



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

**EFEITO DE EXTRATOS DE AÇAÍ (*Euterpe oleracea* Mart) E DE
PITANGA (*Eugenia uniflora* L.) SOBRE A ATIVIDADE DE CATALASE
E GST EM CÉREBROS E HEPATÓCITOS DE RATOS VISANDO A
PROTEÇÃO CONTRA AGENTES CITOTÓXICOS**

Taís da Silva Rosa

Sob Orientação da Professora
Cristiane Martins Cardoso

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

Seropédica, RJ
Julho de 2019

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

R788e Rosa, Taís da Silva, 1984-
EFEITO DE EXTRATOS DE AÇAÍ (Euterpe oleracea Mart)
E DE PITANGA (Eugenia uniflora L.) SOBRE A ATIVIDADE
DE CATALASE E GST EM CÉREBROS E HEPATÓCITOS DE RATOS
VISANDO A PROTEÇÃO CONTRA AGENTES CITOTÓXICOS / Taís da
Silva Rosa. - Japeri, 2019.
122 f.: il.

Orientadora: Cristiane Martins Cardoso.
Tese(Doutorado). -- Universidade Federal Rural do Rio
de Janeiro, Pós Graduação em Química, 2019.

1. GST. 2. Catalase. 3. Atividade. 4. Açaí. 5.
Pitanga. I. Cardoso, Cristiane Martins , 1973-,
orient. II Universidade Federal Rural do Rio de
Janeiro. Pós Graduação em Química III. Título.

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

TAÍS DA SILVA ROSA

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

TESE APROVADA EM 03/07/2019



Cristiane Martins Cardoso. Dr^a.UFRRJ
(Orientadora)



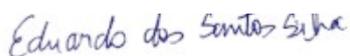
Cristiano Jorge Riger. Dr.UFRRJ



Diego de Mello conde de Brito. Dr. UFRRJ



Frederico Freire Bastos. Dr.UERJ



Eduardo dos Santos Silva. Dr. SEEDUC/RJ

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu filho, João Gabriel, que me impulsiona a acordar todos os dias e me faz uma pessoa melhor. Que me olha sorrindo e me pergunta: “mãe, você está estressada?” E quando respondo ele me dá vários beijos. Me dá bom dia, e pergunta como foi meu dia, todos os dias. Ele me faz perceber o que realmente é importante na vida e me faz desejar ser o melhor exemplo para que ele siga, e saiba a importância de enfrentar os desafios e não desistir dos sonhos. Dedico aos meus pais, que em meio a tantas batalhas, me olham sempre com carinho e com uma ternura imensuráveis. Que deram muito de suas vidas para que eu chegasse até aqui e, não satisfeitos, continuam a fazer dia após dia, minha vida valer a pena. Dedico ao meu marido, que mesmo depois de tantas e tantas lutas permanece ao meu lado e me apoia, e mesmo quando a vontade é de jogar tudo para o alto, me diz que ficaremos bem e que tudo dará certo. Como ele diz: “O pior já passou e nós vencemos.” Foram incontáveis tropeços e quedas duras, mas em todas vocês estavam comigo e participaram de um jeito ou outro. Se hoje há pessoas lendo este texto é porque vocês existem. Serei eternamente grata pela família que Deus escolheu para mim, pela paciência e amor que me concedem e por não desistirem de mim. Amo vocês e darei sempre o melhor de mim para que se orgulhem.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela vida que me concede, pela saúde e pela oportunidade de estudar e trabalhar. Agradeço a Ele por me guiar nas decisões e iluminar meus pensamentos, me dando condições de terminar esta Tese, me permitindo superar tantas adversidades. Agradeço ainda, por todas as pessoas especiais que Ele colocou e ainda coloca em meu caminho.

Agradeço ao meu filho e aos meus pais por todo carinho de sempre, por entenderem minhas ausências, meu nervosismo, e tudo que passei durante todos esses anos. Agradeço ao meu marido pelo apoio e paciência, pelo carinho, principalmente nos últimos anos. Todos foram essenciais para realização deste trabalho, em todos os sentidos.

Agradeço aos velhos e novos amigos. Soraia, amiga que o doutorado me deu e que mesmo distante ouve meus lamentos e desesperos, me apoia e divide comigo alegrias e frustrações de um doutorado. É amizade para vida.

Agradeço aos amigos que encontrei em minha nova caminhada. O IFMT me surpreendeu com amigades que parecem já serem de anos... Laila, Laís, Felipe, Mônica, Carol. Impossível terminar essa etapa da minha vida sem agradecer a vocês. Cada abraço nos corredores, carinho, palavras de apoio em todas as vezes que cheguei para trabalhar decidida em desistir do doutorado. E foram muitas vezes.... Obrigada pela paciência. Encontrar pessoas como vocês em uma cidade nova, longe da família, totalmente fora da zona de conforto, com novos desafios e realidades, tão distante de onde o Doutorado foi realizado, diante de tantas dificuldades, foi maravilhoso. Não é exagero dizer que vocês mudaram minha história. Serei eternamente grata e desejo que esta amizade perdure.

Agradeço minha Orientadora Cristiane, que em meio a tantas dores e dificuldades, encontrou um momento para mim. Cris, você é uma pessoa muito especial. Eu sei que não fui a melhor aluna que você já teve ou quis ter, mas eu te juro que fiz o melhor que pude. Eu desejo que Deus retribua tudo que você fez por mim e que alegre seus dias e te faça muito feliz.

Agradeço a CAPES por financiar a pesquisa desta Tese de Doutorado e pela concessão da bolsa de estudos.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior - Brasil (CAPES) - Código de financiamento 001.

A todos, meu muito obrigada.

RESUMO

ROSA, Taís da Silva. **Efeito de extratos de açaí (*Euterpe oleracea* Mart) e pitanga (*Eugenia uniflora* L) sobre a atividade de catalase e GST em cérebro e hepatócito de ratos visando a proteção contra agentes citotóxicos.** 2019. 122p Tese (Doutorado em Química, Bioquímica). Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2019.

Existem diversos compostos xenobióticos capazes de prejudicar o funcionamento do organismo diretamente ou induzindo a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs). O processo necessário de eliminação de xenobióticos ocorre principalmente com a participação de enzimas de biotransformação, como a Glutathione S-transferase (GST). Já as EROs, são eliminadas por outros mecanismos que podem também envolver a atuação de enzimas, como a catalase. Compostos bioativos presentes em vegetais, principalmente frutas, são constantemente relatados por possuírem ação antioxidante e agirem diretamente na célula ou atuarem como moduladores tanto de enzimas de biotransformação quanto do metabolismo de EROs. Neste trabalho, o objetivo foi verificar como compostos presentes em extratos de açaí e pitanga influenciam a atividade da GST, sua isoforma *mu* e da catalase cerebral e hepática de ratos, e avaliar a possibilidade dos extratos dessas frutas se tornarem alternativas promissoras para aumentar a capacidade do organismo de proteção contra agentes possivelmente citotóxicos. Foram obtidos os extratos das duas frutas, sendo o extrato bruto obtido com extração de compostos em água destilada e extratos fracionados: etéreo (éter etílico), alcoólico (em etanol, utilizando resíduo sólido resultante da obtenção do extrato etéreo) e aquoso (em água destilada, utilizando resíduo sólido resultante da obtenção do extrato etéreo e alcoólico). Estes extratos foram testados em ensaios enzimáticos de GST e catalase citosólicas cerebrais e hepáticas de ratos, e os resultados foram comparados com os ensaios controle, realizados na ausência de extratos. Foram realizados estudos cinéticos dos ensaios na presença e ausência dos extratos, em diversas concentrações de substrato, como curvas de Michaelis-Menten e o comportamento da enzima avaliado. Foi possível observar a capacidade modulatória dos compostos presentes nos extratos obtidos das duas frutas, de forma diferenciada e dependente do composto, da enzima e/ou isoforma. Tanto GST quanto catalase foram ativadas ou inibidas pelos diferentes extratos testados. Inativações foram mais recorrentes e, para GST, ocorreram na sua maioria de forma mista tanto para os extratos de açaí quanto de pitanga. Porém, inibição competitiva foi encontrada para o extrato bruto de pitanga em cérebro, indicando que os compostos presentes neste extrato inibiram a enzima com ligação direta ao sítio ativo. Para a GST hepática, o extrato bruto de açaí promoveu inibição não competitiva, mostrando interação direta dos compostos com o sítio ativo. Foi observado um aumento da atividade da GST com o extrato etéreo de açaí, em cérebro, e com o extrato alcoólico de pitanga, em fígado. Já para catalase, o aumento da atividade foi observado com o extrato bruto de açaí em cérebro e bruto de pitanga tanto para a catalase cerebral quanto hepática. Os resultados obtidos com estes extratos permitem relacioná-los ao aumento da capacidade celular de biotransformação e diminuição da concentração de compostos xenobióticos no organismo, assim como com a redução da possibilidade de ocorrência de estresse oxidativo. Tendo em vista a forma de consumos das frutas ser semelhante ao extrato bruto obtido neste trabalho, o aumento da atividade da catalase proporcionado por esses extratos foi um dos resultados mais importantes obtidos na perspectiva de redução de EROs.

Palavras-chave: GST, Catalase, Frutas

ABSTRACT

ROSA, Taís da Silva. **Effect of Acai (*Euterpe oleracea* Mart) and Pitanga (*Eugenia uniflora* L) extracts on catalase and GST activity in rat brain and hepatocyte for protection against cytotoxic agents.** 2019. 122p Tese (Doutorado em Química, Bioquímica). Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2019.

There are several xenobiotic compounds capable of directly impairing the body's function or inducing the formation of reactive oxygen species (ROS). The necessary process for xenobiotic elimination occurs mainly with the participation of biotransformation enzymes, as Glutathione S-transferase (GST). ROS, on the other hand, are eliminated by other mechanisms that may also involve the action of enzymes, such as catalase. Bioactive compounds present in vegetables, especially fruits, are constantly reported to have antioxidant action and to act directly on the cell or to act as modulators of both biotransformation enzymes and ROS metabolism. In this study, we aimed to verify how compounds present in Acai and Pitanga extracts influence the activity of GST, its mu isoform and the cerebral and hepatic catalase of rats; also, to evaluate the possibility of the extracts of these fruits becoming promising alternatives to increase the protection capacity of the organism against potentially cytotoxic agents. Extracts of the two fruits were obtained; the crude extract was obtained by extracting compounds in distilled water and the ether (ethyl ether), alcoholic (in ethanol, using solid residue resulting from obtaining the ether extract) and aqueous (in distilled water, using solid residue resulting from the etheric and alcoholic extract) fractionated extracts. These extracts were tested in enzymatic assays of rat GST and cytosolic brain and hepatic catalase of rats, and the results were compared with control assays performed in the absence of extracts. Kinetic studies of the assays were performed in the presence and absence of extracts at various substrate concentrations, such as Michaelis-Menten curves and the enzyme behavior evaluated. It was possible to observe the modulatory capacity of the compounds present in the extracts obtained from the two fruits, depending on the compound, the enzyme and / or isoform. Both GST and catalase were activated or inhibited by the different extracts tested. Inactivations were more recurrent, and for GST occurred mostly in mixed form for both acai and pitanga extracts; however, competitive inhibition was found for crude brain pitanga extract indicating that the compounds present in this extract inhibited the enzyme without a direct bound to the active site. For hepatic GST, the raw acai extract promoted noncompetitive inhibition, presenting direct interaction of the compounds with the active site. Increased GST activity was observed with the açai ether extract in the brain and the alcoholic extract of pitanga in the liver. For catalase, increased activity was observed with crude açai extract in brain and crude pitanga extract for both cerebral and hepatic catalase. The results obtained with these extracts allow to relate them to the increase of the cellular capacity of biotransformation and decrease of the concentration of xenobiotic compounds in the organism, as well as to the reduction of the possibility of oxidative stress occurrence. Given that the fruit consumption is similar to the crude extract obtained in this work, the increased catalase activity provided by these extracts was one of the most important results obtained from the perspective of reducing ROS.

Keywords: GST, Catalase, Fruits

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resultados dos testes de prospecção fitoquímica de extratos apolares.....	35
Tabela 2. Resultados dos testes de prospecção fitoquímica de extratos polares.....	37
Tabela 3. Quantificação de fenóis totais em extrato etéreo de açaí obtidos pelo Método 1 e método QuEChERS adaptado, em mg/g de extrato.....	39
Tabela 4. Quantificação de fenóis totais em extratos de açaí e pitanga em mg/ g de extrato....	40
Tabela 5. Comparação dos parâmetros cinéticos da GST cerebral de rato sob influência dos diferentes extratos de pitanga e açaí.....	59
Tabela 6. Comparação dos parâmetros cinéticos da GST hepática de rato sob influência dos diferentes extratos de pitanga e açaí.....	71
Tabela 7. Atividade de catalase hepática solúvel de ratos na ausência (controle) e presença dos extratos bruto e etéreo de açaí e pitanga.....	83

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1.** Efeito dos extratos de açaí (A) e pitanga (B) sobre a atividade de GST geral cerebral de rato. Atividade de GST cerebral de rato com adição dos extratos bruto, etéreo, alcoólico e aquoso de açaí e pitanga, comparados ao controle (sem adição dos extratos)42
- Gráfico 2.** Efeito dos extratos de açaí (A) e pitanga (B) sobre a atividade de GST geral hepática de rato. Atividade de GST hepática de rato com adição dos extratos bruto, etéreo, alcoólico e aquoso de açaí e pitanga, comparados ao controle (sem adição dos extratos)44
- Gráfico 3.** (A) Atividade de GST geral cerebral de rato com adição dos extratos etéreos de açaí, obtidos a partir do método QuEChERS (Q) adaptado e do método segundo Broizini et al (2007), método “Normal” (N). (B) Comparação da atividade na GST geral cerebral entre os métodos. ns: sem diferença estatisticamente significativa.....46
- Gráfico 4.** Curva de Michaelis-Menten para atividade controle de GST citosólica cerebral de rato, em excesso do substrato 1-cloro 2,4-dinitrobenzeno (CDNB).....47
- Gráfico 5.** Gráfico de Michaelis-Menten: Efeito dos extratos brutos de pitanga (A) e açaí (B) sobre as atividades de GST cerebral de rato utilizando CDNB como substrato. (▪) Extrato; (•) Controle.....49
- Gráfico 6.** Gráficos de Lineweaver-Burk: Influência dos extratos brutos de pitanga (A) e açaí (B) sobre a atividade de GST cerebral de ratos. (▪) Extrato; (•) Controle.....50
- Gráfico 7.** Gráfico de Michaelis-Menten: Efeito dos extratos etéreos de pitanga (A) e açaí (B) sobre as atividades de GST cerebral de rato utilizando CDNB como substrato. (▪) Extrato; (•) Controle.....52
- Gráfico 8.** Gráficos de Lineweaver-Burk: Influência dos extratos etéreos de pitanga (A) e açaí (B) sobre a atividade de GST cerebral de ratos. (▪) Extrato; (•) Controle.....53
- Gráfico 9.** Gráfico de Michaelis-Menten: Efeito dos extratos alcoólico de pitanga (A) e açaí (B) sobre atividades de GST cerebral de rato utilizando CDNB como substrato. (▪) Extrato; (•) Controle.....55

Gráfico 10. Gráficos de Lineweaver-Burk: Influência dos extratos alcoolicos de pitanga (A) e açaí (B) sobre as atividades de GST cerebral de ratos. (▪) Extrato; (•) Controle.....	56
Gráfico 11. Gráfico de Michaelis-Menten: Efeito dos extratos aquosos de pitanga (A) e açaí (B) sobre a atividade de GST cerebral de rato utilizando CDNB como substrato. (▪) Extrato; (•) Controle.....	57
Gráfico 12. Gráficos de Lineweaver-Burk: Influência dos extratos aquosos de pitanga (A) e açaí (B) sobre a atividade de GST cerebral de ratos. (▪) Extrato; (•) Controle.....	58
Gráfico 13. Curva de Michaelis-Mentes para atividade controle de GST citosólica hepática de rato, utilizando 1-cloro 2,4-dinitrobenzeno (CDNB) como substrato.....	61
Gráfico 14. Efeito dos extratos brutos de pitanga (A) e açaí (B) sobre as curvas de Michaelis-Menten para GST hepática de rato utilizando CDNB como substrato. (•) Extratos; (▲) Controle.	62
Gráfico 15. Comparação dos gráficos de Lineweaver-Burk para a GST hepática. Influência dos extratos brutos de pitanga (A) e açaí (B). (•) Extratos; (▪) Controle.....	63
Gráfico 16. Efeito dos extratos etéreos de pitanga (A) e açaí (B) sobre as curvas de Michaelis-Menten para GST hepática de rato utilizando CDNB como substrato. (•) Extratos; (▲) Controle.	64
Gráfico 17. Comparação dos gráficos de Lineweaver-Burk para a GST hepática. Influência dos extratos etéreos de pitanga (A) e açaí (B). (•) Extratos; (▪) Controle.....	65
Gráfico 18. Efeito dos extratos alcoólico de pitanga (A) e açaí (B) sobre as curvas de Michaelis-Menten para GST hepática de rato utilizando CDNB como substrato. (•) Extratos; (▲) Controle.	67
Gráfico 19. Comparação dos gráficos de Lineweaver-Burk para a GST hepática. Influência dos extratos alcoólicos de pitanga (A) e açaí (B). (•) Extratos; (▪) Controle.....	68

Gráfico 20. Efeito dos extratos aquosos de pitanga (A) e açaí (B) sobre as curvas de Michaelis-Menten para GST hepática de rato utilizando CDNB como substrato. (•) Extratos; (▲) Controle.....	69
Gráfico 21. Comparação dos gráficos de Lineweaver-Burk para a GST hepática. Influência dos extratos aquosos de pitanga (A) e açaí (B). (•) Extratos; (▪) Controle.....	70
Gráfico 22. Atividade de GST geral hepática (A) e cerebral (B) de rato com adição dos extratos aquosos de pitanga, obtidos a partir do método QuEChERS (Q).....	73
Gráfico 23. Atividade de GST mu de rato com adição do extrato aquoso de açaí. Foi utilizado como substrato o DCNB (1,2- Dicloro-4-nitrobenzeno) 80 mM. Comparação entre os diferentes tecidos: controle hepático (CF), extrato aquoso em fígado (AF), controle cerebral (CC), extrato aquoso em cérebro (CA).....	76
Gráfico 24. Atividade de GST mu de rato com adição do extrato etéreo de açaí. Foi utilizado como substrato o DCNB (1,2- Dicloro-4-nitrobenzeno) 80 mM. Comparação entre os diferentes tecidos: controle hepático (CF), extrato etéreo em fígado (F), controle cerebral (CC), extrato etéreo em cérebro (C).....	78
Gráfico 25. Atividade de GST mu de rato com adição do extrato bruto de pitanga. Foi utilizado como substrato o DCNB (1,2- Dicloro-4-nitrobenzeno) 80 mM. Comparação entre os diferentes tecidos: controle hepático (CF), extrato bruto em fígado (F), controle cerebral (CC), extrato bruto em cérebro (C).....	79
Gráfico 26. Atividade de GST mu de rato com adição do extrato aquoso de pitanga extraído pelo método de QuEChERS. Foi utilizado como substrato o DCNB (1,2- Dicloro-4-nitrobenzeno) 80 mM. Foi realizada a comparação entre os diferentes tecidos: controle hepático (CF), extrato aquoso em fígado (QF), controle cerebral (CC), extrato aquoso em cérebro (QC).....	80

Gráfico 27. Atividade de catalase citosólica cerebral (A e B) e hepática (C e D) de rato com adição dos extratos aquosos de pitanga e açaí. Foram utilizadas 2 concentrações do substrato peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 7,5 μM (A e C) e 30 μM (B e D). Foi realizada a comparação entre os diferentes extratos: bruto de pitanga (BP, bruto de açaí (BA), etéreo de pitanga (EP), etéreo de açaí (EA, alcoólico de pitanga (ALP), alcoólico de açaí (ALA), aquoso de pitanga (AP) e aquoso de açaí (AA).....84

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Esquema resumido da biotransformação enzimática de compostos lipofílicos, contendo fases I (ativação), II (inativação) e III (eliminação). Adaptado de Bard (2000)4
- Figura 2.** Estrutura da Molécula de GSH.....6
- Figura 3.** Estrutura da GSTP humana em complexo com GSH (Allocati et al., 2018)6
- Figura 4.** Representação esquemática da conjugação do benzo-a-pireno e do acetoaminophen com GSH, catalisada pela enzima GST (Parkinson, 2001)7
- Figura 5.** Etapas de redução univalente do O₂ (adaptado de Lee et al., 2004)10
- Figura 6.** Reação de Fenton (adaptado de Marques, 2015)10
- Figura 7.** Cadeia transportadora de elétrons. “Vazamento” de elétrons da cadeia transportadora de elétrons para a formação de EROs (Lehninger et al., 2011)11
- Figura 8.** Reações esquematizadas e enzimas participantes (grifadas em azul) da formação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. (adaptado de Barbosa et al., 2006)12
- Figura 9.** Esquema resumido de reações que compõem o mecanismo de defesa antioxidante celular através da interconversão enzimática da glutathiona (GSH), nas suas formas reduzida e oxidada. (Rover Junior et al., 2001)14
- Figura 10.** Sistema de defesas antioxidantes celulares e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (Kensler et al., 2007)15
- Figura 11.** Vista do tetrâmero da catalase humana. (Adaptada de Putnam et al., 2000)16
- Figura 12.** Aplicações da catalase (adaptado de Kaushal et al., 2018)17
- Figura 13.** A) Frutos de açaí. B) Cacho de açaí.....20

Figura 14. (A) Frutos de pitanga. (B) Pitangueira.....	22
Figura 15. Separação, pelo método QuEChERS modificado, do extrato etéreo (15A) e alcoólico (15B) de pitanga obtido a partir do resíduo sólido da obteção do extrato etéreo.....	33
Figura 16. Separação de fases obtida durante extração etérea de polpa de pitanga pelo método QuEChERS.....	34
Figura 17. Possíveis vias de oxidação das catecolaminas-OH-radical-hidroxi-O (Andreazza et al., 2006)	75
Figura 18. Comparação estrutural entre enzimas GST e sua isoforma GSTmu obtidas de Plasmodium falciparum, através de determinação por método raio-x. (Fritz-Wolf et al., 2003).....	82

LISTA DE ABREVIACÕES E SÍMBOLOS

ATP	Adenosina Tri Fosfato
CDNB	1-Cloro-2,4-dinitrobenzeno
DCNB	1,2-Dicloro-4-nitrobenzeno
EAA	Extrato Aquoso de Açaí
EAcA	Extrato Alcoólico de Açaí
EAP	Extrato Aquoso de Pitanga
EAcP	Extrato alcoólico de Pitanga
EAQP	Extrato Aquoso de QuEChER de Pitanga
EBA	Extrato Bruto de Açaí
EEAM	Extrato Etéreo de Açaí Método 1
EEAQ	Extrato Etéreo de Acai QuEChER
EETM	Extrato Etéreo de Pitanga Método 1
EETP	Extrato Etéreo de Pitanga QuEChER
EPB	Extrato de Pitanga Bruto
ERN	Espécies Reativas de Nitrogênio
ERO	Espécies Reativos de Oxigênio
GPx	Glutaciona Peroxidase
GR	Glutaciona Redutase
GSH	Glutaciona Oxidada
GSSG	Glutaciona Reduzida
GST	Glutaciona S-transferase
GSTmu	Glutaciona S-transferase classe mu
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato Reduzida
NOS	xido Ntrico Sintase
Trx	Tiorredoxina
TrxR	Tiorredoxina Redutase
QuEChERS	Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1 BIOTRANSFORMAÇÃO DE XENOBIÓTICOS	3
2.1.1 Glutathione S-transferase (GST)	5
2.2 PROBLEMAS DA BIOTRANSFORMAÇÃO.....	8
2.3 ESTRESSE OXIDATIVO.....	9
2.3.1 Catalase	16
2.4 MODULAÇÃO ENZIMÁTICA POR COMPOSTAS BIOATIVOS.....	18
2.5 AÇAÍ	19
2.6 PITANGA	22
3. OBJETIVOS	24
3.1 OBJETIVOS GERAIS	24
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	24
4 MATERIAL E MÉTODOS	25
4.1 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS DE PITANGA E AÇAÍ	25
4.1.1 Obtenção das polpas de frutas	25
4.1.2 Obtenção dos extratos brutos de pitanga e açaí fracionados de açaí e pitanga	25
4.1.3 Obtenção dos extratos fracionados de pitanga e açaí	25
4.1.3.1 Método de extração fracionada “Normal”.....	25
4.1.3.2 Método QuEChERS	25
4.2 PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA DOS EXTRATOS	26
4.2.1 Extratos Apolares	26
4.2.1.1 Antraquinonas.....	26
4.2.1.2 Esteroides e Triterpenoides	26
4.2.1.3 Derivados de Cumarinas.....	26
4.2.1.4 Glicosídeos Cardioativos	27
4.2.2 Extratos Polares	27
4.2.2.1 Alcalóides	27
4.2.2.2 Flavonoides.....	27
4.2.2.3 Saponinas.....	27
4.2.2.4 Carboidratos	28
4.2.2.5 Ácidos Orgânicos	28
4.2.2.6 Taninos	28

4.2.2.7 Aminoácidos não proteicos	29
4.3 DETERMINAÇÃO DE FENÓIS TOTAIS.....	29
4.4 PREPARO DE FRAÇÕES ENZIMÁTICAS CITOSÓLICAS DE CÉREBRO E FÍGADO DE RATOS.....	29
4.5 DETERMINAÇÃO DA QUANTIDADE DE PROTEÍNA NA FRAÇÃO CITOSÓLICA DE CÉREBRO E FÍGADO DE RATO.....	30
4.6 ENSAIOS ENZIMÁTICOS	30
4.6.1 Determinação da atividade geral de GST	30
4.6.2 Determinação da atividade da GST da classe <i>Mu</i>	30
4.6.3 Determinação da atividade de catalase citosólica hepática e cerebral de ratos	30
4.6.4 Efeito dos extratos de pitanga e açaí sobre as atividades enzimáticas	31
4.7 GRÁFICOS E ANÁLISES ESTATÍSTICAS	31
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
5.1 COMPARAÇÃO ENTRE MÉTODOS DE EXTRAÇÃO (PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA)	32
5.1.1 Extrato aquoso de primeira extração (Aquoso de QuEChERS de pitanga)	33
5.1.2 Prospecção fitoquímica dos extratos etéreos	35
5.2 PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA DOS EXTRATOS AQUOSO E ALCOÓLICO DE PITANGA E AÇAÍ	36
5.3 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FENÓIS TOTAIS	39
5.3.1 Avaliação comparativa dos métodos de extração quanto a quantidade de fenóis totais	39
5.3.2 Determinação de fenóis totais dos extratos de açaí e pitanga.....	40
5.4 EFEITO DOS EXTRATOS DE AÇAÍ E PITANGA SOBRE A ATIVIDADE DE GST GERAL.....	41
5.5 COMPARAÇÃO DA ATIVIDADE DE GST GERAL CEREBRAL DE RATOS COM ADIÇÃO DOS EXTRATOS ETÉREOS DE AÇAÍ OBTIDOS PELOS DOIS DIFERENTES MÉTODOS	45
5.6 DETERMINAÇÃO DAS CONSTANTES DE MICHAELIS-MENTEN E VELOCIDADE MÁXIMA DA GST GERAL – INFLUENCIADA DOS EXTRATOS.....	46
5.6.1 GST geral cerebral.....	46
5.6.2 GST geral hepática	60
5.6.3 GST geral – Extrato aquoso de QuEChERS de pitanga.....	72
5.6.4 GST <i>mu</i>	73
5.7 EFEITOS DOS EXTRATOS DE AÇAÍ E PITANGA SOBRE ATIVIDADE DE CATALASE.	82
6. CONCLUSÕES	89
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91

1 INTRODUÇÃO

Tecidos vivos estão constantemente em contato com substâncias potencialmente prejudiciais à sua manutenção e desenvolvimento. Estas substâncias, quando consideradas estranhas ao organismo, são chamadas de compostos xenobióticos. Estes compostos podem prejudicar diretamente as células por sua toxicidade ou ainda promover aumento da formação de espécies reativas de oxigênio por diversos caminhos de reação e ciclos redox, alterando o equilíbrio celular de utilização e remoção dessas espécies e levando a ocorrência de estresse oxidativo.

Esses processos tornam ainda mais necessário o mecanismo de defesa celular para impedir que ocorram situações de toxicidade e/ou estresse oxidativo que ameacem a integridade celular por meio da oxidação de biomoléculas. Isso se deve, principalmente, à capacidade dos compostos xenobióticos de comprometer processos biológicos importantes levando a ocorrência de doenças neurodegenerativas, câncer, entre outras já relatadas na literatura.

Para manutenção da homeostase, as células necessitam de aparato protetor, os quais incluem enzimas de biotransformação, antioxidantes e substâncias com atividade antioxidante capazes de tornar compostos potencialmente tóxicos menos reativos e mais fáceis de serem eliminados. O processo de eliminação de compostos xenobióticos e prejudiciais ao organismo ocorre, principalmente, com a participação de enzimas de biotransformação, como as pertencentes da família glutathione S-transferase (GST). A ação de enzimas de biotransformação pode levar à perda do potencial tóxico ou farmacológico de compostos xenobióticos e, principalmente, converter substâncias originalmente lipofílicas em metabólitos mais hidrofílicos, facilitando sua excreção e impedindo que as lesões celulares aconteçam. Na tentativa de proteção contra possíveis lesões, a célula ainda possui outros mecanismos enzimáticos de ação, nos quais participam enzimas antioxidantes que catalisam a oxidação de espécies reativas de oxigênio, eliminando-as e impedindo seu acúmulo.

Tendo em vista o crescente número de compostos xenobióticos e o conseqüentemente aumento de situações que potencializam a formação de espécies reativas de oxigênio, torna-se importante conhecer o mecanismo de ação tanto da biotransformação quanto das enzimas antioxidantes, buscando formas de promover aumento da desintoxicação celular e reduzir a formação de espécies reativas de oxigênio.

Compostos bioativos presentes em vegetais diversos, principalmente frutas, já foram relatados na literatura por sua capacidade antioxidante, eliminando diretamente espécies reativas ou até mesmo impedindo sua formação. Esses compostos também são estudados pela possibilidade de alterarem a atividade de enzimas antioxidantes, como a catalase. Eles também são capazes de alterar a atividade de enzimas responsáveis por diminuir a concentração de compostos xenobióticos na célula, como as enzimas de biotransformação da família GST.

A literatura contém diversos estudos que mostram a relação entre os compostos bioativos presentes em frutas e outros vegetais, com capacidade de influenciar positiva ou negativamente a atividade enzimática. Frutas e outros vegetais contêm substâncias antioxidantes distintas e diversos outros compostos, cujas atividades têm sido bem comprovadas nos últimos anos. A presença de compostos fenólicos, tais como flavonoides, ácidos fenólicos, antocianinas, além das já conhecidas vitaminas C, E e carotenoides, contribuem para os efeitos benéficos destes alimentos. Somando-se a isto, estudos têm demonstrado que compostos polifenólicos naturais possuem efeitos significativos na redução do câncer e evidências epidemiológicas demonstram correlação inversa entre doenças cardiovasculares e consumo de alimentos fonte de substâncias fenólicas, possivelmente por suas propriedades antioxidantes.

Tendo em vista a potencial toxicidade de compostos xenobioticos e sua capacidade de promover a formação de espécies altamente reativas e prejudiciais, neste estudo buscou-se avaliar a interação entre os compostos bioativos presentes em frutas de grande consumo humano, açaí e pitanga, e a possível modulação enzimática produzida por esses compostos. Foram avaliadas, ainda, de que forma esses compostos poderiam modular a redução da concentração de espécies reativas de oxigênio através da ativação da enzima catalase e possibilitar o aumento da eliminação de compostos xenobióticos através da ativação da enzima GST, melhorando a capacidade celular de proteção contra agentes citotóxicos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 BIOTRANSFORMAÇÃO DE XENOBIÓTICOS

Nossos tecidos são constantemente expostos a diversas substâncias químicas, naturais ou sintéticas, exógenas ao metabolismo normal do organismo, chamadas de xenobióticos. Dentre esses compostos estão fármacos, aditivos alimentares, pesticidas, toxinas, substâncias químicas de uso industrial e poluentes ambientais de diversos tipos.

Com o funcionamento normal do organismo, os xenobióticos são absorvidos por difusão passiva através das membranas celulares, metabolizados e excretados pela urina, bile, fezes, ar expirado e transpiração. No caso de compostos não voláteis, a excreção depende em grande parte da hidrossolubilidade da molécula, o que pode torná-la inadequada para a excreção direta. Substâncias muito lipofílicas podem, pela dificuldade de excreção, permanecer no corpo dos mamíferos, por exemplo, por muitos anos (Timbrell et al., 2011).

Após absorvido, a maioria dos compostos xenobióticos lipofílicos pode ser metabolizado nas células e formar produtos que serão excretados de forma mais fácil e rápida, em um processo de metabolização chamado de biotransformação (Huber e Almeida, 2008). O metabolismo de biotransformação envolve ação enzimática e é dividido em duas fases (fase I e fase II). Em geral, as reações de fase I introduzem ou expõem um grupo funcional no xenobiótico e as reações de fase II envolvem a conjugação dos produtos da primeira fase com moléculas endógenas. A conjugação é uma ligação covalente entre um grupo funcional do xenobiótico e, por exemplo, um ácido glicurônico, um sulfato ou uma glutatona reduzida (Hodgson, 2004). Nessa fase geralmente se observa a transformação do xenobiótico em uma espécie que apresenta maior hidrossolubilidade, além de uma menor toxicidade, e que, por fim, é transportada para o exterior da célula e então excretada (Delapedra, 2015). A figura 1 ilustra um esquema resumido da biotransformação enzimática de compostos lipofílicos.

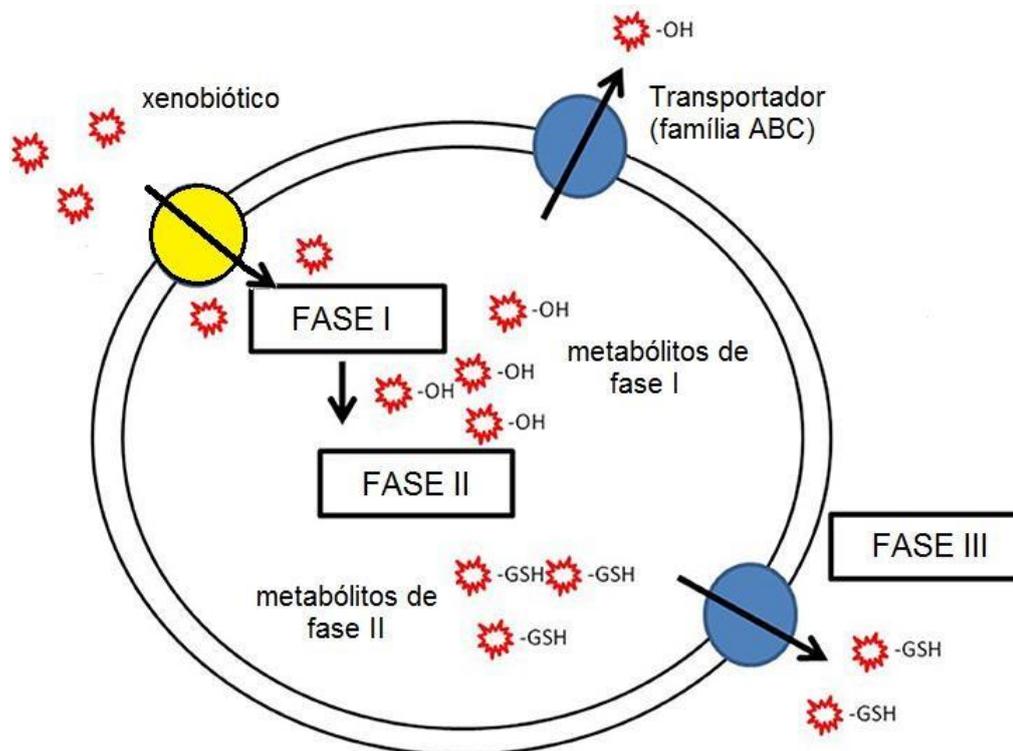


Figura 1. Esquema resumido da biotransformação enzimática de compostos lipofílicos, contendo fases I (ativação), II (inativação) e III (eliminação) (adaptado de Bard, 2000).

Na primeira fase da biotransformação ocorrem reações, como oxidação, redução e hidrólise, que expõem ou introduzem grupos funcionais do composto lipofílico ($-OH$, $-NH_2$, $-SH$ ou $-COOH$) e geralmente resultam em um pequeno aumento da hidrofiliicidade da molécula. Os grupos funcionais expostos ou introduzidos na fase I são, muitas vezes, sítios das reações de fase II. Na maioria das vezes, o produto gerado a partir das reações primárias do xenobiótico decompõe-se em um agente eletrofílico altamente reativo. Entre as enzimas de fase I, o sistema citocromo P450 é a principal família, tanto em versatilidade catalítica quanto em número de xenobióticos que são metabolizados (Guengerich, 1987; Waterman e Johnson, 1991).

As reações de fase II do metabolismo de xenobióticos incluem glicuronidação, sulfatação, acetilação, metilação, conjugação com compostos como glutathiona (GSH) e aminoácidos (glicina, taurina e ácido glutâmico) (Paulson et al., 1986). Com exceção da metilação e da acetilação, as reações de fase II resultam em um grande aumento da hidrofiliicidade dos xenobióticos, possibilitando rapidamente sua excreção.

A biotransformação dá origem a metabólitos com características físico-químicas que favorecem a eliminação (menor coeficiente de partição lipídio: água) pela urina e fezes. Embora

a sequência típica seja a fase II sucedendo a fase I, caso o xenobiótico possua grupos funcionais adequados, a conjugação pode ocorrer sem ser precedida pela fase I. E, em alguns casos excepcionais, produtos conjugados de fase II podem ser substratos para reações catalisadas pelas enzimas de fase I (Trush, 2008).

A maior parte dos compostos xenobióticos é metabolizada no fígado, sendo este o órgão em que há a maior concentração e diversidade de enzimas relacionadas ao processo de desintoxicação. Apesar disso, as enzimas de biotransformação são encontradas em quase todos os órgãos do corpo, principalmente trato gastrointestinal, rins, pele, pulmão e mucosa nasal; locais em que há maior contato do organismo com o meio externo (Rocha, 2004).

2.1.1. Glutathione S-transferases (GST)

A superfamília das glutathione-S-transferases (EC 2.5.1.18, GSTs) representam cerca de 1% do total de proteínas celulares e são encontradas em praticamente todos os eucariotos aeróbicos e alguns procariotos. Estas enzimas pertencem ao grupo de enzimas metabolizadoras de xenobióticos ou de biotransformação, junto com as glicuronosiltransferases, NADPH-quinona redutase e as enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase e a glutathione redutase. As GSTs protegem as células contra a toxicidade induzida por compostos citotóxicos e genotóxicos, que são geralmente de natureza hidrofóbica, catalisando uma reação S-conjugação com uma molécula hidrofílica, a glutathione reduzida, GSH (figura 2). GSTs estão envolvidas tanto em processos fisiológicos quanto patológicos, como: remoção de compostos endógenos, como espécies reativas de oxigênio, regeneração de proteínas com grupo sulfidrilado reduzido, transporte intracelular, processos digestivos, síntese de prostaglandinas e biotransformação de xenobióticos (Helvecio, 2014; Torres et al., 2004).

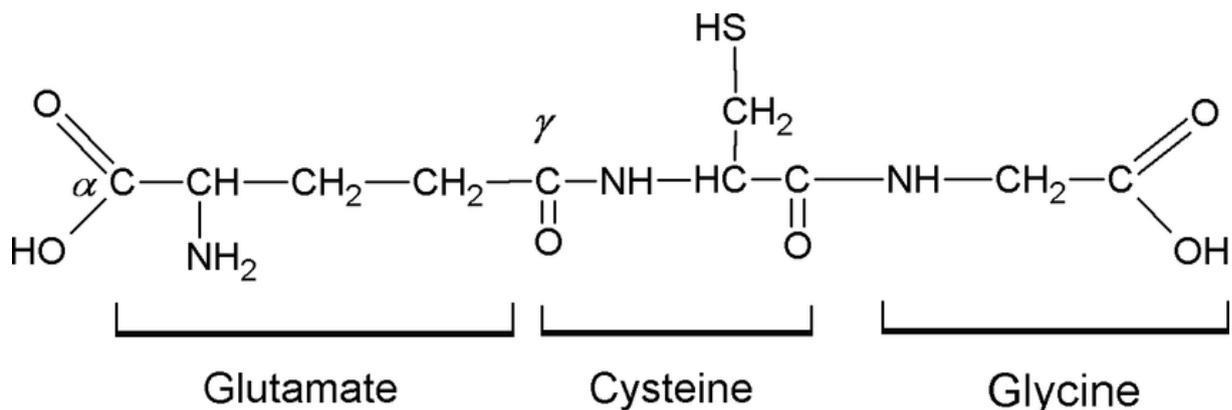


Figura 2: Estrutura da Molécula de GSH (adaptado de Villa et al., 2019).

Todas as GSTs solúveis têm uma massa molecular em torno dos 26 KDa e são encontradas no meio biológico geralmente como homo ou heterodímeros, apresentando dois sítios ativos por dímero. Os sítios ativos possuem atividades independentes um do outro, e são chamados sítio G e sítio H. O sítio G, no qual ocorre ligação ao tripeptídeo glutathiona (figura 3), é composto em grande parte por resíduos de aminoácidos encontrados na porção amino-terminal. O sítio H possui menor especificidade e é o local onde ocorre a ligação do substrato exógeno, podendo ser mais variável em termos estruturais, sendo formado em grande parte pelos resíduos da porção carboxi-terminal. A alta diversidade do sítio H contribui para que as GSTs possam se ligar a diferentes substratos (Ding et al., 2003; Huber e Almeida, 2008; Mannervik e Danielson, 1988).

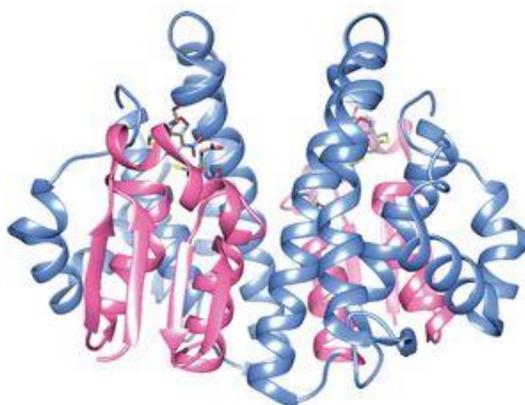


Figura 3: Estrutura da GSTP humana em complexo com GSH (Allocati et al., 2018).

GSTs são classificadas em duas categorias distintas, uma grande superfamília que incluem as isoformas citosólicas, solúveis e diméricas, envolvidas na biotransformação de

xenobióticos e endobióticos e uma segunda superfamília que compreendem GSTs microsossomais, provavelmente triméricas, envolvidas no metabolismo do ácido araquidônico (eicosanóides) e da glutationa (GSH). A superfamília das GSTs citosólicas (solúveis), com base nas suas sequências primárias, contém pelo menos 16 genes subdivididos em oito classes separadas denominadas α (GSTA), μ (GSTM), π (GSTP), θ (GSTT), ζ (GSTZ), σ (GSTS), ω (GSTO) e κ (GSTK), cada classe contendo uma ou mais isoformas homo ou heterodiméricas (Parkinson, 2001).

Os substratos (eletrófilos) mais comuns das GSTs incluem: haletos de alquila, epóxidos, compostos α , β insaturados (como quinonas, iminoquinonas, aldeídos, cetonas, lactonas e ésteres), haletos de arila e nitro aromáticos (Huber & Almeida, 2008). A figura 4 ilustra dois exemplos de reações de conjugação com a glutationa, catalisados por GSTs.

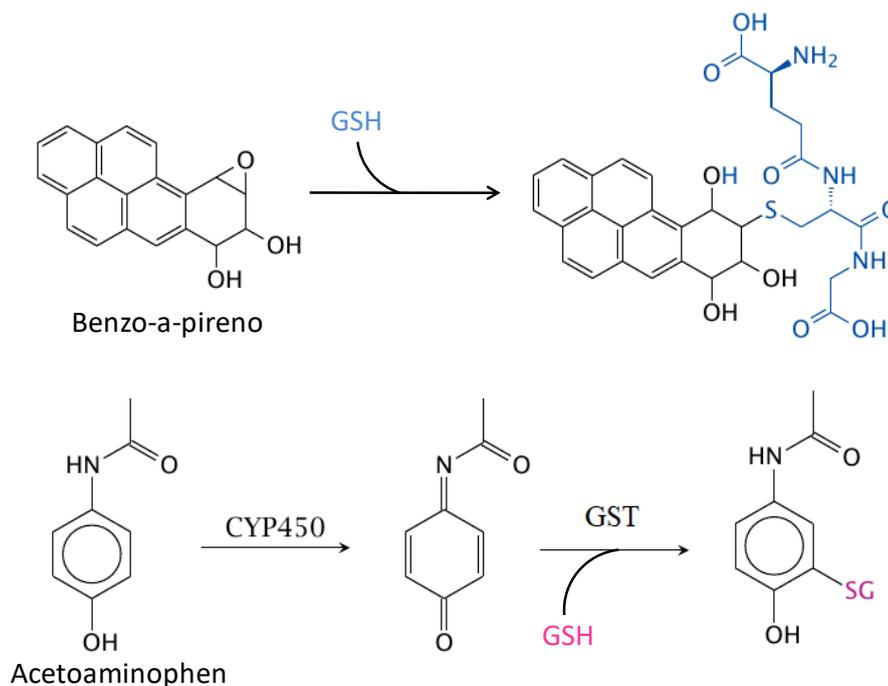


Figura 4: Representação esquemática da conjugação do benzo-a-pireno e do acetoaminofeno com GSH, catalisada pela enzima GST (Parkinson, 2001).

Além da proteção contra compostos exógenos, as GSTs conferem proteção contra compostos tóxicos de origem endógena, sobretudo aqueles resultantes da ocorrência de estresse oxidativo, a exemplo dos hidroperóxidos gerados a partir da peroxidação de lipídeos. As GSTs catalisam a remoção de peróxidos lipídicos através de reações de conjugação com GSH para uma vasta gama de metabólitos de xenobióticos (inseticidas, hormônios, ácido graxos, entre

outros), onde os conjugados são depois transportados para os vacúolos de sequestro e/ou posterior metabolização (Anjum et al., 2012; Helvecio, 2014; Lunjuam et al., 2007). O grupo eletrófilo para reações de conjugação pode ser fornecido por um átomo de carbono, um átomo de nitrogênio, ou um átomo de enxofre (Hayes e Pulford, 1995). Além da sua capacidade para catalisar a formação de conjugados, as GSTs podem também atuar como peroxidases e isomerases.

2.2 PROBLEMAS DA BIOTRANSFORMAÇÃO

Sob determinadas condições, processos protetores, vistos como desintoxicadores, podem fazer com que a alteração na atividade biológica do composto o torne ainda mais reativo e tóxico que o composto original, sendo este um fato importante e relevante, principalmente quando o composto xenobiótico é um fármaco (Timbrell et al., 2011).

Devido às várias patologias associadas às enzimas de biotransformação, muitos estudos têm sido realizados com o objetivo de avaliar os efeitos da ação de enzimas de biotransformação, bem como descobrir compostos naturais com possíveis influências e efeitos sobre essas enzimas, a fim de controlar sua ação e a formação de produtos tóxicos durante o processo de desintoxicação (Edenharder et al., 2002).

Relacionados a segunda fase do processo de biotransformação, estudos mostram que extratos brutos e extratos secos produzidos a partir de determinados vegetais, têm sido relacionados como ativadores da GST. Em ensaios *in vitro* em células de mamíferos, pesquisadores mostraram que os extratos de alguns vegetais testados foram eficazes na ativação enzimática (Torres et al., 2004). Em experimentos com animais de laboratório, especialmente ratos ou camundongos, alimentados com dietas adicionadas do extrato ou do vegetal desidratado em pó, foi constatado que a atividade da GST aumentou em diferentes tecidos como fígado, intestino, pulmão, entre outros. Há ainda relatos de que a ativação da GST em tecidos animais tem sido associada como fator de prevenção de câncer (Torres et al., 2004).

O entendimento do mecanismo de ação desses compostos bioativos, pode ser útil na elucidação dos mecanismos associados ao surgimento de várias patologias, relacionadas a citotoxicidade causada por compostos xenobióticos direta ou indiretamente (Edenharder et al., 2002).

2.3 ESTRESSE OXIDATIVO

As moléculas orgânicas e inorgânicas com átomos que contêm um ou mais elétrons não pareados com existência independente podem ser classificados como radicais livres. Essa configuração faz dos radicais livres moléculas altamente instáveis, com meia-vida curtíssima e quimicamente muito reativas (Halliwell, 1994; Avilez, 2008). A presença dessas moléculas no organismo é crítica para a manutenção de muitas funções fisiológicas normais (Bianchi e Antunes, 1999). A produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e de nitrogênio (ERN) é parte integrante do metabolismo humano, sendo normalmente encontradas em baixa concentração dentro das células. ERO e ERN têm importante função biológica, atuando como mediadoras da transferência de elétrons e em vários processos bioquímicos como a fagocitose, sendo produzidas para eliminar o agente agressor por reações de oxidação (Vasconcelos et al., 2007; Avilez, 2008; Oliveira et al., 2009).

Em condições normais, a maior parte do oxigênio (O_2) obtido pela respiração aeróbia é convertida em água (H_2O) em etapas sucessivas de redução. Entretanto, em certas situações fisiológicas e patológicas este processo é incompleto, o que dá origem a um conjunto de moléculas oxidantes conhecidas como espécies reativas de oxigênio (ERO). Em concentrações fisiológicas, as ERO atuam como moléculas de sinalização, participando de diversas respostas adaptativas. Entretanto, em altas concentrações, tais moléculas podem ocasionar o estresse oxidante. Esta condição é caracterizada pelo desequilíbrio entre a concentração de moléculas oxidantes e antioxidantes em favor da primeira e está associada a várias doenças e morte (Bianchi e Antunes, 1999).

A formação de ERO *in vivo* ocorre via ação catalítica de enzimas, durante os processos de transferência de elétrons que ocorrem no metabolismo celular ou pela exposição a fatores exógenos e agentes tóxicos como drogas, inseticidas, radiação ionizante, entre outros. O ânion radicalar superóxido (O_2^{\bullet}) pode ser gerado continuamente por diversos processos ou pela redução monoelétrica de oxigênio molecular (O_2). A reação de dismutação do O_2^{\bullet} catalisada pela superóxido dismutase (SOD) ou pela ação de diversas oxidases *in vivo*, localizadas nos peroxissomos, resulta na formação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) – figura 5 (Barbosa, 2006; Vasconcelos et al., 2007).

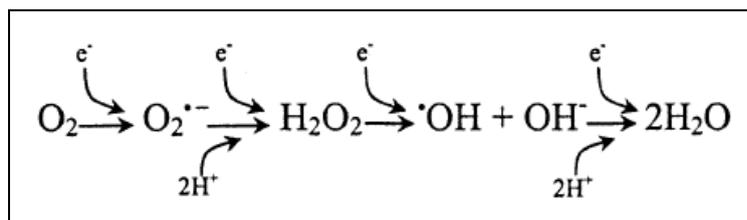


Figura 5: Etapas de redução univalente do O₂ (adaptado de Lee et al., 2004).

Quando reduzido por íons metálicos (Fe²⁺ e Cu⁺), na reação de Fenton (figura 6), o H₂O₂ gera o radical •OH, que apresenta uma meia-vida extremamente curta, pois reage muito rapidamente com moléculas biológicas sequestrando aleatoriamente um átomo de hidrogênio.

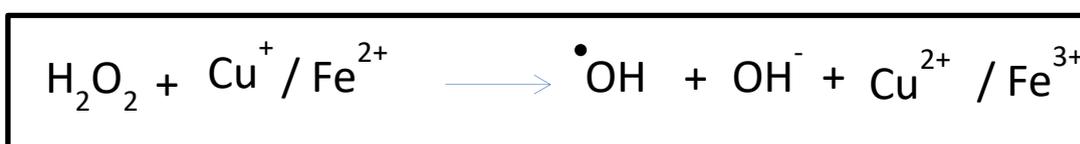


Figura 6: Reação de Fenton (adaptado de Marques, 2015).

A mitocôndria é o principal local de produção de EROs. Um dos processos naturais de formação de espécies reativas de oxigênio é a cadeia transportadora de elétrons, que acoplada à transferência de elétrons, leva a formação de ATP (Barja, 2007). Durante o processo de fosforilação oxidativa cerca de 3 a 5 % dos elétrons escapam da cadeia respiratória e reduzem parcialmente o O₂ formando O₂^{•-}. Esse processo fisiológico de “vazamento” de elétrons leva, a longo prazo, ao envelhecimento celular (Benzi et al., 1992).

Compreendem a produção do íon O₂^{•-} três sítios componentes da cadeia transportadora de elétrons: a NADH-ubiquinona oxidoredutase, a succinato-ubiquinona oxidoredutase e a ubiquinona-citocromo c redutase (complexo, I, II e III, respectivamente) (figura 7). Quando no complexo I, a formação dos íons O₂^{•-} parece ocorrer na região da proteína que adentra a matriz mitocondrial, localizada, possivelmente, próximos aos centros de Ferro-Enxofre. No complexo II, chegam os elétrons carregados pela Flavina Adenina Dinucleotídeo (FAD), formados durante o Ciclo de Krebs. O elétron carregado por este composto, pode ser cedido à molécula de O₂, formando O₂^{•-}. Tal reação parece estar limitada a ocorrência *in vivo* quando a célula está submetida a estresse oxidante ou em processo de envelhecimento. Já no complexo III, o íon O₂^{•-} é formado a partir da doação do elétron carregado pela Coenzima Q (ubiquinona), molécula não proteica que carrega para o complexo III os elétrons obtidos nos complexos I e II. Dependendo do grau de redução da ubiquinona, os elétrons podem chegar ao complexo III por sítio voltado

para a matriz mitocondrial ou para o espaço intermembrana, fazendo com que, na formação do íon O_2^- , haja a liberação deste nos dois espaços (Murphy, 2009).

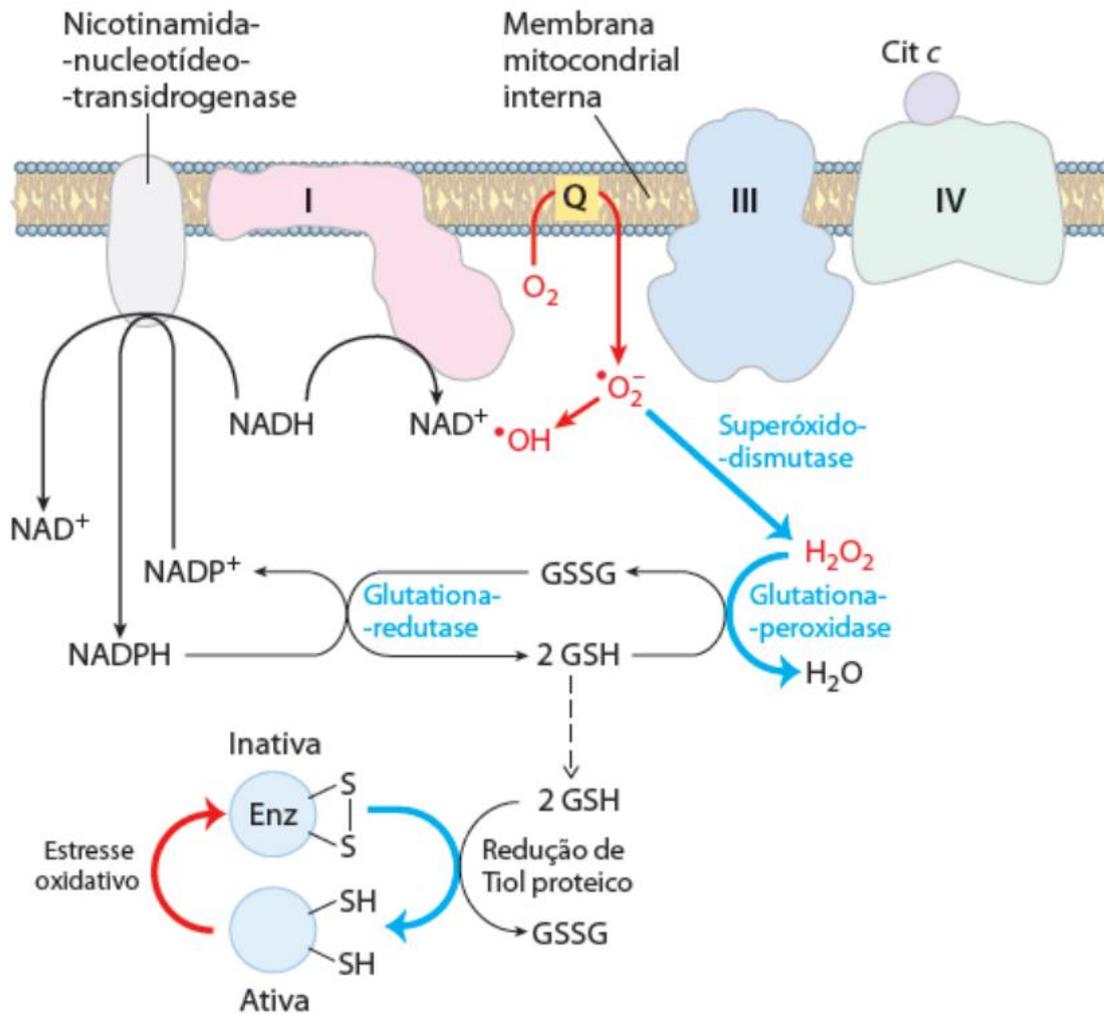


Figura 7: Cadeia transportadora de elétrons. “Vazamento” de elétrons da cadeia transportadora de elétrons para a formação de EROs (Lehninger et al., 2011).

Sob catálise enzimática, o oxigênio molecular pode também reagir com óxido nítrico ($NO\bullet$), formando $NO_2\bullet$. Este produto reage rapidamente com $O_2\bullet^-$ e produz o intermediário peroxinitrito ($ONOO^-$) (Barreiros e David, 2005). As reações de formação desses compostos estão representadas a seguir (1, 2).



A figura 8 mostra um esquema resumido da formação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio a partir de catalise realizada por diversas enzimas (Vasconcelos et al., 2007).

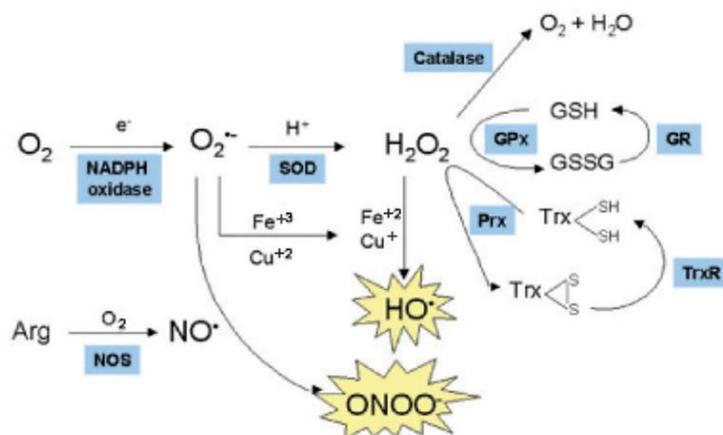


Figura 8: Reações esquematizadas e enzimas participantes (grifadas em azul) da formação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. SOD: enzima superóxido dismutase. GPx: enzima glutaciona peroxidase; Prx: peroxirredoxinas; GR: enzima glutaciona redutase; TrxR: enzima tiorredoxina redutase; Trx: tiorredoxina; GSH: glutaciona reduzida; GSSG: glutaciona oxidada; NOS: enzima óxido nítrico sintase (adaptado de Barbosa et al., 2006).

Contudo, na condição de pró-oxidante a concentração desses radicais pode aumentar devido à maior geração intracelular, acarretando um desequilíbrio entre a formação de compostos oxidantes e antioxidantes, levando a excesso do primeiro e consequentes danos nos ácidos nucleicos, proteínas e lipídeos. Esse fenômeno é denominado estresse oxidativo (Bianchi e Antunes, 1999; Yang et al., 2003). Os radicais livres podem se espalhar pelo citoplasma, pelas mitocôndrias ou pela membrana e o seu alvo celular (proteínas, lipídeos e DNA) está relacionado com o seu sítio de formação (Bianchi e Antunes, 1999). As espécies reativas formadas nos processos fisiológicos estão envolvidas com diferentes alterações metabólicas, como: peroxidação lipídica, glicação de proteínas, inativação de enzimas e alteração nas estruturas celulares e, consequentemente, com danos ao organismo (Silva et al., 2011).

Entre as espécies reativas de oxigênio, o radical hidroxila ($\bullet\text{OH}$) exibe a maior atividade oxidativa. É o radical mais tóxico conhecido, já que pode oxidar qualquer classe de macromoléculas biológicas, incluindo lipídios, proteínas e ácidos nucleicos. Portanto, a ação do radical $\bullet\text{OH}$ pode resultar em danos oxidativos dando origem a muitas doenças, incluindo a artrite, aterosclerose, cirrose, diabetes, câncer, doença de Alzheimer, enfisema e ao envelhecimento (Ozyürek et al., 2008).

Todos os componentes celulares são suscetíveis à ação das EROs, porém, a membrana celular é um dos mais atingidos em decorrência da peroxidação lipídica, que acarreta alterações em sua estrutura e permeabilidade (Mello Filho et al., 1983). Conseqüentemente há perda da seletividade na troca iônica e liberação do conteúdo de organelas, como as enzimas hidrolíticas dos lisossomos e formação de produtos citotóxicos (como o malonaldeído), culminando com a morte da célula. A peroxidação de ácidos graxos poliinsaturados presentes nas membranas celulares resulta na formação de eletrófilos, como aldeídos e, hidroxialdeídos, cetoaldeídos α , β -insaturados e/ou seus respectivos epóxidos. Alguns destes são altamente genotóxicos, e sua formação excessiva pode ser controlada pela ação de GSTs (Huber e Almeida, 2008).

Em sistemas aeróbicos, o equilíbrio entre a quantidade de agentes óxido-redutores presentes, como as EROs, e o sistema de defesa antioxidante é imprescindível. Desta forma, o equilíbrio entre a formação e a remoção de espécies radiculares no organismo deve ser regulado de forma que as reações e processos metabólicos ocorram em um nível adequado para a manutenção da fisiologia das células (Cerqueira et al, 2007).

Para proteger-se, a célula possui um sistema de defesa que pode atuar de duas formas, sendo uma delas a eliminação do agente antes que ele cause lesão. Este caminho inclui mecanismos enzimáticos e não enzimáticos dos quais participam moléculas como a glutathiona reduzida (GSH) e enzimas como superóxido-dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathiona-peroxidase (GPx) e glutathiona S-transferase (GST). Em algumas situações pode ocorrer uma adaptação do organismo em resposta a geração desses radicais com o aumento da síntese de enzimas antioxidantes. O controle do nível das enzimas antioxidantes nas células é extremamente importante para a sobrevivência em ambiente aeróbico (Bianchi e Antunes, 1999). Outra linha de defesa celular funciona reparando a lesão ocorrida, sendo constituída por compostos como o ácido ascórbico e enzimas como a glutathiona-redutase (GSH-Rd) e GPx, entre outros (Ferreira e Matsubara, 1997).

Neste contexto, os dois principais meios de defesa antioxidantes no organismo podem ser divididos em dois grupos, enzimáticos e não enzimáticos. Os sistemas enzimáticos envolvem as enzimas do ciclo redox da glutathiona, particularmente a glutathiona peroxidase. A figura 9 mostra, esquematicamente, a participação enzimática nos processos antioxidantes.

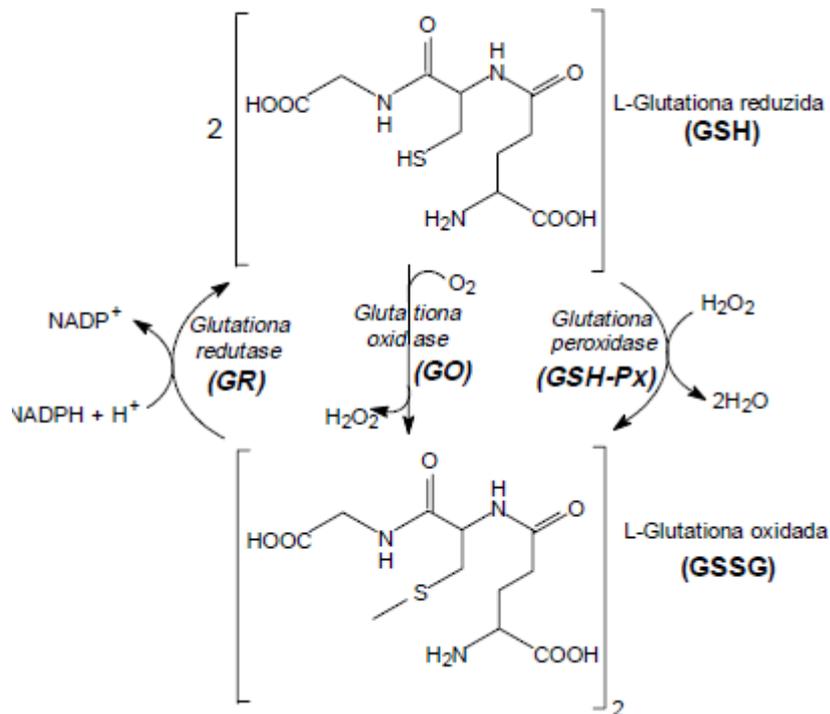


Figura 9: Esquema resumido de reações que compõem o mecanismo de defesa antioxidante celular através da interconversão enzimática da glutatona (GSH), nas suas formas reduzida e oxidada. GR: glutatona redutase; GO: glutatona oxidase; GSH-Px: glutatona peroxidase (Rover Junior et al., 2001).

A glutatona peroxidase (GSH-Px) tem sua principal atuação na remoção do peróxido de hidrogênio existente na membrana celular. A glutatona redutase (GR) catalisa a conversão de glutatona oxidada (GSSG) para a forma reduzida (GSH) em uma reação NADPH-dependente (Anjum et al., 2012). Outros sistemas enzimáticos de defesa antioxidantes operando em conjunto com as enzimas citadas anteriormente incluem a superóxido dismutase (SOD), dependente de Cu^{2+} e Zn^{2+} como cofatores, promovendo a dismutação do radical superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio, bem como a catalase, que converte peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular (figura. 10).

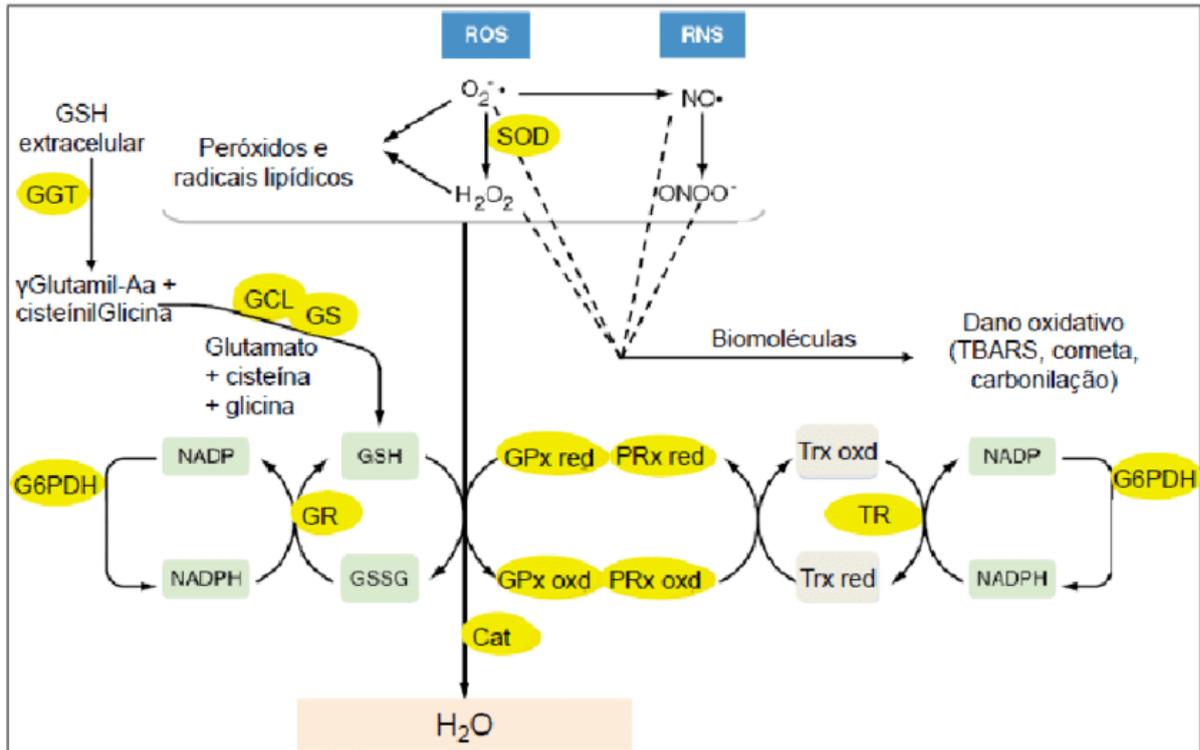


Figura 10: Sistema de defesas antioxidantes celulares e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. O₂·⁻-Nion superóxido; NO·-Óxido nítrico; ONOO·-Peróxido nitrito; H₂O₂-Peróxido de Hidrogênio; SOD-Superóxido Dismutase; GGT-gama-glutamil transpeptidase; GCL-gama-glutamilcisteinil ligase; GS-glutationa sintetase; G6PDH-glicose-6 fosfato desidrogenase; GR-glutationa redutase; GPx red-Glutationa Peroxidase reduzida; GPx oxd-glutationa peroxidase oxidada; Prx red-peroxiredoxina reduzida; Prx oxd-peroxiredoxina oxidada; CAT-Catalase; GSHglutationa reduzida; GSSG-dissulfeto de glutationa; NADP-nicodinamina adenina dinucleotídeo fosfato oxidado; NADP-nicodinamina adenina dinucleótido fosfato oxidado; NADP-nicodinamina adenina dinucleótido fosfato reduzido; Trx oxd-tioredoxina oxidada; Trx red-tioredoxina reduzida; TR-tioredoxina redutase. (Kensler et al., 2007 apud Trevisan, 2010).

Diversas doenças estão associadas a um desequilíbrio entre moléculas oxidantes e antioxidantes no organismo. Um aumento da produção de ERO ou uma baixa eficiência do sistema antioxidante pode deflagrar ou intensificar uma doença. Grandes concentrações de EROs podem ser geradas na inflamação em resposta a uma infecção ou doença autoimune. Isto faz com que os indivíduos que apresentam doenças de natureza inflamatória, como a artrite reumatóide e AIDS, experimentem condições de estresse oxidante (Peters et al., 2009).

Em virtude da natureza oxidante de algumas doenças, diversas terapias antioxidantes têm sido estudadas, inclusive aquelas baseadas em moléculas endógenas. Isto envolve o desenvolvimento de análogos funcionais sintéticos ou de origem natural. Tais moléculas podem

ser estruturalmente relacionadas aos grupamentos funcionais da enzima ou apenas apresentam o metal que as compõe, como por exemplo, o selênio (Gerra, 2001; Sánchez-Valle e Méndez-Sánchez, 2018).

2.3.1 Catalase

Catalase (EC 1.11.1.6, CAT) é uma oxidoreductase que possui um papel crucial na eliminação de peróxido de hidrogênio, uma ERO versátil que pode ser convertida, sob catálise enzimática, em radical hidroxila (Beers e Sizer, 1952; Mattos et al., 2003). É encontrada em uma grande variedade de organismos aeróbicos e anaeróbicos sendo uma das enzimas celulares mais rápidas, hidrolisando mais de um milhão de moléculas de substrato por segundo (Lončar and Fraaije, 2015). O mecanismo básico da reação envolve a quebra do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em oxigênio e água, reduzindo o estresse oxidativo causado pelo substrato (Barynin et al., 2001).

CAT é um tetrâmero (figura 11) formado por quatro polipeptídeos, cada uma com mais de 500 resíduos de aminoácidos e uma massa molecular de aproximadamente 240 KDa (Goyal e Basak, 2010). Ela contém quatro grupos heme na sua estrutura que permite a enzima reagir com o peróxido de hidrogênio, mas pode utilizar tanto ferro como manganês como cofator da reação. Está presente em virtualmente todas as células que utilizam oxigênio, sendo encontrada principalmente nos peroxissomos, mas ausente nas mitocôndrias (Bai et al., 1999).

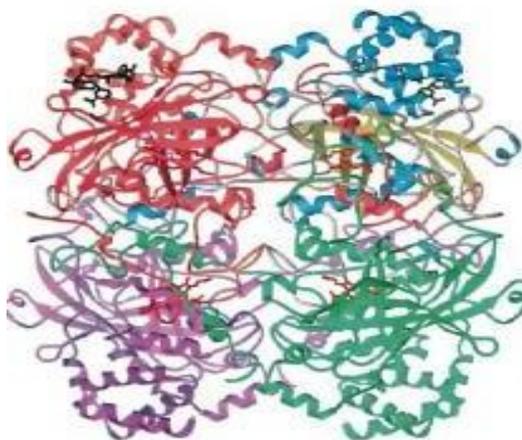


Figura 11: Vista do tetrâmero da catalase humana (adaptado de Putnam et al., 2000).

Há registros de três tipos de catalase: monofuncionais, bifuncionais (catalase-peroxidases) e pseudo-catalases. As catalases monofuncionais são normalmente isoladas de animais, plantas, fungos e bactérias, tendo características estruturais semelhantes, porém exibindo menor atividade de peroxidase e catalisam reações de um número limitado de substratos orgânicos. As catalase-peroxidases já foram isoladas de bactérias e fungos, possuem atividade dependente do pH do meio, são mais sensíveis ao calor, solventes orgânicos e H_2O_2 e, por atuarem como catalase e peroxidase, possuem um número maior de compostos como substrato. Já as pseudo-catalases são assim denominadas por não possuírem grupamento heme em sua estrutura, mas sim um sítio de reação contendo átomos de manganês (Goyal e Basak, 2010).

Estudos indicam que a suplementação de catalase exógena previne a oxidação da GSH mediada pelo H_2O_2 , em eritrócitos humanos normais (Ferreira e Matsubara, 1997). Além disso, por apresentar aumento de atividade em situações de estresse oxidativo, a catalase é utilizada como biomarcador em estudos que avaliam impactos ambientais (Cogo et al., 2009). A figura 12 mostra diversas outras aplicações atuais da enzima catalase.

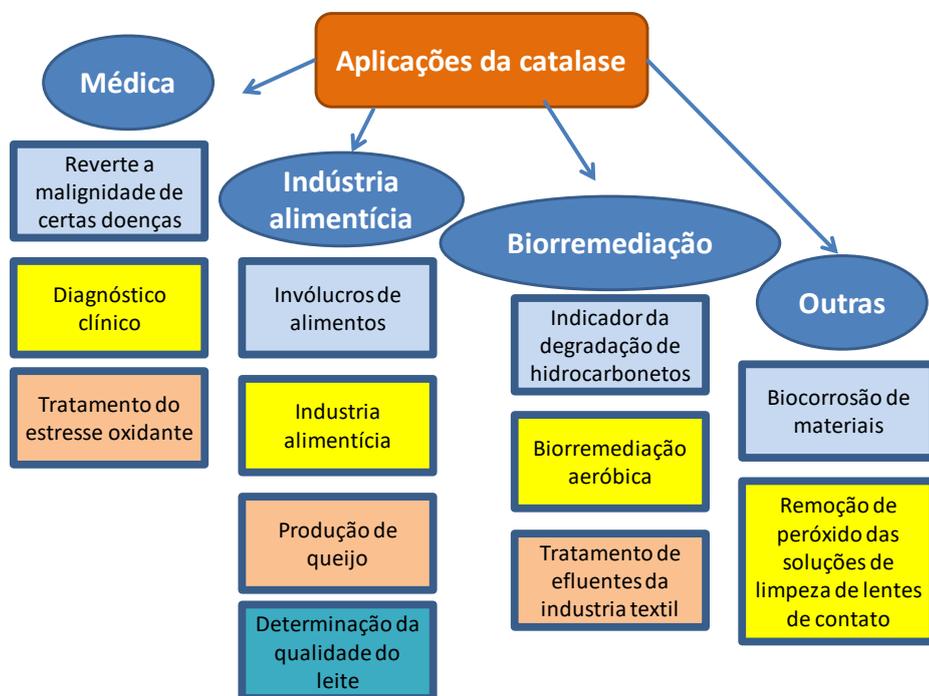


Figura 12. Aplicações da catalase (adaptado de Kaushal et al., 2018).

2.4. MODULAÇÃO ENZIMÁTICA POR COMPOSTOS BIOATIVOS

A capacidade de componentes de alimentos de regular ou alterar a expressão de enzimas biotransformadoras sugere que essas enzimas podem representar um elo essencial entre a alimentação e a prevenção de doenças. Essas características são ainda mais interessantes quando há a possibilidade de extração e purificação destes componentes para posterior utilização ou para um maior controle de seu consumo (Clapper et al., 1997).

Compostos bioativos como flavonoides são reportados na literatura, pois, além de sua ação antioxidante, interagem com enzimas antioxidantes e induzem a ação de enzimas da fase II do processo de biotransformação, como a GST (Procházková et al., 2011). Efeitos importantes também foram encontrados na interação de flavonoides com enzimas antioxidantes, como reportado por Martin et. al (2010) em estudo onde foi possível perceber a capacidade do extrato polifenólico de cacau de aumentar a atividade de enzimas antioxidantes (glutaciona peroxidase e glutaciona redutase), aumentando o efeito protetor do mecanismo celular hepático contra estresse oxidativo, via ativação de quissases extracelulares, além da redução da geração de espécies reativas de oxigênio.

As atividades das enzimas catalase e superóxido dismutase foram significativamente aumentadas em indivíduos colesterolêmicos, quando tratados em suplementação com naringenina, flavonoide encontrado em frutas. Isso indica que este composto bioativo pode exercer ação importante na regulação da capacidade antioxidante de indivíduos hipercolesterolêmicos (Jung et al., 2003).

Em estudos realizados em fêmeas de ratos, a administração de apigenina, ginisteína e tangeretina promoveu aumento da atividade de GST em células do coração e reduziu a atividade enzimática em células hepáticas. Já catalase e outras enzimas antioxidantes, tiveram suas atividades reduzidas, quando administradas com quercetina (Breinholt et al., 2000). A quercetina também foi reportada por sua ação protetora do estresse oxidativo do tecido renal de ratos submetidos a administração oral de cloreto de cádmio, sendo o cádmio indutor de estresse oxidativo, melhorando respostas bioquímicas enzimáticas (CAT, SOD, GST) antes reduzidas significativamente pela ação do cádmio (Renugadevi e Prabu, 2010).

Segundo Lee-Hilz et al. (2006), a atividade pró-oxidante de compostos bioativos pode contribuir para os benefícios à saúde pelos quais tais compostos são conhecidos, por indução de enzimas de desintoxicação e antioxidantes. Tendo como resultado o aumento ou diminuição da atividade de enzimas antioxidantes ou de biotransformação, os estudos mostram que os

diversos compostos bioativos testados possuem capacidade modulatória sobre a atividade de diversas enzimas e compõem um grupo importante de compostos a serem avaliados quanto a possibilidade de aumento da capacidade celular de defesa.

2.5 AÇAÍ

A palavra açaí é de origem tupi – yá-çai - e significa fruto que chora, ressuma ou deita água, provavelmente relacionado ao fato de que durante o processo de extração da polpa, esta flui lentamente, em forma de grandes gotas, tanto quando extraída manualmente como quando extraída em pequenas máquinas despulpadoras, de amplo uso na Amazônia (Oliveira et al., 2007).

Açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) é uma palmeira amplamente distribuída no norte da América do Sul com a sua maior ocorrência e importância econômica nas planícies de inundação do estado brasileiro amazônico do Pará (Schauss et al., 2006). O açaizeiro produz frutos pequenos, arredondados e de coloração roxo-escuro (Eto et al., 2010) e o Brasil se posiciona como o maior produtor, consumidor e exportador desse produto (Menezes et al., 2008). Esse fruto é comercializado e consumido pela população local nas regiões produtoras do Pará, Maranhão, Amapá, Acre e Rondônia e, com o crescimento do mercado, esse produto passou a ser consumido também nas grandes capitais brasileiras. Atualmente a exportação passou a ser feita para Estados Unidos, Japão, China e alguns países da Europa (Portinho et al., 2012).

Uma grande variedade de produtos comercializáveis é produzida a partir desta palma, mas seus frutos esféricos, que são colhidos principalmente de julho a dezembro, são o seu produto comestível mais importante. Cada palmeira produz de 3 a 4 cachos de frutos, cada cacho possuindo de 3 a 6 kg. Os frutos de forma redonda e que variam de 1 a 1,5 cm de diâmetro, aparecem com coloração verde quando imaturos e roxo escuro quando maduros (Pozo-Insfran et al., 2004).

A semente é responsável pela maior parte do tamanho do fruto e é coberta por fibras finas, sob a qual há uma pequena camada comestível. O açaí de diferentes ecossistemas amazônicos reúne características essenciais para a nutrição humana como fonte de energia, fibra alimentar, antocianinas, minerais, como o cálcio e o potássio (Yuyama et al., 2011). A figura 13 ilustra o fruto do açaizeiro e a palmeira de açaí com cacho de frutos maduros.



(A)



(B)

Figura 13: A) Frutos de açai. B) Cacho de açai. (Rocha, 2017).

A poupa comestível do fruto possui cerca de 2,4% de proteína e 5,9% de lipídios, de onde deriva seu alto valor calórico. Já os óleos contêm aproximadamente 60% de ácido oleico, 22% de ácido palmítico, 12% de ácido linoléico, 6% de ácidos palmitoléico e esteárico, juntamente com outros ácidos graxos em quantidades vestigiais. Também foram identificados pelo menos cinco esteróis incluindo β -sitosterol (78%), estigmasterol (6,5%), δ 5-avenasterol (6,5%) e campesterol (6,0%). Contém ainda ácidos fenólicos como o ácido vanílico, ácido siringico, ácido p-hidroxibezoico, ácido ferúlico catequinas e cianidinas (Hreinrich et al., 2011; Pacheco-Palencia et al, 2008).

Existe uma prevalência das cianidinas, entre elas as antocianinas, sendo que a mais frequente no açai é a cianidina-3-rutinosídeo, com 60 a 67%, e a cianidina-3- glucosídeo com 26 a 30% (Schauss et al., 2006), e flavonoides com destaque para a quercetina, a orientina e seus derivados e proantocianidinas (Hreinrich et al., 2011; Pacheco-Palencia et al, 2008). Sete flavonóides principais foram isolados de polpa de açai liofilizada por vários métodos cromatográficos. Suas estruturas foram elucidadas como orientina, homorientina, vitexina, luteolina, crossiol, quercetina e dihidrokaempferol (Kang et al., 2010). As antocianinas

tornaram-se conhecidas por suas diversas propriedades farmacológicas e propriedades medicinais, incluindo anticarcinogênica, anti-inflamatória e antimicrobiana, prevenindo a oxidação de proteínas de baixa densidade, enfermidades cardiovasculares e doenças neurológicas (Menezes et al., 2008). O grau de maturidade do açaí também é importante devido a atividade biológica dos seus pigmentos. A polpa verde ou de vez, apresenta menor número de pigmentos fenólicos, antocianinas e atividade antioxidante em relação à polpa madura que tem a quantidade máxima desses pigmentos (Portinho et al., 2012). A polpa do açaí possui vários antioxidantes, mas as antocianinas, proantocianidinas e outros flavonóides são os compostos reconhecidamente bioativos predominantes. A bebida produzida a partir da polpa de açaí contém teores de proteínas e glicídios assimiláveis (glicose, frutose e sacarose) relativamente baixos, 1,26 e 0,37 g/100 mL de açaí (Eto et al., 2010).

O açaí tem sido reportado como um promissor agente anti-inflamatório por induzir melhora do perfil imunológico por ação imunomodulatória e, por apresentar compostos antioxidantes, está associado a efeitos benéficos na diminuição dos riscos de obesidade associada a diabetes tipo 2 (Portinho et al., 2012). Diferentes partes dessa planta têm sido usadas como produto medicinal pelos povos nativos. Segundo a tradição, o óleo da fruta tem ação antidiarreica e a raiz combinada com *Carica papaya*, *Citrus sp* e *Quassia amara* tem ação antimalárica. Além disso, o caroço é aproveitado como adubo orgânico ou no artesanato, o caule para obtenção do palmito e as folhas para cobrir as casas dos habitantes do interior das regiões produtoras (Portinho et al., 2012).

O crescimento do comércio internacional do açaí tem sido atribuído à bebida e a indústria e produtos relacionados, em que muita atenção tem sido dada a sua capacidade antioxidante e associado ao potencial benefício a saúde (Pacheco-Palencia et al, 2008). A polpa desse fruto tem sido objeto de alguns estudos em decorrência do seu valor nutritivo, sendo inclusive considerada como um alimento funcional devido ao seu grande conteúdo de antocianinas, pigmentos responsáveis pela coloração característica do fruto (Eto et al, 2010).

2.6 PITANGA

A pitanga, fruto da pitangueira (*Eugenia uniflora* L.), pertence a família botânica das Myrtaceae e é uma planta frutífera nativa do Brasil até o Norte da Argentina e Uruguai. Uma planta de fácil produção, resistente as condições urbanas e ornamental, muitas vezes é cultivada em casa, jardins e parques. Pode ser encontrada em todo o Brasil, especialmente na região Nordeste. É largamente consumida como frutas frescas, suco de frutas, polpa congelada e geleia, bastante apreciada em decorrência de seu sabor agradável e refrescante (Porcu e Rodriguez-Amaya, 2008; Oliveira et al., 2006). A pitangueira frutifica de outubro a janeiro, sendo congelada a principal forma de comercialização da fruta (Vizzotto, 2006). A figura 14 ilustra a cor e formato do fruto e a pitangueira com frutos verdes e maduros.

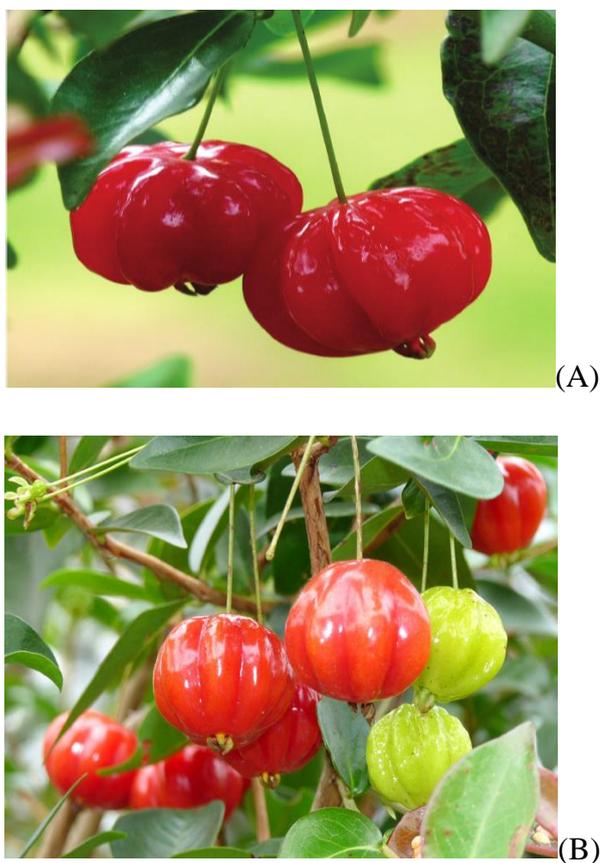


Figura 14: (A) Frutos de pitanga (Frazon et al., 2013); (B) Pitangueira (Frazon, 2015).

Em decorrência de uma ampla diversidade genética, a pitanga apresenta cor que varia do alaranjado até o vermelho escuro (Lima et al., 2002). Apresenta espécies com compostos

fenólicos com ação antioxidante e algumas com ação hipoglicemiante e antireumáticas, também utilizadas em distúrbios estomacais e como anti-hipertensiva (Auricchio e Bacchi, 2003).

Dentre os compostos com atividade biológica presentes na pitanga estão compostos fenólicos, quercetina, kaempferol e miricetina, leucoantocianidinas e esteroides e triterpenos. No óleo essencial obtido da fruta são encontrados ácidos fenólicos, β -pireno, limoneno e cineol (Consolini et al., 1999; Huber e Almeida, 2008). Em pitanga fresca foram identificados o licopeno (73,0 ng / g), γ -caroteno (52,7 ug / g), β -criptoxantina (47,0 ug / g), rubixantina (23,0 ug / g), fitoflueno (13,1 ug / g), β -caroteno (9,5 ug / g) e ζ -caroteno (4,7 ug / g) (Porcu e Rodriguez-Amaya, 2008). Os compostos fenólicos e os carotenóides totais na pitanga roxa madura encontram-se em maiores teores do que na pitanga vermelha no mesmo estágio de maturação. A seleção roxa exibiu quantidade significativa de antocianinas, cujo teor foi mais elevado no fruto maduro do que no semi-maduro. Os carotenóides, antocianinas e flavonóis encontram-se mais concentrados na película do que na polpa deste fruto maduro (Lima et al., 2002).

Há uma gama de compostos biologicamente ativos já identificados nas folhas da pitanga, dentre eles a miricitrina, quercetina e seus quercitrina 3-l-ramnosídeos, terpenóides como monoterpenos, triterpenos, sesquiterpenos e taninos hidrolisáveis (Alice et al., 1991; Vizzotto, 2006). Segundo Schapoval et al. (1994), o extrato de pitanga teve ação inibitória sobre a atividade da enzima xantina oxidase e aumentou o metabolismo de lipídios. Em outros testes, um dos resultados utilizando óleos essenciais de pitanga mostrou sua ação antioxidante ao diminuir a peroxidação lipídica em ratos (Victoria et al., 2012). A presença de antocianinas, flavonóis e carotenóides totais na pitanga roxa fazem deste fruto uma fonte promissora de compostos antioxidantes cujo cultivo deveria ser estimulado.

Antioxidantes naturais têm tido aplicação crescente em alimentos nutracêuticos, fitomedicamentos e aditivos alimentares. De fato, nos últimos anos, diversos estudos mostraram o alto teor de compostos antioxidantes e a capacidade de influenciar a atividade de enzimas de biotransformação e antioxidantes por compostos bioativos extraídos de frutas e outros vegetais, o que faz desses compostos alvos de estudos cada vez mais frequentes (Lima et al., 2002; Ozen et al., 2018).

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi determinar como compostos bioativos obtidos dos extratos das frutas de açaí e pitanga alteram a atividade das enzimas GST e catalase, aumentando ou diminuindo essa atividade, visando proteger as células contra danos causados por compostos xenobióticos e espécies reativas de oxigênio.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Obter extratos contendo compostos bioativos (extrato bruto, etéreo, aquoso e alcoólico) de açaí e pitanga;
- II. Verificar a influência dos compostos bioativos presentes nos extratos sobre a atividade da enzima GST citosólica cerebral e hepática de ratos;
- III. Verificar a influência dos compostos bioativos presentes nos extratos sobre a atividade da enzima GSTmu citosólica cerebral e hepática de ratos;
- IV. Verificar a influência dos compostos bioativos presentes nos extratos sobre a atividade da enzima catalase citosólica cerebral e hepática de ratos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS DE PITANGA E AÇAÍ

4.1.1 Obtenção das polpas de frutas

As polpas de açaí foram obtidas do comércio da região Norte, mais especificamente de Belém do Pará (PA), transportadas congeladas e mantidas dessa forma até sua utilização. Os frutos de pitanga foram colhidos de pitangueiras da região de Seropédica (RJ), despolpadas manualmente e a polpa triturada e congelada até sua utilização.

4.1.2 Obtenção dos extratos brutos de pitanga e açaí

Os compostos bioativos presentes na polpa “in natura” triturada de açaí e de pitanga foram extraídos segundo protocolo de Broizini et al. (2007), utilizando água destilada para

obtenção do extrato bruto, na proporção de 1:5 (g da amostra: mL de água) durante 1 hora em agitador magnético, à temperatura ambiente. A solução foi filtrada a vácuo em funil de Büchner e o resíduo líquido centrifugado a 3.000 rpm por 2 minutos para decantação de sólidos mais finos. Os extratos brutos foram armazenados congelados à -20°C até sua utilização nos ensaios de atividade enzimática.

4.1.3 Obtenção dos extratos fracionados de pitanga e açaí

4.1.3.1 Método de extração fracionada (“Normal”)

O primeiro método para obtenção de pool de compostos bioativos testado utilizou protocolo segundo Broizini et al. (2007). Nesta extração, a polpa de açaí seca foi exposta a calor seco durante cinco dias para retirada da máxima quantidade de água possível, para que esta pudesse ser utilizada como matéria prima para extração.

Os compostos bioativos presentes na polpa de açaí foram extraídos sequencialmente utilizando solventes de diferentes polaridades, seguindo a ordem crescente: éter etílico, etanol e água destilada. Os diferentes solventes utilizados permitiram extrair classes diferentes de compostos em cada extrato obtido, de acordo com a polaridade destes compostos.

A polpa de açaí já seca e triturada foi adicionada de éter etílico na proporção 1:5 e agitada durante 1 hora a temperatura ambiente. Após o tempo de extração, a mistura foi filtrada e armazenada até sua utilização nos testes enzimáticos e o resíduo sólido utilizado para extração sequencial utilizando etanol. O segundo resíduo sólido foi utilizado para extração em água destilada. Ao fim das extrações foram obtidos os extratos etéreo, alcoólico e aquoso de açaí e de pitanga.

4.1.3.2 Método QuEChERS

As frações de extratos de compostos naturais em éter etílico foram obtidas a partir de adaptação do método QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*), descrito por Anastassias et al. (2003). O processo de extração QuEChERS descrito na literatura é realizado a partir de 5g de amostra, adição de solvente e agitação vigorosa. Após são adicionados sais como o NaCl e o MgSO₄, para retirada de água. Após nova agitação, a mistura é centrifugada e o sobrenadante transferido para tubo de teflon, para nova adição de sal e centrifugação. O novo sobrenadante é retirado e armazenado até sua utilização. Neste trabalho, alterações a este método foram testadas a fim de facilitar a obtenção de extratos de frutas sem

a necessidade da etapa de retirada de água. As alterações testadas para o método compreenderam mudanças na quantidade de amostra, solvente e sais utilizados.

4.2 PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA DOS EXTRATOS

4.2.1 Extratos Apolares

Os extratos etéreos (apolares) de açaí e pitanga foram analisados por metodologias diferentes, para determinação de seu perfil fitoquímico a partir da ausência ou presença de antraquinonas, esteroides e triterpenos, derivados de cumarinas e glicosídeos cardioativos.

4.2.1.1 Antraquinonas

A presença de antraquinonas foi determinada a partir da reação de Borntraeger. Os extratos etéreos secos, foram ressuspensos em 3 mL de triclorometano (CHCl_3) e adicionados 2 mL de hidróxido de sódio 3% ao extrato clorofórmico. A mistura foi agitada suavemente, até o aparecimento de coloração rósea, vermelha ou violeta na fase aquosa, indicativa de reação positiva.

4.2.1.2 Esteroides e triterpenoides

A verificação de esteroides e triterpenoides foi realizada segundo protocolo descrito por Matos (1997). O extrato etéreo seco foi ressuspense em 3 mL de clorofórmio e adicionado 2 mL de anidrido acético. A mistura foi agitada suavemente e, após agitação, foi adicionado lentamente 1 mL de ácido sulfúrico concentrado. Uma sucessão de cores, partindo de róseo ao azul até verde foram observadas para resposta positiva da presença de esteroide e triterpenoides.

4.2.1.3 Derivados de cumarinas

A presença de derivados de cumarinas foi verificada segundo protocolo descrito por Costa (1972). O extrato seco foi ressuspense em 5 mL de éter etílico e concentrado em banho-maria até 0,5 mL. Em papel de filtro, foram aplicadas gotas da solução etérea de modo a formar manchas de 1 cm de diâmetro cada. A uma destas manchas, adicionou-se uma gota de hidróxido de sódio 1N. Metade da mancha foi coberta com um anteparo escuro e exposta a luz ultravioleta. O anteparo foi retirado e foi verificada a existência de fluorescência azul na parte descoberta da mancha, indicativa de reação positiva.

4.2.1.4 Glicosídeos Cardioativos

A presença de glicosídeos cardioativos foi avaliada pela reação de Kedde. O extrato etéreo seco foi ressuspense em 1 ml de ácido acético glacial e adicionadas 2 gotas de cloreto férrico a 2 %. A mistura foi transferida cuidadosamente para um tubo de ensaio contendo cerca de 1 mL de ácido sulfúrico concentrado e foi observado o aparecimento de coloração vermelho-acastanhada na zona de contato dos líquidos.

4.2.2 Extratos polares

Os extratos bruto, aquoso e alcoólico (polares) de açaí e pitanga foram analisados por metodologias diferentes, para determinação de seus perfis fitoquímicos a partir da ausência ou presença de alcaloides, flavonoides, saponinas, carboidratos, ácidos orgânicos, taninos e aminoácidos não proteicos.

4.2.2.1 Alcaloides

A presença de alcaloides nos extratos polares foi determinada segundo protocolo descrito por Wall et al. (1954). Os extratos secos foram ressuspensos em 4mL de solução de ácido clorídrico 1% (v/v). Foram então separadas duas porções de 2mL para tubos de ensaio diferentes e adicionadas 5 gotas de reagente Dragendorff (Carbonato de bismuto, Iodeto de potássio, Ácido clorídrico, água destilada). A ocorrência de precipitado na cor vermelho tijolo foi indicativa de reação positiva.

4.2.2.2 Flavonoides

A verificação quanto ausência ou presença de flavonoides foi realizada segundo protocolo de Wall et al. (1954). Os extratos polares foram ressuspensos em 3ml de metanol e adicionados de 1 mL de ácido clorídrico concentrado. Foi adicionada à solução uma fita de magnésio e ela permaneceu reagindo até o surgimento de uma coloração rósea, indicativa de reação positiva.

4.2.2.3 Saponinas

O teste para presença de saponinas foi realizado de acordo com protocolo proposto por Barbosa (2001). As amostras de extratos polares secos foram ressuspensas em 3 mL de água

destilada e agitadas vigorosamente em tubo de ensaio por 5 segundos. A formação de espuma, persistente por no mínimo 20 minutos, foi o indício de presença de saponinas.

4.2.2.4 Carboidratos

A presença ou ausência de carboidratos nas amostras de extratos polares foi determinada por protocolo descrito por Costa (1972). Em um primeiro momento as amostras de extratos polares foram ressuspensas em 3ml de água destilada e adicionadas de 2 mL do reativo de Fehling A (formada por sulfato de cobre e água destilada) e 2 mL de reativo de Fehling B (formada por tartarato de sódio e potássio, hidróxido de potássio e água destilada). A mistura foi aquecida em banho-maria até ebulição. A formação de um precipitado vermelho-tijolo foi considerada indicação para reação positiva. No caso de reações negativas, um segundo teste foi realizado para confirmação do resultado.

No segundo teste, as amostras foram ressuspensas em 3 mL de água destilada, adicionados 1mL de ácido clorídrico concentrado e fervidas em banho-maria por 10 minutos. Após esse tempo, a mistura foi resfriada e neutralizada com solução de hidróxido de ferro III a 20%. À mistura, foram adicionados 2 mL do reativo de Fehling A e 2 mL de reativo de Fehling B e aquecida em banho-maria, por 5 minutos em ebulição. A formação de precipitado vermelho-tijolo indicou reação positiva.

4.2.2.5 Ácidos orgânicos

A determinação da presença de ácidos orgânicos foi realizada utilizando método descrito por Merck (1980). Para essa determinação, as amostras de extratos polares foram ressuspensas em 3 mL de água destilada. A mistura foi testada sobre reativo de Pasková, observando-se o descoloramento do mesmo para consideração de resultado positivo. O Reativo de Pasková é formado pela mistura de duas soluções, sendo uma composta de verde de bromocresol, azul de bromofenol e etanol; e a segunda de permanganato de potássio, carbonato de sódio e água destilada.

4.2.2.6 Taninos

A presença de taninos foi avaliada segundo protocolo descrito por Matos (1997). As amostras dos extratos polares foram ressuspensas em 5 mL de água destilada e adicionadas de

4 gotas de solução de cloreto férrico a 1% (p/v). O aparecimento de uma coloração verde ou azul foi indicativo para reação positiva.

4.2.2.7 Aminoácidos não proteicos

A reação com ninidrina foi utilizada para avaliar a presença de aminoácidos não proteicos nas amostras de extratos não polares de açaí e pitanga (Matos, 1997). As amostras foram ressuspensas em 5 mL de água destilada. Gotas da mistura foram aplicadas em papel de filtro até formar um halo de um centímetro de diâmetro. Sobre a mancha, foram adicionadas 2 gotas do reativo ninidrina a 1% (p/v). O sistema foi aquecido em estufa a 100°C por 2 a 3 minutos e foram considerados resultados positivos os papéis em que houve presença de coloração violeta ou azulada, persistente.

4.3 DETERMINAÇÃO DE FENÓIS TOTAIS

O conteúdo total de fenóis das amostras foi determinado utilizando o reagente Folin-Ciocalteu e solução de carbonato de sódio adicionado a amostra (Sousa et al., 2007). Após 15 minutos de reação, a absorvância do produto foi lida em espectrofotômetro a 765 nm, e o teor total de fenóis foi calculado a partir de curva de calibração utilizando ácido gálico como padrão.

4.4 PREPARO DAS FRAÇÕES ENZIMÁTICAS CITOSÓLICAS DE CÉREBRO E FÍGADO DE RATOS

As amostras de cérebro e fígados de ratos Wistar machos foram descongeladas, pesadas e homogeneizadas em homogeneizador Potter-Elvehjem teflon/vidro, numa proporção de 1,0 g de tecido para 4,0 mL de solução tampão gelada (fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,0, contendo sacarose 0,25 M). Os homogeneizados foram centrifugados a 9.000 x g por 45 minutos a 4 °C. Os sobrenadantes desta primeira centrifugação foram transferidos para novos tubos e ultracentrifugados em ultracentrífuga Hitachi, a 100.000 x g por 90 minutos a 4 °C. O sobrenadante, fração citosólica, foi recolhido, aliqotado e armazenado em freezer (-20°C) até sua utilização para determinação de atividade da enzima GST, sua isoforma mu e catalase. As análises seguiram de acordo com documento de liberação emitido pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/IOC) do Instituto Oswaldo Cruz, sob número LA-010/2016.

4.5 DETERMINAÇÃO DA QUANTIDADE DE PROTEÍNA NA FRAÇÃO SOLÚVEL DE CÉREBRO E FÍGADO DE RATO

A quantificação de proteína foi determinada através do método de Peterson (1977) utilizando como padrão 10 µg e 100 µg de albumina sérica bovina (BSA).

4.6 ENSAIOS ENZIMÁTICOS

4.6.1 Determinação da atividade geral de GST

A atividade geral de GST foi determinada de acordo com o método descrito por Habig et al. (1974). O meio reacional continha, além da amostra, 5,0 mM de GSH (glutathiona reduzida) e 100 mM de CDNB (1-cloro 2,4-dinitrobenzeno) em solução tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 6,0. Nas curvas de Michaelis-Menten foram utilizadas as seguintes concentrações de CDNB: 5,0; 10,0; 12,5; 16,5; 25; 50 e 75 mM. A formação do complexo GSH-CDNB foi continuamente registrada no espectrofotômetro ($\lambda = 340 \text{ nm}$) a 25 °C durante 3 minutos. A atividade específica foi determinada usando o coeficiente de absorvidade milimolar do complexo GSH-CDNB ($\epsilon_{340} = 9,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) e expressa em µmol de complexo GSH-CDNB produzido por minuto por miligrama de proteína.

4.6.2 Determinação da atividade da GST classe *mu*

A atividade da isoforma *mu* da enzima GST foi realizada segundo protocolo descrito por Habig et al. (1974), utilizando como substrato DCNB (1,2-dicloro-4-nitrobenzeno), na concentração de 200mM, e concentração de GSH de 5,0mM. A absorvância do produto final da reação foi lida em espectrofotômetro ($\lambda = 345 \text{ nm}$) a 25°C durante 3 minutos, e expressa em µmol de complexo GSH-DCNB ($\epsilon_{345} = 8,5 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) produzido por minuto por miligrama de proteína.

4.6.3 Determinação da atividade de catalase citosólica hepática e cerebral de ratos

A atividade de catalase foi ensaiada de acordo com o método descrito por Zoppi et al. (2003). O meio reacional continha, além da fração citosólica, 7,5 ou 30 mM de H₂O₂ em solução tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,5. O consumo de H₂O₂ foi continuamente registrado no

espectrofotômetro ($\lambda = 240 \text{ nm}$) a $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Os cálculos para determinar a atividade enzimática foram feitos usando o coeficiente de absorvidade milimolar do H_2O_2 ($\epsilon_{240} = 43,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$). A atividade específica foi expressa em μmol de H_2O_2 consumido por minuto por miligrama de proteína ($\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$).

4.6.4 Efeito dos extratos de pitanga e açáí sobre as atividades enzimáticas

Efeitos *in vitro* dos extratos sobre as atividades das enzimas GST e catalase em citosol hepático e cerebral de ratos foram testados a partir da adição, ao meio reacional, de $5 \mu\text{L}$ dos extratos testados: extrato bruto, etéreo, alcoólico e aquoso. Após a adição dos extratos, as atividades eram determinadas de acordo com os métodos descritos nos itens 4.6.1., 4.6.2 e 4.6.3, com leituras feitas a cada 30 segundos, durante 3 minutos. Para a GST mu, os ensaios foram realizados com os extratos com melhores resultados para atividade de GST geral, considerando os resultados de influência positiva.

4.7 GRÁFICOS E ANÁLISES ESTATÍSTICAS

A comparação das médias dos grupos foi feita usando o teste One-way ANOVA e pós-teste de comparação múltiplas de Tuckey-Kramer ($p < 0,05$), utilizando o software GraphPad InStat versão 3.10 para Windows. Os gráficos foram feitos no software GraphPad Prism versão 5.01 para Windows. Ambos os softwares pertencentes a GraphPad Software, San Diego California USA.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 COMPARAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS DE EXTRAÇÃO (PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA)

O método QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*), que se caracteriza pela extração rápida, confiável, fácil, econômica, robusta e segura de analitos a partir de matrizes complexas, tem sido amplamente utilizado para a extração de resíduos de agrotóxicos e é considerado promissor para a extração de toxinas distintas em diversas matrizes alimentares. Esse método foi testado como alternativa para a extração do pool de compostos bioativos de frutas, já que nos métodos de extração mais utilizados e descritos na literatura, as amostras devem estar o máximo possível livres de água. A etapa de remoção de água por métodos convencionais foi considerada inviável, levando em consideração a grande quantidade de água presente na matriz testada e na possibilidade de perda dos compostos bioativos de interesse.

A etapa de remoção de água no método QuEChERS, geralmente feita com adição de algum sal inorgânico, proporciona um extrato final de menor polaridade, facilitando a extração do analito de interesse com solventes mais apolares. A escolha do $MgSO_4$ no método original foi devido a sua maior capacidade de remover água quando comparado a outros sais. Além de reduzir o volume de fase aquosa, sua hidratação é uma reação exotérmica, tendo como resultado o aquecimento entre 40 e 45 °C da amostra durante as etapas de extração/partição, favorecendo a extração, especialmente dos compostos apolares (Anastassias et al., 2003). A adaptação do método foi necessária por conta da complexidade das matrizes avaliadas e da necessidade de mudança dos solventes utilizados para ser possível a obtenção dos diferentes compostos bioativos, solúveis nos diferentes solventes utilizados.

Com esse procedimento foi possível obter os extratos etéreo, alcoólico e aquoso de açaí e pitanga, contendo um pool de compostos bioativos, testados quanto a influência na atividade de enzimas antioxidantes e de biotransformação. A figura 15 (A) ilustra o resultado da separação dos extratos utilizando macerado de pitanga após o primeiro processo de centrifugação (extrato etéreo). Após a retirada dos extratos etéreos, a parte da matriz ainda presente no tubo foi retirada e reservada para que fosse possível realizar um novo procedimento,

agora com etanol, obtendo assim o extrato alcoólico (figura 15B). O mesmo procedimento foi realizado para obtenção do extrato aquoso.

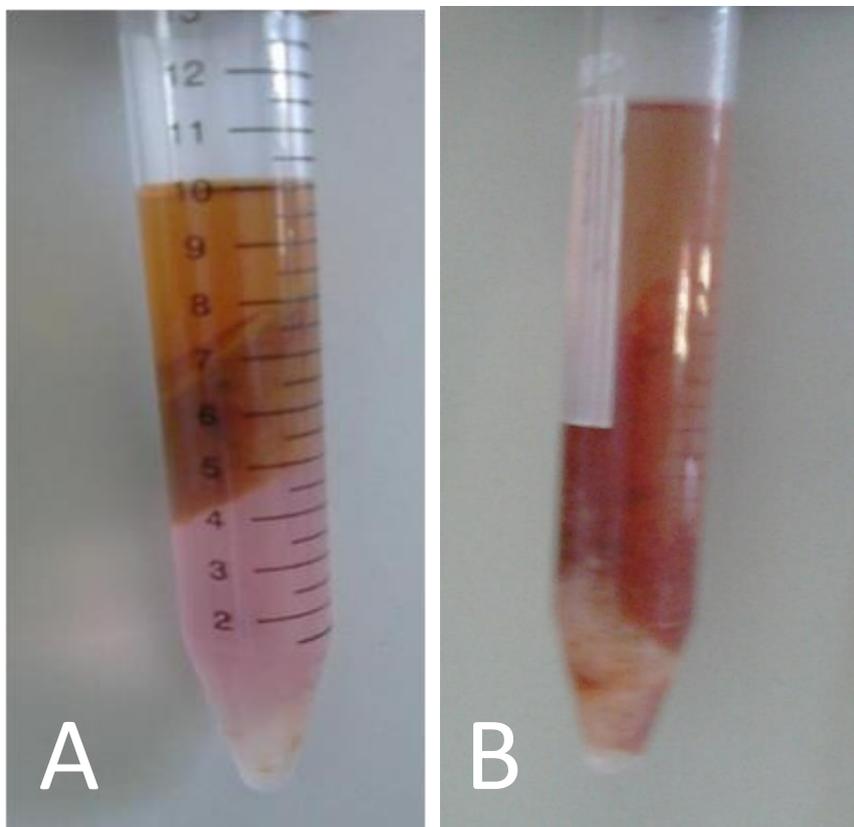


Figura 15: Separação, pelo método QuEChERS modificado, do extrato etéreo (A) e alcoólico (B) de pitanga obtido a partir do resíduo sólido da obtenção do extrato etéreo.

Os mesmos procedimentos foram adotados para obtenção dos extratos etéreo, aquoso e alcoólico de açai.

5.1.1 Extrato aquoso de primeira extração (Aquoso de QuEChERS de pitanga)

Durante o processo de obtenção dos extratos de compostos bioativos de frutas, utilizando o método QuEChERS, uma das etapas permite a separação entre a fase orgânica e a fase aquosa da mistura. No preparo do extrato etéreo de pitanga, a grande quantidade de água presente na fruta gerou uma fase aquosa visível e de fácil obtenção. Essa fase aquosa também foi alvo de testes, considerando a possibilidade de conter compostos bioativos de interesse e passíveis de influenciar na atividade das enzimas estudadas, assim como os outros extratos. A

figura 16 mostra a fase aquosa retirada para teste, durante o processo de obtenção do extrato etéreo.

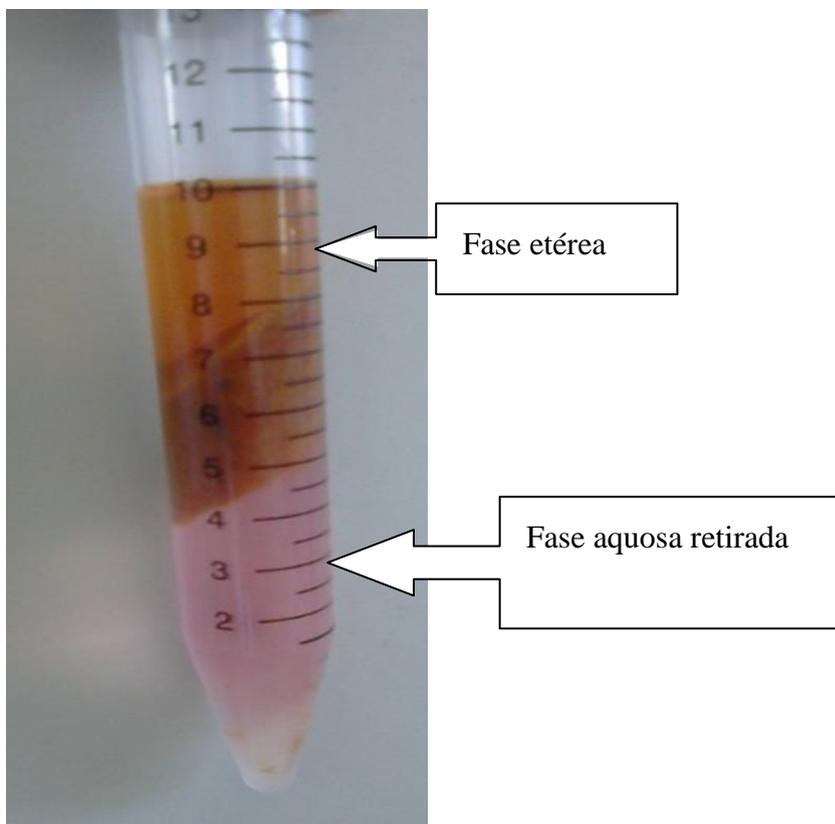


Figura 16: Separação de fases obtida durante extração etérea de polpa de pitanga pelo método QuEChERS.

Para avaliar a viabilidade do uso do método QuEChERS para obtenção dos extratos de frutas e continuação das atividades utilizando esses extratos, foram realizados testes de prospecção fitoquímica, teor de fenóis totais e atividade de GST com os extratos etéreos das frutas. Os testes consideraram ainda os extratos obtidos pelos dois métodos: Adaptação ao Método QuEChERS, chamado aqui apenas de QuEChERS, e Método da literatura, segundo Broizini et al. (2007), aqui referido como Método “Normal” (N), que exige secagem da polpa das frutas e maior utilização de solventes.

5.1.2 Prospecção fitoquímica dos extratos etéreos

A prospecção fitoquímica foi realizada a partir de diferentes métodos, a fim de determinar as classes de compostos presentes nos extratos etéreos de açaí e pitanga obtidos com as duas metodologias de extração testadas, Normal e QuEChERS. As classes de compostos presentes nos extratos apolares, etéreo de açaí e pitanga, foram esteroides e triterpenos, cumarinas, glicosídeos cardioativos e antraquinonas. A intensidade de cada tipo de composto presente nos extratos em cada método de extração está apresentada na Tabela 1.

Tabela 1: Resultados dos testes de prospecção fitoquímica de extratos apolares, em escala: 0= ausência; +=presença; += fraca; ++= moderada; +++= forte; S= suspeita.

	Esteróides e Triterpenos	Cumarinas	Glicosídeos Cardioativos	Antraquinonas
EEAN	0	0	+++	0
EEAQ	0	0	+	0
EEPN	+	0	0	S
EEPQ	S	0	+	S

EEAN= Extrato Etéreo de Açaí por Método Normal; EEAQ= Extrato etéreo de Açaí por QuEChERS; EEPN= Extrato Etéreo de Pitanga por Método Normal; EEPQ= Extrato Etéreo de Pitanga por QuEChERS.

A partir dos resultados encontrados foi possível perceber semelhanças nos extratos obtidos pelos dois métodos, para esteroides e triterpenos de açaí, cumarinas e antraquinonas tanto de açaí quanto de pitanga. Para esteroides e triterpenos dos extratos de pitanga, foi observada pequena diferença, com presença fraca no extrato por Método Normal e suspeita no extrato por QuEChERS. Diferença de resultados também foi observada na análise de glicosídeos cardioativos, em que uma presença forte foi determinada para o extrato de açaí obtido por Método Normal e apenas presença fraca no extrato por QuEChERS. Já para os extratos de pitanga, foi possível determinar a ausência de glicosídeos cardioativos no extrato por Método Normal e presença fraca no extrato por QuEChERS.

Os glicosídeos cardioativos são substâncias que atuam sobre o músculo cardíaco, na atividade da enzima $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ (Barreiro, 2002). São conhecidos por sua ação no combate

a insuficiência cardíaca como, por exemplo a digitoxina, cardenolídeo extraído da *Digitalis purpurea* L (Foglio et al., 2006). Contudo, até então, esses compostos não foram reportados como moduladores diretos da atividade de GST. Visto que o objetivo de uso dos extratos é verificar a possibilidade de modulação da atividade enzimática pelos compostos bioativos presentes nestes extratos, não haverá prejuízo no uso do método QuEChERS para obtenção dos mesmos.

Os triterpenos, encontrados no extrato etéreo de pitanga, são reportados na literatura como compostos bioativos com ação antioxidante, antimicrobiana, antialérgica, dentre outras, o que justifica seu uso para fins medicinais (Noldin et al., 2006; Scariotto et al., 2018). Apesar disso, estudos mostram que a utilização de determinados triterpenos pentacíclicos (lupeol e betulina) para avaliar a redução de formação de cristais de oxalato de sódio em animais submetidos a indução de formação de cálculos na bexiga com consequente aumento da peroxidação lipídica e diminuição da ação celular antioxidante, levou à diminuição da concentração de GSH nos rins e bexiga, além de acentuada inibição da enzima GST, nos mesmos órgãos. Porém, os dois compostos testados foram capazes de restaurar o estado tiol e enzimas antioxidantes como a catalase, tendo como um dos possíveis mecanismos de ação o aprimoramento das defesas do corpo (Malini et al., 1999).

Antraquinonas, também encontradas no extrato etéreo de pitanga, são compostos com atividade hepatotóxica, parcialmente responsáveis por efeito laxante de plantas como *Valeriana officinalis* (Gobbo-Neto e Lopes, 2007; Secretti et al., 2015), porém não são apresentados relatos sobre modulação enzimática ou efeito antioxidante.

5.2 PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA DOS EXTRATOS AQUOSO E ALCOÓLICO DE PITANGA E AÇAÍ

Os extratos aquosos e alcoólicos de açaí e pitanga obtidos por método QuEChERS foram analisados por diferentes metodologias a fim de determinar as classes de compostos com atividade biológica presentes. Foram realizados testes para detecção de saponinas, taninos, ácidos orgânicos, carboidratos, aminoácidos não proteicos, flavonoides e alcaloides. Os resultados de detecção estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2: Resultados dos testes de prospecção fitoquímica de extratos polares, em escala: 0 ausência; (+) presença; (+) fraca; (++) moderada; (+++) forte; (S) suspeita.

	Saponinas	Taninos	Ácidos Orgânicos	Carboidratos	Aminoácidos não proteicos	Flavonoides	Alcaloides
EBP CHCl ₃	0	0	+	0	+	0	0
EBP aquoso	0	0	+	+	+	0	0
EAP CHCl ₃	0	0	+	++	+	0	0
EAcA aquoso	+++	+++	0	++	++	0	0
EAcA CHCl ₃	0	0	0	0	+	0	0
EBA Aquoso	0	+	0	++	+	0	0
EBA CHCl ₃	0	0	0	+	++	0	0
EAcP Aquoso	0	+	+	+++	++	0	0
EAcP CHCl ₃	0	0	+	+	++	0	0
EAA	0	+++	0	0	+++	0	0
EAP	0	+	+	+++	+++	0	0
EAQP CHCl ₃	0	0	0	+	+	0	0
EAQP Aquoso	0	0	0	+++	++	0	0

EBP CHCl₃= Extrato bruto de pitanga em triclorometano; EBP aquoso = Extrato bruto de pitanga em água destilada; EAP CHCl₃= Extrato aquoso de pitanga em triclorometano; EAcA aquoso = extrato alcóolico de açaí em água destilada; EAcA aquoso = extrato alcóolico de açaí em triclorometano; EBA aquoso = Extrato bruto de açaí em água destilada; EBA CHCl₃ = Extrato bruto de açaí em triclorometano; EAcP aquoso = extrato alcóolico de pitanga em água destilada; EAcP CHCl₃ = extrato alcóolico de pitanga em triclorometano; EAA= Extrato aquoso de açaí; EAP= extrato aquoso de pitanga; EAQP CHCl₃= extrato aquoso QuEChER pitanga em triclorometano; EAQP aquoso = extrato aquoso QuEChER pitanga em água destilada.

Das amostras estudadas, apresentaram ácidos orgânicos os extratos bruto, aquoso e alcoólico de pitanga. Apenas o extrato aquoso de açaí não apresentou carboidratos e, todos os extratos apresentaram aminoácidos não proteicos. Apenas o extrato alcoólico de açaí apresentou saponinas e apresentaram taninos os extratos aquoso e alcoólico de pitanga, e os extratos bruto, aquoso e alcoólico de açaí.

Dentre as amostras que apresentaram taninos, os extratos aquoso e alcoólico de açaí mostraram presença mais forte destes compostos. Taninos são compostos fenólicos resultantes do metabolismo secundário de vegetais, responsáveis por conferir proteção contra patógenos e impedir o ataque de herbívoros que se alimentam destes vegetais. Esses compostos são divididos em dois grupos, de acordo com seu tipo estrutural: taninos hidrolisáveis e taninos condensados ou proantocianidinas, estes presentes nos frutos de açaí (Rocha et al., 2011; Battestin et al., 2004). Auricchio et al. (2007) avaliou como positiva a atividade antioxidante *in vitro* por extrato hidroalcoólico de folhas de pitanga em homogenato de cérebro de camundongos que tiveram o extrato administrado horalmente, e atribuiu esse efeito, principalmente, aos taninos presentes no extrato. Por sua ação antioxidante comprovada, a presença deste composto é resultado importante a ser observado na continuação dos estudos.

As saponinas, encontradas no extrato alcoólico de açaí, são uma classe de terpenos policíclicos que nas plantas desempenham função emulsificante (propriedade tensoativa), sendo importantes na defesa de ataques de insetos e microorganismos (Vizzotto et al., 2010). As saponinas podem se complexar com fosfolipídios de membrana celular ou proteínas, alterando a permeabilidade das membranas, facilitando a absorção de substâncias benéficas ou não, estando envolvidas, portanto, em possíveis processos de toxicidade celular (Rodrigues et al., 2010). As saponinas já foram reportadas na literatura por sua atividade analgésica, expectorante, antimicrobiana, antifúngica, entre outras relacionadas a propriedade de modificação de permeabilidade de membrana ou ainda sua ação hipoglicemiante (Amorim, 2016; Rodrigues et al., 2010), e também já foram relatadas como possíveis inibidoras de enzimas digestivas, como tripsina e quimiotripsina (Makkar, 2007).

Em extratos de açaí e pitanga foram encontrados ácidos orgânicos, os quais apresentam atividade antioxidante reportadas na literatura e que possuem derivados amplamente encontradas em diversos tipos de plantas (Borguini, 2006). Em pitanga, já foi relatada a presença de ácidos orgânicos como ácidos fenólicos, β -pireno, limoneno e cineol (Consolini et al., 1999; Huber e Almeida, 2008) e, em açaí, já foram relatados os ácidos orgânicos, ácidos

fenólicos como o ácido vanílico, ácido siríngico, ácido p-hidroxibezoico, ácido ferúlico, catequinas e cianidinas (Hreinrich et al., 2011; Pacheco-Palencia et al., 2008). Ácidos orgânicos, como os fenólicos, são estudados por suas características antioxidantes em alimentos e no organismo, as quais são conferidas pela presença de um anel benzênico, um grupamento carboxílico e um ou mais grupamentos hidroxila na molécula, e que os tornam alvo nos estudos de prevenção a doenças como câncer, cardiovasculares, entre outras (Soares, 2002).

5.3 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FENÓIS TOTAIS

Compostos fenólicos são produzidos por plantas e estão relacionados a sua proteção, principalmente quanto a resistência ao ataque de microrganismos e pragas (Rocha et al., 2011). Sendo os antioxidantes mais abundantes em vegetais, estes compostos se enquadram em diversas categorias, tais como: fenóis simples, ácidos fenólicos, flavonoides, cumarinas e taninos condensados (Chaves et al., 2008; Rocha et al., 2011). Muitos desses compostos já foram relatados com importantes ações no mecanismo celular de proteção contra espécies reativas de oxigênio. As características físico químicas destes compostos permitem que participem de reações de neutralização e sequestro de EROs, podendo alterar tanto o processo inicial de formação das espécies reativas quanto impedir sua propagação (Sousa et al., 2007).

5.3.1 Avaliação comparativa dos métodos de extração quanto a quantidade de fenóis totais

Para efeito de comparação com relação a composição dos extratos, foi realizado ensaio para determinação de fenóis totais. O resultado está apresentado na Tabela 3.

Tabela 3: Quantificação de fenóis totais em extrato etéreo de açaí obtidos pelo Método Normal e método QuEChERS adaptado, em mg/g de extrato.

Métodos de Extração	Fenóis (mg/g)
Método N	0,121±0,005
QuEChERS	0,137±0,001

Os valores não significativamente diferentes encontrados em relação ao conteúdo total de fenóis mostra que os dois métodos de extração possuem condições de retirar da amostra quantidades semelhantes de compostos fenólicos. Estes resultados atestam mais uma indicação

de que o Método Normal, mais lento e custoso, pode ser substituído pelo método QuEChERS, mais rápido e econômico, sem prejuízo para as análises posteriores, como já demonstrado para análises enzimáticas.

Diante dos resultados favoráveis, o método QuEChERS foi utilizado no preparo dos demais extratos analisados.

5.3.2 Determinação de fenóis totais dos extratos de açaí e pitanga

O teor de fenóis totais foi determinado em todos os extratos de pitanga e açaí obtidos por método QuEChERS. Os resultados encontrados estão dispostos na Tabela 4.

Tabela 4: Quantificação de fenóis totais em extratos de açaí e pitanga em mg/ g de extrato.

Extrato	Fenóis (mg/g)
Bruto de açaí	0,0933±0,0004
Bruto de pitanga	0,0325±0,0018
Etéreo de açaí	0,1370±0,0010
Etéreo de pitanga	0,0341±0,0007
Aquoso de açaí	0,0657±0,0033
Aquoso de pitanga	0,0166±0,0008
Alcoólico de açaí	0,0789±0,0076
Alcoólico de pitanga	0,0391±0,0012
Aquoso de QuEChER de Pitanga	0,0641±0,0023

De acordo com os resultados, os extratos de açaí possuem maior teor de fenóis do que os extratos de pitanga. Destes, o extrato etéreo de açaí foi o que apresentou a maior quantidade de fenóis totais. Dos extratos de pitanga, o extrato aquoso de QuEChER de pitanga foi o que apresentou maior teor de compostos fenólicos.

Segundo Kuskoski et al. (2006), o teor de compostos fenólicos totais encontrados em polpa de açaí congelada (obtidas de forma aleatória em Florianópolis – SC (BR) foi de, aproximadamente, 1,37mg/g. Para pitanga, Lopes et al. (2011) encontraram valores de fenóis

totais de 0,84g/100g, no extrato aquoso de pitangas obtidas na região de Campos dos Goytacases – RJ (BR). Apesar da discrepância de valores encontrados neste trabalho, causada possivelmente pela diferença de tratamento das amostras e os locais de obtenção, comparadas aos dados da literatura, tanto para açaí quanto para pitanga os teores de fenóis totais encontrados indicam que existem nestes extratos, compostos capazes de agir direta e indiretamente na diminuição de EROs e modulação de atividade enzimática.

5.4. EFEITO DOS EXTRATOS DE AÇAÍ E PITANGA SOBRE A ATIVIDADE DE GST GERAL

Glutathione S-transferase (GST) é uma família de enzimas que participam do processo de metabolização de xenobióticos tornando-os menos tóxicos e facilitando sua eliminação. Juntamente com o tripeptídeo glutathione (GSH), as GSTs desempenham um papel importante no sistema de defesa celular contra os compostos eletrofílicos, quando catalisam a conjugação destes compostos com a GSH, formando um composto mais hidrossolúvel e passível de eliminação via sistema urinário (Zanden et al., 2003).

Muitos estudos têm sido realizados, voltados para a avaliação dos efeitos que componentes de frutas, como flavonoides, e outras substâncias possivelmente bioativas têm sobre a atividade da GST, seja ativando ou inibindo-a (Torres et al., 2004). Dependendo do alvo de estudo, conhecer substâncias que alteram positiva ou negativamente a atividade de GST é importante e pode mudar condições de tratamento ou de consumo dos alimentos ou drogas que contenham esses compostos. Neste último caso, coloca-se como exemplo o tratamento de enfermidades utilizando fármacos antineoplásicos, tendo em vista o envolvimento desta enzima em processos de resistência a múltiplos fármacos, situação em que é desejável alteração negativa de sua atividade (Wang et al., 2017)

Neste trabalho foram realizados testes com extratos de açaí e pitanga, duas frutas muito consumidas na dieta humana e utilizadas como matéria-prima para diversos produtos incluindo alimentos e cosméticos. O objetivo foi avaliar como os componentes bioativos presentes nesses extratos influenciam a atividade da GST Geral cerebral e hepática de ratos.

Para início dos testes, foram feitas análises para determinar se extratos produzidos a partir da polpa dos frutos açaí e pitanga, influenciariam a atividade da enzima GST. Os valores de concentração de fração solúvel utilizados nos ensaios foram determinados a partir da atividade enzimática observada nos diferentes volumes de fração solúvel testados. A

concentração de proteína na fração solúvel cerebral de rato utilizada nos testes enzimáticos foi de 8,85 mg/mL de solução, e fração solúvel hepática foi 26,85 mg/mL. Estas concentrações foram determinadas em ensaio preliminar como concentração proteica com resultado de atividade enzimática adequado para os ensaios, sem que houvesse prejuízo na leitura espectrofotométrica pela coloração da fração solúvel. Esse valor de conteúdo proteico encontrado foi utilizado no cálculo das atividades enzimáticas a fim de padronizá-las em termos de atividade específica. O gráfico 1 ilustra os valores de atividade da GST Geral cerebral com utilização dos extratos de açaí e de pitanga.

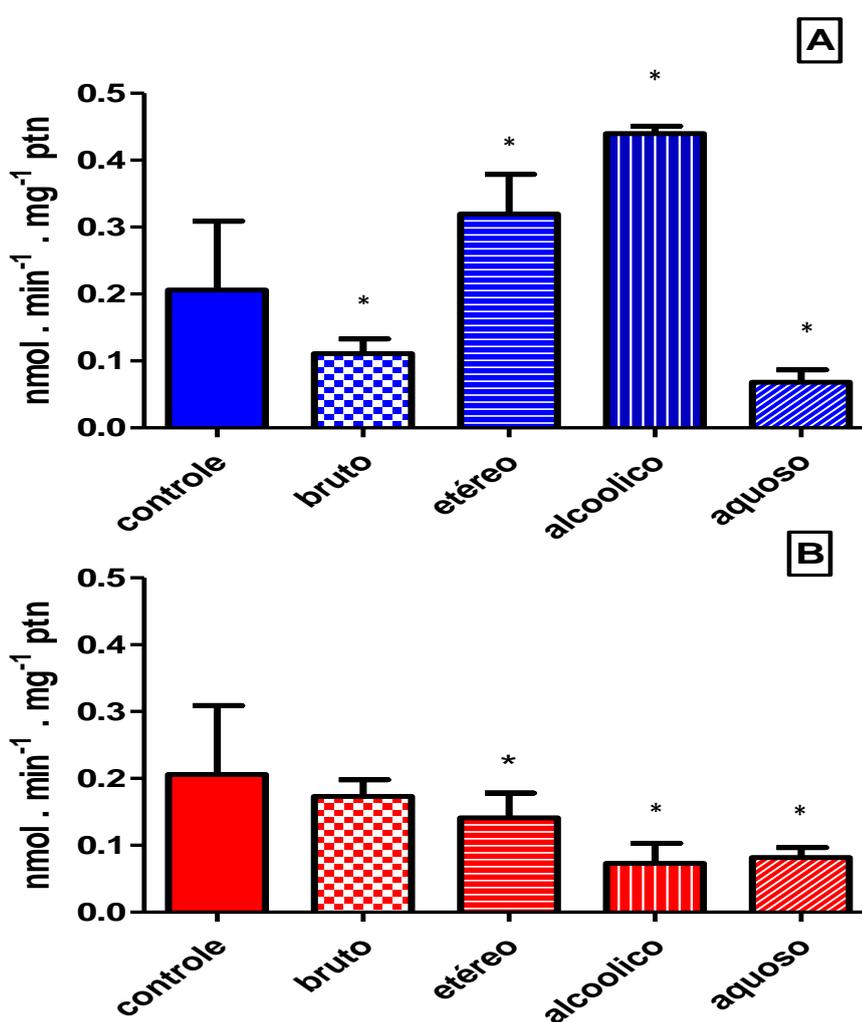


Gráfico 1: Efeito dos extratos de açaí (A) e pitanga (B) sobre a atividade de GST geral cerebral de rato. Atividade de GST cerebral de rato com adição dos extratos bruto, etéreo, alcoólico e aquoso de açaí e pitanga, comparados ao controle (sem adição dos extratos). (*) As atividades das amostras contendo extrato foram comparadas estatisticamente por ANOVA segundo o teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer ($p < 0,05$).

Diante dos resultados obtidos com os testes, foi possível perceber que nas condições da reação (CDNB 50 mM e extrato 5 μ L) houve diminuição da atividade da GST utilizando os extratos bruto de açaí, aquoso de açaí, aquoso de pitanga, etéreo e alcoólico de pitanga, aquoso de açaí e aquoso de pitanga (50%, 35%, 60%, 60% e 60%, respectivamente). Nos ensaios com os extratos etéreo e alcoólico de açaí houve aumento da atividade em cerca de 70% e 100%, respectivamente, quando comparada ao controle, indicando que os extratos possuem compostos capazes de influenciar e alterar a atividade da enzima cerebral estudada.

Os mesmos extratos foram utilizados para o teste preliminar de avaliação da atividade da GST Geral hepática de ratos (gráfico 2). Nas mesmas condições dos ensaios anteriores, foi possível determinar a predisposição da enzima GST hepática de ser influenciada por compostos bioativos presentes nos extratos de açaí e pitanga testados. Os resultados obtidos nos ensaios mostram que a presença dos extratos possui pouca influência sobre a atividade de GST, uma vez que a diferença entre os ensaios e o controle não foi considerada estatisticamente significativa.

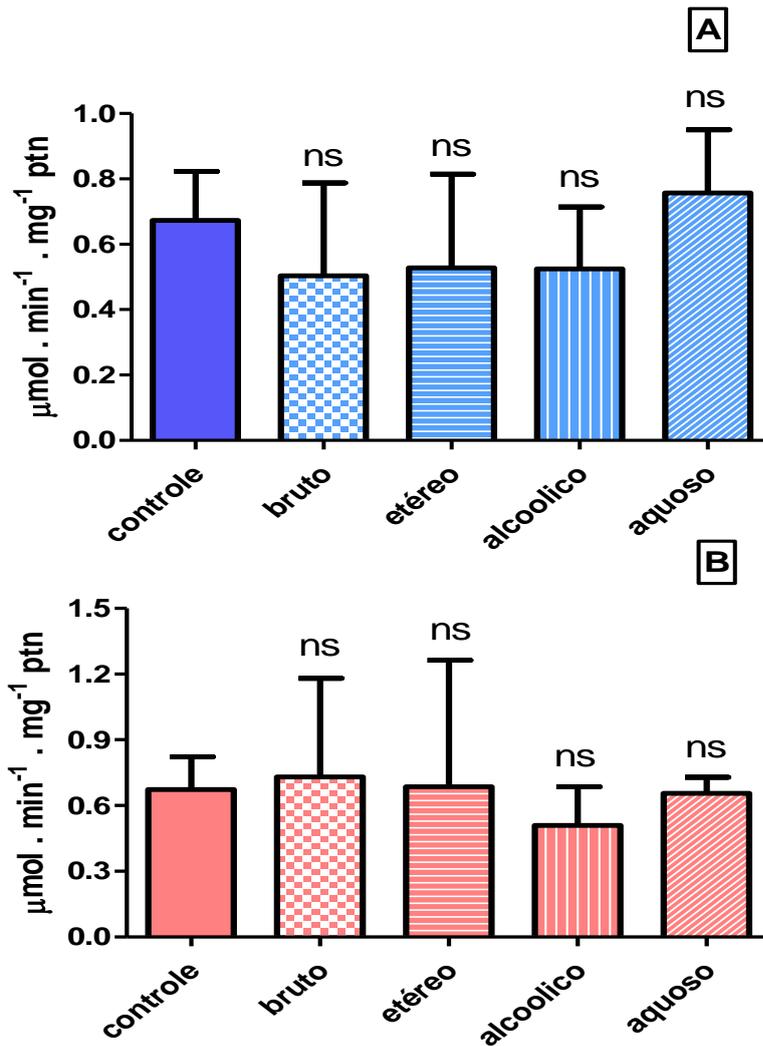


Gráfico 2: Efeito dos extratos de açaí (A) e pitanga (B) sobre a atividade de GST geral hepática de rato. Atividade de GST hepática de rato com adição dos extratos bruto, etéreo, alcoólico e aquoso de açaí e pitanga, comparados ao controle (sem adição dos extratos). ns: resultado não considerado estatisticamente diferente. As atividades das amostras contendo extrato foram comparadas estatisticamente por ANOVA segundo o teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer ($p < 0,05$).

Os resultados obtidos nos testes indicaram que o pool de compostos presentes em todos os extratos testados é capaz de influenciar a atividade da GST cerebral estudada. Porém, tendo em vista que a variação na concentração de substrato pode exercer influência sobre a atividade enzimática, novos testes foram realizados. Nestes, inclui-se o estudo cinético realizado para melhor compreender a atividade enzimática descrita, a fim de verificar concentrações possíveis de substrato em que alterações de atividade sejam observadas, até mesmo na enzima GST hepática.

Os metabólitos bioativos que predominam no açaí são antocianinas e flavonóides, dentre eles a quercetina e o dihidrokaempferol (Heinrich et al, 2011). Segundo Rohman et al. (2010), derivados de quercetina e cumarinas presentes em bulbos de cebola interagem significativamente com GST intracelular, inibindo fortemente a atividade desta enzima em ensaio utilizando extrato aquoso dos bulbos de cebola. Além disso, a quercetina bruta promove uma inibição concentração e tempo-dependente da atividade inespecífica da GSTP-1, sendo esta atividade inibida completamente após incubada com solução de quercetina na concentração de 100 μ M, durante 1 hora ou após 2 h de incubação com solução de quercetina na concentração de 25 μ M. Estes resultados indicam que, possivelmente, esta inibição é causada pela ligação dos produtos de oxidação da quercetina ao sítio ativo de GSTP1-1, atuando como inibidores específicos (Zanden et al., 2003). No estudo conduzido por Sahu et al. (1996), a atividade de GST geral de sistemas modelos de núcleos isolados de fígados de ratos, foi inibida quando incubada com kaempferol, miricetina e quercetina (encontrados em polpa de pitanga) separadamente, demonstrando atividade pró-oxidante destes compostos. Esses dados indicam que a redução da atividade da GST cerebral de rato pode ser influenciada por esses compostos bioativos presentes nos extratos testados.

5.5 COMPARAÇÃO DA ATIVIDADE DE GST GERAL CEREBRAL DE RATO COM ADIÇÃO DOS EXTRATOS ETÉREOS DE AÇAÍ OBTIDOS PELOS DOIS DIFERENTES MÉTODOS

Dois tipos de extrato etéreo de açaí obtidos pelos métodos de extração utilizados nesse estudo foram testados quanto aos seus efeitos sobre a atividade da GST geral cerebral e hepática: o protocolo sugerido por Broizini et al. (2007), aqui chamado de “Normal” (N), e a adaptação ao método QuEChERS, chamado apenas de QuEChERS (Q), sendo este método o alvo dos testes. Os resultados obtidos estão ilustrados no gráfico 3. A partir dos resultados pode-se observar que não houve variação significativa sobre a atividade de GST geral cerebral utilizando os extratos obtidos pelos dois métodos.

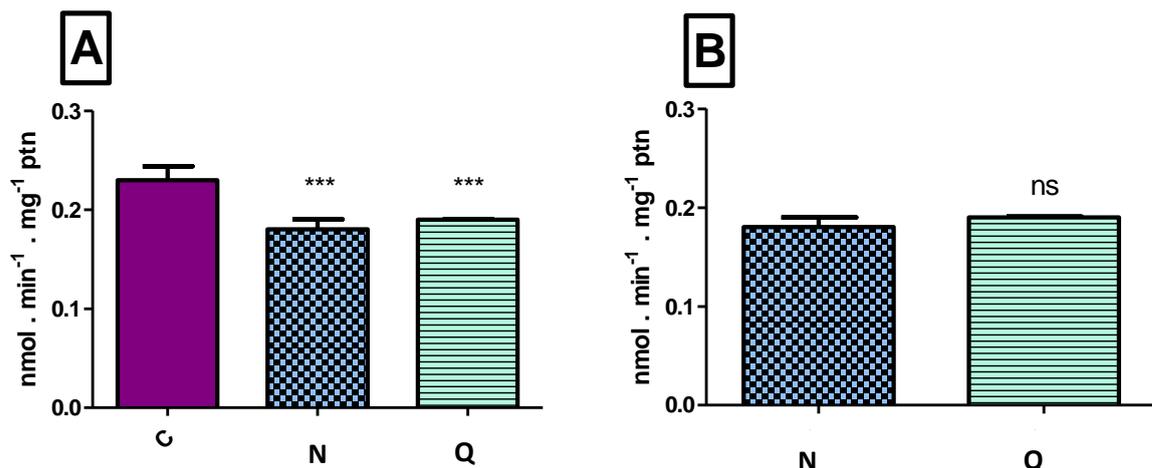


Gráfico 3: (A) Atividade de GST geral cerebral de rato com adição dos extratos etéreos de açaí, obtidos a partir do método QuEChERS (Q) adaptado e do método segundo Broizini et al (2007), método "Normal" (N). (***) Diferença estatisticamente significativa entre os ensaios com extrato e ensaio controle. (B) Comparação da atividade na GST geral cerebral entre os métodos. ns: sem diferença estatisticamente significativa entre os métodos. As atividades das amostras contendo extrato foram comparadas estatisticamente por ANOVA segundo o teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer.

Os extratos etéreos de açaí obtidos utilizando os dois métodos de extração inibiram a atividade *in vitro* da enzima GST em relação a amostra controle, sem extrato (gráfico 3A). Porém, na comparação entre os resultados de atividade de GST para esses métodos, a inibição promovida por eles não apresentou diferença estatística significativa, indicando que a adaptação testada na metodologia de extração pode ser utilizada para preparo de amostras com obtenção de extratos de produtos naturais sem prejuízo aos resultados de atividade enzimática. Isso é ainda mais interessante quando se considera que este é um método de rápida aplicação, com menor uso de solventes, custo reduzido e aplicabilidade em matrizes alimentares em que o processo de retirada de água por calor é inviável.

5.6 DETERMINAÇÃO DAS CONSTANTES DE MICHAELIS-MENTEN E VELOCIDADE MÁXIMA DA GST- INFLUENCIADA PELOS EXTRATOS

5.6.1 GST cerebral

O ensaio de atividade da enzima GST cerebral de rato, sem adição de extratos (controle), foi realizado e caracterizado quanto a cinética de Michaelis-Menten, considerando que o

principal objetivo é estudar a velocidade da reação enzimática e as condições que a afetam. A velocidade de uma reação catalisada por enzimas é determinada a partir da concentração de substrato consumido ou produto formado ao longo do tempo. Tal velocidade pode variar em resposta a diferentes fatores como concentração da enzima, concentração do substrato, pH do meio reacional, temperatura e concentração de compostos ativadores ou inibidores presentes no meio (Lima e Nunes, 2007).

O gráfico 4 ilustra a curva obtida a partir do estudo do efeito da concentração do substrato CDNB sobre a atividade de GST em fração citosólica cerebral de ratos. A cinética de Michaelis-Menten permite obter valores de parâmetros enzimáticos importantes como, a constante de Michaelis (K_M) e a velocidade máxima ($V_{m\acute{a}x}$), para melhor caracterização da atividade enzimática, fornecendo uma melhor resposta e avaliação da velocidade da reação em função da concentração de substrato (Devlin, 2011).

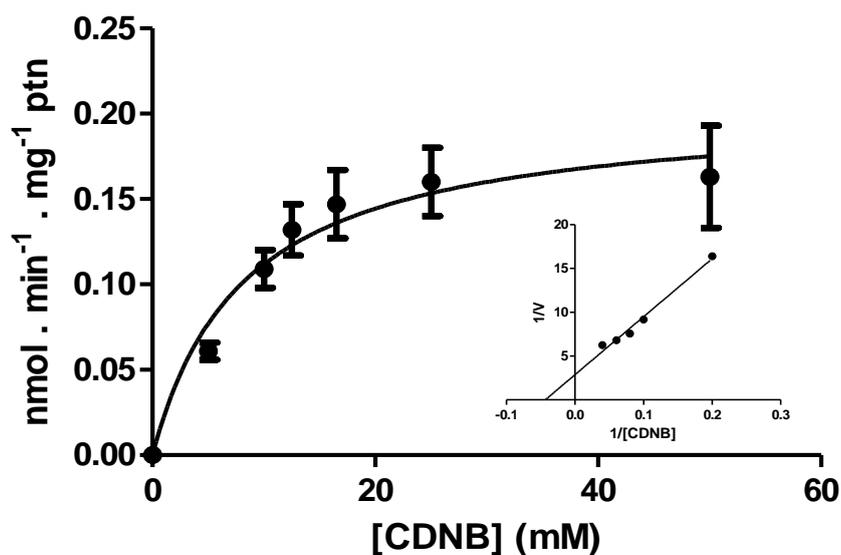


Gráfico 4: Efeito da concentração do substrato 1-cloro 2,4-dinitrobenzeno (CDNB) sobre a atividade de GST em fração citosólica cerebral de ratos.

O valor de K_M foi determinado como 3,44 mM e o valor de $V_{m\acute{a}x}$, aproximadamente, 0,204 nmol.min⁻¹.mg⁻¹. A caracterização da atividade de GST controle permite melhor avaliação da influência dos extratos de açaí e pitanga sobre a atividade enzimática e, conseqüentemente, melhor utilização dos extratos de acordo com sua ação.

Dos resultados preliminares encontrados para a atividade da GST com a ação dos extratos de açaí e pitanga, foi possível iniciar o estudo para entendimento da forma como ocorre a variação da atividade enzimática causada pelos compostos bioativos presentes nestes extratos, utilizando diferentes concentrações de substrato. Levando em consideração que o mecanismo de catálise de conjugação entre o substrato CDNB e a glutathiona possa ser modelado (Torres, 2004), uma vez que a concentração de substrato pode ser alterada para investigação do seu efeito na velocidade da reação, foram realizados ensaios enzimáticos com substrato CDNB, nas concentrações de 10; 12,5; 16,5; 25 e 50 mM, utilizando tanto o extrato de açaí quanto o de pitanga (Santos, 2009). A faixa de concentração de substrato foi ajustada de acordo com a equação de Michaelis-Menten $V = V_{\text{máx}} \times S / (K_M + S)$, sendo S a concentração de substrato, $V_{\text{máx}}$ a velocidade máxima da enzima e K_M , a constante de Michaelis-Menten (Lopes, 2013).

O gráfico 5 mostra as curvas de Michaelis-Menten obtidas para a atividade de GST cerebral de ratos em ensaios realizados com uso dos extratos brutos de pitanga (A) e de açaí (B). A adição do extrato bruto de pitanga promoveu ativação da atividade da GST cerebral de rato apenas na concentração de 25 mM (aproximadamente 50%) de CDNB. A diferença entre o ensaio controle e as demais concentrações testadas não foram estatisticamente significativas, mostrando que o extrato bruto de pitanga não influenciou a atividade da enzima nestas concentrações.

Em todas as concentrações de substrato testadas, o extrato bruto de açaí promoveu redução na atividade da GST (56%, 17%, 50%, 50 e 27%, aproximadamente). Levando em consideração a ação inibitória dos componentes do extrato bruto de açaí, os dados de K_M e $V_{\text{máx}}$ foram determinados a partir do gráfico de duplos recíprocos e comparados com aqueles determinados pelo ensaio controle.

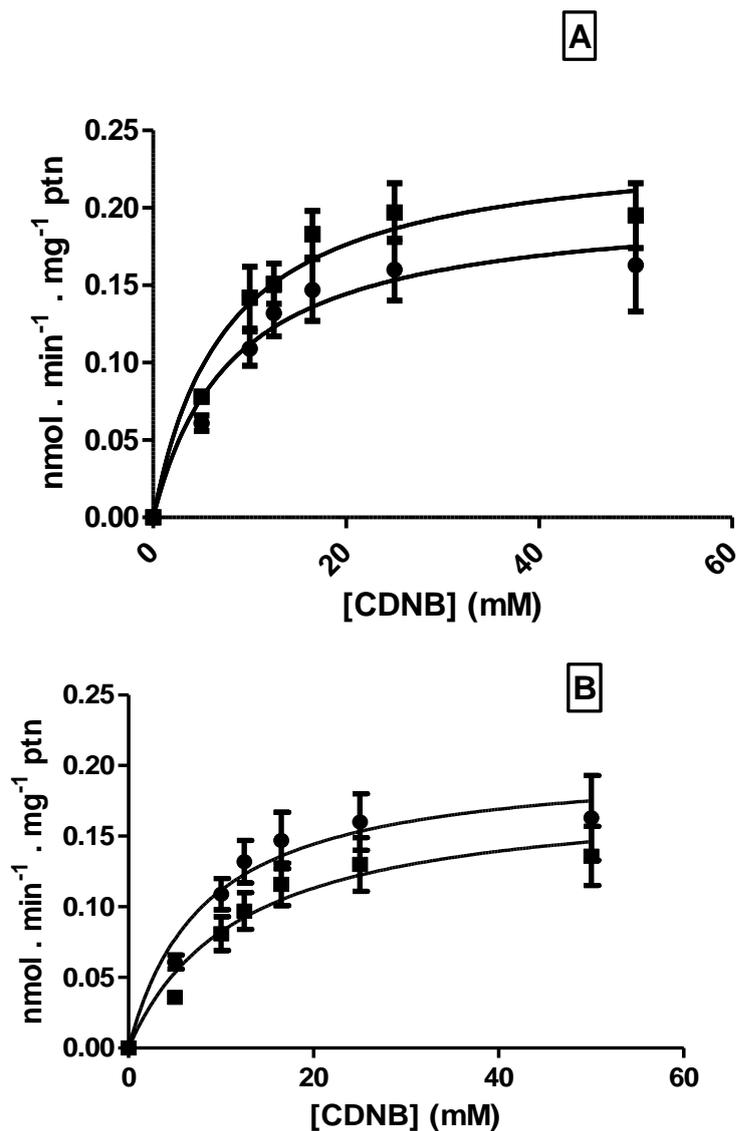


Gráfico 5. Gráfico de Michaelis-Menten: Efeito dos extratos brutos de pitanga (A) e açai (B) sobre as atividades de GST cerebral de rato utilizando CDNB como substrato. (■) Extrato; (●) Controle.

Ao atingir a velocidade máxima, a formação de produto da reação manteve-se praticamente constante, indicando saturação da enzima com o substrato, que ocorre devido ao reduzido número de sítios ativos livres da enzima. Nas menores concentrações de substrato, a velocidade de reação foi menor. À medida que a concentração de substrato foi elevada, a velocidade da reação também aumentou, de forma que novos aumentos na concentração de substrato já não influenciaram a atividade, demonstrando a saturação da enzima pelo substrato.

A curva indicativa de uma cinética de Michaelis-Menten para os 2 extratos levou a construção do gráfico de Lineweaver-Burk, ilustrado no gráfico 6, do qual foi possível obter parâmetros cinéticos a serem discutidos posteriormente.

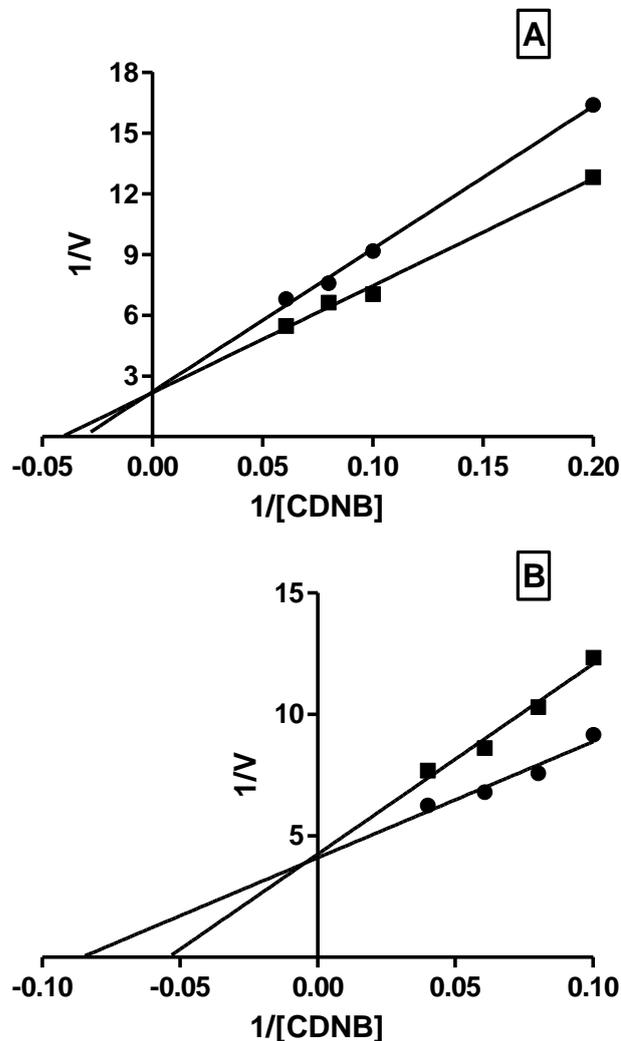


Gráfico 6. Gráficos de Lineweaver-Burk: Influência dos extratos brutos de pitanga (A) e açaí (B) sobre a atividade de GST cerebral de ratos. (▪) Extrato; (•) Controle.

Utilizando as mesmas concentrações de substrato, foram realizados ensaios enzimáticos para o estudo do comportamento da atividade da enzima GST sob influência de extratos etéreos de pitanga e de açaí. O gráfico 7 ilustra as curvas de Michaelis-Menten obtidas para as atividades enzimáticas desses extratos.

No ensaio de GST realizado utilizando o extrato etéreo de pitanga (gráfico 7A), em todas as concentrações de substrato testadas as alterações de velocidade visualizadas, não foram consideradas estatisticamente significativas, indicando baixa capacidade modulória desse extrato. No ensaio realizado com extrato etéreo de açaí (gráfico 7B) o comportamento

observado foi diferente, havendo aumento da atividade enzimática em praticamente todas as concentrações de substrato testadas chegando a uma ativação maior que 100% na concentração de 50mM.

Os ensaios com extratos etéreos, de característica apolar, indicaram que estes possuem compostos bioativos capazes de alterar positiva ou negativamente a atividade da enzima GST, dependendo do extrato de fruta utilizado e, conseqüentemente, do pool de compostos presentes. Apesar de a prospecção fitoquímica realizada neste trabalho não ter encontrado, em açaí, compostos capazes dessa modulação, existem na literatura dados que indicam a presença de compostos apolares como o sitosterol (Schauss et al., 2006), flavonoide encontrado na fruta e que possui capacidade antioxidante (Galotta, 2008), podendo estar relacionado ao aumento de atividade enzimática observado. Segundo Gupta et al. (2011), um estudo com tratamento de ratos diabéticos com beta-sitosterol mostrou aumento nos níveis séricos de atividade de GST. De acordo com os autores, o aumento de atividade da GST pode ser atribuído a ação direta do beta-sitosterol.

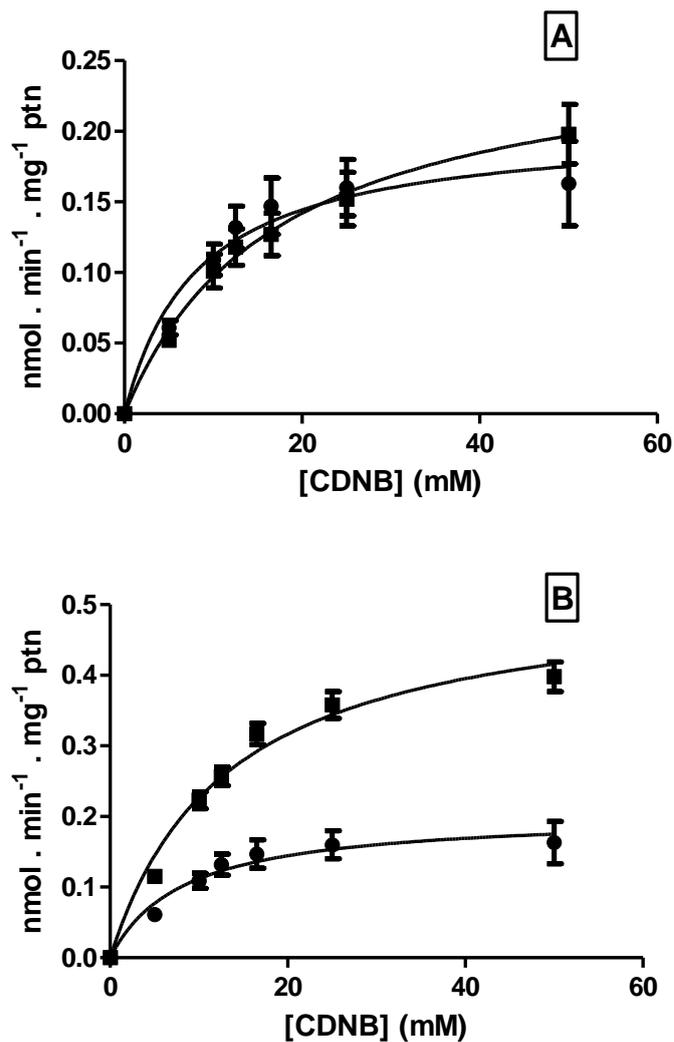


Gráfico 7. Gráfico de Michaelis-Menten: Efeito dos extratos etéreos de pitanga (A) e açai (B) sobre as atividades de GST cerebral de rato utilizando CDNB como substrato. (▪) Extrato; (•) Controle.

Para o extrato etéreo de pitanga, nas menores concentrações de substrato, a velocidade de reação foi alta; já em valores mais elevados, houve menor consumo de substrato e formação de produto. Já para o extrato etéreo de açai essa elevada taxa de reação em menor concentração de substrato foi somente observada na presença do extrato, o que indica a forte capacidade modulatória deste, quando comparado a controle. Para melhor compreensão desta cinética de reação, foram construídos os gráficos de Lineweaver-Burk (gráfico 8A e B) para os dois extratos, dos quais foi possível obter parâmetros cinéticos a serem discutidos adiante.

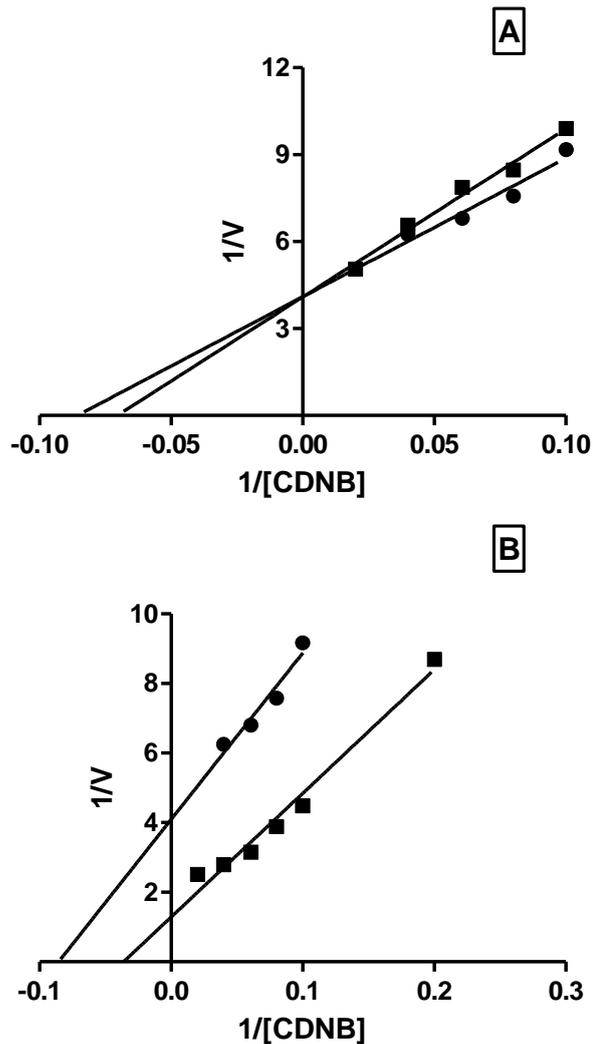


Gráfico 8: Gráficos de Lineweaver-Burk: Influência dos extratos etéreos de pitanga (A) e açaí (B) sobre a atividade de GST cerebral de ratos. (▪) Extrato; (•) Controle.

Assim como realizado com extratos bruto e etéreo de açaí e pitanga, também foram realizados ensaios de atividade de GST citosólica cerebral de ratos, em diferentes concentrações de substrato, na presença de extrato alcoólico das frutas. O gráfico 9 ilustra a atividade enzimática determinada na presença do extrato alcoólico de açaí pelo gráfico de Michaelis-Menten, e o gráfico 10, o gráfico de duplos recíprocos obtido a partir da linearização do primeiro.

Em todas as concentrações de substrato testadas para o extrato alcoólico de pitanga (gráfico 9A) houve redução da atividade enzimática, alcançando reduções de até 71% na maior concentração de substrato avaliada. Os mesmos motivos já descritos anteriormente podem ser responsáveis pelo comportamento encontrado com o uso do extrato alcoólico de pitanga, que

apresenta compostos como taninos e outros compostos (também determinados na prospecção fitoquímica) e/ou a atividade das isoformas de GST.

A presença do extrato alcoólico de açaí influenciou os ensaios, inibindo a atividade enzimática. As reduções foram de 47%, 41%, 63%, 69% e 45%, nas concentrações de substrato testadas. Assim como para o extrato alcoólico de pitanga, para o extrato alcoólico de açaí foi determinada a presença de taninos e demais compostos bioativos (prospecção fitoquímica), que podem ser responsáveis pela modulação da atividade enzimática.

De acordo com os gráficos de Michaelis-Menten, para o extrato alcoólico de pitanga, nas menores concentrações de substrato, a velocidade de reação foi relativamente alta; já em valores mais elevados, houve menor consumo de substrato e formação de produto, fazendo com que as velocidades de reação alcançassem valores semelhantes entre o ensaio controle e na presença do extrato. Já para o extrato etéreo de açaí essa elevada taxa de reação em menor concentração de substrato foi somente observada na presença do extrato, o que indica a forte capacidade modulatória deste, quando comparado a controle, ainda que tenham o mesmo valor da velocidade máxima de reação. Para melhor compreensão desta cinética de reação, foram construídos os gráficos de Lineweaver-Burk (gráfico 10A e B), para os dois extratos, dos quais foi possível obter parâmetros cinéticos a serem discutidos adiante.

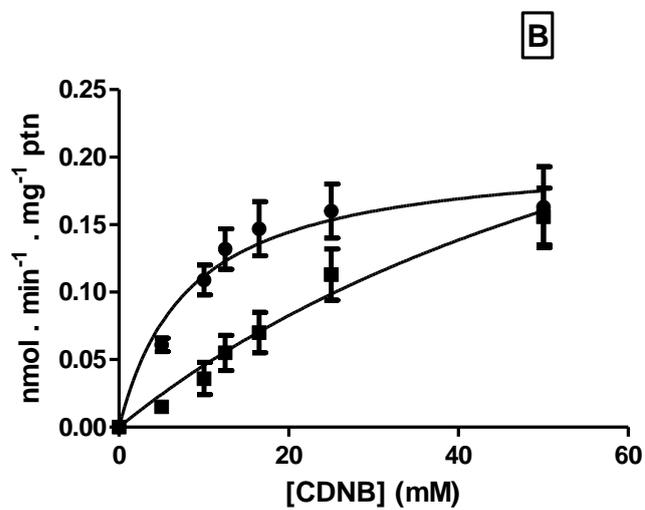
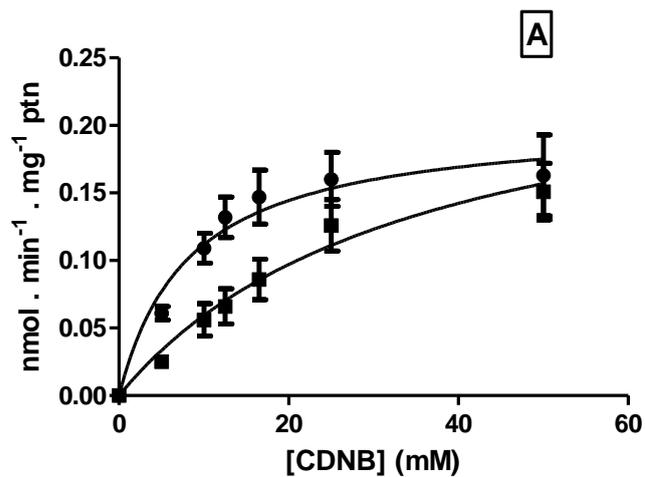


Gráfico 9. Gráfico de Michaelis-Menten: Efeito dos extratos alcoolico de pitanga (A) e açai (B) sobre atividades de GST cerebral de rato utilizando CDNB como substrato. (▪) Extrato; (•) Controle

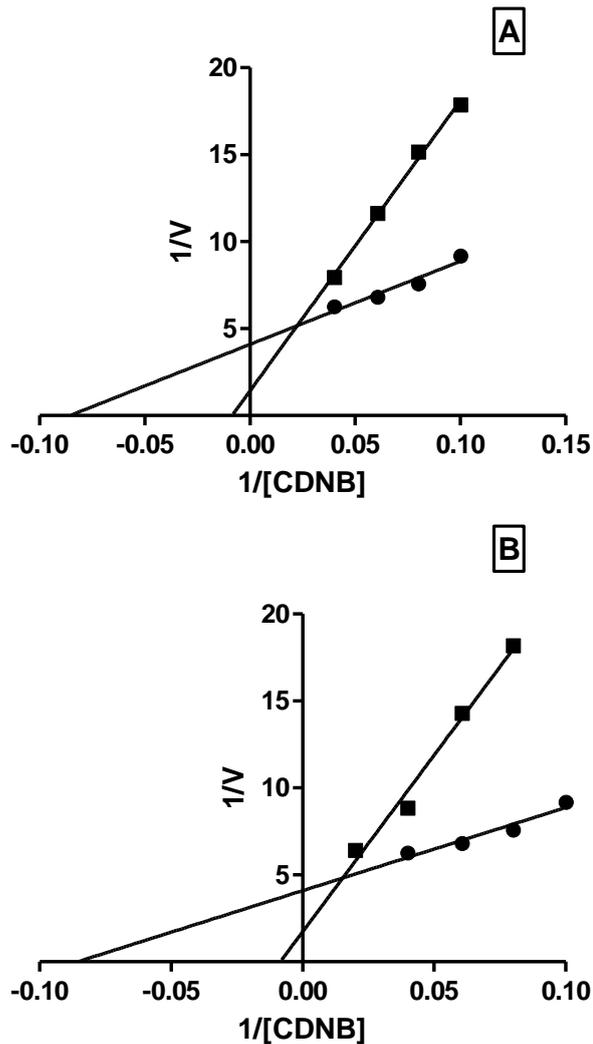


Gráfico 10: Gráficos de Lineweaver-Burk: Influência dos extratos alcoolicos de pitanga (A) e açaí (B) sobre as atividades de GST cerebral de ratos. (■) Extrato; (●) Controle.

Continuando o estudo do comportamento da atividade da enzima GST citosólica cerebral de ratos sob influência de extratos aquosos de açaí e de pitanga, os ensaios foram realizados com as mesmas concentrações de substrato dos ensaios anteriores. O gráfico 11 mostra as curvas de Michaelis-Menten obtidas para as atividades de GST, sob influência dos extratos aquosos de açaí e de pitanga. Na sequência, os gráficos de Lineweaver-Burk complementando as informações do estudo cinético da atividade enzimática (gráfico 12).

Sob influência do extrato aquoso de açaí, houve inibição da atividade enzimática em todas as concentrações de substrato utilizadas (58%, 70%, 62%, 82% e 45%, respectivamente). Para o extrato aquoso de pitanga, também foi observada a redução da atividade enzimática nas

concentrações de substrato testadas em 10, 12,5, 16,5, 25 e 50mM com 63%, 50%, 48%, 74% e 49%, respectivamente.

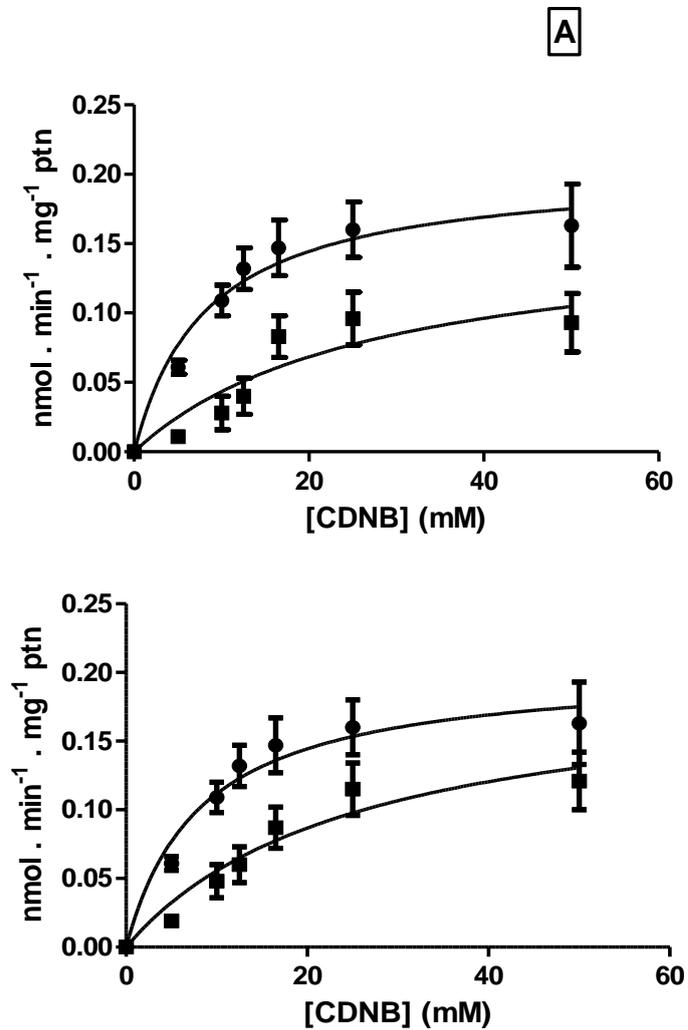


Gráfico 11. Gráfico de Michaelis-Menten: Efeito dos extratos aquosos de pitanga (A) e açai (B) sobre a atividade de GST cerebral de rato utilizando CDNB como substrato. (▪) Extrato; (•) Controle.

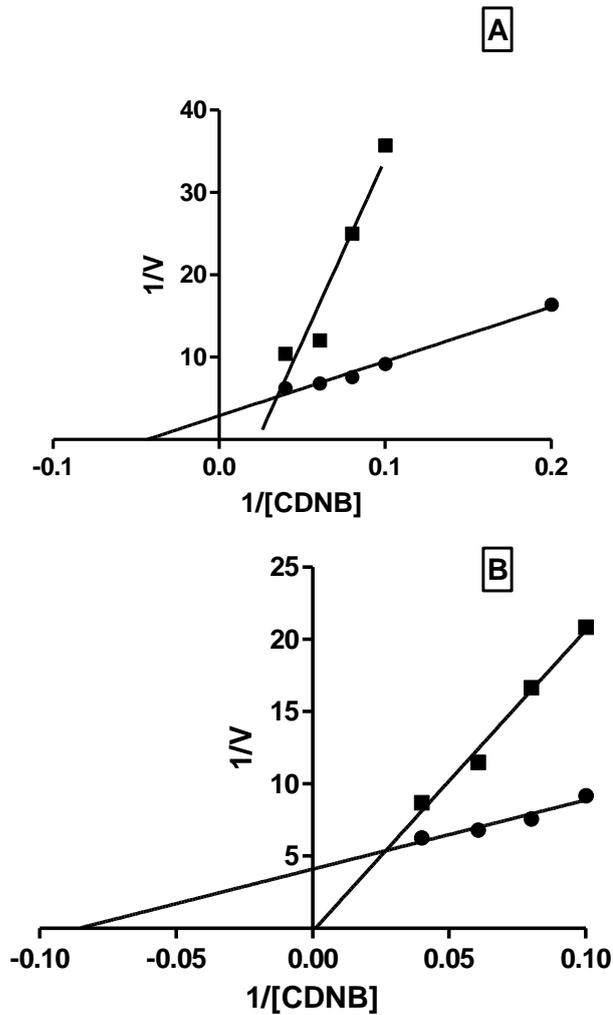


Gráfico 12: Gráficos de Lineweaver-Burk: Influência dos extratos aquosos de pitanga (A) e açaí (B) sobre a atividade de GST cerebral de ratos. (■) Extrato; (●) Controle.

Tais resultados podem ser explicados pela presença de taninos, como foi identificado durante o teste de prospecção fitoquímica. Estudos indicam que o ácido tânico, tanino que aparece geralmente em vegetais, promoveu inibição da atividade enzimática da GST hepática, resultado em concordância com o encontrado por Krajka-Kuźniak e Baer-Dubowska (2003), que avaliaram a atividade de GST em microsoma hepático de camundongos suíços fêmeas, tratados intraperitoneamente com ácido tânico (concentração de 20 a 80mg/Kg de peso corporal). A diferença dos resultados pode estar relacionada às diferentes isoformas existentes de GST, nos diversos órgãos em que a enzima já foi encontrada. Os efeitos sobre as diferentes isoformas de GST podem ser diversos, conforme a especificidade de cada isoforma.

A caracterização das atividades enzimáticas como cinéticas Michaelinas e a linearização das curvas (gráficos de Lineweaver-Burk) permitiram o cálculo dos parâmetros cinéticos dessas

atividades. Seguindo a lógica da cinética de Michaelis-Menten, a velocidade da reação, formação de produto, tende a aumentar com a concentração de substrato. Sendo assim, a Velocidade Máxima é um parâmetro cinético que indica a concentração de substrato em todos os sítios ativos das enzimas estão ocupados. Outro parâmetro cinético importante é a Constante de Michaelis-Menten (K_M), que indica a quantidade de substrato em que a velocidade da reação é metade da velocidade máxima. Os valores encontrados para os parâmetros cinéticos da atividade de GST cerebral sob influência de cada extrato testado, estão apresentados na tabela 5. A comparação destes parâmetros permite inferir sobre o tipo de interação que ocorre entre a enzima, substrato e inibidor.

Tabela 5: Comparação dos parâmetros cinéticos da GST cerebral de rato sob influência dos diferentes extratos de pitanga e açai.

Amostra	K_M (mM)	$V_{m\acute{a}x}$ (nmol.min⁻¹.mg ptn⁻¹)
Controle	8,26 ± 2,17 ^{a, b, c}	0,204 ± 0,018 ^{a, b, c}
Bruto pitanga	7,58 ± 2,07 ^a	0,243 ± 0,0021 ^a
Bruto açai	12,0 ± 3,57 ^b	0,181 ± 0,021
Etéreo pitanga	17,37 ± 1,92	0,265 ± 0,013
Etéreo açai	13,20 ± 2,52	0,526 ± 0,040
Alcoólico pitanga	35,02 ± 8,97	0,267 ± 0,039
Alcoólico açai	83,93 ± 34,75	0,429 ± 0,128
Aquoso pitanga	27,36 ± 20,17 ^c	0,162 ± 0,063 ^b
Aquoso açai	25,49 ± 10,33	0,197 ± 0,041 ^c

a, b, c: letras sobrescritas indicam amostras estatisticamente iguais ao controle segundo teste de Tukey-Kramer, considerando $p < 0,05$.

Um fator importante da catalise enzimática e explorado comercialmente é a possibilidade de inibição da atividade enzimática. O processo inibitório pode acontecer quando substâncias se ligam à enzima livre ou ao complexo enzima-substrato ou, ainda, competem pelo sítio catalítico da enzima, no caso desses compostos se assemelharem estruturalmente ao substrato (Devlin, 2011; Lehninger et al., 2011). O resultado final é, assim como visto com os

diversos extratos utilizados neste trabalho, uma diminuição ou até mesmo eliminação completa da atividade enzimática, levando a perda da capacidade de biotransformação.

A determinação de parâmetros cinéticos permite avaliar a que tipo de inibição está sujeita a enzima, quando na presença de compostos que, teoricamente, não são seus substratos. Esses parâmetros cinéticos nos permitiram concluir que a modulação dos compostos presentes no extrato bruto de açaí, etéreo de pitanga, etéreo de açaí, alcoólico de pitanga, alcoólico de açaí, aquoso de açaí e aquoso de pitanga ocorreram como inibição mista, em que tanto K_M quanto $V_{m\acute{a}x}$ são afetados pela presença do inibidor. Nesse caso, a presença do inibidor pode afetar a ação enzimática mesmo em presença de elevadas concentrações de substrato, uma vez nesse tipo de inibição o composto considerado inibidor pode interagir tanto com a enzima livre quanto com o complexo enzima-substrato. Sendo assim, o extrato etéreo de pitanga pode prejudicar de forma bastante significativa a atividade da enzima GST cerebral de ratos, diminuindo a capacidade de biotransformação (Devlin, 2011; Lehninger et al., 2011).

Para o extrato bruto de pitanga, os parâmetros cinéticos indicam que a inibição promovida pelo *pool* de compostos presente nesse extrato, é do tipo competitiva, em que o inibidor compete com o substrato pelo sítio ativo da enzima, impedindo que haja formação do complexo enzima-substrato e consequente formação de produto. Nesses casos, o valor de K_M é aumentado, mas não há variação na $V_{m\acute{a}x}$ (Lehninger et al., 2011). Sendo assim, esses extratos quando em concentração elevada podem alterar os resultados iniciais aqui apresentados e diminuir a capacidade celular de proteção contra compostos xenobióticos e/ou promotores de estresse oxidativo.

5.6.2 GST hepática

O ensaio de atividade de GST hepática de rato, sem adição de extratos (controle) (gráfico 13) foi realizado e caracterizado quanto a cinética de Michaelis-Menten, e a partir da equação representativa do modelo cinético, calculados os parâmetros de $V_{m\acute{a}x}$ e K_M que auxiliaram na compreensão das concentrações de substrato necessárias para cada ensaio. Com auxílio do gráfico de Lineweaver-Burk foi possível determinar como parâmetros da cinética enzimática o valor de 88,70 mM para K_M e, aproximadamente, 0,269 nmol.min⁻¹.mg⁻¹ para $V_{m\acute{a}x}$. Assim como realizado para a GST cerebral, a caracterização da atividade permitiu melhor avaliação da influência dos extratos de açaí e pitanga sobre a atividade enzimática e adequação do uso desses extratos.

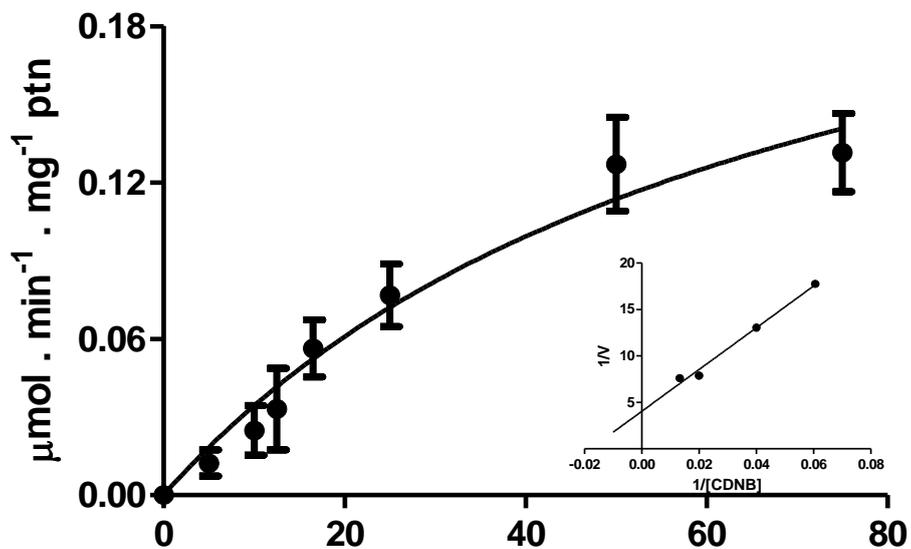


Gráfico 13: Curva de Michaelis-Mentes para atividade controle de GST citosólica hepática de rato, utilizando 1-cloro 2,4-dinitrobenzeno (CDNB) como substrato.

Assim como para a enzima GST cerebral, os resultados iniciais encontrados para a atividade da GST Geral com a ação dos extratos açai e pitanga permitiram iniciar o estudo para entendimento da forma como ocorre a modelação da enzima GST Geral hepática por, utilizando diferentes concentrações de substrato. As concentrações de substratos testadas foram as mesmas dos ensaios anteriores em que foi observada a ação dos extratos sobre a enzima GST cerebral. O gráfico 14 ilustra as atividades da GST citosólica hepática de ratos em ensaios realizados com uso dos extratos brutos de pitanga (A) e de açai (B).

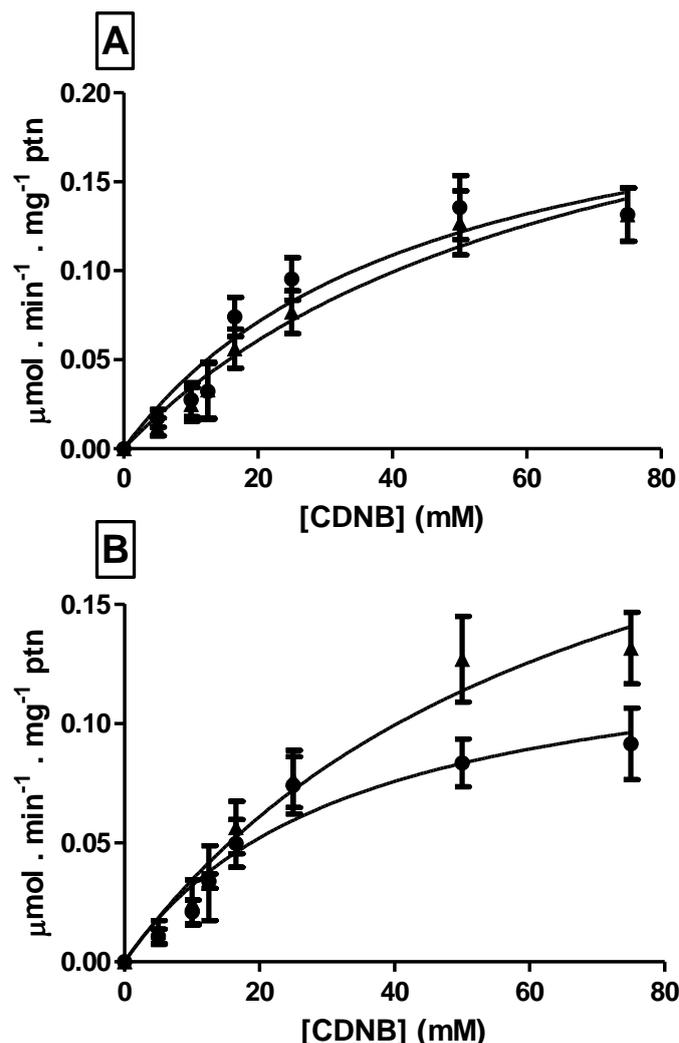


Gráfico 14: Efeito dos extratos brutos de pitanga (A) e açai (B) sobre as curvas de Michaelis-Menten para GST hepática de rato utilizando CDNB como substrato. (•) Extratos; (▲) Controle.

A presença do extrato bruto de pitanga, mostrou pouca influência sobre essa atividade enzimática, não havendo diferença estatisticamente significativa entre os resultados de atividades encontrados no ensaio controle e aqueles obtidos na presença do extrato. Já utilização do extrato bruto de açai nos ensaios de atividade da GST hepática mostrou uma inibição significativa na maioria das concentrações de substrato utilizadas (37%, 50% e 7%, nas concentrações de 10; 12,5 e 16,5 mM, respectivamente). Assim como mencionado anteriormente, esse comportamento pode estar relacionado com os compostos bioativos presentes nos extratos e, aqui, determinados na prospecção fitoquímica; e também pelas isoformas da enzima GST, que assim como para a GST cerebral, reconhecem o composto CDNB como substrato.

As curvas de Michaelis-Menten para o ensaio controle e para aqueles realizados na presença do extrato bruto de pitanga, seguem a mesma trajetória de crescimento, chegando a valor não estatisticamente significativo de diferença, o que confirma a menor capacidade de modulação desse extrato sobre a enzima hepática geral. Já para o extrato bruto de açaí, as velocidades máximas de reação diferem de forma a confirmar a capacidade inibitória do extrato, quando comparado ao ensaio controle. Essa avaliação cinética da reação permitiu a elaboração de gráfico de Lineweaver-Burk que complementa o estudo da cinética enzimática (gráfico 15).

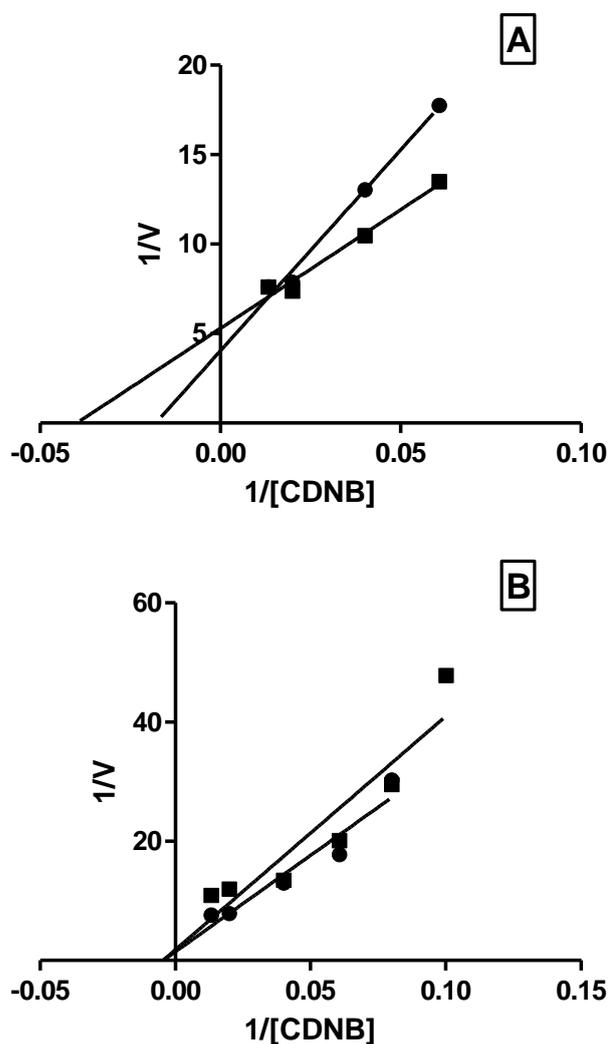


Gráfico 15. Comparação dos gráficos de Lineweaver-Burk para a GST hepática. Influência dos extratos brutos de pitanga (A) e açaí (B). (●) Extratos; (■) Controle.

Os resultados para os ensaios tanto com extrato bruto de pitanga quanto de açaí indicam que a composição desses extratos contém substâncias bioativas, como taninos, capazes de alterar a atividade enzimática.

Em continuação ao estudo da influência dos extratos de pitanga e açaí na atividade da enzima GST hepática de ratos, o gráfico 16 ilustra as curvas de Michaelis-Menten obtidas nos ensaios com uso dos extratos etéreos de açaí (B) e de pitanga (A), e o gráfico 17 mostra a representação de Lineweaver-Burk para esses ensaios.

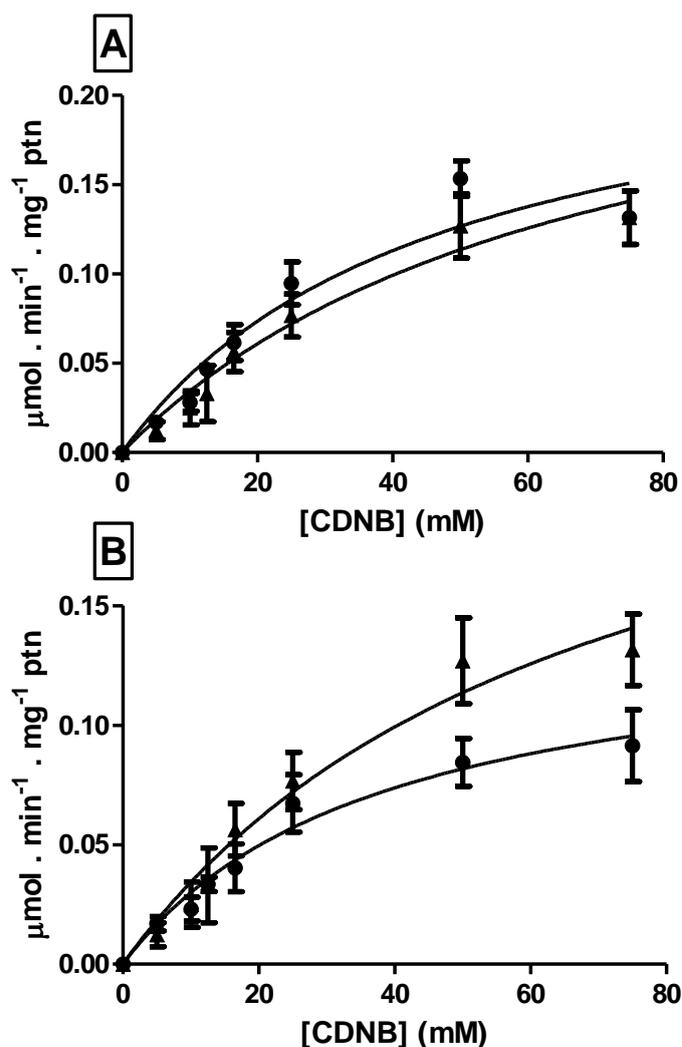


Gráfico 16: Efeito dos extratos etéreos de pitanga (A) e açaí (B) sobre as curvas de Michaelis-Menten para GST hepática de rato utilizando CDNB como substrato. (●) Extratos; (▲) Controle.

A presença do extrato etéreo de açaí nos ensaios de atividade da enzima GST Geral hepática de ratos promoveu alteração significativa dessa atividade. Foi possível, determinar a porcentagem de inibição dessa atividade, muito expressiva nas concentrações de 16,5 e 50mM de substrato, 56% e 33,5%, respectivamente. O estudo da cinética Mikaeliana da utilização

deste extrato indica que, a velocidade máxima a que chegam os ensaios corresponde a um perfil de ativação proporcionada pelo uso do extrato etéreo de açaí.

Para os ensaios realizados sob influência do extrato etéreo de pitanga foi possível observar aumento da atividade enzimática nas concentrações de 25 e 50 mM. Porém, na maioria das concentrações de substrato avaliadas, a diferença observada não foi considerada estatisticamente significativa, de acordo com o teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer. Na concentração de 25mM, o aumento da atividade foi de 23,5%.

O gráfico de Lineweaver-Burk para esses extratos foi utilizado na determinação dos parâmetros cinéticos discutidos posteriormente, de forma a melhor conhecer como a cinética enzimática se desenvolve na presença dos referidos extratos.

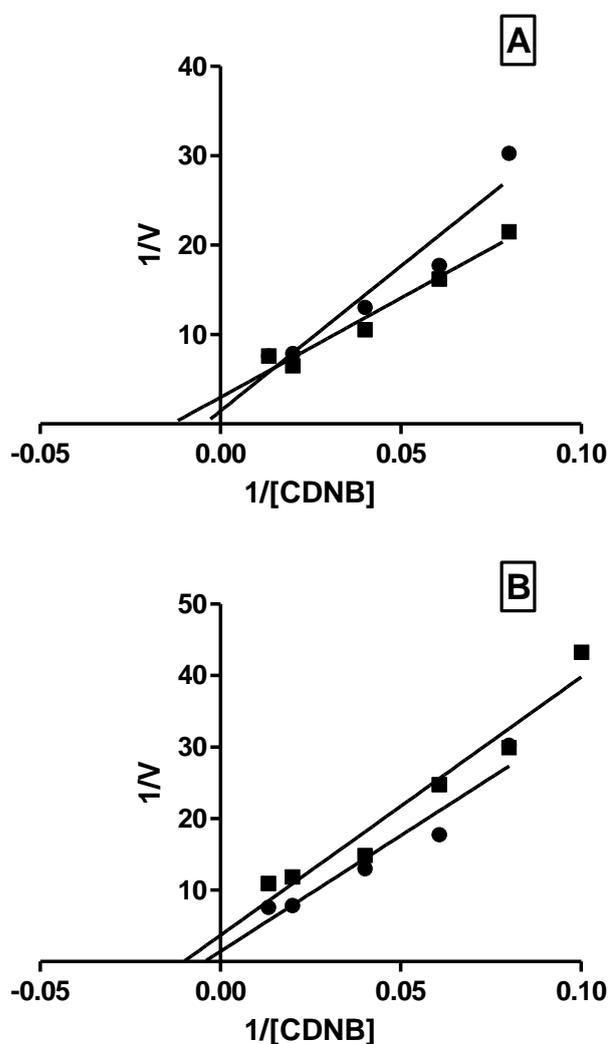


Gráfico 17. Comparação dos gráficos de Lineweaver-Burk para a GST hepática. Influência dos extratos etéreos de pitanga (A) e açaí (B). (•) Extratos; (■) Controle.

Assim como observado anteriormente com a GST cerebral de ratos, o uso dos extratos favoreceu a alteração da atividade enzimática hepática, mostrando que os compostos bioativos presentes são responsáveis pela modulação das duas enzimas. Taninos encontrados nos extratos (determinados na prospecção fitoquímica), como já mencionado, possuem atividade biológica que pode ser responsável pela inibição enzimática observada nos ensaios (Krajka-Kuźniak e Baer-Dubowska, 2003).

Em continuação à análise do efeito da adição de extratos de compostos bioativos sobre a atividade da enzima GST hepática de ratos, os gráficos 18 e 19 ilustram os gráficos de Michaelis-Menten e Lineweaver-Burk, respectivamente, como resultados encontrados nos ensaios utilizando o extrato alcoólico de açaí e de pitanga.

A presença do extrato alcoólico de açaí permitiu observar a capacidade modulatória sobre a atividade da enzima GST Geral hepática de ratos. Nas concentrações de 16,5, 25 e 50 mM de substrato, foram encontradas diferenças estatisticamente significativas (segundo o teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer) entre os ensaios controle e contendo o extrato alcoólico de açaí, chegando a uma inibição de até 44%.

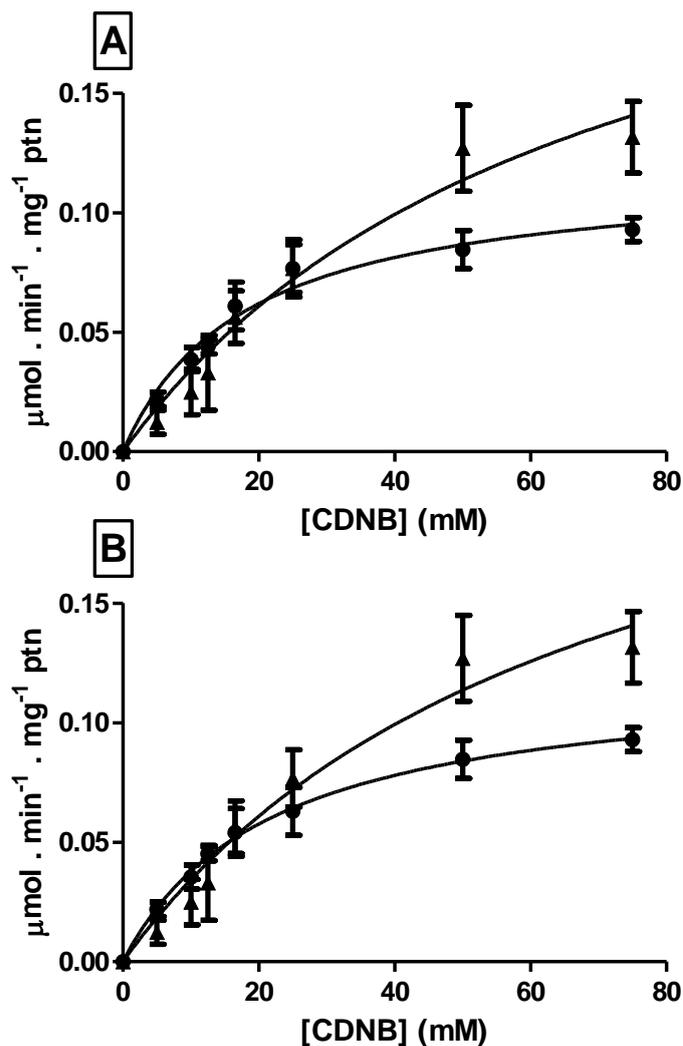


Gráfico 18: Efeito dos extratos alcoólico de pitanga (A) e açaí (B) sobre as curvas de Michaelis-Menten para GST hepática de rato utilizando CDNB como substrato. (•) Extratos; (▲) Controle.

Para o extrato alcoólico de pitanga, no ensaio realizado com concentração de substrato de 25 mM de substrato, foi possível perceber um pequeno aumento da atividade enzimática de aproximadamente 19%. Este aumento pode estar relacionado com o alcance da atividade ótima da enzima. Apesar disso, nas concentrações de 12,5, 16,5 e 50 mM de substrato, houve diminuição da atividade enzimática de 33,5%, 24% e 58%, respectivamente.

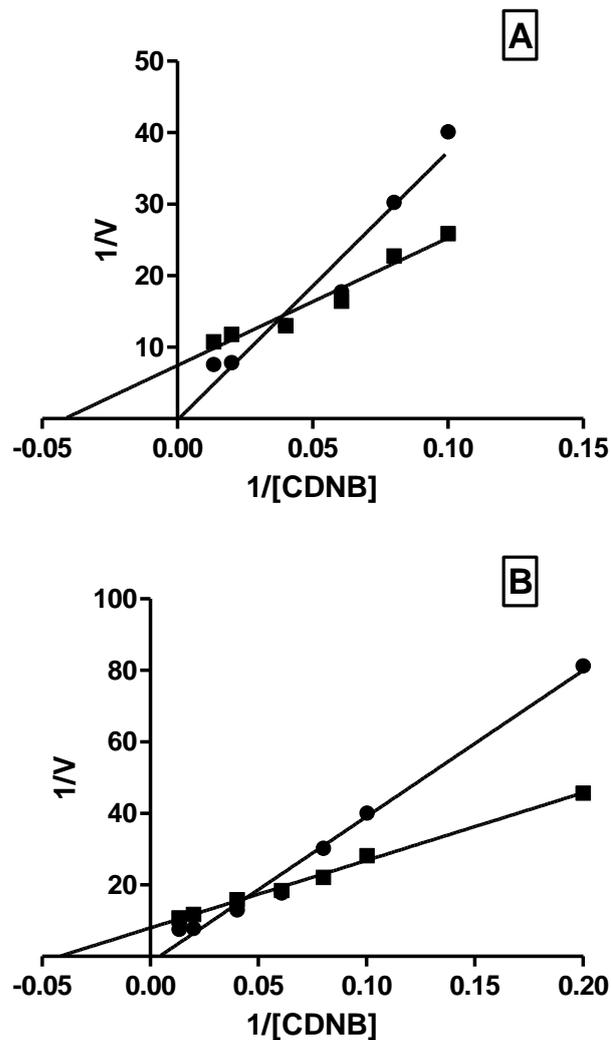


Gráfico 19: Comparação dos gráficos de Lineweaver-Burk para a GST hepática. Influência dos extratos alcoólicos de pitanga (A) e açaí (B). (●) Extratos; (■) Controle.

Os resultados encontrados confirmam a capacidade modulatória do extrato sobre a atividade da enzima GST Geral hepática de ratos, sendo essa capacidade possivelmente relacionada com a composição dos extratos, como já mencionado anteriormente. Para melhor compreensão dessa capacidade modulatória, os dados de K_M e $V_{m\acute{a}x}$ foram obtidos e serão melhor discutidos, posteriormente.

Por fim, o gráfico 20 mostra os resultados encontrados nos ensaios utilizando extratos aquosos de açaí e de pitanga e sua influência na atividade da GST Geral hepática de ratos, caracterizada por curva de Michaelis-Menten.

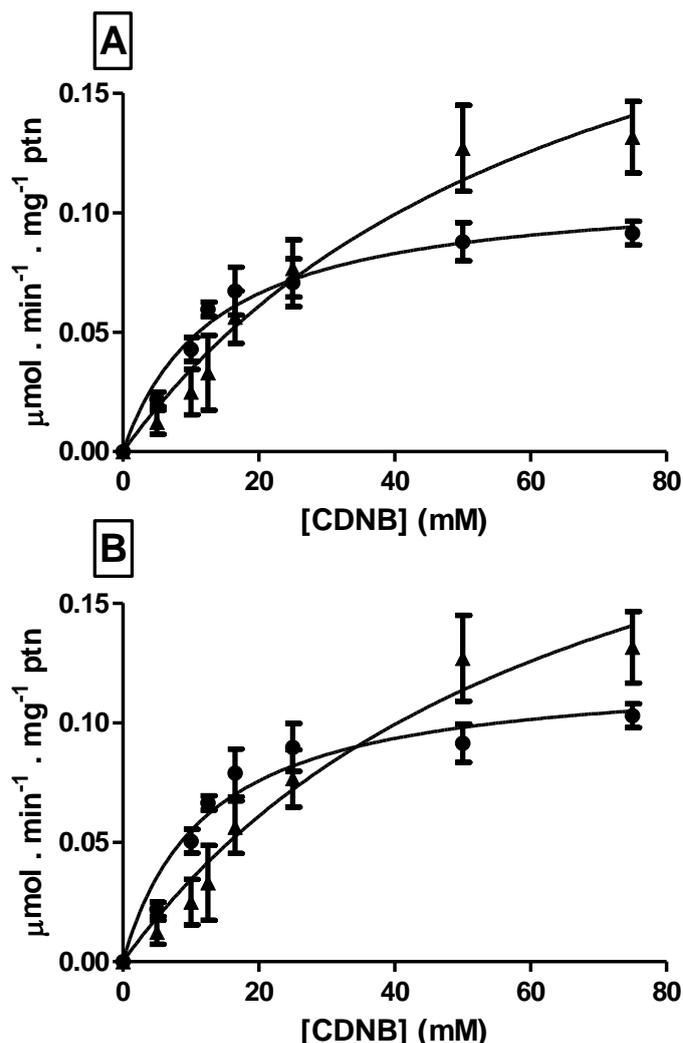


Gráfico 20: Efeito dos extratos aquosos de pitanga (A) e açaí (B) sobre as curvas de Michaelis-Menten para GST hepática de rato utilizando CDNB como substrato. (•) Extratos; (▲) Controle.

O extrato aquoso de açaí (gráfico 20B) promoveu, na maioria das concentrações de substrato testadas, modificações na atividade que não foram consideradas estatisticamente significativas quando comparada a atividade controle (ausência de extrato). No entanto, não é possível dizer que o extrato aquoso de açaí não possui compostos com capacidade modulatória sobre a GST hepática de ratos, já a partir da concentração de 25 mM houve uma redução de aproximadamente 59% na atividade enzimática.

Para o extrato aquoso de pitanga, em praticamente todas as concentrações utilizadas foi possível observar alterações na atividade que pudessem ser consideradas estatisticamente significativas, quando comparadas ao controle, apenas em concentração de substrato superior a 25mM. Situações em que houve redução da atividade enzimática inferiores a 10%.

A diferença observada nas curvas de Michaelis-Menten indica que, nas concentrações de substrato testadas, há características de que os dois extratos modulam a atividade enzimática de forma negativa. Porém, o estudo cinético também indica que as concentrações de substrato para o ensaio controle não foram suficientes para alcançar valores constantes de atividade, não havendo para o ensaio controle de GST Geral hepática uma condição de saturação.

Ainda sobre a caracterização da atividade enzimática, foram construídos os gráficos de Lineweaver-Burk (gráfico 21) para complementação da caracterização da cinética enzimática, para os extratos aquosos testados. Os parâmetros cinéticos obtidos a partir das informações são discutidos mais a frente, em comparação aos demais resultados.

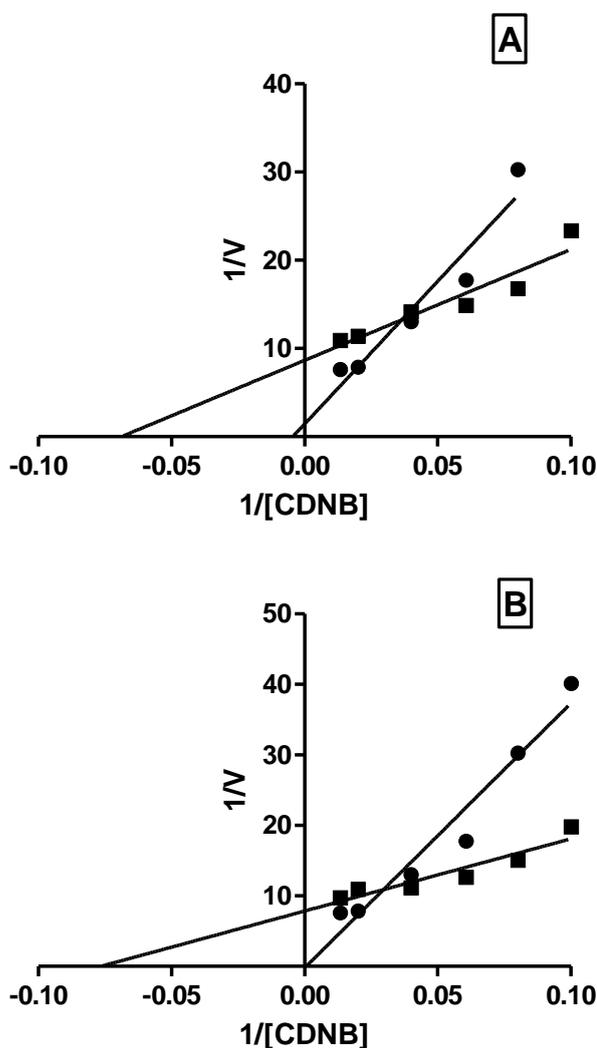


Gráfico 21. Comparação dos gráficos de Lineweaver-Burk para a GST hepática. Influência dos extratos aquosos de pitanga (A) e açaí (B). (●) Extratos; (■) Controle.

De acordo com a prospecção fitoquímica realizada e a análise dos resultados anteriores, os compostos bioativos encontrados no extrato aquoso de pitanga são moduladores da GST cerebral, e também podem ser considerados moduladores da GST citosólica hepática, de forma negativa. Assim como realizado para a enzima GST cerebral, os parâmetros cinéticos na enzima GST hepática foram determinados a fim de melhor caracterizar a atividade enzimática. Os valores encontrados para os parâmetros cinéticos da atividade de GST hepática sob influência de cada extrato testado estão apresentados na tabela 6.

Tabela 6: Comparação dos parâmetros cinéticos da GST hepática de rato sob influência dos diferentes extratos de pitanga e açaí.

Amostra	K_M (mM)	V_{máx} (nmol.min⁻¹.mg ptn⁻¹)
Controle	68,28 ± 23,02 ^{a,b,c}	0,269 ± 0,054 ^{a, b}
Bruto pitanga	44,66 ± 18,98 ^a	0,230 ± 0,052 ^a
Bruto açaí	33,61 ± 11,54	0,139 ± 0,023
Etéreo pitanga	46,30 ± 20,89 ^b	0,244 ± 0,059 ^b
Etéreo açaí	37,94 ± 8,91 ^c	0,144 ± 0,017
Alcoólico pitanga	18,11 ± 3,12	0,118 ± 0,080
Alcoólico açaí	21,92 ± 1,31	0,121 ± 0,003
Aquoso pitanga	13,57 ± 2,54	0,111 ± 0,007
Aquoso açaí	12,27 ± 3,20	0,122 ± 0,011

a, b, c: letras sobrescritas indicam amostras estatisticamente iguais ao segundo teste de Tukey-Kramer, considerando $p < 0,05$.

Os parâmetros cinéticos descritos acima, permitiram determinar de forma mais clara, o tipo de inibição enzimática passível de ocorrer com a enzimas GST Geral hepática. A análise desses parâmetros indica que a inibição promovida pelos extratos bruto de açaí, etéreo de açaí, alcoólicos de pitanga e de açaí, e aquosos de pitanga e de açaí, é do tipo mista. Como já mencionado, nesse processo de inibição, a ligação do inibidor a um sítio diferente daquele em que se liga o substrato impede que haja reversão do processo inibitório pelo aumento da

concentração de substrato, promovendo redução da concentração de enzima livre e consequentemente diminuição da velocidade de reação (Marques e Yamanaka, 2008).

Já o extrato bruto de pitanga, aparentemente, promove inibição do tipo competitiva, competindo com o substrato pelo sítio ativo da enzima, alterando o valor de K_M e indicando necessidade de maior concentração de substrato para alcançar o valor relativo à metade da velocidade máxima.

Considerando os parâmetros determinados para o extrato etéreo de pitanga, houve a indicação de que esse extrato não tende a promover inibição enzimática. Tal resultado é corroborado pela curva de Michaelis-Mentes já apresentada, que, em toda sua extensão, não houve diferença estatisticamente significativa entre os valores de atividade do ensaio controle, comparado ao ensaio na presença do referido extrato.

5.6.3 GST Geral – Extrato aquoso de QuEChERS de pitanga

Durante a obtenção do extrato etéreo de pitanga utilizando a metodologia QuEChER adaptada, foi possível separar uma fase aquosa, apresentando sal dissolvido. Essa fase, chamada aqui de “extrato aquoso de QuEChER de pitanga”, também foi testada nos ensaios de atividade enzimática, uma vez que sua característica mais polar possivelmente permitiu a extração de compostos diferentes daqueles encontrados no extrato etéreo. Os testes foram realizados com as GST cerebral e hepática de ratos e os resultados ilustrados nas figuras a seguir.

O resultado obtido no teste da atividade de GST hepática de ratos, na presença deste extrato, ilustrado no gráfico 22A, foi realizado na concentração de 100 mM de substrato e indicou um aumento na atividade da enzima de aproximadamente 8%, quando esta atividade é comparada a um ensaio controle realizado na ausência de extratos, porém essa diferença não foi considerada estatisticamente significativa. Comparando este resultado ao obtido quando utilizado o extrato etéreo de pitanga na avaliação dos efeitos na atividade da GST, foi possível perceber que a ativação causada pelo extrato aquoso aqui referido é menor que a proporcionada pelo extrato etéreo. Isso indica que os compostos presentes nas duas fases de extração são diferentes e agem de forma diferenciada sobre a enzima.

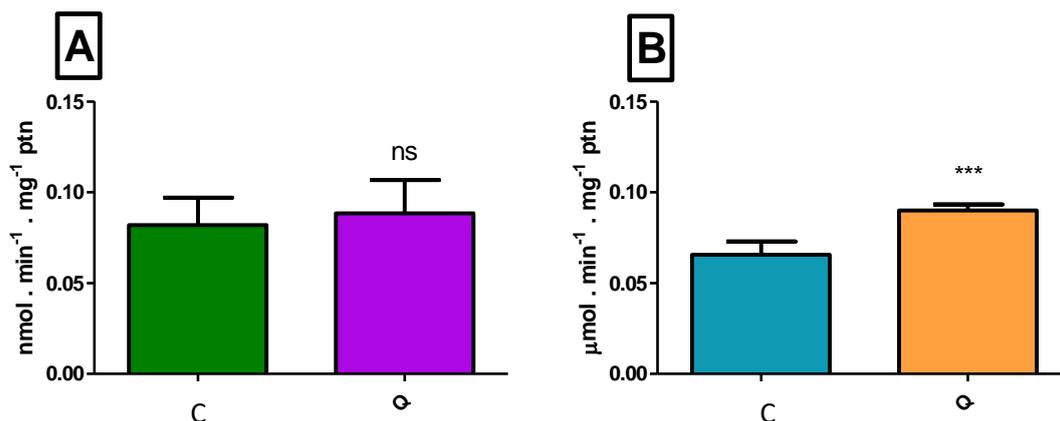


Gráfico 22: Atividade de GST geral hepática (A) e cerebral (B) de rato com adição dos extratos aquosos de pitanga, obtidos a partir do método QuEChERS (Q). As atividades das amostras contendo extrato foram comparadas ao controle (C) estatisticamente por ANOVA segundo o teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer. (***) Apresenta diferença estatisticamente significativa do controle. (ns) Não apresenta diferença estatística do controle.

Na presença do extrato, a atividade da GST cerebral de ratos foi aumentada em aproximadamente 12%, indicando diferença entre as enzimas hepática e cerebral e, conseqüentemente, diferença na modulação promovida pelo extrato, para a concentração de 100mM de substrato. De acordo com o teste de prospecção fitoquímica, o extrato aquoso de QuEChER de pitanga possui em sua composição carboidratos e aminoácidos não proteicos, não contendo, portanto, os compostos tidos até aqui como os possíveis responsáveis pelas modulações causadas pelos extratos estudados. Porém, a própria característica físico-química do extrato pode ser responsável pela inibição observada.

Os resultados encontrados nos diversos testes realizados, tanto com GST hepática quanto com a cerebral, indicaram que os extratos obtidos de açaí e pitanga são capazes de alterar a atividade natural da enzima, aumentando-a ou diminuindo-a, de acordo com o tipo de extrato e o local em que a enzima atua, em diversas concentrações de substrato não específico para esta enzima. Estes resultados permitem elaboração de caminhos para utilização dos extratos de forma a aumentar ou diminuir a permanência de um fármaco ou outro composto xenobiótico no organismo.

5.6.4 GST *mu*

A enzima GST possui diversas isoformas distribuídas pelos diversos órgãos do corpo onde são encontradas. As isoenzimas de GST compreendem as classes alfa, mu, pi, teta, kappa,

sigma, zeta, e ômega, sendo pi e mu as mais abundantes (Rao et al., 2014). Os genes GSTM1 ocorrem devido a uma deleção no gene, o que resulta em proteína específica com perda completa da funcionalidade e esses genótipos nulos (com total ausência de proteína) já foram associados com risco de alteração de uma variedade de condições, incluindo o câncer, doenças cardiovasculares e doença respiratória (Karam et al., 2012; Sireesha et al., 2012). Segundo estudos, indivíduos que possuem alelo GSTM1 nulo possuem menor resistência à fármacos antineoplásicos utilizados no tratamento quimioterápico de câncer de ovário, portanto, aumento da atividade desta isoforma de GST pode comprometer a eficácia de tratamentos (Takeda et al., 2011).

A atividade da GSTmu é determinada a partir do uso de substrato específico dicloronitrobenzeno, diferente do substrato da GST geral (1-cloro-2,4-dinitrobenzeno). A atividade da isoforma GSTmu já foi encontrada, de acordo com a literatura, em fígado e em cérebro humanos, além de outros tecidos (Hayes e Pulford, 1995).

Acredita-se que GSTmu cerebrais estejam envolvidas na desintoxicação de orto quinonas produzidas no metabolismo de catecolaminas, como dopamina, adrenalina e noradrenalina (figura 17). Estes metabolitos podem estar envolvidos em distúrbios neurodegenerativos como doença de Parkinson e Esquizofrenia. Dessa forma, o aumento da atividade de GSTmu pode aumentar a capacidade celular de biotransformação e consequente eliminação desses compostos (Andreazza et al., 2006).

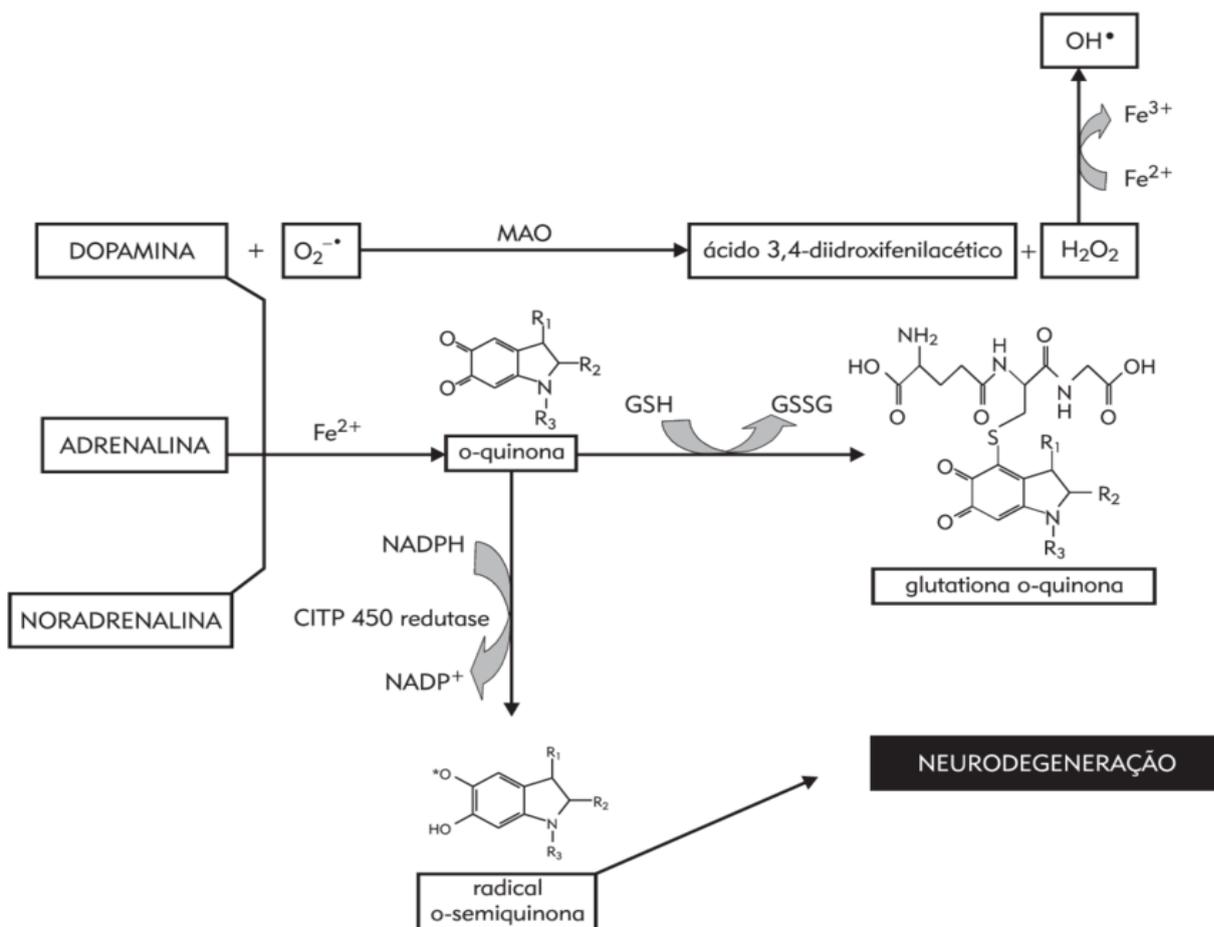


Figura 17: Possíveis vias de oxidação das catecolaminas-OH-radical-hidroxi-la-O (Andreazza et al., 2006).

O gráfico 23 ilustra a atividade da GSTmu cerebral e hepática de ratos (controle) e a influência da utilização do extrato aquoso de açaí sobre a atividade destas enzimas, para determinação da presença da isoforma e avaliação de uma possível modulação da atividade enzimática pelos componentes bioativos desses extratos. O ensaio de atividade controle da GSTmu cerebral e hepática realizados mostraram que, para as atividades específicas alcançadas, enzima hepática possui uma atividade que é cerca de 1,5 vezes maior que a atividade da enzima cerebral.

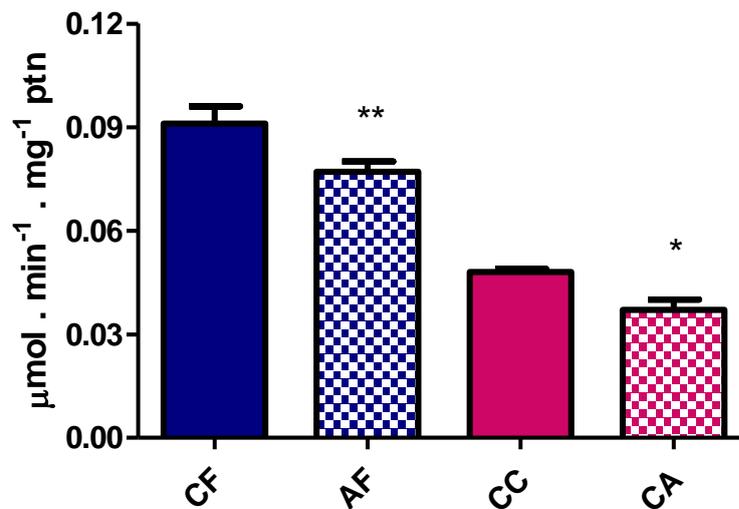


Gráfico 23: Atividade de GST *mu* de rato com adição do extrato aquoso de açaí. Foi utilizado como substrato o DCNB (1,2- Dicloro-4-nitrobenzeno) 80 mM. Comparação entre os diferentes tecidos: controle fígado (CF), extrato aquoso em fígado (AF), controle cerebral (CC), extrato aquoso em cérebro (CA). As atividades das amostras contendo extrato foram comparadas com o controle estatisticamente por ANOVA segundo o teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer.

Os resultados encontrados indicam a presença da isoforma GST μ em cérebro e em fígado de ratos e a modulação proporcionada pelo uso do extrato aquoso de açaí. Os resultados de atividade indicaram que, na presença do extrato aquoso de açaí, as concentrações de substrato utilizadas alcançaram a atividade específica de 0,0365 mmol.min⁻¹.mg⁻¹ para a enzima cerebral, e de 0,0336 mmol.min⁻¹.mg⁻¹ para a enzima hepática. O uso do extrato promoveu uma redução na atividade da isoforma GST μ em aproximadamente 23% e 15%, para as enzimas cerebral e hepática, respectivamente.

Com a confirmação da presença da isoforma da enzima GST testada, os demais extratos obtidos (bruto, etéreo e aquoso de QuEChERS de pitanga) também foram utilizados em ensaios enzimáticos e avaliados quanto a capacidade de modulação da atividade da isoforma GST μ cerebral e hepática de ratos.

Os resultados encontrados nos testes anteriores deste trabalho foram utilizados como base para determinar os extratos utilizados nos testes com diferentes concentrações de substrato na atividade da enzima GST μ hepática e cerebral de ratos. Os extratos utilizados foram aqueles que influenciaram positivamente a enzima GST geral ou que tiveram menor influência negativa, a fim de determinar a ação desses extratos e verificar as melhores possibilidades de

utilização dos extratos para contribuir de forma eficaz com o processo de desintoxicação do organismo.

Em outras concentrações de substrato testadas, os compostos presentes no extrato aquoso de açaí foram capazes de influenciar a atividade enzimática aumentando-a em, aproximadamente, 90%, quando comparadas ao ensaio controle, fazendo deste extrato interessante no que diz respeito a diminuição da concentração de compostos xenobióticos no organismo, além da possibilidade de diminuição de estresse oxidativo. Segundo estudo relatado por Possamai (2009), a atividade da GST μ de células sanguíneas aumentou em trabalhadores expostos a altas concentrações de metais pesados, o que indica a capacidade de aumento de atividade quando expostas a determinadas condições de reação.

Como mencionado anteriormente, a prospecção fitoquímica realizada com os extratos indicou a presença de taninos no extrato aquoso de açaí, podendo ser este composto responsável pela redução da atividade enzimática, de acordo com pesquisas reportadas na literatura (Krajka-Kuźniak e Baer-Dubowska, 2003). Os resultados obtidos com o mesmo extrato nos ensaios de atividade enzimática hepática indicaram pouca capacidade de modulação pelo extrato aquoso de açaí, havendo pequena inibição (aproximadamente 15%), na menor concentração de substrato testada. Esse resultado indica a diferença entre as isoformas da enzima GST encontradas nos diversos tecidos do corpo, uma vez que reagem de forma diferente quando submetidas aos mesmos compostos (Fritz-Wolf et al., 2003).

As mesmas concentrações de substrato foram repetidas nos ensaios de atividade de GST μ cerebral e hepática na presença do extrato etéreo de açaí e os resultados aparecem ilustrados no gráfico 24, em comparação com ensaio controle. Foi possível observar diminuição da atividade enzimática relevante com 80 mM de concentração de substrato, em que a atividade enzimática foi reduzida totalmente tanto para a enzima cerebral quanto hepática. Este resultado mostra com clareza a capacidade modulatória dos compostos presentes no extrato utilizado e a diferença das características da isoforma μ que potencializaram a redução da atividade, quando comparada a atividade controle.

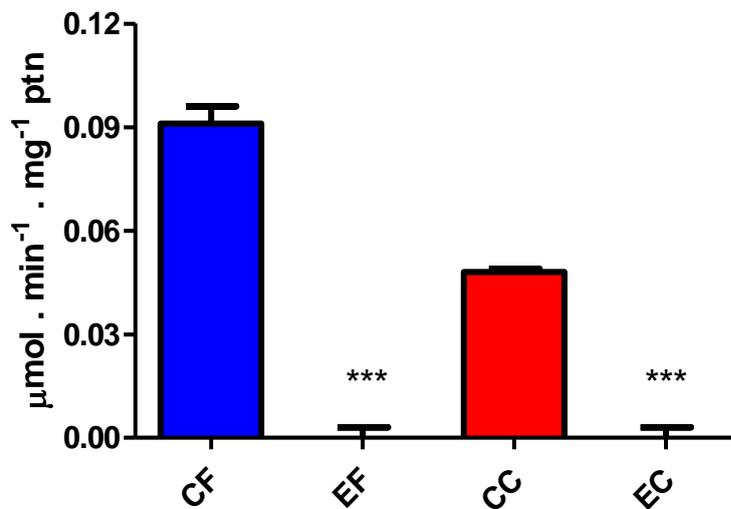


Gráfico 24: Atividade de GST μ de rato com adição do extrato etéreo de açaí. Substrato DCNB (1,2- Dicloro-4-nitrobenzeno) 80 mM. Comparação entre os diferentes tecidos: controle hepático (CF), extrato etéreo em fígado (EF), controle cerebral (CC), extrato etéreo em cérebro (C). As atividades das amostras contendo extrato foram comparadas com o controle estatisticamente por ANOVA segundo o teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer.

Para a enzima cerebral, o aumento da concentração de substrato (150mM) diminui a atividade no ensaio controle, porém mostra influência positiva quando associada ao extrato etéreo de açaí, levando a um aumento de atividade de, aproximadamente, 700%. Assim como já relatado anteriormente, o extrato etéreo de açaí possui em sua composição de compostos bioativos, como taninos, que podem ser responsáveis por esse aumento de atividade quando aumentada a concentração de substrato.

O extrato etéreo de açaí se mostra bastante produtivo em termos de resultado de modulação enzimática tanto para GST não específica quanto para específica, levando em consideração a facilidade e economia possibilitadas pelo novo método de extração. GSTs estão envolvidas no processo de resistência a fármacos antineoplásicos, aumentando a eliminação destes compostos e diminuindo seu tempo de interação e ação celular (Allocati et al., 2018), diminuindo a eficácia de tratamentos. A associação deste resultado com o encontrado para a atividade da GST não específica torna o extrato etéreo de açaí importante aliado na diminuição da atividade enzimática, reduzindo a capacidade celular de eliminação de compostos com consequente aumento do tempo de permanência de compostos xenobióticos importantes, como fármacos, no organismo.

O extrato bruto de pitanga foi testado para verificar sua capacidade de modulação sobre a atividade da GST específica cerebral e hepática. Os resultados encontrados nos ensaios enzimáticos e a comparação desses com os resultados do ensaio controle estão ilustrados no gráfico 25.

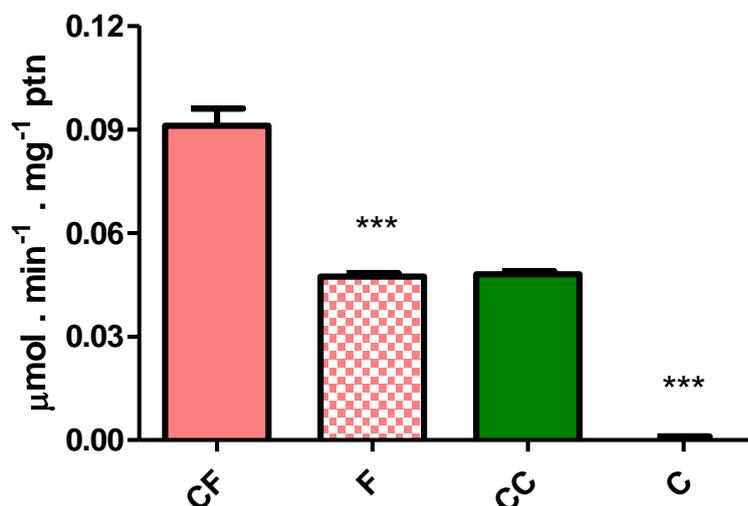


Gráfico 25: Atividade de GST *mu* de rato com adição do extrato bruto de pitanga. Foi utilizado como substrato o DCNB (1,2- Dicloro-4-nitrobenzeno) 80 mM. Comparação entre os diferentes tecidos: controle hepático (CF), extrato bruto em fígado (F), controle cerebral (CC), extrato bruto em cérebro (C). As atividades das amostras contendo extrato foram comparadas com o controle estatisticamente por ANOVA segundo o teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer.

De acordo com os resultados, na mínima concentração de substrato testada, houve inibição de 100% da atividade enzimática cerebral. Esse resultado foi alterado com o aumento da concentração de substrato, até que na máxima concentração testada, houve aumento da atividade enzimática (aproximadamente 48%) na presença do extrato bruto de pitanga. Assim como observado com o extrato etéreo de açaí, para o extrato bruto de pitanga diferença de modulação sobre a enzima específica é importante para avaliar até que ponto a modulação ocorre de forma negativa e a partir de que ponto ela ocorre aumentando a atividade enzimática, a fim de que possam ser utilizados de forma devida.

Para a enzima hepática, sob ação do extrato bruto de pitanga, foi possível observar aumento da atividade na maior concentração de substrato testada, chegando a ter um aumento de 60% (concentração de 150 mM de substrato). Na menor concentração de substrato, houve

redução (aproximadamente, 50%), porém não tão expressiva quanto aquela observada para a enzima cerebral.

O aumento da atividade da enzima GST não específica promovido pelo uso do extrato aquoso de QuEChER de pitanga, impulsionou a continuidade dos ensaios de atividade de GST específica utilizando este extrato e os resultados obtidos nos ensaios estão ilustrados no gráfico 26.

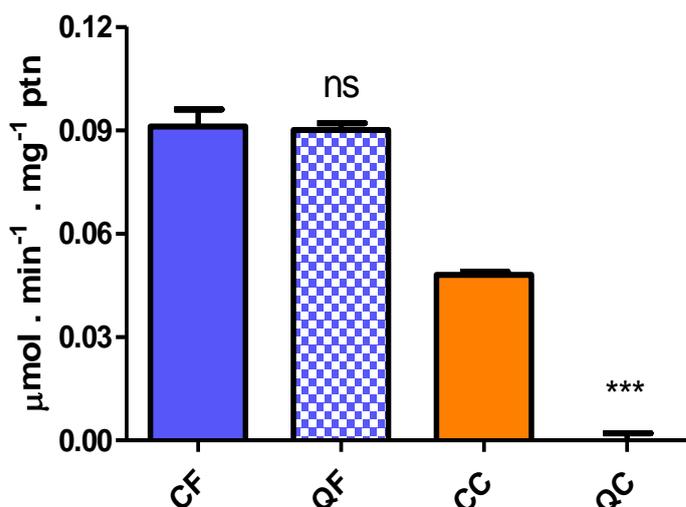


Gráfico 26: Atividade de GST *mu* de rato com adição do extrato aquoso de pitanga extraído pelo método de QuEChERS. Foi utilizado como substrato o DCNB (1,2- Dicloro-4-nitrobenzeno) 80 mM. Foi realizada a comparação entre os diferentes tecidos: controle hepático (CF), extrato aquoso em fígado (QF), controle cerebral (CC), extrato aquoso em cérebro (QC). As atividades das amostras contendo extrato foram comparadas com o controle estatisticamente por ANOVA segundo o teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer.

De acordo com os resultados obtidos, a enzima GST μ cerebral não apresentou atividade com concentração de substrato mínima testada – 0,007mM-, na presença do extrato aquoso de QuEChERS de pitanga (gráfico 26). O aumento da concentração de substrato promoveu redução da atividade enzimática nos ensaios controle, seguida por um aumento da atividade em presença de extrato. Em concentrações mais elevadas de substrato (0,035mM), a atividade enzimática foi elevada em cerca de 62%.

Apesar da forte modulação provocada pelo extrato aquoso de QuEChER de pitanga sobre a atividade da enzima GST, sua utilização é facilitada para a enzima não específica, uma vez que a inibição observada segue uma variação linear, que permite prever resultados de forma mais clara e objetiva. Já a utilização do extrato para modulação da enzima específica é

prejudicada pela expressiva variação das atividades nas diferentes concentrações de substrato testadas, dificultando previsão de ações e resultados.

O mesmo extrato foi utilizado em teste com a enzima específica hepática e os resultados indicam que a utilização do extrato permitiu um alcance da velocidade máxima de reação de 0,0402mmol/min/mg, para as concentrações de substrato testadas. Os ensaios na enzima GST μ hepática utilizando extrato aquoso de QuEChER de pitanga apresentaram resultados não considerados significativamente diferentes do controle na menor concentração de substrato testada. Com o aumento da concentração de substrato houve aumento da atividade na presença do extrato (aproximadamente 62%).

Apesar do extrato encontrado ser novo e inesperado no início da pesquisa realizada, apresentou resultados importantes e promissores quando o foco é a desintoxicação ou até mesmo diminuição da concentração de espécies reativas de oxigênio, uma vez que a inibição da atividade enzimática foi percebida nas amostras cerebral, das enzimas específica e não específicas. Confirmando mais uma vez as diferentes características apresentadas pelas isoformas enzimáticas, os resultados encontrados para atividade da enzima específica hepática foram diferentes daqueles observados na enzima cerebral, tanto para os ensaios de atividade controle quanto para aqueles observados na presença do extrato.

Segundo Fritz-Wolf et al. (2003), a semelhança de sequência de aminoácidos entre as classes de GST é muito menor (20 a 30% de identidade) do que entre os membros da mesma classe (75% de resíduos idênticos), o que pode explicar a diferença nos resultados. Trabalho publicado por Fritz-Wolf et al. (2003) mostra diferenças estruturais entre GST não específica e GST μ do parasita causador da malária *Plasmodium falciparum*, através de determinação por método que emprega raios-x (figura 18).

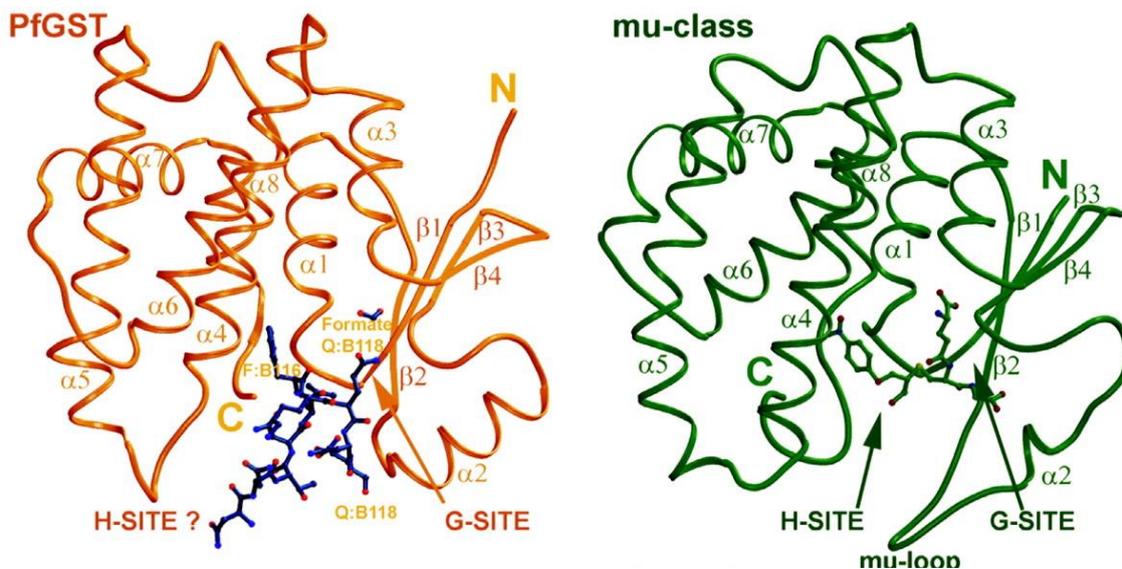


Figura 18: Comparação estrutural entre enzimas GST e sua isoforma GSTmu obtidas de *Plasmodium falciparum*, através de determinação por método raio-x (Fritz-Wolf et al., 2003).

5.7 EFEITO DOS EXTRATOS DE AÇAÍ E PITANGA SOBRE A ATIVIDADE DE CATALASE

A enzima catalase parece ser o principal regulador celular do metabolismo de peróxido de hidrogênio, exercendo uma dupla função: decomposição de H_2O_2 , resultando em H_2O e O_2 (atividade catalítica), e oxidação de doadores Hidrogênio, por exemplo, metanol, etanol, ácido fórmico, fenóis, com o consumo de 1 mol de peróxido (Aebi, 1984; Bai et al., 1999).

Segundo Bai et al. (1999), a enzima catalase está presente apenas ou primariamente na fração peroxissômica das células de mamíferos. Porém, em estudo realizado pelo mesmo autor, foi possível constatar aumento da expressão de catalase citosólica e mitocondrial em células hepáticas humanas. Portanto, foram realizados ensaios enzimáticos para determinar a atividade de catalase citosólica cerebral e hepática de ratos. Os ensaios de atividade foram realizados com extratos bioativos testados neste trabalho e atividade controle (sem adição de extrato), para verificação da influência desses extratos sobre a atividade enzimática e, conseqüentemente, sobre a capacidade celular de diminuir a concentração de espécies reativas de oxigênio, principalmente peróxido de hidrogênio.

Para que todos os ensaios fossem realizados com a quantidade adequada de enzima, foram produzidas curvas de proteínas. A construção da curva de proteína para a fração solúvel citosólica cerebral de ratos permitiu determinar a quantidade de fração solúvel utilizada nos

diversos ensaios de atividade. Para esses ensaios ficou determinado o volume de 20 μL de fração solúvel, já que com este volume foi possível alcançar maior atividade enzimática, com menor desvio padrão.

Para os ensaios de atividade de catalase hepática, a curva contruída com variação da quantidade de proteínas indicou como melhor a utilização do volume de 30 μL de fração. Porém, para facilitar os ensaios e não prejudicar as leituras espectrofotométricas, foi utilizado o valor de 10 μL de fração, sem prejuízo para os resultados.

De acordo com Devlin (2011), concentrações mais altas de catalase são encontradas em peroxissomos e concentrações mais baixas em mitocôndrias e no citosol. Apesar da dificuldade em encontrar dados na literatura relacionados a atividade de catalase citosólica cerebral de ratos, nas condições dos ensaios realizados neste trabalho foi possível encontrar atividade enzimática suficiente para comprovar a presença da catalase citosólica cerebral. A partir da atividade controle determinada, foi possível realizar os ensaios de atividade enzimática utilizando todos os extratos e determinar sua capacidade modulatória sobre esta enzima.

Tendo em vista os escassos estudos referentes a existência de catalase citosólica hepática e cerebral, foram realizados testes iniciais para determinar a presença desta catalase, além de possibilitar a previsão de possíveis modulações dos extratos de frutas utilizados. Os resultados são apresentados na tabela 7.

Tabela 7. Atividade de catalase hepática solúvel de ratos na ausência (controle) e presença dos extratos bruto e etéreo de açaí e pitanga.

Extrato	Volume de extrato (μL)	Atividade ($\text{mmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg ptn}^{-1}$)	Inibição/ Ativação
Controle	-	0,0079 \pm 0,0002	-
Bruto de açaí	5	0,0024 \pm 0,0002	Inibição de 66%
Bruto de Pitanga	5	0,0093 \pm 0,0005	Ativação de 15%
Etéreo de açaí	5	0,0089 \pm 0,0004	Ativação de 19,3%
Etéreo de Pitanga	5	0,0064 \pm 0,0001	Inibição de 17%

Com os resultados obtidos na determinação da atividade de catalase citosólica hepática de ratos, foi possível observar uma concentração de catalase citosólica possível de ser avaliada

quanto sua atividade e modulação por compostos bioativos de extratos de frutas, nas condições dos ensaios realizados. A partir dos resultados iniciais encontrados, novos testes foram realizados para determinar a forma como as modulações ocorrem, além de determinar a modulação para os demais extratos utilizados. Os gráficos a seguir (gráfico 27) ilustram os resultados obtidos nos ensaios controle de catalase cerebral e hepática e os efeitos promovidos pelo uso dos extratos bruto, etéreo, aquoso e alcoólico de açaí e de pitanga, sobre a atividades dessas enzimas.

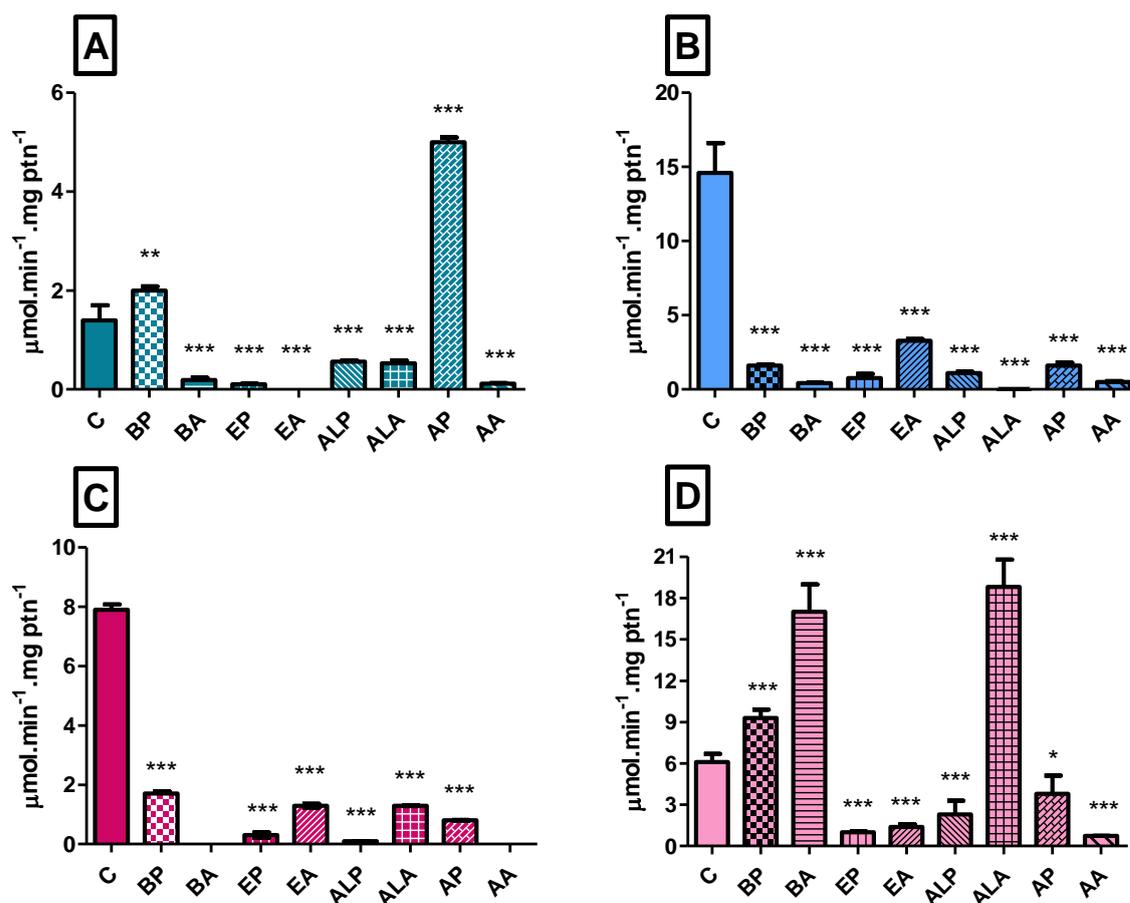


Gráfico 27: Atividade de catalase citosólica cerebral (A e B) e hepática (C e D) de rato com adição dos extratos aquosos de pitanga e açaí. Foram utilizadas 2 concentrações de peróxido de hidrogênio (H_2O_2): $7,5 \mu\text{M}$ (A e C) e $30 \mu\text{M}$ (B e D). Foi realizada a comparação entre os diferentes extratos: bruto de pitanga (BP), bruto de açaí (BA), etéreo de pitanga (EP), etéreo de açaí (EA), alcoólico de pitanga (ALP), alcoólico de açaí (ALA), aquoso de pitanga (AP) e aquoso de açaí (AA). As atividades das amostras contendo extrato foram comparadas com o controle estatisticamente por ANOVA segundo o teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer.

De acordo com os resultados encontrados, foi possível identificar que os compostos presentes no extrato bruto de açaí inibiram severamente a atividade da enzima catalase hepática nas concentrações mais baixas de substrato, chegando a inibi-la em 100% (0,0075 mM). Já na maior concentração de substrato testada, houve aumento relevante da atividade enzimática, cerca de 186%.

Esses resultados indicam que o extrato bruto de açaí é capaz de aumentar a atividade da catalase em altas concentrações de substrato e, conseqüentemente, aumentar o metabolismo de espécies reativas de oxigênio, como o peróxido de hidrogênio. Estudos relataram alta biodisponibilidade e bioacessibilidade antioxidante de compostos ativadores de catalase presentes em tomate, alho e cebola, resultando em elevada biodisponibilidade desses compostos (Gawlik-Dziki, 2012). Dentre estes compostos estão presentes também os compostos fenólicos presentes em açaí, sugerindo que os resultados encontrados utilizando o extrato bruto de açaí possam ter relação direta com esses mesmos compostos e comportamento.

Com o uso do extrato bruto de pitanga também foi possível visualizar uma expressiva diminuição da atividade enzimática hepática na presença dos compostos presentes no extrato utilizado, chegando a alcançar, aproximadamente, 86% de diminuição da atividade. Assim como foi visto com o extrato bruto de açaí, os compostos presentes no extrato bruto de pitanga foram capazes de alterar a atividade enzimática de forma a aumentá-la apenas em concentrações elevadas de substrato. Sendo assim, este também pode ser considerado um extrato com compostos bioativos que viabilizam diminuição de espécies reativas de oxigênio e estresse oxidativo, porém apenas em condições de altas concentrações destas substâncias.

Os extratos etéreos de açaí e pitanga também foram capazes de alterar de forma expressiva a atividade da catalase citosólica hepática de ratos, porém em todas as concentrações testadas a modulação foi negativa, diminuindo a atividade enzimática. Diminuições da atividade de até 84% foram identificadas, o que também diminui a possibilidade de utilizar esse extrato de forma a contribuir para redução do estresse oxidativo.

Diminuições de atividade expressivas também foram observadas com a utilização do extrato etéreo de pitanga. As reduções encontradas foram de 96% na menor concentração de substrato (0,0075 mM) e, aproximadamente, 84% na maior concentração (0,030 mM). Porém, a redução não é dependente da concentração de substrato. Independente disso, o extrato etéreo de pitanga também não é o ideal, em termos de atividade de catalase hepática para aumento do metabolismo de espécies reativas de oxigênio.

Dos resultados observados, aqueles referentes a atividade de catalase hepática influenciada pela presença do extrato aquoso de açaí foram os que proporcionaram a maior redução de atividade enzimática, considerando as concentrações de substratos utilizadas. Isto porque a redução de atividade proporcionada pelo extrato aquoso de açaí foi de 100% nas concentrações de substrato de 0,0075 mM, e reduções bem próximas a 100% nas demais concentrações testadas.

Reduções de atividade importantes, porém, não tão expressivas, também foram observadas com a utilização do extrato aquoso de pitanga. Com esse extrato as inibições diminuíram com o aumento da concentração de substrato, indo de, aproximadamente, 90% de inibição na menor concentração de substrato (0,0075 mM) e para 35% de inibição na maior concentração (0,030 mM). Considerando a redução da concentração celular de espécies reativas de oxigênio, a utilização de extrato aquosos de açaí e pitanga é bastante relevante, pois mostra que o sinergismo entre os compostos bioativos presentes nesses extratos, como compostos fenólicos, possibilitam a utilização destes mesmo em pequenas concentrações de substrato.

Os resultados referentes a utilização e verificação do extrato alcoólico de açaí, em comparação com os resultados obtidos nos ensaios controle também foram verificados e a comparação deste ensaio com o controle mostra a diminuição da atividade enzimática hepática em 83%, na concentração de 0,0075 mM do substrato. Ao contrário de muitos dos extratos testados, houve aumento da atividade enzimática, promovido pelo uso do extrato alcoólico de açaí na maior concentração de substrato utilizada, indicando que esse aumento é relacionado a concentração de substrato, podendo estar associado aos compostos bioativos presentes no extrato, como taninos já mencionados como capazes desse tipo de modulação enzimática.

O aumento verificado foi de, aproximadamente, 210% e coloca o extrato alcoólico de açaí como uma possibilidade na redução da concentração de espécies reativas de oxigênio. Segundo Doğan (2008), o aumento da concentração de H₂O₂ aumentou em até 3 vezes a produção de catalase em *Aspergillus fumigatus*, quando incubado a 37°C, em estudo que buscou analisar o efeito da concentração de peróxido de hidrogênio e outros compostos fenólicos no crescimento e produção de catalase da cepa estudada. No ensaio citado, a concentração do substrato foi de 1Mm, considerando o aumento da atividade dependente da concentração desse substrato e fazendo com que a atuação dos compostos bioativos fosse considerada significativa.

O extrato alcoólico de pitanga produziu resultados que mais se assemelham a maioria dos extratos testados, com redução expressiva da atividade enzimática (redução máxima de

98%, em 0,0075 mM). As reduções diminuem com o aumento da concentração de substrato (62%, em 0,030 mM), mas mantém o extrato testado fora do grupo que é considerado promissor no que diz respeito a diminuição do estresse oxidativo. A redução da atividade enzimática indica que a utilização do extrato aquoso de QuEChER de pitanga não favorece a redução da concentração celular de EROs.

Para a atividade da enzima catalase cerebral, o uso do extrato bruto de açaí resultou em diminuição da atividade enzimática que aumentaram de acordo com a concentração de substrato. As reduções foram de 86% e 99%, o que confirma a capacidade de modulação desse extrato sobre a catalase testada, mas o impede de ser utilizado como possibilidade de aumento da capacidade celular em diminuir a concentração de espécies reativas de oxigênio.

Em comparação com resultados do ensaio controle, a atividade da enzima catalase cerebral foi modulada de forma negativa, com redução máxima de 89%, com 0,030mM de substrato, apesar de na menor concentração de substrato testada (0,0075 mM). A redução da atividade pode estar relacionada com compostos presentes nos extratos, como taninos, e justifica a diminuição da velocidade máxima alcançada.

Os extratos etéreos de açaí e pitanga foram utilizados nos ensaios de atividade enzimática de catalase citosólica cerebral de ratos a fim de determinar sua capacidade modulatória. Aparentemente a inibição causada pelo extrato etéreo de açaí não depende da concentração de substrato e alcançou 100% na menor concentração de substrato testada. Na concentração de 0,030mM, o valor de inibição foi de 77%. Assim como observado com o extrato de açaí, o extrato de pitanga promoveu inibição da atividade enzimática que, aparentemente, não dependem da concentração de substrato, ficando em torno de 92%.

Tanto para o extrato etéreo de açaí quanto para o de pitanga, não foi possível associá-los a uma possibilidade de utilização para aumento do metabolismo celular de espécies reativas de oxigênio e conseqüente redução do estresse oxidativo, levando em consideração as células cerebrais. Assim como já relatado anteriormente, os compostos bioativos presentes nos dois extratos (fenólicos) modulam a atividade enzimática e podem ser utilizados em processo que requeira diminuição da atividade enzimática e possível retenção de substratos na célula.

Mais uma vez, o extrato testado mostrou que os compostos bioativos presentes e detectados nos testes fitoquímicos são capazes de diminuir a atividade da catalase citosólica cerebral, sendo esta redução independente da concentração de substrato. As reduções de atividade foram de 91% e 96%, indicando a forte capacidade modulatória do extrato.

Nos testes realizados com o extrato aquoso de açaí, a utilização deste extrato leva a um consequente aumento da concentração de EROs e possibilidade de ocorrência de estresse oxidativo. Mais uma vez, os compostos presentes nesse extrato podem ser considerados responsáveis por essa inibição.

O comportamento observado da atividade enzimática foi diferente quando os ensaios foram realizados com o extrato aquoso de pitanga. Aparentemente, esse extrato é capaz de alterar a atividade da catalase citosólica cerebral, porém essa alteração ocorre de forma positiva, aumentando a atividade enzimática, em baixa concentração de substrato.

Os resultados encontrados nos ensaios indicam que a velocidade máxima da atividade enzimática foi alcançada (0,0029 mmol/min/mg) com as concentrações de substrato utilizadas nos ensaios. Com o extrato aquoso de pitanga foi observado aumento de atividade na menor concentração de substrato (aproximadamente 257%). O resultado obtido indica a possibilidade de uso do extrato na diminuição do estresse oxidativo causado pelo excesso de espécies reativas de oxigênio.

O último extrato de açaí testado foi o alcoólico, e o resultado obtido mostra que o efeito dos seus compostos sobre a atividade da enzima catalase foi semelhante àqueles encontrados com a utilização dos demais extratos obtidos da mesma fruta, e permitiu alcance da velocidade máxima de reação (0,0003mmol/min/mg) nas condições dos ensaios. Redução de até 100% foi determinada, e o aumento da inibição acompanhou o aumento da concentração de substrato. Mais uma vez, um extrato de açaí se mostrou capaz de influenciar a atividade da catalase citosólica cerebral de ratos, porém diminuindo sua atividade e não sendo considerado alternativa para contribuir no aumento do metabolismo de espécies reativas de oxigênio.

As reduções de atividade foram de 60% com a concentração de substrato de 0,0075mM, e 92% de inibição para concentração de 0,030mM. Assim como a maioria dos extratos testados, o extrato alcoólico de pitanga também não se mostrou propício para ser utilizado com o intuito de diminuir a concentração de espécies reativas de oxigênio.

Taninos presentes nos extratos de açaí podem estar relacionados com a diminuição da atividade da catalase, pois, de acordo com estudos publicados, foram encontradas baixas atividade de catalase em amostras vegetais com altas concentrações de taninos. Esse fato pode ser explicado por flavonoides terem como função a proteção celular do estresse oxidativo por reação direta (quelação ou inativação) de espécies reativas de oxigênio.

6 CONCLUSÕES

Os estudos realizados durante este trabalho permitiram a adaptação de métodos analíticos para obtenção de extratos das frutas açaí e pitanga, de forma mais rápida e econômica. A adaptação ao referenciado método QuEChERS possibilitou a produção de diversos extratos, sem prejudicar a composição química, mantendo a influência comprovada em atividade de GST, antes observada nos extratos obtidos a partir de métodos na literatura específicos para este fim.

Os testes de prospecção fitoquímica apresentaram como resultado a presença, principalmente, de saponinas, taninos, aminoácidos não proteicos e carboidratos, nos extratos brutos, alcoólicos e aquosos de pitanga e açaí e indicaram ausência de flavonoides. Para os extratos etéreos, a prospecção indicou a presença de esteroides e triterpenos, glicosídeos cardioativos e antraquinonas no extrato de pitanga; glicosídeos cardioativos nos extratos de açaí. Tais resultados foram importantes, juntamente com os compostos já descritos na literatura, durante todo o trabalho principalmente como possíveis justificativas para as modulações enzimáticas causadas por ação desses extratos.

De acordo com os resultados encontrados neste estudo, todos os extratos utilizados foram capazes de influenciar e alterar as atividades das enzimas GST e catalase, seja de forma positiva ou negativa, dependendo do extrato e da própria enzima estudada. Para a enzima GST cerebral de ratos, os extratos brutos de açaí e pitanga, aquoso de açaí e de pitanga, alcoólico de açaí e pitanga diminuíram a capacidade de biotransformação de compostos xenobióticos. Destes, o extrato bruto de pitanga promoveu inibição competitiva, os demais extratos das duas frutas promoveram inibição mista. O extrato etéreo de açaí e aquoso de QuEChERS de pitanga, ativaram a GST Geral cerebral, nas condições dos ensaios.

Para a enzima GST hepática, o extrato bruto de açaí, etéreo de açaí, aquoso de açaí e de pitanga, alcoólico de açaí também diminuíram a capacidade celular de biotransformação. Nesse caso, parâmetros cinéticos também foram obtidos para determinação da modulação proporcionada, e indicaram que os extratos brutos de açaí, etéreo de açaí, aquosos de açaí e de pitanga e alcoólico de açaí tendem a inibir a enzima GST Geral hepática de forma mista. O extrato bruto de pitanga não foi capaz de influenciar a enzima e o extrato alcoólico de pitanga promoveu ativação enzimática.

Os resultados obtidos para a enzima GST evidenciam as diferentes características existentes entre as enzimas hepática e cerebral, de modo que um mesmo extrato pode influenciar

as duas enzimas de formas diferentes. Para os estudos realizados com a enzima GST específica da classe *mu*, foi possível perceber que a atividade da isoforma cerebral foi inibida pelos extratos aquoso e etéreo de açaí, e bruto de pitanga, porém, o extrato etéreo de açaí aumentou a atividade enzimática quando utilizado em maiores concentrações de substrato. Já o extrato aquoso de QuEChER de pitanga não foi capaz de influenciar a atividade da isoforma hepática, tendo, porém, modulado negativamente a atividade da isoforma cerebral.

Para a enzima catalase, a maioria dos extratos inibiu a atividade de forma bastante expressiva, levando a diminuição da capacidade antioxidante. Para a enzima catalase cerebral, apenas o extrato aquoso de pitanga e aquoso de QuEChER de pitanga aumentaram a atividade enzimática, tendo o último extrato o resultado mais expressivo. Para a enzima hepática, o extrato bruto de açaí e o extrato alcoólico de açaí foram capazes de promover esse aumento.

Condições patológicas ou não que aumentem concentração de H_2O_2 no organismo, seja por aumento da sua produção ou diminuição dos componentes do sistema antioxidante como o GSH, ou até mesmo a diminuição da atividade de enzimas que metabolizam esse composto, levam ao acúmulo de H_2O_2 no citosol ou mitocôndria, prejudicando a manutenção do equilíbrio celular (Bai, 1999). Dessa forma, os resultados obtidos com os extratos para a enzima catalase não foram, em maioria, promissores no que trata a diminuição da concentração de espécies reativas de oxigênio celular e consequente diminuição do estresse oxidativo.

Esses resultados mostram que os compostos presentes em extratos obtidos de frutas são pontos de estudo importantes para a regulação do organismo quanto à sua capacidade aumento do tempo de permanência de compostos xenobióticos na célula, uma vez que a maioria dos extratos promoveu inibição da atividade de GST geral e isoforma *mu*. Os resultados indicam, ainda, baixa capacidade dos extratos de modulação da capacidade enzimática antioxidante, não sendo, em sua maioria, promissores para a tal ação. O resultado se torna mais expressivo para o extrato alcoólico e aquoso de pitanga, já que o fígado é o órgão onde a maioria dos processos de desintoxicação ocorre. Já para os extratos brutos de açaí e pitanga, os resultados são relevantes pelo fato de o extrato bruto permitir que o resultado seja alcançado com a ingestão da fruta completa, sem a necessidade de fracionamento dos extratos.

7 REFERÊNCIAS

AEBI, H. Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*. Volume 105, Pages 121-126, 1984.

ALICE, C. B.; VARGAS, V. M. F.; SILVA, G. A. A. B.; SIQUEIRA, N. C. S.; SCHAPOVAL, E. E. S.; GLEYE, L.; HENRIQUES, J. A. P.; HENRIQUES, A. T. Screening of plants used in south Brazilian folk medicine. *Journal of Ethnopharmacology*. Volume 35, Issue 2, Pages 165 -171, 1991.

ALLOCATI, N.; MASULLI, M.; DI ILIO, C.; FEDERICI, L. Glutathione transferases: substrates, inhibitors and pro-drugs in cancer and neurodegenerative diseases. *Oncogenesis*. 2018. DOI 10.1038/s41389-017-0025-3

AMORIM, Q. S. Resíduos da indústria processadora de polpas de frutas: capacidade antioxidante e fatores antinutricionais. Dissertação de Mestrado. Itapetinga, Bahia. 2016.

ANASTASSIAS, M.; LEHOTAY, S. J.; STAJNBAHER, D.; SCHENCK, F. J. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid phase extraction” for determination of pesticide residues in produce. *J. AOAC Int.* 86, 412-431, 2003.

ANDREAZZA, A. C.; SOARES, D. G.; KEHL, L. F.; BORELLA, M. L. L.; SALVADOR, S. Transtornos neuropsiquiátricos e estresse oxidativo. DOI: 10.13140/2.1.5141.0240

ANJUM, N. A.; AHMAD, I.; MOHMOOD, I.; PACHECO, M.; DUARTE, A. C.; PEREIRA, E.; UMAR, S.; AHMAD, A.; KHAN, N. A.; IQBAL, M.; PRASAD, M. N. V. Modulation of glutathione and its related enzymes in plants' responses to toxic metals and metalloids—A review. *Environmental and Experimental Botany*. Volume 75, 307-324, 2012.

AURICCHIO, M. T.; BACCHI, E. M. Folhas de *Eugenia uniflora* L. (pitanga): propriedades farmacobotânicas, químicas e farmacológicas. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 62(1): 55 - 61 ,2003.

AVILEZ, I. M. Metabolismo antioxidativo, biotransformação hepática e alterações histológicas de matrinxã (*Brycon amazonicus*, SPIX & AGASSIZ, 1829, CHARACIDAE) exposto ao fenol. Tese de Doutorado. Universidade Federal de São Carlos, 2008.

BAI, J.; RODRIGUEZ, A. M.; MELENDEZ, J. A.; CEDERBAUM, A. I. Overexpression of Catalase in Cytosolic or Mitochondrial Compartment Protects HepG2 Cells against Oxidative Injury. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 274, No. 37, Issue of September 10, pp. 26217–26224, 1999.

BARD, S. M. Multixenobiotic resistance as a cellular defense mechanism in aquatic organisms. *Aquat. Toxicol.* 48, 357–389, 2000.

BARBOSA, L. F.; AUGUSTO, M. H. G. M. O. Danos oxidativos e neurodegeneração: o que aprendemos com animais transgênicos e nocautes? *Quim. Nova*, Vol. 29, No. 6, 1352-1360, 2006.

BARBOSA, W. L. R. Manual para Análise Fitoquímica e Cromatográfica de Extratos Vegetais. Universidade Federal do Pará (UFPA). Belém, 2001.

BARJA, G. Mitochondrial oxygen consumption and reactive oxygen species production are independently modulated: implications for aging studies. *Rejuvenation Res.* Jun;10(2):215-24, 2007.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M.; MIRANDA, A. L. P.; RODRIGUES, C. R. A química medicinal de n-acilidrazonas: novos compostos-protótipos de fármacos analgésicos, anti-inflamatórios e anti-trombóticos. *Quim. Nova*, Vol. 25, No. 1, 129- 148, 2002.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Quim. Nova*, Vol. 29, No. 1, 113-123, 2006.

BARYNIN, V. V.; WHITTAKER, M. M.; ANTONYUK, S. V.; LAMZIN, V. S.; HARRISON, P. M.; ARTYMIUK, P. J.; WHITTAKER, J. W. Crystal structure of manganese catalase from *Lactobacillus plantarum*. *Structure*, 2001.

BATTESTIN, V.; MATSUDA, L. K.; MACEDO, G. A. Fontes e aplicações de taninos e tanases em alimentos. *Alim. Nutr.*, v.15, n.1, p.63-72, 2004.

BEERS, R. F.; SIZER, I. W. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J Biol Chem*, 1952.

BENZI, G.; PASTORIS, O.; MARZATICO, F.; VILLA, R. F.; DAGANI, F.; CURTI, D. The mitochondrial electron transfer alteration as a factor involved in the brain aging. *Neurobiology of Aging*, 1992.

BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. *Rev. Nutr.*, 12(2): 123-130, 1999.

BORGUINI, R. G. Avaliação do potencial antioxidante e de algumas características físico-químicas do tomate (*Lycopersicon esculentum*) orgânico em comparação ao convencional. Tese de Doutorado. São Paulo, 2006.

BREINHOLT, V.; LAURIDSEN, S. T.; DRAGSTED, L. O. Differential effects of dietary flavonoids on drug metabolizing and antioxidant enzymes in female rat. *Xenobiotica*, 2000.

BROINIZI, P. R. B.; ANDRADE-WARTHA, E. R. S.; SILVA, A. M. O.; NOVOA, A. J. V.; TORRES, R. P.; AZEREDO, H. M. C.; ALVES, R. E.; MANCINI-FILHO, J. Avaliação da atividade antioxidante dos compostos fenólicos naturalmente presentes em subprodutos do pseudofruto de caju (*Anacardium occidentale* L.). *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, 27(4): 902-908, 2007.

CERQUEIRA, F. M.; MEDEIROS, M. H. G.; AUGUSTO, O. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. *Quim. Nova*, Vol. 30, No. 2, 441-449, 2007.

CHAVES, M. H.; CITÓ, A. M. G. L.; LOPES, J. A. D.; COSTA, D. A.; OLIVEIRA, C. A. A.; COSTA, A. F.; BRITO JÚNIOR, F. E. M. Fenóis totais, atividade antioxidante e constituintes químicos de extratos de *Anacardium occidentale* L., Anacardiaceae. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 20(1): 106-112. 2010.

CLAPPER, M. L.; SZARKA, C. E.; PFEIFFER, G. R.; GRAHAM, T. A.; BALSHEM, A. M.; LITWIN, S.; GOOSENBERG, E. B.; FRUCHT, H.; ENGSTROM, P. F. Preclinical and Clinical Evaluation of Broccoli Supplements as Inducers of Glutathione S-Transferase Activity. *Clinical Cancer Research*. Vol. 3, 25- 30, 1997.

COGO, A. J. D.; SIQUEIRA, A. F.; RAMOS, A. C.; CRUZ, Z. M. A.; SILVA, A. G. Utilização de enzimas do estresse oxidativo como biomarcadoras de impactos ambientais. *Natureza on line*, 2009.

CONSOLINI, A. E.; BALDINI, O. A. N.; AMAT, A. G. Pharmacological basis for the empirical use of *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) as antihypertensive. *Journal of Ethnopharmacology* 66, 33–39, 1999.

COSTA, A. F. Farmacognosia. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1972.

DELAPEDRA, G. Investigação bioquímica do sistema antioxidante de *Crassostrea gigas* expostas a 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno: o papel da glutathione na resposta a agentes eletrofílicos. Trabalho de conclusão de curso apresentado à Universidade Federal de Santa Catarina, 2015.

DEVLIN, T. M. Manual de Bioquímica com Correlações Clínicas. Ed. Blucher; Edição: 7ª, 2011.

DING, Y; ORTELLI, F.; ROSSITER, L. C.; HEMINGWAY, J.; RANSON, H. The Anopheles gambiae glutathione transferase supergene family: annotation, phylogeny and expression profiles. *BMC Genomics*, 2003.

DOĞAN, T. The effects of hydrogen peroxide, gallic acid and resveratrol on growth and catalase production of *Aspergillus fumigatus*. *Agris*, 2008.

EDENHARDER, R.; SAGER, J.W.; GLATT, H.; MUCKEL, E.; PLATT, K.L. Protection by beverages, fruits, vegetables, herbs, and flavonoids against genotoxicity of 2-acetylaminofluorene and 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) in metabolically competent V79 cells. *Mutation Research* 521, 57–72, 2002.

ETO, D. K.; KANO, A. M.; BORGES, M. T. M. R.; BRUGNARO, C.; CECCATO-ANTONINI, S. R.; VERRUMA-BERNARD, M. R. Qualidade microbiológica e físico-química da polpa e mix de açaí armazenada sob congelamento. *Rev Inst Adolfo Lutz.*; 69(3):304-10, 2010.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev Ass Med Brasil.* 43(1): 61-8, 1997.

FOGLIO, M. A.; QUEIROGA, C. L.; SOUSA, I. M. O.; RODRIGUES, R. A. F. Plantas Medicinais como Fonte de Recursos Terapêuticos: Um Modelo Multidisciplinar. *MultiCiência*, 2006.

FRITZ-WOLF, K.; BECKER, A.; RAHLFS, S.; HARWALDT, P.; SCHIRMER, R. H.; KABSCH, W.; BECKER, K. X-ray structure of glutathione S-transferase from the malarial parasite *Plasmodium falciparum*. *PNAS.* 100 (24) 13821-13826, 2003. doi.org/10.1073/pnas.2333763100

FRAZON, R. C.; GONÇALVES, R. S.; RASEIRA, M. C. B.; ANTUNES, L. E. C. Porta-enxertos e época de enxertia na propagação da pitangueira (*Eugenia uniflora*). Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento. Embrapa Clima Temperado, 2013.

FRAZON, R. C. Propagação vegetativa da pitangueira por enxertia. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento. Embrapa Clima Temperado, 2015.

GALOTTA, A. L. Q. A.; BOAVENTURA, M. A. D.; LIMA, L. A. R. S. Antioxidant and cytotoxic activities of 'açai' (*Euterpe precatoria* Mart.). *Quim. Nova*, Vol. 31, No. 6, 1427-1430, 2008.

GAWLIK-DZIKI, U. Changes in the antioxidant activities of vegetables as a consequence of interactions between active compounds. *Journal of Functional Foods*. 4(4):872-882, 2012.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Quim. Nova*, Vol. 30, No. 2, 374-381, 2007.

GOYAL, M. M.; BASAK, A. Human catalase: looking for complete identity. *Protein Cell*. 1(10): 888–897, 2010. DOI 10.1007/s13238-010-0113-z

GUENGERICH, F. P. Oxidative cleavage of carboxylic esters by cytochrome P-450. *J Biol Chem*, 1987.

GUPTA, R.; SHARMA, A. K.; DOBHAL, M.P.; GUPTA, R.S. Antidiabetic and antioxidant potential of sitosterol in streptozotocin-induced experimental hyperglycemia. *Journal of Diabetes*, 2011.

HABIG, W. H.; PABST, M. J.; JAKOBY, W. B. Glutathione s-Transferases. The first enzymatic in mercapturic acid formation. *The J. of Biol. Chemistry*, v.249, n.22, p.7130-7139, 1974.

HALLIWELL, B. Free Radicals and Antioxidants: a Personal View. *Nutrition Reviews*, Volume 52, Issue 8, Pages 253–265; 1994.

HAYES, J. D.; PULFORD, D. J. The Glutathione S-Transferase Supergene Family: Regulation of GST and the Contribution of the Isoenzymes to Cancer Chemoprotection and Drug Resistance. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 30(6):445-600, 1995.

HEINRICH, M.; DHANJI, T.; CASSELMAN, I. Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) – A phytochemical and pharmacological assessment of the species' health claims. *Phytochemistry Letters* 4, 10- 21, 2011.

HELVECIO, H. Caracterização funcional do gene da Glutathione S-Transferase Epsilon2 (GSTE2) em *Aedes aegypti*. Dissertação de Mestrado. *Fundação Oswaldo Cruz*. Recife, 2014.

HODGSON, E. Textbook of modern toxicology. 3^o ed. USA: John Wiley & Sons Publication. 2004. 557p.

HUBER, P. C.; ALMEIDA, W. P. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. *Quim. Nova*, Vol. 31, No. 5, 1170-1179, 2008.

HUBER, L. S.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Flavonóis e flavonas: fontes brasileiras e fatores que influenciam a composição em Alimentos. *Alim. Nutr.* V.19, n. 1, p. 97- 108, 2008.

JUNG, U. J.; KIM, H. J.; LEE, J. S.; LEE, M. K.; KIM, H. O.; PARK, E. J.; KIM, H. K.; JEONG, T. S.; CHOI, M. S. Naringin supplementation lowers plasma lipids and enhances erythrocyte antioxidant enzyme activities in hypercholesterolemic subjects. *Clinical Nutrition*. Volume 22, Issue 6, 2003.

KANG, J.; LI, Z.; WU, T.; JENSEN, G. S.; SCHAUSS, A. G.; WU, X. Food Chemistry Antioxidant capacities of flavonoid compounds isolated from acai pulp (*Euterpe oleracea* Mart.) Volume 122, Issue 3, Pages 610-617, 2010.

KARAM, R. A.; PASHA, F.; EL-SHAL, A. S.; RAHMAN, H. M. A.; GAD, D. M. Impact of glutathione-S-transferase gene polymorphisms on enzyme activity, lung function and bronchial asthma susceptibility in Egyptian children. *Gene*, v. 497, n. 2, p. 314–319, 2012.

KAUSHAL, J.; MEHANDIA, S.; SINGH, G.; RAINA, A.; ARYA, S. K. Catalase enzyme: Application in bioremediation and food industry. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2018.

KRAJKA-KUŹNIAK, V.; BAER-DUBOWSKA, W. The effects of tannic acid on cytochrome P450 and phase II enzymes in mouse liver and kidney. *Toxicology Letters*, 2003.

KUSKOSKI, E. M.; ASUERO, A. G.; MORALES, M. T.; FETT, R. Frutos tropicais silvestres e polpas de frutas congeladas: atividade antioxidante, polifenóis e antocianinas. *Ciência Rural*. v.36, n.4, p.1283-1287, jul-ago, 2006.

LEE, J.; KOO, N.; MIN, D. B. Reactive Oxygen Species, Aging, and Antioxidative Nutraceuticals. *Comprehensive Reviews In Food Science And Food Safety*—Vol. 3, 2004.

LEE-HILZ, Y. Y.; BOERBOOM, A. J. F.; WESTPHAL, A. H.; VAN BERKEL, W, J, H.; AARTS, J. M. M. J. G.; RIETJENS, I. M. C. M. Pro-Oxidant Activity of Flavonoids Induces EpRE-Mediated Gene Expression. *Chem. Res. Toxicol*, 2006.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. Princípios de Bioquímica. 5. ed. São Paulo: Sarvier, 2009. 1273p.

LIMA. R. S.; NUNES, G. S. Biossensor enzimático para detecção de fungicidas ditiocarbamatos. Estudo cinético da enzima aldeído desidrogenase e otimização do biossensor. *Quim. Nova*, Vol. 30, No. 1, 9-17, 2007.

LIMA, V. L. A. G.; MELO, E. A.; LIMA, D. E. S. Fenólicos e carotenoides totais em pitanga. *Scientia Agricola*, v.59, n.3, p.447-450, 2002.

LONCAR, N.; FRAAIJE, M. W. Catalases as biocatalysts in technical applications: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015. DOI: 10.1007/s00253-015-6512-6

LOPES, D. D. M.; BERNARDES, N. R.; COSTA, I. F. J. B.; PINHEIRO, L. Z.; OLIVEIRA, D. B. Avaliação da atividade antioxidante, taninos e fenóis totais do extrato da polpa de pitanga (*Eugenia uniflora*). 34a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2011.

LOPES, C. M. F. Opicapone Sulfation: Sulfotransferase Isoforms Characterization. Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, 2013.

LUMJUAN, N. et al. The *Aedes aegypti* glutathione transferase family. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. *Oxford*, v.37, p.1026-1035, 2007.

MAKKAR, H. P.; FRANCIS, G.; BECKER, K. Bioactivity of phytochemicals in some lesser-known plants and their effects and potential applications in livestock and aquaculture production systems. *Animal*, 2007.

MALINI, M. M.; LENIN, M.; VARALAKSHMI, P. Protective effect of triterpenes on calcium oxalate crystal-induced peroxidative changes in experimental urolithiasis. *Pharmacol Res*, 41, 413–418, 2000.

MARQUES, G. L. Estresse oxidativo no envelhecimento cardíaco: estudo experimental em ratos. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Paraná, 2015.

MARQUES, P. R. B. O.; YAMANAKA, H. Biossensores baseados no processo de inibição enzimática. *Quim. Nova*, Vol. 31, No. 7, 1791-1799, 2008.

MARTÍN, M. A.; SERRANO, A. B. G; RAMOS, S.; PULIDO, M. I.; BRAVO, L.; GOYA, L. Cocoa flavonoids up-regulate antioxidant enzyme activity via the ERK1/2 pathway to protect against oxidative stress-induced apoptosis in HepG2 cells. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. Volume 21, Issue 3, 2010.

MANNERVIK, B. & DANIELSON, U. H. Glutathione transferases: structure and catalytic activity. *Crit. Rev. Biochem*, 1988.

MATOS, F.J. A. Introdução à Fitoquímica Experimental. 2. ed. Fortaleza: Edições UFC, 1997.

MELLO FILHO, A. C.; HOFFMAN, M. E.; MENECHINI, R. Cell killing and DNA damage by hydrogen peroxide are mediated by intracellular iron. *Biochem J*. 218: 273- 5; 1983.

MENEZES, E. M. S.; TORRES, A. T.; SRUR, A. U. S. Valor nutricional da polpa de açaí (*Euterpe oleracea* Mart) liofilizada. *Acta Amazonica*. vol. 38(2), 311 – 316, 2008.

MERCK, E. Reactivos de coloración para cromatografía en capa fina y en papel. Darmstadt: Merck, 76 p. 1980.

MONTEIRO, V. N.; SILVA, R. N. Aplicações Industriais da Biotecnologia Enzimática. *Processos Químicos*, 2009.

MURPHY, M. P. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem.J.* 417,1–13. 2009.

NOLDIN, V. F.; ISAIAS, D. B.; FILHO, V. C. Gênero *Calophyllum*: importância química e farmacológica. *Quim. Nova*, Vol. 29, No. 3, 549-554, 2006.

OLIVEIRA, F. M. N.; FIGUEIRÊDO, R. M. F.; QUEIROZ, A. J. M. Análise comparativa de polpas de pitanga integral, formulada e em pó. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, v.8, n.1, p.25-33, 2006.

OLIVEIRA, A. C.; VALENTIM, I. B.; GOULART, M. O. F. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. *Quim. Nova*, Vol. 32, No. 3, 689-702, 2009.

OLIVEIRA, M. S. P.; NETO, J. T. F.; PENA, R. S. Açaí: Técnicas de cultivo de processamento. Semana da Fruticultura, Floricultura e Agroindústria / VII Flor Pará. Belém – Pará – Brasil, 2007.

OZEN, T.; YILDIRIM, K.; TOKA, M. The impacts of *Elaeagnus umbellata* Thunb. leaf and fruit aqueous extracts on mice hepatic, extrahepatic antioxidant and drug metabolizing enzymes related structures. *Braz. J. Pharm. Sci.*, 2018.

ÖZYÜREK, M.; BEKTAOĞLU, B.; GÜÇLÜ, K.; APAK., K. Hydroxyl radical scavenging assay of phenolics and flavonoids with a modified cupric reducing antioxidant capacity

(CUPRAC) method using catalase for hydrogen peroxide degradation. *Analytica Chimica Acta*, 2008.

PACHECO-PALENCIA, L. A.; MERTENS-TALCOTT, S.; TALCOTT, S. T. Chemical Composition, Antioxidant Properties, and Thermal Stability of a Phytochemical Enriched Oil from Açai (*Euterpe oleracea* Mart.). *J. Agric. Food Chem.* 56, 4631–4636, 2008.

PAULSON, G. D., CALDWELL, J., HUTSON, D. H. E MENN, J. J. Conjugation Mechanisms of Xenobiotic Metabolism: Mammalian Aspects. In *Xenobiotic Conjugation Chemistry* (J. Caldwell, eds), pp 2–28, American Chemical Society, Londres. 1986.

PARKINSON, A. Biotransformation of xenobiotics. In *Casarett & Doull's toxicology*, ed. C. Klaassen, 133-224. New York, 2001.

PETERS, F.; FRANCK, T.; PEQUITO, M.; De La REBIÈRE, G.; GRULKE, S.; SALCCICIA, A.; VERWILGHEN, D.; CHIAVACCINI, L.; DEBY-DUPONT, G.; SERTEYN, D. In vivo administration of acepromazine or promethazine to horse decreases the reactive oxygen species production response of subsequently isolated neutrophils to stimulation with phorbol myristate acetate. *J Vet Pharmacol Ther*, 2009.

PETERSON, G. L. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Analytical Biochemistry*, v. 83, n. 2, p. 346-356, 1977. Doi: 10.1016/0003-2697(77)90043-4.

PORCU, O. M.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Variation in the Carotenoid Composition of the Lycopene-Rich Brazilian Fruit *Eugenia uniflora* L. *Plant Foods Hum Nutr.* 63:195–199, 2008.

POSSAMAI, F. P. Análise do estresse oxidativo em trabalhadores expostos a emissão de contaminantes atmosféricos de incinerador de resíduos sólidos de serviço de saúde, antes e após a suplementação antioxidante. Tese de Doutorado. Florianópolis, 2009.

PORTINHO, J. A.; ZIMMERMANN, L. M.; BRUCK, M. R. Efeitos Benéficos do Açaí. *International Journal of Nutrology*, v.5, n.1, p. 15-20, 2012.

POZO-INSFRAN, D. D.; BRENES, C. H.; TALCOTT, S. T. Phytochemical Composition and Pigment Stability of Açaí (*Euterpe oleracea* Mart.). *J. Agric. Food Chem.* 52, 1539-1545, 2004.

PROCHÁZKOVÁ, D.; BOUŠOVÁ, I.; WILHELMOVÁ, N. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia*, 2011.

PUTNAM, C. D.; ARVAI A. S.; BOURNE, Y. AND TAINER, J. A. Active and Inhibited Human Catalase Structures: Ligand and NADPH Binding and Catalytic Mechanism. *J. Mol. Biol.* 296, 295±309, 2000.

RAO, D. K.; SHAIK, N. A.; IMRAN, A.; MURTHY, D. K.; GANTI, E.; CHINTA, C.; RAO, H.; SHAIK, N. S.; AL-AAMA, J. Y. Variations in the GST activity are associated with single and combinations of GST genotypes in both male and female diabetic patients. *Mol Biol Rep* 41:841–848, 2014. DOI 10.1007/s11033-013-2924-5.

RENUGADEVI, J.; PRABU, S. M. Quercetin protects against oxidative stress-related renal dysfunction by cadmium in rats. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 2010.

ROCHA, D. A. M. Alterações de enzimas de biotransformação de xenobióticos na fase inicial da Esquistossomose Mansônica Murina. Mestrado em Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, 2004.

ROCHA, W.S.; LOPES, R. M.; SILVA, D. B.; VIEIRA, R. F.; SILVA, J. P.; AGOSTINI-COSTA, T. S. Compostos fenólicos totais e taninos condensados em frutas nativas do cerrado. *Rev. Bras. Frutic.*, v. 33, n. 4, p. 1215-1221, 2011.

ROCHA, R. Cacho de Açaí e Cultivar de Açaizairo BRS Pará. <https://www.embrapa.br/rondonia/busca-de-imagens/-/midia/3716001/cacho-de-acai>. 2017. Acesso em 31/08/2019.

RODRIGUES, K. A. F.; DIAS, C. N.; FLORÊNCIO, J. C.; VILANOVA, C. M.; GONÇALVES, J. R. S.; COUTINHO-MORAES, D. F. Prospecção fitoquímica e atividade moluscicida de folhas de *Momordica charantia* L. *Cad. Pesq.*, São Luís, v. 17, n. 2. 2010.

ROHMAN, M. M.; HOSSAIN, M. D. and FUJITA, M. Inhibitory interactions of glutathione derivatives, coumarins and quercetins with dominant onion bulb glutathione S-transferases: a structural analysis. *Nature and Science*. 2010.

ROVER JÚNIOR, L.; HÖEHR, N. F.; VELLASCO, A. P.; KUBOTA, L. T. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutathione associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. *Quim. Nova*, Vol. 24, No. 1, 112- 119, 2001.

SÁNCHEZ-VALLE, V.; MÉNDEZ-SÁNCHEZ, N. Estrés oxidativo, antioxidantes y enfermedad. *Rev Invest Med Sur Mex*; 20 (3): 161-168, 2013.

SAHU, S.C.; GRAY, G. C.P ro-oxidant activity of flavonoids: effects on glutathione and glutathione S-transferase in isolate rat liver nuclei. *Cancer Letters*, 1996.

SANTOS, T. B. Estudo cinético da oxidação enzimática do ácido 5-o-cafeoilquínico por polifenoloxidasas. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Paraná, 2009.

SCARIOTTO, S.; QUILOT-TURION, B.; POËSSEL, J.; RASEIRA, M. C. B.; DINI, M.; ROTH, F. Caracterização de Compostos Fenólicos e Triterpenos em Pêssegos e Nectarinas do Banco de Germoplasma da Embrapa. Boletim de pesquisa e desenvolvimento 292, *Embrapa Clima Temperado*. Pelotas, RS. 2018.

SCHAPOVAL, E. E. S.; SILVEIRA, S. M.; MIRANDA, M. L.; ALICE, C. B.; HENRIQUES, A. T. Evaluation of some pharmacological Pro-oxidant activity of flavonoids: effects on glutathione and glutathione S-transferase in isolate rat liver nuclei activities of *Eugenia uniflora* L. *Journal of Ethnopharmacology* 44, 137-142, 1994.

SCHAUSS, A. G.; WU, X.; PRIOR, R. L.; OU, B.; PATEL, D.; HUANG, D. AND KABABICK, J. P. Phytochemical and Nutrient Composition of the Freeze-Dried Amazonian

Palm Berry, *Euterpe oleraceae* Mart. (Acai). *J. Agric. Food Chem.*, 54 (22), pp 8598–8603, 2006.

SECRETI, L.C.; OSHIRO, A.M.; OLIVEIRA, V.S. Características físicas e químicas da polpa in natura da fruta noni (*Morindacitrofolia* L.). *A Revista Eletrônica da Faculdade de Ciências Exatas e da Terra*. v. 4, n. 7, 2015.

SILVA, A. M. O; ANDRADE-WARTHA, E. R. S.; CARVALHO, E. B. T.; LIMA, A; NOVOA, A V.; MANCINI-FILHO, J. Effect of aqueous rosemary extract (*Rosmarinus officinalis* L.) on the oxidative stress of diabetic rats. *Rev. Nutr.*, 24(1):121-130, 2011.

SILVA, W. J. M.; FERRARI, C. K. B. Metabolismo Mitocondrial, Radicais Livres e envelhecimento. *Rev. Bras. Geriatr. Gerontol.* 14(3):441-451, 2011.

SIREESHA, R.; BHAGYALAXMI, S. G.; MAMATA, M.; YADAGIRIREDDY, P.; UPENDERGOUD, P.; VENKATESHWARRAO, P.; BHANUPRAKASHREDDY, G.; ISHNUPR IYA, S.; ADM , T . Total activity of glutathione-S-transferase (GST) and polymorphisms of GST M1 and GSTT 1 genes conferring risk for the development of age related cataracts. *Experimental Eye Research* . Volume 98 , Pages 67 -74, 2012.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. *Rev. Nutr.*, Campinas, 15(1):71-81., 2002.

SOUSA, C. M. M.; SILVA, H. R.; VIEIRA-JR., G. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Quim. Nova*, Vol. 30, No. 2, 351-355, 2007.

TAKEDA, G. K.; LEITE, D. B.; JUNQUEIRA, M. G.; LOPES, L. G. F.; SILVA, I. D. C. G.; BARACAT, F. F. Assessment of glutathione S-transferaseM1 (GSTM1) and its polymorphisms GSTM1 null in the response to treatment with chemotherapy in advanced ovarian carcinoma. *Einstein*. 9(3 Pt 1):367-71, 2011.

TIMBRELL, J. A.; MARRS, T. C. Biotransformation of Xenobiotics . *General Applied and Systems Toxicology*, 2011.

TORRES, M. C. L.; SOARES, N. F. F.; MAIA, J. F. Parâmetros cinéticos da glutathione S-transferase e sua ativação por extratos de vegetais. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, 24(2): 243-248, 2004.

TREVISAN, R. Defesas celulares e sistema antioxidante em bivalves marinhos (*Mytilus edulis* e *Perna perna*) expostos a metais. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina, 2010.

TRUSH, M A. Xenobiotic Biotransformation. Johns Hopkins Bloomberg Scholl of Public Health, 2008.

VASCONCELOS, S. M. L; GOULART, M. O. F.; MOURA, J. B. F.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M. S.; KUBOTA, L. T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. *Quim. Nova*, Vol. 30, No. 5, 1323-1338, 2007.

VICTORIA, F. N.; LENARDÃO, E. J.; SAVEGNAGO, L.; PERIN, G.; JACOB, R. G.; ALVES, D.; SILVA, W. P.; MOTTA, A. M., NASCENTE, P. S. Essential oil of the leaves of *Eugenia uniflora* L.: Antioxidant and antimicrobial properties. *Food and Chemical Toxicology* 50, 2668–2674, 2012.

VIZZOTTO, M.; KROLOW, A. C.; WEBER, G. E. B. Metabólitos Secundários Encontrados em Plantas e sua Importância. Documento 316, Pelotas - Embrapa Clima Temperado, 2010.

VIZZOTTO, M. Fitoquímicos em pitanga (*Eugenia uniflora* L.): seu potencial na prevenção e combate a doenças. II Encontro sobre pequenas frutas e frutas nativas do Mercosul, 2006.

YANG, Y.; HA, H.; LEE, H. B. Role of reactive oxygen species in TGF-1-induced epithelial-mesenchymal transition. *Nephrol Dial Transplant*, 2003.

YUYAMA, L. K. O.; AGUIAR, J. P. L.; FILHO, D. F. S.; YUYAMA, K.; VAREJÃO, M. J.; FÁVARO, D. I. T.; VASCONCELLOS, M. B. A.; PIMENTEL, S. A.; CARUSO, M. S. F. Caracterização físico-química do suco de açaí de *Euterpe precatoria* Mart. oriundo de diferentes ecossistemas amazônicos. *Acta Amazonica*. Vol. 41(4), 545 – 552; 2011.

WALL, J. M.; KRIDER, M. M.; KREWSON, C. F.; EDDY, C. R.; WILLAMAN, J. J.; CORELL, D. S.; GENTRY, H. S. Steroidal sapogenins VII. Survey of plants for steroidal sapogenins and other constituents. *Journal of the American Pharmacists Association*, 63, 1-7, 1954.

WANG, S.; MENG, Q.; XIE, Q.; ZHANG, M. Effect and mechanism of resveratrol on drug resistance in human bladder cancer cells. *Molecular Medicine Reports*, 2017.

WATERMAN, M. R.; JOHNSON, E. F. *Methods in Enzymology*, Vol. 206, 1991.

ZANDEN, J. J. V.; HAMMAN, O. B.; van IERSEL, M. L.P.S.; BOEREN, S.; CNUBBEN, N. H.P.; Lo BELLO, M.; VERVOORT, J.; van BLADEREN, P. J.; RIETJENS, I. M.C.M. Inhibition of human glutathione S-transferase P1-1 by the flavonoid quercetin. *Chemico-Biological Interactions* 145, 139_ 148, 2003.

ZOPPI, C. C.; ANTUNES-NETO, J.; CATANHO, F. O.; GOULART, L. F.; MOTTA E MOURA, N.; MACEDO, D. V. Alterações e lesão muscular em jogadores de futebol durante uma temporada competitiva. *Rev. paul. Educ. Fís.*, n. 17, p. 119- 130, 2003.