



Universidade de Brasília

**Faculdade de Ciências da Saúde
Pós-Graduação em Nutrição Humana**

**COMPOSTOS DA CASCA DE TUCUM-DO-CERRADO (*Bactris setosa* Mart.) COM
ATIVIDADE ANTIOXIDANTE**

MARCELA BERCKMANS VIÉGAS COSTA DANTAS

**BRASÍLIA, DF
2016**

MARCELA BERCKMANS VIÉGAS COSTA DANTAS

**COMPOSTOS DA CASCA DE TUCUM-DO-CERRADO (*Bactris setosa* Mart.) COM
ATIVIDADE ANTIOXIDANTE**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do título de Mestre do Programa de Pós Graduação em Nutrição Humana da Universidade de Brasília.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Élide Geralda Campos

BRASÍLIA, DF

2016

BANCA EXAMINADORA**Professora Dra. Élide Geralda Campos**

Universidade de Brasília – Instituto de Biologia (UnB)
(Presidente)

Dr. Marciano Régis Rubini

Instituto de Biologia – Depto. de Biologia Celular - UnB
(Examinador)

Dra. Andréa Barretto Motoyama

Faculdade de Ciências da Saúde - Depto.de Farmácia- UnB
(Examinadora)

Dr. Túlio César Ferreira

Faculdade de Medicina Veterinária - UPIS
(Suplente)

Não foi fácil, mas é gratificante a realização de um sonho. Deixei o lugar quentinho, seguro e amável que era as asas dos meus pais e minha cidade natal para levantar meu próprio voo. E agora aqui de cima, prestes a aterrissar, vejo que tudo valeu a pena: a saudade, o choro engolido, o choro chorado, o acolhimento recebido, os ônibus perdidos, as noites em claro, o conhecimento compartilhado, os experimentos feitos e refeitos. E o principal: desde a decolagem, Deus me mostrou que esse era o caminho a ser seguido, e então, eis-me aqui, futura mestre pela UnB.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus por me conceder sabedoria, perseverança, saúde e me fazer sentir Sua presença em todos os momentos de minha vida.

Agradeço aos meus pais Adriana e Béba pelo apoio, investimento, confiança, cuidado, e por sempre acreditar em mim. A saudade foi grande, mas na nossa maneira conseguimos nos unir ainda mais.

Ao meu noivo Tiago que me fez acreditar nesse sonho quando ele era apenas algo distante e me acompanhou nessa nova vida. Agradeço a sua compreensão, amor, estímulo, suporte e companhia até nos experimentos em horários inconvenientes.

À dona Dalva e família por me acolherem no momento que mais precisei aqui em Brasília, por tentar preencher o vazio que senti longe da família me inserindo em sua família e cuidando de mim como tal.

Aos meus sogros que tem exercido papel de pais em minha vida, presentes todos os dias principalmente nessa reta final me estimulando e ajudando.

A professora Élide pelos ensinamentos, desafios, confiança, conselhos, paciência para me mostrar o mundo da pesquisa que a priori me parecia algo tão obscuro e difícil.

Ao professor Osmindo que com bom humor e simpatia me ensinou e ajudou em meus experimentos com cromatografia.

Ao pessoal do laboratório de Bioquímica da Nutrição: Professora Sandra, Natália e em especial Marcela, que tanto me ensinaram e ajudaram nos meus primeiros passos no laboratório.

A aluna de IC, Luane, por me ajudar na realização de alguns experimentos.

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	6
LISTA DE FIGURAS	7
ABSTRACT	8
RESUMO	9
1. INTRODUÇÃO	10
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
2.1 AS FRUTAS NO CONTEXTO DA ALIMENTAÇÃO SAUDÁVEL.....	12
2.2 A BIODIVERSIDADE DO CERRADO BRASILEIRO	13
2.2.1 Frutos Nativos do Cerrado	14
2.2.2 Tucum-do-Cerrado (<i>Bactris setosa</i> Mart.)	16
2.3 A FORMAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROs)	20
2.4 EFEITOS BIOLÓGICOS DAS EROS.....	22
2.5 DANO OXIDATIVO E AS EROS	24
2.6 SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE	25
2.6.1 Sistema Antioxidante Enzimático	26
2.6.2 Sistema Antioxidante Não Enzimático	27
2.6.2.1 <i>Compostos Fenólicos</i>	27
3. OBJETIVOS	29
3.1 OBJETIVO GERAL.....	29
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
4. METODOLOGIA	30
4.1 AMOSTRA DE TUCUM - DO - CERRADO	30
4.2 PREPARO DOS EXTRATOS DE TUCUM-DO-CERRADO.....	30
4.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DA CASCA DE TUCUM-DO-CERRADO.....	31
4.3.1 Capacidade total de redução de ferro (Ferric reducing antioxidant power).....	31
4.3.2 Ensaio de medida de dano oxidativo à 2-desoxirribose (2-DR).....	32
4.4 ENSAIOS UTILIZANDO LEVEDURAS <i>Saccharomyces cerevisiae</i> PARA AVALIAR AS PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES DAS FRAÇÕES DO TUCUM-DO-CERRADO.	33
4.4.1 Linhagem de levedura	33
4.4.2 Meio de crescimento e condições de cultura	34
4.4.3 Exposição das células de levedura a oxidante na presença de extrato e frações do Tucum-do-Cerrado em microplaca	34
4.5 IDENTIFICAÇÃO E SEPARAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS DO TUCUM-DO-CERRADO	34
4.5.1 Análise por HPLC-DAD	35
4.5.2 Espectrometria de massa	35
REFERÊNCIAS	36
ARTIGO SUBMETIDO	42

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

EROs	Espécies reativas de oxigênio
BSA	Proteína albumina do soro bovino
AVC	Acidente vascular cerebral
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
·O₂⁻	Radical superóxido
·OH	Radical hidroxil
HPLC-DAD	Cromatografia líquida de alta performance-detector fotodiodo
CHP	Cumeno hidroperóxido
NAD	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
ATP	Trifosfato de adenosina
FAD	Dinucleótido de flavina e adenina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
2-DR	2-desoxirribose
SOD	Superóxido dismutase
GSH	Glutationa reduzida
GPx	Glutationa peroxidase
CAT	Catalase
TRX	Tioredoxina redutase
GRX	Glutaredoxina
NRF2	Do inglês: nuclear respiratory factor 2
NF-KB	Fator nuclear k-b
ARE	Elemento de resposta antioxidante
Keap1	Do inglês: kelch-like ech-associated protein 1
ABS	Absorbância
MALDI-TOF	Do inglês: mass spectrometry-matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight
FRAP	Do inglês: ferric reducing antioxidant power
TPTZ	Tripiridil-s-triazina
TBA	Ácido tiobarbitúrico
MDA	Malondialdeído
EAq	Extrato aquoso
EE	Extrato etanólico

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Distribuição geográfica dos principais biomas do Brasil	13
Figura 2: Palmeira do Tucum-do-Cerrado e suas folhas	16
Figura 3: O fruto do Tucum-do-Cerrado	17
Figura 4: Reação redox da Ubiquinona	20
Figura 5: Citocromo c com destaque para os grupos hemes	20
Figura 6: Cadeia transportadora de elétrons	21
Figura 7: Fases da peroxidação lipídica	24
Figura 8: Esquema de classificação e subdivisão dos compostos fenólicos	28
Figura 9: Localização da coleta do fruto do Tucum-do-Cerrado	30

ABSTRACT

Among the edible fruits of the Brazilian savanna, tucum-do-cerrado (*Bactris setosa* Mart) stands out due to its high antioxidant potential and polyphenol content. We investigated the aqueous extract of tucum-do-cerrado regarding its mechanism of action and the antioxidant potential of its fractions. The aqueous extract was fractionated by HPLC and the fractions analyzed in terms of their antioxidant activity by means of the oxidative degradation of 2-deoxyribose. Five fractions were selected based on the antioxidant activity observed *in vitro* and components of three of them were identified as cyanidin, peonidin and quercetin. The selected HPLC samples, on the other hand, showed a detrimental effect on yeast cell growth in the presence of H₂O₂. Thus our results advance in identifying tucum-do-cerrado compounds with antioxidant activity. The results show dichotomous actions of the tucum-do-cerrado compounds that should be investigated thoroughly to uncover the real possibilities of tucum-do-cerrado in contributing to good human health.

Keywords: *Bactris setosa*, antioxidants, yeast, HPLC, cyanidin, peonidin, quercetin.

RESUMO

Entre os frutos comestíveis do cerrado brasileiro, o tucum-do-cerrado (*Bactris setosa* Mart) se destaca devido ao seu alto potencial antioxidante e conteúdo de polifenóis. Nós investigamos o extrato aquoso de tucum-do-cerrado quanto ao seu mecanismo de ação e o potencial antioxidante de suas frações. O extrato aquoso foi fracionado por HPLC e as frações analisadas em termos da sua atividade antioxidante por meio da degradação oxidativa de 2-desoxirribose. Cinco frações foram selecionadas com base na atividade antioxidante observada *in vitro* e os componentes de três delas foram identificados como cianidina, peonidina e quercetina. No entanto, as amostras de HPLC selecionadas apresentaram um efeito prejudicial sobre o crescimento de células de levedura na presença de H₂O₂. Assim, nossos resultados avançam na identificação de compostos tucum-do-cerrado com atividade antioxidante. Os resultados mostram ações dicotômicas dos compostos tucum-do-cerrado que devem ser investigadas cuidadosamente para descobrir as reais possibilidades de tucum-do-cerrado em contribuir para a boa saúde humana.

Palavras-chave: *Bactris setosa*, antioxidantes, levedura, HPLC, cianidina, peonidina, quercetina.

1. INTRODUÇÃO

Muitos estudos têm demonstrado uma relação inversa entre o consumo de frutas e hortaliças com a incidência de determinadas doenças humanas, como acidente vascular cerebral, doenças cardíacas e cânceres de pulmão, de estômago e esôfago, e do cólon retal (LOCK *et al.*, 2005; HU *et al.*, 2014). Esse efeito protetor pode estar relacionado ao fato de frutas e hortaliças serem fontes de compostos bioativos com propriedade antioxidante (LARSON, 1988; FARIA *et al.*, 2011; GOMES-ROCHETTE *et al.*, 2016), os quais combatem a oxidação de biomoléculas sob condição de estresse oxidativo (HALLIWELL, 2005). O estresse oxidativo ocorre quando há um desequilíbrio entre a produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) e as defesas antioxidantes. Essa condição tem sido relacionada a diversas doenças humana, como câncer e Alzheimer (HALLIWELL, 2005).

Os antioxidantes são importantes para a homeostase celular, pois eles auxiliam na detoxificação de EROs que são geradas durante o metabolismo aeróbico normal (SCHIEBER & CHANDEL, 2014). As EROs podem ter função sinalizadora (FINKEL, 2011), mas também podem causar danos oxidativos à biomoléculas (DNA, proteínas e lipídeos) (KALYANARAMAN, 2013). O radical hidroxil ($\cdot\text{OH}$) é formado pela reação entre o H_2O_2 com Fe^{2+} (Reação de Fenton), e é a forma mais reativa que indiscriminadamente causa danos à biomoléculas ou instabilidade genômica (GLASAUER & CHANDEL, 2014). O organismo dispõe de defesas antioxidantes que podem ser enzimáticas e não enzimáticas (KOURY & DONÂNGELO, 2003). A defesa antioxidante enzimática compreende enzimas, tais como catalase, superóxido dismutase, glutationala peroxidase, que atuam diretamente sobre EROs específicas, enquanto a não enzimática corresponde aos compostos (endógenos ou oriundos da dieta) com atividade antioxidante os quais podem atuar sequestrando EROs ou quelando o ferro (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

O Cerrado representa o segundo maior ecossistema brasileiro (IBGE, 2016) e a savana com maior biodiversidade no mundo (MENDONÇA *et al.*, 2008). Este bioma apresenta características climáticas peculiares, pois a região apresenta duas estações bem definidas: primavera-verão chuvosa e o outono-inverno extremamente seco (SILVA; ASSAD; EVANGELISTA, 2008). O clima adverso e as frequentes queimadas definem limites de tolerância para as espécies vegetais desenvolverem mecanismos de sobrevivência e se adaptarem a estresses bióticos e abióticos (SILVA; ASSAD; EVANGELISTA, 2008). Ao longo dos anos, as plantas do Cerrado devem ter desenvolvido mecanismos específicos para sua seleção natural ao estresse oxidativo gerado por esses fatores, principalmente na forma de

compostos bioativos antioxidantes (SIQUEIRA *et al.*, 2013). Um estudo recente avaliou a composição de compostos bioativos e o potencial antioxidante de doze frutos do Cerrado e mostrou que sete frutos – araticum (*Annona crassiflora* Mart), cagaita (*Eugenia dysenterica* DC.), cajuzinho (*Anacardium humile* St. Hil), jurubeba (*Solanum paniculatum* L.), lobeira (*Solanum grandiflorum* Ruiz & Pav.), mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes) e Tucum-do-Cerrado (*Bactris setosa* Mart) – apresentaram atividade antioxidante correspondente ao elevado teor de compostos fenólicos, comparado com os valores da maçã Red Delicious (*Malus domestica*), fruto convencional com alta atividade antioxidante, sendo o Tucum-do-Cerrado o fruto de maior destaque (SIQUEIRA *et al.*, 2013).

O Tucum-do-Cerrado é um fruto de aparência similar à jabuticaba, usado para fabricação de geléias, doces e sorvetes, além do seu consumo *in natura* (VIEIRA *et al.*, 2010). O Tucum-do-Cerrado pode ser considerado uma excelente fonte de compostos bioativos como flavonóides, antocianinas e vitamina C (SIQUEIRA *et al.*, 2013), sendo que a maior concentração desses compostos está presente na casca do fruto (ROSA *et al.*, 2016). Ensaios *in vitro* em células de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* expostas a oxidantes identificaram proteção antioxidante promovida pelo extrato da casca e da casca mais polpa do Tucum-do-Cerrado, além da proteção também identificada contra o dano oxidativo à proteína albumina do soro bovino (BSA) e peroxidação lipídica (SOUZA, 2013). Ensaios *in vivo* com ratos suplementados com ferro também detectaram proteção antioxidante promovida pelo consumo diário de Tucum-do-Cerrado (FUSTINONI-REIS *et al.*, 2016). Um estudo recente identificou as principais classes de compostos fenólicos presente na casca de Tucum-do-Cerrado por técnica de cromatografia líquida de alta performance (HPLC), são elas: flavonoides, antocianinas, flavonas, ácidos fenólicos e estilbenos (ROSA *et al.*, 2016).

Embora as classes específicas de compostos fenólicos presentes na casca do Tucum-do-Cerrado tornaram-se recentemente conhecidas (ROSA *et al.*, 2016), não existem estudos relacionados a associação de compostos do Tucum-do-Cerrado à atividade antioxidante apresentada pelo extrato aquoso da casca ou descrevendo mecanismos antioxidantes prováveis apresentadas pelo extrato. Portanto, o objetivo do presente estudo foi relacionar a atividade antioxidantes de compostos específicos da casca de Tucum-do-Cerrado por meio do ensaio de degradação de 2-desoxirribose (Genaro-Mattos *et al.*, 2009) e pela avaliação do crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* expostos a oxidantes.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 AS FRUTAS NO CONTEXTO DA ALIMENTAÇÃO SAUDÁVEL

A alimentação saudável, balanceada e diversificada é fator determinante para a promoção da saúde física e mental (BRASIL, 2006). Neste contexto, as frutas devem fazer parte das refeições diárias, sendo recomendado o consumo variado com relação às cores, composições e valores nutricionais relacionados às fibras, proteínas, carboidratos, vitaminas e sais minerais (BRASIL, 2006). De modo geral, as frutas têm altos teores de carboidratos (glicose, frutose, outros açúcares solúveis e pectina), vitaminas, minerais, fibras e ácidos orgânicos, embora sejam geralmente muito pobres em proteínas e gorduras (ORNELLAS, 1988; BRASIL, 2014). Além disso, elas são fontes de compostos fitoquímicos antioxidantes, os quais são substâncias que retardam ou previnem a oxidação de moléculas, e podem ser exemplificadas pelos carotenóides (beta-caroteno, licopeno), flavonoides, taninos, estilbenos, ácidos fenólicos e as vitaminas C, E e A (LARSON, 1988; SAIKIA; MAHNOT; MAHANTA, 2015; GOMES-ROCHETTE *et al.*, 2016).

A Organização Mundial da Saúde recomenda o consumo de 400 g/dia de frutas, o que é equivalente a cinco porções diárias (OMS, 2003). O consumo adequado de frutas e hortaliças pode ajudar na prevenção de doenças cardiovasculares e alguns tipos de câncer (OMS, 2002). A ingestão insuficiente desses alimentos está entre os 10 fatores de risco associados às essas doenças no contexto mundial (OMS, 2002). Muitos estudos têm demonstrado uma relação inversa entre o consumo de frutas e hortaliças com a incidência de determinadas doenças. Um estudo de meta-análise com 760.629 voluntários observou associação inversa entre consumo de frutas e hortaliças com o risco de acidente vascular cerebral (AVC). Também mostrou que o consumo de frutas cítricas, maçãs, pêras e vegetais folhosos pode contribuir para prevenção da doença (HU *et al.*, 2014). O estudo de Lock e colaboradores (2005) analisou a carga global de doenças atribuída ao baixo consumo de frutas e hortaliças, onde houve associação com seis doenças (doença cardíaca isquêmica, AVC e cânceres de pulmão, colorretal, estômago e esôfago). Os autores concluíram que a mortalidade mundial por essas doenças atribuída ao inadequado consumo de frutas e hortaliças foi de 2.6 milhões de mortes por ano.

Mais de cem doenças estão associadas à oxidação de constituintes do sistema biológico em situação de estresse oxidativo (HALLIWELL, 2005), e por isso os alimentos fonte de compostos antioxidantes desempenham papel importante na promoção de saúde.

2.2 A BIODIVERSIDADE DO CERRADO BRASILEIRO

O Brasil é o país detentor da maior diversidade biológica do planeta, possuindo cerca de vinte por cento das espécies de plantas e de animais conhecidas no mundo, distribuídas em seus distintos biomas (BRASIL, 2016). O Cerrado é o segundo maior ecossistema Brasileiro, possui 2.036.448 km², o que equivale a aproximadamente 24% do território nacional (IBGE, 2016).

A delimitação geográfica do bioma do cerrado é constantemente alterada, pois a localização de cada bioma é condicionada pelos fatores climáticos, principalmente temperatura, pluviosidade e umidade relativa, e o fator de menor interferência: tipo de substrato (RIBEIRO & WALTER, 2008). O Cerrado é a segunda maior formação vegetal brasileira, estando a maior parte concentrada na área do Planalto Central do Brasil (Figura 1), abrangendo os estados: Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Rondônia, Goiás, Tocantins, Maranhão, Piauí, Bahia, Minas Gerais, São Paulo e Distrito Federal. E também ocorre em áreas disjuntas ao norte nos estados do Amapá, Amazonas, Pará e Roraima, e ao sul em pequenas áreas do Paraná (SILVA; ASSAD; EVANGELISTA, 2008).



Figura 1. Distribuição geográfica dos principais biomas do Brasil. Em destaque, a área ocupada pelo Cerrado.

Fonte: RIBEIRO & WALTER, 2008.

Devido às relações ecológicas e fisionômicas com as Savanas da América Tropical, do Sudeste Asiático e dos continentes Africano e Australiano, o Cerrado pode ser considerado uma Savana. (WALTER; CARVALHO; RIBEIRO, 2008). A biodiversidade da Savana brasileira a eleger a Savana mais rica do mundo: a flora tem 4.400 espécies exclusivas; a fauna apresenta 837 espécies de aves, 67 gêneros de mamíferos, 150 espécies de anfíbios e 120 de répteis (IBGE, 2015). Em termo de flora vascular, também é a mais rica dentre as Savanas: são 12.356 espécies já identificadas (MENDONÇA *et al.*, 2008).

O Cerrado apresenta características climáticas peculiares, pois a região apresenta duas estações bem definidas: uma chuvosa, que se inicia nos meses de setembro e outubro e se estende até os meses de março e abril, onde os meses de novembro, dezembro e janeiro são os que apresentam a maior média mensal de precipitação; e a estação seca ocasionada pela redução drástica das chuvas. Essa estação se inicia em abril e maio e se estende até os meses de setembro a outubro (SILVA; ASSAD; EVANGELISTA, 2008).

A distribuição da flora do Cerrado é influenciada não somente pelo clima, mas também pela latitude, frequência de queimadas, profundidade do lençol freático, solo ácido, pastejo e fatores antrópicos (RIBEIRO & WALTER, 2008). Do ponto de vista ecológico, a estação seca é a mais importante, pois a deficiência hídrica define limites de tolerância para as espécies vegetais desenvolverem mecanismos de sobrevivência e se adaptarem ao ambiente (SILVA; ASSAD; EVANGELISTA, 2008). Além disso, o sua vegetação se desenvolve em solos ácidos e pobres em nutrientes, com alta concentração de alumínio (KLINK & MACHADO, 2005). Esses fatores adversos do Cerrado podem ter sido determinantes para a flora ter desenvolvido mecanismos de defesa, principalmente na forma de compostos bioativos para superar o estresse oxidativo (SIQUEIRA *et al.*, 2013).

2.2.1 Frutos Nativos do Cerrado

A enorme biodiversidade existente no Cerrado só era utilizada pela população indígena, até que houve a transferência da capital federal para Brasília e a política de interiorização e de integração nacional, que fizeram com que a região do Centro Oeste fosse explorada e inserida no contexto de produção de alimentos (VIEIRA *et al.*, 2010). Embora a região tenha evoluído no contexto agrícola, muitas espécies nativas do Cerrado continuam restritas ao uso da população local (VIEIRA *et al.*, 2010). Esse extrativismo representa um

potencial econômico para famílias que se favorecem com o eco-turismo regional, prática em ascensão na região Centro-Oeste (VIEIRA *et al.*, 2010).

Almeida e colaboradores (1998) descreveram a botânica e o uso potencial de cento e dez espécies vegetais do cerrado utilizadas frequentemente pela população rural e urbana da região. A maioria dessas espécies é utilizada para diversos fins, tais como: frutífero, madeireiro, medicinal, ornamental, forrageiro, etc (ALMEIDA *et al.*, 1998). Exemplos da versatilidade das espécies vegetais do cerrado são encontrados com facilidade na redondeza: o Baru com potencial madeireiro; espécies de palmeiras que além dos frutos, fornecem folhas para cobertura de tetos e disponibilizam fibras para fabricação de redes, chapéus, peneiras; o pecíolo do buriti é utilizado em confecção de moveis, brinquedos e até mesmo barcos; da polpa de alguns frutos são extraídos corantes utilizados para tingir tecidos (ALMEIDA *et al.*, 1998). Além disso, como herança indígena, uma prática importante é a utilização de espécies nativas do cerrado para fins medicinais que acontece desde muitos anos. Alguns efeitos medicinais dessas espécies são: laxante, controle glicêmico, cicatrizante, anti bronquite, controle de queda de cabelo, e entre outros benefícios (ALMEIDA *et al.*, 1998). Um levantamento do uso e comercialização de espécies vegetais nativas do cerrado em Alto Paraíso/GO registrou cerca de cem espécies usadas para fins fitoterápicos, compondo garrafadas, chás, pomadas e travesseiros (SOUZA & FELFILI, 2006).

Vinte e seis espécies foram identificadas com aproveitamento alimentar (ALMEIDA *et al.*, 1998), sendo a maioria delas desconhecidas pelas outras regiões do Brasil (VIEIRA *et al.*, 2010). As espécies frutíferas do Cerrado são muito utilizadas para o consumo *in natura* ou para a produção de doces, geleias, mingaus, pães, bolos, bolinhos fritos, tortas, paçoquinhas, sorvetes, pratos salgados, licores (ALMEIDA *et al.*, 1998), polpas congeladas e barras de cereais (VIEIRA *et al.*, 2010). Os frutos apresentam sabores e aromas peculiares, além do valor nutricional agregado (VIEIRA, 2010), com elevados teores de açúcares, proteínas, vitaminas, minerais (ROESLER *et al.*, 2007; ALMEIDA; COSTA; SILVA, 2008) e compostos fenólicos com atividade antioxidante (ROESLER *et al.*, 2007; SIQUEIRA *et al.*, 2013).

Além de fonte alimentar, a densidade nutricional confere às frutas do Cerrado atividade funcional, podendo atuar na prevenção de doenças crônicas e envelhecimento precoce (SIQUEIRA *et al.*, 2013). Além disso, esses frutos podem ser matéria prima de novos compostos bioativos antioxidantes para indústria farmacêutica (SIQUEIRA *et al.*, 2013). Por fim, o elevado teor de nutrientes e o uso popular desses frutos, revelam a importância desses

alimentos para o complemento alimentar na área rural e potenciais econômico e farmacêutico – ainda pouco explorados.

2.2.2 Tucum-do-Cerrado (*Bactris setosa* Mart.)

O Tucum-do-Cerrado pertence ao e Magnoliophyta (Angiospermae), classe Liliopsida (monocotyledonae), ordem Arecales e família Areaceae (Palmae). Seu nome científico é *Bactris setosa* Mart, é uma palmeira de hábito arbórea e encontrada frequentemente em mata ciliar e mata de galeria (MENDONÇA *et al.*, 2008), sendo popularmente conhecido também como tucum-do-brejo, uva-da-terra ou simplesmente tucum (SILVA *et al.*, 2001).

O Tucum-do-Cerrado, como podemos ver na figura abaixo, é uma palmeira arbustiva com 2 a 4,5m de altura (Figura 2A), caules aglomerados com 2 a 9 caules por touceira, e tronco coberto de espinhos muito finos e agudos (Figura 2B). As figuras 2C e 2D mostram as folhas da palmeira, 2 a 8 por caule aéreo, possuem espinhos de cor amarelada com a extremidade preta, distribuídos uniformemente na parte inferior das folhas e pecíolo.



Figura 2 – Palmeira do Tucum-do-Cerrado e suas folhas. (A) Palmeira do Tucum-do-Cerrado; (B)

Tronco do Tucum-do-Cerrado; (C) Folhas da palmeira do Tucum-do-Cerrado; (D) Folha com setas para identificação dos espinhos.

Fonte: Marcela Berckmans (Fotos tiradas em 21/02/2015).

As inflorescências são interfoliárias e ramificadas, frutifica de janeiro a abril. O Tucum-do-Cerrado é encontrado em cachos na palmeira (figura 3A), cerca de 3 a 4 cachos por palmeira. Como podemos visualizar a figura abaixo, ele é um fruto similar à jabuticaba, apresenta formato circular com dimensão de aproximadamente 1,3 a 2,2 cm e coloração negro-arroxeadado (Figura 3C). As peculiaridades do Tucum-do-Cerrado em relação à jabuticaba são: a casca possui coloração opaca e textura fibrosa, a polpa também fibrosa e tem coloração mais esbranquiçada, e o caroço é bem rígido e maior (Figura 3B).

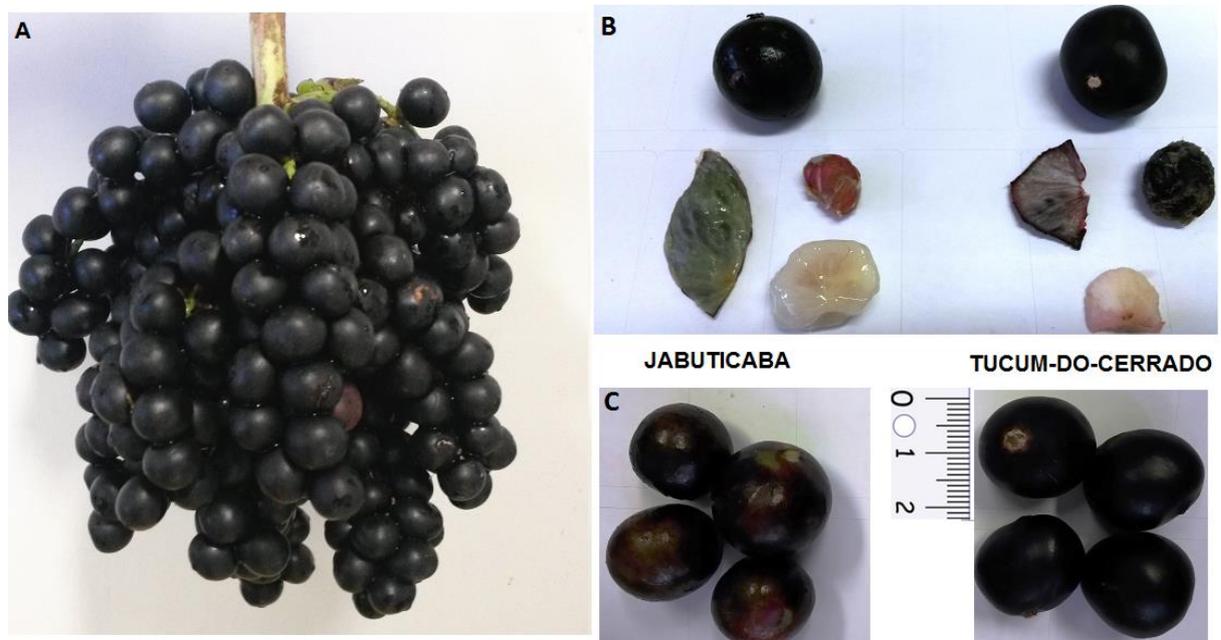


Figura 3 – O fruto do Tucum-do-Cerrado. (A) O cacho do Tucum-do-Cerrado; (B) Comparação das partes do fruto Tucum-do-Cerrado e jabuticaba; (C) Similaridade externa do Tucum-do-Cerrado e Jabuticaba, em detalhe, régua em centímetros.

Fonte: Marcela Berckmans (Fotos tiradas em 21/02/2015).

O fruto é consumido *in natura* e também na forma de suco, sorvete, geleia e vinho (SILVA *et al.*, 2001). As folhas também são amplamente utilizadas na cultura indígena para a produção de redes, cordas de arco, linhas de pesca, artesanatos, entre outros. Isso porque elas possuem fibras resistentes e flexíveis, consideradas superiores ao linho. A semelhança com outras fibras têxteis vegetais faz do Tucum-do-Cerrado um bom potencial de aplicação em atividades têxteis (DUARTE *et al.*, 2012).

A avaliação da composição de compostos bioativos e do potencial antioxidante de doze frutos do Cerrado brasileiro (araticum, baru, cagaita, cajuzinho, guariroba, ingá, jatobá, jenipapo, jurubeba, lobeira, mangaba e tucum do cerrado) apresenta o Tucum-do-Cerrado como o fruto de maior destaque, até mesmo em relação à maçã red delicious, fruto convencional com alta atividade antioxidante (BOYER & LIU 2004; SIQUEIRA *et al.*, 2013). O fruto do Tucum-do-Cerrado representa uma excelente fonte de compostos bioativos como flavonóides, antocianinas e vitamina C (Tabela 1) (SIQUEIRA *et al.*, 2013).

Tabela 1 - Caracterização dos compostos bioativos presentes no fruto inteiro do Tucum-do-Cerrado.

COMPOSTOS BIOATIVOS	Resultado	Observação
Flavanóis Totais (mg catequina/100g)	717	15 – 19 vezes > maçã*
Antocianinas Totais (mg/100g)	83	35 vezes > maçã*
Flavonóides amarelos (mg/100g)	42	8 vezes > maçã*
Vitamina C (mg/100g)	78	2,5 – 3 vezes > maçã*

Fonte adaptada: SIQUEIRA *et al.*, 2013.

*Red delicious

A casca do Tucum-do-Cerrado apresenta maior concentração para vários compostos analisados – fenólicos totais, flavanóis totais, antocianinas totais, flavanóides amarelos, vitamina c e carotenóis - em relação à polpa ou fruto inteiro (ROSA *et al.*, 2016). Assim, a capacidade antioxidante do fruto está associada principalmente aos compostos presentes na casca. Entretanto, para todas as frações - casca, polpa e fruto inteiro-, o Tucum-do-Cerrado não pode ser considerado um alimento fonte de carotenóides (0,15mg β -caroteno/100g), pois as concentrações são baixas comparadas à cenoura (2.455mg β -caroteno /100g), alimento fonte desses compostos (CONTADO *et al.*, 2010). O Tucum-do-Cerrado também não pode ser considerado um alimento fonte de flavanóides amarelos (42 mg/100g), comparando seu teor com o caju (105 mg/100g), por exemplo, uma fruta fonte de flavanóides amarelos. (MOURA *et al.*, 2001).

Ensaio *in vivo* com ratos alimentados com dieta enriquecida em ferro, polpa e casca de tucum do cerrado apresentaram diminuição dos níveis de malondialdeído no fígado quando comparados com animais que receberam dieta enriquecida com ferro, sugerindo proteção antioxidante promovida pelo consumo diário de tucum-do-cerrado (FUSTINONI-REIS *et al.*, 2016). Outro estudo com ensaios *in vitro*, utilizando células de levedura *Saccharomyces cerevisiae*, também testou a proteção antioxidante promovida por extratos - aquoso e

etanólico - das frações do Tucum-do- Cerrado (casca, polpa mais casca e polpa) (SOUZA, 2013). As leveduras foram expostas aos extratos de Tucum-do-Cerrado e aos oxidantes peróxido de hidrogênio (H_2O_2), menadiona e cumeno hidroperóxido (CHP) com concentrações previamente estabelecidas. A análise mostrou que houve aumento significativo do crescimento celular utilizando ambos os extratos da casca do fruto quando comparadas com curvas de crescimento do controle oxidante, comprovando a proteção antioxidante promovida pelo extrato do fruto. Sendo assim, neste estudo também foi verificado que os extratos da casca do Tucum-do-Cerrado apresentaram maior atividade antioxidante, seguido pelos extratos de casca mais polpa, e os extratos da polpa não apresentaram capacidade antioxidante significativa, o que indica que os compostos bioativos estão presentes na casca do fruto (SOUZA, 2013).

Foi estudada também a proteção à peroxidação lipídica através de ensaios de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) (SOUZA, 2013). Os extratos aquoso e etanólico da casca e polpa mais casca do Tucum-do-Cerrado apresentaram capacidade antioxidante, enquanto que o extrato da polpa só apresentou atividade em extrato aquoso, indicando uma baixíssima atividade antioxidante comparada as demais partes do fruto. Além disso, ao comparar a atividade antioxidante da maçã com a atividade antioxidante encontrada no Tucum-do-Cerrado foi verificado que os extratos da casca e casca mais polpa foram superiores à capacidade antioxidante da maçã (SOUZA, 2013).

Ao analisar a proteção dos extratos de Tucum-do-Cerrado contra o dano oxidativo na proteína Albumina do Soro Bovino (BSA), o ensaio de dano à proteína mostrou que apenas o extrato aquoso da casca do fruto foi capaz de proteger o dano oxidativo (SOUZA, 2013). Reforçando mais uma vez que a capacidade antioxidante está associada aos compostos presentes na casca e que o Tucum-do-Cerrado pode ser considerado um alimento fonte de compostos bioativos.

Recentemente realizou-se a análise dos compostos presentes na casca do fruto Tucum-do-Cerrado por meio de fracionamento em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência HPLC (ROSA *et al.*, 2016). Em todos os extratos analisados – aquoso, metanólico e etanólico -, três principais classes de compostos fenólicos foram identificados: flavonóides, ácidos fenólicos e estilbenos. Dentre os flavonóides destacaram-se por apresentar maior concentração os flavanóis (catequina), flavonóis (quercetina) e algumas antiocianinas (cianidina e pelargonidina). Dentre os ácidos fenólicos destacaram-se o ácido gálico, caféico e ferúlico. Os estilbenos e resveratrol foram identificados em menor quantidade (ROSA *et al.*, 2016). No extrato aquoso foram quantificados em maior abundância flavanóis (catequina) e

antocianinas (cianidina), seguido por flavonas (rutina), ácido hidrobenzóico (gálico) e em menor concentração, o ácido hidroxicinâmico (caféico) (ROSA *et al.*, 2016).

2.3 A FORMAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROs)

O produto da degradação das biomoléculas – carboidratos, lipídios e proteínas (aminoácidos) – é direcionado para a cadeia respiratória, onde ocorre o processo de fosforilação oxidativa. A função global da cadeia respiratória é a oxidação do NADH e do FADH_2 , bem como o transporte de equivalentes reduzidos ao longo de outros transportadores para o acceptor final, o oxigênio (O_2). Ao final da cadeia respiratória ocorre formação de H_2O e geração de ATP pela ATP sintase (NELSON & COX, 2014).

A cadeia respiratória é composta de 4 complexos dispostos na membrana interna mitocondrial. Os elétrons são transportados para os complexos através de moléculas carregadoras, sendo elas: NAD, FAD, ubiquinona, citocromos e proteínas com centros ferro-enxofre. A ubiquinona é uma benzoquinona solúvel em lipídeos, com uma longa cadeia lateral de isoprenoide. A ubiquinona pode aceitar um elétron para se tornar o radical semiquinona ($\cdot\text{QH}$) ou 2 elétrons para formar ubiquinol (QH_2) (Figura 4). Assim como os carregadores FAD, a ubiquinona atua na junção entre um doador de dois elétrons e um acceptor de um elétron. O citocromo c é uma proteína que contém um grupo prostético heme contendo ferro. Os hemes do citocromo c são covalentemente ligados por meio de resíduos de Cys (Figura 5). O potencial de redução padrão do átomo de ferro do heme depende de sua interação com as cadeias laterais da proteína (NELSON & COX, 2014).

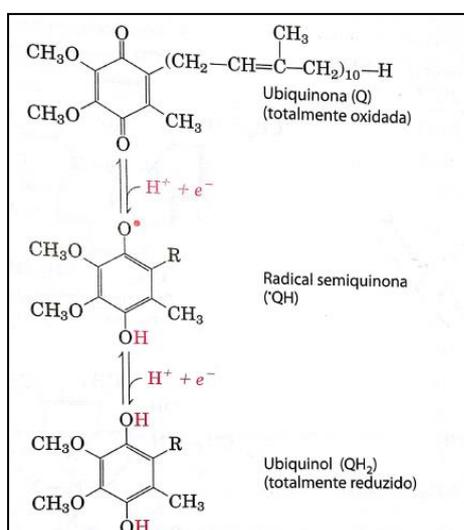


Figura 4: Reação redox da Ubiquinona.
Fonte: NELSON & COX, 2014.

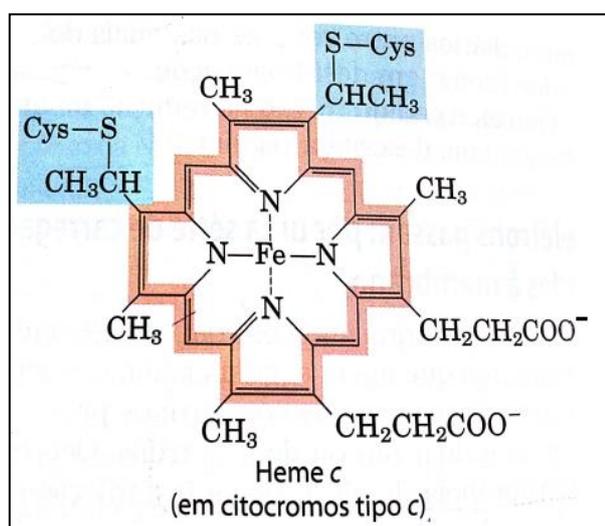


Figura 5: Citocromo c com destaque para os grupos hemes.
Fonte: NELSON & COX, 2014.

A porta de entrada de elétrons para a cadeia respiratória é via NADH e FADH₂ (Figura 6), de maneira que esses elétrons são transferidos para os complexos I e II, respectivamente. Ao entrar nestes complexos, os elétrons são transferidos para a ubiquinona e então, são direcionados para o complexo III. Ao passar pelo complexo III, os elétrons são transferidos para o citocromo c, e em seguida, para o complexo IV que doa os elétrons para o oxigênio (NELSON & COX, 2014).

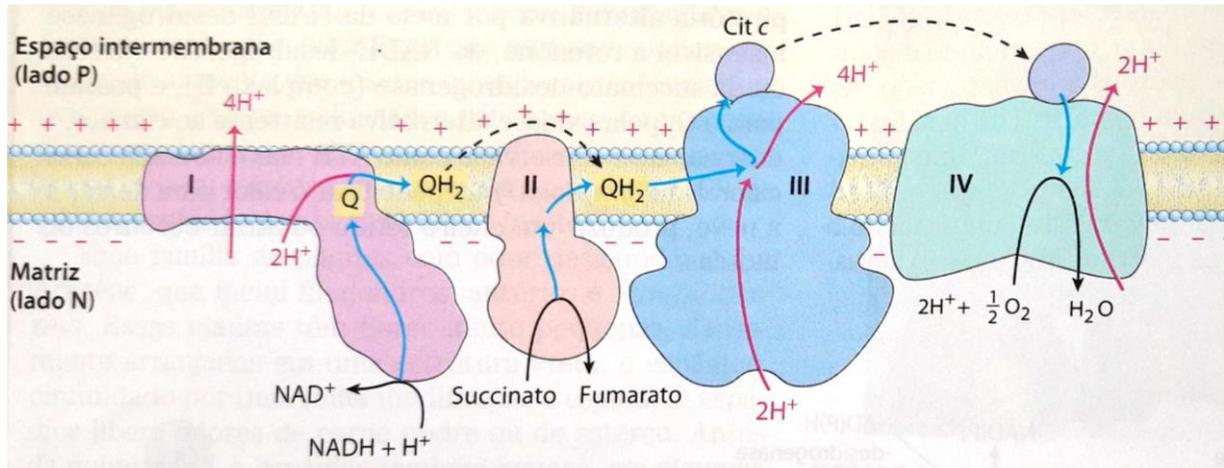
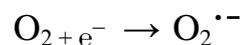
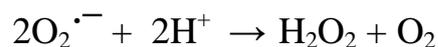


Figura 6: Cadeia transportadora de elétrons.
Fonte: NELSON & COX, 2014.

Como dito anteriormente, o aceptor final da cadeia respiratória é O₂, no entanto, uma pequena porcentagem – estima-se que 1% a 5% - do oxigênio que consumimos pode ser reduzido, transformando-se em radical superóxido (O₂^{•-}), uma Espécie Reativa de Oxigênio (EROs) (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007):



O radical livre superóxido é altamente reativo, e para impedir o dano oxidativo induzido pelo O₂^{•-}, as células têm diversas formas da enzima superóxido-dismutase que catalisa a reação de formação de outra ERO menos reativa: o H₂O₂ (NELSON & COX, 2014).



O H₂O₂ por sua vez pode reagir com o Fe²⁺ (Reação de Fenton), formando o radical hidroxil (•OH), extremamente reativo que indiscriminadamente oxida proteínas, lipídeos e DNA, resultando em danos ou instabilidade genômica (GLASAUER & CHANDEL, 2014). O radical hidroxil pode ser formado também por meio da reação H₂O₂ com O₂^{•-} (reação de

Haber-Weiss, reação 3). O radical hidroxil é o produto da Reação de Fenton e o radical superóxido participa da reação de reciclagem do ferro (reação 2) (LIOCHEV & FRIDOVICH, 2002).



Sendo assim, a partir da formação do radical superóxido, a formação de outros EROs, ora menos reativo ora mais reativo, ocorre em cadeia. Além da formação de EROs como produto do metabolismo aeróbico (SCHIEBER & CHANDEL, 2014), outras fontes importantes são: NADPH oxidases (gera ânion superóxido), óxido nítrico sintases (gera óxido nítrico) e lipoxigenases (gera hidroperóxidos de ácidos graxos) (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007). Fatores externos como radiação ionizante, poluição, agentes oxidantes e quimioterápicos, também são responsáveis pela formação de EROs (DATO *et al.*, 2013).

2.4 EFEITOS BIOLÓGICOS DAS EROS

As EROs são frequentemente associadas com estresse oxidativo, o que sugere que as EROs estão envolvidas na indução de patologias por danificar lipídios, proteínas, e DNA (HALLIWELL, 2005; GLASAUER & CHANDEL, 2014). No entanto, nas últimas duas décadas tem-se tornado evidente que EROs também atuam como moléculas de sinalização intracelular para regular processos biológicos e fisiológicos (RIBEIRO *et al.*, 2005; FINKEL, 2011).

Um exemplo da função das EROs no organismo é seu papel na resposta imune a infecções e patógenos (KALYANARAMAN, 2013). Os fagócitos em geral possuem um mecanismo de defesa contra corpos estranhos onde ocorre um alto consumo de oxigênio, geralmente denominado queima ou explosão respiratória. Nesse processo, o oxigênio consumido é convertido em ânion superóxido e peróxido de hidrogênio através do complexo da NADPH oxidase (KALYANARAMAN, 2013). Essas espécies podem formar o radical hidroxil (reação de Harber-Weiss), oxidante potente que podem exercer papel antimicrobiano (GRANT *et al.*, 2012).

Há evidências de que as EROs também desempenham um papel importante na sinalização celular (SCHIEBER & CHANDEL, 2014). O princípio da sinalização redox consiste na oxidação dos resíduos de cisteína em proteínas, mediada por H_2O_2 (RHEE, 2006). O H_2O_2 é a EROs com forma mais estável e tem facilidade em atravessar membranas, o que é ideal para sinalização molecular (GLASAUER & CHANDEL, 2014). Durante a sinalização redox, o H_2O_2 oxida o resíduo de cisteína, provocando alterações alostéricas dentro da proteína que alteram a sua função. A forma oxidada da cisteína pode voltar à forma reduzida pela ação da tioredoxina redutase (Trx) e da glutaredoxina (GRX), e assim a função da proteína no seu estado original pode ser reestabelecida (WINTERBOURN & HAMPTON, 2008). A oxidação de resíduos de cisteína em proteínas serve como um mecanismo de transdução de sinal reversível (SCHIEBER & CHANDEL, 2014). No entanto, existem modificações que podem ser irreversíveis e resultar em permanentes danos à proteína. Portanto, as células têm enzimas antioxidantes dedicadas a evitar o acúmulo de H_2O_2 intracelular - principalmente, peroxirredoxinas, catalase e peroxidases glutathiona (SCHIEBER & CHANDEL, 2014).

Além da especificidade e seletividade das EROs em seus alvos, o local de produção de EROs dentro da célula é um importante determinante para ocorrência de danos ou sinalização redox (SCHIEBER & CHANDEL, 2014). Para sinalização redox eficaz, a oxidação de uma dada proteína pelo H_2O_2 deve ocorrer perto da fonte de produção de H_2O_2 . Por exemplo, as proteínas alvos de H_2O_2 gerado a partir de NADPH oxidases de membrana plasmática são também localizadas em membrana plasmática (SCHIEBER & CHANDEL, 2014).

Outro efeito biológico das EROs consiste na sua interação com os fatores de transcrição através da sinalização redox (HADDAD, 2002; FINKEL, 2011), tais como o fator nuclear de transcrição (NRF2) e Fator Nuclear K-B (NF-KB). O NRF2 regula a expressão de genes antioxidantes através de sua interação com o elemento de resposta antioxidante (ARE), localizado no DNA (SINGH *et al.*, 2010). O NRF2 encontra-se inativo no citoplasma celular associado à proteína Keap1 (do inglês, Kelch-like ECH-associated Protein 1). A ativação do fator de transcrição NRF2 é mediada pela presença de espécies reativas, levando a dissociação do complexo NRF2-Keap1 e translocação do NRF2 para o núcleo celular, permitindo assim, a transcrição dos genes e enzimas antioxidantes através da interação do NRF2 com AREs (ZHANG & HANNINK, 2003). O NRF2 modula a transcrição de aproximadamente 200 genes, cuja as proteínas formadas apresentam funções antioxidantes, enzimas de desintoxicação, proteínas de choque térmico e enzimas que sintetizam o GSH (do inglês, Growth-Stimulating Hormone) (GLASAUER & CHANDEL, 2014).

O NF- κ B é um fator de transcrição que pode ser ativado por oxidantes e sua atividade inibida por antioxidantes (RIBEIRO *et al.*, 2005). Complexado a uma proteína inibidora (I κ B), o NF- κ B encontra-se inativo no citosol. Quando ocorre aumento de EROs, o NF- κ B sofre redução e dissociação do complexo, o que permite sua ligação na sequência de DNA na região promotora dos genes alvo, iniciando a transcrição de genes que atuam como mediadores pró-inflamatório (HADDAD, 2002). Portanto, assim como o NRF2, a ativação desses fatores de transcrição é uma resposta à condição oxidante.

2.5 DANO OXIDATIVO E AS EROs

Estresse oxidativo é a condição de desequilíbrio entre a produção de EROs e as defesas antioxidantes (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007) fazendo com que tenha uma sobrecarga de pro-oxidantes (KALYANARAMAN, 2013). Como consequência desse desequilíbrio, podem ocorrer danos oxidativos às biomoléculas como DNA, proteínas e lipídios (KALYANARAMAN, 2013). Um dos principais danos causados pelas EROs é a peroxidação lipídica da membrana celular, além disso, o estresse oxidativo pode gerar danos a proteína e DNA, provocando diversas alterações na função celular (COVARRUBIAS *et al.*, 2008)

Os ácidos graxos poli-insaturados são os principais alvos para o ataque de radicais livres (NORDBERG & ARNÉR, 2001) através da peroxidação lipídica (Figura 7). A oxidação dos lipídios de membrana pode causar mudanças na estrutura e na fluidez celular (STYSKAL *et al.*, 2012). O produto inicial da oxidação de ácidos graxos insaturados são os hidroperóxidos lipídicos, mas outros intermediários também são formados. Um dos mais conhecidos formados na peroxidação lipídica é o malondialdeído (MDA). Esse composto reage facilmente com proteínas e DNA. Por ser solúvel em água, o MDA é suficientemente estável para se difundir do seu sítio de formação para outro sítio podendo causar danos ao DNA (STYSKAL *et al.*, 2012).

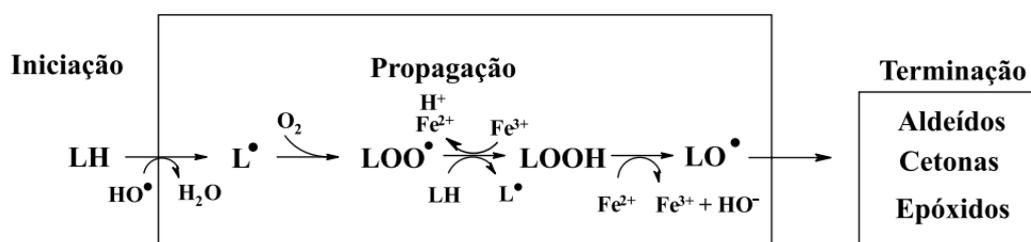


Figura 7: Fases da peroxidação lipídica.

Fonte: LOUREIRO; MASCIO; MEDEIROS, 2002.

Os aminoácidos são muito sensíveis a ataques de EROs. A nível celular, quando proteínas são expostas a EROs, ocorre alteração na estrutura da proteína é alterada. Essas modificações levam a alterações funcionais que perturbam o metabolismo celular. Uma vez oxidada, as proteínas podem ser reparadas ou, se o reparo não é possível, degradadas ou excluídas da célula para minimizar os possíveis efeitos negativos dessas proteínas danificadas. Os aminoácidos contendo enxofre (cisteína e metionina) são os únicos que possuem enzimas específicas reparadoras de dano oxidativo. (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007; STYSKAL *et al.*, 2012).

O DNA tanto nuclear como mitocondrial é susceptível a oxidação por EROs. As EROs reagem com as bases do DNA ou com a desoxirribose. A maior consequência do dano oxidativo ao DNA consiste na modificação das bases nitrogenadas que causam mutações, e caso não reparadas, causam alteração da expressão gênica (KALYANARAMAN, 2013). A oxidação do DNA tem sido relacionada fortemente com senescência celular, a apoptose e o desenvolvimento do fenótipo de células cancerígenas. (STYSKAL *et al.*, 2012).

2.6 SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE

Os antioxidantes podem ser definidos como compostos que em baixas concentrações retardam, inibem ou previnem a oxidação de moléculas estabilizando o produto final, e portanto, reduzem o estresse oxidativo *in vivo* (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007). Também podem ser definidos como compostos naturais ou sintéticos, que apresentam elevada estabilidade oxidativa e que tem propriedade de prevenir a oxidação das biomoléculas (ENGLBERGER *et al.*, 2009).

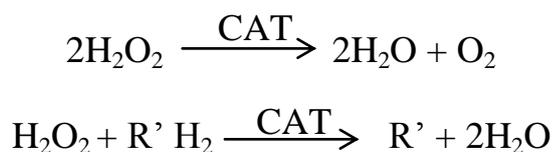
O organismo dispõe de diversos mecanismos de defesa antioxidante para prevenir ou reduzir os efeitos causados pelo estresse oxidativo (KOURY & DONANGELO, 2003). O sistema de defesa antioxidante nos animais pode atuar de três formas: como antioxidantes de prevenção, que impedem a formação de radicais livres; como sequestradores de radicais (scavengers), impedindo o ataque de radicais livres às células; ou como quelantes de metais, complexando metais de transição, e impedindo que estes participem de reações oxidativas em cadeia, e assim causem danos ao organismo (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007). Os compostos antioxidantes podem ser classificados em não enzimáticos e enzimáticos.

2.6.1 Sistema Antioxidante Enzimático

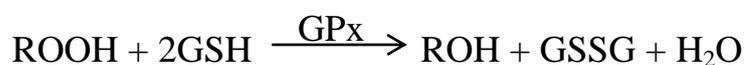
O sistema de defesa enzimático é composto pelas enzimas Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Glutathione Peroxidase (GPx) que atuam como a primeira linha de defesa contra os oxidantes. As enzimas antioxidantes atuam em conjunto para remover várias EROs produzidas por reações de radicais livres. As enzimas superóxido dismutases, CuZn-SOD (citossólica) e Mn-SOD (mitocondrial), são metalo-enzimas que catalizam a dismutação de $O_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 e O_2 (COVARRUBIAS *et al.*, 2008; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007). Na mitocôndria, o superóxido é formado relativamente em altas concentrações, devido à dispersão de elétrons da cadeia respiratória, sendo a MnSOD essencial (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007). Nessa reação, duas moléculas de superóxido formam peróxido de hidrogênio e oxigênio. A reação catalisada por SOD é extremamente eficiente.



O H_2O_2 gerado pelas superóxido dismutases é convertido em água e oxigênio pela catalase. Essa enzima também pode detoxificar outros substratos como fenóis e álcoois através da redução acoplada do H_2O_2 . A catalase (CAT) é uma heme-enzima que está localizada tanto no citosol como nos peroxissomos em células eucariotas.



A glutathione peroxidase (GPx) é outra enzima que converte o H_2O_2 em água. Além disso, ela também atua na proteção contra peróxidos orgânicos. A GPx é dependente de selênio e necessita da presença de glutathione reduzida (GSH) conforme a reação abaixo:



2.6.2 Sistema Antioxidante Não Enzimático

O sistema de defesa não-enzimático é classificado em endógeno – antioxidantes sintetizados pelo organismo - e exógeno – antioxidantes de origem dietética. Entre os compostos endógenos temos como exemplo a bilirrubina, a ceruloplasmina, os hormônios sexuais, a melatonina, a coenzima Q e o ácido úrico. Os compostos antioxidantes de origem dietética se destacam: vitaminas (vitamina C e E), carotenoides e compostos fenólicos (BIANCHI & ANTUNES, 1999; ORAIN & ESCRICHE, 2015).

2.6.2.1 Compostos Fenólicos

Os compostos fenólicos são produtos do metabolismo secundário das plantas e são responsáveis parcialmente pela capacidade antioxidante, cor e sabor (BRAVO, 1998; KARAÇELIK *et al.*, 2015). Na fisiologia vegetal, os compostos fenólicos têm diversos papéis como reprodução, desenvolvimento, crescimento, pigmentação, defesa e atuam como sinalizadores orgânicos (DOMENECH-CABO *et al.*, 2009). Como parte da regulação bioquímica da produção de compostos fenólicos, encontram-se diversas enzimas interligadas à atividade de hormônios, lesões, infecções por patógenos fúngicos, estresses nutricionais, luminosidade e radiações (NACZK & SHAHIDI, 2004). Mais de 8.000 estruturas fenólicas já foram identificadas no reino vegetal e a maioria pode ser encontrada em alimentos (OROIAN & ESCRICHE, 2015).

Devido ao grande valor nutricional que oferecem, os compostos fenólicos têm sido um emergente alvo de estudos e descobertas quanto a sua ação benéfica na saúde (VALLS *et al.*, 2009; SIQUEIRA *et al.*, 2013). Seus efeitos positivos na saúde podem estar relacionados com suas propriedades em nível do trato gastrointestinal, atividade antiviral, antiinflamatória e antialérgica, antimutagenia/anticarcinogênica, antiolesterolêmica e atividade antioxidante (SANCHEZ-MORENO, 2002). A ação dos compostos fenólicos quanto à sua capacidade antioxidativa é dependente do(s) composto(s) presente(s) no alimento e sua respectiva concentração, além do número de hidroxilas que os constituem e sua localização espacial (HASSIMOTTO *et al.*, 2005). A capacidade antioxidante dos compostos fenólicos pode ocorrer pelo mecanismo scavenger - sequestro de radicais livres ou quelante ferro, bloqueando as reações em cadeia que geram radicais livres (MOREIRA & MANCINI-FILHO, 2004).

Os polifenóis são definidos como substâncias que possuem pelo menos um anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos incluindo seus grupos funcionais, sendo essas estruturas químicas responsáveis pela classificação das diferentes classes destes compostos (MALACRIDA & MOTTA, 2005). Os compostos fenólicos se dividem em 5 grandes classes: ácidos fenólicos, lignanas, flavonoides, estilbenos e taninos (IGNAT; VOLF; POPA, 2011). A figura 6 esquematiza a divisão dos compostos fenólicos com destaque compostos identificados e quantificados em maior concentração na casca do Tucum-do-Cerrado, sendo as classes: flavanóis, flavonas e antocianinas (ROSA *et al.*, 2016).

Os flavonoides (C6-C3-C6) dividem-se em 7 classes diferentes e elas se diferenciam entre si pela variação química do “anel C” da sua estrutura: flavonóis, flavonas, flavanóis, flavanonas, isoflavonóides, flavonolóis e antocianinas (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010). Os flavonoides são sintetizados por quase todos os tecidos vegetais e por isso são encontrados em abundância em frutas comestíveis, vegetais folhosos, raízes, tubérculos, bulbos, ervas, temperos, legumes, chá, café e vinho tinto (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010). A catequina é comumente encontrada em chás, principalmente chá verde, enquanto que as antocianinas são encontradas em frutas vermelhas-arroxeadas e a rutina tem como fontes o trigo sarraceno e frutas cítricas. Os compostos pertencentes à classe dos flavonoides são os mais estudados e reconhecidos pela sua atividade antioxidante e nutracêutica (ALUKO, 2012).

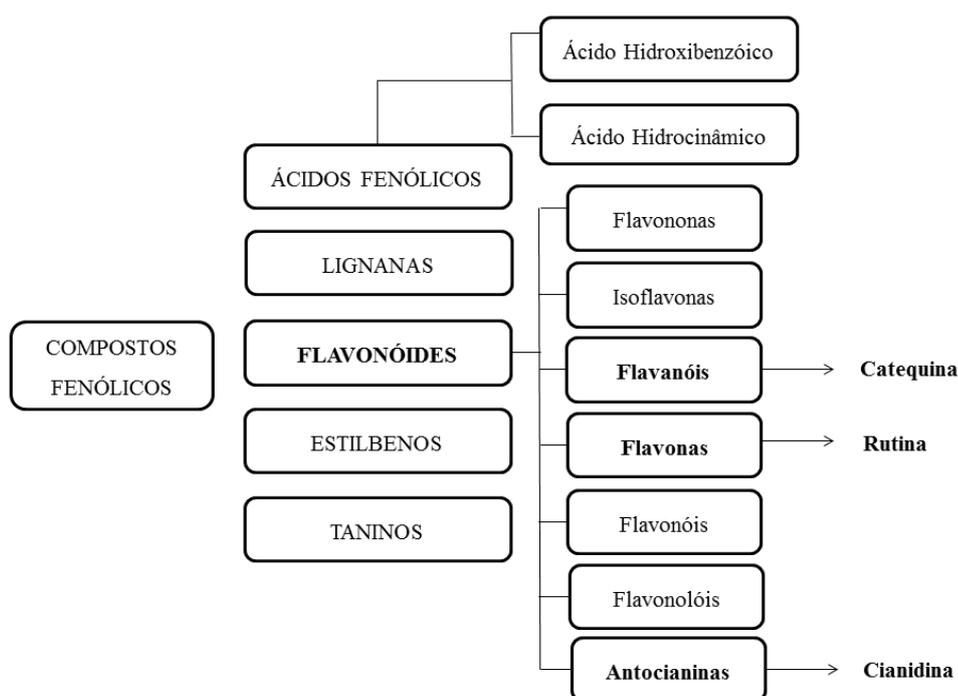


Figura 8. Esquema de classificação e subdivisão dos compostos fenólicos. Em destaque as classes e compostos encontrados em maior concentração na casca de Tucum-do-Cerrado. Fonte adaptada: ROSA, 2013.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Investigar os efeitos das frações e extrato aquoso da casca liofilizada de Tucum-do-Cerrado sobre a proteção antioxidante *in vitro* e em células de leveduras.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a atividade antioxidante dos extratos aquoso e etanólico de casca liofilizada de Tucum-do-Cerrado;
- Fracionar o extrato de casca liofilizada de Tucum-do-Cerrado de maior atividade antioxidante e obter compostos para serem analisados neste trabalho;
- Investigar a atividade antioxidante dos compostos obtidos no fracionamento do extrato da casca liofilizada de Tucum-do-Cerrado;
- Verificar se o extrato atua como quelante de ferro ou sequestrador de EROs em ensaios de dano oxidativo à biomoléculas;
- Investigar se o extrato e os compostos de Tucum-do-Cerrado aumentam a resistência ao dano oxidativo em *Saccharomyces cerevisiae*;
- Identificar compostos presentes no extrato da casca de Tucum-do-Cerrado de maior atividade antioxidante por espectrometria de massa;

4. METODOLOGIA

4.1 AMOSTRA DE TUCUM - DO - CERRADO

Os frutos de Tucum-do-Cerrado da espécie *Bactris setosa* Mart. foram coletados em ponto ótimo de maturidade hortícola em fevereiro de 2015 em uma chácara localizada na cidade de Terezópolis de Goiás – GO. A localização geográfica do local (obtida pelo GPS) é Latitude 16°46'52.25" e Longitude: 49° 5'57.22", conforme pode ser visualizada na imagem abaixo (Figura 9). Os cachos de Tucum-do-Cerrado foram levados ao laboratório onde os frutos foram destacados, lavados em água corrente para eliminação da sujeira na superfície. Posteriormente foram lavados em água destilada e colocados para secar à temperatura ambiente. Após estarem totalmente secos, os frutos foram armazenados no freezer –80°C até a preparação dos extratos.



Figura 9: Localização da coleta do fruto do Tucum-do-Cerrado. Imagem gerada pelo software “Google Earth” a partir da localização geográfica do local de coleta do Tucum-do-Cerrado em Terezópolis de Goiás (o marcador em vermelho indica o local aproximado da coleta) (A); mapa ampliado da localização geográfica do local da coleta do Tucum-do-Cerrado em Terezópolis de Goiás (B);

4.2 PREPARO DOS EXTRATOS DE TUCUM-DO-CERRADO

Para preparo dos extratos foi utilizada somente a casca do Tucum-do-Cerrado, uma vez que estudos anteriores já verificaram que esta é a fração do fruto que contém a maior

concentração de compostos bioativos (ROSA *et al.*, 2016). A separação das cascas do fruto foi realizada com o fruto ainda congelado, utilizando uma faca do tipo inoxidável. As cascas foram armazenadas em tubos de centrifugação a -80°C , posteriormente foram liofilizadas e armazenadas novamente no freezer -80°C . A amostra liofilizada foi macerada em almofariz de porcelana na presença de nitrogênio líquido. Em seguida, os extratos da casca foram preparados utilizando dois diferentes solventes: água deionizada (MiliQ) e etanol.

Para o preparo do extrato aquoso (EAq) e do extrato etanólico (EE) foi utilizada 1g de casca liofilizada macerada e foi adicionado 10 mL de água deionizada (EAq) ou etanol (EE). Posteriormente, a mistura no tubo de centrifugação foi agitada no Thermomixer a 750 rpm, durante 1 hora, a temperatura de 10°C a 12°C . Em seguida, o tubo foi coberto com papel alumínio e a amostra ficou em repouso por 16 horas em um refrigerador a 5°C . Após pernoitar, a amostra foi filtrada com auxílio de funil e papel filtro JP41 (JProLab – Alemanha). Foi adicionado mais solvente para aproveitamento dos resíduos do tubo até o extrato filtrado atingir o volume final de 10 mL. Os extratos aquoso e etanólico foram armazenado a -80°C até o momento das análises.

4.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DA CASCA DE TUCUM-DO-CERRADO

4.3.1 Capacidade total de redução de ferro (Ferric reducing antioxidant power: FRAP)

A capacidade antioxidante dos diferentes extratos do Tucum-do-Cerrado foi estimada pela metodologia de FRAP, realizada de acordo com o descrito por Brenzie e Strain (1996), com modificações. Brevemente, o reagente FRAP foi preparado no momento da realização do teste a partir das soluções de tampão acetato de sódio 300 mmol/L a pH 3,6; solução de 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) 10 mmol/L em HCl 40 mmol/L, e solução de cloreto férrico 20 mmol/L, nas proporções 10:1:1; e posteriormente incubado a 37°C por 30 minutos. Em seguida foi preparado o sistema reacional contendo 900 μL de reagente FRAP, 90 μL de água e 30 μL do extrato do Tucum-do-Cerrado. O reagente FRAP e o solvente do extrato (900 e 120 μL , respectivamente) foram utilizados como branco e a leitura da absorbância realizada à 595 nm imediatamente após o início da reação. Foram preparadas soluções aquosas de FeSO_4 , na faixa de concentração entre 0 – 2000 $\mu\text{mol/L}$, para construção da curva de calibração ($y = 0,00057x + 0,00339$; $r^2 = 0,998$). Os experimentos foram realizados em triplicata e os valores

foram expressos como uma média \pm desvio padrão expressos em mmol de FeSO₄/g de casca liofilizada (BENZIE & STRAIN, 1996).

4.3.2 Ensaio de medida de dano oxidativo à 2-desoxirribose (2-DR)

A medida do dano oxidativo a 2-desoxirribose (2-DR) foi realizada através do ensaio espectrofotométrico proposto Gutteridge e Halliwell (1988) com modificações (GENARO-MATTOS *et al.*, 2009). Nesse método, cria-se um sistema reacional *in vitro* para formação de radicais livres que ocasiona o dano à pentose do DNA. Basicamente, avalia se os extratos ou compostos bioativos são capazes de proteger a 2-DR do dano oxidativo promovido pelo radical hidroxil e também é possível detectar o mecanismo de proteção (quelante de metais ou sequestrador de radicais livres).

Conforme as reações abaixo, o sistema de geração de radicais livres se inicia quando o Fe(III) reage com ascorbato numa reação de oxi-redução (1). O ferro reduzido Fe(II) reage com o O₂ transformando-o em uma EROs: o radical Superóxido (O₂^{•-}) (2). O radical superóxido que é altamente reativo transforma-se em um menos reativo: peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (3), que por sua vez reage com o Fe(II) pela reação de Fenton (4), formando o radical hidroxil (•OH).

- 1) Fe³⁺ – EDTA + ascorbato → Fe²⁺ – EDTA + ascorbil[•]
- 2) Fe²⁺ – EDTA + O₂ → Fe³⁺ + O₂^{•-}
- 3) 2O₂^{•-} + 2H⁺ → H₂O₂ + O₂
- 4) Fe²⁺ – EDTA + H₂O₂ → Fe³⁺ – EDTA + ⁻OH + •OH
- 5) OH[•] + 2-DR → MDA
- 6) MDA + 2TBA → TBA₂ – MDA

O dano oxidativo ocorre pelo radical hidroxil que é extremamente reativo. Inserindo a 2-DR no sistema reacional, o radical hidroxil irá degradá-la e ocorrerá formação de malondialdeído (MDA) (5). Para parar a reação de degradação da 2-DR usa-se o ácido fosfórico seguido por ácido tiobarbitúrico (TBA). O TBA é usado para formação do complexo TBA₂–MDA (6) que é espectrofotometricamente detectável.

O meio reacional com volume final de 0,4mL foi composto de tampão KPi (10 mM) pH 7,2, ascorbato (1 mM), 2- DR (5 mM), EDTA-Fe(III) (50 μM) e extrato/composto de tucum do cerrado. A reação foi iniciada com a adição de Fe(III) e o meio reacional foi incubado por tempos progressivos: 0, 10 20, 30 e 40 minutos em temperatura ambiente

($\cong 25^{\circ}\text{C}$). A reação foi finalizada ao adicionar 400 μL de ácido fosfórico 4% seguido por 400 μL de TBA 1%. A mistura foi aquecida em banho seco a 95°C por 15 minutos, e em seguida foi realizada a leitura do complexo MDA-TBA₂ em 532nm no espectrofotômetro Hitachi U-2001.

Para caracterização da atividade antioxidante, foram realizadas duas variações do método com tempo fixo de reação (20 minutos): variação da concentração do extrato para avaliar se a atividade é do tipo dose-dependente e variação da 2-DR (0-50 mM) para testar atividade antioxidante do tipo sequestradora de radicais. Foi utilizado manitol (10 mM) como controle positivo para o tipo de mecanismo sequestrador.

Neste experimento, além do ensaio com a reação completa onde é criado um ambiente oxidativo e inserido o extrato/composto para avaliar a proteção que ele promove, também foi feito o branco, chamado tempo zero. Nesse branco, o ascorbato que é usado para iniciar a reação de formação dos radicais livres, é incluído no final da reação, após adição do TBA. Isso foi feito para descontar a degradação da 2-DR pelo Fe(III) durante a fase de fervura, ou seja, a degradação que não é causada pelo $\cdot\text{OH}$ (GENARO-MATTOS *et al.*, 2009). Para descontar a coloração do extrato também foi feito a leitura do branco constituído apenas por tampão e extrato. O esquema abaixo representa a ordem de adição dos reagentes:

Ensaio com reação completa:

Ascorbato \rightarrow Tampão KPi \rightarrow 2-DR \rightarrow Fe(III) \rightarrow Extrato \rightarrow Ácido Fosfórico \rightarrow TBA

Tempo Zero(Branco):

Tampão KPi \rightarrow 2-DR \rightarrow Fe(III) \rightarrow Extrato \rightarrow Ácido Fosfórico \rightarrow TBA \rightarrow Ascorbato

A porcentagem da proteção dos extratos foi calculada pela seguinte fórmula:

$$\% \text{ Proteção} = 1 - \frac{(\text{Ensaio teste} - \text{Branco do ensaio teste})}{(\text{Controle positivo} - \text{Branco do controle positivo})}$$

4.4 ENSAIOS UTILIZANDO LEVEDURAS *Saccharomyces cerevisiae* PARA AVALIAR AS PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES DAS FRAÇÕES DO TUCUM-DO-CERRADO

4.4.1 Linhagem de levedura

Foi utilizada a linhagem selvagem S288C de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* disponíveis no laboratório de biologia molecular da Universidade de Brasília.

4.4.2 Meio de crescimento e condições de cultura

Uma única colônia de levedura foi inoculada em 3 mL de meio YPD (extrato de levedura 1% (p/v), peptona 2% (p/v), D-glucose 2% (p/v)) e incubadas durante a noite a 30°C sob agitação a 250 rpm. No dia seguinte, 1 mL da cultura foi transferido para um microtubo de 1,5 mL e centrifugou-se a 3000 rpm durante 5 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi removido e 1 mL de meio YPD foi usado para ressuspender as células. Em seguida, a amostra de células foi diluída 1:100 utilizando YPD e foi colocada numa câmara de Neubauer para contagem de células através de microscópio. Após o cálculo da concentração de células, a cultura de células original foi diluída para 4×10^5 células/mL para então serem utilizadas nos experimentos.

4.4.3 Exposição das células de levedura a oxidante na presença de extrato e frações do Tucum-do-Cerrado em microplaca

O crescimento das células de leveduras foi realizado em placa de 96 poços a 30°C e agitação de 282 cpm. As curvas de crescimentos foram avaliadas em quatro condições com volume final de 200 μ L: 1) células crescidas em meio de cultura YPD; 2) células crescidas em meio de cultura YPD e expostas ao agente oxidante; 3) células crescidas em meio de cultura YPD e expostas às frações de tucum-do-cerrado 4) Células crescidas em meio de cultura YPD e expostas ao agente oxidante e às frações do tucum-do-cerrado. O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) foi usado como agente oxidante em concentração final de 1 mM (esta concentração foi selecionada a partir de outras concentrações previamente testadas) preparado diariamente em água deionizada e misturado com células de leveduras (concentração final de 1×10^5 células/mL). O crescimento das células foi monitorado a 600 nm por 36 horas, com intervalo de 30 minutos cada leitura, utilizando o leitor de placas 96 poços (Eon®).

4.5 IDENTIFICAÇÃO E SEPARAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS DO TUCUM-DO-CERRADO

4.5.1 Análise por HPLC-DAD

A separação e identificação dos compostos fenólicos presentes no Tucum-do-Cerrado foram realizadas através da metodologia de fracionamento em cromatográfica líquida de alta eficiência (High Performance/Pressure Liquide Chromatography, HPLC) de acordo com Rosa e colaboradores (2016).

A análise cromatográfica dos compostos fenólicos presentes no Tucum-do-Cerrado foi realizada por um sistema de HPLC Shimadzu® LC-20AT (Kyoto, Japão). O aparelho HPLC apresenta um detector fotodiodo (DAD), que permite fazer uma varredura de diferentes compostos ao mesmo tempo. O extrato aquoso foi filtrado com o filtro de membrana de 0,22 µm (Millex GV, Millipore) e amostras de 200 µL foram injetadas na coluna de fase reversa Synergi 4u Fusion-RP C₁₈ (250 x 4.6 mm i.d., 4 µm, Phenomenex, USA). As soluções de Ácido Fórmico 2% (fase móvel A) e Metanol 90% acidificado com Ácido Fórmico 0,5% (fase móvel B) foram bombeadas em fluxo de 0,8 mL/min. A corrida da amostra foi de 52 minutos com gradiente linear de 0 - 42% de fase móvel B e os dados do DAD foram obtidos a 200 – 600 nm. Os compostos fenólicos foram identificados por comparação do tempo de retenção e espectro de absorção a 280 nm com padrões, além de análise através do espectro de massa.

4.5.2 Espectrometria de massa

As frações cromatográficas que exibiram atividade antioxidante nos ensaios realizados foram analisadas em espectrômetro de massas do tipo MALDI-TOF/TOF (do ingles, Matrix-assisted laser desorption/ionization-Time of flight) modelo AB SCIEX TOF/TOF™ 5800 (AB Sciex, Framingham, MA, EUA). As frações foram ressuspendidas em água contendo TFA 0,1% (v/v) e 1 µL de cada fração cromatográfica foi aplicada em placa de aço inoxidável juntamente com 1 µL de matriz ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA 20 µg/µL). O procedimento foi realizado no modo refletido positivo, sendo a faixa m/z analisada de 200 a 4000 Da.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, S P; COSTA, T S A; SILVA, J A. **Frutas Nativas do Cerrado** – Caracterização físico-química e fonte potencial de nutrientes. Capítulo 12 . In: SANO, S M; ALMEIDA, S P; RIBEIRO, J F. **CERRADO: Ecologia e flora**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, vol. 1, 2008, 406p

ALMEIDA, S P; PROENÇA, C E; SANO, S M; RIBEIRO, J F. **CERRADO** – Espécies vegetais úteis. Planaltina: EMBRAPA – CPAC, 1998, 464p.

ALUKO, R E. **Function Food and Nutraceuticals**. Canada: Springer; Food Science Text Series 2012, 168p.

BIANCHI, M L P.; ANTUNES, L M G Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Rev Nutr.**, v.12, n.12, p.123-30, 1999.

BENZIE, I F F; STRAIN, J J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. **Analytical Biochemistry**, 239, 70 – 76, 1996.

BOYER J, LIU RH. 2004. Apple phytochemicals and their health benefits. **Nutrition journal**. May 12;3:5.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Guia alimentar para a população brasileira: promovendo a Alimentação saudável**. Brasília, DF, 2006, 284 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Guia alimentar para a população brasileira**. 2 ed. Brasília, DF, 2014, 156p.

BRASIL, Ministério do Meio Ambiente - MMA. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/biodiversidade/biodiversidade-brasileira> . Acessado em 02 de janeiro de 2016.

BRAVO, L. Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutrition Reviews**, v. 56, n. 11, p. 317-333, Nov 1998.

CONTADO, E W N F; PATTO, L S; ROCHA, D A; ABREU, C M P; CORRÊA, A D; SANTOS, C D. Estudo dos métodos de extração de carotenóides em cenoura por fluido supercrítico (EFS) e convencional. **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v. 34, Edição Especial, p. 1617-1623, 2010.

COVARRUBIAS, L; HERNÁNDEZ-GARCIA, D; SCHNABEL, D; SALAS-VIDAL, E; CASTRO-OBREGÓN, S. Function of reactive oxygen species during animal development: Passive or active? **Developmental Biology** 320, 1-11, 2008.

DATO, S; CROCCO, P; D’AQUILA, P; RANGO, F; BELLIZI, D; ROSE, G; PASSARINO, G. Exploring the Role of Genetic Variability and Lifestyle in Oxidative Stress Response for Healthy Aging and Longevity. **Int. J. Mol. Sci.** 14: 16443-16472, 2013.

DOMENECH-CARBO, M T; CRUZ-CANIZARES, J; OSETE-CORTINA, L; DOMENECH-

CARBO, A; DAVID, H. Ageing behaviour and analytical characterization of the Jatoba resin collected from *Hymenaea stigonocarpa* Mart. **International Journal of Mass Spectrometry**, 284:1-3, p. 81-92, 2009.

DAMODARAN, S; PARKIN, K L; FENNEMA, O R. **Química de Alimentos de Fennema**. Porto Alegre: Artmed, 4ª Ed. 2010, 900p.

DUARTE, A Y S; QUEIROZ, R S; SANCHES, R A; GARCIA, C R; DEDINI, F G.. Ethnobotany of Natural Fibres - *Bactris setosa* (tucum) in a Traditional Rural Community. **Fibres & Textiles in Eastern Europe**, v. 20, n. 2, p. 18-20, 2012.

ENGLBERGER, L; SCHIERLE, J; HOFMANN, P; LORENS, A; ALBERT, K; LEVENDUSKY, A; PAUL, Y; LICKANETH, E; ELYMORE, A; MADDISON, M; BRUM, I; NEMRA, J; ALFRED, J; VELDE, N V; KRAEMER, K. Carotenoid and vitamin content of Micronesian atoll foods: *Pandanus* (*Pandanus tectorius*) and garlic pear (*Crataeva speciosa*) fruit. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 22, n. 1, p. 1-8, Feb 2009.

FARIA, A F; MARQUES, M C; MERCADANTE, A Z. Identification of bioactive compounds from jambolão (*Syzygium cumini*) and antioxidant capacity evaluation in different pH conditions. **Food Chemistry**. 126, 1571-1578, 2011.

FINKEL, T. Signal transduction by reactive oxygen species. **J. CellBiol.** 194, 7–15, 2011.

FUSTINONI-REIS A M, ARRUDA S F, DOURADO L P, DA CUNHA M S, SIQUEIRA E M. Tucum-Do-Cerrado (*Bactris setosa* Mart.) Consumption Modulates Iron Homeostasis and Prevents Iron-Induced Oxidative Stress in the Rat Liver. **Nutrients**. Feb;8:38,2016.

GENARO-MATTOS, T C; DALVI, L T; OLIVEIRA, R G; GINANI, J S; HERMES-LIMA, M. Reevaluation of the 2-deoxyribose assay for determination of free radical formation. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1790: 1636-1642, 2009.

GLASAUER, A; CHANDEL, N S. Targeting antioxidants for cancer therapy. **Biochem Pharmacol.** 1;92(1):90-101, 2014.

GOMES-ROCHETTE N F, DA SILVEIRA VASCONCELOS M, NABAVI S M, MOTA E F, NUNES-PINHEIRO D C, DAGLIA M, DE MELO D F. Fruit as potent natural antioxidants and their biological effects. **Current pharmaceutical biotechnology**. Apr 25, 2016.

GRANT, S S; KAUFMANN, B B; CHAND, N S; HASELEY, N; HUNG, D T. Eradication of bacterial persisters with antibiotic-generated hydroxyl radicals. **Proceedings of the National Academy of Science of USA**. 109:12147–12152; 2012.

GUTTERIDGE J M, HALLIWELL B. The deoxyribose assay: an assay both for 'free' hydroxyl radical and for site-specific hydroxyl radical production. **The Biochemical journal**. Aug1;253:932-933,1988.

HADDAD, J. J. Antioxidant and prooxidant mechanisms in the regulation of redox(y)-sensitive transcription factors. **Cellular signaling**, v.14 n.11, 879-897, 2002.

HALLIWELL, B. Free radicals and other reactive species in disease. **Encyclopedia of life sciences**, 2005.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. Oxford, UK: Oxford University Press, 4^o. 2007

HASSIMOTTO, N. M. A.; GENOVESE, I. S.; LAJOLO, F. M. Antioxidant activity of dietary fruits, vegetables, and commercial frozen fruit pulps. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 8, p. 2928-35, 2005.

HU et al. Fruits and Vegetables Consumption and Risk of Stroke: A Meta-Analysis of Prospective Cohort Studies. **Stroke** 45 (6), 1613-9, 2014.

IBGE. **Vamos Conhecer o Brasil**. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. <http://7a12ibgegovbr/vamos-conhecer-o-brasil/nosso-territorio/biomashtml>. Acessado em 02 de janeiro de 2016.

IGNAT, I.; VOLF, I.; POPA, V. I. A critical review of methods for characterization of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. **Food Chemistry**, v. 126, n. 4, p. 1821-1835, Jun 15 2011.

KALYANARAMAN, B. Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students: Oxidants, antioxidants and disease mechanisms. **Redox Biology** 1 244–257, 2013.

KARAÇELİK, A A; KUCUK, M; ISKEFIYELI, Z; AYDEMİR, S; SMET, S; MISEREZ, B; SANDRA, P. Antioxidant components of *Viburnum opulus* L. determined by on-line HPLC–UV–ABTS radical scavenging and LC–UV–ESI-MS methods. **Food Chemistry**. 175:106–114, 2015.

KLINK C A, MACHADO R B. Conservation of the Brazilian cerrado. **Conservation Biology**.19:707-713, 2005.

KOURY, J.C.; DONANGELO, C.M. Zinco, estresse oxidativo e atividade física. **Rev. Nutr.**, Campinas, v. 16, n.4, p.433-441, 2003.

LARSON, R. A. The antioxidants of higher plants. **Phytochemistry**, 27 (4) 969-978, 1988.

LIOCHEV, S.I., FRIDOVICH, I. The Haber-Weiss cycle -- 70 years later: an alternative view. **Redox report** : communications in free radical research 7, 55-57; 2002.

LOCK, K; POMERLEAU, J; CAUSER, L; ALTMANN, D R; MCKEE, M. Global burden of disease due to low consumption of fruit and vegetables. **Bulletin of the World Health Organization** 83 (2) 100-108, 2005.

LOUREIRO, A. P. M; MASCIO, P. D; MEDEIROS, M. H. G. Formação de adutos exocíclicos com bases de DNA: Implicações em mutagênese e carcinogênese. **Química Nova**, 25 (5) 777-793, 2002.

MALACRIDA, C. R.; MOTTA, S. Total phenolics and anthocyanins in grape juice. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** , Campinas, v. 25, n. 4, 2005.

MENDONÇA R C; FELFILI, J M; WALTER, B M T; SILVA JUNIOR, M C; REZENDE, A V; FILGUEIRAS; T S; NOGUEIRA, P E; FAGG, C W. Flora vascular do bioma Cerrado: Checklist com 12.356 espécies, capítulo 15. In: SANO, S M; ALMEIDA, S P; RIBEIRO, J F. **CERRADO: Ecologia e flora**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, vol. 2, 2008, 802p

MOURA, C F H; ALVES, R E; INNECCO, R; FILGUEIRAS, H A C; MOSCA, J L; PINTO, S A. **Revista Brasileira de Fruticultura**. 23,3:537-540, 2001.

MOREIRA, A V B. ; MANCINI-FILHO, J. Influence of spices phenolic compounds on lipoperoxidation and lipid profile of rats tissues. **Rev. Nutr.**, Campinas, v. 17, n. 4, 2004 .

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **J Chromatogr A**, v. 1054, n. 1-2, p. 95-111, Oct 29 2004.

NELSON, D L.; COX, M M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. Porto Alegre: Artemed 6ª Ed. 2014. 1298p

NORDBERG, J., ARNÉR, E.S.J. Reactive oxygen species, antioxidants, and mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology & Medicine** 31, 1287-1312, 2001

Organização Mundial de Saúde (OMS). **Fruit and Vegetable Promotion Initiative** – report of the meeting, Geneva, 2003.

Organização Mundial de Saúde (OMS). **The World Health Report 2002**. Reducing Risks, Promotion Healthy Life, Geneva, 2002.

OROIAN, M; ESCRICHE, I. Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis. **Food Research International**.74:10-36, 2015.

ORNELLAS, L. H. **Técnicas dietéticas: seleção e preparo de alimentos**. 5º edição, São Paulo: Atheneu, 1998.

RHEE, S. Cell signaling. H₂O₂, a necessary evil for cell signaling. **Science** 312, 1882–1883, 2006.

RIBEIRO, S M R; QUEIROZ, J H; PELÚZO, M C G; COSTA, N M B; MATTA, S L P; QUEIROZ, M E L R. A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. **Biosci**, 21, 3, 133 – 149, 2005.

RIBEIRO, J F; WALTER, B M T. As principais fitofisionomias do Bioma Cerrado. Capítulo 6. In: SANO, S M; ALMEIDA, S P; RIBEIRO, J F. **CERRADO: Ecologia e flora**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, vol. 1, 2008, 406p

ROESLER, R; MALTA, L G; CARRASCO, L C; HOLANDA, R B; SOUSA, C A S; PASTORE, G M. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. **Ciencia e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, 27 (1): 53 - 60, 2007.

ROSA, F. R. Atividade antioxidante de frutos do cerrado e identificação de compostos em *Bactris setosa* Mart., *Palmae* (tucum-do-cerrado). **Tese de doutorado** – Universidade de Brasília, Brasília-DF, 2013.

ROSA F R, ARRUDA A F, SIQUEIRA E M, ARRUDA S F. Phytochemical Compounds and Antioxidant Capacity of Tucum-Do-Cerrado (*Bactris setosa* Mart), Brazil's Native Fruit. **Nutrients**. 8:110, 2016.

SAIKIA, S; MAHNOT, N K; MAHANTA, C L. Optimisation of phenolic extraction from Averrhoa carambola pomace by response surface methodology and its microencapsulation by spray and freeze drying. **Food Chemistry** 171:144–152, 2015.

SÁNCHEZ-MORENO, C. Compuestos polifenólicos: efectos fisiológicos. **Actividad antioxidante. Alimentaria**, v. 38 (329), p.29-40, jan./fev., 2002.

SCHIEBER, M; CHANDEL, N. ROS function in Redox Signaling and Oxidative Stress. **Current Biology** 24, R453–R462, May 19, 2014.

SILVA, D B; SILVA, J A; JUNQUEIRA, N T V; ANDRADE, L R M. **Frutas do Cerrado**. Embrapa, 2001, 179p.

SILVA, F A M; ASSAD, E D; EVANGELISTA, B A. Caracterização climática do Bioma Cerrado. Capítulo 3. . In: SANO, S M; ALMEIDA, S P; RIBEIRO, J F. **CERRADO: Ecologia e flora**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, vol. 1, 2008, 406p.

SINGH, S; VRISHNI, S; SINGH, B K; RAHMAN, I; KAKKAR, P. Nrf2-ARE stress response mechanism: a control point in oxidative stress-mediated dysfunctions and chronic inflammatory diseases. **Free Radic. Res.** 44:1267–1288, 2010.

SIQUEIRA, E M A; ROSA, F R; FUSTINONI, A M; SANT'ANA, L P; ARRUDA, S F. Brazilian Savanna Fruits Contain Higher Bioactive Compounds Content and Higher Antioxidant Activity Relative to the Conventional Red Delicious Apple. **Plos One**, v. 8, n. 8, p. 7, 2013.

SOUZA, C. D.; FELFILI, J. M. Uso de plantas medicinais na região de Alto Paraíso de Goiás, GO, Brasil. **Acta bot. bras.** 20(1): 135-142. 2006.

SOUZA, V. Y. V. Análise da proteção antioxidante promovida por extratos de tucum-do-cerrado (*Bactris setosa*). **Dissertação de mestrado** – Universidade de Brasília, Brasília-DF, 2013.

STYSKAL, J; VAN-REMMEN, H; RICHARDSON, A; SALMON, A B. Oxidative stress and diabetes: What can we learn about insulin resistance from antioxidant mutant mouse models? **Free Radical Biology & Medicine** 52, 46-58, 2012.

VALLS, J; MILLÁN, S; MARTÍ, M P; BORRÀS, E; AROLA, L. Advanced separation methods of food anthocyanins, isoflavones and flavanols. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 43, p. 7143-7172, 2009.

VIEIRA, R F; AGOSTINI-COSTA, T S; SILVA, D B; SANO, S M; FERREIRA, F R. **Frutas nativas da região Centro-Oeste do Brasil**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2010, 1º edição, 322 p.

WALTER, B M T; CARVALHO, A M; RIBEIRO, J F. O conceito de Savana e de seu componente Cerrado. Capítulo 1. In: SANO, S M; ALMEIDA, S P; RIBEIRO, J F. **CERRADO: Ecologia e flora**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, vol. 1, 2008, 406p

WINTERBOURN, C.C; HAMPTON, M. B. Thiol chemistry and specificity in redox signaling. **Free Radic Biol. Med.** 45, 549–561, 2008.

ZHANG, D.D; HANNINK, M. Distinct cysteine residues in Keap1 are required for Keap1-dependent ubiquitination of Nrf2 and for stabilization of Nrf2 by chemopreventive agents and oxidative stress. **Mol. Cell. Biol.**23:8137–8151, 2003.

ARTIGO SUBMETIDO

Compounds of tucum-do-cerrado (*Bactris setosa*) fruit with antioxidant activity

Marcela Berckmans Viégas Costa Dantas^{1,3}, Osmindo Rodrigues Pires Júnior², Luane Tomé de Paula Campos³, Élide Geralda Campos^{1,3}

¹Programa de Pós-Graduação em Nutrição Humana, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Asa Norte, Brasília, DF, Brazil, CEP 70910-900.

² Laboratório de Toxinologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Asa Norte, Brasília, DF, Brazil, CEP 70910-900.

³ Laboratório de Biologia Molecular, Departamento de Biologia Celular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Asa Norte, Brasília, DF, Brazil, CEP 70910-900.

Marcela Berckmans Viégas Costa Dantas - 55+61-98112-7999

Email:marcelaberckmans@gmail.com

Osmindo Rodrigues Pires Júnior 55-61-3107-3101 Email:osmindo@unb.com

Luane Tomé de Paula Campos – 55-61-99326-8771 Email:luanetome14@gmail.com

Élide Geralda Campos – 55-61-3107-2950 and 61-996074859 Email:
elida@unb.br; elidacamposunb@gmail.com

*Corresponding author:

Dr. Élide Geralda Campos
Departamento de Biologia Celular
Universidade de Brasília
Brasília - DF - Brazil
CEP 70910-900
Tel: +55-61-3107-2950
E-mail: elida@unb.br; elidacamposunb@gmail.com

Abstract

Among the edible fruits of the Brazilian savanna, tucum-do-cerrado (*Bactris setosa* Mart.) stands out due to its high antioxidant potential and polyphenol content. We investigated the aqueous extract of tucum-do-cerrado regarding its mechanism of action and the antioxidant potential of its fractions. The aqueous extract was fractionated by HPLC and the fractions analyzed in terms of their antioxidant activity by means of the oxidative degradation of 2-deoxyribose. Five fractions were selected based on the antioxidant activity observed *in vitro* and components of three of them were identified as cyanidin, peonidin and quercetin. The selected HPLC samples, on the other hand, showed a detrimental effect on yeast cell growth in the presence of H₂O₂. Thus our results advance in identifying tucum-do-cerrado compounds with antioxidant activity. The results show dichotomous actions of the tucum-do-cerrado compounds that should be investigated thoroughly to uncover the real possibilities of tucum-do-cerrado in contributing to good human health.

Keywords: *Bactris setosa*, antioxidants, yeast, HPLC, cyanidin, peonidin, quercetin

1.Introduction

Several studies have shown an inverse association between the intake of fruits and vegetables and the risk of developing certain diseases, such as heart disease, stroke, and cancers of the lung, colon, stomach and esophagus (Hu et al. 2014, Lock et al. 2005). This protective effect is mainly related to the fact that fruits and vegetables are sources of many bioactive compounds with antioxidant properties (Gomes-Rochette et al. 2016). Such compounds minimize oxidation of biological constituents and therefore protect cells from oxidative stress damage, while playing a role in signal transduction as well (Murphy et al. 2011).

The Brazilian Cerrado is composed of three biomes: tropical grassland (campo limpo), savanna (campo sujo, campo cerrado, and cerrado sensu stricto), and seasonal forest (cerradão) (Batalha 2011), and is the second largest Brazilian ecosystem (IBGE 2016). Its biodiversity is exemplified by thousands of different plant species (Mendonça et al. 1988). The Cerrado region has a rainy season (October to March) followed by a dry season (April to September), with average annual rainfall of 1,500 mm and mild temperatures throughout the year (22°C to 27°C). In addition, its vegetation develops in acidic and nutrient-poor soils, with high aluminum concentration (Klink and Machado 2005). Cerrado plants must have developed specific mechanisms to survive the significant biotic and abiotic stresses (drought, fire in the dry season, lack of nutrients, excess aluminum for example) present throughout the year. Environmental stresses, such as drought, can induce an increase in plant antioxidants as a mean to counteract increased generation of reactive oxygen species (ROS) (Yang et al. 2015). Following this reasoning, the edible fruits of the Cerrado may be considered a distinct quantitative and/or qualitative source of antioxidants when compared to fruits produced in regions of temperate climate and fertile soil.

Tucum-do-cerrado (*Bactris setosa* Mart.) fruits are produced as clusters by medium-sized (4-6 meters high) palms with trunks covered with very fine thorns. Each fruit is 1.1 to 2.1 cm long and 1.3 to 2.2 cm wide (Figure 1) (Lima and Soares 2003). The tucum-do-cerrado palm tree bears fruits from January to April each year. The pulp of the ripe fruit is edible and can be consumed fresh. Tucum-do-cerrado fruits are used to make juices, liqueurs, ice cream, jellies, wines and vinegars (Silva et al. 2001). Fruits are also used in infusions of "cachaça", a distilled alcoholic beverage.

A study of twelve native edible Cerrado fruits showed that tucum-do-cerrado contains a higher content of total phenolics (~12-fold), total flavonoids (~19-fold), yellow flavonoids

(~8-fold), anthocyanins (~35-fold) and vitamin c (~3-fold) when compared to the apple Red Delicious (*Malus domestica* Borkh.) which is considered to have significant levels of antioxidants (Boyer and Liu 2004, Siqueira et al. 2013). Analysis of aqueous, methanolic and ethanolic tucum-do-cerrado peel extracts by high performance liquid chromatography coupled with a photodiode detector (HPLC-DAD) identified the major classes of phenolics as flavanols, anthocyanins, flavones phenolic acids and silbenes (Rosa et al. 2016). Measures of the antioxidants and antioxidant activity of tucum-do-cerrado fruit extracts showed that most activity is in the peel, instead of the pulp, and in aqueous instead of other types (hexanic, ethanolic or methanolic) of extracts (Rosa et al. 2016, Souza 2013). Regarding the *in vivo* effects of tucum-do-cerrado, rats fed an iron-enriched diet containing tucum-do-cerrado pulp and peel showed diminished liver malondialdehyde levels when compared to animals that received an iron-enriched diet (Fustinoni-Reis et al. 2016). Such results demonstrate the *in vivo* antioxidant protection of tucum-do-cerrado fruit.

Although the specific classes of phenolic compounds present in tucum-do-cerrado became recently known (Rosa et al. 2016), to our knowledge, there are no studies relating specific tucum-do-cerrado compounds to the antioxidant activity presented by the total peel aqueous extract or describing probable antioxidant mechanisms presented by the extract. Therefore, the objective of the present study was to relate specific compounds of tucum-do-cerrado peel to antioxidant activities measured by the 2-deoxyribose degradation assay (Genaro-Mattos et al. 2009) and by investigating *Saccharomyces cerevisiae* growth exposed to oxidants.

2. Results and discussion

Initially we performed the FRAP assay with the aim to investigate the best starting material and extraction method of bioactive compounds of tucum-do-cerrado (Table 1). The aqueous extract from lyophilized peel (EAqL) showed the highest activity among the other forms of extraction/material. Therefore, EAqL was chosen to be used in this study. In another study on the antioxidant potential of fresh and lyophilized samples of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil, the lyophilized samples also had the highest antioxidant capacity of all fruit samples and this result was associated with higher total phenol contents (Rufino et al. 2010). Furthermore, the lyophilization process produced less variability of the antioxidant activity. A study about drying processes and extraction procedures pointed lower variability of the phenolic content in lyophilized rosemary, when compared to fresh sample, and it was

suggested that lyophilization is the best method for storing the sample before analysis because minimizes waste and oxidation of phenolic compounds (Mulinacci et al. 2011).

The antioxidant action of an extract can be achieved by means of two main mechanisms: chelation of metals or scavenging of free radicals. The 2-deoxyribose (2-DR) degradation assay for determination of hydroxyl radicals ($\cdot\text{OH}$) is a very popular assay to analyze the pro- or antioxidant activities of pure compounds or plant extracts and aid in description of mechanism of action (Genaro-Mattos, Dalvi, Oliveira, Ginani and Hermes-Lima 2009, Lopes et al. 1999). Figures 2a-b show that EAqL has a protective effect *in vitro* in different reaction times, except for the concentration of 0.5 mg/ml that did not provided protection to 2 -DR in any of the times tested. In addition, the oxidative damage to 2 -DR was inversely proportional to the concentration of EAqL, which features a dose-dependent antioxidant effect (Figure 2c-d). The results obtained by varying the concentration of 2-DR suggest that the mechanism of action of EAqL is of the scavenger type, because its performance was similar to mannitol, a classic scavenger (Figure 2e-f). When the concentration of 2-DR was increased, EAqL showed a decrease in antioxidant protection, which indicated the capacity to quench hydroxyl radicals generated in the *in vitro* oxidative system. This probably happened because the antioxidants present in EAqL and 2 -DR, the target molecule, compete for the hydroxyl radical in the reaction (Andrade et al. 2006).

The tucum-do-cerrado peel extract has high antioxidant activity when compared to other cerrado fruits and apple (Rosa, Arruda, Siqueira and Arruda 2016, Siqueira, Rosa, Fustinoni, de Sant'Ana and Arruda 2013). To be able to relate the antioxidant activity to specific bioactive compounds, we performed extract fractionation by HPLC (Figure S1) and antioxidant tests *in vitro*. Figure 3a shows that all extract fractions had antioxidant activity in the 2 -DR degradation assay. However fractions 06, 09, 15 and 17 stood out with respect to their antioxidant protection percentage (Table 2). From this result, we seek to identify these fractions and also test its effect on yeast cell growth in oxidative stress conditions.

Fractions 06 and 09 were identified by HPLC and through comparison of the retention time and UV-visible spectral data of standards, while fractions 15, 17 and 18 were identified by HPLC and mass spectrometry (MS) analysis in the positive ion mode (Table 3). The UV-spectral data of fractions 06 and 09 were similar with the UV-spectral data of catechin standard (Figure S2-3). The MS analysis of fraction 15 showed two peaks with m/z 449 and a fragment ion at m/z 287 (Figure S4), corresponding to cyanidin-3-glucoside and cyanidin, respectively (Liu, Guo and Sun 2012). The mass ion ($m/z = 301$) of fraction 17 corresponded to a peonidin fragment (Liu, Guo and Sun 2012) and fraction 18, with mass ion

($m/z = 303$), was identified as a fragment of quercetin (Petrovic et al. 2010). A recent study on characterization of phenolic compounds in different extracts from tucum-do-cerrado peel detected catechin and cyanidin compounds in all extracts, the quercetin was found only in the aqueous extract with partition methanol/water (1:3) and peonidin not was identified (Rosa et al. 2016). These results suggest that lyophilization of the peel before extract preparation optimizes the extraction of phenolic compounds.

Finally, we tested the antioxidant activity of fractions 06, 09, 15 and 17 in yeasts cells exposed to hydrogen peroxide, an oxidant agent. Figure 3b shows that all fractions, when combined with H_2O_2 treatment, caused a delay in cell cycle progression. In addition, fractions used in higher concentrations completely abolished cell growth (results not shown). Therefore, despite the fractions showing antioxidant activity in a chemical assay, the assay with yeast cells indicated an opposite activity (pro -oxidant or even toxic), depending on the concentration. This can be explained by the fact that polyphenol compounds are susceptible to oxidation in cell culture medium and as oxidation product can be generated reactive oxygen species (ROS) (Halliwell 2014). The oxidation of these molecules may present toxic effect, depending on the amount of ROS produced and adaptive capacity of the cell (Halliwell 2014). In this sense, we suggest that the fractions have undergone oxidation and H_2O_2 concentration has reached lethal concentration or combined with other ROS.

3. Conclusions

We concluded that the lyophilized peel is a better source for the extraction of bioactive compounds with antioxidant activity from tucum-do-cerrado fruit when compared to non-lyophilized peel, and that water is better than ethanol as an extraction agent. Furthermore, in preliminary experiments to uncover the mechanism of action we showed that tucum-do-cerrado extract has a similar effect to that of mannitol, a classical free radical scavenger, indicating that the extract presents scavenger activity. Based on the analysis of the antioxidant activity of the HPLC fractions, five fractions were selected, and three of them were identified as cyanidin, peonidin and quercetin, while one was suggested to be catechin. However, when these samples were associated with an oxidant insult (H_2O_2), they showed a detrimental effect on the growth of *S. cerevisiae* yeast. Finally, further studies are needed to identify other relevant phenolic compounds in tucum-do-cerrado and to describe their mechanism of action, and pharmacological properties. The results on the effects on yeast growth lead us to suggest investigation of the effect of tucum-do-cerrado compounds on diseased cells, such as cancer cells.

Acknowledgments. We thank Dr. Sandra Fernandes Arruda (Universidade de Brasília) and Dr. Fernanda Ribeiro Rosa (Universidade Federal de Uberlândia) for donating some reagents and sharing their expertise on the FRAP assay and preparation of extracts. We also thank graduate student Carlos Santana (UnB) for his help with the HPLC. MBVCD was supported by a CAPES studentship.

References

- Andrade RG, Jr., Ginani JS, Lopes GK, Dutra F, Alonso A, Hermes-Lima M. 2006. Tannic acid inhibits *in vitro* iron-dependent free radical formation. *Biochimie. Sep*;88:1287-1296.
- Batalha MA. 2011. O Cerrado não é um bioma. *Biota Neotrop* 11:21-24.
- Boyer J, Liu RH. 2004. Apple phytochemicals and their health benefits. *Nutrition journal*. May 12;3:5.
- Fustinoni-Reis AM, Arruda SF, Dourado LP, da Cunha MS, Siqueira EM. 2016. Tucum-Do-Cerrado (*Bactris setosa* Mart.) Consumption Modulates Iron Homeostasis and Prevents Iron-Induced Oxidative Stress in the Rat Liver. *Nutrients*. Feb;8:38.
- Genaro-Mattos TC, Dalvi LT, Oliveira RG, Ginani JS, Hermes-Lima M. 2009. Reevaluation of the 2-deoxyribose assay for determination of free radical formation. *Biochimica et biophysica acta*. Dec;1790:1636-1642.
- Gomes-Rochette NF, Da Silveira Vasconcelos M, Nabavi SM, Mota EF, Nunes-Pinheiro DC, Daglia M, De Melo DF. 2016. Fruit as potent natural antioxidants and their biological effects. *Current pharmaceutical biotechnology*. Apr 25.
- Halliwell B. 2014. Cell culture, oxidative stress, and antioxidants: avoiding pitfalls. *Biomedical journal*. May-Jun;37:99-105.
- Hu D, Huang J, Wang Y, Zhang D, Qu Y. 2014. Fruits and vegetables consumption and risk of stroke: a meta-analysis of prospective cohort studies. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. Jun;45:1613-1619.
- IBGE. 2016. Vamos Conhecer o Brasil. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. <http://7a12ibgegovbr/vamos-conhecer-o-brasil/nosso-territorio/biomashtml>.
- Klink CA, Machado RB. 2005. Conservation of the Brazilian cerrado. *Conservation Biology*.19:707-713.
- Lima AL, Soares JJ. 2003. Aspectos florísticos e ecológicos de palmeiras (Arecaceae) da Reserva Biológica de Duas Bocas, Cariacica, Espírito Santo. *Boletim do Museu de Biologia Mello Leitão*.16:5-20.
- Liu GL, Guo HH, Sun YM. 2012. Optimization of the extraction of anthocyanins from the fruit skin of *Rhodomyrtus tomentosa* (Ait.) Hassk and identification of anthocyanins in the extract using High-

- Performance Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-Mass Spectrometry (HPLC-ESI-MS). *International journal of molecular sciences*.13:6292-6302.
- Lock K, Pomerleau J, Causer L, Altmann DR, McKee M. 2005. The global burden of disease attributable to low consumption of fruit and vegetables: implications for the global strategy on diet. *Bulletin of the World Health Organization*. Feb;83:100-108.
- Lopes GK, Schulman HM, Hermes-Lima M. 1999. Polyphenol tannic acid inhibits hydroxyl radical formation from Fenton reaction by complexing ferrous ions. *Biochimica et biophysica acta*. Oct 18;1472:142-152.
- Mendonça R, Felfili J, Walter B, Silva Jr. JC, Rezende A, Filgueiras T, Nogueira P. 1988. *Flora vascular do Cerrado Planaltina, Brasil: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa - Cerrados*.
- Mulinacci N, Innocenti M, Bellumori M, Giaccherini C, Martini V, Michelozzi M. 2011. Storage method, drying processes and extraction procedures strongly affect the phenolic fraction of rosemary leaves: an HPLC/DAD/MS study. *Talanta*. Jul 15;85:167-176.
- Murphy MP, Holmgren A, Larsson NG, Halliwell B, Chang CJ, Kalyanaraman B, Rhee SG, Thornalley PJ, Partridge L, Gems D, et al. 2011. Unraveling the biological roles of reactive oxygen species. *Cell metabolism*. Apr 6;13:361-366.
- Petrovic M, Petrovic B, Savic J, Bugarcic ZD, Dimitric-Markovic J, Momic T, Vasic V. 2010. Flavonoids as matrices for MALDI-TOF mass spectrometric analysis of transition metal complexes. *Journal of Mass Spectrometry*.290:39-46.
- Rosa FR, Arruda AF, Siqueira EM, Arruda SF. 2016. Phytochemical Compounds and Antioxidant Capacity of Tucum-Do-Cerrado (*Bactris setosa* Mart), Brazil's Native Fruit. *Nutrients*. Mar;8:110.
- Rufino MSM, Alves RE, Brito ES, Pérez-Jiménez J, Saura-Calixto F, Mancini-Filho J. 2010. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. *Food chemistry*.121:996-1002.
- Silva DB, Silva JA, Junqueira NTV, Andrade LRMFdc. 2001. *Frutas do Cerrado*. Embrapa Informação Tecnológica.178.
- Siqueira EM, Rosa FR, Fustinoni AM, de Sant'Ana LP, Arruda SF. 2013. Brazilian savanna fruits contain higher bioactive compounds content and higher antioxidant activity relative to the conventional red delicious apple. *PloS one*.8:e72826.
- Souza VYV. 2013. *Análise da Proteção Antioxidante Promovida por Extratos de Tucum-do-Cerrado (Bactris setosa)* Universidade de Brasília.
- Yang Y, Dong C, Yang S, Li X, Sun X, Yang Y. 2015. Physiological and proteomic adaptation of the alpine grass *Stipa purpurea* to a drought gradient. *PloS one*.10:e0117475.

Figure Legends

Figure 1. Images of (a) clusters of tucum-do-cerrado fruits as they are found in nature, (b) parts of one fruit and pulp, peel and seed, and (c) tucum-do-cerrado fruits, comparison with the scale. Pictures taken by Marcela Berckmans in 02/21/2015.

Figure 2. Effect of different concentrations of aqueous extract of tucum-do-cerrado (EAqL) on the oxidative degradation of 2-deoxyribose and comparison with mannitol. (a,b) The reactions occurred in phosphate-buffered solution (10 mM, pH 7.2) containing 5mM 2-DR, 1 mM ascorbate, 50 μ M Fe(III)-EDTA in the absence (\blacktriangle) or presence of aqueous extract of tucum-do-cerrado: 0.52mg/ml (\blacksquare), 1.0 mg/ml (\bullet), 1.55 (\blacklozenge), 2.07mg/ml (\square), 2.60 (Δ). Samples were incubated for 0-40 minutes. (c,d) The reactions were performed as in (a), except that various concentrations of EAqL were tested. Samples were incubated for 20 min. (e,f) The reactions occurred in phosphate-buffered solution (10 mM, pH 7.2) containing 5– 50mM 2-DR, 1 mM ascorbate, 50 μ M Fe(III)-EDTA in the presence of 2.07 mg/ml tucum-do-cerrado aqueous extract (\square) or mannitol 10 mM (\circ) or water (control) (\blacktriangle). Samples were incubated for 20 minutes. Values are mean \pm S.E. (n = 3).

Figure 3. (a) Antioxidant activity of the HPLC fractions of tucum-do-cerrado aqueous extract measured by the oxidative degradation of 2-deoxyribose. The reactions occurred in phosphate-buffered media (10 mM, pH 7.2) containing 5mM, 2-DR, 1 mM ascorbate, 50 μ M Fe(III)-EDTA in the absence (control) or presence of tucum-do-cerrado fractions. Reaction time was 20 minutes. Values are mean \pm S.D. (n = 3). Fractions 06, 09, 15 and 17 were selected for experiment with the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. (b) Time course of yeast growth in YPD medium (Control) and in YPD medium containing H₂O₂ (HP, 1 mM final concentration) or tucum-do-cerrado HPLC fractions (labeled "F" followed by the fraction number) or both (tucum-do-cerrado fraction plus H₂O₂). The concentrations of the fractions were as follows: F06 – 24.35 ng/ml; F09 – 10.67 ng/ml; F15 – 43.1 ng/ml and F17 – 26.1 ng/ml. Values are means of two independent experiments performed in different days.

Table 1. Ferric reducing antioxidant power (FRAP) in aqueous (EAq) and ethanolic (EEt) tucum-do-cerrado extracts prepared using lyophilized (L) or fresh non-lyophilized (NL) peel.

Extracts	FRAP¹
EAq (L)	18.12 ± 0.74
EEt (L)	3.81 ± 0.82
EAq(NL)	5.27 ± 2.64
EEt (NL)	3.01 ± 0.89

¹ Expressed as mmol Fe₂SO₄/g peel powder.
Means ± SD (n=3).

Table 2. Antioxidant protection percentage of fractions in the 2-deoxyribose (2-DR) degradation assay.

Fractions	Concentration (ng/ml)	Protection (%)
1	283	30
2	117	40
3	175	42
4	115	35
5	106	46
6	195	52
7	220	32
8	87	26
9	85	45
10	140	23
11	272	41
12	94	24
13	115	26
14	292	27
15	345	38
16	122	36
17	209	57
18	84	37
19	97	37

Values of % inhibition of 2-deoxyribose damage were calculated from data depicted in Fig.3a.

Table 3. Identification of phenolic compounds in tucum-do-cerrado by HPLC-DAD and MALDI-TOF.

Peak number	Retention time (min)	Uv Max	Fragment(s) ions m/z (MS mode)	Compound
6	20.62	220, 278, 524	-	Catechin *
9	27.66	216, 278, 517	-	Catechin *
15	41.73	211, 279, 326, 517	287	Cyanidin
17	47.30	206, 269, 357, 518	301	Peonidin
18	49.35	254, 353, 520	303	Quercetin

*Proposed only by UV spectrum (Figures S2 and S3)

Figure 1

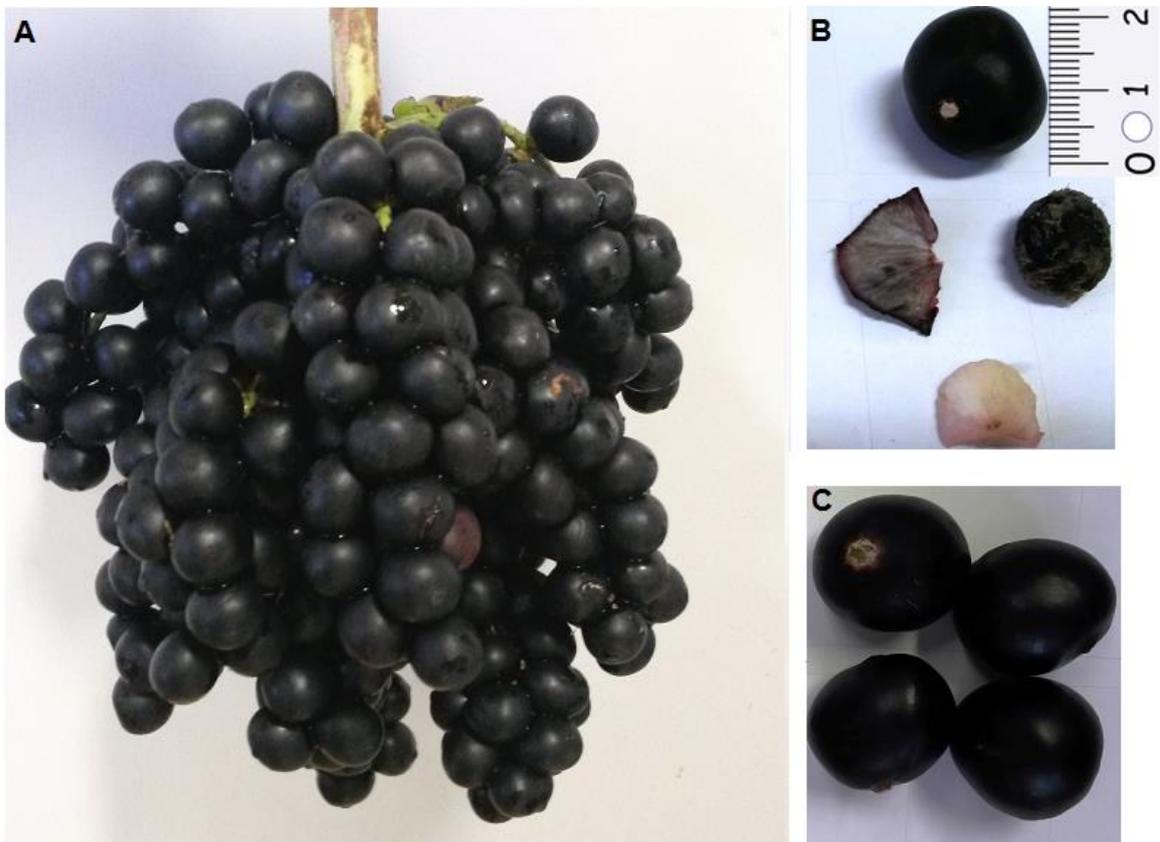


Figure 2

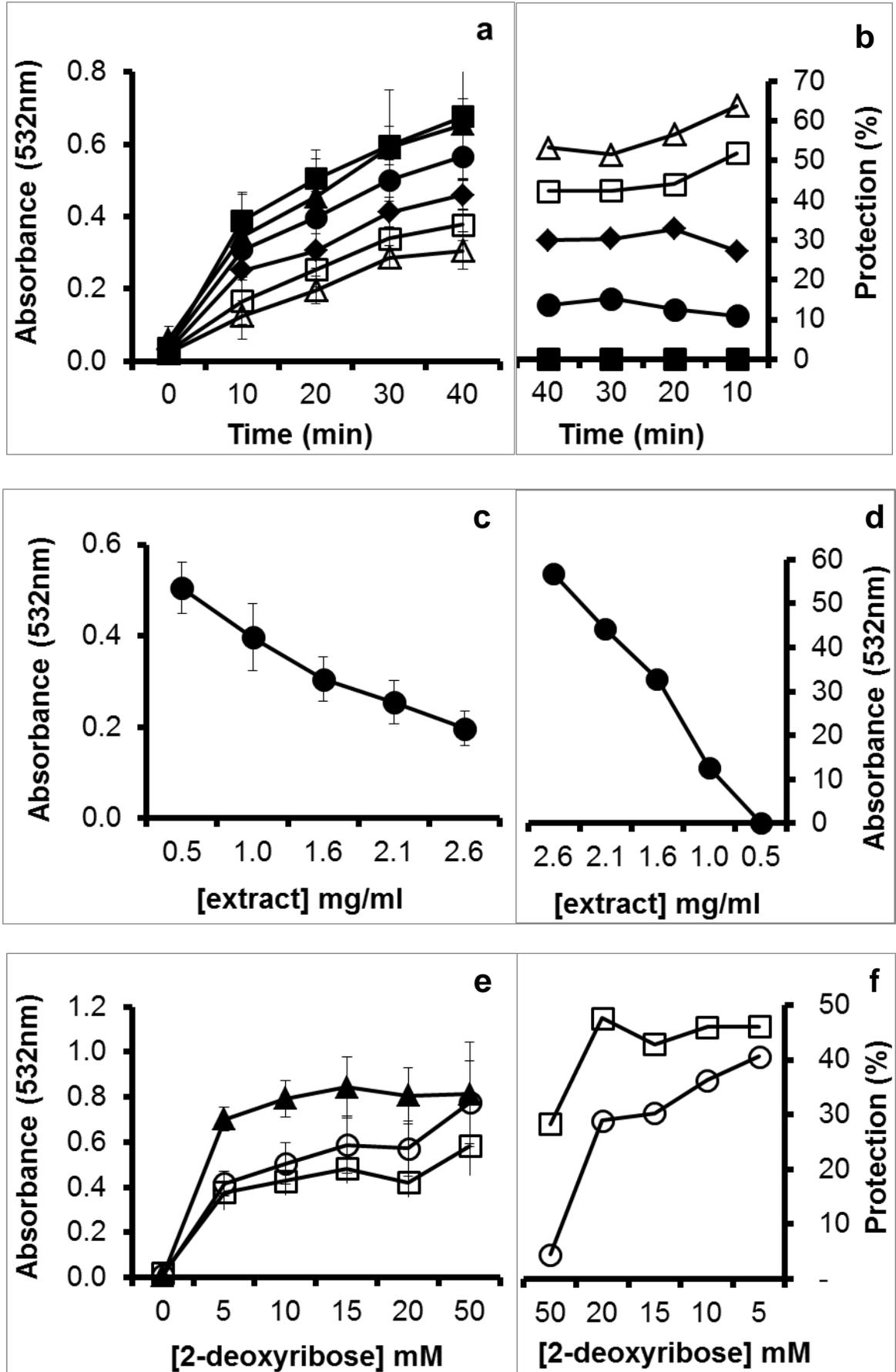
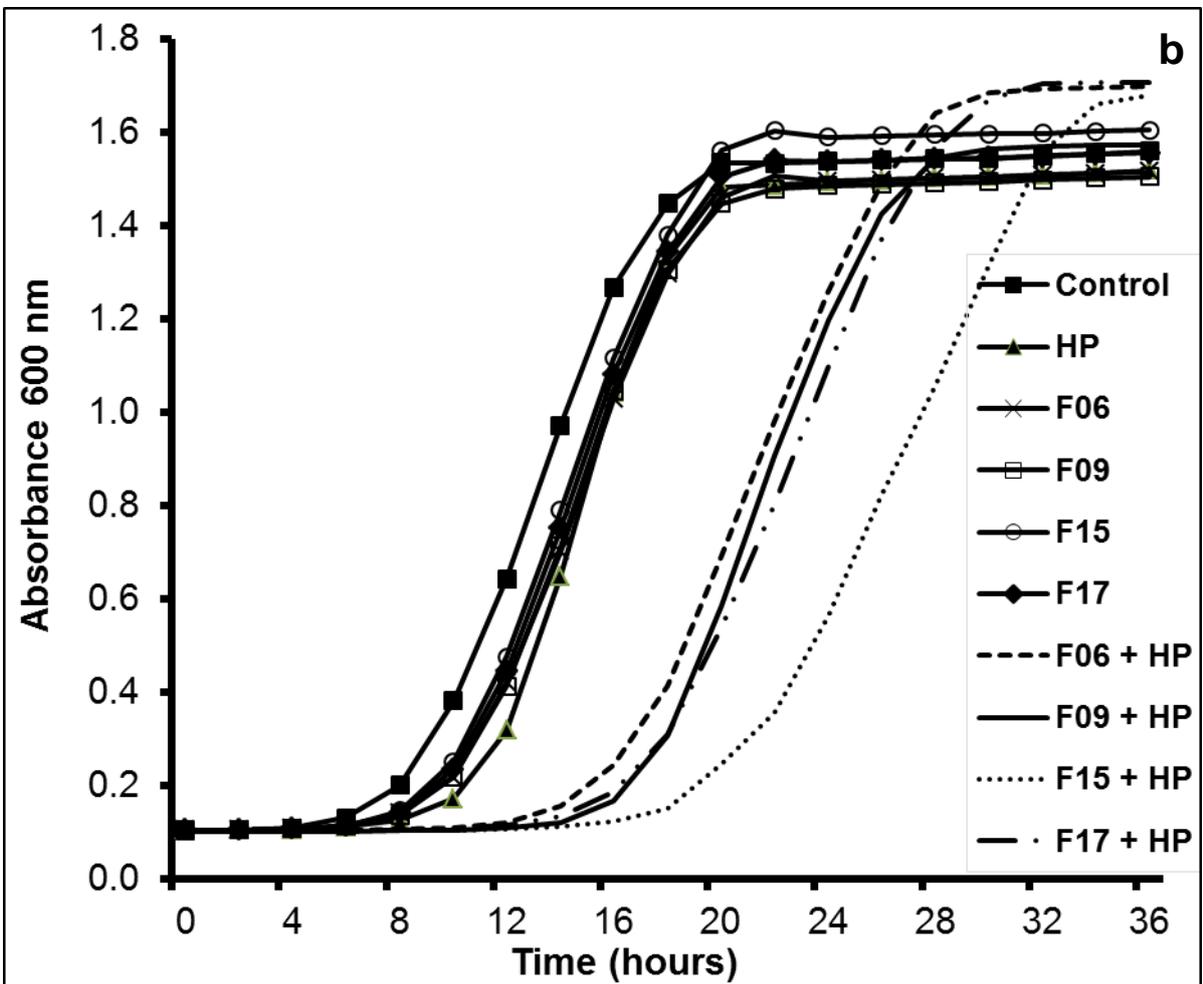
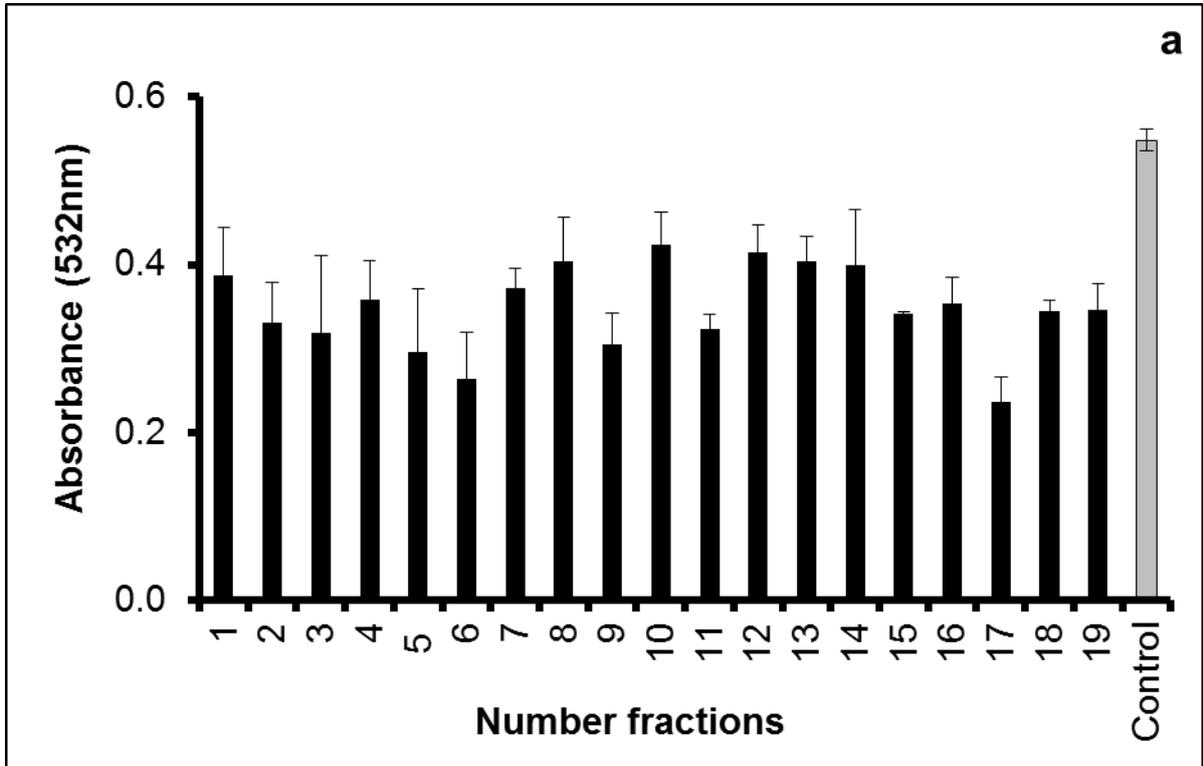


Figure 3



Supplementary Material

1. Experimental

1.1. Reagents, Standards and Sample Material

Ascorbic acid, 2,4,6-tris(2-pyridyl)-S-triazine (TPTZ), 2-deoxyribose (2-DR), iron trichloride, iron(II) sulfate heptahydrate, potassium phosphate, thiobarbituric acid (TBA), sodium acetate, were obtained from Sigma. Acetic acid was purchased from Merck, phosphoric acid from Vetec, and hydrochloric acid from Cromoline. Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) from Synth. Ethanol and Methanol (grade HPLC) from J.T.Baker. Phenolic standards were all purchased from Sigma-Aldrich Inc. The fruits of tucum-do-cerrado (*Bactris setosa* Mart) were collected in condition of full maturity in a farm localized in the city of "Terezópolis de Goiás", Goiás, Brazil. The geographic coordinates for collection site were 16°46'52.25"S and 49° 5'57.22"W.

1.2. Extraction of tucum-do-cerrado fruit compounds

The fruits were selected for full maturity and peel integrity, then they were washed with deionized water and let to dry at ambient temperature before storage at -80°C. The peel was cut from frozen fruits using a stainless steel knife. The peels were lyophilized. Subsequently, the frozen samples were immersed in liquid nitrogen and pulverized in a mortar. The extraction was done using powder of lyophilized peel, with solvent (water or ethanol) added in 1:10 ratio (w/v) and mixing in a Thermomixer (750 rpm) at 12°C for 1h. The crude extracts were stored at 4°C overnight and then filtered using a JP41 filter paper for the removal of remaining particles. These procedures were conducted in the dark.

1.3. HPLC-DAD analysis

The analyses were carried out using an HPLC system (Shimadzu, Japan) consisting of a solvent delivery pump (Model LC-20 AT) and a diode array detector- DAD (Model SPD-M20A). The aqueous extract was filtered through a 0.22 µm membrane filter (Millex-GV, Millipore) and 200 µL aliquots of the sample were injected into the Synergi 4u Fusion-RP C₁₈ (250 x 4.6 mm i.d., 4 µm particle size, Phenomenex, USA). The flow rate was 0.8 mL/min

using 2% formic acid solution (Solvent A) and 90 % methanol: acidified water(0.5 formic acid; 9:1, v/v) (Solvent B) as mobile phase. A gradient programme was linear: 0 – 52 min, 0 – 42% B and the DAD was set at 200 - 600 nm. Phenolic compounds were identified by comparing their retention time, UV-visible spectral data at 280 nm to previously injected standards and mass analysis.

1.4. MALDI-TOF-MS analysis

Mass analysis of fractions of extract was performed using an AB Sciex TOF/TOF 5800 (AB Sciex, Framingham, MA, USA) in the 200-4,000 Da range in the reflected positive mode, using internal calibration. The samples was resuspended in water containing TFA 0,1% (v/v), using alfa-cyano-4-hydroxycinnamic acid as matrix.

1.5. Ferric Reducing Antioxidant Power Assay (FRAP).

The antioxidant activity of the aqueous and ethanoic extracts was estimated by the FRAP assay (Benzie and Strain 1996) with modifications. The FRAP reagent was freshly prepared mixing solutions of 0.3 mol/L acetate buffer (pH 3.6), 10 mmol/L 2,4,6-triazine-tripyridyl in 40 mmol/L hydrochloric acid and an aqueous solution of 20 mmol/L ferric chloride in a 10:1:1 ratio and then incubating the mixture at 37°C for 30 min. Subsequently, 900 µL of FRAP reagent was mixed with 30 µL of fruit extract and 90 µL of deionized water. A tube containing 900 µL of FRAP reagent plus 90 µL of deionized water plus 30 µL of solvent was used as a blank solution and the absorbance at 595 nm was measured immediately after starting the reaction. Aqueous solutions of known Fe (II) concentrations in the range of 100- 2000 mmol/L (Fe₂SO₄) were used to generate a calibration curve. The total extracts were assayed in triplicate and the mean values were expressed in mmol Fe per g of fruit. The results were expressed as the mean values ± standard deviation.

1.6. 2-deoxyribose (2-DR) degradation assay

In vitro formation of ·OH (hydroxyl radical) and determination of anti/prooxidant properties of tucum-do-cerrado extracts and fractions was performed using the 2-deoxyribose oxidative degradation method (Gutteridge and Halliwell 1988) with modifications by Genaro-Mattos et al. (Genaro-Mattos et al. 2009). All solutions used were prepared daily and used

fresh. The following solutions were added in a microtube and in this sequence: 50µL of ascorbic acid (1mM), 50µL of potassium phosphate buffer (10mM, pH 7,2), 50 µL 2-desoxyribose (5mM), 50µL of complex of iron trichloride (FeIII) with EDTA (50µM) and 200 µL of extract or fraction or mannitol. Reactions were incubated at room temperature (25 ± 1 °C) for different time periods (0, 10, 20, 30 and 40 min) and stopped by the addition of 0.4ml 4% phosphoric acid and 0.4ml 1% TBA (w/v in 50mM NaOH). After boiling (95°C) for 15 min, the absorbance was measured at 532 nm. To discount 2-DR degradation during the boiling phase of the method, a blank called “zero time incubation” was use, where ascorbic acid (used to start free radical formation from oxygen plus Fe(III)) was included in the reacting media after the addition of TBA (Genaro-Mattos, Dalvi, Oliveira, Ginani and Hermes-Lima 2009).The inhibition percentage was calculated using the formula below:

$$I(\%) = \frac{\text{Abs.}_{\text{blank}} - \text{Abs.}_{\text{sample}}}{\text{Abs.}_{\text{blank}}} \times 100\%$$

1.7. Yeast strain and analysis of cell growth

Saccharomyces cerevisiae (S288c - MAT α SUC2 gal2 mal mel flo1 flo8-1 hap1) yeast cells were used to analyse antioxidant protection by tucum-do-cerrado fractions. A single yeast colony was inoculated into 3 mL of YPD medium (1% w/v yeast extract, 2% w/v peptone, 2% w/v D-glucose) and incubated overnight at 30°C with shaking at 250 rpm. The next day 1 mL of the culture were transferred to a 2.5 mL microtube and centrifuged at 3000 rpm for 5 min at room temperature. The supernatant was removed and 1 mL of fresh YPD medium was used to resuspend the cells. The cell sample was then diluted 1:100 using YPD in a new microtube and an aliquot placed in a Neubauer chamber for cell counting under a microscope. After calculating the cell concentration, the original cell culture was diluted to 4×10^5 cells/mL to be used in the experiments. Yeast growth curves were obtained for cells growing in YPD medium only, or in YPD medium containing 1 mM H₂O₂, at 30 °C and 282 cpm. The solution of hydrogen peroxide was prepared in deionized water using the molar extinction coefficient of $0.040 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ at 240 nm. The appropriate concentration of H₂O₂ was firstly determined using a range of concentrations, and then mixed with yeast cells suspension to a final concentration of 10^5 cells/mL in wells (total volume of 200 µL) of 96well plates. Yeast growth was monitored by reading the absorbance at 600 nm half an hour after the start of incubation and then at each half an hour intervals for 36h using a 96well plate reader (Eon®).

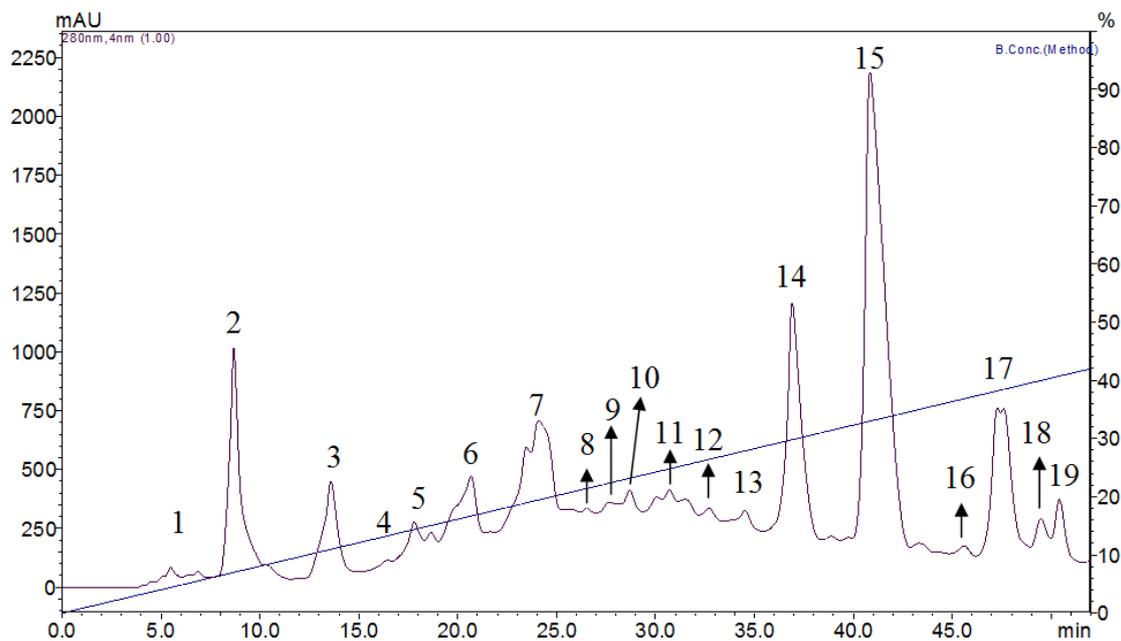


Figure S1. HPLC Chromatographic profile of tucum-do-cerrado aqueous extract. The collected fractions are indicated with numbers and arrows (19 in total). The experimental conditions were as follows: flow rate 0.8 mL/min, mobile phase 2% formic acid (Solvent A) and methanol: acidified water (0.5 formic acid; 9:1, v/v) (Solvent B). Detection was made at 280 nm. Peak identification is listed in table 2.

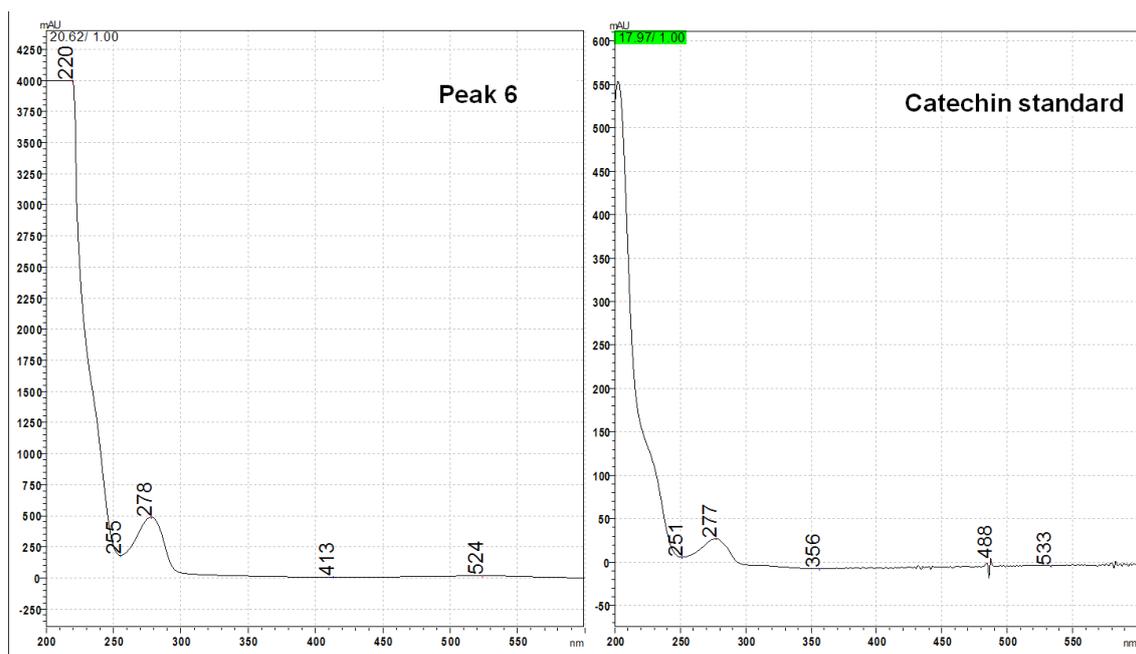


Figure S2. The UV-spectral data of peak 6 and catechin standard.

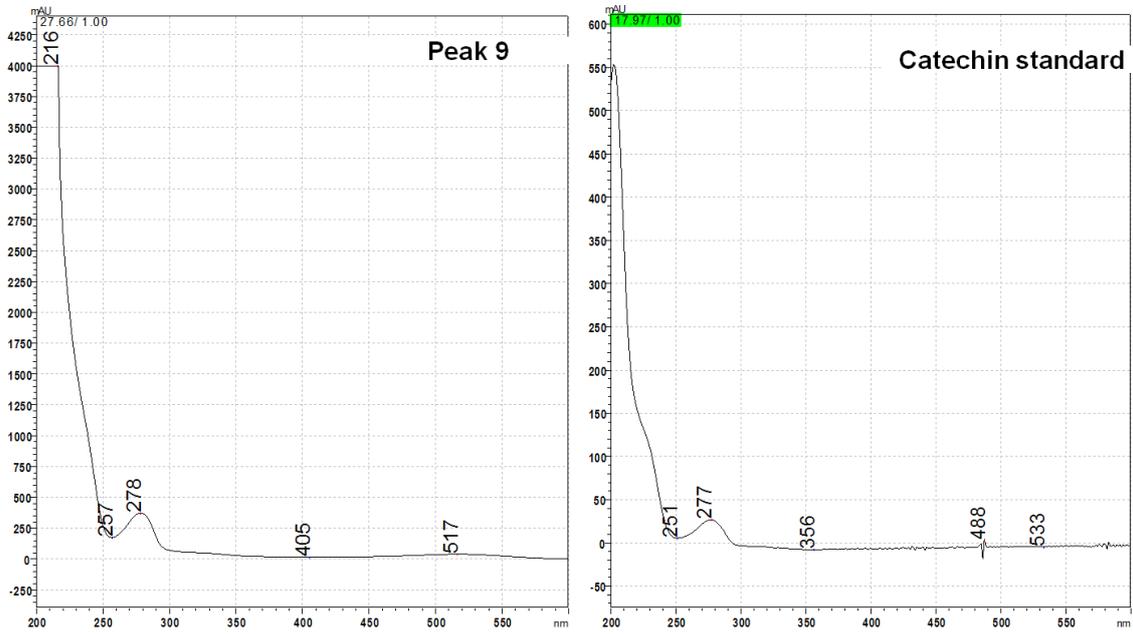


Figure S3. The UV-spectral data of peak 9 and catechin standard.

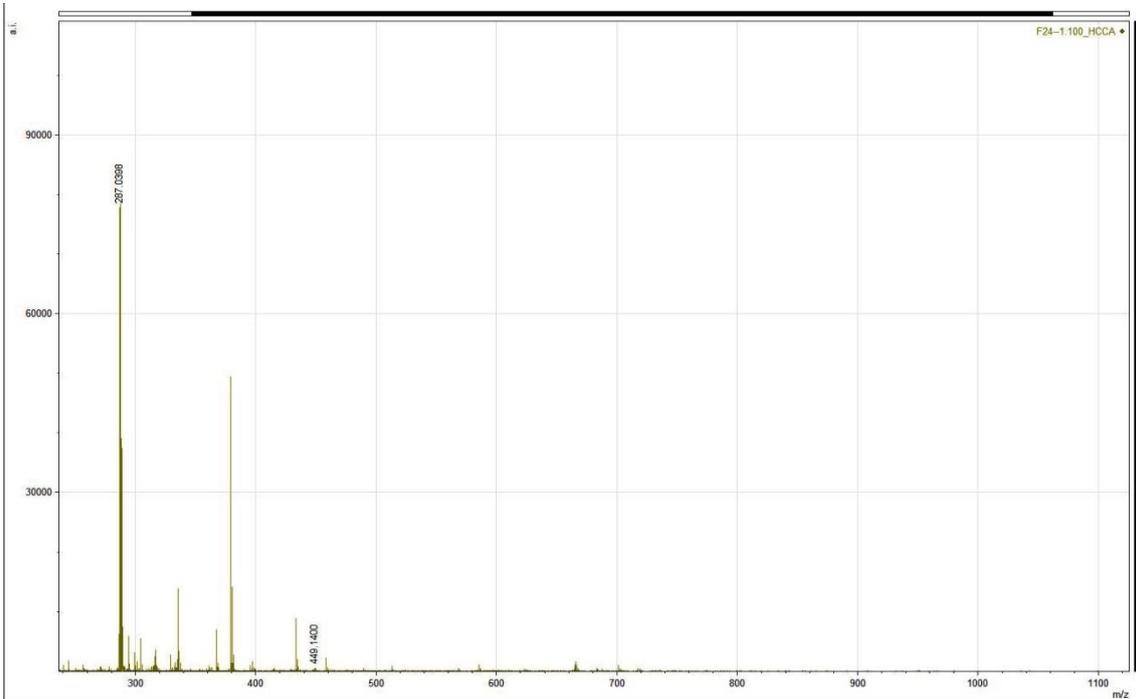


Figure S4. Mass Spectra of fraction 15 obtained in the positive mode by MALDI-TOF.

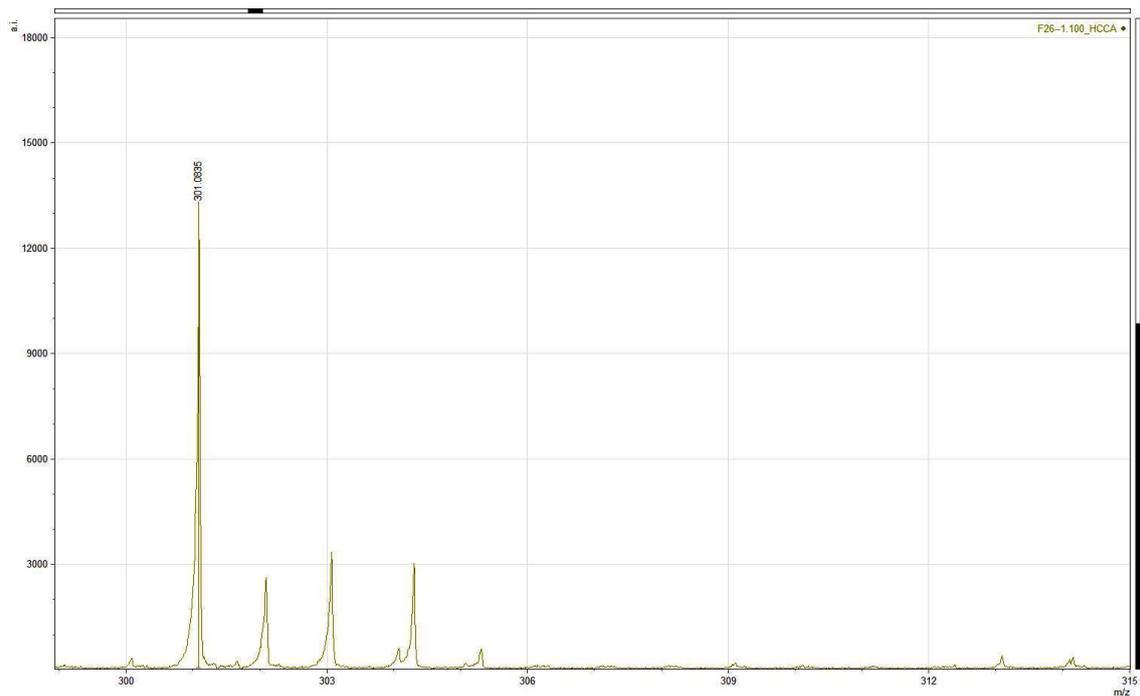


Figure S5. Mass Spectra of fraction 17 obtained in the positive mode by MALDI-TOF.

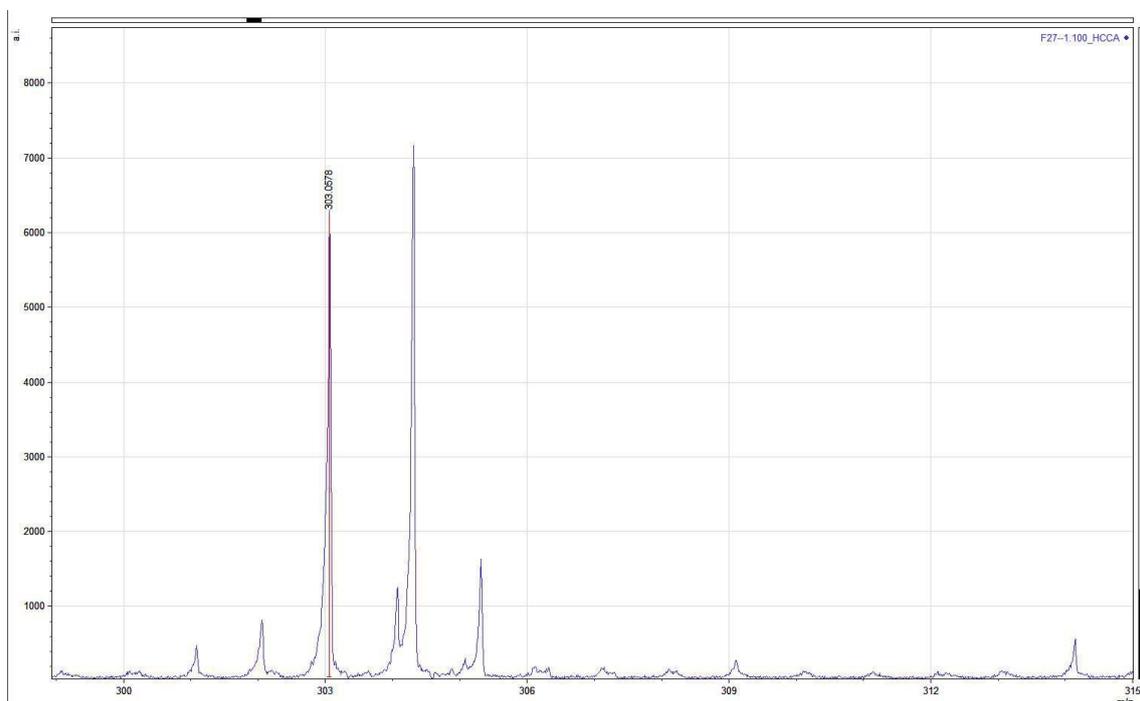


Figure S6. Mass Spectra of fraction 18 obtained in the positive mode by MALDI-TOF.

References

Benzie IF, Strain JJ. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Analytical biochemistry*. Jul 15;239:70-76.

Genaro-Mattos TC, Dalvi LT, Oliveira RG, Ginani JS, Hermes-Lima M. 2009. Reevaluation of the 2-deoxyribose assay for determination of free radical formation. *Biochimica et biophysica acta*. Dec;1790:1636-1642.

Gutteridge JM, Halliwell B. 1988. The deoxyribose assay: an assay both for 'free' hydroxyl radical and for site-specific hydroxyl radical production. *The Biochemical journal*. Aug 1;253:932-933.