

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO

INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

DISSERTAÇÃO

ESTUDO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE DIFERENTES
CLASSES DE MOLÉCULAS ISOLADAS DE MEL E PRÓPOLIS
EM CÉLULAS DE *Saccharomyces cerevisiae*

Edlene Ribeiro Prudêncio

2016



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO

INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**ESTUDO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE
DIFERENTES CLASSES DE MOLÉCULAS ISOLADAS DE
MEL E PRÓPOLIS EM CÉLULAS DE *Saccharomyces cerevisiae***

EDLENE RIBEIRO PRUDÊNCIO

Sob orientação do
Prof. Dr. Cristiano Jorge Riger

E Co-orientação
Prof^ª. Dr^a Cristiane Martins Cardoso de Salles

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

SEROPÉDICA, RJ

547

P971e

T

Prudêncio, Edlene Ribeiro, 1991-

Estudo do potencial antioxidante de diferentes classes de moléculas isoladas de mel e própolis em células de *Saccharomyces cerevisiae* / Edlene Ribeiro Prudêncio. - 2016.

xii, 74 f.: il.

Orientador: Cristiano Jorge Riger.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Química, 2016.

Bibliografia: f. 64-74.

1. Química orgânica - Teses. 2. Fenóis - Teses. 3. Antioxidantes - Teses. 4. *Saccharomyces cerevisiae* - Teses. 5. Mel - Teses. 6. Própolis - Teses. 7. Stress oxidativo - Teses. I. Riger, Cristiano Jorge, 1972- II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Química. III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO

INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

EDLENE RIBEIRO PRUDÊNCIO

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências,
no Programa de Pós-Graduação em Química, área de concentração em Bioquímica.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 04/08/2016

Prof. Dr. Cristiano Jorge Riger

Depto. de Química/ICE/UFRRJ (Orientador e Presidente)

Prof^a. Dr^a. Maria Ivone Martins Jacintho Barbosa

Depto. de Tecnologia de Alimentos/IT/UFRRJ (Membro Titular Interno)

Prof. Dr. Marcos Dias Pereira

Depto. de Bioquímica/IQ/UFRRJ (Membro Titular Externo)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida e por todas as oportunidades que me trouxe até aqui, e pela e a intercessão de Nossa Senhora em todos os momentos de minha vida.

Muito obrigada, meus pais Susana e Edmundo Prudêncio, por seu imenso amor e dedicação em conduzir meu amadurecimento. Seus valores foram essenciais para as minhas conquistas.

Agradeço a minha irmã Edna Bragança por seus inúmeros conselhos e momentos de carinho, que foram um apoio fundamental na minha jornada.

Muito obrigada André Souza por todo seu amor, carinho e paciência no nosso namoro.

Um agradecimento muito especial para o meu orientador Cristiano Jorge Riger. Mestre, tive grandes ensinamentos ao acompanhar sua excelente didática, seu comprometimento nas pesquisas e sua conduta profissional. Levarei sempre comigo seu grande exemplo de valorização do aluno e compreensão do lado humano das pessoas. A ciência ganha muito tendo profissionais como você. Obrigada professora Cristiane Salles por todo apoio e incentivo neste trabalho. Obrigada professora Rosane Nora por ceder os compostos utilizados neste trabalho. Um agradecimento especial ao Laboratório de Estresse Oxidativo em Micro-organismos (LEOM), onde eu pude desenvolver esta pesquisa.

Agradeço aos meus amigos Flavio, Raquel, Daniel Ferreira, Daniel Cordeiro, Pedro e Leonardo pelos momentos de alegria e apoio, que me ajudaram muito nessa jornada. Um grande obrigado aos meus amigos de laboratório Izabel, Juliana, Nathalia, Lynn, Priscila, Natan, Larissa e Francine; a amizade de vocês tornou mais leve e divertida a árdua rotina de experimentos.

Agradeço aos amigos que o Departamento de Tecnologia de Alimentos me deu. Obrigada Romulo, Rosa e demais professores e funcionários do DTA. Um agradecimento muito especial ao Roberto e ao Ivan, a compreensão e a parceria de vocês foi fundamental para que eu chegasse até aqui.

“Se enxerguei mais longe, foi por estar de pé sobre ombro de gigantes”

Isaac Newton

RESUMO

PRUDENCIO, Edlene Ribeiro. **Estudo do potencial antioxidante de diferentes classes de moléculas isoladas de mel e própolis em células de *Saccharomyces cerevisiae***. 2016. 86p. Dissertação. (Mestrado em Química, Bioquímica). Instituto de Ciências Exatas. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2016.

O mel e a própolis são produzidos por abelhas, a partir da coleta de néctar e seiva das plantas. No processo, os compostos fenólicos oriundos do metabolismo secundário dos vegetais são incorporados aos produtos mencionados. Amostras de mel e própolis de diferentes regiões foram caracterizadas e o conteúdo de compostos fenólicos pode ser dividido em: derivados do ácido hidroxibenzoico, derivados do ácido hidroxicinâmico, flavonoides e flavonoides glicosilados. Na literatura, valores de atividade antioxidante *in vitro* descritos divergem consideravelmente entre os autores. Além disso, os métodos *in vitro* (DPPH, ABTS, FRAPP, dentre outros) não representam condições fisiológicas como concentração de substratos e interação de metabólitos. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é uma ferramenta para ensaio biológico, uma vez que apresenta elevada semelhança com células de mamíferos superiores no sistema de defesa antioxidante. O objetivo deste trabalho foi comparar o potencial antioxidante de diferentes classes de compostos fenólicos, utilizando os representantes morina, rutina, ácido siríngico e clorogênico em cepas controle (BY4741) e mutantes ($\Delta sod1$ e $\Delta gsh1$) de *S. cerevisiae*. Foram avaliados toxidez dose-dependente, tolerância ao estresse e peroxidação lipídica. Todos os compostos fenólicos testados foram efetivos em reduzir danos oxidativos intracelulares, com destaque para o ácido clorogênico na cepa controle. Quando comparado às células estressadas, este promoveu aumentos de 75% de sobrevivência, contra 57% em média dos demais tratamentos; e diminuição de 60% em níveis de peroxidação lipídica, contra redução próxima a 47% dos demais tratamentos. Nas cepas mutantes, todas as substâncias tiveram resultados semelhantes entre si. Desta forma, outros dois componentes da classe do ácido hidroxicinâmico, ácido cafeico e éster fenético do ácido cafeico (CAPE), foram testados comparativamente. Ambos atuaram como antioxidante em *S. cerevisiae*, entretanto CAPE foi a substância mais tóxica e também a que promoveu aumento mais significativo de glutatona reduzida dentre os derivados hidroxicinâmicos. Esse resultado corrobora com dados de estudos que apontam que a atividade protetora dos compostos fenólicos está relacionada a ativação do sistema antioxidante por ação xenobiótica dessas substâncias.

Palavras-chaves: *Saccharomyces cerevisiae*, compostos fenólicos, estresse oxidativo.

ABSTRACT

PRUDENCIO, Edlene Ribeiro. **Study of different molecules classes isolated from honey and propolis antioxidant activity in *Saccharomyces cerevisiae* cells.** 2016. 86p. Dissertation. (Master of Science in Chemistry, Biochemistry). Instituto de Ciências Exatas. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2016.

Honey and propolis are produced by bees from the nectar and sap collected from plants. In the process, the phenolic compounds derived from secondary metabolism of plants are incorporated into the products mentioned. Honey and propolis samples from multiple regions have been characterized and phenolic compounds can be divided into: hydroxybenzoic acid derivatives, hydroxycinnamic acid derivatives, flavonoids and glycosylated flavonoids. In the literature, there is no consensus among the authors about the values for *in vitro* antioxidant activity. Moreover, these methods do not represent physiological conditions such as concentration of substrates and metabolites interaction. The yeast *Saccharomyces cerevisiae* is an alternative tool for a biological assays, since it is similar to mammalian cells. The main goal of this study is to compare the antioxidant potential of different phenolic compounds classes using representatives morin, rutin, chlorogenic acid and syringic acid in control strains (BY4741) and mutant ($\Delta sod1$ and $\Delta gsh1$) of *S. cerevisiae*. They were evaluated in dose-dependent toxicity, stress tolerance, and lipid peroxidation. All tested phenolic compounds were effective in reducing intracellular oxidative damage, especially the chlorogenic acid in the control strain. When compared to stressed cells, it promoted 75% increase on cell survival rates, compared with 57% on average for the other treatments; and 60% decrease in levels of lipid peroxidation, compared to reductions close to 47% with other treatments. In mutant strains, all compounds presented similar results. Thus, two components of the class hydroxycinnamic acid, caffeic acid and caffeic acid phenethyl ester (CAPE) were tested comparatively. Both acted as an antioxidant in *S. cerevisiae*, however CAPE was the most toxic substance promoting the most significant increase on reduced glutathione levels among hydroxycinnamic derivatives. This result supports some related research that claims phenolic compounds protection is related to activation of the antioxidant system as xenobiotic action of these substances.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, phenolic compounds, oxidative stress.

ÍNDICE DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - (A) Estrutura geral dos derivados de ácido benzoico (ácido benzoico, R1 = R2 = H);	6
Figura 2 - Estrutura química dos principais tipos de flavonoides	6
Figura 3 - Estruturas de ressonância de estabilização de radical por oxidação monoelétrica de grupo hidroxila em galangina.	9
Figura 4 - Possíveis pontos de coordenação de flavonoides com metais.....	9
Figura 5 - (A) Estrutura química dos flavonoides; (B) Hidroxilas em posição orto; (C) Presença de ligação dupla de oxigênio na posição 5 do anel C; (D) Presença de hidroxilas na posição 3 e 5	10
Figura 6 - Mecanismo de sequestro de radical por ácido hidroxicinâmico, incluindo estabilização por ressonância de radical por meio de ligação intramolecular de hidrogênio... ..	11
Figura 7 - (A) Estrutura química do ácido sirínico e (B) Estrutura química do ácido clorogênico	12
Figura 8 - (A) Estrutura química do flavonoide rutina e (B) Estrutura química do flavonoide morina.	13
Figura 9 - Etapas da cinética de crescimento de leveduras, de acordo com a fonte energética.	14
Figura 10 - Cadeia transportadora de elétrons e ATP sintase.	17
Figura 11 - Etapas da redução da água na cadeia transportadora de elétrons: (a) Reação acoplada à síntese de ATP pela ATP sintase; (b) Redução do oxigênio com apenas um elétron; (c) Formação de peróxido de hidrogênio através da adição de dois prótons; (d) Formação de ânion e radical hidroxila através da adição de um elétron.	17
Figura 12 - Esquema proposto para a formação de hidroperóxidos lipídicos e peróxidos cíclicos a partir do ácido araquidônico	20
Figura 13 - Reação entre o ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) e o malonaldeído, formando composto colorido medido espectrofotometricamente a 532nm.....	21
Figura 14 - Síntese do tripeptídeo glutationa.	24

Figura 15 - Sistemas de defesa antioxidantes enzimáticos. CAT-Catalase, SOD-Superóxido dismutase, GPx-Glutationa peroxidase, GRd-Glutationa redutase, GSH-Glutationa reduzida, GSSG-Glutationa oxidada.	24
Figura 16 - Diluições seriadas para posterior plaqueamento.	30
Figura 17 - Esquema do tratamento inicial das células: (S) células + peróxido de hidrogênio + Ácido Siríngico 10 µg.mL ⁻¹ ; (C) células + peróxido de hidrogênio + Ácido Clorogênico 10 µg. mL ⁻¹ ; (M) células + peróxido de hidrogênio + Morina 10 µg. mL ⁻¹ ; (R) células + peróxido de hidrogênio + Rutina 10 µg. mL ⁻¹	32
Figura 18 - Produto formado a partir da reação do ácido 2-tiobarbitúrico e o malonaldeído.	34
Figura 19 - Tolerância celular da cepa BY4741 a diferentes concentrações das substâncias morina (A), rutina (B), ác. clorogênico (C) e ác. siríngico (D).	37
Figura 20 - Tolerância celular das cepas $\Delta sod1$ (A) e $\Delta gsh1$ (B) após exposição às concentrações de 1 e 10 µg.mL ⁻¹ das substâncias morina, rutina, ác. siríngico e ác. clorogênico.	39
Figura 21 - Viabilidade celular da cepa controle. Avaliação da tolerância ao estresse causado pela exposição a H ₂ O ₂ (1,0 mM) por 1 h após o pré-tratamento com ácido siríngico, ácido clorogênico, morina e rutina (10 µg.mL ⁻¹) por 2 h.	42
Figura 22 - Viabilidade celular das cepas $\Delta sod1$ e $\Delta gsh1$. Avaliação da tolerância ao estresse causado pela exposição a H ₂ O ₂ (1,0 mM) por 1 h após o pré-tratamento com ácido siríngico, ácido clorogênico, morina e rutina (10 µg.mL ⁻¹) por 2 h.	44
Figura 23 - Avaliação da peroxidação lipídica na cepa BY4741. Células foram submetidas aos tratamentos por 2 h com as substâncias a 10 µg.mL ⁻¹ , seguido de incubação com peróxido de hidrogênio (1,0 mM) por 1 h.	46
Figura 24 - Avaliação da peroxidação lipídica nas cepas $\Delta sod1$ e $\Delta gsh1$. Células foram submetidas aos tratamentos por 2 h com as substâncias a 10 µg.mL ⁻¹ , seguido de incubação com peróxido de hidrogênio (1,0 mM) por 1 h.	47
Figura 25 - Avaliação da função mitocondrial no meio YPGly. Avaliação da tolerância ao estresse causado pela exposição a H ₂ O ₂ (1,0 mM) por 1 h após o pré-tratamento com ácido siríngico, ácido clorogênico, morina e rutina (10 µg.mL ⁻¹) por 2 h.	49
Figura 26 - Ácidos cafeico, quínico e clorogênico (5-cafeoilquínico).	52

Figura 27 - Estrutura do éster fenetil do ácido cafeico.	53
Figura 28 - Tolerância celular da cepa BY4741 a diferentes concentrações das substâncias ácido cafeico (A) e CAPE (B), incubada por 2h a 28°C/160rpm.	54
Figura 29- Tolerância celular das cepas $\Delta sod1$ e $\Delta gsh1$ a diferentes concentrações das substâncias ácido cafeico (A), CAPE (B) incubada por 2h a 28°C/160rpm.	54
Figura 30 - Viabilidade celular na cepa BY4741. Avaliação da tolerância ao estresse causado pela exposição a H_2O_2 (1,0 mM) por 1 h após o pré-tratamento com ácido clorogênico, ácido cafeico e CAPE ($10 \mu g.mL^{-1}$) por 2 h.	55
Figura 31 - Viabilidade celular das cepas $\Delta sod1$ e $\Delta gsh1$. Avaliação da tolerância ao estresse causado pela exposição a H_2O_2 (1,0 mM) por 1 h após o pré-tratamento com ácido clorogênico, ácido cafeico e CAPE ($10 \mu g.mL^{-1}$) por 2 h.	56
Figura 32 - Avaliação da peroxidação lipídica na cepa BY4741. Células foram submetidas aos tratamentos por 2 h com ácido clorogênico, ácido cafeico e CAPE ($10 \mu g.mL^{-1}$), seguido de incubação com peróxido de hidrogênio (1,0 mM) por 1h.	57
Figura 33 - Avaliação da peroxidação lipídica nas cepas $\Delta sod1$ e $\Delta gsh1$. Células foram submetidas aos tratamentos por 2 h com ácido clorogênico, ácido cafeico e CAPE ($10 \mu g.mL^{-1}$), seguido de incubação com peróxido de hidrogênio (1,0 mM) por 1 h.	58
Figura 34 - Avaliação da concentração de GSH e GSSG na cepa BY4741. Células foram submetidas aos tratamentos por 2 h com ácido clorogênico, ácido cafeico e CAPE ($10 \mu g.mL^{-1}$), seguido de incubação com peróxido de hidrogênio (1,0 mM) por 1 h.	60

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Atividade antioxidante de compostos fenólicos pelo método DPPH em $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (CE_{50}) e o solvente utilizado.....	8
Tabela 2 - Cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> utilizadas no trabalho.	27

SIGLAS E ABREVIATURAS

CAT - Catalase

SOD - Superóxido dismutase

GPx - Glutathione peroxidase

GRd - Glutathione reductase

YPD - Yeast/Peptone/Dextrose

YPGly - Yeast/Peptone/Glycerol

GSH - Glutathione reduzida

GSSG - Glutathione oxidada

TBA - Thiobarbituric Acid (Ácido 2-tiobarbitúrico)

MDA - Malonaldeído

LPO - Lipoperoxidação

EDTA - Etilenodiamin Tetracetic Acid (Ácido etileno diamino tetra acético)

TCA - Trichloroacetic Acid (Ácido tricloroacético)

HNE - hidroxil-2-nonenal

DPPH - 2,2-difenil-2-picrilhidrazil

ABTS - 2,2'- azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido-sulfônico)

NADPH - Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

GST - Glutathione S-transferase

NF- κ B - Nuclear Factor kappa beta

MAPkinases - Mitogen Activated Protein Kinases

SUMÁRIO	Pág
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1 O mel e a Própolis	3
2.2 Identificação dos Compostos Presentes no Mel e na Própolis	4
2.3 Avaliação da Capacidade Antioxidante <i>in vitro</i>	7
2.4 Mecanismo de Ação dos Compostos Fenólicos	9
2.5 Modelo Biológico Eucariótico: <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	13
2.6 Estresse Oxidativo	15
2.7 Sistema de Defesa Antioxidante Enzimático	21
2.7.1 Superóxido dismutase (SOD)	21
2.7.2 Catalase (CAT)	22
2.8 Sistema de defesa antioxidante não-enzimático	23
3. OBJETIVO	26
3.1 Objetivos Específicos	26
4. MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1 Material	27
4.1.1 Meios de cultura	27
4.1.2 Microrganismos e condições de cultivo	27
4.1.3 Repique	28
4.1.4 Inóculo	28
4.1.5 Preparo das substâncias testadas	28
4.2 Métodos	29
4.2.1 Fator de conversão de absorvância para concentração	29
4.2.2 Toxidez	30
4.2.3 Pré-tratamento com as substâncias	30
4.2.4 Viabilidade celular	33
4.2.5 Peroxidação lipídica	33
4.2.6 Disfunção mitocondrial	34
4.2.7 Oxidação intracelular através dosagem de glutathiona oxidada (GSSG) e glutathiona reduzida (GSH)	34

4.3	Análise estatística	35
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
5.1	Avaliação da Toxicidade Dose-Dependente	36
5.2	Viabilidade Celular	40
5.3	Peroxidação Lipídica	45
5.4	Disfunção Mitocondrial	48
5.5	Comparativo com Ensaio <i>in vitro</i>	49
5.6	Comparativo entre ácidos hidroxicinâmicos e seus derivados	50
5.6.1	Toxicidade do ácido cafeico e do CAPE	53
5.6.2	Viabilidade celular e peroxidação lipídica	55
5.6.3	Dosagem de glutathiona reduzida (GSH) e oxidada (GSSG)	59
6.	CONCLUSÕES	63
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64

1. INTRODUÇÃO

Os alimentos que possuem quantidades consideráveis de substâncias com propriedades benéficas para o organismo são conhecidos como alimentos funcionais, e se caracterizam por oferecer vários benefícios à saúde; além do valor nutritivo inerente à sua composição química, podem desempenhar um papel potencialmente benéfico na redução do risco de doenças.

O “Paradoxo Francês” é uma anomalia dietética encontrada na população da França e em regiões mediterrâneas. Estudos epidemiológicos revelaram que a dieta rica em flavonoides, uma classe de compostos fenólicos, está relacionada com o aumento da longevidade e a diminuição da incidência de doenças cardiovasculares observadas nestas populações; apesar do seu elevado consumo de lipídios e baixa taxa de atividade física (PROCHÁZKOVÁ; BOUŠOVÁ; WILHELMOVÁ, 2011). O grupo de compostos fenólicos tem recebido especial atenção nas últimas décadas e são encontrados em diversos outros tipos de alimentos funcionais; como chá verde, vinho, frutas vermelhas, azeite de oliva, vegetais escuros, cebola, maçãs, dentre outros (ROLEIRA et al., 2015).

Em consonância com esses dados, extratos brutos de mel e própolis, ricos em polifenóis, também podem vir a auxiliar as defesas endógenas do organismo, como as enzimas e os metabólitos relacionados ao sistema de defesa antioxidante intracelular, relacionados à eliminação de espécies reativas de oxigênio (EROs) produzidas pelo metabolismo celular e prejudiciais às estruturas e funções celulares. Além disso, é importante ressaltar que uma gama de doenças neurodegenerativas, cardiovasculares e até o câncer estão associadas ao aumento dessas espécies reativas no ambiente intracelular; portanto, o aumento das defesas antioxidantes significaria uma melhoria do quadro de pacientes acometidos por essas enfermidades.

Já estão descritos na literatura mais de 300 componentes encontrados no mel e na própolis, incluindo açúcares, proteínas, vitaminas, minerais e outros compostos, tais como ácidos orgânicos, alcoóis, ésteres, cetonas e flavonoides, destacando-se os compostos fenólicos. A grande variedade de componentes presentes nestas misturas se deve a diversidade de flora e região geográfica de onde são produzidos, permitindo assim diversidade de compostos e propriedades (CAN et al., 2015; ZHANG et al., 2015a).

Devido a grande variedade de componentes, torna-se interessante verificar qual classe de compostos é preponderante nas propriedades terapêuticas observadas nesses alimentos. Com este intuito, pretende-se identificar uma classe de compostos que possua alto potencial antioxidante.

Os ensaios *in vitro* vêm confirmando a ação antioxidante de compostos orgânicos isolados do mel e da própolis. Dentre os métodos utilizados, destaca-se o DPPH, que por meio de mudança de coloração do reagente 2,2-difenil-1-picrilhidrazil mede-se o potencial antioxidante de determinado composto. Este reagente apresenta coloração violeta quando está na sua forma radicalar e muda de cor quando estabilizado, permitindo verificar a capacidade e a concentração de substâncias capazes de eliminar radicais livres.

Entretanto, os métodos *in vitro* não consideram interações metabólicas e condições fisiológicas, onde estão presentes diversos componentes que podem influenciar na capacidade antioxidante das substâncias testadas. Uma alternativa é o uso de células de leveduras. Estes fungos unicelulares apresentam organelas e o metabolismo de replicação celular e de defesa antioxidante muito semelhantes às células de mamíferos. Devido à semelhança com organelas e sistema de defesa antioxidante de células de mamíferos superiores, estes microrganismos são ferramentas úteis na avaliação do potencial antioxidante de substâncias que possam ser captadas para a matriz intracelular das leveduras.

Muitos compostos presentes no mel e na própolis já foram estudados quanto às suas propriedades antioxidantes, e já têm diversos trabalhos publicados relatando aplicações farmacêuticas; outros, entretanto, possuem poucos estudos realizados. Devido a isto foi selecionado um representante de cada grande grupo dos compostos fenólicos para desenvolver esta pesquisa: dos derivados do ácido hidroxibenzoico (ácido siríngico), dos derivados do ácido hidroxicinâmico (ácido clorogênico), dos flavonoides (morina) e dos flavonoides glicosilados (rutina). Estes compostos apresentam potencial antioxidante *in vitro*; porém, poucos estudos comparam suas atividades biológicas em um modelo de estudo eucarioto, como as células da levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 O mel e a Própolis

O mel é um alimento consumido pela humanidade há milênios. Diversos registros históricos de tratamentos de enfermidades de povos egípcios, tibetanos ou greco-romanos incluem o uso de mel, própolis, larvas de abelhas e até das próprias abelhas em preparados medicinais (VANDAMME et al., 2013). São atribuídas a ele propriedades antioxidantes, antibacterianas, antifúngicas e anti-inflamatórias (ETERAF-OSKOU EI; NAJAFI, 2013; VANDAMME et al., 2013; VIUDA-MARTOS et al., 2008).

O uso do mel como alimento se deve principalmente ao seu elevado valor nutricional e energético, bem como ao seu poder edulcorante (DA SILVA et al., 2016). O uso medicinal do mel sofreu redução na medicina moderna (ETERAF-OSKOU EI; NAJAFI, 2013); entretanto, ele continua sendo reconhecido como alimento de elevada qualidade nutricional, e o reconhecimento de suas propriedades fisiológicas e bioquímicas impulsiona novamente seu consumo (VIUDA-MARTOS et al., 2008).

De acordo com o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Mel do Ministério da Agricultura e Abastecimento do Brasil (MAPA), o mel é definido como um produto alimentício produzido pelas abelhas melíferas a partir do néctar das flores ou de secreções procedentes de partes vivas das plantas; ou ainda de secreções de insetos sugadores de plantas. As abelhas recolhem, transformam e combinam esses materiais com substâncias específicas próprias, e armazenam este material nos favos da colmeia até a maturação (BRASIL, 2000).

A composição química do mel consiste de glicídios (80%), água (17%) e de uma gama de outras moléculas (3%), tais como enzimas, aminoácidos, compostos orgânicos, vitaminas e minerais. Recebe especial atenção a porção dos compostos orgânicos que contém os fenólicos, e estudos recentes vêm comprovando que os efeitos benéficos do mel e seus derivados advêm destes compostos (DA SILVA et al., 2016; VANDAMME et al., 2013).

Ao retirar o néctar, as abelhas colhem uma diversidade de substâncias produzidas pelo metabolismo secundário das plantas, que varia de acordo com algumas características específicas, como espécie vegetal, clima, localização geográfica e estado fisiológico em que a planta se encontra. Numa situação de estresse, por exemplo, o metabolismo vegetal utiliza

rotas biossintéticas para sua própria proteção. Desta forma, a composição química dos vegetais é bastante diversa, e já foram descritas centenas de substâncias biologicamente ativas. Neste contexto, quando a abelha retira seu alimento das plantas, pode absorver compostos bioativos dos vegetais e incorporá-los ao mel, como, por exemplo, os compostos fenólicos (DA SILVA et al., 2013, 2016).

A própolis é um produto das abelhas conhecido pelo homem há mais de 3.000 anos e utilizada para diversos fins. Os sacerdotes do antigo Egito já a utilizavam como substância medicinal e como parte integrante dos unguentos de embalsamar (GREGORIS; STEVANATO, 2010). Registros históricos apontam que persas, romanos e incas também fizeram uso da própolis para fins medicinais, principalmente para melhorar a imunidade no tratamento de infecções. O nome da substância deriva do grego, onde *pro* significa “em defesa de” e *polis* “cidade”. De fato, as abelhas produzem esta resina para proteger a colmeia de infecções microbianas e defendê-la de insetos invasores. A própolis é encontrada em finas camadas revestindo rachaduras, fortalecendo a estrutura dos favos e vedando orifícios da colmeia (MARCUCCI, 1996).

Na sua composição se encontram, em geral, 50% de resinas, 30% de ceras, 10% de óleos aromáticos, 5% de polens e outros 5% de diversas substâncias orgânicas (CARLOS et al., 2012; VIUDA-MARTOS et al., 2008). Estão relacionadas à própolis atividades antibacteriana, antiviral, antifúngica, cicatrizante, antioxidante, anti-inflamatória, imunoestimulante, e até propriedades anticancerígenas. Assim como no mel, diversos trabalhos relacionam as propriedades verificadas na própolis aos compostos fenólicos nela presentes (DA SILVA et al., 2012; GREGORIS; STEVANATO, 2010; MARCUCCI, 1996).

Já estão descritos mais de 200 compostos isolados em diferentes tipos de própolis (GREGORIS; STEVANATO, 2010). A composição varia conforme a época do ano, variedade de abelha que a produz, flora coletada, dentre outros aspectos. Assim como o mel, é um produto muito diversificado. Embora não seja considerada um alimento, o fato de a própolis possuir diversas propriedades a torna ingrediente com propriedades terapêuticas em bebidas, alimentos e cosméticos (CARLOS et al., 2012).

2.2 Identificação dos Compostos Presentes no Mel e na Própolis

Estão descritos na literatura diversos trabalhos com elucidação dos compostos presentes no mel e na própolis. A determinação se inicia com uma etapa de extração por meio

de solventes, que são em sua maioria misturas água-álcool em diferentes proporções, tanto para mel quanto para própolis. Soluções aquosas de etanol (25 a 70% v/v) são utilizadas em alguns trabalhos durante 12-24 horas, sob agitação (FROZZA et al., 2013; VALENZUELA-BARRA et al., 2015), enquanto as extrações metanólicas são utilizadas em diferentes proporções com água (BALTRUSAITYTE; VENSKUTONIS; CEKSTERYTE, 2007; CAN et al., 2015). Há ainda trabalhos que utilizam técnicas combinadas de extração aquosa, com aquecimento ou acidificações, e posterior extração etanólica (GAŠIĆ et al., 2014; SOUSA et al., 2016). Poucos trabalhos realizam extração com outros solventes como acetato de etila (KECKEŠ et al., 2013).

Os extratos obtidos são filtrados ou centrifugados e a identificação dos compostos é realizada por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) utilizando detector UV-Vis (CAN et al., 2015; CARLOS et al., 2012; SALGUEIRO et al., 2014; SOUSA et al., 2016) e/ou espectrofotometria de massas (FROZZA et al., 2013; GAŠIĆ et al., 2014; KECKEŠ et al., 2013). A grande variedade de compostos isolados de mel e própolis advém das diferenças de flora, região e clima de onde o néctar ou a seiva foram coletados (DA SILVA et al., 2016; ETERAF-OSKOU EI; NAJAFI, 2013; HABIB et al., 2014). Dentre os compostos com atividade antioxidante destacam-se os compostos fenólicos. Estes foram extraídos, isolados e caracterizados, sendo classificados em dois grandes grupos: ácidos fenólicos ou flavonoides.

O grupo dos ácidos fenólicos divide-se em dois grandes grupos: os derivados do ácido hidroxibenzoico (Figura 1A) e os derivados do ácido hidroxicinâmico (Figura 1B). Os derivados do ácido benzoico incluem os ácidos salicílico, gentístico, p-hidroxibenzoico, protocatecuico, vanílico, gálico, siríngico e outros. Estes constituem os compostos fenólicos mais simples encontrados em vários alimentos (GÖÇER; GÜLÇIN, 2011; SOARES, 2002). Os derivados do ácido hidroxicinâmico compreendem os ácidos p-cumárico, cafeico, ferúlico, dentre outros. Eles podem também se apresentar de forma conjugada entre si ou com outros compostos orgânicos. É o caso do ácido clorogênico, que representa a combinação do ácido quínico com o ácido cafeico (GÖÇER; GÜLÇIN, 2011; SOARES, 2002). Todos os ácidos fenólicos citados já foram descritos em amostras de mel e própolis, em diferentes concentrações, de acordo com a flora coletada pelas abelhas (KECKEŠ et al., 2013; SOUSA et al., 2016).

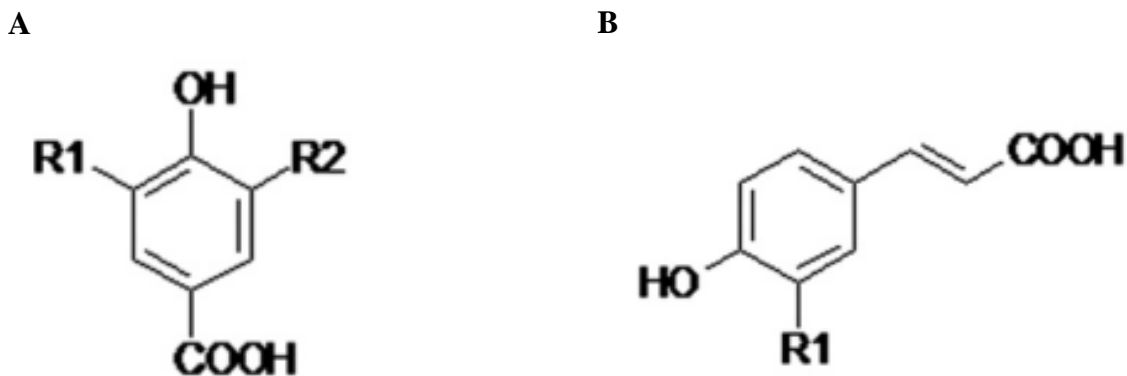


Figura 1 - (A) Estrutura geral dos derivados de ácido benzoico (ácido benzoico, R1 = R2 = H);
 (B) Estrutura geral dos derivados do ácido hidroxicinâmico (ácido hidroxicinâmico R1 = H)
 (DA SILVA et al., 2016).

Os flavonoides são um grupo de substâncias que compreende as classes dos flavonóis, flavonas, flavononas, isoflavonas, catequinas e antocianinas (Figura 2). Apresentam uma grande variedade de substâncias e contém a estrutura básica de três anéis aromáticos. Nas plantas desempenha funções como a pigmentação de frutos e flores, a regulação do crescimento vegetal e a proteção da planta contra agentes oxidativos (PROCHÁZKOVÁ; BOUŠOVÁ; WILHELMOVÁ, 2011; SILVA et al., 2015). Em amostras de mel e própolis já foram descritos naringenina, crisina, rutina, morina, canferol, miricetina, hesperidina, apigenina, dentre outros (DA SILVA et al., 2013; GAŠIĆ et al., 2014; KECKEŠ et al., 2013; SOUSA et al., 2016).

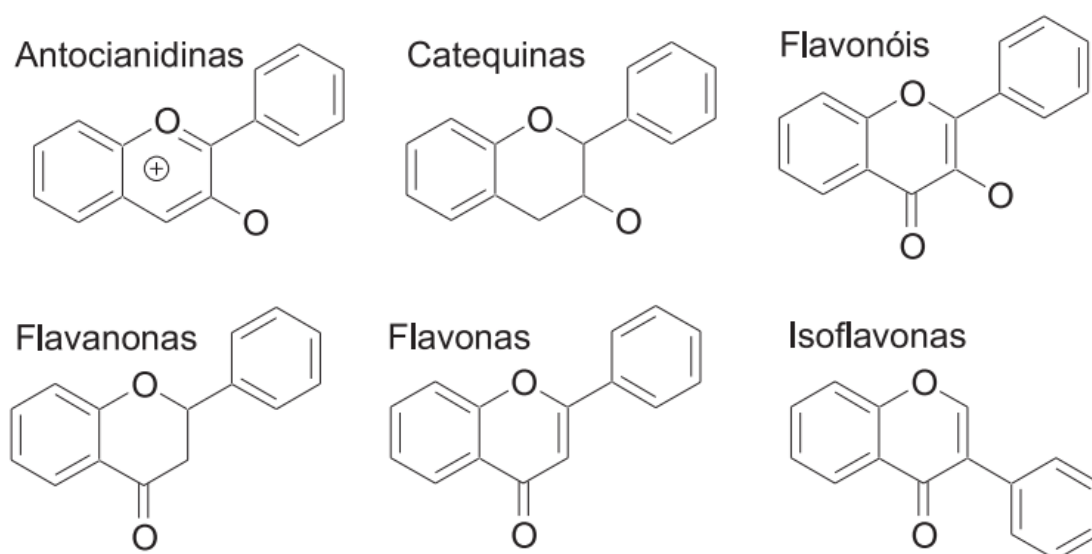


Figura 2 - Estrutura química dos principais tipos de flavonoides
 (MARÇO; POPPI; SCARMINIO, 2008).

2.3 Avaliação da Capacidade Antioxidante *in vitro*

Diversos trabalhos, após caracterizar os constituintes do mel e da própolis, testam o potencial antioxidante *in vitro* dos ácidos fenólicos e flavonoides isolados que, em sua maioria, apresentam estruturas químicas que lhes fornecem características para participarem de reações de óxi-redução.

Vários métodos são utilizados para determinar a capacidade antioxidante em extratos e substâncias isoladas; um dos mais usados consiste em avaliar a atividade sequestradora do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH•), de coloração púrpura que absorve a 515nm. Por ação de um antioxidante ou uma espécie radicalar, o DPPH• é reduzido formando 2,2-difenil-picril-hidrazina, de coloração amarela, com conseqüente desaparecimento da absorção, podendo a mesma ser monitorada pelo decréscimo por espectrofotometria. A partir dos resultados obtidos determina-se a porcentagem de atividade antioxidante de uma substância. Este valor corresponde à quantidade de DPPH consumida pelo antioxidante, sendo que a quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50% é denominada concentração eficiente (CE₅₀), também chamada de concentração inibitória (CI₅₀). Quanto maior o consumo de DPPH por uma amostra, menor será a sua CE₅₀ e maior a sua atividade antioxidante (SOUSA et al., 2007).

Outras metodologias recorrentes na literatura são o método 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido-sulfônico (ABTS), que tem o fundamento comum de avaliar a capacidade de uma substância sequestrar radicais do reagente, causando alteração de cor mensurável em espectrofotômetro; o FRAP, que baseia-se na capacidade de uma substância reduzir o Fe³⁺ do reagente; e capacidade de absorção de radicais oxigenados (Oxygen Radical Absorbance Capacity- ORAC), que avalia a atividade antioxidante através da inibição da oxidação, induzida pelo radical peróxil, por transferência de átomos de hidrogênio (CAN et al., 2015; CARLOS et al., 2012; CRUZ, 2011).

Estes métodos, entretanto, avaliam apenas reações isoladas de sequestro de radicais e não simulam condições encontradas no interior das células, como interações metabólicas e indução de enzimas. Além disso, existe na literatura uma grande divergência nos valores encontrados para atividade antioxidante *in vitro* dos mesmos. Na Tabela 1 estão listados os valores obtidos pelo método DPPH em CE₅₀ (µg/mL).

Tabela 1 - Atividade antioxidante de compostos fenólicos pelo método DPPH em $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (CE_{50}) e o solvente utilizado.

ÁCIDOS FENÓLICOS						
<i>Derivados do ácido hidroxicinâmico</i>						
	CE_{50}	solvente	CE_{50}	solvente	CE_{50}	solvente
Ácido clorogênico	$34,72 \pm 1,45^A$	M	$1,75 \pm 0,003^B$	Et	$112,37 \pm 2,3^C$	M
Ácido ferúlico	$4,79 \pm 0,25^D$	M	$30,07 \pm 0,54^E$	Et	$1,49 \pm 0,017^B$	Et
Éster fenílico do ácido cafeico (CAPE)	$12,8^C$	M	$4,27 \pm 0,10^E$	Et	$3,3^F$	N.D.
Ácido cafeico	$1,24 \pm 0,013^B$	Et	$6,46 \pm 0,17^E$	ET	$12,1 \pm 0,2^H$	M e Et
<i>Derivados do ácido hidroxibenzoico</i>						
Ácido gálico	$15,09 \pm 0,98^A$	M	$1,16 \pm 0,04^D$	M	$5,1 \pm 0,1^H$	M e Et
Ácido siríngico	$1,33 \pm 0,012^B$	Et	$2,42 \pm 0,27^D$	M	$12,3 \pm 0,0^H$	M e Et
Ácido protocatecuico	$1,29 \pm 0,007^B$	Et	$2,30 \pm 0,84^D$	M	$11,1 \pm 0,0^H$	M e Et
FLAVONOIDES						
Flavonóis						
Quercetina	$25,98 \pm 0,71^A$	M	$9,53 \pm 0,36^G$	Et	$5,5 \pm 0,0^H$	M e Et
Morina	$41,93 \pm 2,96^A$	M	$2,75 \pm 0,041^B$	Et	$16,5 \pm 0,4^H$	M e Et
Galangina	$0,705 \pm 0,003^B$	Et	$91,19 \pm 25,05^D$	M	$0,24 \pm 0,03^G$	Et
Miricetina	$3,6 \pm 0,1^A$	M	$1,38 \pm 0,008^B$	Et	$9,05 \pm 0,10^G$	Et
Canferol	$1,32 \pm 0,013^B$	Et	$2,63 \pm 0,05^G$	Et	$18,8 \pm 0,0^H$	M e Et
Flavonoides glicosilados						
Rutina	$33,35 \pm 0,28^A$	M	$5,77 \pm 0,36^G$	Et	$5,3 \pm 0,1^H$	M e Et

A - (SETHIYA; TRIVEDI; MISHRA, 2014), B - (CAI et al., 2006), C - (XIANG; NING, 2008), D - (SALGUEIRO et al., 2014), E - (WU et al., 2007), F - (GÖÇER; GÜLÇİN, 2011), G - (MASUOKA; MATSUDA; KUBO, 2012), H - (VILLAÑO et al., 2007), M- Metanol, ET- Etanol, N.D.- Não descrito

Esta grande variação nos resultados utilizando o método do DPPH, que também é observada em outros métodos (CAI et al., 2006; ZHANG et al., 2015b), dificulta a distinção de qual substância tem maior eficácia na proteção contra os radicais livres. Soma-se a isto a desvantagem de não haver semelhança com ambientes intracelulares, o que pode trazer grandes discussões sobre que compostos ou classe de compostos serão mais eficientes em testes com células animais (SOVA, 2012).

2.4 Mecanismo de Ação dos Compostos Fenólicos

Diversos mecanismos já foram propostos para justificar a ação antioxidante observada nos compostos fenólicos. O primeiro seria a remoção direta de radicais por meio da formação de compostos mais estáveis, a partir do fornecimento de hidrogênio para compostos radicalares (Figura 3). Os diversos híbridos de ressonância possíveis na estrutura de flavonoides e ácidos fenólicos os tornam menos reativos, diminuindo o poder deletério de outras espécies reativas (GREGORIS; STEVANATO, 2010).

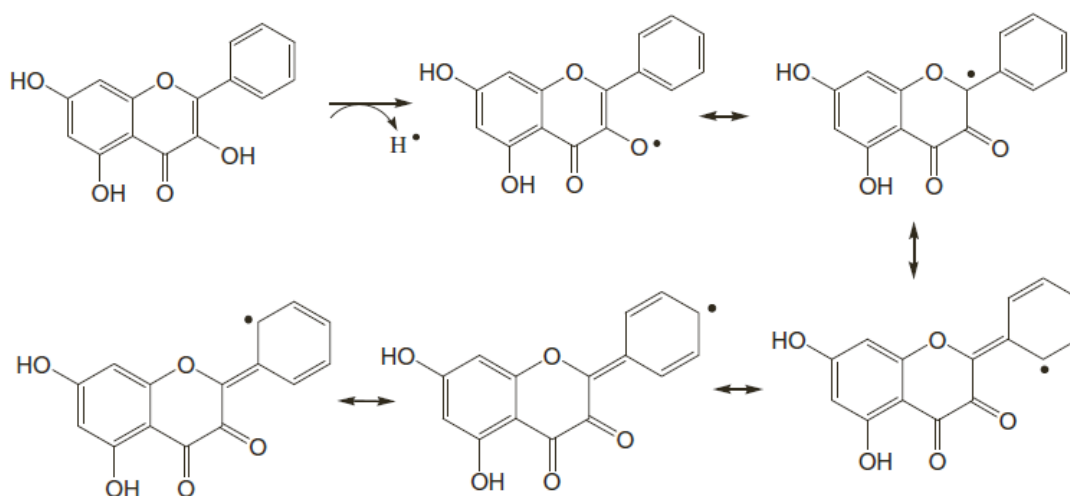


Figura 3 - Estruturas de ressonância de estabilização de radical por oxidação monoelétrica de grupo hidroxila em galangina (GREGORIS; STEVANATO, 2010).

Outro mecanismo de seu potencial antioxidante é a sua atuação como quelante de metais (Figura 4), que são catalisadores das reações de Fenton e Waber-Heiss e propagadores na formação de EROs; diminuindo, portanto, o estresse oxidativo intracelular (LI et al., 2014).

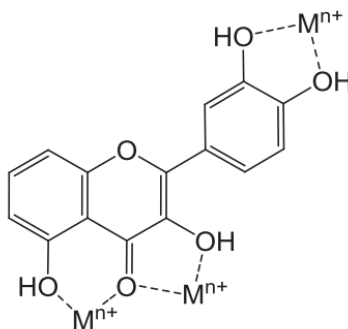


Figura 4 - Possíveis pontos de coordenação de flavonoides com metais (PROCHÁZKOVÁ; BOUŠOVÁ; WILHELMOVÁ, 2011).

As atividades *in vitro* de compostos fenólicos são dependentes da sua estrutura. Em flavonoides (Figura 5A) já foi observada que a presença de hidroxilas na posição orto (Figura 5B), principalmente no anel B; a presença de ligação dupla com oxigênio no anel C (Figura 5C) e grupos hidroxilas nas posições 3 e 5 (Figura 5D) aumentam o potencial antioxidante, uma vez que contribuem para a estabilização de estruturas de ressonância (CAI et al., 2006; PROCHÁZKOVÁ; BOUŠOVÁ; WILHELMOVÁ, 2011). A presença de glicosídios, entretanto, reduz a capacidade antioxidante; como, por exemplo, o flavonoide quercetina, que apresenta 50% mais atividade que a rutina, a qual possui mesma estrutura, porém com glicosilações (PROCHÁZKOVÁ; BOUŠOVÁ; WILHELMOVÁ, 2011).

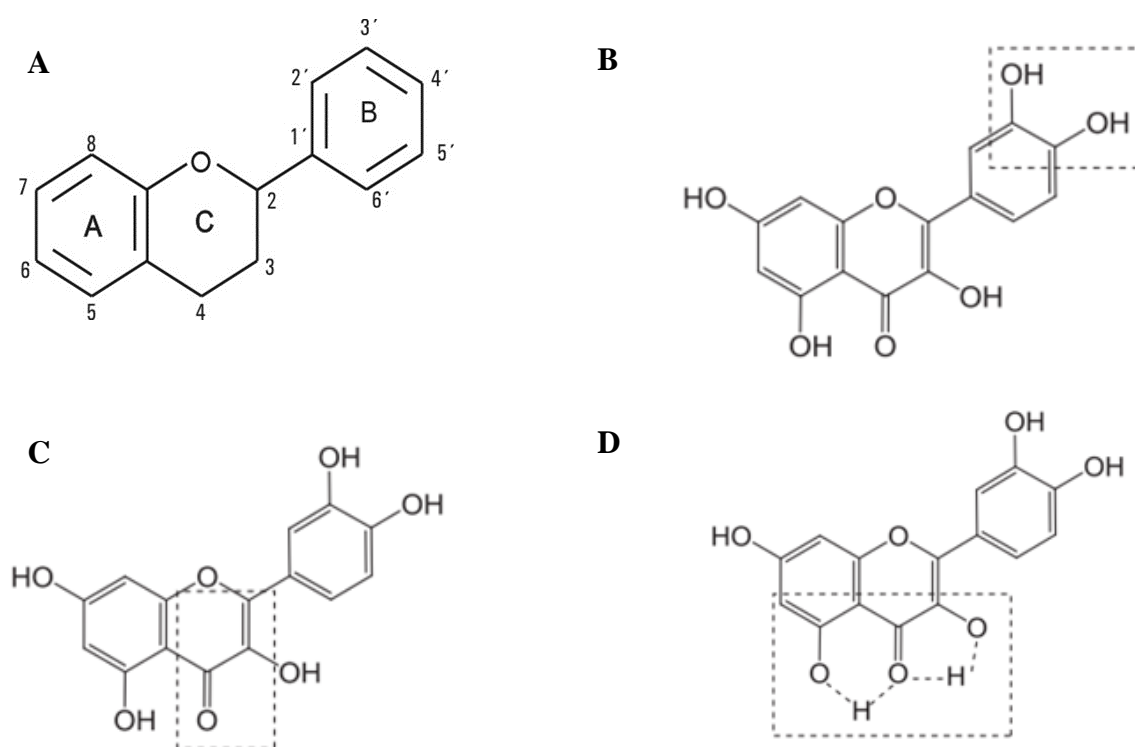


Figura 5 - (A) Estrutura química dos flavonoides; (B) Hidroxilas em posição orto; (C) Presença de ligação dupla de oxigênio na posição 5 do anel C; (D) Presença de hidroxilas na posição 3 e 5 (PROCHÁZKOVÁ; BOUŠOVÁ; WILHELMOVÁ, 2011; REGINATO; DA SILVA; BAUERMANN, 2015).

Os ácidos fenólicos têm atividade aumentada com a presença de hidroxilas na posição orto (Figura 6) ou grupos carbonílicos em posição orto a hidroxilas, como acontece com o ácido siríngico (CAI et al., 2006). Além disso, de uma maneira geral os ácidos hidroxicinâmicos tem atividades *in vitro* mais elevadas que os ácidos hidroxibenzoicos (SOVA, 2012).

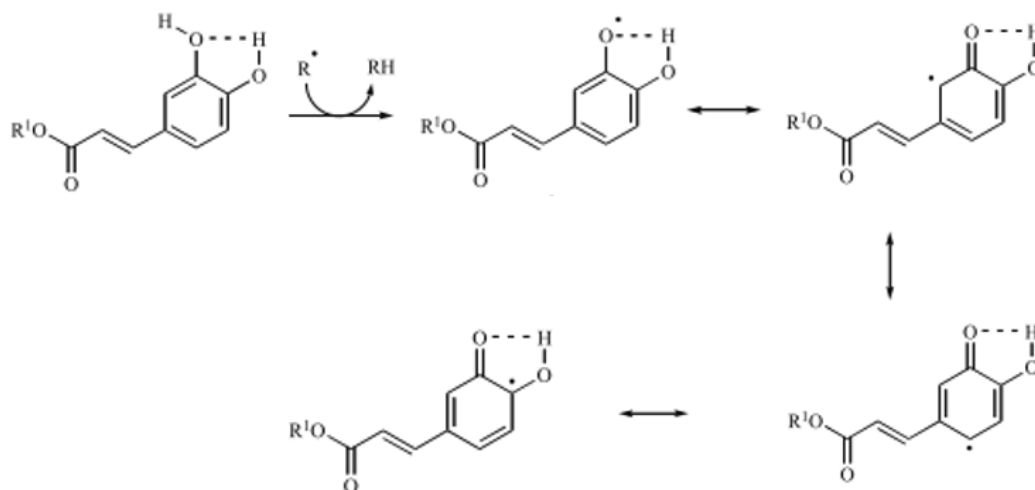


Figura 6 - Mecanismo de sequestro de radical por ácido hidroxicinâmico, incluindo estabilização por ressonância de radical por meio de ligação intramolecular de hidrogênio (SOVA, 2012).

No entanto, ensaios em modelos biológicos apontam que os flavonoides e outros compostos fenólicos atuam modulando a expressão e a atividade de enzimas relacionadas às defesas antioxidantes (BELINHA et al., 2007; FENG et al., 2005). Os compostos fenólicos teriam capacidade de induzir enzimas de fase II, como a NADPH quinona redutase e a GST, além de inibir enzimas ligadas a carcinogênese, como a Proteína de Ativação 1 (AP1), NF- κ B e MAPkinases (FENG et al., 2005; PROCHÁZKOVÁ; BOUŠOVÁ; WILHELMOVÁ, 2011).

É importante também ressaltar que compostos fenólicos têm também atividade pró-oxidante dependente de sua concentração. A presença das hidroxilas na posição orto pode também produzir radicais ou peróxido de hidrogênio, quando na presença de íons cobre e moléculas de oxigênio (LAMBERT; ELIAS, 2010; MAURYA; DEVASAGAYAM, 2010). Os flavonoides rutina e morina em concentrações acima de $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ foram capazes de produzir peróxido de hidrogênio e danificar o DNA, através de ensaio cometa em linfócitos humanos. Entretanto, naringenina e hesperidina, que não possuem hidroxilas em posição orto no anel B, não causaram este efeito nesta mesma concentração (YEN et al., 2003). O mecanismo de geração de peróxido de hidrogênio ou radicais pode explicar a ação antimicrobiana de flavonoides e seus efeitos tóxicos em concentrações mais elevadas (PROCHÁZKOVÁ; BOUŠOVÁ; WILHELMOVÁ, 2011).

Neste trabalho foram selecionados os ácidos fenólicos siríngico e clorogênico e os flavonoides morina e rutina para avaliação de suas atividades antioxidantes *in vivo*. De acordo com a Tabela 1, alguns trabalhos apontam esses compostos com valores de CE_{50}

relativamente baixos e, além disso, possuem poucos trabalhos científicos de atividade antioxidante em modelos biológicos eucariotos.

O ácido 3,5-dimetóxi-4-hidróxibenzoico, mais conhecido como ácido siríngico (Figura 7A), pode ser encontrado em uvas e em seus produtos derivados, como o vinho. Sua estrutura é derivada do ácido benzoico. Já o ácido 5-cafeoil-quínico ou ácido clorogênico (Figura 7B) é um derivado do ácido cinâmico, e é encontrado comumente em sementes de café e oliva, chá preto, maçã e batatas (ROLEIRA et al., 2015).

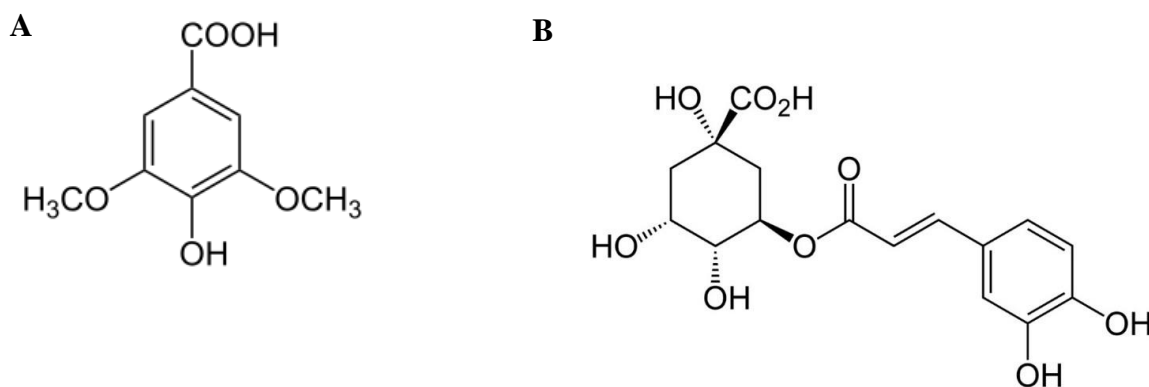


Figura 7 - (A) Estrutura química do ácido siríngico e (B) Estrutura química do ácido clorogênico (FARAH; DUARTE, 2015; SOARES, 2002).

A rutina (Figura 8A) é um flavonoide glicosilado encontrado em variedades de trigo, aspargos e outros vegetais, e possui diversos estudos indicando suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e antitumorais (YANG; GUO; YUAN, 2008). A morina (Figura 8B) é um flavonoide da classe dos flavonóis e apresenta-se distribuído em uma grande gama de alimentos, como cebola, goiaba, algas, uva, dentre outros (MENDOZA-WILSON; SANTACRUZ-ORTEGA; BALANDRÁN-QUINTANA, 2011). Diversos estudos atribuem a esta substância propriedades antioxidante, anti-inflamatória e anti-hepatotóxica (VENU GOPAL, 2013).

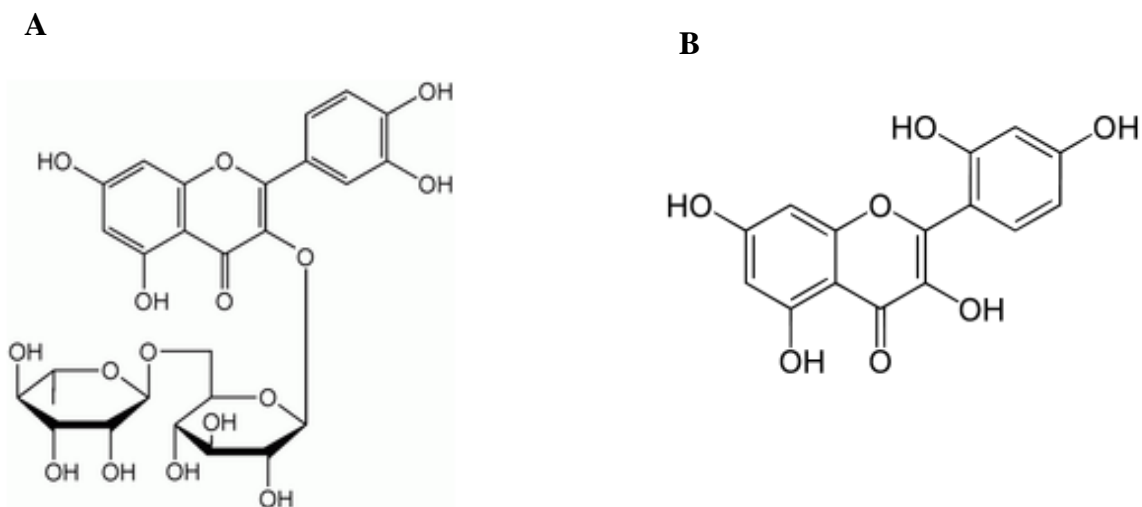


Figura 8 - (A) Estrutura química do flavonoide rutina e (B) Estrutura química do flavonoide morina (MASUOKA; MATSUDA; KUBO, 2012; VENU GOPAL, 2013).

2.5 Modelo Biológico Eucariótico: *Saccharomyces cerevisiae*

Os ensaios antioxidantes *in vitro* não mimetizam condições fisiológicas, como a concentração de metabólitos intracelulares; nem considera fatores metabólicos como biodisponibilidade e transformações enzimáticas (SOVA, 2012). Uma alternativa são os ensaios *in vivo* em células de levedura, mais precisamente da espécie *Saccharomyces cerevisiae*. Eles são organismos eucarióticos unicelulares amplamente estudados e possuem grande semelhança com células de mamíferos superiores; principalmente no que se referem às macromoléculas, estruturas, organelas e ortologia com proteínas humanas. Estas características tornam estas células ferramentas importantes nas pesquisas sobre mutagênese, reparo do DNA e mecanismos de resposta ao estresse oxidativo (TREUSCH et al., 2011).

A *S. cerevisiae* pertence ao grupo das leveduras anaeróbias facultativas, ou seja, obtém energia por meio de fermentação de hexoses ou por meio de respiração celular, desta forma estão também expostas continuamente às EROs oriundas do metabolismo aeróbico. Como possuem ortologia com os sistemas antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos de mamíferos superiores, elas se tornam um interessante modelo biológico para a avaliação da atividade biológica relacionada a extratos e moléculas naturais (COSTA; MORADAS-FERREIRA, 2001).

O uso de células de *S. cerevisiae* como modelo de estudo apresenta ainda outras importantes vantagens, visto que seu genoma está completamente elucidado, facilitando assim

a obtenção de cepas geneticamente modificadas para estudos mais direcionados; somando-se a isso o seu baixo custo de manutenção das células, facilidade de manipulação em laboratório, rapidez de crescimento e baixa taxa de mutações espontâneas (LUSHCHAK, 2006). Diversos trabalhos da literatura utilizam estas células como modelo de estudo para atividade antioxidante (SÁ et al., 2013; SADOWSKA-BARTOSZ et al., 2013; WU et al., 2011).

A determinação do metabolismo utilizado pela levedura, aeróbico ou fermentativo, é dependente da concentração de açúcares no meio extracelular. Na presença de concentrações superiores a 0,2% de açúcares fermentáveis ocorre o metabolismo anaeróbico; enquanto que abaixo de 0,2%, ocorre ativação das enzimas que participam da biossíntese de moléculas responsáveis pelo funcionamento da mitocôndria e ativação de genes necessários ao metabolismo respiratório. Esta mudança de fonte energética leva a uma alteração na sua cinética de crescimento celular (Figura 9), com um crescimento mais lento (BRAUER et al., 2005).

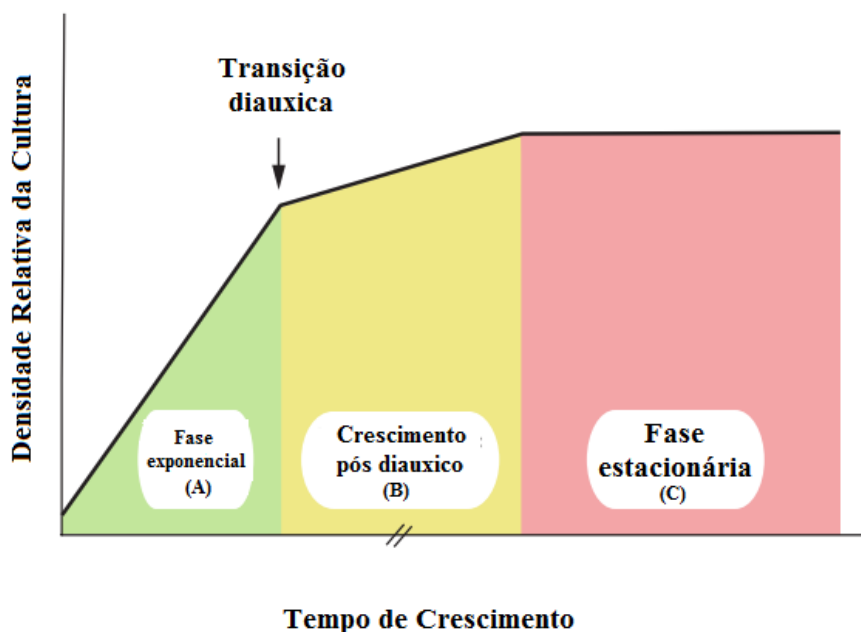


Figura 9 - Etapas da cinética de crescimento de leveduras, de acordo com a fonte energética (HERMAN, 2002).

Após sua incubação em meio rico contendo hexoses, as células iniciam uma intensa divisão celular utilizando como fonte energética o processo de fermentação. Esta fase caracteriza-se por um crescimento exponencial na quantidade de células; sendo, portanto, chamada de fase exponencial ou fermentativa (Figura 9A). Este crescimento leva a um grande

consumo da fonte de energia (hexoses) e formação de álcool como metabólito. Após a depleção da fonte energética, as células realizam a transição diáuxica, na qual ocorre uma parada transiente na divisão celular, enquanto as células são preparadas para o metabolismo respiratório (Figura 9B). A seguir as células reassumem a divisão celular em um ritmo mais lento, utilizando o etanol como fonte de carbono produzido durante a fermentação (fase pós-diáuxica ou metabolismo respiratório). Quando boa parte das fontes de carbono estiver exaurida, as células entram na fase estacionária (Figura 9C), onde podem sobreviver por algum tempo na ausência de nutrientes (LAVOVÁ et al., 2014).

2.6 Estresse Oxidativo

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), as doenças crônicas não transmissíveis são as principais causas de óbitos no mundo, além de gerar perda de qualidade de vida da população e grandes impactos econômicos para as famílias, comunidades e governos (LI et al., 2014; LOZANO et al., 2012). Dentre estas doenças podem ser citadas o diabetes, a obesidade, doenças neurodegenerativas como Alzheimer e Parkinson, a aterosclerose e o câncer. Vários estudos concluem que a geração de estresse oxidativo, por meio de radicais livres ou outras substâncias oxidantes; desencadeia eventos patológicos que, por sua vez, estão relacionados a problemas cardiovasculares, carcinogênese e danos neurodegenerativos (LI et al., 2014; VAN RAAMSDONK; HEKIMI, 2012; YE et al., 2014).

Os radicais livres são átomos ou moléculas que possuem pelo menos um elétron desemparelhado em seus orbitais externos, permitindo a transferência de elétrons a moléculas vizinhas. Alguns exemplos são os radicais superóxido ($O_2^{\cdot-}$), hidroperoxila (HO_2^{\cdot}) e hidroxila ($\cdot OH$); sendo que este último é considerado um dos radicais mais reativos dentre as espécies reativas de oxigênio, capaz de reagir com a maioria das biomoléculas com constantes de velocidade que variam de 10^7 a $10^{10} M^{-1} \cdot s^{-1}$. O radical hidroxila pode ser formado através da reação entre o radical superóxido e a molécula de peróxido de hidrogênio, conhecida como reação de Haber-Weiss (Equação 1) (DEMIDCHIK, 2014).



Embora outros metais divalentes possam participar desta catálise, como por exemplo o cobre; o ferro é o íon metálico mais abundante no organismo, sendo, portanto, um dos principais agentes de catálise deste tipo de reação. A maior parte do ferro se encontra complexada na glicoproteína transferrina produzida pelo fígado, em situações atípicas estas

podem estar insuficientes e permitir a circulação de ferro livre no organismo (ORINO et al., 2001).

Os compostos não radicalares, como H₂O₂ (peróxido de hidrogênio) e HOCl (ácido hipocloroso), não possuem elétrons livres, sendo portanto menos instáveis que os radicais livres, mas também podem reagir com moléculas próximas (JENSEN, 2003). O peróxido de hidrogênio tem a capacidade de atravessar camadas lipídicas por meio de canais de água, permitindo a ocorrência de reações de oxidação numa grande variedade de tecidos (BIENERT; SCHJOERRING; JAHN, 2006; LUSHCHAK, 2010). Sua toxicidade é aumentada na presença de metais devido à ocorrência da reação de Fenton (STĘPNIAK; LEWIŃSKI; KARBOWNIK-LEWIŃSKA, 2013) (Equações 2 e 3)



Em organismos aeróbios, as EROs são formadas naturalmente pelo metabolismo, e possuem funções fisiológicas importantes; como sinalização de processos inflamatórios, sinalização celular, através da ativação da guanilato ciclase com a formação do segundo mensageiro da guanosina monofato cíclica, e indução de divisão das células (VALKO et al., 2007). Fontes externas, como a radiação UV, tabagismo, poluentes, drogas, dietas excessivamente calóricas, excesso de exercícios físicos, pesticidas e solventes industriais, também podem induzir a formação de radicais livres.

A situação de estresse se configura quando há um desbalanço entre a concentração das EROs e as defesas antioxidantes, podendo esta condição de estresse ser resultado de: (a) um aumento excessivo na produção das EROs; (b) uma diminuição da capacidade de defesa celular antioxidante; (c) ou ainda por ambos (BARBOSA et al., 2010). A principal fonte de EROs dentro das células é a mitocôndria. Cerca de 90% do oxigênio absorvido é convertido diretamente em água na mitocôndria através da enzima citocromo oxidase, que catalisa a transferência de 4 elétrons e 4 prótons para a molécula de oxigênio molecular, originando água e possibilitando a geração de energia na forma de moléculas de ATP pela ATP sintase (Figura 10).

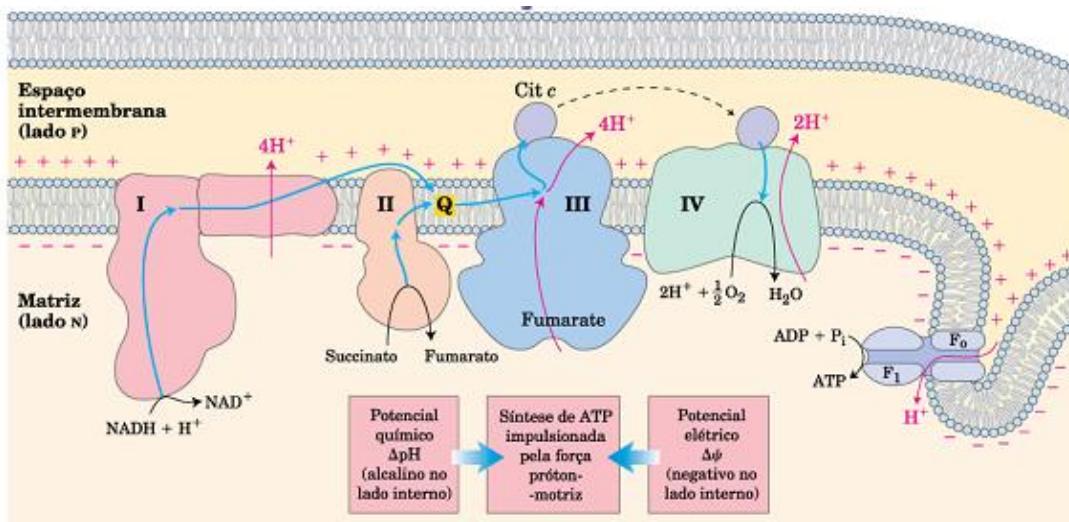


Figura 10 - Cadeia transportadora de elétrons e ATP sintase (NELSON; COX, 2014).

A ação da citocromo oxidase controla a geração de radicais livres, impedindo sua geração excessiva na mitocôndria (Figura 11a). No entanto, cerca de 2% a 5% do oxigênio metabolizado é desviado para outras vias metabólicas; e reduzidos de forma univalente, dando origem aos radicais livres (BARBOSA et al., 2010). A primeira redução do oxigênio com apenas um elétron origina o ânion radical superóxido ($O_2^{\bullet -}$) (Figura 11b). Esta reação pode ser seguida da aceitação de dois prótons e formação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Figura 11c). Este último não é uma espécie radicalar, uma vez que não apresenta elétrons desemparelhados na última camada eletrônica; entretanto ao aceitar mais um elétron, sofre cisão originando ânion hidroxila (OH^-) e radical hidroxila ($\bullet OH$) (Figura 11d). Estas espécies ao receberem um próton e um elétron formam moléculas de água (Figura 11e) (LUSHCHAK, 2014).

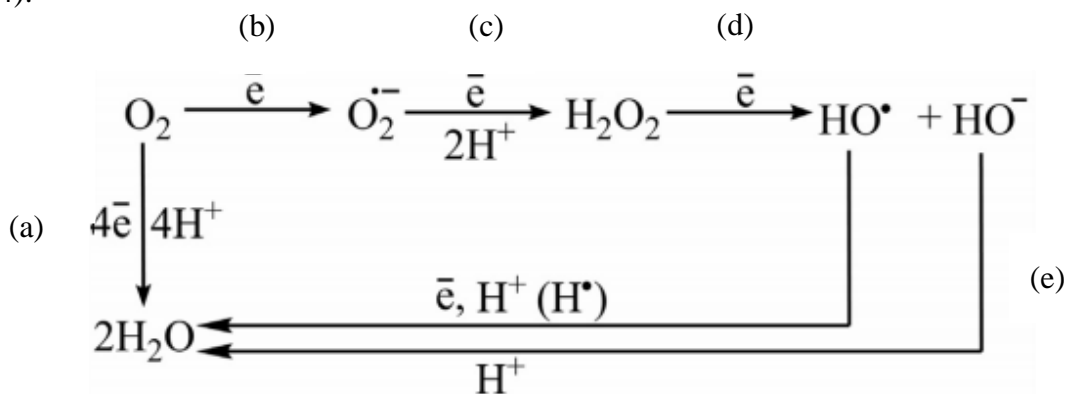


Figura 11 - Etapas da redução da água na cadeia transportadora de elétrons: (a) Reação acoplada à síntese de ATP pela ATP sintase; (b) Redução do oxigênio com apenas um elétron; (c) Formação de peróxido de hidrogênio através da adição de dois prótons; (d) Formação de ânion e radical hidroxila através da adição de um elétron (LUSHCHAK, 2014).

Além de vir da mitocôndria, as EROs também podem ser formadas pela ação de enzimas oxidases, como a citocromo P450 e a NADPH oxidase. O poder deletério das espécies reativas de oxigênio está na sua baixa estabilidade e com isso elevada reatividade, o que leva a facilidade de reação com diversas biomoléculas, como lipídios, proteínas e DNA; com a consequente perda de suas funções biológicas. Estes danos prejudicam o funcionamento de tecidos e órgãos, podendo originar ou acelerar o quadro bioquímico relacionado às diversas patologias (LI et al., 2014).

Os mecanismos envolvidos na oxidação de proteínas por EROs foram melhor esclarecidos por estudos em que aminoácidos pépticos e proteínas simples foram expostos a radiação ionizante, sob condições em que os radicais hidroxila e superóxido eram formados. Evidenciou-se com este ensaio que as cadeias laterais de todos os aminoácidos dos resíduos de proteínas, em particular metionina e cisteína, são susceptíveis à oxidação pela ação de EROs. A oxidação de resíduos de cisteína leva à formação reversível de ligações dissulfeto (-SS) onde antes haviam sulfidrilas (-SH); comprometendo a estrutura, a estabilidade e a função das proteínas (COSTA; MORADAS-FERREIRA, 2001; IMLAY, 2013; VALKO et al., 2007).

A molécula de DNA pode ser danificada tanto nas bases purínicas e pirimidínicas, quanto nos açúcares ou na ligação fosfodiéster; principalmente pelo radical hidroxila que é o mais reativo. A modificação permanente do material genético e o seu não reparo por sistemas específicos representa o primeiro passo envolvido em mutagênese, carcinogênese e envelhecimento (DEMIDCHIK, 2014; IMLAY, 2013).

Os lipídios poliinsaturados presentes em diversas membranas celulares são altamente susceptíveis à oxidação por radicais livres. O processo envolve as etapas de iniciação, propagação e terminação (SHAHIDI; AMBIGAIPALAN, 2015). A reação se inicia com o sequestro do hidrogênio do ácido graxo poliinsaturado por espécies radiculares com a consequente formação do radical lipídico ($L\bullet$) (Equação 4). Na etapa de propagação, o radical lipídico formado reage rapidamente com o oxigênio molecular, formando um radical peroxila ($LOO\bullet$) (Equação 5). Este por sua vez sequestra um novo hidrogênio do ácido graxo poliinsaturado, formando novamente o radical lipídico da fase de propagação (Equação 6). O término da lipoperoxidação ocorre quando os radicais produzidos nas etapas anteriores reagem entre si, desfazendo as espécies radicares (Equação 7) (SHAHIDI; AMBIGAIPALAN, 2015).



Uma vez formados, os radicais peroxil (LOO•) podem sofrer reação de ciclização a endoperóxidos (Figura 12), precursores de malonaldeído (MDA). Diversos estudos demonstram que o MDA é mutagênico em bactérias e células de mamíferos, e carcinogênico em ratos (VALKO et al., 2007). Um segundo produto relevante da peroxidação lipídica é o 4-hidróxi-2-nonenal (HNE). Os ensaios com esta substância mostram baixo potencial mutagênico, entretanto elevada toxidez às células testadas (VALKO et al., 2007).

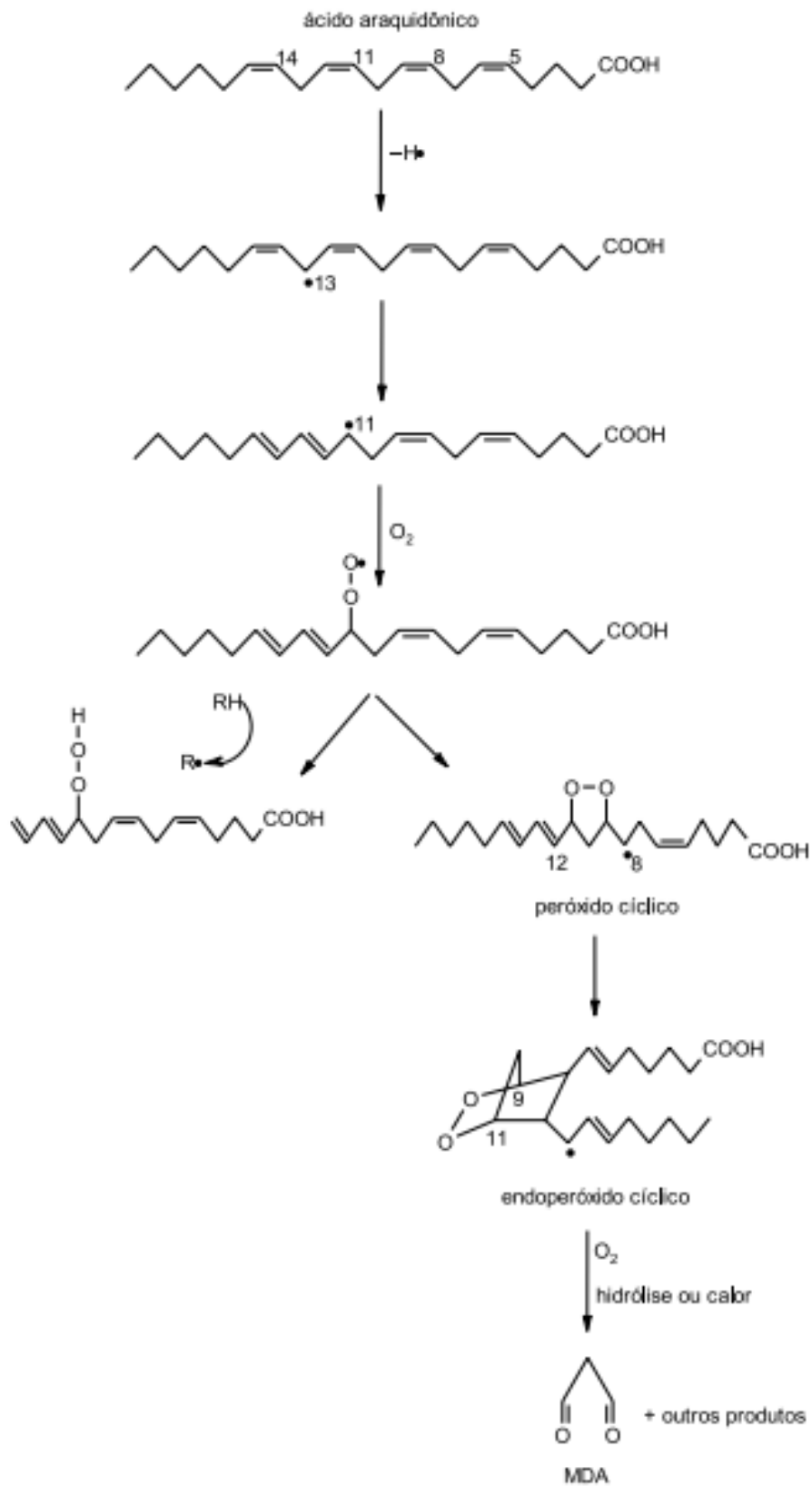


Figura 12 - Esquema proposto para a formação de hidroperóxidos lipídicos e peróxidos cíclicos a partir do ácido araquidônico (LOUREIRO; DI; MEDEIROS, 2002).

O acúmulo de produtos da peroxidação lipídica fornece um importante marcador bioquímico de estresse oxidativo. Existe forte correlação entre as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA) (Figura 13), como os marcadores de peroxidação lipídica; e os produtos que refletem dano oxidativo no DNA das células (NELSON et al., 2006).

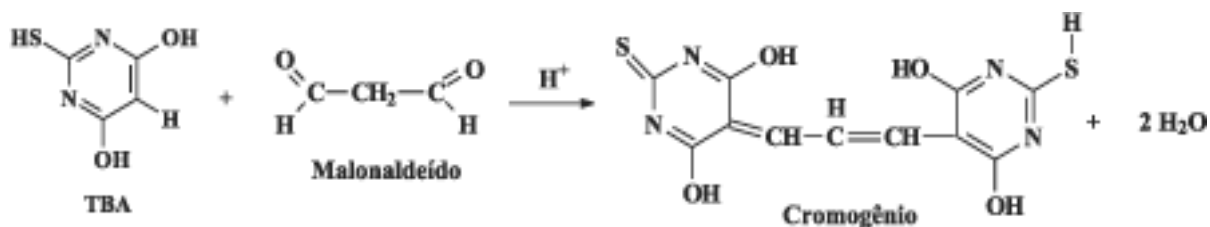


Figura 13 - Reação entre o ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) e o malonaldeído, formando composto colorido medido espectrofotometricamente a 532nm (OSAWA; DE FELÍCIO; GONÇALVES, 2005).

2.7 Sistema de Defesa Antioxidante Enzimático

As defesas antioxidantes intracelulares podem ser divididas em sistemas enzimáticos e não enzimáticos. O sistema enzimático inclui enzimas como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutaciona peroxidase (GPx); enquanto o sistema não enzimático inclui ácido ascórbico (vitamina C), tocoferol (vitamina E), glutaciona (GSH), carotenoides, flavonoides e outras substâncias com capacidade de diminuir a concentração de radicais livres (YE et al., 2014).

Em condições fisiológicas esses mecanismos de defesa mantêm a concentração de radicais livres a níveis não deletérios dentro das células, e suas concentrações são precisamente reguladas. Uma vez que a célula detecta condição de estresse, é ativada uma sequência de genes para sintetizar enzimas e moléculas de proteção (COSTA; MORADAS-FERREIRA, 2001).

2.7.1 Superóxido dismutase (SOD)

O ânion superóxido é um dos radicais oxidativos mais críticos devido a sua capacidade de gerar outras espécies mais reativas, tais como o radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$). A defesa fisiológica mais eficiente contra o radical $\text{O}_2\cdot^-$ é a enzima superóxido dismutase, que converte dois ânions superóxidos em uma molécula de peróxido de hidrogênio e outra de oxigênio molecular (Equação 8). O peróxido de hidrogênio formado é posteriormente

convertido em água e oxigênio pelas enzimas catalase ou glutathiona peroxidase (CARILLON et al., 2013).



A enzima Cu^{2+} , Zn^{2+} -superóxido dismutase (Cu, Zn-Sod) é sintetizada a partir do gene *SOD1*, e é encontrada no citoplasma celular (possui duas subunidades, cada uma contendo um átomo de cobre e um átomo de zinco). A Mn^{3+} -superóxido dismutase (Mn-Sod) é codificada pelo gene *SOD2*, tem localização mitocondrial e trata-se de uma enzima tetramérica, apresentando 1 átomo de manganês por subunidade. Atualmente sabe-se que uma série de alterações metabólicas é observada em células deficientes nos genes *SOD1*, *SOD2* ou em ambos. Em leveduras, estas alterações atingem desde defeitos metabólicos, como a incapacidade de mutantes Δsod1 crescerem em meios de carbono não fermentáveis como lactato; até mesmo uma hipersensibilidade a condições de estresse térmico e alcoólico (MANFREDINI et al., 2004). A alteração na atividade da enzima Sod1p em humanos parece estar associada a doenças cardiovasculares, doenças neurodegenerativas, como a Esclerose Lateral Amiotrófica e Alzheimer, e o câncer (AMARI et al., 2008; VALKO et al., 2007).

2.7.2 Catalase (CAT)

A catalase é uma enzima presente na maioria dos organismos vivos. Nas células eucariotas é encontrada nos peroxissomos e no citoplasma das células. Esta enzima é tetramérica e possui um grupo heme em cada subunidade com um átomo de ferro central no sítio ativo, que é o responsável por sua atividade catalítica. A reação catalisada por ela é a de quebra da molécula de peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular (Equação 9).



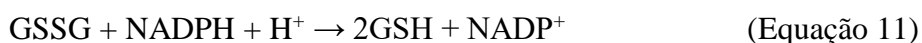
Em *S. cerevisiae* observa-se a presença de duas catalases, com as mesmas propriedades de mamíferos, no entanto em compartimentos distintos. A catalase A é uma proteína localizada no peroxissomo e é codificada pelo gene *CTA1*, enquanto a catalase T é citossólica, sendo codificada pelo gene *CTT1* (AMARI et al., 2008). A deleção de uma ou das duas catalases não altera o crescimento e a sensibilidade ao H_2O_2 em fase exponencial (LUSHCHAK, 2010; TOLEDANO et al., 2003). Porém, em fase estacionária, a linhagem contendo a dupla mutação ($\Delta\text{cta1}\Delta\text{ctt1}$) possui maior sensibilidade ao H_2O_2 quando comparada com o tipo selvagem e a linhagem com mutação simples. Isso indica que a

catalase de levedura age de forma mais preponderante na fase estacionária (TOLEDANO et al., 2003). A deleção do gene *CTA1* torna as células mais sensíveis ao estresse oxidativo do que a deleção em *CTT1* (AMARI et al., 2008).

2.8 Sistema de defesa antioxidante não-enzimático

Embora o sistema de defesa enzimático seja eficiente, o organismo conta ainda com um sistema de defesa antioxidante não enzimático (ROLEIRA et al., 2015). Este sistema é constituído por substâncias de baixo peso molecular, como a glutatona; e maiores, como a metalotioneína, que são metabólitos produzidos pelas células (BARBOSA et al., 2010).

A glutatona é um tripeptídeo constituído de ácido glutâmico, cisteína e glicina, sendo o grupo tiol da cisteína o local ativo responsável pelas suas propriedades bioquímicas (GOSTIMSKAYA; GRANT, 2016). Os níveis de GSH celular são mantidos a partir da enzima glutatona peroxidase (GPx) catalisa a redução de peróxido de hidrogênio e peróxidos orgânicos a seus correspondentes alcoólicos, as custas da conversão de glutatona reduzida (GSH) a glutatona oxidada (GSSG) (Equação 10); e glutatona redutase (GRd), que reduz a GSSG em GSH através da oxidação do NADPH proveniente do ciclo das pentoses (Equação 11). Esta enzima permite então a continuidade da ação da glutatona peroxidase (GOSTIMSKAYA; GRANT, 2016; LUSHCHAK, 2014).



O tripeptídeo glutatona tem elevada importância no sistema de defesa antioxidante, visto que ele possui ação em uma grande variedade de substratos, incluindo xenobióticos, radicais oriundos de radiação e substâncias cancerígenas. Mudanças na homeostase da glutatona estão associadas a processos de envelhecimento e à Doença de Parkinson (BRIGELIUS-FLOHÉ; MAIORINO, 2013). Similarmente à glutatona, a metalotioneína possui grupos sulfidrilas em sua estrutura, capazes de desintoxicar as células através de reações redox (LUSHCHAK, 2014).

A levedura *Δgsh1* é deficiente na produção de glutatona por não possuir a enzima γ -glutamylcisteína sintetase, responsável pela síntese do dipeptídeo Glu-Cis, que é um precursor para a enzima glutatona sintetase gerar o tripeptídeo Glu-Cis-Gli (Figura 14). Esta deleção produz uma cepa com maior sensibilidade a danos oxidativos que as outras citadas, uma vez que a glutatona é uma defesa mais abrangente que as enzimas catalase e superóxido

dismutase (BRIGELIUS-FLOHÉ; MAIORINO, 2013). Além disso, o balanço GSH/GSSG indica para a célula mudanças no estado redox intracelular e conseqüentemente a indução ou a repressão da transcrição de uma série de genes de defesa celular (MORGAN et al., 2013).

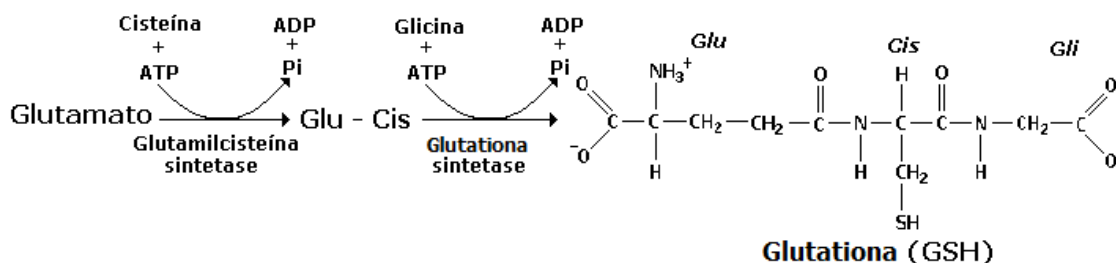


Figura 14 - Síntese do tripeptídeo glutatona.

A Figura 15 ilustra uma integração do sistema de defesa enzimático com a glutatona, contendo a formação das espécies reativas e as enzimas que participam da sua eliminação nas células.

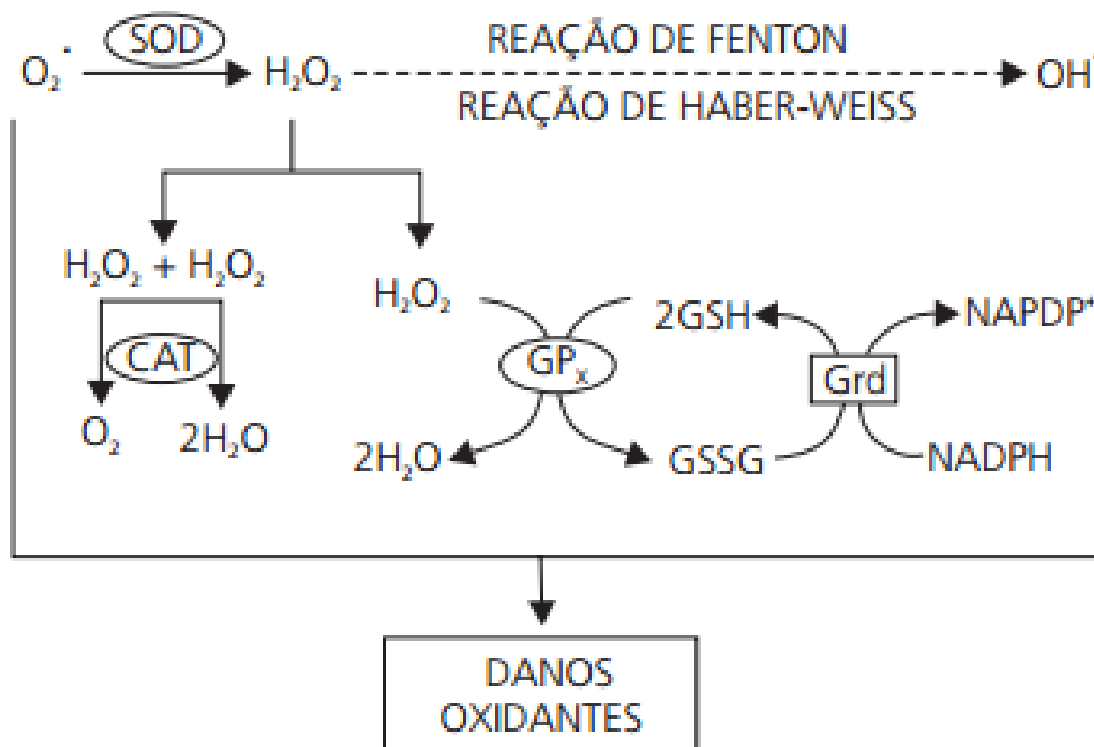


Figura 15 - Sistemas de defesa antioxidantes enzimáticos. CAT-Catalase, SOD-Superóxido dismutase, GPx-Glutaciona peroxidase, GRd-Glutaciona redutase, GSH-Glutaciona reduzida, GSSG-Glutaciona oxidada (BARBOSA, 2010).

Além das moléculas que são produzidas pelo organismo, outras substâncias são adquiridas através da dieta e atuam combatendo radicais livres dentro das células. Como exemplo destes antioxidantes exógenos podem ser citadas as vitaminas, como o ácido ascórbico e α -tocoferol; carotenoides, como licopeno; compostos fenólicos, como os encontrado em mel e própolis; e minerais, como o selênio. (KRISHNAIAH; SARBATLY; NITHYANANDAM, 2011).

O principal mecanismo destas espécies são os que já foram descritos para os compostos fenólicos neste trabalho. Ao doarem hidrogênio para espécies radicais instáveis, se tornam estruturas deficientes em elétrons, mas com estabilização por híbridos de ressonância. Esta propriedade os torna radicais estáveis e diminuem reações em cadeia que poderiam causar danos às biomoléculas. Entretanto, estas substâncias são capazes de estabilizar poucas moléculas radicais por molécula de antioxidante, diferente das enzimas que apenas uma unidade catalisa grande quantidade de reações por meio de regeneração do sítio ativo (SHAHIDI; AMBIGAIPALAN, 2015).

A ingestão regular de frutas, legumes, verduras e sementes, ricos em antioxidantes não enzimáticos, está associada a redução de incidência de doenças relacionadas a EROs; como doenças neurodegenerativas e diversos tipos de câncer (RAO et al., 2016; SHAHIDI; AMBIGAIPALAN, 2015).

3. OBJETIVO

Avaliar o potencial antioxidante *in vivo* de quatro classes de compostos fenólicos encontrados em variedades de mel e própolis brasileiros utilizando células de *Saccharomyces cerevisiae*.

3.1 Objetivos Específicos

- Avaliar o potencial antioxidante de quatro diferentes classes de compostos fenólicos encontradas em mel e própolis em um modelo biológico eucarioto;
- Verificar a relação entre a ação antioxidante de classes de compostos fenólicos e sistemas de defesa endógenos em células de *S. cerevisiae*;
- Comparar a eficiência antioxidante *in vivo* desses compostos com resultados *in vitro* e *in vivo* existentes em estudos da literatura específica;
- Avaliar outros compostos pertencentes à classe com maior potencial antioxidante.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

4.1.1 Meios de cultura

Para o estudo foram utilizadas diferentes formulações de meios de cultivo: meio YPD 2% líquido, composto de 1% de extrato de levedura (Difco, EUA) 2% de peptona (Difco, EUA) e 2% de glicose (Vetec, Brasil); meio YPD 2% sólido, constituído pelos mesmos compostos do meio YPD 2% líquido, porém com a adição de 2% de ágar (Difco, EUA) para solidificar o meio; e meio YPGly 4% sólido, composto de 1% de extrato de levedura, 2% de peptona, 4% de glicerol (Vetec, Brasil) e 2% de ágar para solidificar o meio.

Os erlenmeyers contendo meio YPD 2% líquido foram preparados obedecendo a razão de 5/1 de volume do frasco/meio de cultura no frasco. Os meios foram esterilizados em autoclave a 121°C por 15 minutos. Os meios sólidos eram vertidos em placas descartáveis estéreis no ambiente de fluxo laminar (Cabine horizontal com filtro ULPA, Marca Esco®).

4.1.2 Microrganismos e condições de cultivo

Foram utilizadas três cepas de *Saccharomyces cerevisiae* (Tabela 2) portadoras ou não de deficiências no sistema de defesa antioxidante.

Tabela 2 - Cepas de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas no trabalho.

<i>Cepas</i>	<i>Genótipos</i>	<i>Fenótipos</i>
BY4741	<i>MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0</i>	Controle
<i>Δsod1</i>	Isogênica da BY4741, exceto <i>YJR104c::kanMX4</i>	Cepa deficiente na enzima SOD citoplasmática (Sod1p)
<i>Δgsh1</i>	Isogênica da BY4741, exceto <i>YJL101c::kanMX4</i>	Cepa deficiente no tripeptídeo glutationa (Gsh1p)

As cepas foram adquiridas da companhia Euroscarf (<http://www.euroscarf.de/>), em Frankfurt, na Alemanha; e armazenadas em meio sólido YPD 2% a 4°C. No meio de

armazenamento das cepas mutantes houve adição de geneticina (0,02%), uma vez que a mutação confere resistência a este antibiótico.

4.1.3 Repique

Os repiques foram preparados através da transferência de alçada de cultura estoque do microrganismo para superfície de ágar contendo YPD 2% sólido inclinado em um tubo *viale*. Este tubo era incubado a 28°C por 24 horas em estufa Incubadora refrigerada (BOD, Marca SOLAB®). Os meios de repiques das cepas mutantes foram acrescidos de 0,02% de geneticina.

4.1.4 Inóculo

Para o preparo do inóculo, uma alçada com células do repique fresco foi transferida para tubo de ensaio contendo 10 mL de água destilada estéril. Um volume de solução correspondente a 20 µg de células foi transferido para erlenmeyer contendo 100mL de meio YPD líquido. O inóculo foi incubado a 28°C por 22 horas sob agitação de 160rpm em incubadora tipo shaker (Incubadora orbital refrigerada, Marca NOVATECNICA®). Após o crescimento das células, a concentração das mesmas foi determinada através da medida da absorvância em espectrofotômetro (UV/Vis, Marca Biospectro®) a 570nm de uma suspensão celular convertida em massa de célula (mg de peso seco de célula/mL de meio de cultura).

A fim de se trabalhar com as células no início do crescimento exponencial (primeira fase de crescimento celular), onde ainda se encontravam mais sensíveis a ação dos radicais livres, os inóculos eram retirados para as subseqüentes análises quando a densidade ótica do meio de cultivo correspondia a concentrações entre 0,5 e 0,8 mg/mL.

4.1.5 Preparo das substâncias testadas

As substâncias analisadas neste trabalho foram escolhidas dentre uma série de compostos fenólicos e flavonoides identificados de amostras de mel e própolis brasileiros pela professora Rosane Nora Castro no Laboratório de Química Medicinal e Laboratório de Química do Mel da UFRRJ. Os méis foram adquiridos na região de Seropédica-RJ, Vassouras- SP, Paracambi-RJ e Teresópolis-RJ com origem floral “assa peixe”, “morrão da candeia” e “cambara”, todos produzidos pela espécie de abelha *Apis mellifera*.

Os ácidos siríngico e cafeico e os flavonoides morina e rutina foram isolados de mel e própolis, enquanto o éster fenílico do ácido cafeico (CAPE) e o ácido clorogênico foram adquiridos pela Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim, Alemanha).

Os ácidos siríngico, clorogênico, cafeico e o CAPE (éster fenílico do ácido cafeico) foram solubilizados em mistura de DMSO e água destilada na proporção 1:1. Foi preparada uma solução estoque na concentração de 2000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Os flavonoides morina e rutina foram solubilizados em mistura de DMSO e etanol na proporção 1:1. Preparou-se solução estoque na concentração de 2000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

A concentração dos solventes não-tóxica às leveduras é de 3% de DMSO (SADOWSKA-BARTOSZ et al., 2013) e 12% de etanol nas culturas celulares (SILVA et al., 2008). A concentração atingida nas culturas celulares durante os ensaios foi de no máximo 2,5% para ambos os solventes.

4.2 Métodos

4.2.1 Fator de conversão de absorvância para concentração

Preparou-se inóculo com concentração desconhecida através da inoculação de alçada de repique fresco em 100 mL de meio YPD líquido estéril. Após 24h de incubação sob agitação a 160 rpm em shaker a 28°C, uma alíquota de 10 mL foi retirada e transferida para tubo falcon previamente tarado e reservou-se. Foram efetuadas diluições 1:10, 1:25, 1:50, 1:100, 1:200 1:250 do inóculo crescido. A absorvância foi lida 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 lavado duas vezes com água destilada estéril. Por fim, o sobrenadante foi descartado e o tubo de ensaio foi colocado em estufa a 60 °C por 72 h. Através da massa de células contida nos 10 mL de meio foi calculada a concentração do inóculo inicial; e, com as absorvâncias das diluições, foi estabelecido uma curva padrão e o fator de conversão de absorvância em concentração ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$).

4.2.2 Toxidez

Um volume de meio correspondente a 20 mg de células foi adicionado a erlenmeyers de 125 mL e adicionadas as substâncias ácido siríngico, ácido clorogênico, morina e rutina nas concentrações de $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Após o tempo de tratamento, alíquotas das suspensões celulares correspondentes a 40 μg de células foram diluídas em água destilada estéril, e após as diluições seriadas foram realizados os plaqueamentos destas células no meio de cultura sólido YPD 2% (Figura 16).

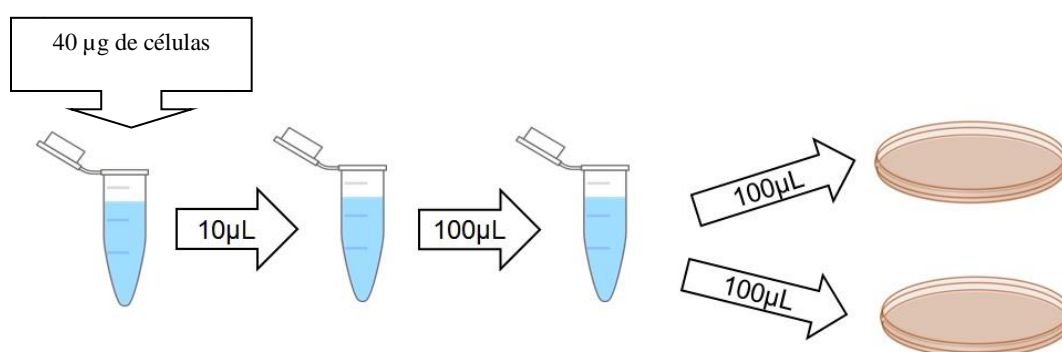


Figura 16 - Diluições seriadas para posterior plaqueamento.

As placas foram incubadas a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ por 48h. As contagens de colônia dos tratamentos foram comparadas com a contagem de células do controle não estressado e foram expressos em porcentagem de sobrevivência.

4.2.3 Pré-tratamento com as substâncias

Foram preparados dois inóculos simultaneamente. A partir de um deles incubou-se alíquotas das suspensões celulares em erlenmeyers de 125 mL durante 2 h com concentrações diferentes das soluções das substâncias a serem testadas. O segundo inóculo foi reservado. Além disso, manteve-se um erlenmeyer apenas com a suspensão celular (controle não estressado) e outro apenas com a suspensão celular e solução de peróxido de hidrogênio na concentração de 1,0 mM (células estressadas). Todos foram mantidos a $28 \text{ }^\circ\text{C}$ / 160 rpm. Após esta pré-incubação, o volume da suspensão celular de cada erlenmeyer foi recolhido e centrifugado em tubo falcon estéril a 5000 rpm/ $4 \text{ }^\circ\text{C}$ por 5 minutos. A suspensão celular foi lavada duas vezes com água destilada estéril gelada, centrifugando após cada lavagem.

As células que foram pré-incubadas com as substâncias foram ressuspensas em 20 mL de meio YPD 2% livre de células, isto é, o sobrenadante do segundo inóculo que foi reservado. As células ressuspensas foram transferidas para os erlenmeyers de 125 mL anteriores, sempre em ambiente estéril. Foi acrescentado peróxido de hidrogênio na concentração de 1,0 mM, e deixados por 1 h sob agitação a 28 °C/160 rpm (Figura 17). Os tubos contendo as células não estressadas e estressadas foram mantidos no gelo até o ensaio propriamente dito.

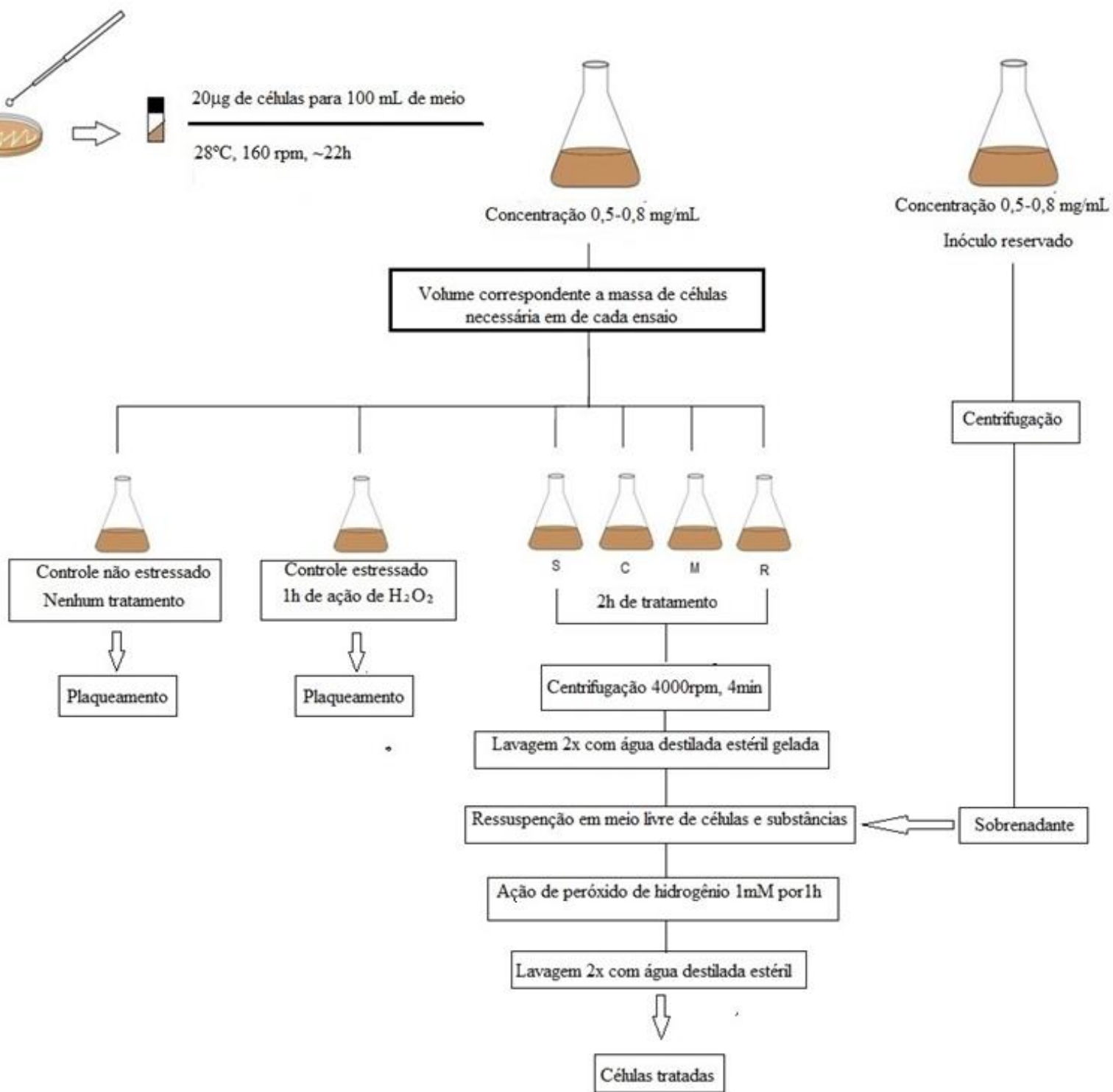


Figura 17 - Esquema do tratamento inicial das células: (S) células + peróxido de hidrogênio + Ácido Siríngico 10 µg.mL⁻¹; (C) células + peróxido de hidrogênio + Ácido Clorogênico 10 µg. mL⁻¹; (M) células + peróxido de hidrogênio + Morina 10 µg. mL⁻¹; (R) células + peróxido de hidrogênio + Rutina 10 µg. mL⁻¹.

4.2.4 Viabilidade celular

Após o tempo de incubação, alíquotas das suspensões celulares correspondentes a 40 µg de células foram diluídas em água destilada estéril, e após as diluições seriadas (Figura 16) foram realizados os plaqueamentos destas células no meio de cultura sólido YPD 2%.

As placas foram preparadas em duplicatas e as colônias foram contadas após 48 horas de incubação à temperatura de 28 °C para posterior visualização do crescimento celular. A viabilidade celular foi determinada pela diferença entre o número de colônias nos meios YPD 2% (controle) e o número de colônias nos meios sob estresse com peróxido, na presença e na ausência das substâncias testadas.

4.2.5 Peroxidação lipídica

Após a etapa de pré-tratamento, um volume correspondente a 50 mg de células foi centrifugado e lavado duas vezes com água destilada estéril, ressuspensas em 500 µL de TCA 10% (ácido tricloroacético) e transferidas para tubo de parede grossa. Foram adicionadas 1,5 g de pérolas de vidro e as células rompidas sob agitação vigorosa com 6 ciclos de 20 segundos no vortex (agitador de tubos, Marca Gehaka[®]) e 20 segundos no gelo. O extrato foi recolhido em eppendorf e as pérolas de vidro lavadas com 500 µL de TCA 10% (Vetec), sendo recolhidos no mesmo eppendorf. Após a lise os extratos passaram por uma centrifugação a 4000 rpm, sobrenadante coletado e utilizado para as análises de peroxidação lipídica através do método TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico).

O ensaio foi realizado com a mistura reacional contendo 150 µL de extrato, 150 µL de H₂O, 100 µL de EDTA (Vetec) 0,1 M e 600 µL de ácido tiobarbitúrico (Merck) 1% em NaOH 0,05 M. Também foi preparado um branco reacional contendo 0,3 mL de H₂O sem o extrato celular. A mistura reacional foi incubada a 100 °C por 15 minutos. Os tubos foram resfriados e a absorvância medida espectrofotometricamente a 532 nm. A dosagem foi feita em duplicata e os resultados expressos em picomoles de malonaldeído (MDA – produto da peroxidação lipídica) por miligrama de célula (pmoles MDA/mg cel) (STEELS; LEARMONTH; WATSON, 1994). O produto gerado é o resultado da reação do ácido tiobarbitúrico e o produto gerado pela peroxidação dos lipídios de membrana – malonaldeído (MDA) (Figura 18).

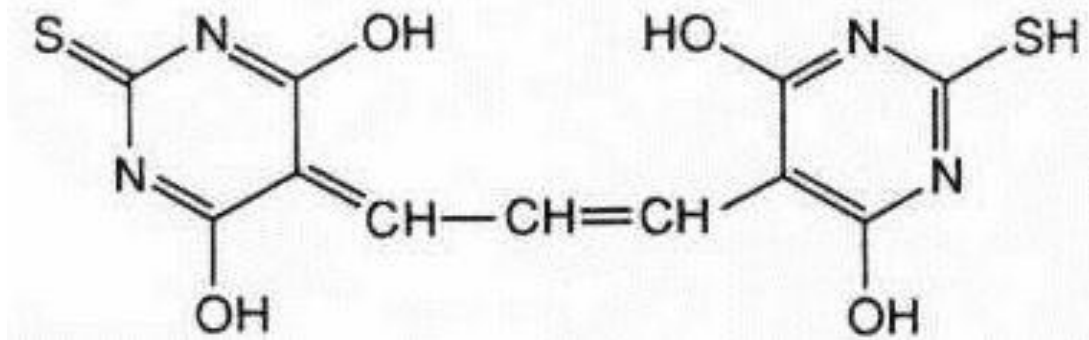


Figura 18 - Produto formado a partir da reação do ácido 2-tiobarbitúrico e o malonaldeído.

4.2.6 Disfunção mitocondrial

Para realização deste teste, um volume correspondente a 40 µg das células tratadas com as substâncias e os controles foram diluídas em eppendorfs (Figura 16), contendo 1 mL de água destilada estéril e posteriormente plaqueadas em meio sólido YPGly 4%. As placas foram incubadas a 30 °C por 96 h. O ensaio de viabilidade em YPD 2% foi realizado simultaneamente em meio YPGly para fins de comparação das contagens.

A determinação do efeito prejudicial do peróxido de hidrogênio nas mitocôndrias foi calculada pela taxa de formação de células petite (mutantes que são incapazes de crescer em fontes de carbono não fermentáveis, como glicerol, devido à baixa função mitocondrial). A percentagem de colônias foi obtida com os resultados de viabilidade celular obtidos nos meios YPD e YPGly.

$$\text{n}^\circ \text{ de petites (\%)} = \frac{(\text{n}^\circ \text{ de colônias YPD}) - (\text{n}^\circ \text{ de colônias YPGly})}{\text{n}^\circ \text{ de colônias em meio YPD}}$$

4.2.7 Oxidação intracelular através dosagem de glutathiona oxidada (GSSG) e glutathiona reduzida (GSH)

Para as dosagens, foram coletados 20 mg de células tratadas, que foram lavados duas vezes com água destilada gelada e ressuspensos em 2 mL de TCA 10% (ácido tricloroacético) gelado. Este foi transferido para um tubo de parede grossa, agitando-se vigorosamente em vortex de 5 em 5 min durante 20 minutos. A suspensão foi transferida para tubo eppendorf previamente resfriado e centrifugada a 14000 rpm por 3 min. O sobrenadante foi recolhido e

neutralizado com NaOH 5 M. Os ensaios enzimáticos foram realizados nos extratos neutralizados (BERNT; BERGMEYER, 1974).

Retirou-se um volume de 100 µL da amostra previamente neutralizada para um tubo de ensaio e foram adicionados 2,9 mL de água destilada e 150 µL de solução aquosa de albumina bovina 1% (branco da reação a 240 nm). Foi adicionado 10 µL da enzima glioxalase I (Sigma-Aldrich), e após homogeneização e leitura (E1), foi adicionado 20 µL do substrato metilglioxal (0,1 M) (Sigma-Aldrich) na cubeta, e as absorvâncias lidas por 16 minutos (E2). Uma segunda adição de 20 µL de metilglioxal foi realizada, e novamente a absorvância acompanhada por mais 8 minutos (E3). Este primeiro ensaio enzimático consiste na utilização da enzima glioxalase I e do substrato metilglioxal, sendo a concentração final de GSH calculada pela leitura da absorvância a 240 nm do produto Lactoil-GSH formado a partir da reação do GSH presente na célula com o metilglioxal. Essas dosagens são realizadas com as reações ocorrendo desde o estado inicial de não-equilíbrio, até o estado final de equilíbrio.

Para a dosagem de GSSG, o espectrofotômetro foi recalibrado a 340 nm, utilizando o ar como branco. Foi adicionado 100 µL de NADPH 1% (Sigma-Aldrich) em NaHCO₃ 1% (Vetec), a suspensão homogeneizada e a absorvância lida (E4). A seguir, adicionou-se 10 µL de glutatona redutase (Sigma-Aldrich) e acompanhou-se a leitura da absorvância por 16 minutos (E5). A enzima é necessária para iniciar o consumo do GSSG. A concentração de GSSG presente nas amostras foi obtida a partir da quantidade de NADPH consumido durante os ensaios.

Utilizando os cálculos abaixo e os coeficientes de extinção e fatores de diluição, foram calculadas as concentrações de glutatona oxidada (GSSG) e reduzida (GSH).

$$\Delta E_{\text{metilglioxal}} = E3 - E2$$

$$\Delta E_{\text{GSH}} = E2 - E1 - \Delta E_{\text{metilglioxal}}$$

$$\Delta E_{\text{GSSG}} = E4 - E5$$

4.3 Análise estatística

Os resultados são apresentados como uma média e desvio padrão de três experimentos independentes, no mínimo. Foram aplicados o teste de análise de variância ANOVA seguido de teste pós-tumo de Tuckey para comparação das diversas médias. A

diferença foi considerada estatisticamente significativa quando $p < 0,05$. A representação com letras diferentes mostra resultados estatisticamente distintos.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Avaliação da Toxicidade Dose-Dependente

Compostos fenólicos são produzidos pelo metabolismo secundário das plantas e entre seus objetivos está o de proteger o organismo vegetal contra o estresse oxidativo intracelular, causado por mudanças de temperatura, conteúdo de água, níveis de luz, exposição a radiação ultravioleta e deficiência de nutrientes; além de defender a planta contra a herbivoria e o ataque de patógenos, e atrair organismos polinizadores, dispersores de sementes e microrganismos simbiotes. Desta forma, existe uma série de atividades biológicas identificadas que estão relacionadas a estes compostos; como sua ação antibacteriana, antifúngica, anti-inflamatória, antiviral e até anticarcinogênica (DEMIDCHIK, 2014; ROLEIRA et al., 2015; SALGUEIRO et al., 2014; VENU GOPAL, 2013).

Com isso, é de crucial importância verificar a toxicidade dos mesmos em diferentes concentrações antes de avaliá-los quanto ao seu potencial antioxidante em um organismo vivo. Os ensaios de toxidez visam verificar o potencial que uma substância possui para causar a morte das células, através de possíveis danos irreparáveis em suas estruturas e metabolismo celulares.

Estes compostos também são reconhecidos pela sua atividade antifúngica, e esta poderia ser uma limitação nas análises realizadas utilizando células de levedura como modelo biológico de investigação. Entretanto, esta atividade antifúngica está diretamente relacionada à concentração das substâncias analisadas; desta forma, estas substâncias podem apresentar ação antioxidante até determinada concentração, a partir da qual se tornariam tóxicas. Este limite varia com a substância fenólica e com os microrganismos empregados como modelo de estudo (MANDALARI et al., 2007).

Primeiramente avaliou-se a toxicidade de um composto antioxidante constituinte de cada classe dos compostos fenólicos encontrados em mel e própolis. O ácido clorogênico da

classe dos derivados do ácido hidroxicinâmico, o ácido siríngico dos derivados do ácido hidroxibenzoico, a morina do grupo dos flavonoides e a rutina dos flavonoides glicosilados.

A cepa controle (BY7471) da levedura *Saccharomyces cerevisiae* apresenta seu genoma íntegro, com todos os genes relacionados às defesas antioxidantes destas células. Desta forma, em teoria torna-se uma cepa mais resistente, uma vez que apresenta codificação para todas as enzimas e metabólitos do sistema de defesa antioxidante celular. No ensaio de toxicidade dos flavonoides rutina e morina, e dos ácidos siríngico e clorogênico foram obtidas porcentagens de 91 a 100% de sobrevivência nos tratamentos com concentração de $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$; de 94 a 100% em tratamentos com as substâncias a $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$; e de 92 a 100% de sobrevivência com os tratamentos a $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ das substâncias. Todas as células foram expostas às substâncias em três diferentes concentrações por um período de 2 horas (Figura 19, A-D).

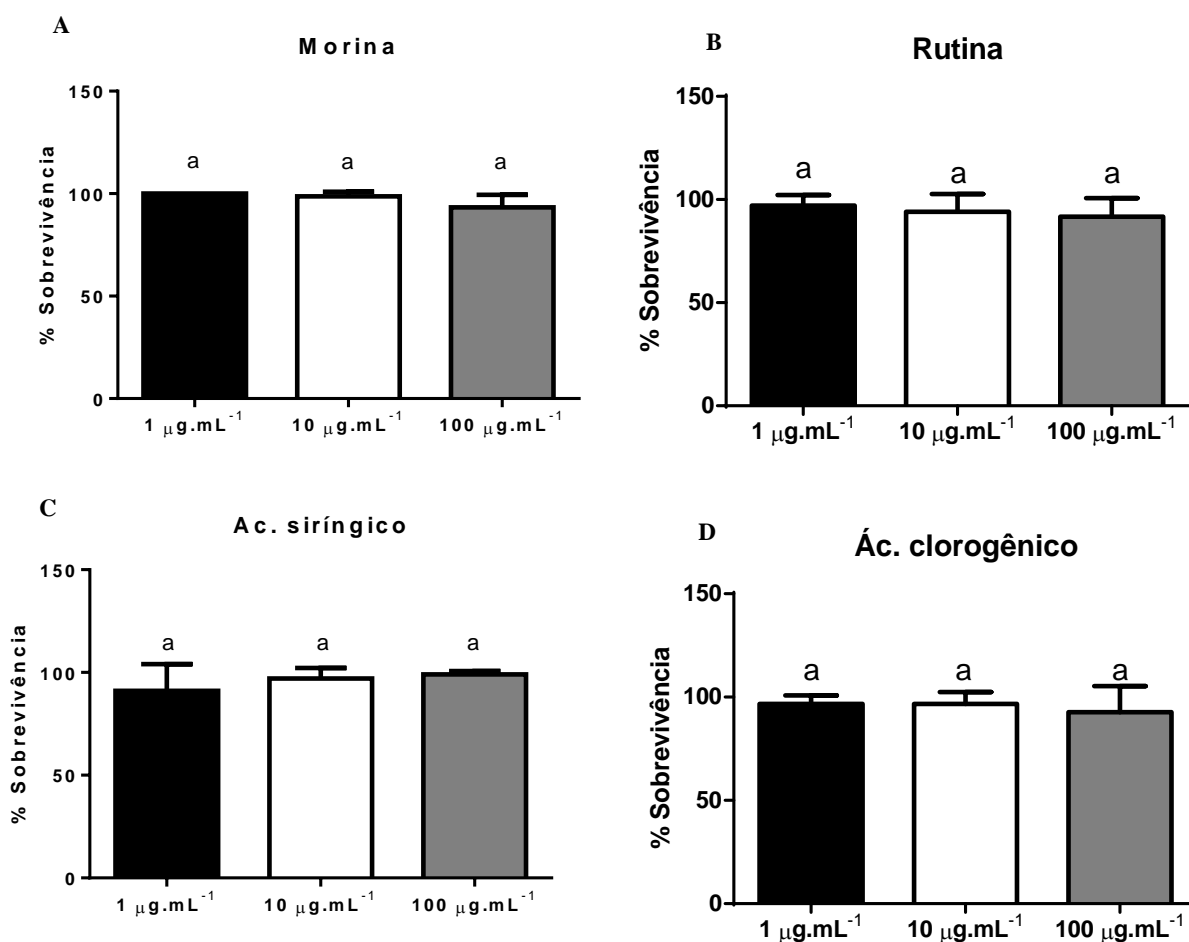


Figura 19- Tolerância celular da cepa BY7471 a diferentes concentrações das substâncias morina (A), rutina (B), ác. clorogênico (C) e ác. siríngico (D).

O tratamento durante 2 h de incubação com as substâncias não revelou qualquer toxicidade dose-dependente, verificada pelos valores estatisticamente semelhantes para as três concentrações utilizadas. A concentração de 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ foi selecionada como a concentração de cada uma das substâncias a ser utilizada nos ensaios seguintes deste estudo.

As leveduras geneticamente modificadas são ferramentas importantes nos estudos bioquímicos por permitirem verificar a importância dos genes deletados em diferentes situações de estresse. No caso particular do estudo da atividade antioxidante deste trabalho, a ausência de uma das ferramentas endógenas de defesa antioxidante gera uma cepa teoricamente mais sensível a danos oxidativos que sua cepa controle (BY4741), permitindo desta forma uma melhor observação da capacidade de proteção das substâncias analisadas frente aos danos oxidativos gerados pelo peróxido de hidrogênio (AMARI et al., 2008; PEREIRA et al., 2003; SÁ et al., 2013; ZYRACKA et al., 2005).

A cepa *Δsod1* não apresenta o gene que codifica a enzima Cu,Zn-superóxido dismutase, presente no citoplasma das células. Como citado anteriormente, esta enzima atua sobre o radical superóxido, de elevada reatividade, convertendo-o a peróxido de hidrogênio. Já a cepa *Δgsh1* é deficiente na produção do tripeptídeo glutationa, pela ausência de uma das enzimas responsável pela sua síntese. Esta cepa apresenta uma maior sensibilidade a danos oxidativos, uma vez que a glutaciona é uma defesa mais abrangente que as enzimas catalase e superóxido dismutase (BRIGELIUS-FLOHÉ; MAIORINO, 2013).

Para o estudo da toxicidade nas cepas geneticamente modificadas (chamadas de mutantes ou simplesmente deletadas), avaliou-se a toxicidade das substâncias apenas nas concentrações de 1 e 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

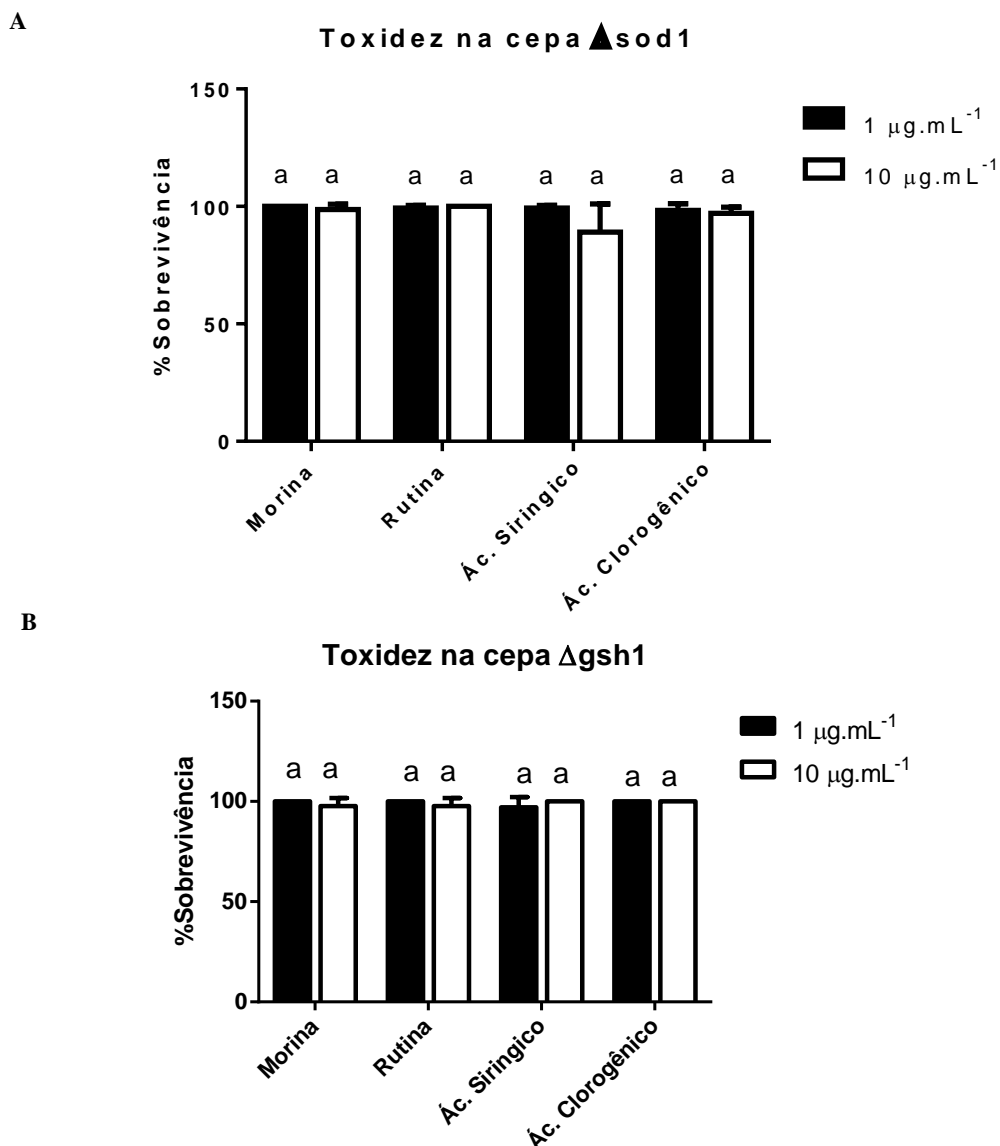


Figura 20 - Tolerância celular das cepas $\Delta sod1$ (A) e $\Delta gsh1$ (B) após exposição às concentrações de 1 e 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ das substâncias morina, rutina, ác. siringico e ác. clorogênico.

Obteve-se como resultados de toxidez nas cepas $\Delta sod1$ e $\Delta gsh1$ (Figura 20A e Figura 20B) o mesmo perfil anteriormente apresentado para a cepa BY4741. O tratamento estatístico não mostrou diferença significativa entre as concentrações testadas e o ensaio controle. Além disso, também não houve diferença de toxicidade nos testes com a cepa controle e nas cepas mutantes.

As concentrações das substâncias utilizadas neste trabalho são semelhantes às encontradas em estudos que avaliaram a ação antioxidante de compostos fenólicos utilizando células de *Saccharomyces cerevisiae*. Em análises utilizando o flavonóide hesperidina (SUN

et al., 2012), ou o polifenol floridizina extraído de maçãs (XIANG et al., 2011), em concentrações aproximadas de 30 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 13 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente; verificou-se aumento na sobrevivência das células de levedura. Outros trabalhos envolvendo testes antioxidantes *in vivo* de várias substâncias isoladas em células de *S. cerevisiae* também utilizaram concentrações próximas a 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (DANI et al., 2008; WILMSEN; SPADA; SALVADOR, 2005).

5.2 Viabilidade Celular

Uma vez que foram determinadas concentrações inócuas das substâncias às leveduras no ensaio de toxidez, o próximo passo é verificar a ação protetora das substâncias em células sob estresse oxidativo com peróxido de hidrogênio. Usando o ensaio de viabilidade celular através da contagem do número de colônias, é possível verificar o aumento de tolerância ao estresse causado pelo peróxido de hidrogênio após pré-tratamento com as substâncias rutina, morina, ácido siríngico e ácido clorogênico (todas na concentração de 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). O peróxido de hidrogênio é um agente oxidante produzido dentro das células em condições fisiológicas normais e tem importância em processos de sinalização celular. Entretanto, o desbalanço em sua concentração pode originar radicais hidroxila de elevado potencial deletério para as estruturas e organelas celulares. Os ensaios de Dani et al. (2008) apontaram que peróxido de hidrogênio na concentração de 2,5 mM apresentou maior inibição de viabilidade em células de *S. cerevisiae* do que os agentes oxidantes tetracloreto de carbono (10 mM) e o metal cádmio (2,5 mM). Porém, como um dos objetivos deste estudo é verificar o potencial antioxidante destes compostos, não seria lógico utilizar concentrações de peróxido de hidrogênio capazes de causar alta letalidade nas células, visto que nem as defesas endógenas são suficientes para a proteção celular contra altas concentrações de H_2O_2 (FERNANDES et al., 2007; PEREIRA; ELEUTHERIO; PANEK, 2001)

Após a pré-incubação das células de levedura com as substâncias avaliadas por 2h, lavou-se as células sucessivas vezes. É interessante ressaltar que a lavagem retira os compostos fenólicos do meio sobrenadante, permitindo assim avaliar apenas a ação dos compostos que provavelmente foram absorvidos pela levedura. As concentrações captadas não foram avaliadas neste trabalho.

O precipitado de células proveniente das lavagens foi ressuspensão em meio de cultura reservado retirado de células também em 1ª fase exponencial de crescimento, onde

houve crescimento celular sem adição de qualquer substância. O objetivo desta estratégia é manter as leveduras numa condição similar de crescimento àquela que havia antes da incubação com as substâncias, mantendo concentrações semelhantes de metabólitos e substratos essenciais para a homeostase celular; diminuindo desta forma interferências bruscas no ambiente extracelular. O peróxido de hidrogênio foi adicionado após esta etapa.

Este ensaio avalia de forma geral o aumento da sobrevivência, mas não identifica como as substâncias atuam neste processo; isto é, não se tem informação se o efeito antioxidante se dá por meio da regulação do sistema antioxidante endógeno ou por ação direta sobre as espécies radicalares geradas durante o metabolismo celular e pelo H₂O₂. Os parâmetros de comparação são as células não submetidas aos compostos fenólicos. O “controle não estressado” representa a viabilidade celular sem adição de nenhuma substância pró ou antioxidante enquanto o “controle de células estressadas” representa a viabilidade com adição apenas da substância oxidante peróxido de hidrogênio.

Na avaliação somente na cepa controle, o pré-tratamento com ácido clorogênico proporcionou maior aumento de viabilidade celular (75%) quando comparado às células estressadas. O ácido siríngico, morina e rutina também propiciaram resultados positivos de ação antioxidante, 59%, 54% e 54% de aumento de sobrevivência respectivamente (Figura 21); entretanto, menores que o ácido clorogênico. Embora não tenham sido encontrados estudos anteriores utilizando esta levedura em contato com o ácido clorogênico, Sato et al. (2011) verificaram que em ratos o ácido clorogênico foi capaz de reduzir o dano oxidativo causado por isquemia/reperfusão de alça intestinal. No caso do tratamento com rutina, Soares; Andrezza; Salvador (2005) a testaram juntamente com outros flavonóides numa concentração de 0,02 mM em *S. cerevisiae* frente ao estresse causado por apomorfina na mesma concentração (0,02 mM), um indutor de estresse oxidativo; e obtiveram aumento de sobrevivência de 52,20% comparado com as células estressadas; ou seja, próximo ao que foi encontrado neste ensaio.

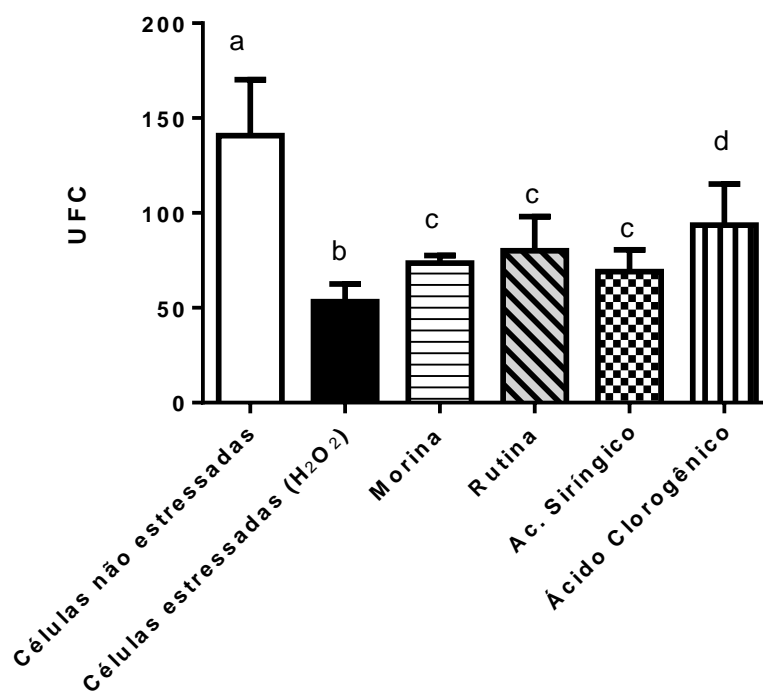


Figura 21 - Viabilidade celular da cepa controle. Avaliação da tolerância ao estresse causado pela exposição a H₂O₂ (1,0 mM) por 1 h após o pré-tratamento com ácido siríngico, ácido clorogênico, morina e rutina (10 µg.mL⁻¹) por 2 h.

Também não foram encontrados estudos de ensaios em levedura utilizando morina e ácido siríngico; entretanto, foram encontrados ensaios *in vivo* em ratos que revelam a atividade antioxidante destes compostos. Animais que receberam 50 mg.Kg⁻¹ de morina durante 30 dias e foram submetidos a um estresse por 1,2-dimetilhidrazona apresentaram redução nos danos oxidativos celulares, por meio da diminuição da peroxidação lipídica nas membranas plasmáticas e do aumento da atividade de enzimas antioxidantes, tais como catalase, superóxido dismutase e glutathione S-transferase (SREEDHARAN; VENKATACHALAM; NAMASIVAYAM, 2009). O ácido siríngico mostrou ação protetora sobre o tecido hepático em ratos tratados com tetracloreto de carbono, onde cortes histológicos mostraram proteção aos tecidos por meio de redução de necrose, de inflamação e de formação de fribromas (ITOH et al., 2010).

O tratamento com as substâncias morina, rutina e ácidos siríngico e clorogênico na cepa *Δsod1* possibilitou um aumento da viabilidade ao nível das células não estressadas (**Figura 22**). O ácido siríngico, embora tenha protegido em menor intensidade, proporcionou um aumento de sobrevivência de 2,7 vezes comparado com as células estressadas. A morina e o ácido clorogênico promoveram aumentos de aproximadamente 3,3 vezes, enquanto a rutina

elevou a sobrevivência em 3,1 vezes. Embora numericamente tenha havido pequenas diferenças, todos os tratamentos foram estatisticamente semelhantes ao controle não estressado.

Embora não tenham sido apontadas diferenças entre os tratamentos na cepa *Δsod1*; curiosamente esta cepa apresentou maior resistência ao peróxido de hidrogênio do que a cepa controle (Figura 22), representada pelo número de colônias contabilizadas (UFC). Esta contrariedade foi verificada também no controle não estressado (Cepa controle 140±29 UFC e cepa *Δsod1* 231±37 UFC), mas não no controle estressado (Cepa controle 53±7 UFC e cepa *Δsod1* 51±8 UFC). Este resultado contraria a expectativa de se verificar uma cepa mais sensível devido à ausência do sistema antioxidante. Entretanto, esta contrariedade já foi verificada em trabalho com o flavonoide hesperidina, realizado por Wilsemen et al. (2005) e Dani et al. (2008) com o resveratrol. Fernandes et al. (2007) apontam que na ausência de um sistema de defesa, a célula aumenta a expressão das enzimas antioxidantes remanescentes de forma a suprir a demanda de proteção. É possível que este mecanismo, juntamente com a proteção exercida pelos compostos fenólicos absorvidos pela célula, foi capaz de suplantar a ausência de uma enzima antioxidante e permitiram viabilidades semelhantes às células não estressadas.

Este resultado sugere que as substâncias, nas concentrações testadas, foram capazes de suplantar, de alguma forma, a falta do sistema de defesa da enzima superóxido dismutase citoplasmática na primeira fase exponencial de crescimento.

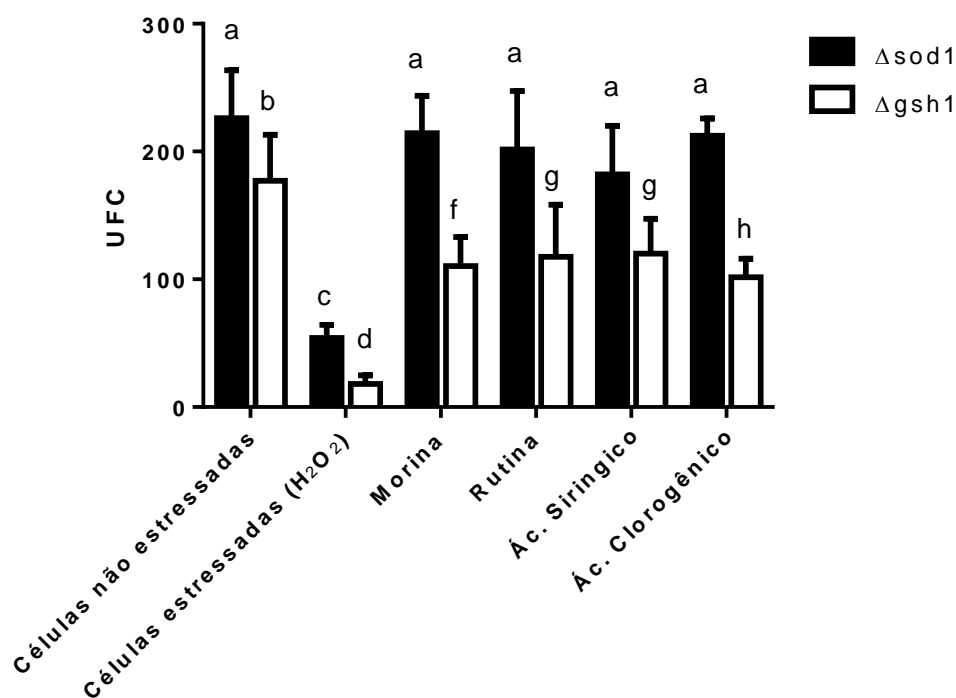


Figura 22- Viabilidade celular das cepas $\Delta sod1$ e $\Delta gsh1$. Avaliação da tolerância ao estresse causado pela exposição a H₂O₂ (1,0 mM) por 1 h após o pré-tratamento com ácido siríngico, ácido clorogênico, morina e rutina (10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) por 2 h.

A cepa $\Delta gsh1$ apresentou perfil diferente da cepa controle (Figura 22). Nela os tratamentos com rutina e ácido siríngico foram os mais efetivos na proteção das células, com um aumento de aproximadamente 5,4 vezes de sobrevivência. A morina proporcionou aumento de 5 vezes de sobrevivência enquanto o ácido clorogênico obteve 4,6 vezes. A agressão com peróxido nesse caso teve um efeito muito mais pronunciado na cepa $\Delta gsh1$ comparado à cepa controle (BY4741). A ausência do tripeptídeo glutathiona mostrou causar grande sensibilidade nas células; fato este observado pela diminuição em aproximadamente 90% da sobrevivência das células tratadas apenas com peróxido de hidrogênio (células estressadas) comparadas às não tratadas (células não estressadas) (Figura 22).

Nas células $\Delta gsh1$ não foi verificado grande aumento de viabilidade como observado na célula deficiente na enzima superóxido dismutase. É possível que o aumento de expressão de outros sistemas de defesa, na ausência de glutathiona, não seja suficiente para combater os radicais livres que ocasionam o estresse oxidativo. Diversos trabalhos apontam que a glutathiona é uma defesa mais abrangente que as enzimas catalase e superóxido dismutase, pois a manutenção dos níveis de glutathiona (GSH) reverte vários processos de oxidação intracelular, independente do seu ponto inicial (BRIGELIUS-FLOHÉ; MAIORINO, 2013;

MORGAN et al., 2013); enquanto que a falta destas enzimas inibe diretamente apenas uma única reação intracelular. Sua deficiência aparenta ser mais deletéria às cepas de levedura do que a deficiência na enzima superóxido dismutase.

5.3 Peroxidação Lipídica

A avaliação dos resultados de peroxidação lipídica permite uma leitura mais apurada da situação redox intracelular, uma vez que quantifica produtos oriundos de degradação dos lipídios de membrana gerados pelo aumento do estresse oxidativo intracelular. A peroxidação lipídica ou lipoperoxidação (LPO) pode ser definida como uma cascata de eventos bioquímicos resultante da ação dos radicais livres sobre os lipídios insaturados das membranas celulares, gerando principalmente radicais lipídicos ($L\cdot$, $LO\cdot$ e $LOO\cdot$); levando à destruição de sua estrutura, falência dos mecanismos de troca de metabólitos e, numa condição extrema, à morte celular (AYALA et al., 2014).

A LPO se constitui num evento citotóxico primário que desencadeia uma sequência de lesões na célula. As alterações nas membranas levam a transtornos relacionados à permeabilidade na membrana, alterando o fluxo iônico e o fluxo de outras substâncias; o que resulta na perda da seletividade para entrada e/ou saída de nutrientes e substâncias tóxicas à célula, danos no DNA e alterações no ciclo celular, oxidação da LDL e comprometimento dos componentes da matriz extracelular (AYALA et al., 2014; LIMA; SAES; ABDALLA, 2001).

Após o tratamento com as substâncias ácido siríngico, ácido clorogênico, morina e rutina na cepa controle obteve-se o perfil de peroxidação apresentado abaixo (Figura 23).

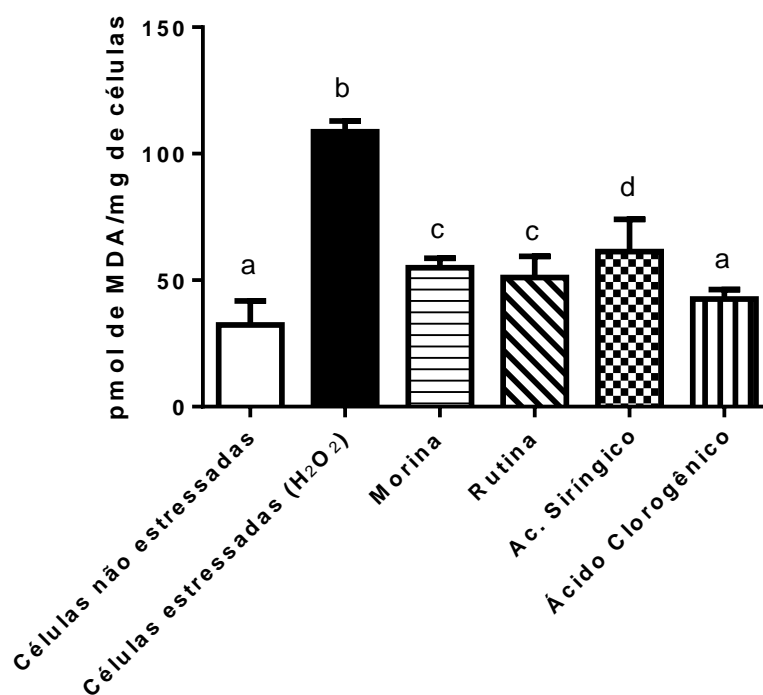


Figura 23 - Avaliação da peroxidação lipídica na cepa BY4741. Células foram submetidas aos tratamentos por 2 h com as substâncias a $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, seguido de incubação com peróxido de hidrogênio ($1,0 \text{ mM}$) por 1 h.

Este ensaio mostrou que as células tratadas com o ácido clorogênico apresentaram redução significativa nos níveis de peroxidação lipídica, com redução de 60% em relação às células estressadas, inclusive sendo estatisticamente semelhantes às células que não sofreram estresse oxidativo. Este resultado está de acordo com a viabilidade celular observada anteriormente para a cepa controle (**Figura 21**) onde o ácido clorogênico também se destacou como a substância que melhor aumentou a sobrevivência das células. A morina e a rutina obtiveram reduções semelhantes, em torno de 50%; enquanto o ácido siríngico reduziu os níveis de peroxidação para 43%. Estes resultados também mostram que todos os compostos fenólicos testados foram potencialmente antioxidantes, protegendo direta ou indiretamente os lipídios de membrana das células de levedura contra a formação de lipídios peroxidados.

Na mutante *SOD1* as substâncias avaliadas também foram efetivas para a redução da peroxidação lipídica (Figura 24), onde todos os tratamentos mostraram níveis de peroxidação semelhantes ao controle não estressado. Nesse caso, esta análise corroborou os resultados obtidos no ensaio de viabilidade celular na cepa Δsod1 , revelando mais uma vez que os compostos fenólicos são suficientes para a proteção celular na falta da enzima superóxido dismutase.

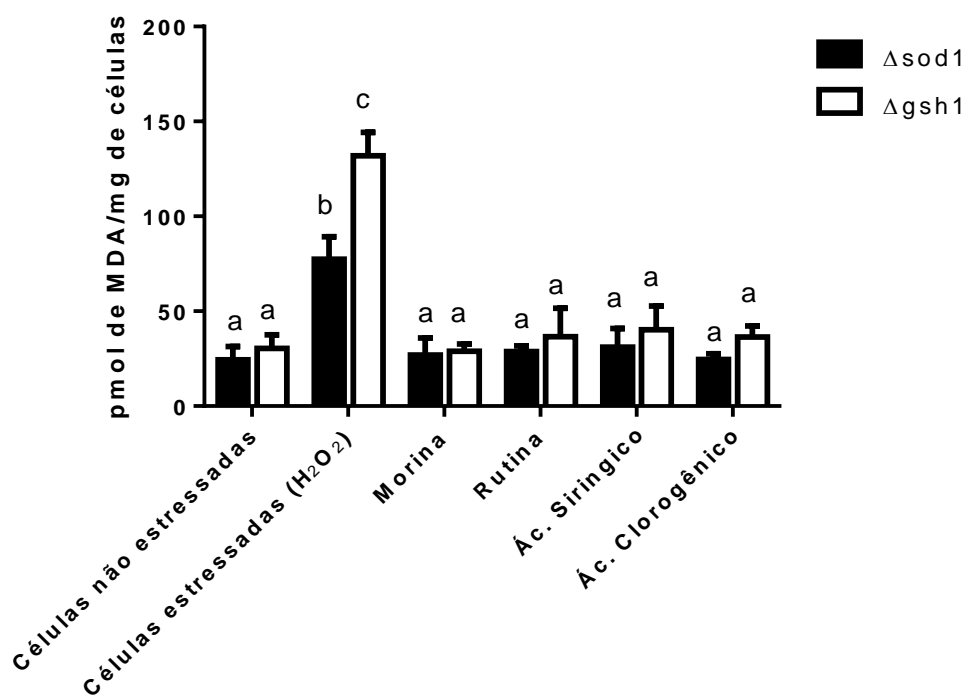


Figura 24 - Avaliação da peroxidação lipídica nas cepas *Δsod1* e *Δgsh1*. Células foram submetidas aos tratamentos por 2 h com as substâncias a $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, seguido de incubação com peróxido de hidrogênio (1,0 mM) por 1 h.

A maior sensibilidade ao estresse provocado pelo peróxido na cepa deficiente em glutathiona no ensaio de viabilidade celular (Figura 22) foi confirmada no ensaio de peroxidação lipídica. Enquanto as cepas BY4741 e *Δsod1* tratadas apenas com peróxido apresentaram em média $110,77 \pm 4,28$ pmol de MDA/mg de células (Figura 23) e $75,25 \pm 15,89$ pmol de MDA/mg (Figura 24), respectivamente; a cepa *Δgsh1* teve formação de peróxidos lipídicos de $131,95 \pm 12,23$ pmol de MDA/mg de células (Figura 24). Porém, independente da cepa, todos os tratamentos foram efetivos na redução da peroxidação lipídica, apresentando-se estatisticamente semelhantes ao controle não estressado.

Os resultados obtidos na peroxidação convergem com o resultado de viabilidade e reforça a teoria citada anteriormente de que a deficiência das enzimas de proteção cause aumento na atividade do sistema de defesa remanescente, justificando os resultados estatisticamente idênticos entre os tratamentos e as células não estressadas na *Δsod1* (DANI et al., 2008). Já na cepa *Δgsh1*, no entanto, não foi observado o efeito de maior resistência ao peróxido de hidrogênio do que na cepa controle. As células deletadas em glutathiona se mostraram mais sensíveis a agressão com peróxido de hidrogênio do que as deficientes no gene *SOD1* e as células controle. Outro trabalho aponta este perfil (DANI et al., 2008;

WILMSEN; SPADA; SALVADOR, 2005), e estes resultados sugerem que a glutatona é uma molécula fundamental no combate aos danos oxidativos causados por H₂O₂.

5.4 Disfunção Mitocondrial

A mitocôndria é a organela na qual ocorre efetivamente a respiração celular, sendo esta responsável pela acepção final de elétrons pelo oxigênio uma vez que possui os complexos enzimáticos responsáveis pelo transporte de elétrons da cadeia respiratória. Desta forma, um desbalanço oxidativo afeta a sua função de produção de energia, comprometendo diretamente a sobrevivência celular, tornando-se um ponto crítico da formação de EROs.

Como forma de levar a célula a realizar o metabolismo respiratório, ou seja, aeróbico, o meio de cultura contém baixa concentração de glicose ou outra fonte de carbono para fermentação. No meio de cultura YPGly, o glicerol é a fonte de carbono disponível para a levedura, porém não fermentável. A célula é forçada, portanto, a utilizar do metabolismo aeróbico para o seu crescimento e desenvolvimento celular. Nele a mitocôndria é uma organela fundamental, e sua função é prejudicada em condição de estresse oxidativo (GRANT; MACIVER; DAWES, 1997).

As células crescidas neste meio apresentam colônias pequenas, chamadas de petites. Uma baixa viabilidade celular no meio que permite metabolismo aeróbico (YPGly) comparado ao anaeróbico (YPD) aponta possíveis danos à mitocôndria, uma vez que sugerem que a célula teria encontrado maior dificuldade de obter energia utilizando a respiração.

A avaliação da disfunção mitocondrial na cepa controle (BY4741) não mostrou diferenças significativas entre as células estressadas e os outros tratamentos com as substâncias, ou seja, não houve aumento de viabilidade significativo com nenhum dos pré-tratamentos realizados (Figura 25).

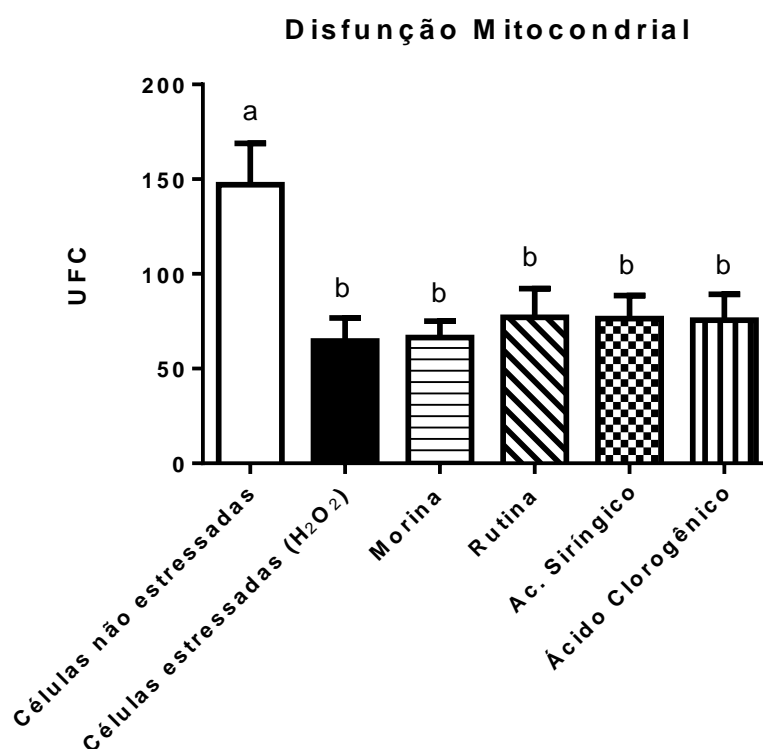


Figura 25 - Avaliação da função mitocondrial no meio YPGly. Avaliação da tolerância ao estresse causado pela exposição a H₂O₂ (1,0 mM) por 1 h após o pré-tratamento com ácido siríngico, ácido clorogênico, morina e rutina (10 µg.mL⁻¹) por 2 h.

Este resultado sugere que no metabolismo aeróbico as substâncias utilizadas não realizaram uma proteção antioxidante capaz de evitar que as mitocôndrias das células da cepa controle (BY4741) não sofressem os prováveis danos causados pela exposição ao peróxido de hidrogênio, e pudessem então realizar corretamente suas funções celulares. Os pré-tratamentos foram realmente eficazes somente no metabolismo fermentativo.

5.5 Comparativo com Ensaios *in vitro*

Após os ensaios de toxidez, viabilidade celular e peroxidação lipídica, constatou-se que os compostos fenólicos, na concentração de 10 µg.mL⁻¹, tiveram forte ação antioxidante frente ao estresse oxidativo gerado por peróxido de hidrogênio na concentração de 1,0 mM. Considerando-se os resultados de uma maneira global, e principalmente os resultados na cepa controle, a classe dos derivados do ácido hidroxicinâmico se destacou nos ensaios realizados.

Os valores de CE₅₀ descritos na literatura variam muito entre os autores. Para o ácido clorogênico, por exemplo, são encontrados valores de CE₅₀ que variam de 1,75 ± 0,003

$\mu\text{g.mL}^{-1}$ (CAI et al., 2006) a $112,37 \pm 2,3 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (XIANG; NING, 2008) no ensaio de DPPH. Esta discrepância dificulta a comparação entre as atividades dos compostos fenólicos.

Apesar disso, estão descritos arranjos químicos que favorecem o sequestro de radicais, um deles seria que atividade antioxidante *in vitro* é aumentada na presença de hidroxilas na posição orto. Desta forma, derivados do ácido hidroxicinâmico teriam maior atividade que derivados do ácido hidroxibenzoico (CAI et al., 2006). Para os flavonoides, além da característica citada, a atividade antioxidante é aumentada também com a presença de ligações duplas com oxigênio na posição 5 do anel C e ausência de glicosilações. A presença destas, inclusive, eleva em aproximadamente 50% a concentração de CE_{50} em ensaio utilizando DPPH (CAI et al., 2006; PROCHÁZKOVÁ; BOUŠOVÁ; WILHELMOVÁ, 2011). Desta forma, seria esperada uma ação antioxidante mais efetiva do ácido clorogênico, comparado ao ácido siríngico; e da morina maior que a da rutina.

Neste estudo corroborou-se que a classe dos derivados hidroxicinâmicos foi de fato mais efetiva que a dos hidroxibenzoicos, embora nas cepas mutantes os resultados tenham sido semelhantes entre si. Já na classe dos flavonoides, o glicosilado e o não glicosilado tiveram resultados próximos, contrariando a previsão dos ensaios *in vitro*.

O principal motivo da divergência dos ensaios *in vitro* é que além dos mecanismos de estabilização de espécies radicais e complexação de íons metálicos catalisadores de formação de espécies radicais, compostos fenólicos são capazes de modular a expressão das enzimas antioxidantes, tendo o efeito global de aumento de sobrevivência celular diante de condições de estresse (KIM; LEE, 2015; LI et al., 2014; PROCHÁZKOVÁ; BOUŠOVÁ; WILHELMOVÁ, 2011; TREUSCH et al., 2011; XIANG et al., 2011).

As diferenças de resultado *in vivo* e *in vitro* reforçam a importância de modelos biológicos para a análise da atividade de substâncias, principalmente fazendo-se uso de um modelo celular semelhante às células de mamíferos superiores, como é o caso das células da levedura *Sacchomyces cerevisiae*.

5.6 Comparativo entre ácidos hidroxicinâmicos e seus derivados

É importante lembrar que vários estudos mostram diferentes extratos brutos contendo substâncias fenólicas apresentando atividade antioxidante, tanto em ensaios *in vitro* (KRISHNAIAH; SARBATLY; NITHYANANDAM, 2011; TOHAMY et al., 2014; ZHANG et al., 2015a) quanto em diferentes tipos celulares (BÚFALO; SFORCIN, 2015; LAMBERT;

ELIAS, 2010; LEÓN-GONZÁLEZ; AUGER; SCHINI-KERTH, 2015; TOHAMY et al., 2014). Ensaios realizados em ratos corroboram com resultados obtidos em levedura, revelando diminuição de estresse oxidativo por polifenóis presentes no cacau (GIACOMETTI MUHVI, D., PAVLETI, A., DUDARI, L., 2016), e diminuição de estresse oxidativo induzido pela cisplatina utilizando extrato de própolis (TOHAMY et al., 2014); ambos diminuindo danos oxidativos no fígado de ratos. Isto sugere que tanto a classe dos compostos fenólicos quanto o extrato bruto podem atuar inibindo o estresse oxidativo intracelular, colaborando para o avanço das pesquisas voltadas ao tratamento de doenças como aterosclerose e os efeitos causados pelo uso da cisplatina em pacientes com câncer.

Portanto, é de crucial importância caracterizar que tipos de compostos ou classe de compostos estariam contribuindo em maior escala para a atividade antioxidante verificada em extratos e frações de substâncias provenientes do meio ambiente. Com esse intuito, e levando-se em consideração que o ácido clorogênico teve uma ação antioxidante mais pronunciada do que os outros compostos avaliados neste estudo, concentrou-se as análises posteriores na classe dos derivados dos ácidos hidroxicinâmicos.

Embora todos os tratamentos tenham promovido melhora nos parâmetros de avaliação de estresse oxidativo intracelular, o ácido clorogênico se destacou com taxas superiores aos demais na melhora do quadro oxidativo na cepa controle. Desta forma, como continuidade do trabalho, buscou-se verificar a ação antioxidante de outros compostos pertencentes à classe dos ácidos hidroxicinâmicos, a fim de determinar se esta classe de compostos manteria uma ação antioxidante mais efetiva, observada através dos resultados obtidos para o ácido clorogênico.

O ácido clorogênico é um éster do ácido cafeico com o ácido quínico (**Figura 26**) O ácido quínico não apresenta insaturações conjugadas na sua molécula, fundamental para a estabilização de radicais; devido a isto não lhe é atribuído atividade antioxidante. O ácido cafeico, por outro lado, é um conhecido antioxidante (CELLI et al., 2007; MAURYA; DEVASAGAYAM, 2010; SATO et al., 2011). Em trabalho anterior utilizando como modelo biológico de estudo intestino de ratos (SATO et al., 2011), o ácido clorogênico foi capaz de reduzir o estresse oxidativo causado por mecanismo de isquemia/reperfusão realizado no intestino das cobaias. O estresse deste modelo é causado devido ao estrangulamento de alça intestinal de ratos por determinado tempo, seguido de reperfusão sanguínea. A formação de EROs é devido ao mecanismo de xantina oxidases. Verificou-se que a microbiota intestinal dos ratos realizava hidrólise do ácido clorogênico em ácido quínico e ácido cafeico. Quando o

ácido cafeico foi utilizado no mesmo mecanismo de isquemia/reperfusão, obteve-se melhora semelhante ao ácido clorogênico. O resultado deste trabalho pode suscitar a hipótese da possibilidade de que esterases produzidas pelo metabolismo dos microrganismos possam hidrolisar o ácido clorogênico em ácido quínico e ácido cafeico, sendo este o responsável pela atividade antioxidante. Outros trabalhos confirmam esta prévia hidrólise e posterior absorção em modelos animais (EL-SEEDI et al., 2012; KONISHI; KOBAYASHI, 2004).

Com isso, um ensaio comparativo das atividades do ácido clorogênico e do ácido cafeico frente às células da levedura *S. cerevisiae* pode verificar qual espécie poderia apresentar melhor atividade protetora. Além disso, a utilização de um outro éster proveniente do ácido cafeico também foi avaliado, já que a atividade antioxidante vista anteriormente poderia ser devido ao ácido cafeico somente, ou especificamente ao ácido cafeico esterificado, como é o caso do ácido clorogênico.

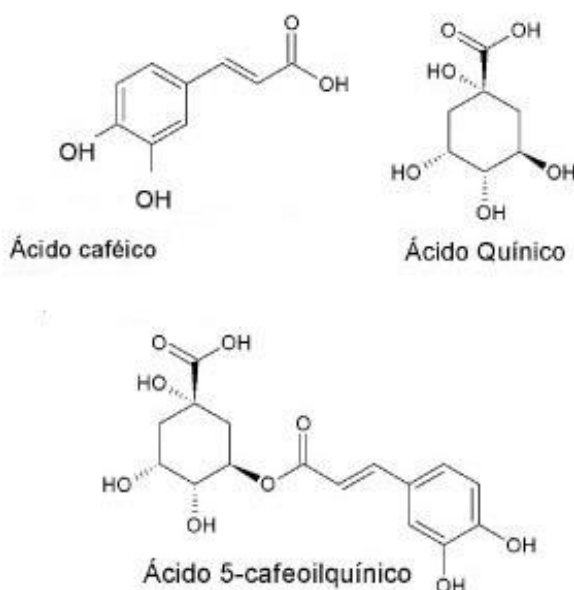


Figura 26 - Ácidos cafeico, quínico e clorogênico (5-cafeoilquínico).

O éster fenetil do ácido cafeico (CAPE, sigla em inglês para ‘*Caffeic Acid Phenethyl Ester*’) (Figura 27) é oriundo do processo de esterificação do ácido cafeico. Este tem sido divulgado em trabalhos revelando sua alta atividade antioxidante, anti-inflamatória, anticancerígena e antifúngica (VIUDA-MARTOS et al., 2008). Devido às evidências de estudos que relacionam o ácido clorogênico e o ácido cafeico e o potencial antioxidante reportado ao CAPE (AZUMA et al., 2000; GONTHIER et al., 2006; MURTAZA; KARIM;

AKRAM, 2014; WU et al., 2007), buscou-se avaliar comparativamente essas três substâncias nos ensaios antioxidantes de peroxidação lipídica e viabilidade celular dos compostos ácido cafeico e CAPE, comparando-se com os resultados anteriormente obtidos para o ácido clorogênico.

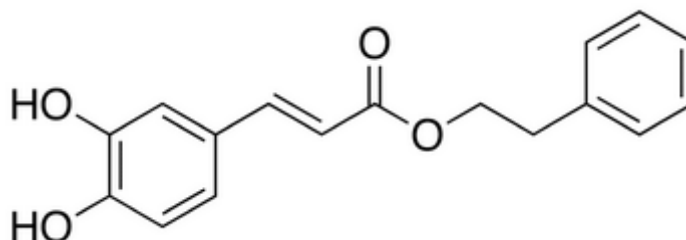


Figura 27 - Estrutura do éster fenetil do ácido cafeico (GÖÇER; GÜLÇİN, 2011).

5.6.1 Toxicidade do ácido cafeico e do CAPE

Tanto o ácido cafeico quanto o CAPE não foram tóxicos às células de levedura nas concentrações de $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (Figura 28B); porém, o CAPE na concentração de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (Figura 28B) foi a única substância que se mostrou tóxica às leveduras nesta concentração. As demais substâncias nas concentrações testadas não causaram redução no potencial de sobrevivência de forma estatisticamente significativa.

A toxidez verificada com o CAPE corrobora os resultados de toxicidade encontrados utilizando *Candida albicans*, onde o CAPE revelou alto efeito fungicida na concentração de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (BREGGER et al., 2007). Mandalari et al. (2007) determinaram que os flavonoides naringenina, naringina, hesperidina, neohesperidina, eriodictiol e neoeriocitrina tiveram ação tóxica em *Sacharommyces cerevisie* em concentrações a partir de $800 \mu\text{g.mL}^{-1}$. O CAPE, portanto, apresenta elevada toxicidade comparada às demais substâncias uma vez que concentrações 8 vezes menores causaram morte celular na cepa controle.

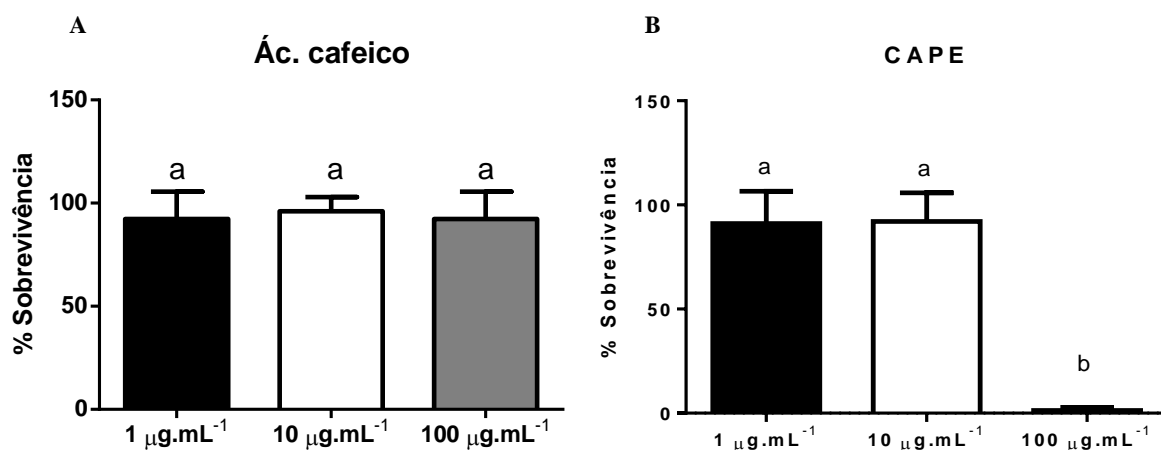


Figura 28 - Tolerância celular da cepa BY4741 a diferentes concentrações das substâncias ácido cafeico (A) e CAPE (B), incubada por 2h a 28°C/160rpm.

O ensaio de toxicidade com ácido cafeico e CAPE nas cepas mutantes foi semelhante a cepa controle, foram obtidas porcentagens de 98 a 100% de sobrevivência nos tratamentos com concentração de 1 µg.mL⁻¹ (Figura 29A) e de 96 a 100% em tratamentos com as substâncias a 10 µg.mL⁻¹ (Figura 29B).

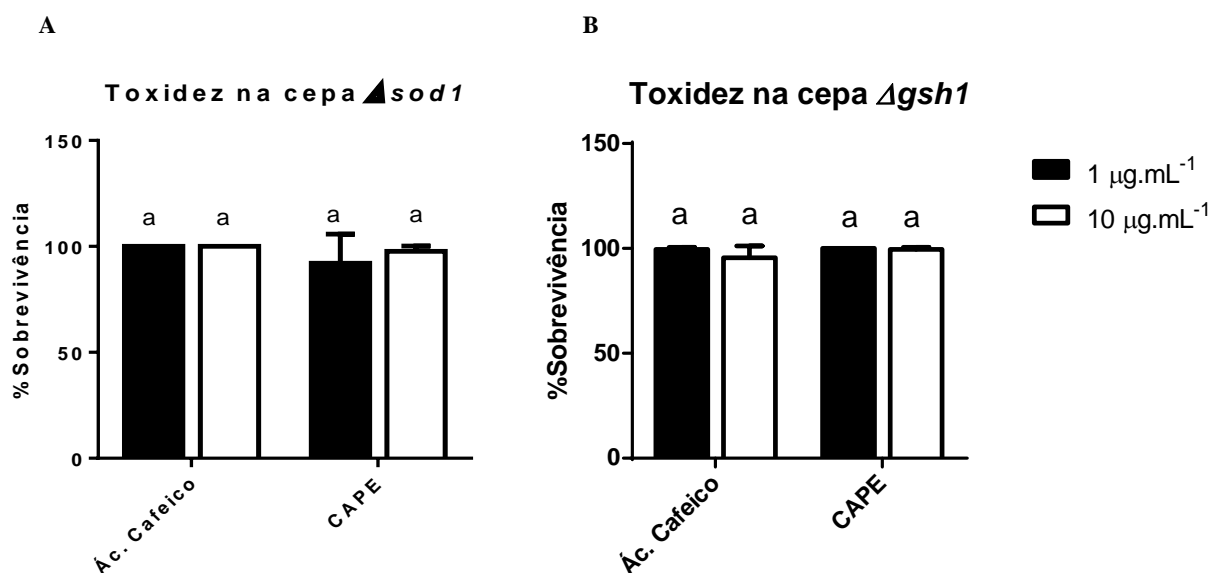


Figura 29 - Tolerância celular das cepas *Δsod1* e *Δgsh1* frente a diferentes concentrações das substâncias ácido cafeico (A), CAPE (B) incubada por 2h a 28°C/160rpm.

Novamente a concentração de 10 µg.mL⁻¹ foi escolhida como a concentração a ser utilizada nos ensaios subsequentes de viabilidade celular, peroxidação lipídica e dosagens de glutathiona oxidada e reduzida.

5.6.2 Viabilidade celular e peroxidação lipídica

Neste ensaio foi avaliada a capacidade das substâncias de proteger a célula da agressão causada pelo peróxido de hidrogênio, por meio da manutenção da viabilidade celular em meio YPD 2%, como feito anteriormente para as outras substâncias.

Na cepa controle BY4741 (Figura 30) observou-se um aumento da viabilidade com todos os tratamentos com os derivados do ácido hidroxicinâmico, sendo o ácido cafeico se destacado com um aumento de mais de 100% de sobrevivência com relação às células estressadas, enquanto que o ácido clorogênico e o CAPE obtiveram um aumento médio de 76% e 91%, respectivamente; ou seja, também se mostrando efetivos na proteção contra o estresse oxidativo intracelular.

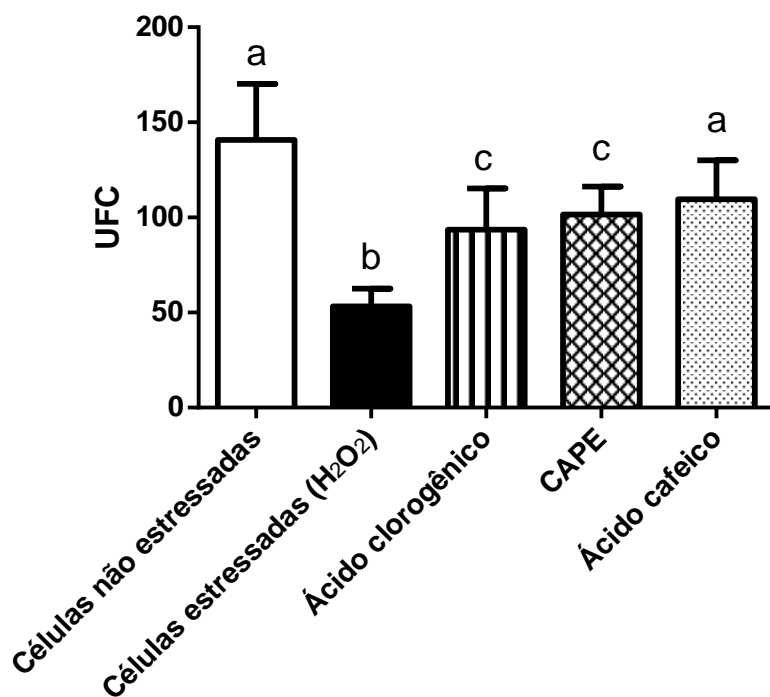


Figura 30 - Viabilidade celular na cepa BY4741. Avaliação da tolerância ao estresse causado pela exposição a H₂O₂ (1,0 mM) por 1 h após o pré-tratamento com ácido clorogênico, ácido cafeico e CAPE (10 µg.mL⁻¹) por 2 h.

O perfil do resultado observado na cepa controle não foi confirmado nas cepas mutantes (Figura 31). Na cepa *Δsod1*, o ácido clorogênico se mostrou mais efetivo, com aumento de viabilidade celular atingindo os níveis do ensaio controle (sem estresse), enquanto que o CAPE e o ácido cafeico apresentaram aumentos de 2,6 e 2,2 vezes, respectivamente; mas estatisticamente iguais entre si. Já na cepa *Δgsh1* (Figura 31), o CAPE teve um resultado

melhor sobre a viabilidade celular (cerca de 5 vezes no aumento da sobrevivência), comparado com os tratamentos com os ácidos clorogênico e cafeico (estatisticamente semelhantes).

É interessante ressaltar que no tratamento apenas com peróxido de hidrogênio as cepas mutantes foram mais sensíveis que a cepa controle. Isto confirma o fato de que a carência de um dos genes de defesa provavelmente deixaria estas cepas mais sensíveis ao estresse oxidativo celular; e ainda que os pré-tratamentos com os derivados dos ácidos hidroxicinâmicos foram eficazes em proteger as células, substituindo com certa eficácia a deleção do sistema de defesa antioxidante que foi excluído. Entretanto não foi possível determinar qual das substâncias testadas foi mais eficiente, uma vez que cada uma se destacou numa cepa.

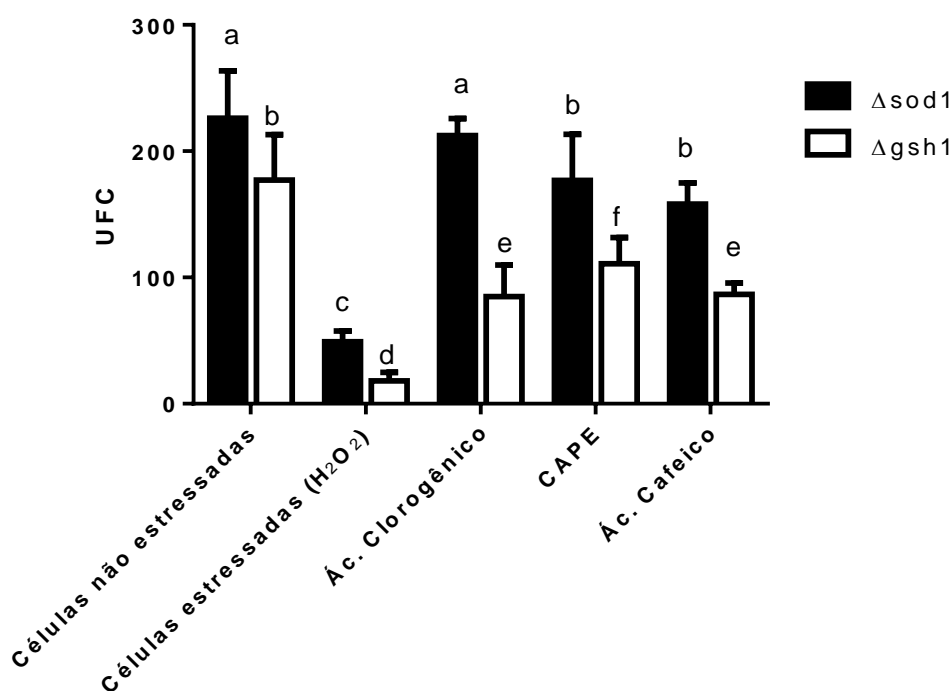


Figura 31 - Viabilidade celular das cepas *Δsod1* e *Δgsh1*. Avaliação da tolerância ao estresse causado pela exposição a H₂O₂ (1,0 mM) por 1 h após o pré-tratamento com ácido clorogênico, ácido cafeico e CAPE (10 μg.mL⁻¹) por 2 h.

Na avaliação da peroxidação lipídica dos derivados do ácido hidroxicinâmico observou-se na cepa controle que todos os tratamentos propiciaram redução nos níveis de peroxidação comparados com as células apenas estressadas, sem o pré-tratamento com as

substâncias ácido clorogênico, ácido cafeico e CAPE. Além disso, a redução da peroxidação atingiu níveis estatisticamente semelhantes ao experimento controle (sem estresse) (Figura 32).

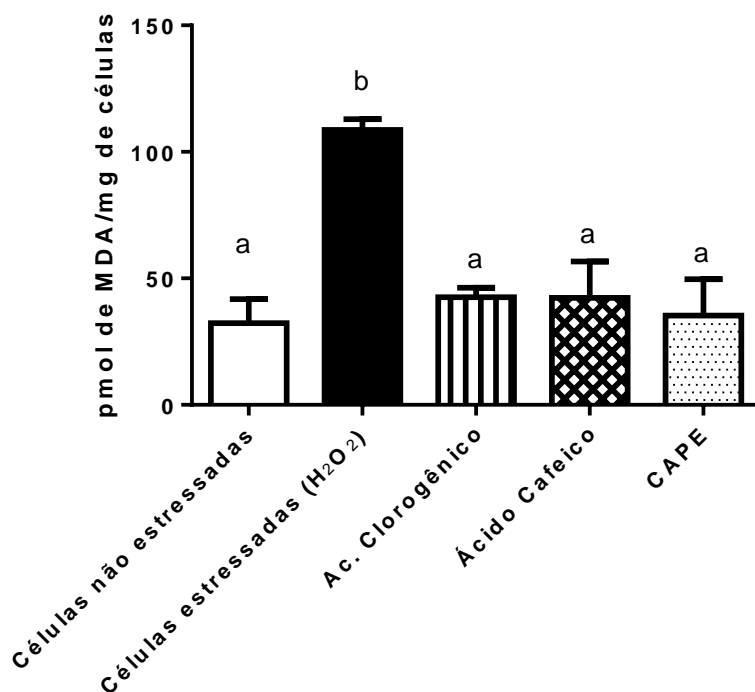


Figura 32 - Avaliação da peroxidação lipídica na cepa BY4741. Células foram submetidas aos tratamentos por 2 h com ácido clorogênico, ácido cafeico e CAPE (10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), seguido de incubação com peróxido de hidrogênio (1,0 mM) por 1h.

Nas duas cepas mutantes, Δsod1 e Δgsh1 (Figura 33), os tratamentos com ácido clorogênico, ácido cafeico e CAPE também propiciaram níveis de peroxidação lipídica semelhantes ao controle, embora CAPE tenha atingido peroxidação 48% acima das células não estressadas na cepa Δsod1 e 59% na cepa Δgsh1 . Os resultados de peroxidação lipídica divergiram com resultados de viabilidade, uma vez que nela os tratamentos tiveram resultados distintos entre as cepas.

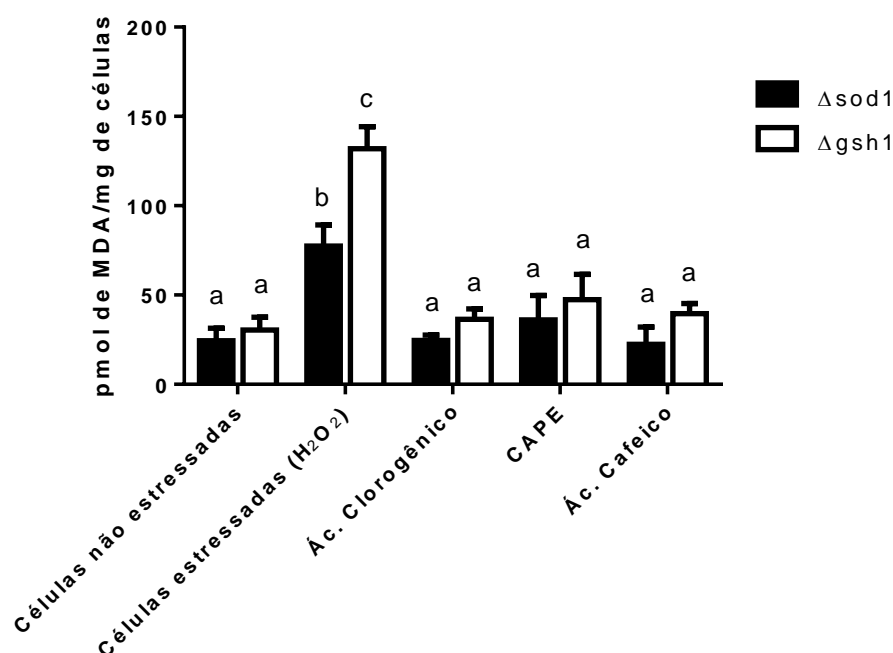


Figura 33 - Avaliação da peroxidação lipídica nas cepas *Δsod1* e *Δgsh1*. Células foram submetidas aos tratamentos por 2 h com ácido clorogênico, ácido cafeico e CAPE (10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), seguido de incubação com peróxido de hidrogênio (1,0 mM) por 1 h.

Cigut et al. (2011) testou ácido cafeico, CAPE e extratos de própolis na concentração de 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ em células de *S. cerevisiae*. Eles obtiveram que apenas o tratamento com o extrato bruto de própolis foi capaz de reduzir a oxidação intracelular (42% de diminuição), enquanto os tratamentos com as substâncias isoladas não mostraram diferença significativa no teste com o biomarcador do ambiente redox intracelular 2,7-diclorofluoresceína. O resultado obtido por Cigut et al. (2011) diverge dos resultados obtidos neste trabalho. É importante ressaltar que a concentração utilizada por ele foi próxima de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, podendo justificar a ausência de efeito antioxidante da substância isolada. A análise de toxidez dose-responder apontou que o CAPE em concentrações próximas a 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ tem efeito tóxico. Além disso, ensaios diferentes foram realizados para avaliar atividade antioxidante

O efeito do ácido cafeico e do CAPE foi testado por diversos autores em outros modelos biológicos (ratos) e relatam ação antioxidante destas moléculas que corroboram os resultados obtidos em levedura deste trabalho.

Celik e Erdogan (2008) verificaram que o CAPE reduziu os níveis de alguns marcadores de estresse oxidativo em cérebro de ratos, induzido por medicamentos que causam diabetes. Os ratos tratados por 60 dias com 10 $\mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}\cdot\text{dia}^{-1}$ tiveram redução de níveis

de peroxidação lipídica, carbonilação de proteínas e diminuição de atividade das enzimas glutatona S-transferase e xantina oxidase no tecido cerebral, entretanto a concentração de glutatona reduzida foi aumentada, justamente como observada neste trabalho.

Chen e Gong (2011) verificaram que o tratamento com CAPE $10\mu\text{M.Kg}^{-1}$ foi capaz de reduzir o estresse oxidativo causado por cádmio (1 mg.Kg^{-1}) em fígado de ratos. Foi constatada redução de peroxidação lipídica e carbonilação de proteínas, além da diminuição da atividade das enzimas antioxidantes catalase e SOD. O tratamento com cádmio reduziu as concentrações de glutatona reduzida e estas foram reestabelecidas com o tratamento com CAPE.

O ácido cafeico (1, 4 e 8 mg.Kg^{-1}) testado em ratos tratados com as drogas antiepiléticas Diazepan® e Vigabatrin® promoveu redução de peroxidação lipídica provocada pelos fármacos. Coelho et al. (2015) verificaram que o tratamento com ácido cafeico foi capaz de reduzir a dosagem de radicais livres no tecido cerebral das cobaias, mas não foi eficaz em normalizar a atividade da enzima SOD.

5.6.3 Dosagem de glutatona reduzida (GSH) e oxidada (GSSG)

Os resultados obtidos para a cepa *Δgsh1* demonstraram que esta cepa é mais sensível ao estresse oxidativo causado pelo peróxido de hidrogênio do que a cepa *Δsod1*. Devido a este fato, procurou-se realizar uma análise que verificasse como variavam as concentrações das espécies GSH (glutatona reduzida) e GSSG (glutatona oxidada) numa cepa que possuía este sistema antioxidante endógeno; ou seja, a cepa controle (BY4741). A dosagem da razão de glutatona oxidada e reduzida visa avaliar como se encontra o ambiente redox intracelular, verificando se a ação antioxidante das substâncias reflete-se na homeostase celular dos níveis de GSH e GSSG. Em estudos anteriores já foi observado que o GSH tem papel essencial na resposta antioxidante ao estresse causado pelo peróxido de hidrogênio (MARIANI et al., 2008; MORGAN et al., 2013).

Os tratamentos com os ácidos clorogênico e cafeico propiciaram aumento na concentração de glutatona reduzida respectivamente em 2,0 e 1,3 vezes comparado às células estressadas. Porém, o tratamento com o CAPE mostrou-se mais eficaz, uma vez que este obteve concentração de glutatona reduzida estatisticamente semelhante às células não estressadas (Figura 34). Apesar do aumento de GSH, o mesmo nível não foi atingido na pré-incubação com os ácidos cafeico e clorogênico.

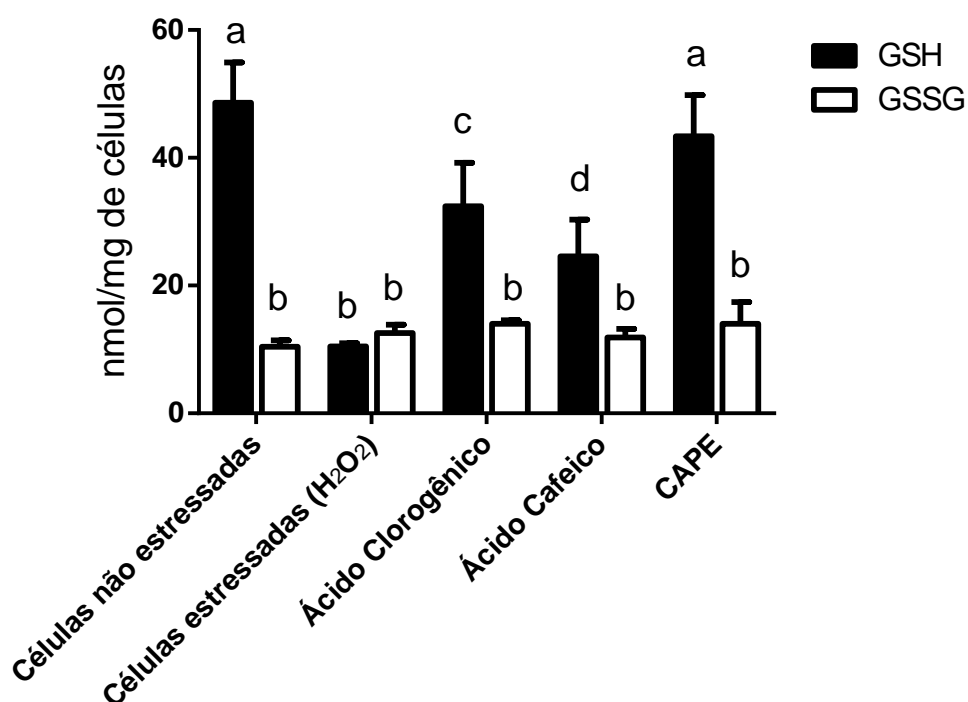


Figura 34 - Avaliação da concentração de GSH e GSSG na cepa BY4741. Células foram submetidas aos tratamentos por 2 h com ácido clorogênico, ácido cafeico e CAPE ($10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), seguido de incubação com peróxido de hidrogênio ($1,0 \text{ mM}$) por 1 h.

Não foi obtida diferença significativa nas concentrações de glutathiona oxidada em nenhum dos tratamentos. Morgan et al. (2013) em seu trabalho apontam que a glutathiona oxidada não é rapidamente reduzida no citoplasma, mas sim rapidamente compartimentalizada nos vacúolos por meio de transportador Ycf1. Isto pode explicar a pouca diferenciação na glutathiona oxidada nos diferentes tratamentos.

As dosagens de glutathiona reduzida e oxidada trazem a leitura da homeostase redox da célula. Os resultados obtidos apontaram que o CAPE proporcionou um aumento de glutathiona reduzida a níveis semelhantes ao encontrado nas células não estressadas. Os tratamentos com ácido clorogênico e cafeico aumentaram os níveis de glutathiona a níveis próximos entre si. Estes resultados reforçam a teoria que o ácido clorogênico tem ação muito semelhante ao ácido cafeico, muito provavelmente devido a sua previa hidrólise por esterases produzidas pela levedura. Em estudos com bebidas fermentadas, já foi verificado que as leveduras secretam enzimas no meio extracelular e metabolizam compostos fenólicos (CALLEMIEN; COLLIN, 2009). Ou seja, é provável que nas leveduras ocorra absorção de

ácido clorogênico de forma semelhante à observada no intestino de ratos, devido aos microrganismos que realizam uma hidrólise prévia (SATO et al., 2011).

Avaliando os resultados de todos os ensaios, observou-se que justamente o composto que apresentou maior potencial tóxico, CAPE em concentrações próximas a 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, foi o que proporcionou maior elevação de glutathione reduzida dentre os derivados do ácido hidroxicinâmico. Embora a concentração de CAPE de 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ não tenha causado diminuição da viabilidade no ensaio de toxidez, a substância pode ter funcionado como um agente indutor de estresse oxidativo nesta concentração, mobilizando defesas antioxidantes endógenas.

Como previsto na literatura, compostos fenólicos podem ter ação pró-oxidante dependentes de concentração, e sua ação modulatória de enzimas que compreendem o sistema de defesa antioxidante pode estar relacionada a esta pequena toxidez. Amari et al., (2008) avaliando o mecanismo antioxidante da quercetina e outros composto fenólicos de baixo peso molecular em células de levedura, propôs que eles funcionam como um xenobiótico e estimulam a maquinaria de resposta ao estresse das células, tornando-as mais resistentes a agressão posterior com peróxido de hidrogênio. Uma vez que o CAPE foi o composto com maior potencial tóxico dentre os testados e foi também o que gerou maiores elevações de glutathione reduzida, além de atividade antioxidante em todos os tratamentos, estima-se que ele atue de forma semelhante à quercetina, induzindo o sistema de defesa antioxidante e desta forma aumentando a tolerância ao estresse posterior causado pelo peróxido de hidrogênio.

Fernandes et al. (2007) verificaram que o pré-tratamento com concentrações sub-letais de peróxido de hidrogênio (0,2 mM) por 1h é capaz de aumentar sobrevivência de *S. cerevisiae* frente tratamento com concentração letal de H_2O_2 (2,5 mM).

Maeta et al. (2007) avaliando o efeito antioxidante de extrato de chá verde e de galato epilocatequina, seu polifenol mais abundante, nas concentrações de 0,01 e 0,005%, respectivamente; observou que eles foram capazes de induzir formação de H_2O_2 por meio da redução de O_2 , em meio ligeiramente alcalino (pH 7,6) e na presença de íons dos metais Fe^{2+} e Cu^{2+} em células de *S. cerevisiae*. Foi atribuído à este mecanismo a atividade antimicrobiana em *E.coli*, tanto do polifenol quanto dos extratos de chá verde. Além disso, houve regulação dos genes Yap1 e Snk7, ambos relacionados à transcrição de fatores críticos para a resposta antioxidante intracelular em *S. cerevisiae*.

O mecanismo de atuação de flavonoides e ácidos fenólicos no geral pode estar de fato relacionado à ativação do sistema de defesa antioxidante como agentes tóxicos não letais às células de levedura. Os ensaios de (AMARI et al., 2008) corroboram esta teoria, uma vez que apontam que tratamentos prévios com estes compostos são eficazes para a proteção antioxidante, entretanto a atividade recuperativa de células, isto é, a adição de flavonoides após o estresse, tenha menor eficácia.

6. CONCLUSÕES

Os representantes das classes de compostos fenólicos avaliados apresentaram ação antioxidante em levedura, reduzindo efeitos de estresse oxidativo causado por peróxido de hidrogênio.

A classe dos derivados hidroxicinâmicos, representada pelo ácido clorogênico, se destacou com maior proteção nos parâmetros oxidativos avaliados na cepa controle.

Os compostos fenólicos ácidos siríngico e clorogênico, rutina e morina foram suficientes para mimetizar indiretamente o efeito protetor da enzima superóxido dismutase (Sod1p) em células de *S. cerevisiae*.

O CAPE foi o derivado do ácido hidroxicinâmico mais efetivo quanto ao potencial antioxidante, revelando que a atividade não está somente relacionada ao seu derivado mais simples (ácido cafeico), mas estende-se ao seu éster fenetílico.

A ação antioxidante dos compostos fenólicos pode estar associada a um estímulo do sistema de defesa endógeno; ou seja, o mecanismo de ação desses compostos pode funcionar como um indutor na ativação das defesas antioxidantes celulares em levedura.

A comprovação da atividade antioxidante de compostos isolados de mel e própolis reafirma que esses produtos são benéficos para a saúde humana e que podem ser poderosos ingredientes em formulações alimentícias e medicinais.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARI, F. et al. Antioxidant small molecules confer variable protection against oxidative damage in yeast mutants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 24, p. 11740–11751, 2008.

AYALA, A. et al. Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2014, p. 1–31, 2014.

AZUMA, K. et al. Absorption of chlorogenic acid and caffeic acid in rats after oral administration. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 48, n. 11, p. 5496–5500, 2000.

BALTRUSAITYTE, V.; VENSKUTONIS, P. R.; CEKSTERYTE, V. Radical scavenging activity of different floral origin honey and beebread phenolic extracts. **Food Chemistry**, v. 101, n. 2, p. 502–514, 2007.

BARBOSA, K. B. F. et al. Estresse oxidativo: Conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutricao**, v. 23, n. 4, p. 629–643, 2010.

BELINHA, I. et al. Quercetin Increases Oxidative Stress Resistance and Longevity in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 2446–2451, 2007.

BERNT, E.; BERGMAYER, H. U. **Methods of Enzymatic Analysis, Glutathione**. 4. ed. Londres: Chemie Weinheim, Academic Press, 1974.

BIENERT, G. P.; SCHJOERRING, J. K.; JAHN, T. P. Membrane transport of hydrogen peroxide. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1758, n. 8, p. 994–1003, ago. 2006.

BRASIL. **Instrução Normativa 11 de 20 de outubro de 2000. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Mel**. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=7797>>.

BRAUER, M. J. et al. Homeostatic Adjustment and Metabolic Remodeling in Glucose-limited Yeast Cultures. **Molecular Biology of the Cell**, v. 16, n. 8, p. 2503–2517, 2005.

BREGER, J. et al. Antifungal chemical compounds identified using a *C. elegans* pathogenicity assay. **PLoS Pathogens**, v. 3, n. 2, p. 0168–0178, 2007.

- BRIGELIUS-FLOHÉ, R.; MAIORINO, M. Glutathione peroxidases. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1830, n. 5, p. 3289–3303, 2013.
- BÚFALO, M. C.; SFORCIN, J. M. The modulatory effects of caffeic acid on human monocytes and its involvement in propolis action. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 67, n. 5, p. 740–745, 2015.
- CAI, Y. et al. Structure-radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants. **Life sciences**, v. 78, n. 25, p. 2872–2888, 2006.
- CALLEMIEN, D.; COLLIN, S. Structure, Organoleptic Properties, Quantification Methods, and Stability of Phenolic Compounds in Beer—A Review. **Food Reviews International**, v. 26, n. June 2014, p. 1–84, 2009.
- CAN, Z. et al. An investigation of Turkish honeys: Their physico-chemical properties, antioxidant capacities and phenolic profiles. **Food Chemistry**, v. 180, p. 133–141, 2015.
- CARILLON, J. et al. Superoxide dismutase administration, a potential therapy against oxidative stress related diseases: Several routes of supplementation and proposal of an original mechanism of action. **Pharmaceutical Research**, v. 30, n. 11, p. 2718–2728, 2013.
- CARLOS, J. et al. Antimicrobial activity , phenolic profile and role in the inflammation of propolis. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, p. 1790–1795, 2012.
- CELIK, S.; ERDOGAN, S. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) protects brain against oxidative stress and inflammation induced by diabetes in rats. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 312, n. 1-2, p. 39–46, 2008.
- CELLI, N. et al. In vitro and in vivo stability of caffeic acid phenethyl ester, a bioactive compound of propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 9, p. 3398–3407, 2007.
- CHEN, F.; GONG, P. Caffeic acid phenethyl ester protect mice hepatic damage against Cadmium exposure. **Procedia Environmental Sciences**, v. 8, p. 633–636, 2011.
- 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.
- COELHO, V. R. et al. Antiepileptogenic, antioxidant and genotoxic evaluation of rosmarinic acid and its metabolite caffeic acid in mice. **Life Sciences**, v. 122, p. 65–71, 2015.
- COSTA, V.; MORADAS-FERREIRA, P. Oxidative stress and signal transduction in

Saccharomyces cerevisiae: Insights into ageing, apoptosis and diseases. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 22, n. 4-5, p. 217–246, 2001.

CRUZ, M. A. O. **Evaluation and characterization of antioxidant and antigenotoxic properties of Portuguese propolis**. [s.l.: s.n.].

DA SILVA, C. G. et al. Protective effects of flavonoids and extract from Vellozia kolbekii Alves against oxidative stress induced by hydrogen peroxide in yeast. **Journal of Natural Medicines**, v. 66, n. 2, p. 367–372, 2012.

DA SILVA, I. A. A. et al. Phenolic profile, antioxidant activity and palynological analysis of stingless bee honey from Amazonas, Northern Brazil. **Food chemistry**, v. 141, n. 4, p. 3552–8, 15 dez. 2013.

DA SILVA, P. M. et al. Honey: Chemical composition, stability and authenticity. **Food Chemistry**, v. 196, p. 309–323, 2016.

DANI, C. et al. Antioxidant protection of resveratrol and catechin in Saccharomyces cerevisiae. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 11, p. 4268–4272, 2008.

DEMIDCHIK, V. Mechanisms of oxidative stress in plants: From classical chemistry to cell biology. **Environmental and Experimental Botany**, v. 109, p. 212–228, jul. 2014.

EL-SEEDI, H. R. et al. Biosynthesis, natural sources, dietary intake, pharmacokinetic properties, and biological activities of hydroxycinnamic acids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 44, p. 10877–10895, 2012.

ETERAF-OSKOU EI, T.; NAJAFI, M. Traditional and modern uses of natural honey in human diseases: A review. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 16, n. 6, p. 731–742, 2013.

FARAH, A.; DUARTE, G. **Bioavailability and Metabolism of Chlorogenic Acids from Coffee**. [s.l.] Elsevier Inc., 2015.

FENG, R. et al. Inhibition of activator protein-1, NF- κ B, and MAPKs and induction of phase 2 detoxifying enzyme activity by chlorogenic acid. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 30, p. 27888–27895, 2005.

FERNANDES, P. N. et al. Oxidative stress response in eukaryotes: effect of glutathione, superoxide dismutase and catalase on adaptation to peroxide and menadione stresses in Saccharomyces cerevisiae. **Redox report : communications in free radical research**, v. 12,

n. 5, p. 236–244, 2007.

FROZZA, C. O. DA S. et al. Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis. **Food and Chemical Toxicology**, v. 52, p. 137–142, 2013.

GAŠIĆ, U. et al. Phenolic profile and antioxidant activity of Serbian polyfloral honeys. **Food Chemistry**, v. 145, p. 599–607, 2014.

GIACOMETTI MUHVI, D., PAVLETI, A., DUDARI, L., J. Cocoa polyphenols exhibit antioxidant, anti-inflammatory, anticancerogenic, and anti-necrotic activity in carbon tetrachloride-intoxicated mice. **Journal of Functional Foods**, v. 23, p. 177–187, 2016.

GÖÇER, H.; GÜLÇİN, I. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE): correlation of structure and antioxidant properties. **International journal of food sciences and nutrition**, v. 62, n. 8, p. 821–5, 2011.

GONTHIER, M. P. et al. Microbial metabolism of caffeic acid and its esters chlorogenic and caftaric acids by human faecal microbiota in vitro. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 60, n. 9, p. 536–540, 2006.

GOSTIMSKAYA, I.; GRANT, C. M. Yeast mitochondrial glutathione is an essential antioxidant with mitochondrial thioredoxin providing a back-up system. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 94, p. 55–65, 2016.

GRANT, C. M.; MACIVER, F. H.; DAWES, I. W. Mitochondrial function is required for resistance to oxidative stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **FEBS Letters**, v. 410, n. 2-3, p. 219–222, 1997.

GREGORIS, E.; STEVANATO, R. Correlations between polyphenolic composition and antioxidant activity of Venetian propolis. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 1, p. 76–82, 2010.

HABIB, H. M. et al. Bioactive components, antioxidant and DNA damage inhibitory activities of honeys from arid regions. **Food chemistry**, v. 153, p. 28–34, 15 jun. 2014.

HERMAN, P. K. Stationary phase in yeast. **Current Opinion in Microbiology**, v. 5, n. 6, p. 602–607, 2002.

IMLAY, J. A. The molecular mechanisms and physiological consequences of oxidative stress: lessons from a model bacterium. **Nature reviews. Microbiology**, v. 11, n. 7, p. 443–54, 2013.

ITOH, A. et al. Hepatoprotective Effect of Syringic Acid and Vanillic Acid on CCl₄ -

- Induced Liver Injury. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v. 33, n. 6, p. 983–987, 2010.
- JENSEN, S. J. K. Oxidative stress and free radicals. **Journal of Molecular Structure: THEOCHEM**, v. 666-667, p. 387–392, 2003.
- KECKEŠ, S. et al. The determination of phenolic profiles of Serbian unifloral honeys using ultra-high-performance liquid chromatography/high resolution accurate mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 138, n. 1, p. 32–40, 2013.
- KIM, J.; LEE, K. W. Coffee and its Active Compounds are Neuroprotective. **Coffee in Health and Disease Prevention**, p. 423–427, 2015.
- KONISHI, Y.; KOBAYASHI, S. Transepithelial Transport of Chlorogenic Acid, Caffeic Acid, and Their Colonic Metabolites in Intestinal Caco-2 Cell Monolayers. **J. Agric. Food Chem**, v. 52, p. 2518–2526, 2004.
- KRISHNAIAH, D.; SARBATLY, R.; NITHYANANDAM, R. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. **Food and Bioproducts Processing**, v. 89, n. 3, p. 217–233, 2011.
- LAMBERT, J. D.; ELIAS, R. J. The antioxidant and pro-oxidant activities of green tea polyphenols: A role in cancer prevention. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 501, n. 1, p. 65–72, 2010.
- LAVOVÁ, B. et al. Diauxic growth of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**, n. 2002, p. 122–123, 2014.
- LEÓN-GONZÁLEZ, A. J.; AUGER, C.; SCHINI-KERTH, V. B. Pro-oxidant activity of polyphenols and its implication on cancer chemoprevention and chemotherapy. **Biochemical Pharmacology**, v. 98, n. 3, p. 371–380, 2015.
- LI, S. et al. Research progress of natural antioxidants in foods for the treatment of diseases. **Food Science and Human Wellness**, dez. 2014.
- LIMA, É. S.; SAES, D.; ABDALLA, P. Peroxidação lipídica : mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 37, n. 3, p. 293–303, 2001.
- LOUREIRO, A. P. M.; DI, P.; MEDEIROS, M. H. G. Formação de adutos exocíclicos com bases de DNA: Implicações em mutagenese e carcinogênese. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 777–793, 2002.

LOZANO, R. et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. **The Lancet**, v. 380, n. 9859, p. 2095–2128, 2012.

LUSHCHAK, V. I. **Budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a model to study oxidative modification of proteins in eukaryotes** *Acta Biochimica Polonica*, 2006.

LUSHCHAK, V. I. Oxidative stress in yeast. **Biochemistry. Biokhimiia**, v. 75, n. 3, p. 281–296, 2010.

LUSHCHAK, V. I. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. **Chemico-Biological Interactions**, v. 224, p. 164–175, 2014.

MAETA, K. et al. Green tea polyphenols function as prooxidants to activate oxidative-stress-responsive transcription factors in yeasts. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 2, p. 572–580, 2007.

MANDALARI, G. et al. Antimicrobial activity of flavonoids extracted from bergamot (*Citrus bergamia* Risso) peel, a byproduct of the essential oil industry. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, n. 6, p. 2056–2064, 2007.

MANFREDINI, V. et al. Glutathione peroxidase induction protects *Saccharomyces cerevisiae* *sod1Δ sod2Δ* double mutants against oxidative damage. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, n. 2, p. 159–165, 2004.

MARÇO, P. H.; POPPI, R. J.; SCARMINIO, I. S. Procedimentos analíticos para identificação de antocianinas presentes em extratos naturais. **Quimica Nova**, v. 31, n. 5, p. 1218–1223, 2008.

MARCUCCI, M. C. Biological and therapeutic properties of chemical propolis constituents. **Quimica Nova**, v. 19, n. 5, p. 529–536, 1996.

MARIANI, D. et al. Involvement of glutathione transferases, Gtt1 and Gtt2, with oxidative stress response generated by H₂O₂ during growth of *Saccharomyces cerevisiae*. **Redox Report**, v. 13, n. 6, p. 246–254, 2008.

MASUOKA, N.; MATSUDA, M.; KUBO, I. Characterisation of the antioxidant activity of flavonoids. **Food Chemistry**, v. 131, n. 2, p. 541–545, 2012.

MAURYA, D. K.; DEVASAGAYAM, T. P. A. Antioxidant and prooxidant nature of hydroxycinnamic acid derivatives ferulic and caffeic acids. **Food and Chemical Toxicology**,

v. 48, n. 12, p. 3369–3373, 2010.

MENDOZA-WILSON, A. M.; SANTACRUZ-ORTEGA, H.; BALANDRÁN-QUINTANA, R. R. Relationship between structure, properties, and the radical scavenging activity of morin. **Journal of Molecular Structure**, v. 995, n. 1-3, p. 134–141, 2011.

MORGAN, B. et al. Multiple glutathione disulfide removal pathways mediate cytosolic redox homeostasis. **Nat Chem Biol**, v. 9, n. 2, p. 119–125, 2013.

MURTAZA, G.; KARIM, S.; AKRAM, M. Caffeic Acid Phenethyl Ester and Therapeutic Potentials. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1–9, 2014.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6^a. ed. [s.l.] Artmed, 2014. v. 2

NELSON, S. K. et al. The induction of human superoxide dismutase and catalase in vivo: A fundamentally new approach to antioxidant therapy. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 40, n. 2, p. 341–347, 2006.

ORINO, K. et al. Ferritin and the response to oxidative stress. **The Biochemical journal**, v. 357, n. Pt 1, p. 241–247, 2001.

OSAWA, C. C.; DE FELÍCIO, P. E.; GONÇALVES, L. A. G. Teste de TBA aplicado a carnes e derivados: Métodos tradicionais, modificados e alternativos. **Química Nova**, v. 28, n. 4, p. 655–663, 2005.

PEREIRA, M. D. et al. Targets of oxidative stress in yeast sod mutants. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1620, n. 1-3, p. 245–251, 2003.

PEREIRA, M. D.; ELEUTHERIO, E. C.; PANEK, A. D. Acquisition of tolerance against oxidative damage in *Saccharomyces cerevisiae*. **BMC microbiology**, v. 1, p. 11, 2001.

PROCHÁZKOVÁ, D.; BOUŠOVÁ, I.; WILHELMOVÁ, N. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. **Fitoterapia**, v. 82, n. 4, p. 513–523, 2011.

RAO, P. V. et al. Biological and therapeutic effects of honey produced by honey bees and stingless bees: a comparative review. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, p. 1–8, 2016.

REGINATO, F. F. Z.; DA SILVA, A. R. H.; BAUERMAN, L. D. F. Avaliação do uso de flavonoides no tratamento da inflamação. **Revista Cubana de Farmacia**, v. 49, n. 3, p. 569–582, 2015.

ROLEIRA, F. M. F. et al. Plant derived and dietary phenolic antioxidants: Anticancer

- properties. **Food Chemistry**, v. 183, p. 235–258, 2015.
- SÁ, R. A. DE et al. Brazilian propolis protects *Saccharomyces cerevisiae* cells against oxidative stress. **Brazilian journal of microbiology**, v. 44, n. 3, p. 993–1000, 2013.
- SADOWSKA-BARTOSZ, I. et al. Dimethyl sulfoxide induces oxidative stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS yeast research**, v. 13, n. 8, p. 820–30, 2013.
- SALGUEIRO, F. B. et al. Phenolic Composition and antioxidant proprieties of brasilian honeys. **Química Nova**, v. 37, n. 5, p. 821–826, 2014.
- SATO, Y. et al. In vitro and in vivo antioxidant properties of chlorogenic acid and caffeic acid. **International Journal of Pharmaceutics**, 2011.
- SETHIYA, N. K.; TRIVEDI, A.; MISHRA, S. The total antioxidant content and radical scavenging investigation on 17 phytochemical from dietary plant sources used globally as functional food. **Biomedicine & Preventive Nutrition**, v. 4, n. 3, p. 439–444, jul. 2014.
- SHAHIDI, F.; AMBIGAIPALAN, P. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects - A review. **Journal of Functional Foods**, v. 18, p. 820–897, 2015.
- SILVA, J. A. et al. Aplicação da metodologia de planejamento fatorial e análise de superfícies de resposta para otimização da fermentação alcoólica. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1073–1077, 2008.
- SILVA, R. et al. Flavonóides: constituição química, ações medicinais e potencial tóxico. **Acta toxicológica argentina**, v. 23, p. 36–43, 2015.
- SOARES, D. G.; ANDREAZZA, A. C.; SALVADOR, M. Avaliação de compostos com atividade antioxidante em células da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 1, p. 95–100, 2005.
- SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes Phenolic acids as antioxidants. **Revista de Nutrição**, v. 15, n. 1, p. 71–81, 2002.
- SOUSA, C. M. D. M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 351–355, 2007.
- SOUSA, J. M. et al. Polyphenolic profile and antioxidant and antibacterial activities of monofloral honeys produced by Meliponini in the Brazilian semiarid region. **Food Research International**, v. 84, p. 61–68, 2016.

- SOVA, M. Antioxidant and antimicrobial activities of cinnamic acid derivatives. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 12, n. 8, p. 749–67, 2012.
- SREEDHARAN, V.; VENKATACHALAM, K. K.; NAMASIVAYAM, N. Effect of morin on tissue lipid peroxidation and antioxidant status in 1, 2-dimethylhydrazine induced experimental colon carcinogenesis. **Investigational New Drugs**, v. 27, n. 1, p. 21–30, 2009.
- STEELS, E. L.; LEARMONTH, R. P.; WATSON, K. Stress tolerance and membrane lipid unsaturation in *Saccharomyces cerevisiae* grown aerobically or anaerobically. **Microbiology (Reading, England)**, v. 140 (Pt 3, n. 1994, p. 569–76, 1994.
- STĘPNIAK, J.; LEWIŃSKI, A.; KARBOWNIK-LEWIŃSKA, M. Membrane lipids and nuclear DNA are differently susceptible to Fenton reaction substrates in porcine thyroid. **Toxicology in vitro**, v. 27, n. 1, p. 71–8, fev. 2013.
- SUN, K. et al. Anti-Aging Effects of Hesperidin on *Saccharomyces cerevisiae* via Inhibition of Reactive Oxygen Species and UTH1 Gene Expression. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 76, n. 4, p. 640–645, 2012.
- TOHAMY, A. A. et al. Assessment of anti-mutagenic, anti-histopathologic and antioxidant capacities of Egyptian bee pollen and propolis extracts. **Cytotechnology**, v. 66, n. 2, p. 283–297, 2014.
- TOLEDANO, M. B. et al. Oxidative stress responses in yeast. **Yeast Stress Responses**, v. 1, p. 242–87, 2003.
- TREUSCH, S. et al. Functional links between A β toxicity, endocytic trafficking, and Alzheimer's disease risk factors in yeast. **Science (New York, N.Y.)**, v. 334, n. 6060, p. 1241–5, 2011.
- VALENZUELA-BARRA, G. et al. Anti-inflammatory activity and phenolic profile of propolis from two locations in Región Metropolitana de Santiago, Chile. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 168, p. 37–44, 2015.
- VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 39, n. 1, p. 44–84, 2007.
- VAN RAAMSDONK, J. M.; HEKIMI, S. From the Cover: Superoxide dismutase is dispensable for normal animal lifespan. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 15, p. 5785–5790, 2012.

- VANDAMME, L. et al. Honey in modern wound care: A systematic review. **Burns**, v. 39, n. 8, p. 1514–1525, 2013.
- VENU GOPAL, J. Morin Hydrate: Botanical origin, pharmacological activity and its applications: A mini-review. **Pharmacognosy Journal**, v. 5, n. 3, p. 123–126, 2013.
- VILLANO, D. et al. Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. **Talanta**, v. 71, n. 1, p. 230–235, 2007.
- VIUDA-MARTOS, M. et al. Functional properties of honey, propolis, and royal jelly. **Journal of food science**, v. 73, n. 9, p. R117–24, nov. 2008.
- WILMSEN, P. K.; SPADA, D. S.; SALVADOR, M. Antioxidant activity of the flavonoid hesperidin in chemical and biological systems. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 12, p. 4757–4761, 2005.
- WU, M. J. et al. An antioxidant screening assay based on oxidant-induced growth arrest in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Research**, v. 11, n. 4, p. 379–387, 2011.
- WU, W. M. et al. Free radical scavenging and antioxidative activities of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) and its related compounds in solution and membranes: A structure-activity insight. **Food Chemistry**, v. 105, n. 1, p. 107–115, 2007.
- XIANG, L. et al. Anti-aging effects of phloridzin, an apple polyphenol, on yeast via the SOD and Sir2 genes. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 75, n. 5, p. 854–858, 2011.
- XIANG, Z. N.; NING, Z. X. Scavenging and antioxidant properties of compound derived from chlorogenic acid in South-China honeysuckle. **LWT - Food Science and Technology**, v. 41, n. 7, p. 1189–1203, 2008.
- YANG, J.; GUO, J.; YUAN, J. In vitro antioxidant properties of rutin. **LWT - Food Science and Technology**, v. 41, n. 6, p. 1060–1066, 2008.
- YE, Z.-W. et al. Oxidative stress, redox regulation and diseases of cellular differentiation. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1850, n. 8, p. 1607–1621, 2014.
- YEN, G.-C. et al. Pro-oxidative properties of flavonoids in human lymphocytes. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 67, n. 6, p. 1215–1222, 2003.
- ZHANG, H. et al. Inhibitory Properties of Aqueous Ethanol Extracts of Propolis on Alpha-Glucosidase. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, p. 1–7,

2015a.

ZHANG, Y. et al. Assessment of the correlations between reducing power, scavenging DPPH activity and anti-lipid-oxidation capability of phenolic antioxidants. **LWT - Food Science and Technology**, v. 63, n. 1, p. 569–574, 2015b.

ZYRACKA, E. et al. Yeast as a biosensor for antioxidants: Simple growth tests employing a *Saccharomyces cerevisiae* mutant defective in superoxide dismutase. **Acta Biochimica Polonica**, v. 52, n. 3, p. 679–684, 2005.