ dos ácido ferúlico e *p*-cumárico nos poços iniciais em A e B, respectivamente. Esses primeiros poços foram homogeneizados e a partir disso foram sendo transferidos volumes de 100 μL de um poço para o seguinte, sempre homogeneizando; de modo que o poço seguinte tivesse sempre metade da concentração do poço anterior.

Ao longo dos 10 poços de cada linha (A e B) as concentrações de exposição foram de 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ à 1,95 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Após o preparo do experimento, a placa de 96 poços ficava em ambiente estéril até completar 24 h e ser adicionada uma solução do corante azul resazurina 1,0 % em água (coloração azul), que em contato com metabolismo celular ativo alterna para a coloração rosa, caracterizando a faixa de concentração que apresenta toxicidade às células. Após 20 min foi possível a visualização dos resultados.

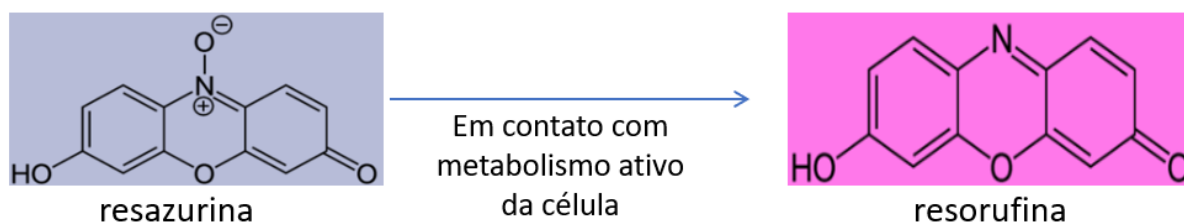


Figura 12: Reação de mudança de coloração da resazurina quando em contato com produtos do metabolismo celular.

4.2.3. Atividade antioxidante por sobrevivência celular

Do inóculo foi transferido um volume de meio correspondente a 50 mg de células para erlenmeyers de 125 mL, sendo classificados quanto à cepa de origem e às substâncias para incubação. Um total de oito tratamentos foram utilizados contendo as cepas de *S. cerevisiae*, sendo quatro com para a cepa BY4741 e quatro para a cepa mutante *Actt1*. Inicialmente, dois dos tratamentos (controle negativo e controle positivo) não receberam nada além de meio contendo 50 mg de células; um tratamento recebeu solução de ácido ferúlico e o outro solução de ácido *p*-cumárico, ambos a uma concentração de 10 µg.mL⁻¹, sendo esse padrão de montagem dos quatro tratamentos executada para cada uma das duas cepas analisadas. Após a adição das substâncias foi realizada incubação por 1 h. Na sequência foi realizada centrifugação das amostras a 5000 rpm por 10 minutos (centrífuga SI-700, Marca Solab Científica) e lavagens com 20 mL de água estéril, por duas vezes. As amostras foram ressuspensas em 20 mL de tampão fosfato de sódio de concentração 0,5 mM e pH 7,0 e todas as amostras, com exceção dos controles negativos, foram tratadas com a concentração de 2,0 mM de H₂O₂ por mais 1 h.

Após o tempo de tratamento, alíquotas das suspensões celulares correspondentes a 40 µg de células foram diluídas em 1 mL de água destilada estéril, sendo posteriormente misturados 10 µL desta suspensão celular diluída com 10 µL de uma solução do corante azul de metileno em água destilada (10% p/v) e levada a mistura para leitura em microscópio (Marca Astral Científica) na câmara de Neubauer, onde 10 µL da mistura foram transferidos para a observação no aparelho. Os quatro quadrantes das extremidades foram utilizados para a contagem de células e foi feita a quantificação de células vivas.

4.2.4. Atividade da enzima catalase

Assim como para o experimento com o azul de metileno, as células cresceram por aproximadamente 24 h; e um volume de inóculo correspondente a 50 mg de células foi transferido para erlenmeyers de 125 mL para a realização dos tratamentos. O controle negativo e o controle positivo compreendiam apenas a suspensão celular no primeiro momento; enquanto outros quatro erlenmeyers receberam as soluções com os ácidos, dois receberam o ácido ferúlico e dois o ácido *p*-cumárico. A incubação com esses tratamentos ocorreu por 1 h a 28 °C/160 rpm, e após esse período todos os tratamentos foram retirados e

seus conteúdos transferidos para tubos tipo falcon estéreis e centrifugados a 5000 rpm por 5 minutos. A suspensão celular foi lavada duas vezes com água destilada gelada estéril.

As células foram ressuspensas em 20 mL de tampão fosfato de sódio (0,05 M, pH 7,0) e em seguida transferidas para os erlenmeyers de 125 mL anteriores, sempre em ambiente estéril. O peróxido de hidrogênio foi adicionado na concentração de 2,5 ou 0,5 mM aos erlenmeyers referentes ao controle positivo e aos ácidos de acordo com o experimento realizado, e a incubação foi mantida novamente por 1 h sob agitação e temperatura controlados. Após o estresse foi repetido o processo de lavagem das células, sendo essas ressuspensas em 0,5 mL de tampão fosfato de sódio pH 7,0 e transferidas para tubo de ensaio de parede grossa. Adicionou-se a esse tubo 1,5 g de pérolas de vidro (40 μ m) e as células foram lisadas sob agitação vigorosa com 3 ciclos de 1 minuto no vórtex (agitador de tubos, Marca Gehaka®) alternados com 1 minuto no gelo. O extrato foi recolhido em tubos do tipo eppendorfs e as pérolas de vidro lavadas com 0,4 mL de tampão fosfato de sódio com o sobrenadante recolhido nos mesmos eppendorfs. Após a lise celular, os extratos celulares passaram por uma centrifugação a 3000 rpm por 5 min, onde o sobrenadante foi coletado e utilizado para a quantificação da atividade da catalase.

Do extrato celular foram recolhidos 100 μ L para serem diluídos em 900 μ L de água destilada estéril e adicionou-se 100 μ L desta diluição a 3,9 mL do mesmo tampão. Desta mistura foi retirado 100 μ L para serem misturados a 36 μ L de H₂O₂ 3,0 M; e a partir disso, observou-se o decréscimo de absorvância em espectrofotômetro no comprimento de onda de 240 nm durante 3 min.

A partir de uma curva padrão previamente construída para H₂O₂ pode-se correlacionar a concentração de H₂O₂ à absorvância, permitindo que fosse analisada a variação da concentração do substrato na amostra e, assim, inferir a velocidade de catálise da enzima catalase. Alíquotas de 100 μ L do extrato diluído também foram adicionados a 4,5 mL de reagente de biureto e as absorvâncias mensuradas a 550 nm para, a partir de uma curva padrão previamente construída, dosar as quantidades de proteínas em cada tratamento; e, com a divisão da velocidade de catálise observada pela quantidade de proteína da amostra, determinar a atividade da enzima.

4.2.5. Modelagem molecular

As moléculas do ácido ferúlico e do ácido *p*-cumárico foram construídas e otimizadas com o programa Spartan'14 (Wavefunction Inc.) através do cálculo DFT (B3LYP) com o conjunto de base 6-31G*, enquanto a estrutura 3D da enzima catalase de *Saccharomyces cerevisiae* (código 1A4E) foi obtida através do banco de dados PDB (Protein Data Bank). A análise da interação da enzima com os ligantes foi estudada por docagem molecular através do programa GOLD 5.4 (CCDC Ltd.). Os resultados para a interação enzima-ligante foram comparados com a molécula de guaiacol, adotada como padrão comparativo por ter sido co-cristalizada à estrutura da catalase de *Bacillus pumilus* (código 4QOQ) adquirida do PDB (LOEWEN, VILLANUEVA, *et al.*, 2015). Inicialmente foi realizada a redocagem do guaiacol na catalase de *B. pumilus* no sítio do Asp110 para a seleção da função mais adequada. A função CHEMSCORE mostrou-se a mais adequada (RMSD = 1,0265) para a realização da docagem do guaiacol no sítio do Asp110 da catalase, assim como a cavidade de 10 Å foi adotada como a mais apropriada para a docagem dos ligantes aqui estudados.

Foi utilizada a plataforma PLIP (<https://plip-tool.biotec.tu-dresden.de/plip-web/plip/index>) para a análise e identificação dos resíduos de aminoácidos envolvidos nas interações enzima-ligante. A partir da identificação dos resíduos de aminoácidos envolvidos nas interações com os ligantes, os resíduos de aminoácidos Asp123, Gln163, Val111, Phe148, Phe149, Phe156, Phe159 e Ile160 foram empregados com liberdade conformacional em novas docagens moleculares, em separado e também com todos flexíveis ao mesmo tempo.

4.2.6. Análise estatística

Os resultados foram apresentados na forma de uma média e desvio padrão de três experimentos independentes, no mínimo. Por meio do PRISMA 8 foi aplicado o teste de análise de variância ANOVA seguido do teste de Tuckey para a comparação entre os resultados gerados das diversas médias. A diferença foi considerada estatisticamente significativa quando $p < 0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Toxicidade dos ácidos ferúlico e *p*-cumárico em *S. cerevisiae*

Neste trabalho os ácidos ferúlico e *p*-cumárico foram estudados quanto a seus efeitos de proteção celular e, para melhor interpretação dos resultados, a concentração destes compostos empregados nos testes não deveria apresentar significativa toxicidade às células de *Saccharomyces cerevisiae*. A fim de verificar em que faixas de concentrações as substâncias ácido ferúlico e ácido *p*-cumárico não seriam tóxicas às células de *S. cerevisiae* foi realizado o ensaio com o corante resazurina, onde células expostas a diferentes concentrações dos ácidos fenólicos receberam uma solução de resazurina. O metabolismo ativo das células promove a conversão de resazurina (coloração azul) a resorufina (coloração rosa) e esta reação possibilita a análise da toxicidade dos ácidos a partir da visualização da coloração (Figura 13). É relevante destacar que a coloração do meio de cultura afetou a coloração apresentada pelo reagente resazurina, sendo observado comparativamente aos poços controle que a coloração laranja claro estava associada a não toxidez e o marrom a toxidez.

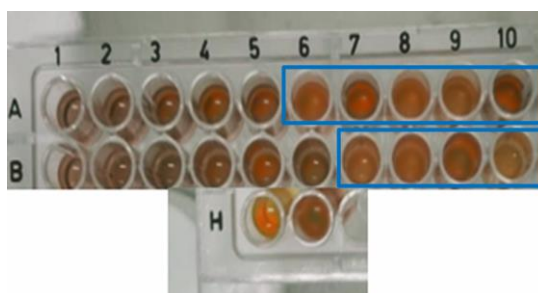


Figura 13: Teste de toxicidade com a resazurina. Diferentes concentrações de ác. Ferúlico (A) e ác. *p*-cumárico (B). Poços controle com células com metabolismo ativo (H6) e sem células (H7).

A partir das colorações obtidas para os tratamentos nos poços da placa de 96 poços pôde-se analisar a toxicidade dos compostos ácidos ferúlico e *p*-cumárico, sendo a linha A usada para a análise da toxicidade do ácido ferúlico e a linha B usada para a análise da toxicidade do ácido *p*-cumárico. Comparando com os poços controle pode-se identificar a coloração apresentada para células sob condições normais (H5) e a coloração relacionada à ausência de células com metabolismo ativo (H6). Para melhor visualização dos resultados deste teste, foi construída uma tabela relacionando a concentração dos ácidos ferúlico e *p*-cumárico com a toxicidade observada (Tabela 1).

Tabela 1: Resultado do ensaio de toxidez das amostras no ensaio da resazurina: (++) alta toxidez, (+) moderada toxidez e (-) baixa ou toxidez inexistente.

<i>Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)</i>	<i>Nível de toxidez Ác. ferúlico</i>	<i>Nível de toxicidade Ác. <i>p</i>-cumárico</i>
1000	+	+
500	+	+
250	+	+
125	+	+
62,5	+	+
31,25	-	+
15,625	-	-
7,81	-	-
3,91	-	-
1,95	-	-

Os ensaios sugerem que abaixo de $15,625 \mu\text{g.mL}^{-1}$ nenhuma das duas substâncias apresenta toxidez às células de *S. cerevisiae* (Tabela 1). Em estudos com células humanas o ácido ferúlico na concentração de $300 \mu\text{g.mL}^{-1}$ não mostrou toxicidade (CHOI, PARK, *et al.*, 2018), enquanto o ácido *p*-cumárico só apresentou-se tóxico em concentrações superiores a $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em células humanas (SOARES, BONACORSIB, *et al.*, 2011); estando esses dados relacionados com os observados neste estudo ao indicarem que esses ácidos fenólicos não são tóxicos em concentrações de até $15,625 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Nesse caso, foi selecionada a concentração de $10,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$, ou seja, $51,5 \mu\text{M}$ de ácido ferúlico e $61,0 \mu\text{M}$ de ácido *p*-cumárico, para ser utilizada nos ensaios seguintes, uma vez que esta não mostrou-se tóxica às células de levedura para ambos os ácidos.

5.2. Potencial antioxidante dos ácidos ferúlico e *p*-cumárico

A fim de verificar a capacidade antioxidante dos ácidos ferúlico e *p*-cumárico foi realizado ensaio de sobrevivência celular com o corante azul de metileno. Neste ensaio, as células de *Saccharomyces cerevisiae* podem ser visualizadas em microscópio e células mortas apresentam-se na coloração azul porque o reagente azul de metileno entra nas células por conta dos poros na membrana celular gerados pelas lesões ocasionadas pelo estresse oxidativo gerado pelo peróxido de hidrogênio, possibilitando deste modo a contagem de células vivas e mortas. O teste com corante azul de metileno permitiu averiguar se as substâncias ácido

ferúlico e ácido *p*-cumárico impactariam na sobrevivência de células eucarióticas frente ao estresse causado por peróxido de hidrogênio (2,0 mM) (Figura 14).

Havia a expectativa de que este ensaio revelasse um efeito antioxidante dos ácidos *p*-cumárico e ferúlico, pois dados da literatura somados à estrutura química desses compostos propiciaram a geração dessa hipótese. A presença de hidroxilas fenólicas é importante para efeitos antioxidantes associados à estabilização de espécies reativas; e a existência de grupamento ácido nas estruturas aliado a uma dupla ligação conjugada com o anel fenólico intensifica este poder antioxidante (DEGÁSPARI e WASZCZYNSKYJ, 2004); podendo resultar em proteção antioxidante às células.

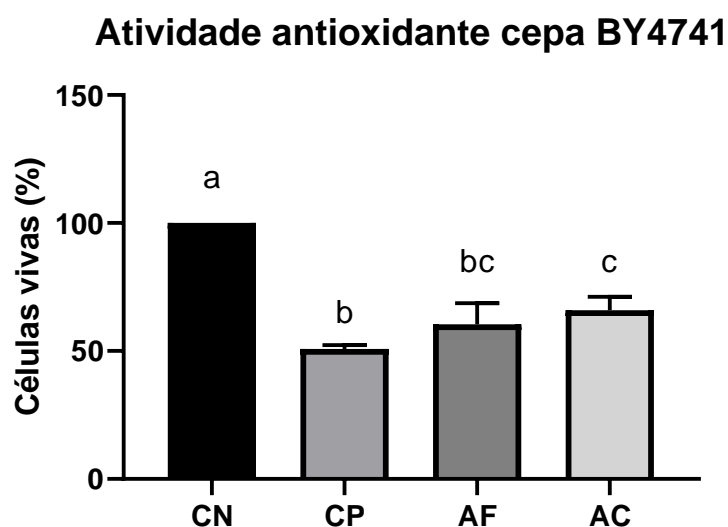


Figura 14: Percentual de células vivas da cepa BY4741 no ensaio com a substância azul de metileno após estresse com H₂O₂ (2,0 mM). CN: controle negativo, CP: controle positivo, AF: ácido ferúlico e AC: ácido *p*-cumárico.

Os resultados revelaram que o ácido *p*-cumárico na concentração de 10,0 µg.mL⁻¹ foi capaz de proteger significativamente as células de danos oxidativos, resultando no aumento do número de células vivas quando comparado ao tratamento só com o agente estressor (H₂O₂) (Figura 14). No tratamento com a solução de ác. *p*-cumárico a média de células vivas foi de 65,92 ± 5,21%, enquanto no controle positivo a média foi de 50,81 ± 1,52%; já o resultado obtido para o tratamento com o ácido ferúlico não resultou em diferença estatística em relação ao ácido *p*-cumárico e nem ao controle positivo, apresentando média de 60,48 ± 8,26%.

No sentido de avaliar possíveis influências dos ácidos ferúlico e *p*-cumárico numa cepa ausente em catalase em condições de estresse oxidativo, também foi realizado o mesmo ensaio com o reagente azul de metileno para a cepa $\Delta ct1$. Esse experimento conta com uma cepa mais sensível, uma vez que cepas deficientes na catalase como a $\Delta ct1$ comumente apresentam maior sensibilidade ao estresse oxidativo (MARTINS e ENGLISH, 2014). Do mesmo modo, um estudo observou que a cepa $\Delta gsh1$ (deficiente em glutatona) de *S. cerevisiae* é mais sensível ao estresse causado por peróxido de hidrogênio que a cepa controle (BY4741), reforçando que a ausência de componentes da defesa antioxidante afeta a resistência das células ao estresse oxidativo (MARTINS, FRANÇA, *et al.*, 2021).

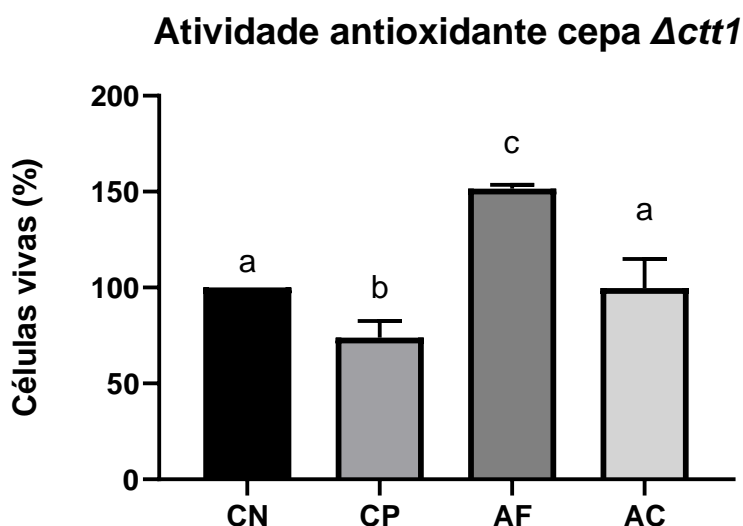


Figura 15: Percentual de células vivas da cepa $\Delta ct1$ no ensaio com substância azul de metileno após estresse com H_2O_2 (2,0 mM). CN: controle negativo, CP: controle positivo, AF: ácido ferúlico e AC: ácido *p*-cumárico.

Nesta cepa deletada em catalase observou-se ambos os ácidos promoveram proteção celular, resultando no aumento do número de células vivas em relação ao controle positivo; onde o ácido ferúlico, o ácido *p*-cumárico e o controle positivo apresentaram médias de $151,60 \pm 2,07\%$, $99,68 \pm 15,23\%$ e $73,96 \pm 8,54\%$ de células vivas, respectivamente. O ácido ferúlico apresentou resultados melhores que o controle negativo na cepa $\Delta ct1$, extrapolando em mais de 50% o resultado obtido para o controle negativo adotado como 100% (células não estressadas) (Figura 15).

Existem vários estudos envolvendo a avaliação antioxidante de substâncias naturais ou sintéticas utilizando cepas mutantes da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, como por exemplo soluções de própolis com elevado teor fenólico (25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) que foram capazes de reduzir drasticamente danos oxidativos gerados pela indução de estresse oxidativo, elevando a sobrevivência celular em mais de 50%; sendo este efeito acentuado em cepas mutantes em genes de enzimas envolvidas na defesa antioxidante como, Δgsh1 (deficiente no tripeptídeo glutatona) e as cepas Δgtt1 e Δgtt2 (deficientes nas enzimas glutatona s-transferase 1 e glutatona s-transferase 2, respectivamente) (DE SÁ, DE CASTRO, *et al.*, 2013). Neste mesmo estudo os extratos provocaram diminuição nos níveis de peroxidação lipídica, com redução de cerca de 20% da peroxidação lipídica na cepa BY4741, cerca de 10% na cepa Δgsh1 e superior aos 20% na cepa Δctt1 ; estando esses resultados de acordo com os observados neste trabalho, onde o pré-tratamento com os ácidos fenólicos não só foi capaz de elevar a sobrevivência celular frente a indução de estresse oxidativo como também o efeito foi percentualmente mais destacado na cepa mutante (Δctt1).

O tratamento das células de *S. cerevisiae* com ácidos fenólicos pode estar induzindo a expressão de enzimas antioxidantes e diminuindo a quantidade de compostos oxidantes no ambiente celular, e isto pode estar impactando na capacidade das células de se defenderem do estresse causado pela exposição ao H_2O_2 e, conseqüentemente, na sobrevivência celular; especialmente para a cepa mutante em catalase (Δctt1). Como foi observado por JO, YOUN, *et al.*, 2019, o pré-tratamento de células de linhagem celular de ratos (HEI-OC1) com ácido ferúlico provoca redução nos níveis de EROs detectado por citometria de fluxo e diminuição no percentual de apoptose detectado pelo ensaio TUNEL frente ao estresse gerado por cisplatina, além do tratamento com ácido ferúlico ter induzido um aumento de aproximadamente 2 vezes na expressão de mRNA de enzimas antioxidantes como catalase e a superóxido dismutase 2.

Derivados de ácidos fenólicos como o CAPE também tem sido relatados com efeito de indução da expressão de enzimas antioxidantes importantes, como no estudo em que o CAPE na concentração de 10 μM foi capaz de provocar aumento de 3 vezes na expressão da enzima superóxido dismutase 3 em células humanas (OHASHI, YASUDA, *et al.*, 2017).

Para a melhor visualização dos impactos do tratamento com os ácidos ferúlico e *p*-cumárico sob a sobrevivência celular em cada cepa (BY4741 e Δctt1), os resultados foram

plotados em um gráfico como aumento percentual na sobrevivência celular para cada ácido fenólico aqui analisado (Figura 16).

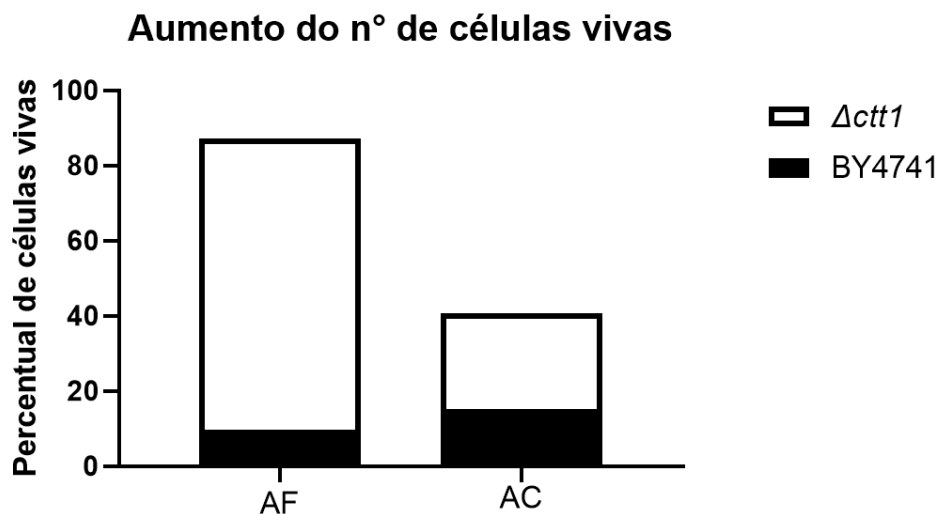


Figura 16: Comparativo entre a atividade antioxidante das cepas no ensaio de sobrevivência. CN: controle negativo, CP: controle positivo. AF: ácido ferúlico e AC: ácido *p*-cumárico. O aumento percentual do número de células vivas foi obtido a partir da diferença entre os percentuais de células vivas de cada tratamento (AF e AC) e o percentual de células vivas no controle positivo da respectiva cepa.

Comparando-se os resultados de ambas as cepas, pode-se observar que a sobrevivência celular dos tratamentos com as soluções dos ácidos ferúlico e *p*-cumárico na concentração de $10,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ foram maiores na cepa mutante em catalase (*Δctt1*) para ambos os ácidos fenólicos (Figura 16), sendo este efeito mais destacado para o ácido ferúlico que apresentou aumento no número de células vivas 8 vezes maior na cepa *Δctt1* do que na cepa BY4741. Este resultado indica que o ácido ferúlico é mais eficiente que o ácido *p*-cumárico na proteção celular da cepa *Δctt1*, reduzindo o número de mortes causadas pelo H_2O_2 em células sem a expressão da catalase. Como os resultados de sobrevivência celular em ambas as cepas é impactado positivamente pelos ácidos fenólicos (Figuras 14 e 15), sendo mais destacado na cepa mais sensível (*Δctt1*), é indicado que o possível efeito destes compostos sobre a enzima catalase não é o efeito mais importante no ponto de vista da sobrevivência celular.

Na literatura tem sido relatado que os níveis de ácidos fenólicos estão positivamente relacionados com a proteção contra o estresse oxidativo e isso foi observado também num estudo empregando chás de ervas e chás verdes em células de *Saccharomyces cerevisiae*;

onde através do ensaio de tamanho do halo, soluções de ervas com elevada composição de fenólicos apresentaram proteção celular contra o H₂O₂ (LI, WANG e LUO, 2018).

Em outro estudo com *S. cerevisiae* tanto o ácido ferúlico quanto o ácido *p*-cumárico empregados na concentração de 50 µg.mL⁻¹ não promoveram redução significativa do nível de oxidação intracelular (CIGUT, POLAK, *et al.*, 2011), divergindo dos dados observados neste trabalho quanto à proteção antioxidante; podendo esta divergência ser explicada pelo fato de serem ensaios que determinam parâmetros diferentes. A oxidação intracelular visa avaliar o ambiente intracelular quanto à capacidade antioxidante dos ácidos, ou seja, determina como o tratamento com os ácidos impacta na homeostase redox das células, enquanto o ensaio realizado neste trabalho avaliou a sobrevivência celular causada pela proteção antioxidante dos ácidos. Com isso, existe a hipótese de que os ácidos fenólicos podem estar afetando as cascatas reacionais relacionadas a danos oxidativos e impedindo a morte celular, sem necessariamente impactar significativamente no nível oxidante do ambiente intracelular.

O ácido *p*-cumárico (5,0 mM) foi capaz de reduzir significativamente a quantidade de EROs e aumentar a sobrevivência do microrganismo *Caenorhabditis elegans* sob estresse oxidativo (YUE, SHEN, *et al.*, 2018); e quando foi avaliado quanto à capacidade antioxidante em linhagem celular de ratos (PC12) sob estresse oxidativo a uma concentração de 250 µg.mL⁻¹ houve aumento na viabilidade celular e supressão da geração de EROs intracelular, sendo esses dados coerentes com os resultados observados neste estudo ao relacionar este ácido fenólico ao aumento da sobrevivência celular frente ao estresse oxidativo (SHEN, SONG, *et al.*, 2019).

O ácido ferúlico em concentrações de 50 e 100 µM também mostrou-se capaz de aumentar a viabilidade e reduzir a quantidade de EROs em linhagem celular de ratos (PC12) estressada com Na₂S₂O₄ (REN, ZHANG, *et al.*, 2017), estando estes dados também de acordo com os resultados apresentados neste trabalho para a sobrevivência celular sob estresse oxidativo gerado por H₂O₂, pois apesar de os ensaios de sobrevivência celular, níveis de EROs e viabilidade celular serem ensaios diferentes e os modelos celulares utilizados (*S. cerevisiae* e PC12) também serem distintos, ambos os trabalhos indicam que este ácido fenólico propicia proteção antioxidante que impacta na vida celular nos diferentes modelos de estudo.

O ácido cafeico apresenta estrutura química muito similar a dos ácidos ferúlico e *p*-cumárico e suas propriedades antioxidantes são bem conhecidas e estabelecidas, tanto que em muitas pesquisas ele é utilizado como padrão antioxidante para estudos envolvendo outros fenólicos. O ácido cafeico na concentração de 30 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ é capaz de inibir em cerca de 70% a peroxidação lipídica; além de combater cerca de 90% das espécies radiculares no ensaio do ABTS *in vitro* na concentração de 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; sendo inclusive responsável pela ação quelante de íons ferro diminuindo o risco do aumento de EROs (GÜLÇIN, 2006). Diante deste contexto de ácidos fenólicos apresentarem diferentes efeitos de proteção celular frente a espécies oxidantes, seguiu-se para análises dos efeitos dos ácidos fenólicos deste estudo sobre a enzima catalase.

5.3. Análise da influência dos ácidos ferúlico e *p*-cumárico na atividade catalásica sob estresse oxidativo mais severo

Com a finalidade de observar o impacto dos tratamentos com os ácidos ferúlico e *p*-cumárico na atividade da enzima catalase, foram realizados ensaios de quantificação da atividade enzimática desta enzima em células de *S. cerevisiae*. Em espectrofotômetro pôde-se observar a variação da absorvância relacionada a degradação de H_2O_2 por parte desta enzima, e assim determinar a atividade catalásica (Figura 17). Quando sob elevado estresse oxidativo as células podem sofrer danos graves em estruturas biológicas e, por consequência, serem levadas à morte. A atividade da enzima catalase também é afetada por este estresse e, por isso, em condições de elevado estresse oxidativo (exposição das células a concentrações acima de 0,8 mM de H_2O_2) os ensaios podem detectar redução da atividade enzimática. É indicado que em concentrações próximas de 2,0 mM de H_2O_2 a atividade da catalase diminua drasticamente (MARTINS e ENGLISH, 2014). Por isso, a atividade da catalase foi avaliada quando a célula foi submetida a uma concentração elevada de peróxido de hidrogênio (2,5 mM), promovendo um maior estresse às células com o objetivo de avaliar se os ácidos impactam na atividade catalásica sob esta condição.

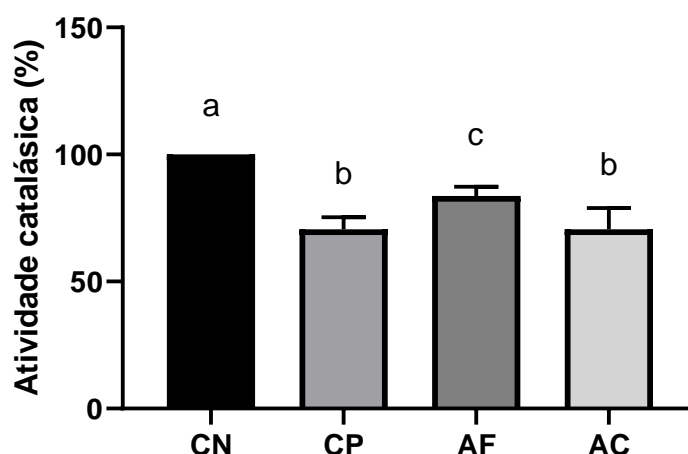


Figura 17: Atividade percentual da catalase na cepa BY4741 em células sob estresse com H₂O₂ (2,5 mM). CN: controle negativo, CP: controle positivo, AF: ácido ferúlico e AC: ácido *p*-cumárico.

Com os resultados obtidos foi possível observar que o ácido ferúlico possibilitou um aumento na atividade da enzima quando comparado ao controle positivo (estressado) (Figura 17), sendo obtidas atividades de $70,58 \pm 4,69\%$, $83,67 \pm 3,66\%$ e $70,61 \pm 8,32\%$, para o controle positivo, ácido ferúlico e ácido *p*-cumárico, respectivamente em relação ao controle negativo (100%). Possivelmente este efeito está relacionado ao menor dano oxidativo devido à proteção gerada pelo tratamento com o ácido ferúlico, corroborando o que foi observado no ensaio com o azul de metileno (Figuras 14 e 15). O tratamento com este ácido fenólico foi capaz de reverter parte da redução da atividade da enzima gerada pela condição oxidativa extrema.

Em um trabalho usando *S. cerevisiae* foi observado que a atividade da catalase sob efeito de H₂O₂ pode aumentar ou diminuir em comparação com a atividade de células não tratadas com o peróxido de acordo com a concentração aplicada, estando a indução da atividade da catalase correlacionada com a sobrevivência celular. Em concentrações mais altas desse agente estressor (acima de 0,8 mM de H₂O₂) foi demonstrado que as células de levedura sofreram maiores danos, provocando redução da viabilidade celular em mais de 50%; e, por consequência, a atividade enzimática observada apresentou-se diminuída em comparação com o controle negativo (MARTINS e ENGLISH, 2014), assim como nos dados aqui apresentados.

Em estudo com ratos observou-se que o ácido rosmarínico que apresenta estrutura similar a do ácido *p*-cumárico dentro de sua estrutura química foi capaz de elevar significativamente a expressão da enzima SOD (cerca de 10%) prejudicada pela exposição ao agente estressor selenito (TSAI, WU e HSU, 2019). Em modelo de estudo de Parkinson com ratos o tratamento com o ácido ferúlico também apresentou efeito de restauração parcial da atividade das enzimas superóxido dismutase em 3 vezes e da catalase em 30%, sendo significativamente maior a atividade no grupo tratado com este ácido fenólico que no grupo apenas exposto ao agente estressor (HAQUE, JAVED, *et al.*, 2015). Estes dados indicam um potencial por parte dos ácidos fenólicos de estimular defesas antioxidantes, podendo isto explicar como o ácido ferúlico foi capaz de propiciar aumento significativo na atividade da enzima catalase em relação ao controle positivo sob estresse oxidativo causado por H₂O₂ (2,5 mM) no presente estudo.

5.4. Atividade catalásica na presença dos ácidos ferúlico e *p*-cumárico sob estresse oxidativo mais brando

Para possibilitar uma melhor compreensão da influência dos ácidos ferúlico e *p*-cumárico sob a atividade da enzima catalase de célula eucariótica, o mesmo ensaio de atividade catalásica foi realizado com a exposição das células a uma concentração menor de H₂O₂ (0,5 mM) e sem exposição ao H₂O₂ (Figura 18).

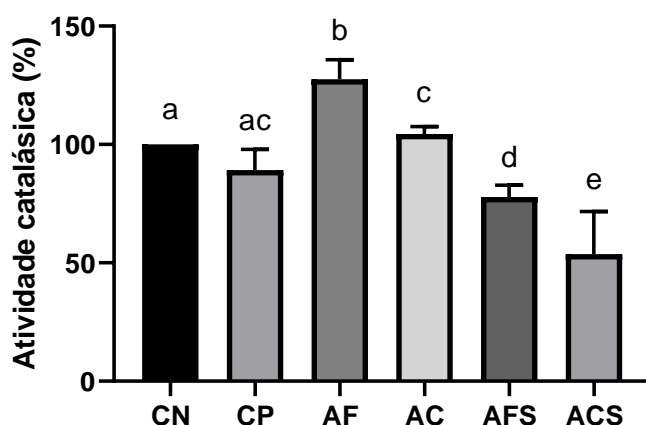


Figura 18: Atividade percentual da catalase na cepa BY4741 em células sob estresse com H₂O₂ (0,5 mM). CN: controle negativo, CP: controle positivo, AF: ácido ferúlico, AC: ácido *p*-cumárico, AFS: ácido ferúlico sem tratamento com H₂O₂ e ACS: ácido *p*-cumárico sem tratamento com H₂O₂.

Em condição mais branda de estresse oxidativo (0,5 mM de H₂O₂) os controles negativo e positivo não apresentaram diferença significativa entre si apresentando atividade catalásica de $89,21 \pm 8,76\%$ e 100% para o controle positivo e controle negativo, respectivamente, (Figura 18) possivelmente por conta dos danos celulares terem afetado um possível aumento de atividade aparente da enzima, como também observado na situação de alto estresse com peróxido na concentração de 2,5 mM (Figura 17). Como consequência disto, uma vez que os tratamentos com os ácidos fenólicos protegem as células dos danos oxidativos celulares, e eleva o número de células vivas como observado no experimento com o azul de metileno (Figuras 14 e 15), a atividade da enzima é elevada para além da atividade registrada para o controle negativo (células sem estresse) e, especialmente o ácido ferúlico foi capaz de provocar a detecção de aumento na atividade da enzima, com médias de atividade de $127,52 \pm 8,29\%$ para este ácido fenólico e $104,40 \pm 3,11\%$ para o ácido *p*-cumárico.

Nos tratamentos somente com os ácidos fenólicos sem as células serem submetidas ao estresse oxidativo há uma redução estatisticamente significativa da atividade da catalase, sendo a atividade catalásica observada de $77,76 \pm 5,00\%$ para o ácido ferúlico e $53,63 \pm 18,07\%$ para o ácido *p*-cumárico em relação ao controle negativo (100%), indicando uma possível modulação negativa da enzima por parte dos ácidos ferúlico e *p*-cumárico.

Estudos indicam que o composto fenólico curcumina tem atuação direta sobre o aumento de atividade da enzima catalase (NAJJAR, GHADARI, *et al.*, 2017), divergindo do apontado neste trabalho, podendo ser explicado pelo fato da curcumina apresentar estrutura com diferenças significativas em relação aos dois ácidos aqui avaliados, pois a curcumina não apresenta grupamento ácido carboxílico e é um polifenol estruturalmente maior. Por outro lado, é bastante relatada a inibição da catalase por flavonoides (MAJUMDER, DAS e SAHA, 2017) (RASHTBARI, DEHGHAN, *et al.*, 2017), como no caso em que a quercetina apresentou atividade inibitória não competitiva da enzima catalase hepática bovina (RASHTBARI, DEHGHAN, *et al.*, 2017). Assim como esses flavonoides, os ácidos ferúlico e *p*-cumárico possivelmente podem estar modulando negativamente a catalase. A fim de observar se haveria uma interação dos ácidos fenólicos estudados com a catalase, o estudo *in silico* destaca-se como uma etapa importante deste estudo.

5.5. Estudo *in silico* das possíveis interações dos ácidos *p*-cumárico e ferúlico com a enzima catalase

Um estudo anterior relatou os sítios de interação observados na catalase de *Bacillus pumilus* para compostos como pirogalol, catecol, resorcinol, guaiacol, hidroquinona e 2-clorofenol, definindo em que sítio da enzima cada estrutura dessas poderia interagir. Os resultados de cristalografia e modelagem apresentados demonstraram que aparentemente o composto fenólico precisa apresentar uma configuração *orto* contendo duas hidroxilas fenólicas para criar uma interação estável no sítio catalítico, substituindo as moléculas de água da enzima nativa onde uma hidroxila interagiria diretamente com o ferro do grupo heme, enquanto a segunda hidroxila formaria ligações de hidrogênio com o N da His57 e o N do Asn130; ambos os resíduos possuindo papel catalítico. Outro sítio observado foi próximo ao resíduo Asp110 da enzima, onde os compostos fenólicos como o guaiacol seriam estabilizados por interações de Van der Waals (Figura 19) (LOEWEN, VILLANUEVA, *et al.*, 2015). Estes dados sugerem o sítio do resíduo de aminoácido Asp110 como um sítio mais provável para a interação dos ácidos ferúlico e *p*-cumárico.

Estruturalmente a catalase A de *Saccharomyces cerevisiae* e *Bacillus pumilus* apresentam em elevado grau de similaridade e o resíduo do aminoácido Asp110 da catalase de *B. pumilus* corresponde ao resíduo Asp123 da catalase de *S. cerevisiae*, sendo por isso o Asp123 empregado como ponto de referência para definir a origem da cavidade de docagem molecular (sítio de interação).

A molécula de guaiacol apresenta semelhanças estruturais com as moléculas dos ácidos ferúlico e *p*-cumárico; além disso, existem dados de cristalografia registrando-a em um sítio da enzima catalase, sendo, portanto, adotada como parâmetro comparativo neste estudo. Assim como a molécula do ácido ferúlico, a molécula do guaiacol apresenta anel fenílico substituído com grupamento hidroxila na posição *orto* ao grupamento metoxila. O ácido *p*-cumárico também apresenta anel fenílico ligado ao grupamento hidroxila, mas diferentemente tanto do ácido ferúlico quanto do ácido *p*-cumárico, a molécula do guaiacol não apresenta cadeia lateral na posição *para* em relação ao grupamento hidroxila, formada por três carbonos e terminando em um grupamento ácido carboxílico, com uma ligação dupla conjugada entre o anel fenílico e o grupamento ácido.

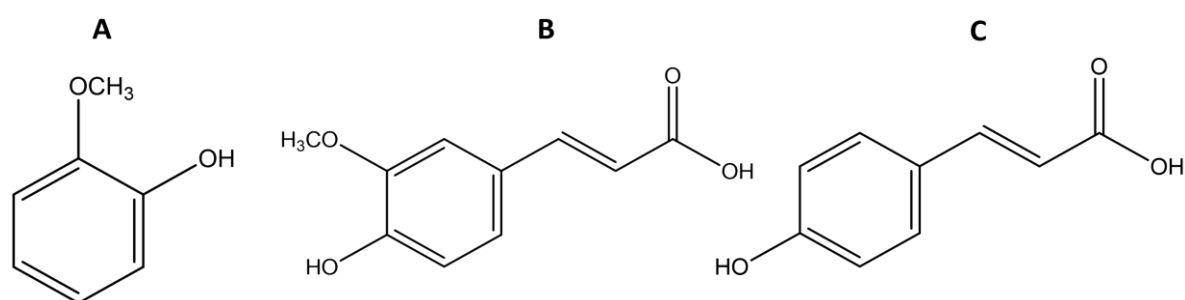


Figura 19: Estrutura química das moléculas de (A) guaiacol, (B) ácido ferúlico, e (C) ácido *p*-cumárico.

Os resultados da docagem sugerem uma interação menos favorável dos ácidos ferúlico e *p*-cumárico neste sítio da enzima (Asp123), sendo a maior pontuação apresentada para a docagem do guaiacol seguida da pontuação referente ao ligante ácido *p*-cumárico e por último o ácido ferúlico, com melhores fitness de 13,59, 2,25 e 0,11, respectivamente (Tabela 2).

Tabela 2: Pontuações de ajuste geradas pela docagem molecular dos ligantes guaiacol, ácido ferúlico e ácido *p*-cumárico na catalase de *Saccharomyces cerevisiae* com cadeias laterais rígidas através da função CHEMSCORE.

<i>Ligante</i>	<i>Pontuações</i>
	13,59
<i>Guaiacol</i>	13,36
	13,14
	2,25
<i>Ác. p-cumárico</i>	1,98
	1,65
	0,11
<i>Ác. ferúlico</i>	0,07
	-0,32

Os resultados foram submetidos à análise da ferramenta PLIP (Protein-Ligand Interaction Profiler) para a identificação dos tipos de interações existentes para cada ligante, possibilitando a identificação de cada resíduo de aminoácido da enzima catalase envolvido em

interações com cada ligante empregado neste estudo e o caráter de interação estabelecida (Tabela 3).

Tabela 3: Interações com os resíduos de aminoácidos observadas pela docagem molecular dos ligantes guaiacol, ácido ferúlico e ácido *p*-cumárico na catalase de *Saccharomyces cerevisiae* com cadeias laterais rígidas.

Compostos	Interações	Aminoácidos
GUAIACOL	<i>Interações Hidrofóbicas</i>	VAL111 PRO124 PHE148 PHE149 ILE160
	<i>Ligações de Hidrogênio</i>	GLY112 ASP123 GLN163
	<i>Empilhamento π</i>	PHE159
ÁCIDO FERÚLICO	<i>Interações Hidrofóbicas</i>	VAL111 PRO124 PHE148 PHE149 PHE149 PHE156 PHE159 ILE160
	<i>Ligações de Hidrogênio</i>	GLY112 ASP123 GLN163
	<i>Interações Hidrofóbicas</i>	VAL111 PHE148 PHE148 PHE149 PHE149 PHE159 PHE159 ILE160 GLN163 LEU196
ÁCIDO <i>p</i>-CUMÁRICO	<i>Ligações de Hidrogênio</i>	GLN163

O ligante guaiacol apresentou 3 tipos de interação com a enzima catalase de *S. cerevisiae*, interações hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e empilhamento π ; enquanto tanto o ácido *p*-cumárico quanto o ácido ferúlico não apresentaram interações do tipo empilhamento π ; porém apresentaram interações hidrofóbicas com mais resíduos de aminoácidos. Vale destacar que tanto o guaiacol quanto o ác. ferúlico apresentaram ligação de hidrogênio com os resíduos dos aminoácidos Gly112, Asp123 e Gln163, enquanto o ác. *p*-cumárico só apresentou ligação de hidrogênio com o resíduo de Gln163. Com isso, pode-se observar que o grupo fenolixa presente na estrutura destes 3 ligantes estudados está envolvido na ligação de hidrogênio com a Gln163, enquanto o substituinte metoxila na posição *orto* à

hidroxila fenólica mostra-se importante para a realização da ligação de hidrogênio com os resíduos Gly112 e Asp123 (Figuras 19A, 19B e 19C).

Como inicialmente a docagem molecular foi realizada assumindo toda a proteína como rígida, incluindo as cadeias laterais do sítio da enzima como estruturas rígidas, sabendo-se que na realidade essas estruturas proteicas apresentam mobilidade; a docagem molecular também foi realizada dando liberdade conformacional a cada uma das principais cadeias laterais envolvidas na interação da catalase com os ligantes guaiacol, ácido ferúlico e ácido *p*-cumárico no sítio do Asp123 (Tabela 4). Este procedimento aproxima o estudo da docagem molecular de um cenário mais realista envolvendo o mecanismo reacional associado à catálise enzimática (DAVIS e BAKER, 2009).

A cada uma das cadeias laterais envolvidas na interação entre os ligantes e a enzima catalase foi dada mobilidade na docagem molecular e também foi feita a docagem molecular com todas essas cadeias laterais com mobilidade ao mesmo tempo. O Δp foi um parâmetro criado para facilitação da análise e corresponde a diferença entre a melhor pontuação obtida de cada docagem molecular flexível e a docagem com cadeias laterais rígidas (Tabela 4).

Tabela 4: Pontuações geradas pela docagem molecular dos ligantes guaiacol, ácido ferúlico e ácido *p*-cumárico na catalase de *Saccharomyces cerevisiae* com cadeias laterais livres através da função CHEMSCORE.

<i>Cadeias</i>	<i>Ligante</i>	<i>Pontuação</i>	Δp (pontuação _f - pontuação _{rígida})
ASP123	<i>Guaiacol</i>	11,87	-1,56
	<i>Ác. p-cumárico</i>	1,22	-1,44
	<i>Ác. ferúlico</i>	-4,42	-4,45
GLN163	<i>Guaiacol</i>	12,33	-1,1
	<i>Ác. p-cumárico</i>	10,51	7,85
	<i>Ác. ferúlico</i>	9,70	9,67
VAL111	<i>Guaiacol</i>	19,46	6,03
	<i>Ác. p-cumárico</i>	8,48	5,82
	<i>Ác. ferúlico</i>	3,89	3,86
PHE148	<i>Guaiacol</i>	13,62	0,19
	<i>Ác. p-cumárico</i>	11,19	8,53
	<i>Ác. ferúlico</i>	8,96	8,93
PHE149	<i>Guaiacol</i>	17,65	4,22
	<i>Ác. p-cumárico</i>	14,49	11,83
	<i>Ác. ferúlico</i>	6,66	6,63
PHE156	<i>Guaiacol</i>	13,21	-0,22
	<i>Ác. p-cumárico</i>	6,09	3,43
	<i>Ác. ferúlico</i>	1,85	1,82
PHE159	<i>Guaiacol</i>	14,71	1,28
	<i>Ác. p-cumárico</i>	16,72	14,06
	<i>Ác. ferúlico</i>	12,68	12,65
ILE160	<i>Guaiacol</i>	16,62	3,19
	<i>Ác. p-cumárico</i>	11,23	8,57
	<i>Ác. ferúlico</i>	2,72	2,69
TODAS	<i>Guaiacol</i>	17,59	4,16
	<i>Ác. p-cumárico</i>	17,38	14,72
	<i>Ác. ferúlico</i>	19,06	19,03
NENHUMA	<i>Guaiacol</i>	13,43	-
	<i>Ác. p-cumárico</i>	2,66	-
	<i>Ác. ferúlico</i>	0,03	-

Quando o estudo foi realizado com todas as cadeias laterais rígidas na docagem molecular, os resultados para os ácidos fenólicos apresentaram pontuações muito baixas e apenas o guaiacol apresentou uma pontuação mais alta, isto pode indicar um impedimento estérico relacionado à estrutura dos ácidos. A flexibilização das cadeias laterais com os resíduos dos aminoácidos Val111, Phe148, Phe149, Phe156, Phe159 e Ile160 envolvidos em interações hidrofóbicas com os ligantes resultam em melhora nas pontuações, sendo este resultado mais destacado para os ácidos fenólicos, sugerindo um melhor encaixe desses

compostos no sítio da enzima (Figuras 20A e 20B). Porém, a flexibilização unicamente da cadeia lateral do Asp123 que está envolvido em ligação de hidrogênio com o guaiacol e o ácido ferúlico na docagem com cadeias laterais rígidas resulta em piora das pontuações, pois o Asp123 passa a interagir com o resíduo do aminoácido Arg125, ficando indisponível para a interação com os ligantes e provocando queda acentuada nas pontuações. No entanto, como na estrutura cristalográfica da enzima ligada ao guaiacol essa interação entre as cadeias laterais dos resíduos não é observada, é possível que essa interação seja um artefato da docagem com as cadeias laterais livre.

Ao permitir que a cadeia lateral do resíduo do aminoácido Phe159 tenha flexibilidade na docagem, o efeito sobre a pontuação dos ácidos é muito acentuado, possibilitando que a pontuação para o ác. *p*-cumárico superasse a pontuação para a docagem do guaiacol. Num ambiente mais realístico, onde todas as cadeias laterais mais importantes para a interação dos 3 ligantes têm mais liberdade, todos os ligantes apresentaram pontuações mais altas e equivalentes entre si, indicando a possibilidade de todos interagirem com a catalase de *S. cerevisiae* no sítio do aminoácido Asp123 (Tabela 4).

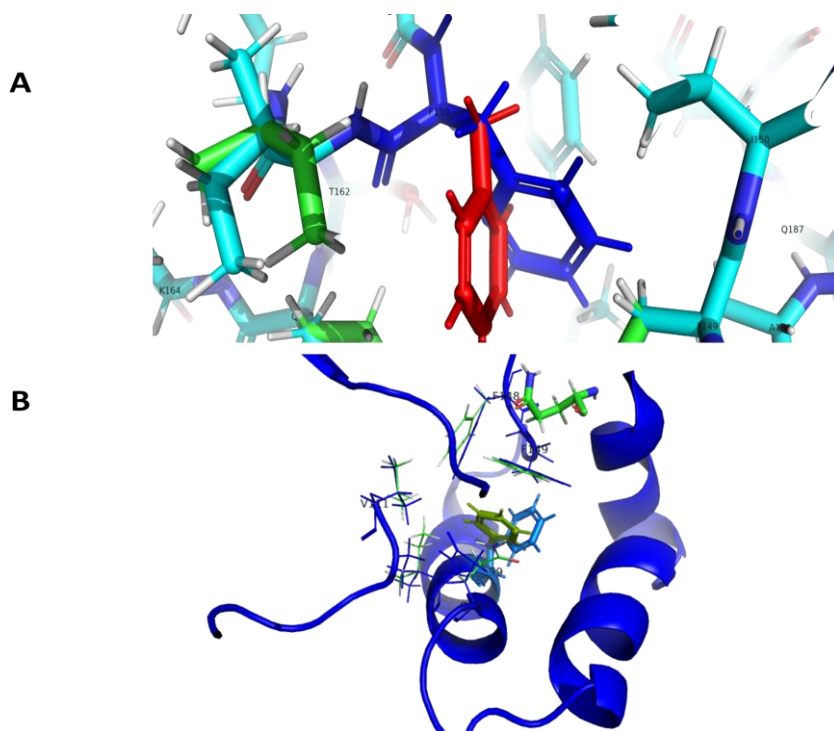


Figura 20: Sítio de ligação da catalase utilizado na docagem molecular. A: Comparação entre a conformação do Phe159 da docagem com cadeias rígidas (vermelho) e a conformação do Phe159 da docagem

com liberdade para a cadeia lateral (azul). B: Comparação entre os sítios quando realizada a docagem com cadeias rígidas (verde) e com liberdade das principais cadeias laterais (azul).

Com a finalidade de comparar as interações observadas para o resultado da docagem molecular com cadeias laterais flexíveis e rígidas, os resultados foram novamente submetido a ferramenta PLIP e as interações indicadas foram expressas em uma tabela (Tabela 5) com mudanças significativas de interações para todos os ligantes estudados.

Tabela 5: Interações com os resíduos de aminoácidos observadas pela docagem molecular dos ligantes guaiacol, ácido ferúlico e ácido *p*-cumárico na catalase de *Saccharomyces cerevisiae* com cadeias laterais flexíveis.

Compostos	Interações	Aminoácidos
GUAIACOL	<i>Interações</i>	VAL111PHE148PHE148PHE156
	<i>Hidrofóbicas</i>	PHE159ILE160GLN163
	<i>Ligações de Hidrogênio</i>	GLN163
ÁCIDO FERÚLICO	<i>Interações</i>	VAL111PRO124PHE148 PHE149
	<i>Hidrofóbicas</i>	PHE149PHE159GLN163
	<i>Empilhamento π</i>	PHE148 PHE159
ÁCIDO <i>p</i>-CUMÁRICO	<i>Interações</i>	VAL111PRO124PHE148PHE148PHE148
	<i>Hidrofóbicas</i>	PHE149 PHE159
	<i>Ligações de Hidrogênio</i>	GLN163GLN192 ASN143

Interações intermoleculares mais fortes como ligação de hidrogênio são perdidas na docagem molecular com as cadeias laterais de interação flexíveis para o ligante guaiacol e o ácido ferúlico (Gly112 e Asp123), assim como menos interações hidrofóbicas são observadas para o ácido ferúlico. No entanto, foi observado um aumento elevado na pontuação de todos os ligantes, principalmente para o ácido ferúlico ($\Delta p = 19,03$), reforçando a possibilidade da

baixa pontuação inicial estar relacionada a efeitos estéricos, principalmente com relação a este ácido fenólico.

Por outro lado, o ácido ferúlico passou a apresentar interações do tipo empilhamento π não verificada antes, reforçando a possibilidade de que o ligante pode-se inserir melhor dentro deste sítio e, assim, estabelecer de forma mais efetiva interações entre seu anel fenílico e o anel fenílico dos resíduos dos aminoácidos Phe148 e Phe159. O ácido *p*-cumárico passou a apresentar ligação de hidrogênio com os resíduos dos aminoácidos Gln192 e Asn143, impactando positivamente na pontuação deste ligante, porém, interações hidrofóbicas com os resíduos Ile160, Gln163 e Leu196 deixaram de ser observadas; o que também pode ter impactado positivamente no aumento de pontuação do ácido *p*-cumárico ($\Delta p = 14,72$) por possibilitar um melhor encaixe do ligante no sítio.

O ligante guaiacol deixou de apresentar empilhamento π com o resíduo de Phe159, mas passou a apresentar interações hidrofóbicas com os resíduos de Phe156, Phe159, Ile160 e Gln163, resultando em uma pequena variação positiva na pontuação observada para este ligante ($\Delta p = 4,16$) (Tabela 5).

É importante destacar que em todas as docagens moleculares realizadas os resultados para o ácido *p*-cumárico foram similares ou superiores aos obtidos para a docagem do ácido ferúlico; podendo este fato estar diretamente relacionado a possível capacidade de modulação negativa destes ácidos sobre a enzima catalase de *S. cerevisiae* quando não submetida a estresse oxidativo, uma vez que o ácido *p*-cumárico apresentou a maior razão de redução de atividade da catalase por mol de ácido empregado no ensaio (Figura 21).

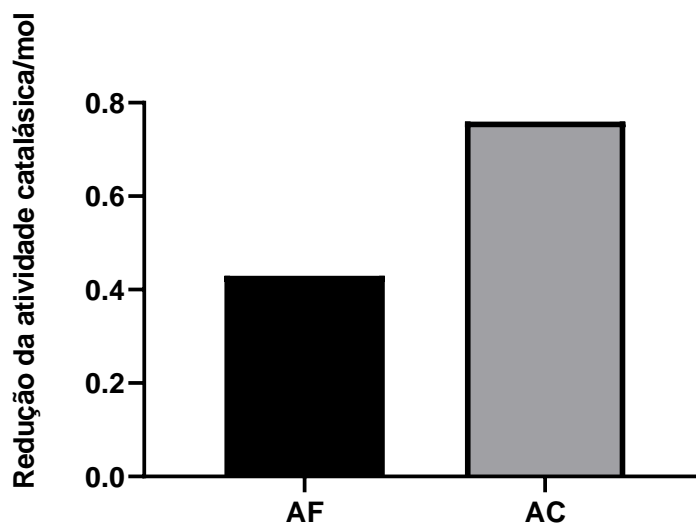


Figura 21: Redução da atividade catalásica por mol de composto utilizado. AF: ácido ferúlico e AC: ácido *p*-cumárico. A redução da atividade foi obtida a partir da diferença da atividade da catalase observada entre o controle negativo e o tratamento com o ácido ferúlico (AFS), ou entre o controle negativo e o tratamento com o ácido *p*-cumárico (ACS); dividida pela concentração molar do ácido fenólico empregada no ensaio.

Em estudo realizado por docagem molecular foi observado que o ácido ferúlico exibiu eficiência significativa como ligante do fator de transcrição NF- κ B envolvido na resposta ao estresse oxidativo (DOSS, DEY, *et al.*, 2016); assim como outro estudo também com foco em células de ratos observou inibição do NF- κ B *in vitro* por parte do ácido ferúlico (LOEWEN, VILLANUEVA, *et al.*, 2015); podendo indicar que componentes relacionados à defesa antioxidante podem interagir e responder a ácidos fenólicos.

Ácido ferúlico, ácido *p*-cumárico e ácido catecuico foram avaliados em outro estudo quanto à interação com as enzimas antioxidantes superóxido dismutase, peroxiredoxina-2 e fosfolípídio-hidroperóxido glutaciona peroxidase por docagem molecular. Os ácidos ferúlico e *p*-cumárico apresentaram melhor interação com todas as enzimas antioxidantes avaliadas no estudo, podendo existir influência direta destes ácidos fenólicos sobre a atividade de enzimas do sistema de defesa antioxidante (OLUGBODI, TINCHO, *et al.*, 2019); assim como é indicado pelos dados da docagem dos ácidos ferúlico e ácido *p*-cumárico na catalase aqui apresentados.

A docagem molecular foi ferramenta de grande auxílio para este estudo, pois sua aplicação propiciou melhor compreensão da influência dos ácidos *p*-cumárico e ferúlico sobre a enzima catalase, possibilitando o entendimento de uma parte relevante do poder antioxidante destes ácidos fenólicos *in vivo*. A utilização da levedura *S. cerevisiae* tornou viável a realização de experimentos considerando a complexidade celular, possibilitando uma melhor análise sobre o comportamento desses potenciais antioxidantes em células eucarióticas.

6. CONCLUSÃO

O ácido ferúlico e o ácido *p*-cumárico mostraram-se não tóxicos às células de *S. cerevisiae* em baixas concentrações e revelaram a capacidade de proteger significativamente as células, tanto da cepa controle (BY4741) quanto à cepa deficiente em catalase ($\Delta ctt1$), contra o estresse oxidativo gerado por tratamento com H₂O₂. Os dois ácidos podem proteger as células contra danos oxidativos severos, e assim garantir que a catalase apresente maior atividade no combate ao peróxido de hidrogênio.

Aparentemente os ácidos ferúlico e *p*-cumárico interagem com a CAT num sítio localizado na proximidade do resíduo do aminoácido Asp123. Tanto um ácido quanto o outro apresentam principalmente interações de caráter hidrofóbico com a enzima. Com destaque para o resíduo de aminoácido Phe159 que além de estar presente em interações com todos os ligantes aqui estudados, também foi componente da cadeia lateral que mais impactou na pontuação das docagens quando lhe foi dada liberdade. A flexibilização das cadeias laterais resultou em aumento significativo nas pontuações obtidas para a docagem dos ligantes guaicol, ácido ferúlico e ácido *p*-cumárico, o que sugere que num ambiente de mais realístico as interações entre estes ligantes e a enzima pode ser muito favorável.

Com base nas docagens moleculares em todas as diferentes condições aplicadas, o ácido *p*-cumárico apresentou-se mais promissor para a interação com enzima catalase e isto pode estar correlacionado com a maior redução de atividade da catalase aqui observada para a exposição a este ácido *in vivo*.

A interação estabelecida entre os ácidos ferúlico e *p*-cumárico e a catalase de *Saccharomyces cerevisiae* supostamente resulta numa redução da atividade enzimática, destacando ambos os fenólicos como possíveis moduladores negativos da enzima para a atividade de degradação do H₂O₂. Entretanto, este fato não impacta significativamente no poder antioxidante destes ácidos, pois estes mesmos foram capazes de proteger em condições oxidativas extremas tanto as células controle (BY4741) quanto às sem catalase ($\Delta ctt1$), indicando que outros mecanismos antioxidantes afetam mais significativamente a sobrevivência celular frente a condição de estresse oxidativo .

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in enzymology**, v. 105, p. 121 – 126, 1984.
- ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos - uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 1 - 9, 2007.
- ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 1 – 9, 2007.
- ATANASOVA, M. et al. Molecular Docking Study on Galantamine Derivatives as Cholinesterase Inhibitors. **Molecular Informatics**, v. 34, n. 6, p. 394 – 403, 2015.
- BARBOSA, K. B. F. et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 630 – 641, 2010.
- BARBOSA, L. F.; MEDEIROS, M. H. G. D.; AUGUSTO, O. Danos oxidativos e neurodegeneração: o que aprendemos com animais transgênicos e nocautes? **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1352 – 1360, 2006.
- BARREIRO, E. J. et al. Modelagem molecular: uma ferramenta para o planejamento racional de fármacos em química medicinal. **Química Nova**, v. 20, n. 3, p. 1 – 10, 1997.
- BARREIRO, E. J.; RODRIGUES, C. R. MODELAGEM MOLECULAR: UMA FERRAMENTA PARA O PLANEJAMENTO RACIONAL DE FÁRMACOS EM QUÍMICA MEDICINAL. **Química Nova**, v. 20, n. 3, p. 1 - 11, 1997.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113 – 126, 2006.
- BELO, M. F. R. F.; SOUZA, A. L. F. Estudo cinético da enzima catalase (E.C. 1.11.1.6) de extrato bruto de batata doce (*Ipomoea batatas*). **Scientia Plena**, v. 12, n. 7, p. 1-7, 2016.
- BEZERRA, G. S. N. et al. Compatibility study between ferulic acid and excipients used in cosmetic formulations by TG/DTG, DSC and FTIR. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 127, n. 2, p. 1683 – 1691, 2016.
- BHARADWAJ, P.; MARTINS, R.; MACREADIE, I. Yeast as a model for studying Alzheimer's disease. **FEMS Yeast Research**, v. 10, n. 8, p. 961 - 969, 2010.
- CERQUEIRA, F. M.; MEDEIROS, M. H. G. D.; AUGUSTO, O. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 441 – 448, 2007.
- CHAVES, O. et al. Theoretical and Experimental Studies of the Interaction between Human Serum Albumin and Artepillin C, an Active Principle of the Brazilian Green Propolis. **Revista Virtual de Química**, v. 11, n. 5, p. 1562 - 1578, 2019.
- CHOI, J.-H. et al. In vitro and in vivo antithrombotic and cytotoxicity effects of ferulic acid. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 32, n. 1, p. 1 – 9, 2018.

- CIGUT, T. et al. Antioxidative activity of propolis extract in yeast cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 21, p. 11449 - 11455, 2011.
- CRUZ, Á. S.; BARBOSA, M. L.; PINTO, T. D. J. A. Testes in vitro como alternativa aos testes in vivo de Draize. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 63, n. 1, p. 1 – 7, 2004.
- DAVIS, I. W.; BAKER, D. ROSETTALIGAND Docking with Full Ligand and Receptor Flexibility. **Journal of Molecular Biology**, v. 385, n. 2, p. 381 - 392, 2009.
- DE SÁ, R. A. et al. Brazilian propolis protects *Saccharomyces cerevisiae* cells against oxidative stress. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 3, p. 993 - 1000, 2013.
- DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. **Revista Visão Acadêmica**, v. 5, n. 1, p. 33 – 40, 2004.
- DONG, C.; ZHANG, N.-J.; ZHANG, L.-J. Oxidative stress in leukemia and antioxidant treatment. **Chinese Medical Journal**, v. 134, n. 16, p. 1897 - 1907, 2021.
- DOSS, H. M. et al. Targeting inflammatory mediators with ferulic acid, a dietary polyphenol, for the suppression of monosodium urate crystal-induced inflammation in rats. **Life Sciences**, v. 148, n. 1, p. 201 – 210, 2016.
- FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, p. 61 – 67, 1997.
- FERREIRA, L. G. et al. Molecular Docking and Structure-Based Drug Design Strategies. **Molecules**, v. 20, n. 7, p. 13385 – 13409, 2015.
- FERREIRA, P. S. et al. A Review of Analytical Methods for p-Coumaric Acid in Plant-Based Products, Beverages, and Biological Matrices. **Critical Reviews in Analytical chemistry**, v. 49, n. 4, p. 1 – 11, 2018.
- FRANÇA, M. B.; LIMA, K. C.; ELEUTHERIO, E. C. A. Oxidative Stress and Amyloid Toxicity: Insights From Yeast. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 118, n. 6, p. 1442 - 1452, 2017.
- GAY, N. H. et al. Neuroprotective Effects of Phenolic and Carboxylic Acids on Oxidative. **Neurochemical Research**, v. 43, n. 3, p. 1 – 15, 2018.
- GEMELLI, T. et al. ESTRESSE OXIDATIVO COMO FATOR IMPORTANTE NA FISIOPATOLOGIA DA DOENÇA DE ALZHEIMER. **Revista Brasileira Multidisciplinar**, v. 16, p. 67 - 77, 2013.
- GLORIEUX, C.; CALDERON, P. B. Catalase, a remarkable enzyme: targeting the oldest antioxidant enzyme to find a new cancer treatment approach. **Biological Chemistry**, v. 398, n. 10, p. 1 – 29, 2017.
- GOYAL, M. M.; BASAK, A. Human catalase: looking for complete identity. **Protein & Cell**, v. 1, n. 10, p. 888 - 897, 2010.
- GÜLÇİN, İ. Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid). **Toxicology**, v. 217, p. 213 - 220, 2006.

- HAQUE, M. E. et al. Neuroprotective potential of ferulic acid in the rotenone model of Parkinson's disease. **Drug, Design, Development and Therapy**, v. 9, p. 5499 – 5510, 2015.
- HARTIG, A.; RUIS, H. Nucleotide sequence of the *Saccharomyces cerevisiae* CTT1 gene and deduced amino-acid sequence of yeast catalase T. **European Journal of Biochemistry**, v. 160, n. 3, p. 487 – 490, 1986.
- HERMAN, P. K. Stationary phase in yeast. **Current Opinion in Microbiology**, v. 5, n. 6, p. 602 - 607, 2002.
- HOFER, S. et al. Studying Huntington's Disease in Yeast: From Mechanisms to Pharmacological Approaches. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 11, n. 318, p. 1 - 20, 2018.
- IMAI, H. et al. Lipid Peroxidation-Dependent Cell Death Regulated by GPx4 and Ferroptosis. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 403, p. 143- 170, 2017.
- JO, E.-R. et al. The protective role of ferulic acid against cisplatin-induced ototoxicity. **International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology**, v. 120, p. 30 – 35, 2019.
- JO, E.-R. et al. The protective role of ferulic acid against cisplatin-induced ototoxicity. **International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology**, v. 41, n. 5, p. 30 - 35, 2019.
- KILIC, I.; YESILOGLU, Y. Spectroscopic studies on the antioxidant activity of p-coumaric acid. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 115, p. 719 – 723, 2013.
- KORB, O.; FINN, P. W.; JONES, G. The cloud and other new computational methods to improve molecular modelling. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 9, n. 10, p. 1121 – 1131 , 2014.
- LAVOVÁ, B.; URMISKÁ, D.; SILLEROVÁ, S. Diauxic growth of a *saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**, v. 3, n. 1, p. 122 – 123, 2014.
- LI, H.; WANG, L.; LUO, Y. Composition Analysis by UPLC-PDA-ESI (-)-HRMS and Antioxidant Activity Using *Saccharomyces cerevisiae* Model of Herbal Teas and Green Teas from Hainan. **Molecules**, v. 23, n. 10, p. 2550, 2018.
- LIMA, É. S. et al. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 37, 2001.
- LIMA, É. S.; ABDALLA, D. S. P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 37, n. 3, p. 293 – 303, 2001.
- LOEWEN, P. C. et al. Unprecedented access of phenolic substrates to the heme active site of a catalase: substrate binding and peroxidase-like reactivity of *Bacillus pumilus* catalase monitored by X-ray crystallography and EPR spectroscopy. **Proteins**, v. 83, n. 5, p. 853 – 866, 2015.
- LUSHCHAK, V. I. Budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a model to study oxidative modification of proteins in eukaryotes. **Acta Biochimica Polonica**, v. 55, n. 4, p. 679 – 684, 2006.
- MACHADO, K. D. C.; FREITAS, R. M. D. Ácido ferúlico e sistema nervoso central: uma prospecção. **Revista GEINTEC**, v. 3, n. 2, p. 221 – 225, 2013.

- MACHADO, M.; CASTRO, R. R.; MARINHO, E. S. Utilização do método semi-empírico PM7 para caracterização do fármaco atalureno: HOMO, LUMO, MESP. **Revista Expressão Católica**, v. 1, n. 1, p. 177 – 183 , 2016.
- MAJUMDER, D.; DAS, A.; SAHA, C. Catalase inhibition an anti cancer property of flavonoids: A kinetic and structural evaluation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 104, p. 929 – 935, 2017.
- MANCUSO, C.; SANTANGELO, R. Ferulic acid: Pharmacological and toxicological aspects. **Food and Chemical Toxicology**, v. 65, p. 185 – 195, 2013.
- MARIS, A. F. et al. Diauxic shift-induced stress resistance against hydroperoxides in *Saccharomyces cerevisiae* is not an adaptive stress response and does not depend on functional mitochondria. **Current Genetics**, v. 39, n. 3, p. 137 – 148, 2001.
- MARTINS, D.; ENGLISH, A. M. Catalase activity is stimulated by H₂O₂ in rich culture medium and is required for H₂O₂ resistance and adaptation in yeast. **Redox Biology**, v. 2, p. 308 – 313, 2014.
- MARTINS, V. D. C. et al. Determination of the Phytochemical Composition and Antioxidant Potential of *Eugenia copacabanensis* and *Myrciaria tenella* Leaves (Myrtaceae) Using a *Saccharomyces cerevisiae* Model. **Chemistry & Biodiversity**, v. 18, n. 6, p. 1 - 28, 2021.
- MATÉ, M. J. et al. Structure of Catalase-A from *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Molecular Biology**, v. 286, n. 1, p. 136 – 147, 1999.
- MATES, J.; PÉREZ-GÓMEZ, C. Antioxidant enzymes and human diseases. **Clinical Biochemistry**, v. 32, n. 8, p. 595 – 603, 1999.
- MEHDI, M. M.; SOLANKI, P.; SINGH, P. Oxidative stress, antioxidants, hormesis and calorie restriction: The current perspective in the biology of aging. **Archives of Gerontology and Geriatrics**, v. 95, p. 1 - 19, 2021.
- MEIRA, K. L.; ALMEIDA, W. L. C.; LAVORATO, S. N. Avaliação da cumarina e seus derivados substituídos como potenciais inibidores da enzima GST- π e determinação de seus perfis farmacocinéticos via estudos in silico. **Revista da Universidade Federal do Oeste da Bahia**, v. 3, n. 1, p. 46, 2018.
- MORAES, D. P. et al. Caracterização de uma nova cultivar de amora-preta BRS Xingu: Composição química, compostos fenólicos e capacidade antioxidante in vitro e in vivo. **Food Chemistry**, v. 322, p. 1 - 9, 2020.
- NAJJAR, F. M. et al. Studies to reveal the nature of interactions between catalase and curcumin using computational methods and optical techniques. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 95, p. 550 – 556, 2017.
- NEMALI, M. R. et al. Comparison of constitutive and inducible levels of expression of peroxisomal beta-oxidation and catalase genes in liver and extrahepatic tissues of rat. **Cancer Research**, v. 48, n. 18, p. 5316 – 5324, 1988.

NGUYEN, P.; YU, H.; KELLER, P. A. Molecular Docking Studies to Explore Potential Binding Pockets and Inhibitors for Chikungunya Virus Envelope Glycoproteins. **Interdisciplinary Sciences--Computational Life Sciences**, v. 10, n. 4, p. 1 – 10, 2017.

NISHIMOTO, T. et al. Important Role of Catalase in the Cellular Response of the Budding Yeast *Saccharomyces cerevisiae* Exposed to Ionizing Radiation. **Current Microbiology**, v. 70, n. 3, p. 1 – 4, 2015.

OHASHI, A. et al. CAPE increases the expression of SOD3 through epigenetics in human retinal endothelial cells. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**, v. 61, n. 1, p. 6 - 13, 2017.

OLIVEIRA, D. M. D.; BASTOS, D. H. M. Biodisponibilidade de ácidos fenólicos. **Química Nova**, v. 34, n. 6, p. 1051 – 1055, 2011.

OLUGBODI, J. O. et al. *Glyphaea brevis* – In vitro antioxidant and in silico biological activity of major constituents and molecular docking analyses. **Toxicology in Vitro**, v. 59, p. 1 – 25, 2019.

OU, S.; KWOK, K.-C. Ferulic acid: pharmaceutical functions, preparation and applications in foods. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 84, n. 11, p. 1261 – 1267, 2004.

PEI, K. et al. p-Coumaric acid and its conjugates: dietary sources, pharmacokinetic properties and biological activities. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 96, n. 9, p. 2952 – 2959, 2015.

PETROVA, V. Y.; RASHEVA, T. V.; KUJUMDZIEVA, A. V. Catalase enzyme in mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 5, n. 1, p. 29 – 41, 2002.

PINZI, L.; RASTELLI, G. Molecular Docking: Shifting Paradigms in Drug Discovery. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 18, p. 1 – 13, 2019.

PUTNAM, C. D. et al. Active and Inhibited Human Catalase Structures: ligand and NADPH binding and catalytic mechanism. **Journal of Molecular Biology**, v. 296, n. 1, p. 295 - 309, 2000.

PUTNAM, C. D. et al. Active and Inhibited Human Catalase Structures: Ligand and NADPH Binding and Catalytic Mechanism. **Journal of Molecular Biology**, v. 296, n. 1, p. 295 - 309, 2000.

QI, X. et al. Mechanism and intervention measures of iron side effects on the intestine. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 60, n. 12, p. 2113 - 2125, 2020.

RASHTBARI, S. et al. Investigation of the binding mechanism and inhibition of bovine liver catalase by quercetin: Multi-spectroscopic and computational study. **BioImpacts**, v. 7, n. 3, p. 147 – 153, 2017.

REN, Z. et al. Ferulic acid exerts neuroprotective effects against cerebral ischemia/reperfusion-induced injury via antioxidant and anti-apoptotic mechanisms in vitro and in vivo. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 40, n. 5, p. 1444 – 1456, 2017.

RIBEIRO, S. M. R. et al. A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. **Bioscience Journal**, v. 21, n. 3, p. 133 – 149, 2005.

RYAZANTSEV, M. N. et al. Quantum Mechanical and Molecular Mechanics Modeling of Membrane-Embedded Rhodopsins. **The Journal of Membrane Biology**, v. 252, n. 4, p. 425 - 449, 2019.

- SADOWSKA-BARTOSZ, I. et al. Dimethyl sulfoxide induces oxidative stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Research**, v. 13, n. 8, p. 820 – 830, 2013.
- SAKAMULA, R.; THONG-ASA, W. Neuroprotective effect of p-coumaric acid in mice with cerebral ischemia reperfusion injuries. **Metabolic Brain Disease**, v. 33, n. 3, p. 765 – 773, 2018.
- SANT'ANNA, C. M. R. D. Métodos de Modelagem Molecular para Estudo e Planejamento de Compostos Bioativos: Uma Introdução. **Revista Virtual de Química**, n. 1, p. 49 – 57, 2009. ISSN 1.
- SHEN, Y. et al. Protective effects of p-coumaric acid against oxidant and hyperlipidemia-an in vitro and in vivo evaluation. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 111, p. 579 – 587, 2019.
- SILVA, M. L. C. et al. Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. **Revista Ciência Agrícola**, v. 31, n. 3, p. 669 – 679, 2010.
- SOARES, A. M. D. S.; MACHADO, O. L. T. Defesa de plantas: Sinalização química e espécies reativas de oxigênio. **Revista Trópica: Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 1, n. 1, p. 9 – 19, 2007.
- SOARES, D. G.; ANDREAZZA, A. C.; SALVADOR, M. *Saccharomyces cerevisiae* como modelo biológico para avaliação da capacidade antioxidante de compostos. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 85, n. 2, p. 45 – 47, 2004.
- SOARES, V. C. G. et al. Cytotoxicity of active ingredients extracted from plants of the Brazilian "Cerrado". **Natural Product Communications**, v. 6, n. 7, p. 983 - 984, 2011.
- SU, L.-J. et al. Reactive Oxygen Species-Induced Lipid Peroxidation in Apoptosis, Autophagy, and Ferroptosis. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, p. 1 - 13, 2019.
- TEHRANI, H. S.; MOOSAVI-MOVAHEDI, A. A. Catalase and its mysteries. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 140, p. 1 - 10, 2018.
- TSAI, C.-F.; WU, J.-Y.; HSU, Y.-W. Protective Effects of Rosmarinic Acid against Selenite-Induced Cataract and Oxidative Damage in Rats. **International Journal of Medical Sciences**, v. 16, n. 5, p. 729 - 740, 2019.
- WHITTAKER, J. W. Non-heme manganese catalase – The 'other' catalase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 525, n. 2, p. 111 - 120, 2012.
- YAN, M. H.; WANG, X.; ZHU, X. Mitochondrial defects and oxidative stress in Alzheimer disease and Parkinson disease. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 62, p. 90 - 101, 2013.
- YUE, Y. et al. p-Coumaric acid improves oxidative and osmosis stress responses in *Caenorhabditis elegans*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 99, n. 3, p. 1190 – 1197, 2018.
- ZDUNSKA, K. et al. Antioxidant Properties of Ferulic Acid and Its Possible Application. **Skin Pharmacology and Physiology**, v. 31, p. 332 – 335, 2018.