

UNIVERSIDADE LUTERANA DO BRASIL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E TOXICOLOGIA
APLICADA



**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E
ANTIMUTAGÊNICA DA ACEROLA (*Malpighia glabra* L.)**

Dissertação para obtenção do Título de
Mestre em Genética e Toxicologia
Aplicada.

ROBERTA DA SILVA NUNES

Orientador: Dr. Marc François Richter

Co-orientadora: Dra. Jenifer Saffi

CANOAS

2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Este trabalho foi desenvolvido nas instalações dos Laboratórios de Farmacocinética, no Centro de Pesquisa em Ciências Médicas; Laboratório de Genética Toxicológica; Laboratório de Farmacognosia da Universidade Luterana do Brasil e no Departamento de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Este trabalho teve o apoio financeiro da Universidade Luterana do Brasil (ULBRA), FAPERGS, CNPq e Farmácia Dermakos Manipulação de Fórmulas, Pelotas-RS.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr^a. Marc François Richter, por sua orientação e apoio durante as várias etapas deste trabalho, pela confiança e conhecimento compartilhado.

A Professora Dr. Jenifer Saffi, pela colaboração.

Ao Professor Dr. Alexandre Ferraz e a Prof. Dr. Juliana Silva pelos sempre pertinentes conselhos...

A todos os funcionários e professores do Programa de Pós-graduação em Genética e Toxicologia Aplicada pela convivência e apoio.

A todos os colegas do Laboratório 416, por tornarem tão agradável e divertido o tempo em que ficamos trabalhando.

Ao colega Giovanni, pela incansável e solicita ajuda sempre necessária, por todos os conselhos, enfim por todos os momentos alegres e divertidos compartilhados dentro do laboratório.

A todos os colegas do curso, em especial Elemar, Léia, Cristiane, Leonel e Mariele pelas inúmeras ajudas, inúmeros conselhos, pelos momentos de boas risadas. Vocês têm um espaço especial no meu coração!

À melhor mãe do mundo, Marisa, sempre incansável em suas ajudas, pela constante demonstração de amor, pela confiança, oportunidade e todo apoio que sempre precisei, te amo muito.

A todos que de uma maneira ou outra me auxiliaram e apoiaram na realização deste trabalho.

Muito obrigada!

ÍNDICE

RESUMO	6
ABSTRACT	7
LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE TABELAS.....	10
1 – INTRODUÇÃO.....	11
1.1 Planta	12
1.1.1 Aspectos gerais	12
1.1.2 Características físicas, químicas e físico-químicas	15
1.1.3 Vitamina C.....	17
1.2 Espécies Reativas de Oxigênio	20
1.2.1 Aspectos gerais que envolvem a formação de ERRO.....	20
1.2.2 Radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$).....	21
1.2.3 Peróxido de hidrogênio (H_2O_2)	22
1.2.4 Radical hidroxila (OH^{\bullet}).....	23
1.2.5 Oxigênio singlete (1O_2).....	24
1.2.6 Danos oxidativos a biomoléculas.....	25
1.3 Estresse Oxidativo e Sistema de Defesa Antioxidante	25
1.3.1 Antioxidantes enzimáticos.....	27
1.3.2 Antioxidantes não enzimáticos	28
1.4 A levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como modelo de estudo	32
1.4.1 Defesas antioxidantes da levedura <i>S. cerevisiae</i>	33
1.5 O Estudo de Substâncias com Atividades Pró-e/ou Antioxidante	36
1.6 Testes de Mutação <i>forward</i>	40

2 – OBJETIVOS.....	41
2.1. Objetivo geral	41
2.2. Objetivos específicos.....	41
3 – MATERIAIS E MÉTODOS	43
3.1 Preparação do extrato liofilizado da fruta	43
3.2 Aquisição dos Extratos Secos de Acerola provenientes de diferentes fornecedores do país.....	43
3.3 Análise cromatográfica da Vitamina C	44
3.4 Avaliações biológicas.....	44
3.4.1 Avaliação da atividade antioxidante	44
3.4.1.1 Ensaio antioxidante <i>in vivo</i>	44
3.4.1.2 Ensaio antioxidante <i>in vitro</i>	46
3.4.1.2.1 Método da hipoxantina/xantina oxidase	46
3.4.1.2.2 Ensaio a base de 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH).....	47
3.4.2 Teste de Mutação <i>Forward</i>	47
3.5 Análise estatística.....	48
4 – RESULTADOS	49
4.1 Análise cromatográfica da Vitamina C	49
4.2 Avaliações biológicas.....	52
4.2.1 Atividade antioxidante.....	52
4.2.1.1 Ensaio antioxidante <i>in vivo</i>	52
4.2.1.2 Ensaio antioxidante <i>in vitro</i>	54
4.2.1.2.1 Ensaio hipoxantina/xantina oxidase	54
4.2.1.2.2 Ensaio do radical DPPH	56
4.2.2 Teste de Mutação <i>Forward</i>	59
5 – DISCUSSÃO	61
6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67

RESUMO

Malpighia glabra L., popularmente chamada de “acerola” ou “cereja-das-antilhas” é uma espécie nativa encontrada na América Tropical. É muito utilizada popularmente pela sua ação adstringente, vitamínica, antianêmica, nutritiva, antifúngica, entre outras. A acerola é um fruto de grande potencial econômico e nutricional, devido, principalmente, ao seu alto conteúdo de vitamina C, que associada com carotenóides e antocianinas presentes destacam este fruto no campo dos alimentos funcionais. Este fato tem motivado diversos pesquisadores, em diferentes partes do mundo, a trabalhar com seus possíveis efeitos benéficos ao organismo humano. Entretanto, existem poucos estudos que comprovem atividades biológicas e a segurança do uso desta fruta para fins terapêuticos. Em função disso, o objetivo desse trabalho foi avaliar os efeitos antioxidante e antimutagênico de 3 diferentes extratos secos industrializados da fruta da planta *Malpighia glabra* L., bem como do extrato liofilizado da fruta *in natura*. Para isso, foram utilizados ensaios *in vivo* e *in vitro* para detecção da atividade antioxidante, bem como linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* com marca genética apropriada para detecção de possível atividade antimutagênica. Além disso, foi feito o doseamento da vitamina C através da técnica da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) nos diferentes extratos em teste.

Os resultados deste estudo indicam que todos os extratos da fruta apresentaram atividade antioxidante *in vivo* e *in vitro*, contudo o extrato liofilizado da fruta *in natura* mostrou-se superior aos outros extratos no que diz respeito a esta atividade biológica. Este mesmo extrato não mostrou atividade mutagênica em *S. cerevisiae*, entretanto, apresentou atividade antimutagênica mostrando proteção contra danos ao DNA induzidos pelo H₂O₂. Pode-se reafirmar assim o grande benefício desta fruta baseado em sua atividade antioxidante e antimutagênico.

ABSTRACT

Malpighia glabra L., also popularly called "acerola" or "cereja-das-antilhas" is a native species found in tropical regions of America. It is popularly used due to its adstringente, vitaminic, antienemic, nutritional, antifungal, among other activities. Acerola is a fruit which has a great economic and also a nutritional potential, primarily due to its high content of vitamin C, associated with carotenoids and anthocyanins, and therefore an important fruit in the field of functional foods. This fact, have driven many researchers in different parts of the world, to work with its possible beneficial effects to the human body. However, there are few studies that show its biological activities and its safety for therapeutic purposes of this fruit. Because of this, the aim of this work was to evaluate antioxidant and antimutagenic activities of three different industrialized dried fruit extracts of the plant *Malpighia glabra* L., and of the liophilized extract of the natural fruit. Therefore, *in vivo* and *in vitro* tests were used for detection of a potential antioxidant activity as well as different strains of *Saccharomyces cerevisiae* with specific markers for genetic detection of a possible antimutagenic activity. In addition, the assay was made of vitamin C through high pressure (HPLC) liquid chromatography in different statements in trial. The results of this study indicate that all fruit extracts showed an antioxidant *in vitro* and *in vivo* activity, but the liophilized extract of the natural fruit was shown to be superior to the industrialized extracts with respect to this biological activity. This same extract showed no mutagenic activity in *S. cerevisiae*, however, presented an antimutagenic activity, thus showing protection against damage to DNA induced by H₂O₂. Thus we can confirm an important benefit of the fruit, based on its antioxidant and antimutagenic activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fruto da planta *Malpighia glabra* L.

Figura 2. Sementes do fruto da planta *Malpighia glabra* L.

Figura 3. Estrutura da vitamina C

Figura 4. Representação da formação do radical OH pelas reações Haber-Weiss/Fenton.

Figura 5. Fases de crescimento de uma levedura selvagem quando iniciada em meio completo

Figura 6. Estrutura do radical livre DPPH

Figura 7. Esquema do ensaio para medir atividades antioxidantes *in vitro* utilizando o sistema da xantina oxidase

Figura 8. Derivatização dos radicais hidroxila com o ácido salicílico, levando a formação de dois compostos estáveis 2,3- e 2,5-dihidroxi-ácido-benzóico (2,3-DHBA e 2,5 DHBA).

Figura 9. Cromatogramas da vitamina C das amostras: **a)** 5 µl de uma solução de 10 mg/ml vitamina C pura; **b)** 5 µl de uma solução de 10 mg/ml do extrato 1; **c)** 5 µl de uma solução de 10 mg/ml do extrato 2; **d)** 5 µl de uma solução de 10 mg/ml do extrato 3; **e)** 5 µl de uma solução de 10 mg/ml do extrato da fruta *in natura*.

Figura 10: Curva padrão da vitamina C.

Figura 11. Ensaio de sobrevivência com células de *S. cerevisiae* na fase estacionária após tratamento com extrato liofilizado da fruta acerola *in natura*.

Figura 12. Ensaio de sobrevivência com células de *S. cerevisiae* na fase estacionária após tratamento com extrato 1.

Figura 13. Ensaio de sobrevivência com células de *S. cerevisiae* na fase estacionária após tratamento com extrato 2.

Figura 14. Ensaio de sobrevivência com células de *S. cerevisiae* na fase estacionária após tratamento com extrato 3.

Figura 15. Resultados do teste antioxidante a base da hipoxantina/xantina oxidase.

Figura 16: Resultados do teste antioxidante a base do radical livre DPPH. Os resultados representam a média dos experimentos realizados em triplicata, sendo considerados estatisticamente significativos $p < 0.001$.

Figura 17. Resultados da atividade antioxidante da vitamina C, a base do radical livre DPPH.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores médios de peso, diâmetro e comprimento de acerolas, segundo diferentes autores

Tabela 2. Composição nutricional da acerola in natura e do suco natural (não processado) de acerola por 100g de porção comestível.

Tabela 3. Valores médios de vitamina C de acerolas, segundo diferentes autores.

Tabela 4. Estágios de maturação da acerola.

Tabela 5. Extratos comercializados utilizados no estudo.

Tabela 6. Linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas no estudo antioxidante *in vivo*

Tabela 7. Avaliação da atividade pró-oxidante e/ou antioxidante dos diferentes extratos da Acerola, e da vitamina C pura, utilizando o teste à base da hipoxantina/xantina oxidase.

Tabela 8: Valores de IC₅₀ dos diferentes extratos testados, em relação à IC₅₀ da vitamina C.

Tabela 9. Indução de Mutação *Forward* em linhagem N123 de *S. cerevisiae* após tratamento com extrato liofilizado da fruta *in natura* em fase estacionária de crescimento.

Tabela 10. Indução de Mutação *Forward* em linhagem N123 de *S. cerevisiae* após tratamento com H₂O₂ e extrato liofilizado da fruta *in natura*, por 1 h em fase estacionária de crescimento.

1 – INTRODUÇÃO

As plantas são mundialmente empregadas na medicina popular e apesar do uso indiscriminado das mesmas, até hoje são escassos os estudos sobre as suas constituições químicas e atividades biológicas. A literatura descreve inúmeras atividades biológicas relacionadas com os compostos encontrados nessas preparações tradicionais, principalmente os fenólicos (MONTOURO *et al.*, 2005). Há muitos anos as plantas são de grande importância no tratamento de algumas doenças e, dessa forma, o estudo da constituição química tem contribuído para que alguns fármacos potentes tenham sido descobertos (SANNOMIYA *et al.*, 2004).

Extratos vegetais e seus constituintes isolados podem ser usados na fabricação de produtos terapêuticos industrializados (MARQUES, 2002). Relatos revelam que cerca de 80% da população mundial utiliza plantas com finalidade terapêutica (FETROW e AVILA, 2000).

A indústria mundial de produtos fitoterápicos tem apresentado, em geral, um crescimento anual de 25% em seus lucros (FETROW e AVILA, 2000). Além disso, o desenvolvimento de um fitoterápico pode ser obtido com custos menores que um fármaco sintético (YUNES *et al.*, 2001). Em muitos países com cultura diversificada, o uso de plantas medicinais tem crescido na última década, generalizando-se em todos os quadrantes do mundo. Nos Estados Unidos da América (EUA), por exemplo, aproximadamente 25% das prescrições contêm compostos originados de plantas (YAMADA, 1998). Em Cuba, a rica flora do país permite vasta tradição no uso de fitoterápicos (VIZOSO *et al.*, 2002). Já na África do Sul, o uso comum e medicinal de plantas é vasto, com grande produção e obtenção de extratos, movimentando setores da economia (VERSCHAEVE *et al.*, 2004). Na Alemanha, vários fitoterápicos já foram liberados no mercado e 70% dos profissionais de saúde prescrevem esses produtos aos pacientes, mantendo um dos maiores mercados mundiais de drogas de origem vegetal (FETROW e AVILA, 2000). No Brasil, muitas plantas são utilizadas sem evidências científicas que comprovem a eficácia desses tratamentos (HOLETZ *et al.*, 2002). Embora

seja o quinto maior consumidor mundial de remédios, possua grande riqueza natural e amplo patrimônio étnico-cultural, o mercado farmacêutico brasileiro é dominado por empresas multinacionais (LOPES, 2004).

Em grande parte, os efeitos gerados pelos constituintes de uma planta no organismo vivo são verificados baseando-se nos conhecimentos populares de uso repetitivo e tradicional. Sabe-se que os vegetais e frutas possuem classes de agentes fitoquímicos com diversas ações terapêuticas, como efeitos antioxidantes, antimutagênicos e até anticarcinogênicos (KUSAMRAN *et al.*, 1998; NAKAMURA *et al.*, 1998; NOGUEIRA *et al.*, 2005). Enfim, os extratos de muitas plantas podem ser usados no tratamento de várias doenças humanas (YEN *et al.*, 2001). Apesar de muitas ações benéficas das plantas, é importante verificar que alguns de seus constituintes podem ser tóxicos ao organismo, e o metabolismo vegetal também pode gerar metabólitos com esta mesma atividade. Segundo AMES (1983) e FRANKE *et al.* (2003), elementos presentes em vegetais da dieta humana, podem ter uso tanto medicinal como podem apresentar substâncias nocivas para o organismo.

1.1 A PLANTA *Malpighia glabra* L.

1.1.1 Aspectos gerais

A família Malpighiaceae é formada por aproximadamente 800 espécies, distribuídas em 60 gêneros, de ocorrência em regiões tropicais (Norte, Nordeste e Região Central do Brasil, além da América Central e Guianas). Apesar desse grande número de espécies vegetais, pouco é conhecido acerca da constituição química da família. Poucos trabalhos na literatura reportam a presença, em geral, de triterpenos, flavonóides e esteróides em algumas espécies (DAVID e SANTOS, 2003). Esses vegetais apresentam diferentes tipos de habitat, frutos e caracteres citogenéticos. Em geral, as espécies arbustivas e arbóreas são muito comuns nesta família (LOMBELLO e MARTINS, 2003). No Brasil, a maior parte das espécies da família Malpighiaceae é conhecida por ser

utilizada com finalidade terapêutica e como alimento. Desse modo, há uma crescente necessidade de mais estudos fitoquímicos com essas espécies (DAVID e SANTOS, 2003).

Malpighia glabra L., popularmente chamada de “acerola” ou “cereja-das-antilhas”, é uma espécie nativa encontrada na América Tropical. É muito utilizada popularmente pela sua ação adstringente, vitamínica, antianêmica, nutritiva, antifúngica, entre outras. A acerola, pelo seu inegável potencial como fonte natural de vitamina C e sua grande capacidade de aproveitamento industrial, tem atraído o interesse dos fruticultores e passou a ter importância econômica em várias regiões do Brasil (NOGUEIRA *et al.*,2005).

O Brasil é o maior produtor, consumidor e exportador de acerola no mundo (CARVALHO, 2000). Existem plantios comerciais em praticamente todos os estados brasileiros (ALVES, 1996). Contudo, é na região nordestina, por suas condições de solo e clima, onde a acerola melhor se adapta (PAIVA *et al.*, 1999).

As indústrias de frutas tropicais processam, no Brasil, cerca de 34 mil toneladas de acerola por ano, o que equivale a 7,16% do total de frutas processadas por estas empresas. As acerolas processadas geram, aproximadamente, 18 mil toneladas de sucos e polpas por ano, concentrando-se esta produção na região nordeste do país (ASTN e APEX, 2001).



Figura 1: Fruto da planta *Malpighia glabra* L.



Figura 2: Sementes do fruto da planta *Malpighia glabra* L.

A acerola (figura1) é um fruto tropical de grande potencial econômico e nutricional, devido, principalmente, ao seu alto conteúdo de vitamina C, que associada com carotenóides e antocianinas presentes destacam este fruto no campo dos alimentos funcionais. Além disso, pode-se destacar, ainda, o seu fácil cultivo, o sabor e aroma agradáveis e a grande capacidade de aproveitamento industrial, o que viabiliza a

elaboração de vários produtos ao mesmo tempo em que promove a geração de empregos. No entanto, há carências quanto a dados de produção (áreas plantada e colhida) de acerola, bem como comercialização do fruto *in natura* e de seus produtos (FREITAS *et al.*, 2006).

1.1.2 Características físicas, químicas e físico-químicas

A acerola, o fruto da aceroleira, é uma drupa, carnosa, variando na forma, tamanho e peso. Nela, o epicarpo (casca externa) é uma película fina; o mesocarpo é a polpa e o endocarpo é constituído por três caroços unidos, com textura pergaminácea, que dão ao fruto o aspecto trilobado. Cada caroço pode conter no seu interior uma semente, com 3 a 5mm de comprimento, de forma ovóide e com dois cotilédones (ALMEIDA *et al.*, 2002). A composição química, inclusive a distribuição de componentes do aroma, é dependente das espécies, condições ambientais e, também, do estágio de maturação da fruta (VENDRAMINI e TRUGO, 2000).

O teor de vitamina C e outras características atribuídas à qualidade da acerola, tais como coloração, peso e tamanho dos frutos, teor de sólidos solúveis e pH do suco, além de serem afetadas pela variabilidade genética dos pomares, sofrem influência de vários outros fatores, como precipitações pluviais, temperatura, altitude, adubação, irrigação e a ocorrência de pragas e doenças (NOGUEIRA *et al.*, 2005).

A acerola é um fruto climatérico, com elevado pico da taxa respiratória (900ml CO₂ kg⁻¹h), mas com uma baixa taxa no pico de produção de etileno (3µl C₂H₄ kg⁻¹ h) (CARRINGTON e KING, 2002). Segundo ARAÚJO (1994), a acerola sofre alterações rapidamente após a colheita na cor, aroma, sabor e textura. Este fato pode estar relacionado com condições de armazenamento, temperatura, entre outros, podendo levar a uma possível degradação dos compostos ativos.

Há frutos arredondados, ovalados ou mesmo cônicos (GONZAGA NETO e SOARES, 1994). O tamanho dos frutos pode variar de 1 a 2,5cm, o diâmetro de 1 a 4cm e o peso de 2 a 15g (ALVES e MENEZES, 1995). Conforme mostra os resultados obtidos

por NUNES *et al.* (2002), GONZAGA NETO *et al.* (1999), GOMES *et al.* (2000), MOURA *et al.* (2002) e FRANÇA e NARAIN (2003) apresentados na Tabela 1.

Tabela 1: Valores médios de peso, diâmetro e comprimento de acerolas, segundo diferentes autores (FREITAS *et al.*, 2006).

CARACTERÍSTICAS	GONZAGA NETO et al. (1999)	GOMES et al. (2000)	NUNES et al. (2002)	MOURA et al. (2002)	FRANÇA & NARAIN (2003)
Peso médio (g)	2,85 a 6,9	-	3,44 a 10,69	3,33 a 11,75	2,65 a 10,85
Diâmetro médio (cm)	-	1,84 a 2,43	1,87 a 2,87	-	1,62 a 2,83
Comprimento médio (cm)	-	1,48 a 1,87	1,43 a 2,24	-	1,43 a 2,35

A acerola muda de tonalidade com a maturação, passando do verde ao amarelo, laranja, vermelho ou roxo (PORCU e RODRIGUEZ-AMAYA, 2003) devido, sobretudo, à degradação da clorofila e à síntese de antocianinas e carotenóides. A cor vermelha da acerola, no estágio maduro, decorre da presença de antocianinas (LIMA *et al.*, 2002b). Na acerola, evidencia-se uma grande variação deste teor influenciando conseqüentemente a cor dos frutos (LIMA *et al.*, 2002a). Quanto maior o teor de antocianinas, melhor a aceitação do produto por parte do consumidor (MOURA *et al.*, 2002).

A tabela 2 mostra a composição nutricional de acerolas *in natura* e do suco de acerola não processado conforme USDA (National Nutrient Database for Standard)(2004). Segundo os valores da tabela 2 tanto a acerola *in natura* como o seu suco natural são excelentes fontes de vitamina C, carotenóides precursores da vitamina A, licopeno, além de conter quantidades consideráveis de tiamina, riboflavina, niacina, ácido pantotênico, cálcio, ferro e magnésio. Uma porção de 100 gramas da fruta *in natura* fornece 2796% da IDR de vitamina C e 28,76% da IDR de vitamina A necessária para um adulto (USDA 2004).

Tabela 2: Composição nutricional da acerola *in natura* e do suco natural (não processado) de acerola por 100g de porção comestível (USDA, 2004).

Nutrientes	Acerola <i>in natura</i>	Suco natural de acerola	Ingestão Diária Recomendada (IDR)
Água (g)	91,41	94,30	-
Energia (kcal)	32	23	-
Proteína (g)	0,40	0,40	50
Lipídeos Totais (g)	0,40	0,40	-
Cinzas (g)	0,20	0,20	-
Carboidratos por Diferença (g)	7,69	4,80	-
Fibra Dietética Total (g)	1,1	0,3	-
Açúcares Totais (g)	-	4,50	-
Minerais:			
Cálcio (mg)	12	10	800
Ferro (mg)	0,20	0,50	14
Magnésio (mg)	18	12	300
Fósforo (mg)	11	9	800
Potássio (mg)	146	97	-
Sódio (mg)	7	3	-
Zinco (mg)	0,10	0,10	15
Cobre (mg)	0,086	0,086	3
Selênio (µg)	0,6	0,1	70
Vitaminas:			
Vitamina C (mg)	1.677,6	1.600,0	60
Tiamina (mg)	0,020	0,020	1,4
Riboflavina (mg)	0,060	0,060	1,6
Niacina (mg)	0,400	0,400	18
Ácido Pantotênico (mg)	0,309	0,305	6
Vitamina B-6 (mg)	0,009	0,004	2
Folato Alimentar (µg)	14	14	200
Vitamina A (IU)	767	509	2.666,67

O alto teor de ácido ascórbico e a presença de antocianinas destacam este fruto no campo dos alimentos funcionais pela habilidade desses compostos em capturar radicais livres no organismo humano. A vitamina C, o β -caroteno e outros carotenóides agem como antioxidantes no organismo humano (SIZER e WHITNEY, 2003; MESQUITA e VIGOA, 2000).

1.1.3 Vitamina C

A vitamina C (figura 3), é um nutriente hidrossolúvel envolvido em múltiplas funções biológicas. É co-fator de várias enzimas envolvidas na hidroxilação pós-tradução do colágeno, na biossíntese de carnitina, na conversão do neurotransmissor dopamina a norepinefrina, na amidação peptídica e no metabolismo da tirosina. Adicionalmente, é importante na absorção do ferro dietético, devido a sua capacidade de reduzir a forma

férrica (Fe^{3+}) a ferrosa (Fe^{2+}), propiciando absorção do ferro não-heme no trato gastrointestinal (LOUREIRO *et al*, 2002; KAGAN *et al*, 1990; HALLIWELL, 2001).

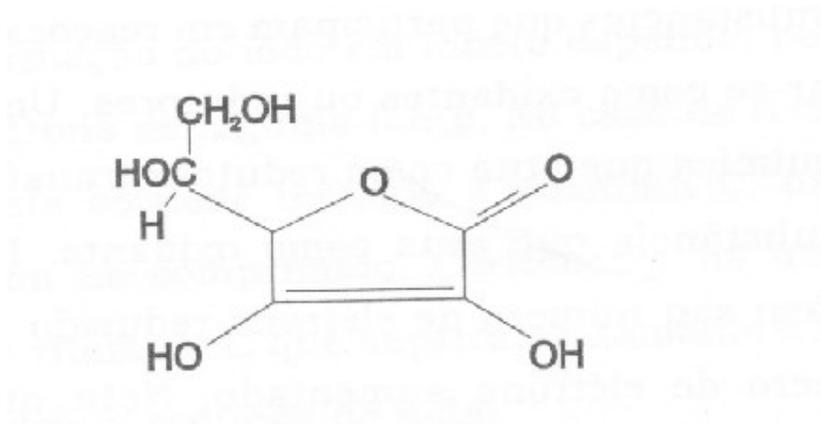


Figura 3: Estrutura da vitamina C

Além da importante função anti-escorbútica, a vitamina C é um potente agente redutor capaz de reduzir a maioria das espécies reativas ao oxigênio/nitrogênio (ROS/RNS) fisiologicamente relevantes. Em meio fisiológico encontra-se predominantemente na forma de monoânion ascorbato (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999). Existem fortes evidências de que o uso de suplementos ricos em vitamina C colaborem para a prevenção de alguns tipos de câncer, tais como estômago (YOU *et al.*, 2000), pulmão (VOORRIPS *et al.*, 2000) e doenças cardiovasculares (KELLY, 1998; YOKOYAMA *et al.*, 2000).

O alto teor de vitamina C e a fragilidade apresentada por este fruto têm motivado diversos pesquisadores, em diferentes partes do mundo, a trabalhar com sua caracterização química e seus possíveis efeitos benéficos ao organismo humano. A tabela a seguir apresenta os valores médios de vitamina C na fruta, segundo diferentes autores, onde se observou uma grande variação no conteúdo de vitamina c, de 779 a 3.094mg/100g.

Tabela 3: Valores médios de vitamina C em acerolas, segundo diferentes autores (FREITAS *et al.*, 2006).

AUTORES	VITAMINA C (MG 100 g ¹)
GONZAGA NETO <i>et al.</i> (1999)	779 a 2.444
GOMES <i>et al.</i> (2000)	853,51 a 1.631,01
AGUIAR (2001)	843,03 a 2.322
PIMENTEL <i>et al.</i> (2001)	1.437,78
SOARES <i>et al.</i> (2001)	1.620
LIMA <i>et al.</i> (2002a)	1.066,66 a 1.845,79
MOURA <i>et al.</i> (2002)	500,90 a 1.854,92
NUNES <i>et al.</i> (2002)	1.598,29 a 2.053,26
SANTOS <i>et al.</i> (2002)	1.089,22 a 3.094,43
PAIVA <i>et al.</i> (2002)	1.001 a 1.600

SIMÃO (1971) menciona que as variedades de acerola são classificadas em doce e ácida, variedades mais ácidas apresentam teores mais altos de vitamina C. Este fato foi constatado por LIMA *et al.* (2002a), que caracterizando acerolas maduras encontraram teor de ácido ascórbico variando de 1.067 a 1.846 mg/100mL de polpa, e frutos menos ácidos com menores teores de vitamina C. FREITAS *et al.*, (2006) indicam que a quantidade de vitamina C e de carotenóides encontradas neste fruto variam com o seu estado de maturação (tabela 4).

Tabela 4: Estágios de maturação da acerola (FREITAS *et al.*, 2006).

Característica (quanto maior o número, mais madura a fruta)	Estágios de Maturação					
	1	2	3	4	5	6
Clorofila (mg 100g¹)	4,41	1,67	0,27	0,23	0,06	0,10
Carotenóides (mg 100 mL¹)	0,00	0,61	0,71	0,86	1,24	1,44
Sólidos Solúveis (° Brix)	6,50	6,50	6,50	6,70	7,10	7,10
Açúcares Solúveis (%)	2,47	3,34	3,88	4,28	4,62	5,05
Acides Titulável (%)	1,65	1,34	1,27	1,19	1,19	1,08
PH	3,40	3,50	3,50	3,50	3,50	3,60
Vitamina C (mg 100g¹)	1822	1371	1259	1186	1120	1021

Visto que a Acerola apresenta alta concentração de vitamina C e carotenóides, assim apresentando uma possível atividade antioxidante, se faz necessário estudos mais detalhados relativos à fatores envolvidos no “estresse oxidativo”.

1.2 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

Os radicais livres são responsáveis pelo estresse oxidativo que pode originar processos fisiopatológicos como envelhecimento, aterosclerose, inflamação, doenças hepáticas, mal de Alzheimer, mal de Parkinson, vários tipos de câncer, entre outros. Nos últimos anos, tem sido constante o interesse na busca de soluções para que seja evitada a formação dessas espécies reativas (radicais livres), ou então soluções que impeçam a ação danosa dessas espécies sobre a célula (MARRONI, 2002).

Vários nomes têm sido empregados para descrever os radicais livres, ou espécies reativas de oxigênio (ERO), no entanto nenhuma contempla a variedade de moléculas de interesse. Será usado o termo ERO, abrangendo coletivamente os radicais livres e os derivados não radicais potencialmente oxidantes (por exemplo, o H_2O_2). Os alvos de ataque das ERO são os lipídios (peroxidação lipídica), proteínas, carboidratos e ácidos nucléicos (DNA) (HENRIQUES *et al.*, 2001).

1.2.1 Aspectos gerais que envolvem a formação de ERO

Os radicais livres são produzidos normalmente nos seres vivos como consequência de diversos processos metabólicos, que envolvem reações de transferência de elétrons. O oxigênio (O_2) é uma molécula altamente reativa e pode ser parcialmente reduzido para formar um número de agentes quimicamente reativos. O processo de transferência de elétrons, ou a absorção de energia pode levar o oxigênio a gerar as ERO (OGA, 2003), as quais abrangem moléculas com um elétron desemparelhado no último orbital, ou seja, ocupando um orbital atômico ou molecular sozinho, também conhecido como Radical Livre (RL), tornando-o muito instável, extraordinariamente reativo, e com uma enorme capacidade para combinar-se com diversas moléculas integrantes da estrutura celular e derivados de cada uma delas. A fonte mais comum de radicais livres nos organismos

aeróbicos ocorre durante as transferências de elétrons na mitocôndria pela cadeia respiratória, que utiliza o oxigênio molecular para obtenção de energia química em forma de adenosina trifosfato (ATP) (BOVERIS, 1998; GARCIA-RUIZ *et al.*, 1995). Durante a geração oxidativa de energia na respiração mitocondrial 95% do oxigênio consumido pelas células é metabolizado na mitocôndria, onde é reduzido à água. Contudo, 2 a 5% do oxigênio sofre redução incompleta, produzindo espécies parcialmente reduzidas, entre elas O_2^- , H_2O_2 , OH, as quais são resultantes respectivamente da redução de um, dois e três elétrons (BOVERIS, 1998; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2000).

Estas formas de oxigênio são altamente prejudiciais para os constituintes celulares, incluindo o DNA, os lipídios, ácidos graxos e as proteínas (STORZ *et al.*, 1987). O oxigênio atmosférico é o principal agente responsável pela deterioração de materiais orgânicos e alimentos expostos ao ar. Diversas classes de moléculas são susceptíveis ao ataque de O_2 e acabam formando hidroperóxidos. Tais hidroperóxidos contribuem para a deterioração e disfunção em células e membranas celulares (LARSON, 1988). Outros processos do metabolismo também podem gerar ERO, tais como autooxidação de pequenas moléculas (hidroquinonas, leucoflavinas, catecolaminas, ferredoxinas) e fagocitose, durante a ação bactericida de neutrófilos e outros fagócitos (HENRIQUES *et al.*, 2001). Também podem ser formadas pela exposição de células à radiação ionizante, pelo ciclo-redox químico presente no ambiente ou pela exposição a metais pesados (AMES, 1983; BRENNAN e SCHIEST, 1996).

1.2.2 Radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$)

O radical superóxido é o produto da redução monovalente do oxigênio molecular (O_2), gerado normalmente durante o metabolismo aeróbico. Ele também pode ser gerado através da auto-oxidação, via interação com agentes redutores celulares (NADH, glutatona e outros) e via ação de diferentes compostos químicos como o paraquat e óxido de 4-nitroquinoleína (4NQO) (BOVERIS, 1998; HENRIQUES *et al.*, 2001). Além destes, o radical superóxido também pode ser formado por outros mecanismos, como: auto-oxidação de moléculas como o gliceraldeído, $FADH_2$, adrenalina e dopamina; por enzimas como a xantina oxidase, na oxidação da xantina e hipoxantina à ácido úrico; assim como algumas

células especializadas na produção de ERO como, por exemplo, os fagócitos (macrófagos e neutrófilos), que por ação de uma oxidase que transfere elétrons do NADPH para o O_2 produzem $O_2^{\bullet-}$ e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) para defesa bactericida (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2000; FORMAN e THOMAS, 1986).

Entre as substâncias de interesse biológico que se auto oxidam gerando o radical superóxido inclui-se a hemoglobina, a mioglobina e catecolaminas. Essas auto-oxidações são, geralmente, reações em cadeia nas quais o radical superóxido pode atuar como iniciador e propagador das cadeias radiculares. Apesar do nome sugerir que esse radical tem alto poder oxidante, o superóxido atua na maioria das reações como um agente redutor (OGA, 2003).

1.2.3 Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2)

Embora o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) não seja considerado um radical livre por definição, por não possuir elétron desemparelhado na última camada, ele é um metabólito do oxigênio extremamente deletério, porque participa da reação que produz o radical hidroxila (OH^{\bullet}). O H_2O_2 é um intermediário reativo do oxigênio que se torna perigoso pelo alcance que tem. Por não reagir imediatamente, pode migrar pela célula e atingir alvos distantes da sua formação, sendo capaz de atravessar camadas lipídicas, e da mesma forma podendo reagir com a membrana eritrocitária e com proteínas ligadas à Fe^{+2} e Fe^{+3} (IZAWA *et al.*, 1995).

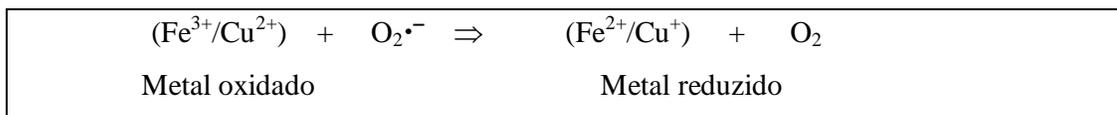
O H_2O_2 é formado principalmente na matriz mitocondrial, durante o processo de redução do oxigênio, ou pela dismutação do radical superóxido pela enzima superóxido dismutase (Sod) (FRIDOVICH, 1998). Além de ser formado na reação de dismutação do superóxido e por fagócitos, também é um subproduto da assimilação oxidativa de várias fontes de carbono e nitrogênio, por peroxissomos e glioxissomos (FORMAN e THOMAS, 1986). Algumas bactérias e micoplasmas também liberam peróxido de hidrogênio, que pode lesar células do hospedeiro, visto que o H_2O_2 pode atravessar membranas biológicas (OGA, 2003).

1.2.4 Radical hidroxila (OH[•])

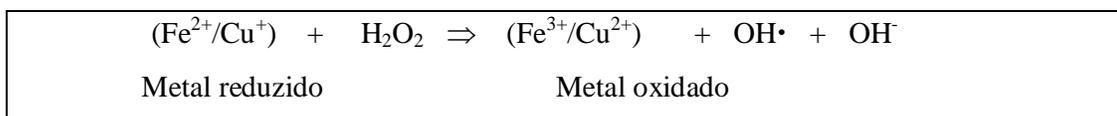
Os efeitos mais tóxicos provocados pela formação tanto do O₂^{•-} quanto do H₂O₂ é a subsequente e rápida formação do radical hidroxila (OH[•]). O OH[•] é facilmente gerado a partir de H₂O₂ através da reação de Fenton na presença de íons metálicos como Fe⁺² ou Cu⁺¹ (FRIDOVICH, 1998).

O radical OH[•] é considerado a ERO mais reativa em sistemas biológicos. A combinação extremamente rápida do OH[•] com metais e outros radicais no próprio sítio onde foi produzido confirma sua alta reatividade. Os metais de transição, tais como ferro (Fe²⁺) e cobre (Cu⁺) aumentam a velocidade da produção de OH[•]. A reação envolvendo metais ocorre em etapas: em um primeiro passo, o metal na sua valência mais alta (Fe³⁺ ou Cu²⁺) reage com o radical O₂^{•-}, produzindo íon metálico, ferroso (Fe²⁺) ou cuproso (Cu⁺) e oxigênio molecular (Reação de Haber-Weiss) deixando o metal em uma valência menor. Estes íons reagem rapidamente com H₂O₂, gerando radical hidroxila (OH[•]), íon hidroxil (OH⁻) e Fe³⁺ (Reação de Fenton) (figura 4).

Reação de Haber-Weiss



Reação de Fenton



A soma das reações acima resulta na Reação de Haber-Weiss/Fenton

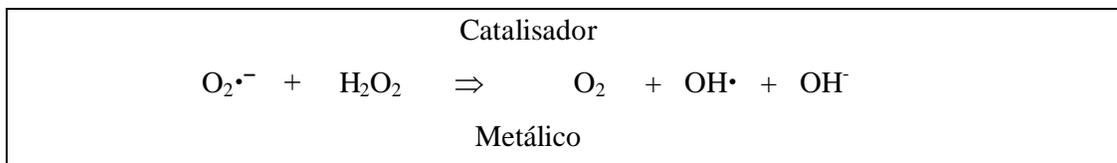


Figura 4: Representação da formação do radical OH pelas reações Haber-Weiss/Fenton. (Adaptado de HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2000).

O radical OH^\bullet tem uma meia vida curtíssima e sua difusão é limitada pela sua velocidade de reação. Por isso, a melhor defesa que a célula tem contra este radical é preventiva, ou seja, evitar que o mesmo seja gerado. Na ausência da catálise pelos íons metálicos, a reação de Fenton ocorreria de forma muito lenta, caso realmente acontecesse (GRALLA e KOSMAN, 1991). Por esta razão, a célula mantém um rígido controle da homeostase metálica. O transporte de metais é altamente regulado (EIDE, 1998) e os íons de metais de transição são mantidos em sua valência mais alta ou estão de alguma forma complexados a proteínas e enzimas onde são armazenados ou fazem parte funcional das mesmas (revisado por HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2000; FRIDOVICH, 1998).

1.2.5 Oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$)

É a forma excitada de oxigênio molecular, não possui elétrons desemparelhados em sua última camada, e possui meia vida em tecidos menor que 0,5 micro segundos (PATTERSON *et al.*, 1990). Pode ser gerado pelos fagócitos, por indução luminosa, por reações catalisadas por peroxidases e outras (CADENAS, 1989).

O oxigênio singlet difere do oxigênio no estado molecular, porque não apresenta restrição na transferência de elétrons, sendo altamente reativo (BECKMAN e AMES, 1998). O oxigênio singlet causa danos às proteínas devido a oxidação de grupos essenciais de aminoácidos, principalmente do triptofano, metionina, histidina e resíduos de cisteína (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2000), sendo também responsável por dar início a peroxidação lipídica, produzindo radicais alcóxila (RO^\bullet) e peróxila (ROO^\bullet). O oxigênio singlet tem importância em certos eventos biológicos, mas poucas doenças foram relacionadas a sua presença (HENRIQUES *et al.*, 2001).

1.2.6 Danos oxidativos a biomoléculas

As ERO são capazes de danificar inúmeras biomoléculas, tais como lipídios (peroxidação lipídica), proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos (DNA e RNA) comprometendo desta forma a integridade celular (PERES, 1999; HENRIQUES *et al.*, 2001). O radical OH^\bullet pode inativar várias proteínas, ao oxidar seus grupos sulfidril (-SH) a pontes dissulfeto (-S-S-). Também pode iniciar a oxidação dos ácidos graxos polinsaturados das membranas celulares (lipoperoxidação). Já o radical superóxido oxida centros metálicos [4Fe-4S] de desidratases, como aconitase, liberando o Fe^{+2} , o qual serve de catalisador para formação do radical OH^\bullet via reação de Fenton (FRIDOVICH, 1998).

No DNA, as ERO produzem uma série de lesões, danificando bases, desoxiriboses, causando quebras simples de cadeia, criando sítios apurínicos e apirimidínicos (sítios AP) e ligações cruzadas entre DNA e proteínas (LAVAL *et al.*, 1998). Sabe-se que nem o radical superóxido nem o peróxido de hidrogênio atacam o DNA diretamente, porém o radical OH^\bullet e o oxigênio singlet podem provocar lesões diretas ao DNA (FRIDOVICH *et al.*, 1998; CADET *et al.*, 1999; MEEHAN *et al.*, 1999). O alvo preferencial do ataque das ERO parece ser a guanina, devido à oxidação do átomo C8, forma-se o produto 7,8-diidro-8-2'-desoxiguanina (8-OXO-G), que é o produto de dano oxidativo melhor caracterizado, sendo fortemente mutagênico *in vitro* e *in vivo*, causando transversões G→T quando não reparado (CADET *et al.*, 1999; BROZMANOVÁ *et al.*, 2001).

1.3 ESTRESSE OXIDATIVO E SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE

Os radicais livres formam-se em condições fisiológicas em proporções controladas pelos mecanismos defensivos celulares. O estresse oxidativo ocorre quando há uma falta de equilíbrio dinâmico entre a produção de oxidantes e a concentração de defesas antioxidantes, levando a danos celulares. Este estresse pode resultar de uma situação em que há uma diminuição nos níveis das enzimas antioxidantes, pela elevada produção de radicais livres, ou por ambos os processos simultaneamente. Os agentes oxidantes são formados no processo normal do metabolismo, mas em algumas condições patológicas, eles podem ser produzidos em excesso, levando ao estresse oxidativo e à possível morte

celular. Distúrbio do equilíbrio entre a formação e a remoção de ERO são associadas a uma série de processos patológicos, por exemplo câncer, isquemia, arteriosclerose, diabetes, mal de Alzheimer entre outras desordens neurológicas e não-patológicas, como por exemplo o envelhecimento (PAWLAK *et al.*, 1998; BECKMAN e AMES, 1998, revisado por SALVADOR e HENRIQUES, 2004).

Os antioxidantes são definidos como “qualquer substância que, quando presente em concentrações baixas, quando comparada com a de um substrato oxidável, retarda significativamente, ou previne, a oxidação daquele substrato” (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2000). Podem ser divididos em antioxidantes naturais, normalmente presentes no organismo, e compostos sintéticos com atividade antioxidante. Para defender-se das ERO e manter a integridade celular, os organismos possuem diversos sistemas de defesa antioxidante.

As estratégias de defesa compreendem três etapas, que são: a prevenção (evitar a formação de ERO), interceptação (neutralização de ERO geradas) e reparação (de danos ocasionados por ERO) (ROSS e MOLEDEUS, 1991; DEMPLÉ e HARRISON, 1994). A prevenção contra a formação de ERO é representada, por exemplo, pelos sistemas de homeostase metálica na prevenção ao estresse oxidativo. A interceptação pode ser representada pelos sistemas enzimáticos (superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase) ou não enzimáticos (glutathione, vitaminas, compostos fenólicos), que impedem a continuação das reações em cadeia. Por último, quando o dano já estiver ocorrido, existem sistemas capazes de repará-lo (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2000). Além destes, existem mecanismos de regulação da capacidade antioxidante que modulam a manutenção e a adaptação de níveis adequados de defesa às espécies reativas de oxigênio (SIES, 1997; SEN e PACKER, 1996).

1.3.1 Antioxidantes enzimáticos

As Superóxido dismutase (Sod) são metalo-enzimas abundantes em células aeróbicas que agem sobre o radical superóxido, dismutando-o a peróxido de hidrogênio. Corresponde a uma família de enzimas com diferentes grupos prostéticos em sua composição. Há várias isoenzimas do tipo Sod, geralmente responsáveis por compartimentos celulares distintos, podendo conter cobre, zinco, ferro ou manganês em seus sítios ativos (FREITAS *et al.*, 2000; HENRIQUES *et al.*, 2001). A SodCuZn, possui Cu^{2+} e Zn^{2+} , está presente principalmente no citosol de células eucarióticas, mas também pode ser encontrada nos lisossomos, núcleos, bem como no espaço entre as membranas mitocondriais externa e interna (CRAPO *et al.*, 1992; LIOU *et al.*, 1993; LONGO *et al.*, 1996). A SodMn, com um íon de Mn^{3+} em cada uma de suas subunidades, está localizada primariamente na mitocôndria. A SodFe possui um íon Fe^{2+} em seu sítio ativo e é a Sod constitutiva da maioria dos organismos eucariotos (FRIDOVICH, 1998).

A catalase (Cat) é uma hemoproteína que catalisa a dismutação do peróxido de hidrogênio para 2 H_2O e O_2 . A ação desta enzima envolve a oxidação divalente do ferro heme (IV), acompanhada da redução divalente do peróxido de hidrogênio. Elas contêm NADPH fortemente ligado, o qual pode prevenir a acumulação da forma ferro (IV) da enzima, a qual é inativa (HENRIQUES *et al.*, 2001). Em células eucarióticas, há catalases citosólicas e perixossomais (FRIDOVICH, 1998).

A glutathiona peroxidase (GSH-Px) catalisa a redução do peróxido de hidrogênio e peróxidos orgânicos a seus correspondentes álcoois às custas da conversão da glutathiona reduzida (GSH) ao dissulfeto correspondente glutathiona oxidada (GSSG). Está presente no citosol de mamíferos, sendo a principal defesa contra peróxidos. A especificidade da GSH-Px inclui não somente eliminação de H_2O_2 , mas também a redução de alquil-hidroperóxidos a seus respectivos álcoois (INOUE *et al.*, 1998).

1.3.2 Antioxidantes não enzimáticos

Talvez o mais conhecido exemplo de sistema de defesa não-enzimático é a glutatona, um tripeptídeo γ -L-glutamil-L-cistinilglicina. A glutatona age como um varredor de radical com grupo sulfidril com ação redox, reagindo com oxidantes para produção de glutatona reduzida (GSH). A glutatona é possivelmente a mais abundante molécula limpadora-redox nas células (MARCHLER *et al.*, 1993), e conseqüentemente esta função é a mais importante na manutenção do estado redox celular.

Genes envolvidos na biossíntese da glutatona foram identificados em *Saccharomyces cerevisiae*, como *GSH1* e *GSH2*, codificando a sintetase γ -glutamilcisteína e sintetase glutatona, respectivamente (KISTLER *et al.*, 1986).

Entre os antioxidantes não enzimáticos pode-se citar a vitamina C, a vitamina E, ubiquinol, os carotenóides e os flavonóides (MACHLIN e BENDICH, 1987). A vitamina C elimina os radicais livres do plasma, citosol e outros compartimentos aquosos. A vitamina E e outros antioxidantes hidrofóbicos atuam fundamentalmente nas membranas e nas bicamadas lipídicas (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2000). Os flavonóides são potentes antioxidantes capazes de atuar como aceptores de radicais livres (HUSAIN *et al.*, 1987) ou de íons metálicos (AFANAS'AV *et al.*, 1989).

O ácido ascórbico ou vitamina C é sintetizado pela maioria dos animais e plantas, porém o homem, bem como outros primatas, cobaias e algumas aves necessitam obtê-lo da dieta, na forma da vitamina hidrossolúvel (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2000). Por ser um agente redutor potente, o ácido ascórbico possui uma excelente capacidade antioxidante, podendo seqüestrar eficientemente inúmeras ERO. Ao reagir com as ERO, o ácido ascórbico é oxidado a ácido desidroascórbico, podendo ser convertido de volta à forma reduzida às custas de GSH ou de NADPH. Também pode regenerar o tocoferol de sua forma radicalar oxidada e contribuir indiretamente na defesa antioxidante lipídica (MAXWELL, 1995). *In vitro*, foi demonstrado que a vitamina C é capaz de exercer propriedades pró-oxidantes, reagindo com íons ferro e cobre, produzindo H_2O_2 e OH^\bullet (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2000). As propriedades antioxidantes do ácido ascórbico

in vitro são várias, porém *in vivo* as evidências de sua ação são limitadas, mesmo sendo as concentrações plasmáticas do mesmo suficientes para exercer efeitos antioxidantes (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2000).

O tocoferol também chamado vitamina E, é uma substância lipossolúvel, “scavenger” de radicais peroxil (RO_2^{\bullet}), sendo provavelmente o mais importante (mas não o único) inibidor da reação de peroxidação lipídica em animais (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2000). A manutenção do nível de redução de RO_2^{\bullet} pelo tocoferol é dependente da redução do radical tocoferil, uma vez formado, por redutores externos, os quais incluem o ácido ascórbico e tióis (SIES, 1997). Assim como o ácido ascórbico, o tocoferol pode reduzir o Fe^{3+} a Fe^{2+} e o Cu^{2+} a Cu^{+} , e então estes podem exercer efeitos pró-oxidante em alguns sistemas *in vitro* (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2000).

O retinol é a forma química, fisiologicamente ativa, da vitamina A, o qual não é obtido diretamente da dieta, mas sim gerado por clivagem enzimática de produtos, tanto de origem animal como vegetal. Existem duas fontes da vitamina A nos alimentos, os carotenóides e os retinóides (revisado por SIES, 1997). Inúmeros estudos têm indicado que a vitamina A pode agir tanto como antioxidante como pró-oxidante. Sob pressões normais de oxigênio, o β -caroteno, precursor de vitamina A, age como antioxidante, porém sob pressões mais altas de oxigênio, perde sua atividade antioxidante e passa a exercer um efeito pró-oxidante (PALOZZA *et al.*, 1997).

Os estrógenos, hormônios sexuais femininos, como o estradiol, a estrona e o estriol podem inibir a peroxidação lipídica (incluindo peroxidação de lipoproteínas de baixa densidade) *in vitro*, em concentrações da ordem de micromolar, possivelmente por possuírem grupos fenólicos que podem agir como antioxidantes *scavenger*, semelhantes à vitamina E (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2000).

O ubiquinol 10, também chamado co-enzima Q reduzida, desempenha um importante papel na cadeia transportadora de elétrons mitocondrial, passando simultaneamente por oxidação e redução, via um radical livre intermediário, a ubisemquinona. *In vitro*, o ubiquinol pode seqüestrar radicais peroxil e inibir a peroxidação

lipídica. Entretanto, a sua ação *in vivo* ainda é desconhecida (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2000). Presente nas lipoproteínas plasmáticas em concentrações relativamente baixas, o ubiquinol provavelmente regenera tocoferol do radical tocoferil e aumenta a sua eficiência como antioxidante (MAXWELL, 1995).

O ácido úrico, subproduto do metabolismo das purinas, demonstrou ser um antioxidante potente, protegendo as membranas do dano oxidativo. Sugere-se que o aumento da concentração plasmática de ácido úrico possa contribuir para o aumento da longevidade humana (AMES, 1983). Em pH fisiológico, apresenta-se na forma de urato, o qual pode ser oxidado por oxidantes fortes, como o OH^\bullet , originando um radical pouco reativo. Também pode quelar íons metálicos, como ferro e cobre, diminuindo a possibilidade destes catalisarem as reações de radicais livres (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2000).

Os flavonóides constituem um grupo de substâncias naturais, que possuem atividades biológicas diversificadas e estudando sua ação como antioxidante foram desenvolvidas muitas pesquisas, envolvendo não só os compostos flavonoídicos, como também os seus precursores biossintéticos (RICHARDSON *et al.*, 1974; PRATT e BIRAC, 1979; RIOS *et al.*, 1992). Os compostos polifenólicos estão presentes em frutas e vegetais (ANGELIS, 2001) como nozes, sementes, ervas, especiarias, flores, em diversos chás e vinho tinto. São importantes compostos de frutas cítricas, (KEFFORD e CHANDLER, 1970) aparecendo em diversas fontes de alimentos sendo consumidos regularmente na dieta humana (HERRMANN, 1976). O consumo destes compostos tem sido associado a efeitos protetores contra doenças cardiovasculares e cânceres (ANGELIS, 2001).

Estes compostos, flavonóides, apresentam efeitos importantes na fisiologia e bioquímica da planta, como ação antioxidante, inibidores enzimáticos, precursores de substâncias tóxicas e exibindo pigmentos coloridos. Estes compostos estão envolvidos na fotossensibilização e na transferência de energia, em ações de hormônios regulatórios do crescimento da planta, no controle respiratório, na fotossíntese, em morfogêneses, na determinação do sexo e bem como na defesa contra infecções (SMITH e BANKS, 1986).

PRATT e BIRAC (1979) estudaram os efeitos de vários flavonóides, como a quercetina, quercitrina, miricetina, quercetina 3-monoglicosídeo, quercetina 3-triglicosídeo, extraídos de sementes de diversas plantas como antioxidantes, utilizando etanol absoluto e fazendo determinações espectrométricas a 258nm. Vários antioxidantes naturais, principalmente os compostos fenólicos, também foram encontrados em muitos vegetais, conforme trabalhos realizados por HAREL e KANNER (1984), FARR *et al.* (1988), SHEABAR e NEEMAN (1988), NAMIKI (1990), PRATT e HUDSON (1990), LOLIGER (1991) e KANNER *et al.* (1994).

A literatura propõe, que os flavonóides exerçam efeitos benéficos em diversos estados patológicos, incluindo câncer, doenças cardiovasculares e em distúrbios neurovegetativos. Muitas ações biológicas destes compostos são atribuídas pelas suas propriedades antioxidantes, e sua possível influência do estado redox intracelular. O mecanismo exercido pelos flavonóides, para estas ações benéficas e tóxicas, ainda permanecem pouco conhecidos. Entretanto, alguns estudos tem demonstrado que sua atividade antioxidante clássica de doação de hidrogênio (RICE-EVANS, 1995; RICE-EVANS *et al.*, 1996; RICE-EVANS, 2001) é pouco provável ser a única explicação para os efeitos celulares benéficos sugeridos (SPENCER *et al.*, 2003).

Após pesquisas na área da farmacologia de alimentos fitoquímicos, um grande número de relatos tem estabelecido que os compostos fenólicos de plantas, incluindo os flavonóides, são potentes antioxidantes e também há relatos de possíveis efeitos antimutagênicos e anticarcinogênicos dos mesmos (MIDDLETON e KANDASWAMI, 1994; RICE-EVANS *et al.*, 1997). Também têm sido mostrado relatos sugerindo que uma dieta rica em compostos fenólicos exibem propriedades pró-oxidantes e citotóxicas, sob certas condições (SUMMERS e FELTON, 1994; YAMANAKA *et al.*, 1997; SUGIHARA *et al.*, 1999). Esta atividade antioxidante/pró-oxidante dos compostos fenólicos pode depender de determinados fatores, tais como o potencial de redução de metal, pH e das características de solubilidade (DECKER, 1997). Muitos extratos de plantas, particularmente os que contêm flavonóides, parecem apresentar uma significativa atividade antioxidante, capaz de diminuir os efeitos nocivos gerados pelos radicais livres (RL), e conseqüentemente o surgimento de doenças associadas à ação destes RL.

1.4 A LEVEDURA *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* COMO MODELO DE ESTUDO

Saccharomyces cerevisiae é um organismo eucarioto amplamente estudado e notavelmente semelhante às células de mamíferos no que se refere às macromoléculas, organelas e proteínas com homologia a proteínas humanas, tornando-a uma ferramenta importante nas pesquisas sobre mutagênese, reparo do DNA e mecanismos que respondem ao estresse oxidativo (COSTA e FERREIRA, 2001).

As leveduras podem crescer tanto em condições anaeróbias quanto aeróbias e, portanto, são expostas continuamente as ERO geradas como bioprodutos do metabolismo (COSTA e FERREIRA, 2001). A *S. cerevisiae* pertence ao grupo das leveduras anaeróbias facultativas. Isto significa que fermenta hexoses como a glicose e a frutose, independente da concentração de oxigênio. A glicose é a principal fonte de carbono da *S. cerevisiae*, uma preferência que é mediada por um complexo processo de repressão e ativação de genes e de proteínas, usualmente conhecido como repressão da glicose ou repressão catabólica (revisado em DE WINDE *et al.*, 1997; GANCEDO, 1998). Quando a concentração de glicose cai para menos de 0,2% no meio, há a desrepressão das enzimas que participam da biossíntese na mitocôndria e de outros genes necessários para o crescimento respiratório (DE WINDE *et al.*, 1997; GANCEDO, 1998).

Este crescimento apresenta fases distintas do ponto de vista metabólico e cinético (figura 5). Após um breve período de adaptação em meio rico (YPD – 2% glicose), chamado de fase lag, as células iniciam uma divisão celular a cada hora e meia (fase exponencial), com energia proveniente da fermentação da glicose. Ao diminuir a disponibilidade de glicose no meio, ocorre a desrepressão catabólica (transição diáuxica), na qual há uma parada transiente na divisão celular, enquanto as células são preparadas para o metabolismo respiratório. Após, ela reassume a divisão celular em um ritmo mais lento (uma divisão a cada três ou quatro horas), utilizando o etanol como fonte de carbono produzido durante a fermentação (fase pós-diáuxica). Quando todas as fontes de carbono forem exauridas, as células entram na fase estacionária na qual podem sobreviver por

muito tempo na ausência de nutrientes (PRINGLE e HARTWELL, 1982; FUGE e WERNER, 1997).

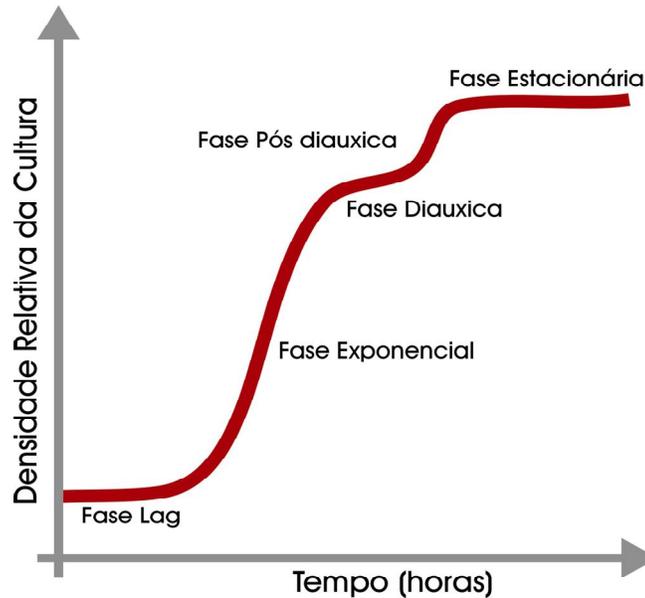


Figura 5: Fases de crescimento de uma levedura selvagem quando iniciada em meio completo (Adaptado de FUGE e WERNER, 1997).

1.4.1 Defesas antioxidantes da levedura *S. cerevisiae*

Como todos os aeróbios, a *S. cerevisiae* apresenta uma variedade de mecanismos de defesa contra danos oxidativos, como atividades enzimáticas, presença de antioxidantes, sequestradores de metais e diversos mecanismos de reparação (MARIS *et al.*, 2001; BROZMANOVA *et al.*, 2001; HENRIQUES *et al.*, 2001). As superóxido dismutase (Sod) são enzimas que fazem a dismutação do radical superóxido a peróxido de hidrogênio. A levedura *S. cerevisiae* contém a SodMn (produto do gene *SOD2*) localizada na matriz da mitocôndria e SodCuZn (produto do gene *SOD1*) presente no citoplasma, núcleo e lisossomos (GRALLA e VALENTINE, 1991; GRALLA e KOSMAN, 1991; LONGO *et al.*, 1996; PARK *et al.*, 1998; LONGO *et al.*, 1999). As linhagens mutantes *sod1Δ*, que são deficientes nesta enzima, apresentam problemas de crescimento em condições aeróbias,

são muito sensíveis a hiperóxia (BILINSKI *et al.*, 1985), a substâncias envolvidas em reações tipo ciclo-redox, tais como paraquat ou menadiona, perdem a viabilidade em fase estacionária e são auxotróficas para metionina e lisina em presença de oxigênio (SRINIVASAN *et al.*, 2000). Acredita-se que, estas auxotrofias se devem a enzimas relacionadas à síntese destes aminoácidos, que seriam extremamente sensíveis à desativação por $O_2^{\bullet-}$ (LIU *et al.*, 1992, SLEKAR *et al.*, 1996). As mutantes *sod2Δ* são hipersensíveis ao oxigênio e crescem mal ou não crescem em fontes de carbono não-fermentáveis. A sensibilidade a hiperóxia é revertida pela mutação *rho⁰* (leveduras sem mitocôndrias), confirmando o papel decisivo da mitocôndria na geração de $O_2^{\bullet-}$ (GUIDOT *et al.*, 1993; FERNÁNDEZ-CHECA *et al.*, 1998).

Mutantes *sod1Δ* e *sod2Δ* mostram níveis de ferro, detectado por Ressonância Paramagnética de Elétron (EPR), de até cinco vezes maiores em relação aos níveis basais da linhagem selvagem isogênica, enquanto a duplo mutante *sod1Δsod2Δ* apresenta níveis de ferro superiores a nove vezes o encontrado para a selvagem, em condições aeróbias de crescimento. O tratamento da linhagem selvagem com um gerador de superóxido - paraquat, também aumentou o ferro detectável por EPR, indicando que o excesso de ferro livre pode ser devido aos efeitos deletérios do radical superóxido (SRINIVASAN *et al.*, 2000).

O peróxido de hidrogênio pode ser catabolizado pelas catalases e peroxidases. Em levedura, a resistência a peróxido tem sido associada aos níveis intracelulares de glutathiona (IZAWA *et al.*, 1995; KOBAYASHI *et al.*, 1996). O gene *GSH1* é necessário para a síntese de γ -glutamilcisteína sintetase, enzima responsável pelo primeiro passo, e é ponto limitante da biossíntese de glutathiona; e o gene *GSH2* codifica a glutathiona sintetase, a segunda enzima da síntese de glutathiona. Ambos foram clonados e as mutantes correspondentes analisadas (LISOWSKY, 1993; GRANT *et al.*, 1997; BRENDEL *et al.*, 1998; INOUE *et al.*, 1998). As mutantes *gsh1Δ* induzem apoptose (MADEO *et al.*, 1999) e morrem rapidamente quando nenhuma glutathiona exógena é fornecida. A glutathiona endógena é importante para a manutenção da integridade mitocondrial, mesmo em meio suplementado com glutathiona, as mutantes *gsh1Δ* tem uma alta tendência de perder a função mitocondrial (SCHMITT *et al.*, 1996; BRENDEL *et al.*, 1998). Além disso, as

leveduras mutantes *gsh1Δ* não adquirem resistência intrínseca sob condições não-fermentáveis e na fase estacionária contra H₂O₂ (MARIS *et al.*, 2000) e não mostraram respostas adaptativas ao estresse por H₂O₂ durante a fase exponencial em meio YPD-glicose (IZAWA *et al.*, 1995).

Duas catalases, uma citosólica e uma peroxissomal, codificadas pelos genes *CTT1* e *CTA1*, respectivamente, também foram identificadas (SPEVAK *et al.*, 1983; HARTIG E RUIS, 1986; COHEN *et al.*, 1988). Ambas são importantes para a resposta adaptativa ao H₂O₂ (IZAWA *et al.*, 1996). A regulação do gene *CTT1* pelo H₂O₂ é mediada pelo elemento de resposta ao estresse (“Stress Responsive Elements - STRE”). Leveduras *Δctt1* e *Δcta1* mutantes são bastante sensíveis a H₂O₂ (IZAWA *et al.*, 1996; GRANT *et al.*, 1998).

O fator de transcrição Yap1, homólogo ao fator humano AP1, é apontado como um dos mais importantes mediadores das respostas adaptativas em *S. cerevisiae*, modulando a transcrição de genes envolvidos na defesa contra oxidantes como o H₂O₂ e a geradores de radicais superóxido (SCHNELL *et al.*, 1992; MEISTER, 1995). Yap1 parece regular genes de forma direta e indireta. Alguns alvos da regulação direta que foram identificados são os genes *TRX2*, um dos dois genes que codificam a tioredoxina em *S. cerevisiae* (KUGE e JONES, 1994); *GSH1*, que codifica para a γ -glutamil-cisteinil-sintetase (WU-AL e MOYE-ROWLEY, 1994); *TRR1*, que codifica para tioredoxina redutase (MORGAN *et al.*, 1997); *GLR1* que codifica a GSSG-redutase. Provavelmente dois membros da superfamília de transportadores envolvidos na resistência múltipla a drogas (MDR): *FLR1*, que codifica um transportador de membrana plasmática e, *YCF1* que codifica um transportador de conjugados cádmio-glutationa (Cd-SG) para dentro do vacúolo (WEMMIE *et al.*, 1994; ALARCO *et al.*, 1997; BAUER *et al.*, 1999). Algumas respostas mediadas por Yap1 exigem uma cooperação de outro fator de transcrição, o fator Skn7 (LEE *et al.*, 1999; DORMER *et al.*, 2002).

Pela simplicidade do cultivo e caracterização genética, as fases de crescimento características e controláveis e sua marcante semelhança aos sistemas de estudo em eucariotos superiores, como a mutação *sod2Δ* em ratos, fazem da levedura um sistema

modelo ideal para estudo de danos oxidativos e funções mitocondriais (LONGO *et al.*, 1999).

1.5 O ESTUDO DE SUBSTÂNCIAS COM ATIVIDADES PRÓ-E/OU ANTIOXIDANTE – MODELOS *in vivo* E *in vitro*.

A levedura *S. cerevisiae* vem sendo utilizada como modelo de estudo experimental de proteção antioxidante em estudos de reparo do DNA. Linhagens isogênicas deficientes em defesas antioxidantes têm sido utilizadas para o estudo do mecanismo de ação de agentes físicos e químicos que interferem com o estado redox celular (BRENNAN e SCHIESTL, 1998; LEE *et al.*, 2001). Um método utilizado consiste em comparar a sensibilidade ao tratamento com um agente físico (por exemplo radiação) ou químico (por exemplo pró/antioxidante), de diversas mutantes deficientes em enzimas antioxidantes ou em um fator de transcrição sensível ao estado redox, como o Yap1p, ou ainda deficiente na síntese de GSH, a fim de avaliar a importância de cada defesa antioxidante celular na desintoxicação do agente testado. Também é possível combinar um oxidante conhecido, como H₂O₂, t-BOOH (peróxido de terc-butil) e paraquat, com uma substância antioxidante ou com outro composto de mecanismo desconhecido, e avaliar o efeito do tratamento da substância na modulação do estresse oxidativo. O aumento da viabilidade celular ao tratamento estará sugerindo atividade protetora (antioxidante) e a diminuição da viabilidade a um efeito deletério (pró-oxidante) (MARIS *et al.*, 2000).

Respostas adaptativas ao estresse oxidativo também podem ser encontradas em levedura. Células pré-tratadas com concentração sub-letal de um oxidante (H₂O₂, t-BOOH, paraquat) apresentam indução de uma resposta protetora que permite que as mesmas sobrevivam a um tratamento com concentrações mais altas ou letais do oxidante (KUGE E JONES, 1994; IZAWA *et al.*, 1995; IZAWA *et al.*, 1996; GRANT *et al.*, 1998). Esta resposta adaptativa não é restrita ao estresse oxidativo, sendo que em levedura a resposta adaptativa mais conhecida é a do choque térmico. Respostas similares também ocorrem para o estresse osmótico, para agentes que provocam danos ao DNA e para outros tipos de estresse. O pré-tratamento com um tipo de agente estressor pode também induzir resistência cruzada contra outro tipo de agente estressor (PARK *et al.*, 1998; LEE *et al.*,

1999; SUGIYAMA *et al.*, 2000). Esses estudos demonstram a complexidade de sistemas altamente regulados que evitam os danos celulares. A regulação desses sistemas em leveduras pode ser mais complexa do que daqueles de organismos aeróbios, pois a levedura é um aeróbio facultativo (MARIS *et al.*, 2001).

Maris *et al.* (2000) demonstraram que a capacidade antioxidante das leveduras em crescimento fermentativo está bastante diminuída em relação a leveduras que não fermentam e que esta diferença não depende da função mitocondrial, ou seja, que o sistema antioxidante da levedura está sujeito à repressão por glicose, também conhecida por repressão catabólica.

Em *S. cerevisiae* foi demonstrado que uma exposição prévia ao dióxido de hidrogênio - H₂O₂ e menadiona (gerador de superóxido) aumenta a resistência a níveis anteriormente tóxicos destes compostos, através da indução de genes e proteínas. Recentemente, foi proposta a existência de dois regulons paralelos de resposta a estresse por H₂O₂, que seriam controlados pelos fatores de transcrição Yap1 e Skn7, envolvendo a indução de mais de 30 proteínas (LEE *et al.*, 1999). Os genes controlados por Yap1 codificam produtos essenciais na manutenção do estado redox da célula.

Desta forma, testes em células eucarióticas da levedura *S. cerevisiae*, tanto proficientes como deficientes em sistemas de reparação de danos causados por estresse oxidativo, assumem um importante papel na verificação da capacidade oxidante e antioxidante, e na determinação do possível mecanismo de ação dos produtos testados.

Um teste antioxidante *in vitro*, simples de se realizar, é a avaliação das propriedades antioxidantes de extratos ou compostos puros ou purificados, frente ao método do radical livre 2,2-difenil-1-picrilidrazila (DPPH) (figura 6). O teste baseia-se na capacidade do antioxidante em doar hidrogênio para o DPPH· provocando a varredura deste radical livre e modificando a coloração da solução. Os resultados obtidos frente ao método do radical livre DPPH permitem fazer uma comparação do potencial antioxidante entre o material a ser analisado em relação a um padrão (SOARES *et al.*, 2003).

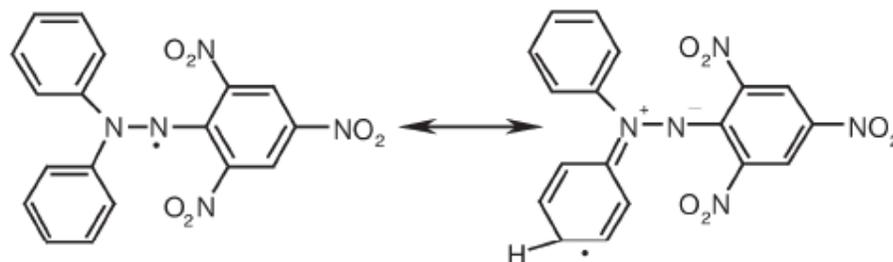


Figura 6: Estrutura do radical livre DPPH

Outro tipo de teste antioxidante *in vitro* é o ensaio à base da xantina oxidase (figura 7). Durante o processo de hidroxilação da hipoxantina em xantina e depois em ácido úrico (devido à presença da enzima xantina oxidase) são produzidos também o íon superóxido a partir do oxigênio e peróxido de hidrogênio a partir de água. Na presença de Fe (III) e de EDTA, o íon superóxido é oxidado a oxigênio molecular, o que reduz o Fe (III) em Fe (II). O Fe (II) é necessária para a transformação, numa segunda reação, do peróxido de hidrogênio em radicais hidroxila. Como radicais hidroxila são muito reativos, a metodologia para quantificação dos radicais hidroxila produzidos no teste é baseada na reação de derivatização dos radicais hidroxila com o ácido salicílico. Desta maneira, são formados dois compostos estáveis: 2,3- e 2,5-dihidroxi-ácido-benzóico (2,3-DHBA e 2,5-DHBA) (Figura 8), fáceis de serem medidos via cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (OWEN *et al.*, 1996 e 2000).

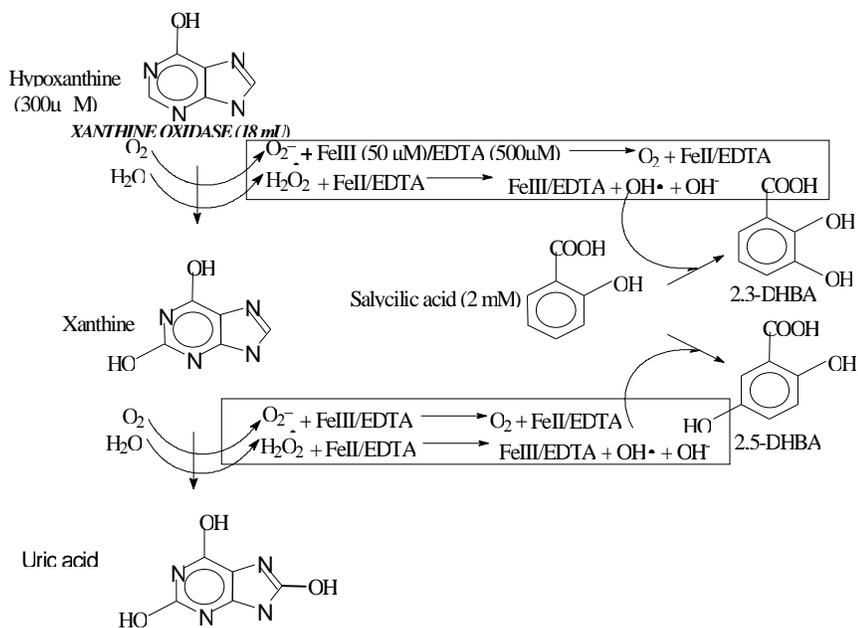


Figura 7: Esquema do ensaio para medir atividades antioxidantes *in vitro* utilizando o sistema da xantina oxidase (Owen *et al.*, 1996).

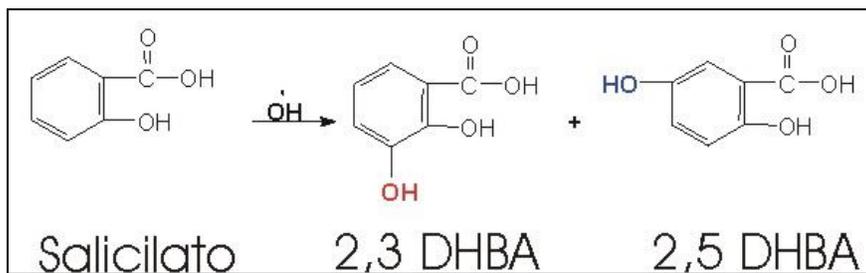


Figura 8: Derivatização dos radicais hidroxila com o ácido salicílico, levando a formação de dois compostos estáveis 2,3- e 2,5-dihidroxi-ácido-benzóico (2,3-DHBA e 2,5 DHBA).

1.6 TESTES DE MUTAÇÃO *forward*

Os ensaios com levedura têm sido de grande utilidade na determinação de agentes mutagênicos ambientais ou farmacológicos e servem para complementar os ensaios de mutagenicidade realizados em bactérias (TERZIYSKA *et al.*, 2000; ROSA *et al.*, 2007; ROSA *et al.*, 2004; MOURA *et al.*, 2007). As mutações são detectadas através da expressão fenotípica, causada por uma mudança súbita e hereditária no genótipo do organismo, alterando suas características. A ocorrência de mutações, no entanto, depende da natureza da lesão e das respostas celulares aos danos no DNA, podendo assim ser dividida em dois grupos: mutações gênicas e cromossômicas. As mutações gênicas são alterações que ocorrem na seqüência de nucleotídeos do DNA e as cromossômicas são as que produzem alterações no número ou estrutura dos cromossomos (WATERS *et al.*, 1999; MACGREGOR *et al.*, 2000; DEARFIELD *et al.*, 2002).

Alterações gênicas, resultantes de um tratamento mutagênico, podem ser facilmente quantificadas usando-se um marcador fenotípico, como por exemplo, a sensibilidade à canavanina. Muitas linhagens selvagens expressam um transportador de arginina chamado Can1p. A canavanina é um análogo estrutural tóxico da arginina. O mesmo transportador que internaliza a arginina, faz a importação de canavanina do ambiente levando as células à morte. Neste sentido, alterações no gene *CAN1*, induzidas por drogas mutagênicas podem aumentar a sobrevivência das células em presença de canavanina quando comparadas a tratamentos não mutagênicos (BRENDDEL e HENRIQUES, 2001; HUANG *et al.*, 2003). A linhagem N123 permite a detecção deste tipo de mutação, chamada mutação *forward* (REVERS *et al.*, 2002). As células revertentes podem ser detectadas pelo semeamento em placas contendo meio seletivo na presença de canavanina.

2 - OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Teve-se por objetivo geral, neste estudo, avaliar a atividade antioxidante e antimutagênica de diferentes extratos secos da planta *Malpighia glabra L.* comercializados no país, bem como do extrato liofilizado da fruta *in natura* através de ensaios biológicos com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* e metodologias antioxidantes *in vitro*.

2.2. Objetivos específicos

➤ Quantificar vitamina C nos diferentes extratos via CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência), para a correlação com efeitos biológicos encontrados em cada extrato.

➤ Determinar a atividade antioxidante *in vivo* do extrato liofilizado da fruta *in natura*, bem como dos extratos secos comercializados da fruta da planta *Malpighia glabra L.*, utilizando diferentes linhagens da levedura *S. cerevisiae* selvagens e isogênicas, deficientes em produtos de genes envolvidos na resposta ao estresse oxidativo.

➤ Determinar a atividade antioxidante *in vitro* do extrato liofilizados da fruta *in natura*, bem como das amostras comerciais de extrato seco de acerola, utilizando a metodologia à base da hipoxantina/xantina oxidase via CLAE.

➤ Determinar a atividade antioxidante *in vitro* do extrato liofilizados da fruta *in natura*, bem como das amostras comerciais de extrato seco de acerola, utilizando a metodologia à base do radical livre DPPH.

➤ Avaliar a atividade antimutagênica do extrato liofilizado da fruta de *Malpighia glabra L. in natura*, utilizando a linhagem N123 da levedura *S. cerevisiae* como modelo de estudo.

➤ Avaliar a qualidade dos 3 extratos secos da planta *Malpighia Glabra L.*, obtidos por diferentes fornecedores do país, baseados nos resultados dos diferentes ensaios biológicos utilizados neste trabalho.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Preparação do extrato liofilizado da fruta *in natura*

A fruta acerola foi adquirida na cidade de São Paulo, Estado de São Paulo, Brasil, no mês de maio de 2007. A preparação do extrato foi realizada no laboratório de Farmacognosia da ULBRA. Utilizou-se uma massa de 300g da fruta, as sementes foram retiradas manualmente e então procedeu-se a extração por turbólise utilizando água (1/10). A seguir a solução foi filtrada, congelada e levada ao processo de concentração por liofilização.

3.2 Aquisição dos extratos secos industrializados da fruta Acerola provenientes de diferentes fornecedores do país.

Os extratos secos industrializados foram adquiridos de três diferentes fornecedores de extrato seco de Acerola no país. Na tabela 5 está apresentada a procedência do fornecedor, a data de validade do extrato e o lote de fabricação. As amostras vieram acompanhadas por laudo de controle de qualidade emitido pelo respectivo fornecedor do produto.

Tabela 5: Extratos de acerola comercializados utilizados no estudo.

Fornecedores	Lote	Data de validade	Origem
1- Yod Comércio de produtos Naturais (Campinas-SP)	82656	Janeiro/ 2008	Nacional
2- Santosflora Comércio de ervas Ltda. (São Paulo-SP)	ACE01/0606	Junho/ 2008	Nacional
3- Deg Importação de Produtos Químicos Ltda. (São Paulo)	80814	Setembro/ 2007	Nacional

3.3 Análise cromatográfica da Vitamina C

A concentração de vitamina C nos diferentes extratos industrializados, bem como do extrato liofilizado da fruta *in natura*, foi determinada utilizando a metodologia descrita por PAULO *et al.*, (1999). O equipamento CLAE utilizado é constituído de um módulo de separação Alliance 2695 e de um detector ultravioleta 2487, ambos da empresa Waters (São Paulo, SP, Brasil). Foram injetados e analisados 5 µl de cada extrato e do composto puro, vitamina C. O tempo de cada corrida cromatográfica foi de 10 min utilizando metodologia isocrática com fase móvel de metanol/água MilliQ (10:90). O comprimento de onda utilizado para vitamina C foi de 300nm. A coluna utilizada para separação dos referidos compostos de cada amostra foi uma coluna Gemini® C18, 110Å, 150 x 4,6 mm, 5µm, da empresa Phenomenex®. Todas as análises cromatográficas foram realizadas em triplicata e para análise das quantidades em unidades de absorbância (AU) foi utilizado o programa EmPower® da empresa Waters (São Paulo, SP, Brasil).

3.4 Avaliações biológicas

3.4.1 Avaliação da atividade antioxidante

Os ensaios antioxidantes foram realizados nos Laboratórios de Genética Toxicológica e de Farmacocinética do Centro de Pesquisa em Ciências Médicas da ULBRA. Extrato de levedura, Bacto Peptona e Bacto Ágar empregados no desenvolvimento dos ensaios foram de procedência Difco® Laboratories (Detroit, MI, Estados Unidos), os solventes e reagentes foram de procedência Nuclear® (Diadema, SP, Brasil), Sigma® (St. Louis, MO, Estados Unidos) e Merck® (Rio de Janeiro, RJ, Brasil).

3.4.1.1 Ensaio antioxidante *in vivo*

Linhas da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (tabela 6) proficientes e deficientes no sistema de defesa antioxidante (SOD, *sod1*, *sod2*, *sod1sod2*, *cat* e *yap1*)

foram analisadas pelo ensaio de sobrevivência. O extrato da fruta e as diferentes amostras comerciais de extrato seco de acerola foram dissolvidos em água para concentração final de 1 mg/mL.

Tabela 6: Linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas neste estudo.

Linhagens	Genótipo	Deficiência do sistema enzimático	Fonte
SOD+	<i>Matα his3Δ1 leu2Δ0 trp1-289 ura3-52</i>	Nenhuma	E.B.Gralla, Los Angeles
<i>sod1Δ</i>	mesmo que SOD+ exceto <i>sod1::URA3</i>	Cu-Zn superóxido dismutase	E.B.Gralla, Los Angeles
<i>sod2Δ</i>	mesmo que SOD+ exceto <i>sod2::TRP1</i>	Mn superóxido dismutase	E.B.Gralla, Los Angeles
<i>sod1Δsod2Δ</i>	mesmo que SOD+ exceto <i>sod1::URA3 sod2::TRP1</i>	Todas superóxido dismutases	E.B.Gralla, Los Angeles
<i>cat1Δ</i>	mesmo que a selvagem BY4741 exceto <i>cat1::KanMx</i>	Catalase citosólica	E.B.Gralla, Los Angeles
<i>yap1Δ</i>	mesmo que a linhagem selvagem (YPH98) exceto <i>yap1::URA3</i>	yAP-1 fator de transcrição	E.B.Gralla, Los Angeles

Meios e soluções foram previamente preparados como descrito por BURKE *et al.* (2000). O inóculo das diferentes linhagens foi preparado em meio líquido YEL (1% extrato de levedura, 2% Bacto Peptona e 2% glicose) e mantido em estufa à 30°C por 48 h para crescimento celular. Meio YEPD contendo 1% extrato de levedura, 2% Bacto Peptona, 2% Bacto Ágar e 2% glicose foi utilizado para as placas na rotina de crescimento celular das leveduras.

Uma solução de NaCl 0,9% foi empregada para diluição das suspensões celulares e água destilada estéril para diluição do H₂O₂ utilizado nos experimentos para testar a atividade antioxidante. Células tratadas com DMSO e com H₂O₂ (1 mM) foram utilizadas como controles negativo e positivo, respectivamente (BOEIRA *et al.*, 2002; DELLA CROCE *et al.*, 2003; LOPES *et al.*, 2004; ROSA *et al.*, 2006).

A atividade antioxidante da fruta de *Malpighia glabra* L. foi avaliada pela sobrevivência das leveduras de *S. cerevisiae* na fase estacionária de crescimento quando tratadas com H₂O₂. Culturas em fase estacionária foram obtidas pela inoculação de uma colônia isolada em meio líquido YEL. Após 48 h de incubação a 30°C, as células foram agitadas, centrifugadas (5 min, 2500rpm) e ressuspensas com 5mL de solução NaCl 0,9%. O número de células foi determinado utilizando uma câmara de Neubauer. As linhagens foram avaliadas por inoculação de 2x10⁷ células/mL por 1 h a 30°C, contendo NaCl 0,9%, as diferentes doses do extrato (50, 100, 250 e 500 µL/mL) e o agente oxidante (100 µL H₂O₂ 1mM). Para a determinação das células sobreviventes, alíquotas das células tratadas foram diluídas apropriadamente e plaqueadas (100 µL) em meio YEPD. Células sobreviventes foram contadas após incubação a 30°C por 48 h (BOEIRA *et al.*, 2002; LOPES *et al.*, 2004). O percentual de sobrevivência foi calculado em relação ao número de colônias sobreviventes no controle negativo. Os ensaios foram realizados em triplicata e os dados representam a média das contagens dos experimentos.

3.4.1.2 Ensaio antioxidante *in vitro*

3.4.1.2.1 Método da hipoxantina/xantina oxidase

O método à base da hipoxantina/xantina oxidase, empregado para a análise em CLAE, foi baseado no método descrito por OWEN e colaboradores (1996). O ensaio é feito através da incubação de hipoxantina, da enzima xantina-oxidase, na presença de Fe (III), EDTA e de ácido salicílico, em banho-maria de 37°C durante 3 horas, na presença do extrato de interesse (extrato seco da fruta). Depois, 30 µl de cada amostra serão analisados via CLAE. Foi utilizada uma coluna de fase reversa µBondapak C18 (300x3,9 mm – 4 µm) da empresa Waters (São Paulo, SP) e a análise foi feita utilizando um gradiente a base dos solventes água/ácido acético (95:5) e metanol, com fluxo de 1ml/min durante 21 minutos. A detecção do 2,3-DHBA e do 2,5-DHBA foi realizada em 325nm.

Em paralelo as amostras foram analisadas em um comprimento de onda de 278nm para monitorar e determinar a quantidade de ácido úrico, o produto da reação enzimática, o que mostra que a enzima presente no ensaio enzimático está funcionando ou que sua atividade não foi comprometida/prejudicada devido à presença do extrato ou composto de interesse.

3.4.1.2.2 Ensaio a base de 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH)

O teste antioxidante a base do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) baseia-se na capacidade do antioxidante em doar hidrogênio para o DPPH provocando a varredura deste radical livre e modificando a coloração da solução. Trata-se de um teste *in vitro*, no qual 200 µl da amostra a ser investigada são misturados com 800 µl de tampão Tris-HCl (100 mM) e 1000 µl de uma solução estoque de DPPH (500 µM). Depois de 20 minutos de incubação, 1 ml da mistura é diluído com 1,5 ml de metanol e então medida a absorbância em um comprimento de ondas de 517nm, utilizando um espectrofotômetro (YAMAGUCHI *et al.*, 1998).

O percentual de captação do radical DPPH foi calculado conforme a seguinte fórmula:

$$\text{Inibição de DPPH (\%)} = \frac{(\text{Abs. controle} - \text{Abs. amostra})}{\text{Abs. controle}} \times 100$$

Após a avaliação da faixa de concentração ideal, calculou-se a concentração do extrato necessária para capturar 50% do radical livre DPPH (IC₅₀) por análise de regressão linear (CARBONARI, 2005). Além disso, foi determinada a capacidade antioxidante de cada extrato em relação à vitamina C, comparando os valores de IC₅₀ de cada extrato com o valor do IC₅₀ da vitamina C, utilizando metodologia citado por SAITO *et al.*, 2007.

3.4.2 Teste de Mutação *Forward*

Para os ensaios de mutagenicidade e antimutagenicidade, utilizou-se a linhagem N123 de *S. cerevisiae*. Em frasco de Erlenmeyer contendo 30mL de YEL foi inoculada

uma colônia isolada dessa linhagem e colocada para crescer em ‘shaker’ (incubadora com agitação orbital – LABLINE), a 180rpm e 30°C, durante 48 horas, para atingir a fase estacionária. As culturas assim mantidas atingiam uma concentração de 2×10^8 céls/mL. Posteriormente, esta suspensão foi passada para um tubo Falcon de 50mL e centrifugada por 5 minutos a 5000rpm. Após esta primeira centrifugação, desprezou-se o sobrenadante e adicionou-se 20mL de solução salina, seguido de centrifugação para lavagem das células. Este procedimento foi repetido duas vezes. As células foram então contadas em câmara de Neubauer no microscópio óptico e foram feitas as diluições necessárias para se obter à concentração celular desejada para o tratamento. A linhagem em fase estacionária foi incubada com quantidades crescentes do extrato (50-500 μ L/mL) durante 2 horas sendo semeadas posteriormente em meio contendo canavanina. Após 3 à 5 dias de incubação à 30°C, as colônias foram contadas. Para o ensaio de antimutagenese, a linhagem foi incubada com 4mM de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e concentrações crescentes dos extratos, sendo posteriormente analisadas conforme o experimento anterior. Determinou-se a sobrevivência através de semeadura em meio rico YEPD, após 3-5 dias de crescimento em estufa a 30°C. Todos estes experimentos foram feitos em triplicata para cada dose testada.

3.5 Análise estatística

A análise estatística dos resultados foi realizada utilizando o teste Anova One-Way Tukey múltipla comparação. Os valores calculados estão expressos como média \pm desvio padrão e os considerados estatisticamente significativos destacados com *P<0,05 ou **P<0,01.

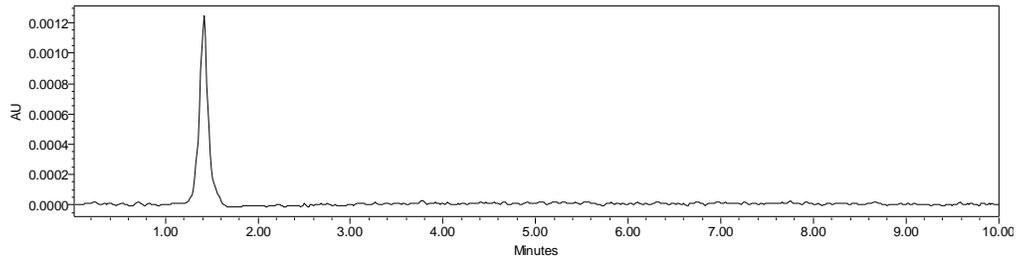
4 RESULTADOS

4.1 Análise cromatográfica da Vitamina C

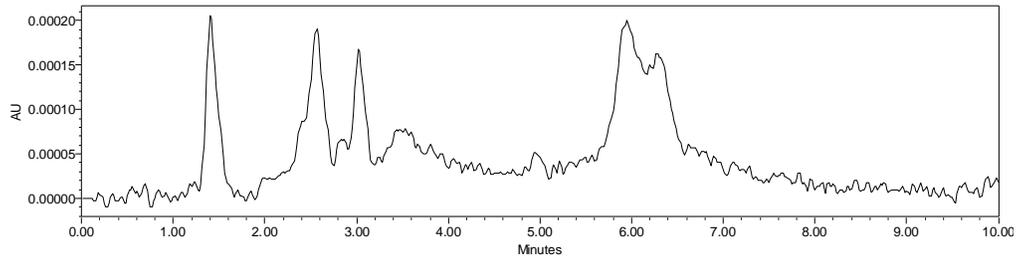
Foram determinadas por CLAE, as quantidades de vitamina C em cada extrato, os resultados destas análises são apresentados na figura 9. A figura 9a mostra o cromatograma da análise cromatográfica de 5 µl de uma solução de 10 mg/ml de vitamina C pura. As figuras 9b, 9c e 9d, mostram os cromatogramas das análises cromatográficas dos extratos industrializados 1, 2 e 3, obtidos comercialmente, e do extrato liofilizado da fruta *in natura* (figura 9e). Cada cromatograma reflete a injeção de 5 µl de solução de 10 mg/ml do respectivo extrato de acerola. O tempo de retenção da vitamina C pura, utilizando um solvente isocrático a base de metanol/água Milli Q (10:90), fluxo de 1 ml/min e detecção em um comprimento de ondas em 300nm era de 1,42 min (figura 9a). Já os tempos de retenção da vitamina C nos extratos 1, 2, 3 (figuras 9b, 9c e 9d, respectivamente) e do extrato da fruta *in natura* (figura 9e) eram de 1,41 min, 1,42 min, 1,42 min e 1,48 min, mostrando uma boa reprodutibilidade da metodologia descrito por PAULO *et al.* (1999).

As quantidades da vitamina C foram definidas a base da curva padrão da vitamina C (figura 10), que mostrou linearidade entre 0,5 µg e 100 µg de vitamina C. As quantidades da vitamina C encontradas nos extratos de 1, 2, 3 e no extrato aquoso *in natura* foram de 10,1µg, 5,2µg, 4,3µg e 26,6µg de vitamina C. Transformando estas quantidades de vitamina C em concentrações de vitamina C nos respectivos extratos, foram obtidos os seguintes valores: 0,20 mg, 0,10 mg, 0,09 mg e 0,53 mg de vitamina C por mg de extrato 1, 2, 3, e do extrato da fruta *in natura*, respectivamente.

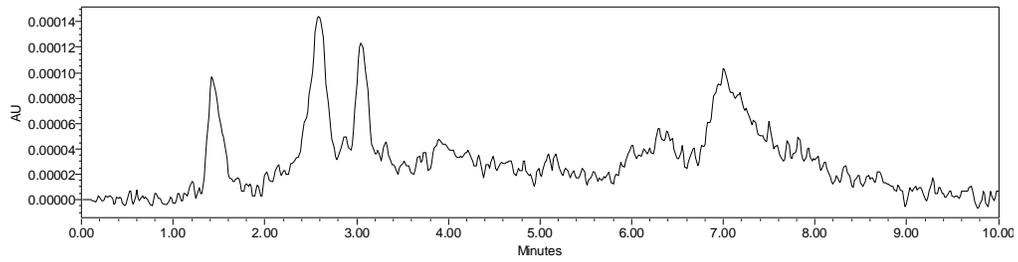
a)



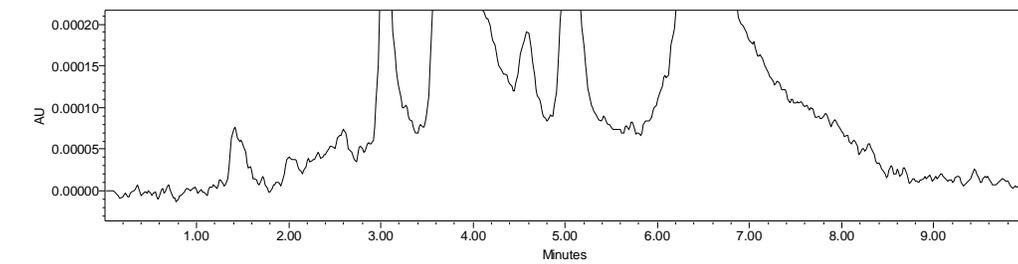
b)



c)



d)



e)

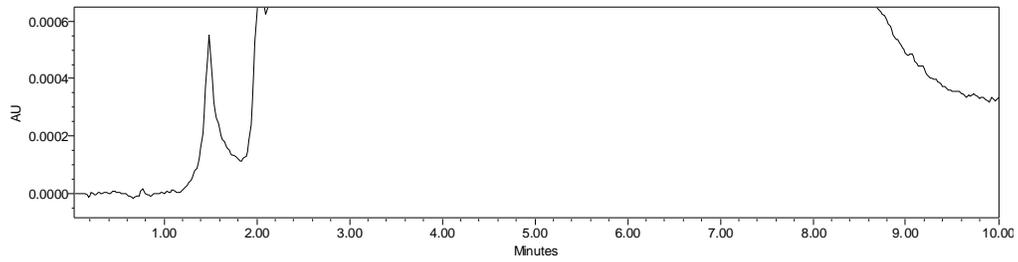


Figura 9: Cromatogramas da vitamina C das amostras: **a)** 5 μl de uma solução de 10 mg/ml vitamina C pura; **b)** 5 μl de uma solução de 10 mg/ml do extrato 1; **c)** 5 μl de uma solução de 10 mg/ml do extrato 2; **d)** 5 μl de uma solução de 10 mg/ml do extrato 3; **e)** 5 μl de uma solução de 10 mg/ml do extrato da fruta *in natura*.

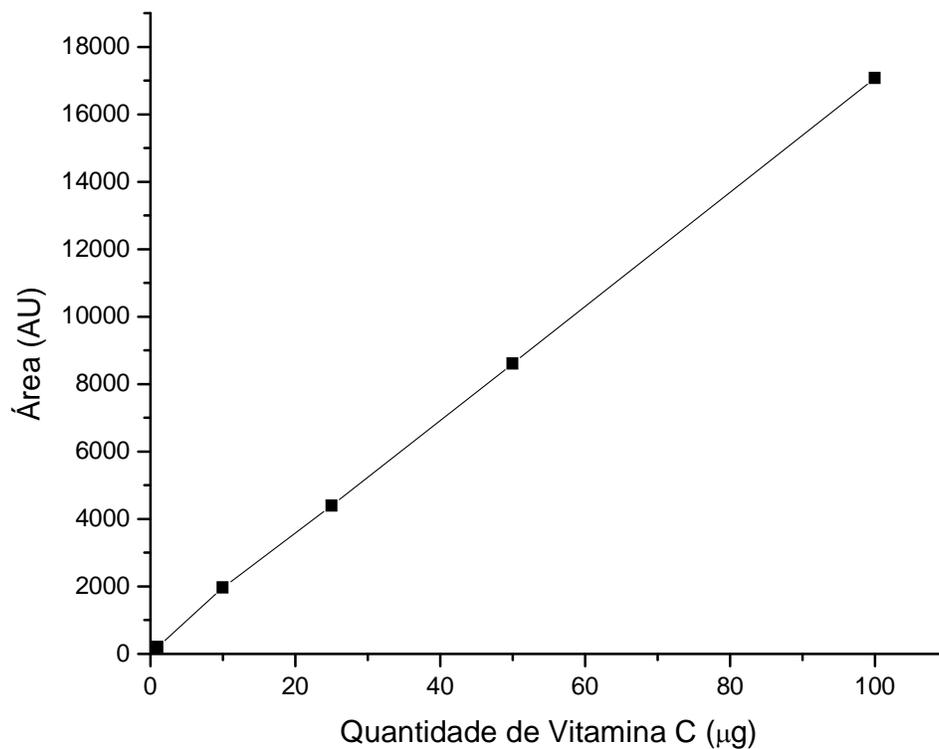


Figura 10: Curva padrão da vitamina C mostrou-se linear entre 0,5 e 100 μg .

4.2 Avaliações biológica

4.2.1 Atividade antioxidante

4.2.1.1 Ensaio antioxidante *in vivo*

Com base nos resultados encontrados foi possível determinar a sobrevivência das linhagens de *S. cerevisiae* proficiente e deficientes em defesas antioxidantes (*sod1*, *sod2*, *sod1sod2*, *cat* e *yap1*), incubadas com diferentes doses (50 a 500 $\mu\text{L/mL}$) dos diferentes extratos da fruta acerola e expostas ao peróxido de hidrogênio (1mM) em fase estacionária de crescimento. Os resultados obtidos mostram claramente que a incubação das linhagens com extrato liofilizado da fruta, bem como das amostras comerciais de extrato seco de acerola resultou em uma significativa ação antioxidante, principalmente no extrato liofilizado da fruta *in natura*, o qual apresentou um forte aumento da sobrevivência nas linhagens de *S. cerevisiae* quando expostas ao H_2O_2 .

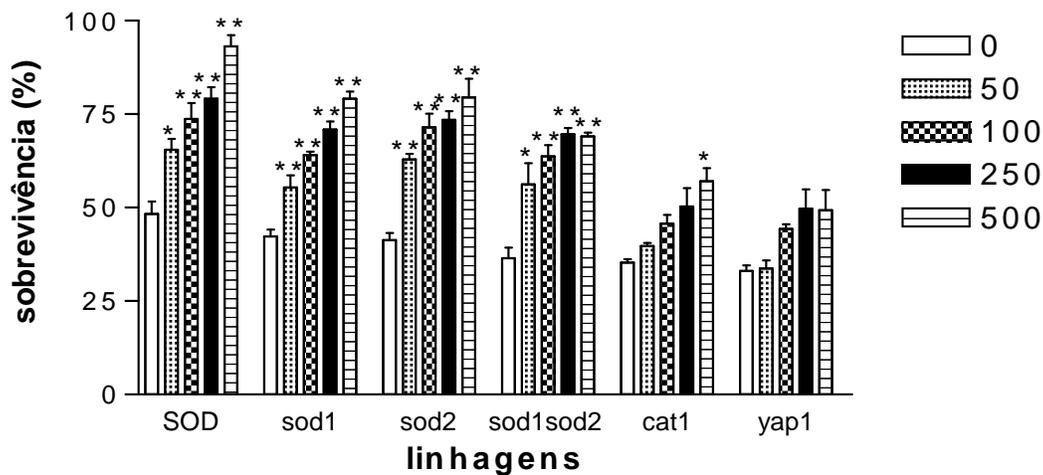


Figura 11: Ensaio de sobrevivência com células de *S. cerevisiae* na fase estacionária após tratamento com extrato liofilizado da fruta acerola *in natura*. Os resultados representam a média dos experimentos realizados em triplicata, sendo considerados estatisticamente significativos * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$ em relação a Tukey.

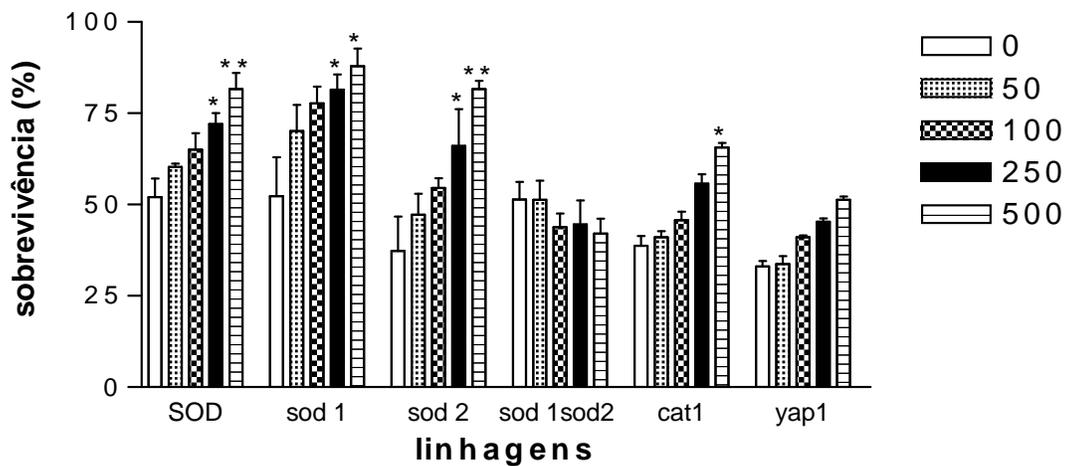


Figura 12: Ensaio de sobrevivência com células de *S. cerevisiae* na fase estacionária após tratamento com extrato 1. Os resultados representam a média dos experimentos realizados em triplicata, sendo considerados estatisticamente significativos * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$ em relação a Tukey.

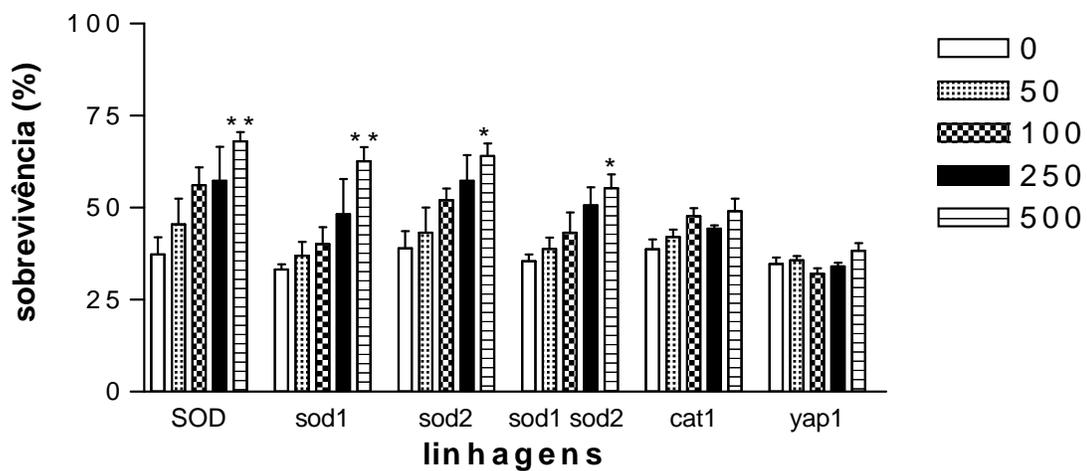


Figura 13: Ensaio de sobrevivência com células de *S. cerevisiae* na fase estacionária após tratamento com extrato 2. Os resultados representam a média dos experimentos realizados em triplicata, sendo considerados estatisticamente significativos *P<0,05 e **P<0,01 em relação a Tukey.

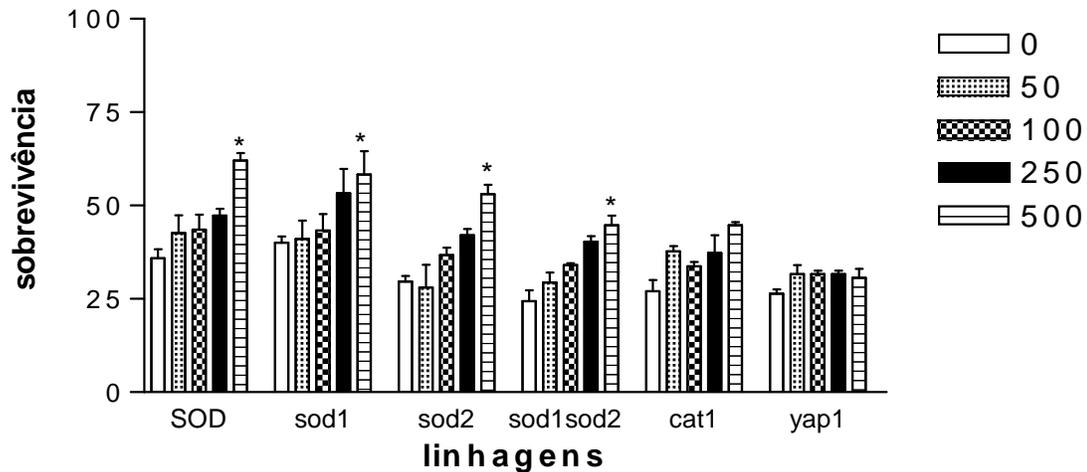


Figura 14: Ensaio de sobrevivência com células de *S. cerevisiae* na fase estacionária após tratamento com extrato 3. Os resultados representam a média dos experimentos realizados em triplicata, sendo considerados estatisticamente significativos *P<0,05 e **P<0,01 em relação a Turkey.

4.2.1.2 Ensaio antioxidantes *in vitro*

4.2.1.2.1 Ensaio à base da hipoxantina/xantina oxidase

Para avaliar a atividade antioxidante *in vitro*, foi utilizado o teste antioxidante a base da hipoxantina/xantina oxidase. Através desta metodologia é realizado um monitoramento da produção de ácidos diidroxi-benzóicos (DHBA) devido a um processo de derivatização dos radicais hidroxila com a molécula ácido salicílico. O referido teste produz radicais hidroxila, que podem ser seqüestrados tanto pelo ácido salicílico, como por compostos antioxidantes, presentes em extratos de plantas. Quanto mais forte a competição

por parte dos compostos potencialmente antioxidantes, menor será produção dos DHBA's (OWEN *et al.*, 1996). A figura 15 mostra uma inesperada atividade pró-oxidante de todos os extratos testados de forma dose-dependente.

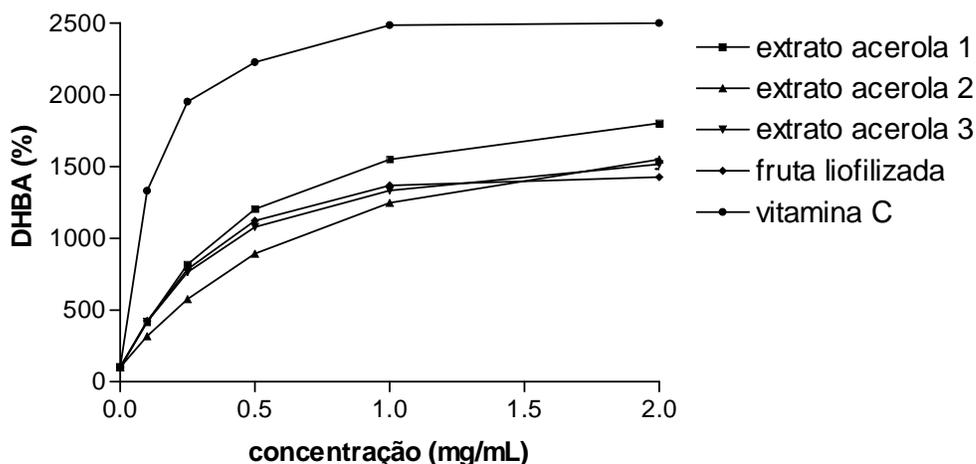


Figura 15: Resultados do teste antioxidante a base da hipoxantina/xantina oxidase.

A figura 15 mostra uma forte atividade pró-oxidante *in vitro*, para os extratos comercializados 1, 2 e 3, o extrato da fruta *in natura* e vitamina C pura. Os resultados representam a média dos experimentos realizados em triplicata, sendo considerados estatisticamente significativos $p < 0,001$.

Para excluir a possibilidade de que a faixa de concentração de 0,1 a 2mg/mL proporcione atividade pró-oxidante, enquanto doses menores poderiam demonstrar atividade antioxidante, foi feito um segundo ensaio testando novas concentrações de 0,0001mg/mL, 0,001mg/mL e 0,01mg/mL (tabela 7), além das concentrações já testados anteriormente. A concentração mais baixa não demonstrou efeito pró-oxidante nem efeito antioxidante. Já nas concentrações de 0,001mg/mL e 0,01mg/mL foi demonstrada diretamente uma atividade pró-oxidante, pois foi constatada um aumento considerável na formação dos dois compostos DHBA. Este aumento é dose-dependente, pois aumenta, conforma o aumento da concentração dos diferentes extratos ou da vitamina C pura no referido teste.

Tabela 7: Avaliação da atividade pró-oxidante e/ou antioxidante dos diferentes extratos da Acerola, e da vitamina C pura, utilizando o teste à base da hipoxantina/xantina oxidase.

Concentração no teste	Extrato 1 Seco	Extrato 2 Seco	Extrato 3 Seco	Extrato fruta <i>in natura</i>	Vitamina C
0,0001 mg/ml	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %
	101 %	101 %	101 %	100 %	101 %
	100 %	100 %	100 %	100 %	99 %
0,001 mg/ml	100 %	100 %	99 %	100 %	102 %
	99 %	101 %	100 %	101 %	101 %
	100 %	102 %	101 %	100 %	101 %
0,01 mg/ml	150 %	121 %	147 %	150 %	434 %
	149 %	122 %	148 %	152 %	436 %
	147 %	122 %	156 %	152 %	435 %
0,1 mg/ml	416 %	309 %	409 %	421 %	1325 %
	416 %	311 %	407 %	421 %	1327 %
	418 %	312 %	406 %	422 %	1325 %
0,25 mg/ml	814 %	560 %	746 %	774 %	1950 %
	824 %	563 %	745 %	775 %	1947 %
	813 %	564 %	743 %	775 %	1950 %
0,5 mg/ml	1240 %	865 %	1002 %	1112 %	2211 %
	1183 %	866 %	1004 %	1114 %	2212 %
	1186 %	866 %	1004 %	1114 %	2212 %
1 mg/ml	1543 %	1201 %	1278 %	1361 %	2475 %
	1545 %	1196 %	1279 %	1357 %	2476 %
	1559 %	1199 %	1277 %	1359 %	2475 %
2 mg/ml	1785 %	1500 %	1432 %	1425 %	2644 %
	1827 %	1502 %	1433 %	1428 %	2635 %
	1789 %	1501 %	1433 %	1429 %	2634 %

Estes resultados pró-oxidantes podem ser explicados devido à presença de altas concentrações do íon ferroso (Fe^{+2}), presente nos reagentes da metodologia, o que inviabiliza o teste antioxidante, pois nestes condições a vitamina C vira um “formador” de radicais hidroxila.

4.2.1.2.2 Ensaio à base do radical livre DPPH

Os resultados obtidos dos testes frente ao método do radical livre DPPH são apresentados na figura 15 e na tabela 7 e permitem fazer uma comparação do potencial antioxidante entre os extratos secos de acerola comercializados no país e o extrato liofilizado da fruta *in natura*.

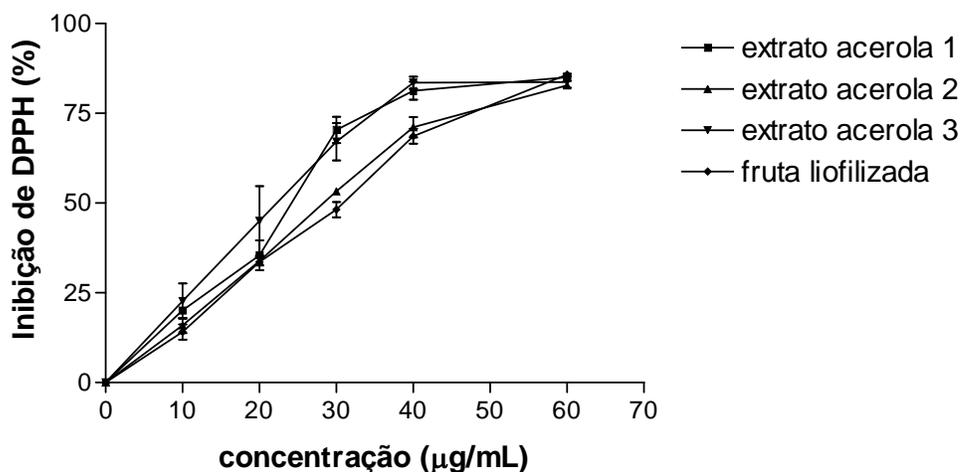


Figura 16: Resultados do teste antioxidante a base do radical livre DPPH. Os resultados representam a média dos experimentos realizados em triplicata, sendo considerados estatisticamente significativos $p < 0.001$.

Com base nos resultados, foi constatada uma significativa atividade antioxidante para todos os extratos testados de forma dose-dependente. Dentre estes, observou-se a maior atividade no extrato da fruta *in natura*, com um $IC_{50} = 27,64 \mu\text{g/mL}$, seguido pelo extrato 1 ($IC_{50} = 28,51 \mu\text{g/mL}$), o extrato 2 ($IC_{50} = 33,48 \mu\text{g/mL}$) e o extrato 3 mostrou uma $IC_{50} = 36,35 \mu\text{g/mL}$.

A atividade antioxidante *in vitro* da vitamina C pura, foi testada utilizando o mesmo teste a base do radical livre DPPH. O IC_{50} encontrada para inibição do radical livre DPPH foi de $3,85 \mu\text{g/mL}$, conforme mostra a figura 17.

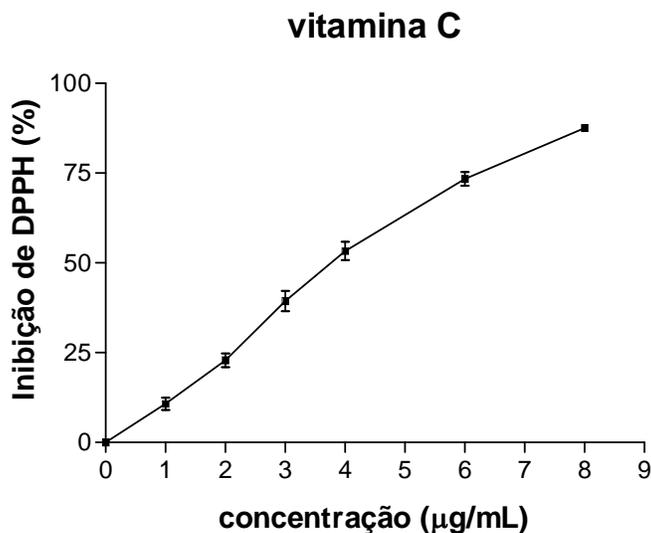


Figura 17: Resultados da atividade antioxidante da vitamina C, a base do radical livre DPPH. Os resultados representam a média dos experimentos realizados em triplicata, sendo considerados estatisticamente significativos $p < 0.001$.

Para comparar os diferentes valores de IC_{50} dos extratos testados, em relação ao IC_{50} da vitamina C, foi dividido o valor do IC_{50} de cada extrato pelo IC_{50} da vitamina C. Os respectivos resultados são apresentados na tabela 8.

Tabela 8: Valores de IC_{50} dos diferentes extratos testados, em relação à IC_{50} da vitamina C.

Extrato / Composto	IC_{50} (µg/mL)	IC_{50} extrato / IC_{50} vitamina C
Fruta liofilizada <i>in natura</i>	27,64	7,18
1	28,51	7,41
2	33,48	8,70
3	36,35	9,44
vitamina C	3,85	1,00

4.2.2 Teste de Mutação *Forward*

Como pode ser visto na tabela 9, através do ensaio para detecção de mutação forward em linhagem N123, o extrato liofilizado da fruta *in natura* não induziu mutagenicidade em *S. cerevisiae* em nenhuma das concentrações avaliadas.

Tabela 9: Indução de Mutação *Forward* em linhagem N123 de *S. cerevisiae* após tratamento com extrato liofilizado da fruta *in natura* em fase estacionária de crescimento.

Substância	Dose	Sobrevivência (%)	Can/107 sobreviv. ^a
CN ^b	0	100 (329) ^c	4,25 ± 4,35 ^e
4NQO ^d	0,5µg/mL	50,28 (88)	34,4 ± 3,12***
Extrato Liofilizado Acerola <i>in natura</i>	50µL	74,70 (246)	6,17 ± 2,92
	100µL	77,91 (257)	6,22 ± 1,01
	250µL	85,83 (283)	5,75 ± 3,51
	500µL	96,00 (316)	4,63 ± 3,51

^a Revertentes Locus específico; ^b Controle Negativo; ^c Número de colônias; ^d Controle positivo; ^e Média e desvio padrão de três experimentos independentes; Dados significantes em relação ao controle negativo (solvente) onde *** $P < 0.001$ / One-way ANOVA-Tukey's multiple comparison test.

Na tabela 10, verifica-se que o tratamento do extrato apresentou um aumento na sobrevivência da linhagem N123 durante o tratamento com H₂O₂, reduzindo simultaneamente o número de revertentes para mutação forward.

Tabela 10: Indução de Mutação *Forward* em linhagem N123 de *S. cerevisiae* após tratamento com H₂O₂ e extrato liofilizado da fruta *in natura*, por 1 h em fase estacionária de crescimento.

Substância	Dose	Sobrevivência (%)	Can/107 sobreviviv. ^a
CN ^b	0	100 (243) ^c	1,78 ± 2,15 ^e
H ₂ O ₂ ^d	4 mM	13,28 (33)	13,39 ± 2,51
Extrato Liofilizado Acerola <i>in natura</i>	50µL+ H ₂ O ₂	15,06 (37)	12,71 ± 1,52
	100µL+ H ₂ O ₂	50,42 (122)	9,46 ± 2,88**
	250µL+ H ₂ O ₂	110,33 (268)	8,93 ± 6,55**
	500µL+ H ₂ O ₂	138,50 (337)	8,60 ± 5,56**

^a Revertentes Locus específico; ^b Controle Negativo; ^c Número de col nias; ^d Controle positivo; ^e Média e desvio padrão de três experimentos independentes; Dados significantes em rela o ao controle positivo (peróxido de hidrogênio) onde ***P*<0.01/ One-way ANOVA-Tukey's multiple comparison test.

5 - DISCUSSÃO GERAL

A família Malpighiaceae é geralmente encontrada em regiões tropicais sendo formada por aproximadamente 800 espécies, distribuídas em 60 gêneros. Apesar desse grande número de espécies vegetais, pouco é conhecido acerca da constituição química e atividades biológicas da família. Poucos trabalhos na literatura reportam a presença, em geral, de triterpenos, flavonóides e esteróides em algumas espécies (DAVID e SANTOS, 2003). No Brasil, a maior parte das espécies da família Malpighiaceae é conhecida por ser utilizada com finalidade terapêutica e como alimento. Desse modo, há uma crescente necessidade de mais estudos fitoquímicos com essas espécies (DAVID e SANTOS, 2003). A acerola é um fruto pertencente à família Malpighiaceae, o qual apresenta grande interesse em função de seu alto teor de vitamina C, do elevado número de safras anuais e do grande potencial de exportação.

Os benefícios obtidos na utilização terapêutica da vitamina C em ensaios biológicos com animais incluem o efeito protetor contra os danos causados pela exposição às radiações e medicamentos (AMARA-MOKRANE *et al.*, 1996). Os estudos epidemiológicos também atribuem a essa vitamina um possível papel de proteção no desenvolvimento de tumores nos seres humanos (LUPULESCU, 1993; DUTHIE *et al.*, 1996). Contudo, a recomendação de suplementação dessa vitamina deve ser avaliada especificamente para cada caso, pois existem muitos componentes orgânicos e inorgânicos nas células que podem modular a atividade da vitamina C, afetando sua ação antioxidante.

Embora a acerola seja amplamente utilizada na dieta humana, ainda são poucos os estudos farmacológicos que garantam seu efeito terapêutico e sua toxicidade. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi verificar a atividade antioxidante e antimutagênica de diferentes extratos da fruta da planta *Malpighia Glabra L.*

Devido à alta concentração de vitamina C presente na acerola, citada anteriormente, foi realizado o doseamento desta vitamina em todos os extratos em estudo por CLAE. Conforme a figura 9, o extrato liofilizado da fruta *in natura* demonstrou a maior concentração da vitamina C, seguido pelos extratos 1,2 e 3. Os resultados apresentaram uma notável diferença entre as amostras, estando a vitamina C presente em todos os

extratos, embora em diferentes concentrações. Pode-se assim fazer um comparativo entre a concentração de vitamina C encontrada em cada extrato e as atividades biológicas mostradas nos testes realizados posteriormente.

A atividade antioxidante foi determinada através de ensaios biológicos *in vivo* com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* e através de duas metodologias *in vitro*, sendo elas o ensaio à base da hipoxantina/xantina oxidase e o ensaio à base do radical livre DPPH.

O ensaio *in vivo* foi realizado utilizando linhagens da levedura *Saccharomyces cerevisiae* proficientes e deficientes no sistema de defesa antioxidante (*SOD, sod1, sod2, sod1sod2, cat e yap1*), por meio de um ensaio semiquantitativo realizado através da inibição de crescimento. O modelo de resposta citotóxica em *S. cerevisiae*, através do teste de inibição de crescimento é uma estratégia simples e muito sensível para avaliação do efeito biológico de substâncias naturais e sintéticas em tratamentos diversos (PICADA *et al.*, 2000; ROSA *et al.*, 2004; ROSA *et al.*, 2006; MOURA *et al.*, 2007).

Como demonstrado nas figuras 11, 12, 13 e 14, o tratamento realizado com diferentes amostras da planta *Malpighia glabra* L. protegeu as linhagens de *S. cerevisiae* contra os danos oxidativos provocados pelo H₂O₂, sendo observado uma forte ação antioxidante principalmente para o extrato da fruta liofilizada *in natura*. Este efeito protetor é evidenciado por um aumento na sobrevivência celular da maioria das linhagens, independente de defesa antioxidante em falta. A partir disso, a atividade encontrada nestes extratos pode ser atribuída a presença de compostos já descritos na literatura presentes na fruta como vitamina C, diferentes carotenos, dentre eles o licopeno e flavonóides como a rutina, que apresentam comprovada capacidade de sequestrar radicais livres com grande eficiência.

Na presença de íons ferro, o H₂O₂ pode originar um dos intermediários mais reativos do oxigênio, o radical OH[•] através da reação de Fenton (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2000). Em condições aeróbicas de crescimento os mutantes *sod1Δ* e *sod2Δ* apresentam níveis maiores de ferro (até 5 vezes), assim como a duplo mutante *sod1Δsod2Δ* (até 9 vezes), detectado por Ressonância Paramagnética de Elétron (EPR), em

relação aos níveis basais da linhagem selvagem isogênica (SRINIVASAN *et al.*, 2000). Além disso, o gene *SOD1* é regulado pelo fator de transcrição Ace1, o qual controla a indução do gene *CUP1* (que codifica uma metalotioneína) em resposta a níveis elevados de cobre (GRALLA *et al.*, 1991), sugerindo defesa a radical superóxido e homeostase de metais (MARIS *et al.*, 2000). Portanto, com base nos resultados obtidos nestes mutantes, pode-se sugerir uma possível ação dos compostos presentes na fruta sobre o radical OH•.

Contudo, os extratos não foram capazes de aumentar a sobrevivência da linhagem yap1 após tratamento com H₂O₂. O fator Yap1 é muito importante na ativação da expressão gênica de enzimas antioxidantes envolvidas em processos de estresse oxidativo, e somente antioxidantes potentes são capazes de proteger esta linhagem nesse modelo de estudo (IKNER e SHIOZAKI, 2005).

Uma vez que todos os extratos demonstraram atividade antioxidante *in vivo* através do ensaio com *S. cerevisiae*, decidiu-se avaliar a atividade antioxidante *in vitro* utilizando o ensaio à base da hipoxantina/xantina oxidase. Neste ensaio, foi verificada uma forte capacidade pró-oxidante para todos os extratos, o que pode ser explicado pela presença do metal de transição Fe²⁺ na metodologia. Estudos *in vitro* mostram que a vitamina C na presença de metais de transição, tais como o ferro, pode atuar como uma molécula pró-oxidante e gerar os radicais peróxido e hidroxila. A reação de Fenton, redução de peróxido de hidrogênio por Cu¹⁺ ou Fe²⁺ a radical hidroxila, é favorecida na presença de vitamina C, sendo capaz de reduzir os metais de transição, tornando-os aptos para esta reação. Quando o Fe²⁺ (forma ferrosa) reduz o H₂O₂ para gerar o radical hidroxila o Fe²⁺ é convertido em Fe³⁺ (forma férrica), a vitamina C converte o Fe³⁺ novamente para Fe²⁺ possibilitando assim mais um ciclo de geração do radical hidroxila à base de Fe²⁺ (AISEN *et al.*, 1990, HERBERT e JAYATILLEKE, 1996). *In vivo* os metais encontram-se complexados, portanto, indisponíveis (HALLIWELL, 1999). Já em situações patológicas em que a quantidade de ferro e/ou cobre livre está elevada, por exemplo, talassemias, hemocromatose e injúria tecidual, a atividade pró-oxidante pode ser relevante (HERBERT e JAYATILLEKE, 1996).

A importância relativa ao desempenho de antioxidantes depende de diversos fatores, tais como o tipo de radical livre formado, onde e como são gerados estes radicais, componentes químicos empregados nas diferentes metodologias e doses ideais para obter proteção. Assim, é perfeitamente possível que um antioxidante atue como protetor em um determinado sistema, mas que falhe na proteção, ou mesmo que aumente as lesões induzidas em outros sistemas, ou tecidos (HALLIWELL *et al.*, 1995).

A partir destes resultados pró-oxidantes do ensaio à base da hipoxantina/xantina oxidase, que diferem do teste *in vivo*, utilizou-se uma segunda técnica *in vitro* à base do radical livre DPPH. Os resultados encontrados neste segundo teste indicam que todos os extratos testados apresentaram uma ação antioxidante, ocorrendo principalmente no extrato liofilizado da fruta *in natura*, que apresentou maior atividade sobre o radical livre DPPH.

Frente aos testes realizados, é importante destacar que o extrato liofilizado da planta *in natura* demonstrou atividade antioxidante e concentração de vitamina C significativamente superiores a todas as amostras de extrato seco comercializadas no país. Além disso, estes extratos apresentaram diferenças marcantes entre si, tanto nos ensaios de atividade antioxidante como nas concentrações de vitamina C. Como observado nos cromatogramas do doseamento da vitamina C (figura 9), os extratos adquiridos de diferentes fornecedores apresentam diversos picos que não se sobrepõem, demonstrando possível presença de distintos compostos em cada amostra. Este fato pode ser decorrente de possíveis influências, tais como o processo de produção do extrato, bem como a forma de armazenamento, temperatura e transporte. Assim, os resultados deste estudo colocam em dúvida a qualidade dos atuais fornecedores de extratos secos de acerola encontrados no país.

Algumas das substâncias presentes nos alimentos e vegetais podem ter efeitos mutagênicos e/ou carcinogênicos, isto é, podem induzir mutações do DNA e/ou podem favorecer o desenvolvimento de tumores enquanto outras podem atenuar ou anular estes efeitos (ANTUNES & ARAÚJO, 2000). Após a observação inicial de efeitos antimutagênicos de certos vegetais, vários compostos têm sido isolados de plantas e testados quanto à ação protetora sobre lesões induzidas no DNA (KADA *et al.*, 1978). O

termo “antimutagênico” foi usado originalmente por NOVICK e SZILARD em 1952 para descrever os agentes que reduzem a frequência de mutação espontânea ou induzida, independente do mecanismo envolvido (VON BORSTEL *et al.*, 1996).

Os mecanismos de ação dos agentes antimutagênicos foram classificados em dois processos maiores, denominados desmutagênese e bio-antimutagênese. Na desmutagênese, os agentes protetores, ou antimutagênicos, atuam diretamente sobre os compostos que induzem mutações no DNA, inativando-os química ou enzimaticamente, inibindo ativação metabólica de pró-mutagênicos ou seqüestrando moléculas reativas. Na bio-antimutagênese, os antimutagênicos atuam sobre o processo que leva a indução de mutações, ou reparo das lesões causadas no DNA (KADA *et al.*, 1978). Posteriormente, uma outra classificação mais detalhada foi sugerida, considerando o modo de ação dos antimutagênicos e/ou anticarcinogênicos, bem como o ambiente de ação, extra ou intracelular (De FLORA & RAMEL, 1988). O potencial antimutagênico de uma substância pode ser avaliado em sistemas biológicos diversos, os mesmos empregados para o estudo e identificação dos agentes mutagênicos. Em qualquer desses sistemas-teste, o tratamento com os agentes mutagênicos, que induzem as mutações, e com os antimutagênicos, que podem inibir o aparecimento de lesões no DNA, pode ocorrer simultaneamente ou em momentos diferentes, por meio de pré ou pós-tratamento. Os agentes antimutagênicos usados em pré-tratamento ou tratamento simultâneo podem atuar como agentes desmutagênicos. A efetividade do agente antimutagênico no pós-tratamento sugere que ele esteja atuando pelo mecanismo de bio-antimutagênese e estaria relacionado ao processo de reparo das mutações (WATERS *et al.*, 1996). Muitos compostos antimutagênicos encontrados nos alimentos são agentes antioxidantes e atuam seqüestrando os radicais livres de oxigênio, quando administrados como pré-tratamento ou nos tratamentos simultâneos com o agente que induz as mutações no DNA.

Espécies reativas de oxigênio produzem uma série de lesões no DNA, danificando bases, deoxiriboses, causando quebras simples de cadeia, criando sítiosapurínicos e pirimidínicos (sítios AP) e ligações cruzadas entre DNA e proteínas por uma série de mecanismos (DIZDAROGLU, 2005). Com base nisto e nos resultados encontrados nos testes antioxidantes, avaliou-se também neste trabalho a capacidade protetora ao DNA do

extrato liofilizado da planta *Malpighia glabra* L. *in natura* pelo ensaio de antimutagenicidade na levedura *S. cerevisiae*.

Para determinação dos efeitos mutagênico e antimutagênico da fruta acerola, foi utilizada a linhagem de levedura N123. Como mostrado nas tabelas 9 e 10, o extrato liofilizado da fruta *in natura* não induziu dano mutagênico nas doses e condições de tratamento utilizado. Contudo, o extrato apresentou forte ação antimutagênica contra danos oxidativos induzidos pelo peróxido de hidrogênio em linhagem N123, verificado principalmente por um aumento na sobrevivência celular. Neste caso, este efeito protetor dos extratos contra danos induzidos por H₂O₂ no DNA seja devido a uma ação antioxidante, provavelmente relacionada à presença de alto teor de vitamina C, que estaria agindo como seqüestrador de ERO, especialmente sobre radical OH[•].

Em resumo, nossos resultados indicam que os diferentes extratos industrializados, bem como o extrato liofilizado da fruta *in natura* possuem significativa atividade antioxidante *in vivo* e *in vitro*. O estudo demonstrou também que a fruta *in natura* possui um maior potencial antioxidante do que os demais extratos testados. Isso nos leva a acreditar que a utilização da fruta *in natura* na dieta humana, traz mais benefícios do que o uso de produtos derivados da fruta. Neste trabalho encontra-se o primeiro relato da atividade antimutagênica da fruta acerola em um modelo *in vivo*. Acredita-se que a ação antimutagênica encontrada esteja relacionada à atividade seqüestradora de radicais livres detectada pelo ensaio em *S. cerevisiae* e ensaio *in vitro* à base do DPPH.

Baseado nos resultados encontrados, torna-se fundamental a futura identificação dos compostos presentes na Acerola, responsáveis pelas atividades encontradas, como forma de garantir a eficácia e segurança para uso popular na dieta humana.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFANAS'AV, I. B.; OSTRACHOVITCH, E. A.; KORKINA, L.G. Effect of rutin its copper complex on superoxide formation and lipid peroxidation in rat liver cromosomes. *FEBS Lett*, v. 425, p. 256-258, 1989.

AISEN, P.; COHEN, G.; KANG, J.O. Iron Toxicosis. *Int. Rev. Exp. Pathol.* v. 31, p. 1-46, 1990.

ALARCO, A.M.; BALAN, I.; TALIBI, D.; MAINVILLE, N.; RAYMOND, M. API-mediated multidrug resistance in *Saccharomyces cerevisiae* FLR1 encoding a transporter of the major facilitator superfamily. *The Journal Biological Chemistry*, v. 272, p. 19304-19313, 1997.

ALMEIDA, J.I.L.; LOPES, J.G.V.; OLIVEIRA, F.M.M. *Produtor de acerola*. Fortaleza: Edições Demócrito Rocha, Instituto Centro de Ensino Tecnológico, 2002.

ALVES, R.E. Características das frutas para exportação. In: GORGATTI NETTO, A.; ARDITO, E.F.G.; GARCIA, E.E. (Eds.) *Acerola para exportação: procedimentos de colheita e pós-colheita*. Brasília: EMBRAPA-SPI, p. 9-12, 1996

ALVES, R.E.; MENEZES, J.B. Botânica da Aceroleira. In: SÃO JOSÉ, A.R.; ALVES, A.E. (Eds.) *Cultura da acerola no Brasil: produção e mercado*. Vitória da Conquista: Departamento de Fitotecnia e Zootecnia/ Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, p. 7-14, 1995.

AMARA-MOKRANE, Y.A.; LEHUCHER-MICHEL, M.P.; BALANSARD, G.; DUMÉNIL, G.; BOTTA, A. Protective effects of α -hederin, chlorophyllin and ascorbic acid towards the induction of micronuclei by doxorubicin in cultured human lymphocytes. *Mutagenesis*, Oxford, v. 11, n. 2, p. 161-167, 1996.

AMES, B.N. Dietary carcinogens and anticarcinogens. *Science*, v. 221, p. 1256-1263, 1983.

ANGELIS, R.C. *Importância de alimentos vegetais na proteção da saúde: fisiologia da nutrição protetora e preventiva de enfermidades degenerativas*. São Paulo: Ed. Atheneu, 2001.

ANTUNES, L.M.G.; ARAÚJO, M.C.P. Mutagenicity and antimutagenicity of the main food colorings. *Revista de Nutrição*, Campinas, v. 13, p. 81-88, 2000.

ARAÚJO, P.S.R. *Acerola*. Campinas: Fundação Cargill, 1994.

ASTN (Associação das Indústrias Processadoras de Frutos Tropicais); APEX (Programa Setorial Integrado de Promoção de Exportações de Sucos Tropicais). Brasília, 2001. Disponível em: <<http://webm5.uol.com.br/cgi-bin/webmail.exe/messages>>. Acesso em: 14 dez. 2003.

BAUER, B.E.; WOLFGER, H.; KUCHLER, K. Inventory and function of yeast ABC proteins: about sex, stress, pleiotropic drug and heavy metal resistance. *Biochemic et Biophysics Acta*, v. 1461, p. 217-236. 1999

BECKMAN, K. B.; AMES, B. N. The free theory of aging matures. *Physiol. Rev.*, v. 78, p. 547-581, 1998.

BILINSKI, T.; KRAWIEC, Z.; LICZMANSKI, A.; LITWINSKA, J. Is hydroxyl radical generated by the Fenton reaction in vivo? *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 130, p. 533-539, 1985.

BOEIRA, J.M.; VIANA, A.F.; PICADA, J.N.; HENRIQUES, J.A.P. Genotoxic and recombinogenic activities of the two β -carboline alkaloids harman and harmine in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutation Research*, v. 500, p. 39-48, 2002.

BOVERIS, A. *Biochemistry of free radicals: from electrons to tissues*. Medicina (B. Aires), v. 58, p. 350-356, 1998.

BRENDEL, M.; GREY, M.; MARIS, A.F.; HIETKAMP, J.; FESUS F.; PICH, C.T.; DAFRÉ, L.; SCHIMIDT, M.; ECKARDT-SHUPP, F.; HENRIQUES, J.A.P. Low glutathione pools in the original *pso3* mutant of *Saccharomyces cerevisiae* are responsible for its pleiotropic sensitivity phenotype. *Curr. Genet.*, v. 33, p. 4-9, 1998.

BRENDEL, M.; HENRIQUES, J.A.P. The *pso* mutants of *Saccharomyces cerevisiae* comprise two groups: one deficient in DNA repair and another with altered mutagen metabolism. *Mutation Research*, v. 489, p. 79-96, 2001.

- BRENNAN, R.J.; SCHIEST, R.H. Cadmium is an inducer of oxidative stress in yeast. *Mutation Res. (Fund. Mol. Mech. Mutagen)*, v. 356, p. 171-178, 1996.
- BRENNAN, R.J.; SCHIESTL, R.H. Free radicals generated in yeast by the *Salmonella* test negative carcinogens benzenes, urethane, thiourea and auramine O. *Mutation Research*, v. 403, p. 65-73, 1998.
- BROZMANOVA, J.; DUDAS, A.; HENRIQUES, J.A.P. Repair of oxidative DNA damage – an important factor reducing cancer risk. *Neoplasms*, v. 48, p. 85-93, 2001.
- BURKE, D.; DAWSON, D.; STEARNS, T. *Methods in yeast genetics: A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual*. New York: CSH Laboratory Press, p. 171-205, 2000.
- CADENAS, E. Biochemistry of oxygen toxicity. *Annu. Rev. Biochem.*, v. 58, p. 79-110, 1989.
- CADET, J.; DELATOUR, T.; GASPARUTTO, D.; POUGET, J. P.; RAVANAT, J. L.; SAUVAIGO, S. Hydroxyl radicals and DNA base damage. *Mutation Research*, v. 424, p. 9-21, 1999.
- CARBONARI, K. A. *Avaliação do Potencial Antioxidante (In vitro e In vivo) e Antiinflamatório de Ouratea parviflora, Polymnia sonchifolia e Marlierea obscura*. Dissertação de Mestrado-Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2005
- CARRINGTON, C.M.S.; KING, R.A.G. Fruit development and ripening Barbados cherry, *Malpighia emarginata* D.C. *Scientia Horticulturae*, Amsterdam, v. 92, n. 1, p. 1-7, 2002.
- CARVALHO, R.A. *Análise econômica da produção de acerola no município de Tomé-Açu, Pará*. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2000.
- COHEN, G.; RAPATZ, W.; RUIS, H. Sequence of the *Saccharomyces cerevisiae* CTA1 gene and amino acid sequence of catalase A derived from it. *Eur. J. Biochem.*, v. 176, p. 159-163, 1988.
- COSTA, V., FERREIRA, P.M. Oxidative stress and signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*: insights into ageing, apoptosis and diseases. *Molecular Aspects of Medicine*, v. 22, p. 217-246, 2001.

CRAPO, J.D.; OURY, T.; RABOUILLE, C.; SLOT, J.W.; CHANG, L.Y. Cooper, zinc superoxide dismutase is primarily cytosolic protein in human cells. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, v. 89, p. 10405-10409, 1992.

DAVID, J.M.; SANTOS, F.A.; Flavonóide e triterpenos de *Stigmaphyllon paralias*. *Quim. Nova*, v. 26, n. 4, p. 484-487, 2003.

DEARFIELD, K.L.; CIMINO, M.C.; McCARROLL, N.E.; MAUER, I.; VALCOVIC, L.R. Genotoxicity risk assessment: a proposed classification strategy. *Mutation Research*, v. 521, p. 121-135, 2002.

DECKER, E. A. Phenolics: prooxidants or antioxidants? *Nutr. Rev.*, v. 55, p. 396-407, 1997.

DE FLORA, S.; RAMEL, C. Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. Classification and overview. *Mutation Research*, Amsterdam, v. 202, p. 285-306, 1988.

DELLA CROCE, C.; BRONZETTI, G.; CINI, M.; CALTAVUTURO, L.; POI, G. Protective effect of lipoic acid against hydrogen peroxide in yeast cells. *Toxicology in Vitro*, v. 17, p. 753-759, 2003.

DEMPLE, B.; HARRISON, L. Repair of oxidative damage to DNA: enzymology and biology. *Annual Review Biochemistry*, v. 63, p. 915-948, 1994.

DE WINDE, J.H.; THEVELEIN, J.M.; WINDERICK, J. Adaptation to nutrient depletion in yeast. In: MAGER, W.H. (ED) Yeast stress responses. *Springer-Verlag*, Heidelberg, p. 7-52, 1997.

DIZDAROGLU, M. Base-excision repair of oxidative DNA damage by DNA glycosylases. *Mutation Research*, v. 591, p. 45-59, 2005.

DORMER, U.H.; WESTWATER, J.; STEPHEN, D.W.S.; JAMIESON, D.J. Oxidant regulation of the *Saccharomyces cerevisiae GSH1* gene. *Biochemica et Biophysica Acta*, v. 1576, p. 23-29, 2002.

DUTHIE, S.J.; MA, A.; ROSS, M.A.; COLLINS, A.R. Antioxidant supplementation decreases oxidative DNA damage in human lymphocytes. *Cancer Research*, Baltimore, v. 56, n. 6, p. 1291-1295, 1996.

EIDE, D.J. The molecular biology of metal ion transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu. Rev. Nutr.*, v. 18, p. 441-469, 1998.

FARR, D.R.; MAGNOLATTO, D.; LOLINGER, J. *Protection of food-stuffs from Oxidation*. U.S. Pat 4741915, 1988.

FERNANDEZ-CHECA, J.C.; GARCIA-RUIZ, C.; COLELL, A.; MORALES, A.; MARÖ, M.; MIRANDA, M.; ARDITE, E. Oxidative stress: role of mitochondria and protection by glutathione. *Biofactors*, v. 8, p. 7-11, 1998.

FETROW, C.; AVILA, J.R. *Manual de medicina alternativa para o profissional*. Guanabara Koogan, p. 743, 2000.

FORMAN, H.J.; THOMAS, M.J. Oxidant production and bactericidal activity of phagocytes. *Annu. Rev. Physiol.*, v. 48, p. 669-680, 1986.

FRANÇA, V.C.; NARAIN, N. Caracterização química dos frutos de três matrizes de acerola (*Malpighia emarginata* D.C.). *Ciência e tecnologia de alimentos*, Campinas, v. 23, n. 2, p. 157-160, 2003.

FREITAS, C.A.S.; MAIA, G.A.; COSTA, J.M.C.; FIGUEIREDO, R.W.; SOUSA, P.H.M. Acerola: Produção, Composição, aspectos nutricionais e produtos. *R. Bras. Agrociência*, v. 12, p. 395-400, 2006.

FREITAS, J. M.; LIBA, A.; MENEGHINI, R.; VALENTINE, J. S.; GRALLA, E. B. Yeast lacking Cu-Zn superoxide dismutase show altered iron homeostasis. *The Journal Biological Chemistry*, v. 275, p. 11645-11649, 2000.

FRIDOVICH, I. Oxygen toxicity: a radical explanation. *J. Exp. Biol.*, v. 201, p. 1203-1209, 1998.

FUGE, E.K.; WERNER, M. Stationary phase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. In: HOHMANN, S and MAYER, W. H. (Eds) *Yeast Stress Response*, Heidelberg: Springer-Verlag, p. 53-74, 1997.

GANCEDO, J.M. Yeast carbon catabolite repression. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, v. 62, p. 334-361, 1998.

GARCÍA-RUIZ, C.; COLELL, A.; MORALES, A.; KAPLOWITZ, N.; FERNANDEZ-CHECA, J.C. Role of oxidative stress generated from the mitochondrial electron transport chain and mitochondrial glutathione status in loss of mitochondrial function and activation of transcription factor nuclear factor-kappa B: studies with isolated mitochondria and rat hepatocytes. *Mol. Pharmacol.*, v. 48, p. 825-834, 1995.

GOMES, J.E.; PERECIN, D.; MARTINS, A.B.G. et al. Análise de agrupamentos e de componentes principais no processo seletivo em genótipos de aceroleira (*Malpighia emarginata* D.C.). *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, v. 22, n. 1, p. 36-39, 2000.

GONZAGA NETTO, L.; MATHUZ, B.; SANTOS, C.A.F. Caracterização agrônômica de clones de aceroleira (*Malpighia spp*) na região do submédio São Francisco. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, v. 21, n. 2, p. 110-115, 1999.

GONZAGA NETTO, L.; SOARES, J.M. *Acerola para exportação: aspectos técnicos da produção*. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1994.

GRALLA, E.B., KOSMAN, D.J. Molecular genetics of superoxide dismutases in yeasts and fungi. *Adv. Genet.*, v. 30, p. 251-319, 1991.

GRALLA, E.B.; VALENTINE, J.S. Null mutants of *Saccharomyces cerevisiae* Cu, Zn superoxide dismutase: characterization and spontaneous mutation rates. *J. Bacteriol.*, v. 173, p. 5918-5920, 1991.

GRANT, C.M.; MACIVER, F.H., DAWES, I.W. Glutathione synthetase is dispensable for growth under both normal and oxidative stress conditions in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* due to an accumulation of the dipeptide gamma-glutamylcysteine. *Mol. Biol. Cell.*, v. 8, p. 1699-1707, 1997.

GRANT, C. M., PERRONE, G., DAWES, I. W. Glutathione and catalase provide overlapping defenses for protection against hydrogen Peroxide in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophysical Research*, v. 253, p. 893-898, 1998.

GUIDOT, D.M., McCORD, J.M., WRIGHT, R.M., REPINE, J.E. Absence of electron transport (Rho^o state) restores growth of a manganese-superoxide dismutase-deficient *Saccharomyces cerevisiae* in hyperoxia. *J. Biol. Chem.*, v. 268, p. 26699-26703, 1993.

HALLIWELL, B. *Trends Biochem. Sci.*, v. 24, p. 255, 1999

HALLIWELL, B.; *Mutat. Res.*, v. 475, p. 29, 2001.

HALLIWELL, B.; AESCHBACH, R.; LÖLINGER, J.; ARUOMA, O.I. The characterization on antioxidants. *Food and Chemical Toxicology*, Oxford, v. 33, n. 7, p. 601-617, 1995.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. C.; *Free Radicals in Biology and Medicine*, 5 ed., Clarendon Press: Oxford, 1999.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.C. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3.ed. Oxford, New York, 2000.

HARBORNE, J.B. *Phytochemical Methods: a guide to modern techniques of plant analysis*. 2 ed. London: Chapman and Hall, 1984.

HAREL, S.; KANNER, J. Lipid antioxidizing factors in orange peel. *International Fruit Juice Union Proceedings*, v. 18, p. 185, 1984.

HARTIG, A.; RUIS, H. Nucleotide sequence of the *Saccharomyces cerevisiae* CTT1 gene and deduced amino-acid sequence of yeast catalase T. *Eur. J. Biochem.*, v. 160, p. 487-490, 1986.

HAYATSU, H.; ARIMOTO, S.; NEGISHI, T. Dietary inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. *Mutation Research*, v.202, p.429-446, 1988.

HENRIQUES, J.A.P.; DAFRÉ, A.L.; PICADA, J.N.; MARIS, A.F.; SALVADOR, M. Espécies reativas de oxigênio e avaliação de antioxidantes em sistemas biológicos. In: SERAFINI L.A., DE BARROS N.M., AZEVEDO J.L. (Eds.), *Biotechnologia na agricultura e na indústria*. Guaíba: Agropecuária, p. 227-256, 2001.

HERRMANN, K. Flavonols and flavones in food plants: A review. *J. Food Technol.*, v. 11, p. 433-448, 1976.

HOLETZ, F.B.; PESSONO, G.L; SANCHES, N.R.; CORTEZ, D.A.G.; NAKAMURA, C.V.; DIAS FILHO, B.P.; Screening of some plants used in the brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 97, n. 7, p. 1027-1031, 2002.

HUANG, M.R.; RIO, A.G.; NICOLAS, A.; KOLODNER, R.D. A genome wide screen in *Saccharomyces cerevisiae* for genes that suppress the accumulation of mutations. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, v. 20, p. 11529-11534, 2003.

HUSAIN, S.R.; CILLARD, J.; CILLARD, P. Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids. *Phytochemistry*, v. 26, p. 2489-2491, 1987.

IKNER, A.; SHIOZAKI, K. Yeast signaling pathways in the oxidative stress response. *Mutat. Res.*, v. 569, p. 13-27, 2005.

INOUE, Y.; SUGIYAMA, K.; IZAWA, S.; KIMURA, A. Molecular identification of glutathione synthetase (GSH2) gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim .Biophys .Acta*, v. 1395, p. 315-320, 1998.

IZAWA, S.; INOUE, Y.; KIMURA, A. Oxidative stress response in yeast: effect of glutathione on adaptation to hydrogen peroxide stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.*, v. 368, p. 73-76, 1995.

IZAWA, S.; INOUE, Y.; KIMURA, A. Importance of catalase in the adaptive response to hydrogen peroxide: analysis of acatalasaemic *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J.*, v. 320, p. 61-67, 1996.

KADA, T.; MORITA, K.; INOUE, T. Anti-mutagenic action of vegetable factor(s) on the mutagenic principle of tryptophan pyrolysate. *Mutation Research*, Amsterdam, v. 53, p. 351-353, 1978.

KAGAN, V. E.; SERBINOVA, E. A.; PACKER, L.; *Arch. Biochem. Biophys.* 1990, 280, 147.

KANNER, J.; FRANKEL, E.; GRANIT, R.; GERMAN, B.; KINSELLA, J. E. Natural antioxidants in grapes and wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 42, p. 64-69, 1994.

KEFFORD, J.F.; CHANDLER, B.V. *The Chemical Constituents of Citrus Fruits.* Academic Press, New York, 1970.

KELLY, F.J. Use of antioxidants in the prevention and treatment of disease. *J. Int. Clin. Chem.*, Shelton, v. 10, p. 21-3, 1998.

KISTLER, M., SUMMER, K. H.; ECKARDT, F. Isolation of glutathione-deficient mutants of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutation Res.*, v. 173, p. 117-120, 1986.

KOBAYASHI, S.; MIYABE, S.; IZAWA, S.; INOUE, Y.; KIMURA, A. Correlation of the OSR/ZRCI gene product and the intracellular glutathione levels in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Biochem.*, v. 23, p. 3-6, 1996.

KUGE, S.; JONES, N. YAP1-dependent activation of TRX2 is essential for the response of *Saccharomyces cerevisiae* to oxidative stress by hydroperoxides. *EMBO J.*, v. 13, p. 655-664, 1994.

KUSAMRAN, W.R.; TEPSWAN, A.; KUPRADINUN, P. Antimutagenic and anticarcinogenic potentials of some Thai Vegetables. *Mut. Res.*, v. 402, p. 247-258, 1998.

LARSON, R.A. The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry*, v. 27, p. 969-978, 1988.

LAVAL, J.; JURADO, J.; SAPARBAEV, M.; SIDORKINA, O. Antimutagenic role of base-excision repair enzymes upon free radical-induced DNA damage. *Mutation Research*, v. 402, p. 94-102, 1998.

LEE, J.H.; CHOI, I.Y.; KIL, I.S.; KIM, S.Y.; YANG, E.S.; PARK, J-W. Protective role of superoxide dismutases against ionizing radiation in yeast, *Biochim. Biophys. Acta.*, v. 1526, p. 191-198, 2001.

LEE, J., GODON, C., LAGNIEL, G., SPECTOR, D., GARIN, J., LABARRE, J., TOLEDANO mb. Yap1 and Skn7 control two specialized oxidative stress response regulons in yeast. *J. Biol. Chem.*, v. 274, p. 16040-16046, 1999.

LIMA, V.L.A.G.; MÉLO, E.A.; LIMA, L.S. et al. Análise conjunta das características físico-químicas de acerola (*Malpighia emarginata* D.C.) do banco ativo de germoplasma em Pernambuco. In: Congresso Brasileiro de Fruticultura, Belém, 2002a.

LIMA, V.L.A.G.; MÉLO, E.A.; LIMA, L.S. et al. Polpa congelada de acerola: efeito da temperatura sobre os teores de antocianinas e flavonóis totais. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, v. 24, n. 3, p. 669-670, 2002b.

LIU, W.; CHANG, L.Y.; GEUZE, H.J.; STROUS, G.J.; CRAPO, J.D.; SLOT, J.W. Distribution of CuZn superoxide dismutase in rat liver. *Free Radical Biology Medicine*, v. 23, p. 408-413, 1993.

LISOWSKY, T. A high copy number of yeast gamma-glutamylcysteine synthetase suppresses a nuclear mutation affecting mitochondrial translation. *Curr. Genet.*, v. 23, p. 408-413, 1993.

LIU, Z.Q.; MA, L.P.; LIU, Z.L. Making vitamin C lipophilic enhances its perspective effects against free radical induced peroxidation of low density lipoprotein. *Chem. Phys. Lipids.*, v. 95, p. 49-57, 1992.

LOLIGER, J. *The use of antioxidants of foods*. In: AUROMA, O.I.; HALLIWELL, B. London: Elsevier, p. 171, 1991.

LOMBELLO, R.A.; MARTINS, E.R.F. Malpigiaceae: correlations between habitat, fruit type and basic chromosome number. *Acta bot. Bras.*, São Paulo, v. 17, n. 2, 2003.

LONGO, V.D.; GRALLA, E.B.; VALENTINE, J.S. Superoxide dismutase activity is essential for stationary phase survival in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, v. 271, p. 12275-12280, 1996.

LONGO, V.D.; LIU, L.L.; VALENTINE, J.S.; GRALLA, E.B. Mitochondrial superoxide decreases yeast survival in stationary phase. *Arch. Biochem. Biophys.*, v. 365, p. 131- 142, 1999.

LOPES, F.C.M. *Avaliação da atividade imunológica in vitro de Alchornea spp quanto à produção de peróxido de hidrogênio, óxido nítrico e fator de necrose tumoral- α por macrófagos murinos*. Dissertação de Mestrado, FCF-Uneso, SP- Brasil, 2004.

LOPES, M.I.L.; SAFFI, J.; ECHEVERRIGARAY, S.; HENRIQUES, J.A.P.; SALVADOR, M. Mutagenic and antioxidant activities of *Croton lechleri* sap in biological systems. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 95, p. 437-445, 2004.

LOUREIRO, A. P. M.; DI MASCIO, P.; MEDEIROS, M. H. G.; *Quim. Nova*, v.25, 2002.

LUPULESCU, A. The role of vitamins A, β -carotene, E and C in cancer cell biology. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, Bern, v. 63, n. 3, p. 3-14, 1993.

MACGREGOR, J.T.; CASCIANO, D.; MÜLLER, L. Strategies and testing methods for identifying mutagenic risks. *Mutation Research*, v. 455, p. 3-20, 2000.

MACHLIN, L.J.; BENDICH, A. Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *FASEB J*, v. 1, p. 441-445, 1987.

MARCHLER, G.; SCHÜLLER, C.; ADAM, G.; RUIS, H. A *Saccharomyces cerevisiae* UAS element controlled by protein kinase A activates transcription in response to a variety of stress conditions. *EMBO J.*, v. 12, p. 1997-2003, 1993.

MARIS, A.F.; ASSUMPCÃO, A.L.K.; BONATTO, D.; BRENDEL, M.; HENRIQUES, J.A.P. Diauxic shift-induced stress resistance against hydroperoxides in *Saccharomyces cerevisiae* is not an adaptive stress response and does not depend on functional mitochondria. *Curr. Genet.*, v. 39, p. 137-149, 2001.

MARIS, A.F.; KERN, A.L.; PICADA, J.N.; BOCCARDI, F.; BRENDEL, M.; HENRIQUES, J.A.P. Glutathione, but not transcription factor Yap1, required for carbon source-dependent resistance to oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet.*, v. 37, p. 175-182, 2000.

MARQUES, M.F. *Molécula de Óxido Nítrico e sua inter-relação com fator de necrose tumoral- α na resposta imunológica induzida por *Styrax comporum* Pohl*. Dissertação de Mestrado, FCF-Unesp, SP- Brasil, 2002.

MAXWELL, S. R. J. Prospects for use of antioxidant therapies. *Drugs*, v. 49, n. 3, p. 345-361, 1995.

MEEHAN, W. J.; SPENCER, J. E. P.; RANNELS, D. E.; WELCH, D. E.; KNOBE, E. T.; OSTRANDER, G. K. Hydrogen peroxide induces oxidative DNA damage in rat type II pulmonary epithelial cells. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, v. 33, p. 273-278, 1999.

MEISTER, A. Glutathione metabolism. *Meth Enzymolog.*, v. 251, p. 3-7, 1995.

MESQUITA, P.C.; VIGOA, Y.G. La acerola. Fruta marginada de America con alto

contenido de ácido ascórbico. *Alimentaria*, Madrid, v. 37, n. 309, p. 113-126, 2000.

MIDDLETON, E. JR.; KANDASWAMI, C. The impact of plant flavonoids on mammalian biology: implications for immunity, inflammation and cancer. In: HARBORNE, J. B. (Ed.), *The Flavonoids*. Chapman & Hall, London, p. 619-652, 1994.

MONTOURO, P.; SANNOMIYA, M.; PIACENTE, S.; PIZZA, C.; BRITO, A.R.M.S.; VILEGAS, W. Application of liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry to the analysis of polyphenolic compounds from an infusion of *Byrsonima crassa* Niedenzu. *Rap. Commun. in Mass Spectr.*, v. 19, n.16, p. 2244-2250, 2005.

MOURA, C.F.H.; ALVES, R.E.; PAIVA, J.R. et al. Avaliação de clones de aceroleira (*Malpighia emarginata* D.C.) na região da Chapada do Apodi-CE. In: Congresso Brasileiro de Fruticultura, Belém, 2002.

MOURA, D. J.; RICHTER, M.; BOEIRA, J. M.; HENRIQUES, J A. P.; SAFFI, J. Antioxidant properties of b-carboline alkaloids are related to their antimutagenic and antigenotoxic activities. *Mutagenesis*, p. 1–10, 2007.

MORGAN, B.A.; BANKS, G.R.; TOONE, W.M.; RAITT, D.; KUGE, S.; JOHNSTON, L.H. The Skn7 response regulator controls gene expression in the oxidative stress response of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO Journal*, v. 16, p. 1035-1044, 1997.

NAKAMURA, Y.K.; SUGANUMA, E.; KUIJAMA, N.; SATO, K.; OHTSUKI, K. Comparative bio-antimutagenicity of common vegetables and traditional vegetables in Kyoto. *Biosci, Biotech. and Biochem.*, v. 62, p.1161-65, 1998.

NAMIKI, M. Antioxidants/antimutagens in foods. *Critical Review in Food Science and Nutrition.*, v. 29, p. 273-291, 1990.

NOGUEIRA, M.E.I; PASSONI, M. H.; BISO, F.I.; LONGO, M.C.; CARDOSO, C.R.P.C.; dos SANTOS, L.C.; VARANDA, E.A.; Investigation of genotoxic and antigenotoxic activities of *Melampodium divaricatum* in *Salmonella typhimurium*. *Toxicol. in vitro*, 2005.

NUNES, E.S.; D'ARAÚJO COUTO, F.A.; BRZ, V.B. *Seleção de genótipos de aceroleira (Malpighia spp)*. In: Congresso Brasileiro de Fruticultura, Belém, 2002.

OGA, Z. *Fundamentos de toxicologia*. 2.ed., Editora Atheneu, São Paulo, p. 39-44, 2003.

OWEN, R.W.; SPIEGELHALDER B.; BARTSCH H. Generation of reactive oxygen species by the faecal matrix. *GUT*, v.46. p. 225–232, 2000.

OWEN, R.W.; WIMONWATWATEE, T.; SPIEGELHALDER, B.; BARTSCH, H. A high performance liquid chromatography system for quantification of hydroxyl radical formation by determination of dihydroxy benzoic acids. *European Journal of Cancer Prevention*, v.5, p. 233–240, 1996.

PAIVA, J.R.; ALVES, R.E.; BARROS, L.M. Melhoramento genético da aceroleira (*Malpighia emarginata* D.C.) na Embrapa Agroindústria Tropical. In: *Recursos genéticos e melhoramento de plantas para o nordeste brasileiro*. Petrolina: Embrapa Semi-Árido/ Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1999. Disponível em: <<http://www.cpatsa.embrapa.br>> Acesso em: 21 março 2004.

PALOZZA, P.; LUBERTO, C.; CALVIELLO, G.; RICCI, P., BARTOLI, G. M. Antioxidant and prooxidant role of beta-carotene in murine normal and tumor thymocyte: Effects of oxygen partial pressure. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 22, p. 1065-1073, 1997.

PARK, J.I.; GRANT, C.M.; DAVIES, M.J.; DAWES, I.W. The cytoplasmic Cu, Zn superoxide dismutase of *Saccharomyces cerevisiae* is required for resistance to freeze-thaw stress. Generation of free radicals during freezing and thawing. *J. Biol. Chem.*, v. 273, p. 22921-22928, 1998.

PATTERSON, M.S.; MADSEN, S.J.; WILSON, B.C. Experimental tests of the feasibility of singlet oxygen luminescence monitoring in vivo during photodynamic therapy. *J. Photochem. Photobiol. B*, v. 5, p. 69-84, 1990.

PAULO, M.G.; MARQUES, H.M.C.; MORAIS, J.A.G.; ALMEIDA, A.J. An isocratic LC method for the simultaneous determination of vitamins A, C, E and β -carotene. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 21, p. 399-406, 1999.

PAWLAK, W.; KEDZIORA, J.; ZOLYNSKI, K.; KEDZIORA-KOMATOWSKA, K.; BLASZAZYK, J.; WITKOWSKI, P.; ZICLENIEWSKI, J. Effect of long term bed rest in man on enzymatic antioxidative defence and lipid peroxidation in erythrocytes. *J. Gravit. Physiol.*, p. 163-4, 1998.

PERES, A. *Efeitos dos alcalóides harmina, harmalina, harmol, harmalol, harmano sobre a resposta proliferativa in vitro de linfócitos periféricos humanos estimulados por fitoemaglutina*. Dissertação de Mestrado, curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Bioquímica, UFRGS, Porto Alegre, 1999.

PICADA, J.N.; MARIS, A.F.; CKLESS, K.; SALVADOR, M.; KHROMOV-BORISOV, N. N.; HENRIQUES, J.A.P. Differential mutagenic, antimutagenic and cytotoxic responses induced by apomorphine and its oxidation product, 8-oxo-apomorphine-semiquinone, in bacteria and yeast. *Mutation Research*, v. 539, p. 29-41, 2000.

PORCU, O.M.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. *Carotenóides de acerola: efeito de estágio de maturação e remoção de película*. In: Simpósio Latino Americano de Ciências de Alimentos – Desenvolvimento Científico e Tecnológico e a Inovação na Indústria de Alimentos. São Paulo: Unicamp, 2003

PRATT, D.E.; BIRAC, P.M. Source of antioxidant activity in soybeans. *Journal of Food Science*, v. 44, p. 1720-1722, 1979.

PRATT, D.E.; HUDSON, B.J.F. In: HUDSON, B.J.F. (Ed.). *Food antioxidants*, London: Elsevier, p. 171, 1990.

PRINGLE, J.R.; HARTWELL, L.H. The *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. In: Strathern, J.N.; Jones, E.W.; Broach, J.R. eds. *The molecular biology of the yeast Saccharomyces cerevisiae, life cycle and inheritance*. Cold Spring Hargbor, Nova York, p. 97-142, 1982.

REVERS, L.F.; CARDONO, J.; BONATTO, D.; GREY, M.; FELDMANN H.; BRENDDEL, M.; HENRIQUES, J.A.P. Thermoconditional modulation of the pleiotropic sensitivity phenotype by the *Saccharomyces cerevisiae* PRP19 mutant allele pso4-1. *Nucleic Acids Research*, v. 30, n. 22, p. 4993-5003, 2002.

RICE-EVANS, C.A. Plant polyphenols: free radical scavengers or chain-breaking antioxidants? *Biochemical Society Symposium*, v. 61, p. 103-116, 1995.

RICE-EVANS, C. A. Flavonoid antioxidants. *Curr. Med. Chem.*, v. 8, p. 797-807, 2001.

RICE-EVANS, C.A.; MILLER, N.J.; PAGANGA, G. Structure–antioxidant activity relationship of flavonoids and phenolic acids. *Free radic. Biol. Med.*, v. 20, p. 933-956, 1996.

RICE-EVANS, C.A.; MILLER, N.J.; PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci.*, v. 2, p. 152-159, 1997.

RICHARDSON, G.A.; EL-RAFEY, M.S.; LONG, M.L. Flavones and flavone derivatives as antioxidants. *Journal of Dairy Science*, v. 30, p. 143-397, 1974.

RIOS, J.L.; MAÑEZ, S.; PAYA, M.; ALCARAZ, M.J. Antioxidant activity of flavonoids from *Sideritis javalambrensis*. *Phytochemistry*, v. 31, n. 6, p. 1947-1950, 1992.

ROSA, R.M.; MELECCHI, M.I.S.; HALMENSCHLAGER, R.C.; ABAD, F.C.; SIMONI, C.R.; CARAMÃO, E.B.; HENRIQUES, J.A.P.; SAFFI, J.; RAMOS, A.L.L.P. Antioxidant and antimutagenic properties of *Hibiscus tiliaceus* L. methanolic extract. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 54, p. 7324-7330, 2006.

ROSA, R. M.; PICADA, J. N.; SAFFI, J.; HENRIQUES, J. A. P. Cytotoxic, genotoxic, and mutagenic effects of diphenyl diselenide in Chinese hamster lung fibroblasts. *Mutation Research*, 2007.

ROSA, R.M.; SULZBACHER, K.; PICADA, J.N.; ROESLER, R.; SAFFI, J.; BRENDEL, M.; HENRIQUES, J.A.P. Genotoxicity of diphenyl diselenide in bacteria and yeast. *Mutation Research*, v. 563, p. 107-115, 2004.

ROSS, D.; MOLEDEUS, P. *Antioxidant defense systems and oxidative stress*. 1 ed., Vigo-Pelfrey. Membrane lipid oxidation. Boca Raton, CRC Press p.151-170, 1991.

SAITO, S.T.; GOSMANN, G.; SAFFI, J.; PRESSER, M.; RICHTER, M.F.; BERGOLD, A.M. Characterization of the Constituents and Antioxidant Activity Brazilian Green Tea (*Camellia sinensis* var. *assamica* IAC-259 Cultivar) Extracts. *J. Agric. Food. Chem.*, 2007

SALVADOR, M.; HENRIQUES, J. A. P. *Radicaís livres e a resposta celular ao estresse oxidativo*. Canoas, RS: Ed. ULBRA, 2004.

SANNOMIYA, M.; FIGUEIREDO, M.E.; LIMA, C.A.H.; BRITO, A.R.M.S.; ROLIN, L.F.; VILEGAS, W.; TAMASHIRO, J. *Quercetina-3-O- α -L-arabinopiranosídeo das folhas de *Byrsonima intermédia**. Resumo apresentado à Sociedade Brasileira de Botânica, 2004.

SCHMITT, A.P.; MCENTEE, K. Msn2p, a zinc finger DNA-binding protein, is the transcriptional activator of the multistress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 93, p. 5777-5782, 1996.

SCHNELL, N.; KREMS, B.; ENTIAN, K.D. The *PARI (YAPI/SQN3)* gene of *Saccharomyces cerevisiae*, a *c-jun* homologue, is involved in oxygen metabolism. *Current Genetics*, v. 21, p. 269-273, 1992.

SEN, C. K.; PACKER L. Antioxidant and redox regulation of gene transcription. *FASEB Journal*, v. 10, p. 709-720, 1996.

SHEABAR, F.Z.; NEEMAN, I. Separation and concentration of natural antioxidants from the rape of olives. *Journal of American Oil Chemical Society*, v. 65, p. 990-991, 1988.

SIES, H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Expl Physiol.*, v. 82, p. 291-295, 1997.

SIMÃO, S. Cereja das Antilhas. In: SIMÃO, S. (Ed.) *Manual de Fruticultura*. São Paulo: Agronomia Ceres, p. 477-485, 1971.

SIZER, F.S.; WHITNEY, E.N. *Nutrition: concepts and controversies*. 9 ed., Belmont (CA): Brooks Cole, 2003.

SLEKAR, K.H.; KOSMANN, D.J.; CULOTTA, V.C. The yeast copper/zinc superoxide dismutase and the pentose phosphate pathway play overlapping roles in oxidative stress protection, *J. Biol. Chem.*, v. 271, p. 28831-28836, 1996.

SMITH, D.A.; BANKS, S.W. *Formation and biological properties of isoflavonoid phytoalexins, in Plant Flavonoids in Biology and Medicine: Biochemical, Pharmacological, and Structure-Activity Relationships* (Cody V, Middleton E and Harborne JB eds) Alan R. Liss, Inc., New York, p. 113-124, 1986.

SOARES, D.G.; ANDREAZZA, A.C.; SALVADOR, M. Sequestering ability of butylated hydroxytoluene, propyl gallate, resveratrol, and vitamins C and E against ABTS, DPPH, and hydroxyl free radicals in chemical and biological systems. *Journal of Agricultura Food Chemistry*, v. 51, n. 4, p. 1077-1080, 2003.

SPEVAK, W.; FESSL, F.; RYTKA, J.; TRACZYK, A.; SKONECZNY, M.; RUIS H. Isolation of the catalase T structural gene of *Saccharomyces cerevisiae* by functional complementation. *Mol. Cell Biol.*, v. 3, p. 1545-1551, 1983.

SRINIVASAN, C.; LIBA, A.; IMLAY, J.A.; VALENTINE J.S.; GRALLA, E.B. Yeast lacking superoxide dismutase(s) show elevated levels of "free iron" as measured by whole cell electron paramagnetic resonance. *J. Biol. Chem.*, v. 275, p. 29187-29192, 2000.

STORZ, G.; CHRISTMAN, M.F.; SIES, H.; AMES, B.N. Spontaneous mutagenesis and oxidative damage to DNA in *Salmonella typhimurium*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, v. 84, p. 8917-8921, 1987.

SUGIHARA, N.; ARAKAWA, T.; OHNISHI, M.; FURUNO, K. Anti- and pro-oxidative effects of flavonoids on metal-induced lipid hydroperoxide-dependent lipid peroxidation in cultured hepatocytes loaded with alpha-linolenic acid. *Free Radic. Biol. Med.*, v. 27, p. 1313-1323, 1999.

SUMMERS, C.B.; FELTON, G.W. Prooxidant effects of phenolic acids on the generalist herbivore *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae): potential mode of action for phenolic compounds in plant anti-herbivore chemistry. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, v. 24, p. 943-953, 1994.

TERZIYSKA, A.; WALTSCHEWA, L.; VENKOV, P. A new sensitive test based on yeast cells for studying environmental pollution. *Environmental Pollution*, v. 109, p. 43-52, 2000.

USDA (National Nutrient Database for Standard). Release 16, July 2003. Disponível em: <http://www.nal.usda.gov/fnic/cgi-bin/nut_search.pl?acerola>. Acesso em: 20 janeiro 2004.

VENDRAMINI, A.L.; TRUGO, L.C. Chemical composition of acerola fruit (*Malpighia glabra* L.) at three stages of maturity. *Food Chemistry*, London, v. 71, n. 2, p. 195-198, 2000.

VERSCHAEVE, L.; KESTENS, V.; TAYLOR, J.L.S.; ELGORASHI, E.E.; MAES, A.; PUVVELDE, L.V.; KEMPE, N.D.; STADEN, J.V. Investigation of the antimutagenic effects of selected South African medicinal plant extracts. *Toxicol. in Vitro*, v. 18, p. 29-35, 2004.

VIZOSO, A.P.; LÓPEZ, A.G.; RUIZ, A. R.; PILOTO, J.; Estudio toxicogénico de un extracto fluido de *Ocimum basilicum* L. (*albanaca blanca*). *Rev. Cub. Plant. Med.*, v. 5, n. 3, p. 78-83, 2002.

VON BORSTEL, R.C.; DRAKE, J.W.; LOEB, L.A. Foreword. *Mutation Research*, Amsterdam, v. 350, p. 1-3, 1996.

VOORRIPS, L. E.; GOLDBOEHM, R.A.; BRANTS, H.A.; VAN POPPEL, G.A.; STURMANS, F.; HERMUS, R.J.; VAN DEN BRANDT, P.A. A prospective cohort study on antioxidant and folate intake and male lung cancer risk. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, Philadelphia, v. 9, p. 357-65, 2000.

WATERS, M.D.; STACK, H.F.; JACKSON, M.A. Genetics toxicology data in the evaluation of potential human environmental carcinogens. *Mutation Research*, v. 437, p. 21-49, 1999.

WATERS, M.D.; STACK, H.F.; JACKSON, M.A.; BROCKMAN, H.E.; DE FLORA, S. Activity profiles of antimutagens: *in vitro* and *in vivo* data. *Mutation Research*, Amsterdam, v. 350, p. 109-129, 1996.

WEMMIE, J.A.; SZCYPKA, M.S.; THIELE, D.J.; MOYE-ROWLEY, W.S. Cadmium tolerance mediated by the yeast AP-1 protein requires the presence of an ATP-binding cassette transporter-encoding gene, YCF1. *The Journal Biological Chemistry*, v. 269, p. 32592-32597, 1994.

WU, A.L.; MOYE-ROWLEY, W.S. *GSH1*, which encodes γ -glutamylcysteine synthetase, is a target gene for Yap-1, transcription regulation. *Molecular Cell Biology*, v. 14, p. 5832-5839, 1994.

YAMADA, Y.; KIKUZAKI, H.; NAKATANI, N. Identification of antimicrobial gingerols from ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). *Journal of Antibacterial and Antifungal Agents*, v. 20, p. 309-311, 1982.

YAMAGUCHI, T.; TAKAMURA, H.; MATOBA, T; TERAOKA, J. HPLC method for evaluation of the free radical-scavenging activity of foods by using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. *Biosci Biotechnol Biochem.*, v. 62, n. 6, p.1201-1204, 1998.

YAMANAKA, N.; ODA, O.; NAGAO, S. Prooxidant activity of caffeic acid, dietary non-flavonoid phenolic acid, on Cu²⁺-induced low density lipoprotein oxidation. *FEBS Lett.*, v. 405, p. 186-190, 1997.

YEN, G.C.; CHEN, H.Y.; PENG, H.H.; Evaluation of the cytotoxicity, mutagenicity and antimutagenicity of emergency edible plants. *Food and Chemical Toxicol.*, vol. 39, p. 1045-1053, 2001.

YOKOYAMA, T.; DATE, C.; KOKUBO, Y.; YOSHIKE, N.; MATSUMURO, Y.; TANAKA, H. Serum vitamin C concentration was inversely associated with subsequent 20-year incidence of stroke in a Japanese rural community. *Stroke*, Dallas, v. 31, p. 2287-2294, 2000.

YUNES, R.A.; PEDROSA, R.C.; CECHINEL FILHO, V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade de desenvolvimento da indústria de fitoterápicos no Brasil. *Quim. Nova*, v. 24, n. 1, p. 147-152, 2001.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)