


 UFAL	<p><b>Universidade Federal de Alagoas</b> Instituto de Química e Biotecnologia <b><i>Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia</i></b> <i>PPGQB</i></p>	 IQB
---	--	--

CRISTHIANE MARIA BAZÍLIO DE OMENA

**ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTICOLINESTERASE DOS EXTRATOS  
ETANÓLICOS DOS FRUTOS: SIRIGUELA *Spondia purpurea* Linnaeus; UMBU  
*Spondia tuberosa* Arruda; JENIPAPO *Genipa americana* Linnaeus E  
MANGABA *Hancornia speciosa* Gomes**

Orientador: Prof. Dr. Antônio Euzébio Goulart Sant'Ana

Maceió - AL  
Maio de 2012

 UFAL	<p style="text-align: center;"><b>Universidade Federal de Alagoas</b> Instituto de Química e Biotecnologia <b>Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia</b> PPGQB</p>	 IQB
---	--	--

CRISTHIANE MARIA BAZÍLIO DE OMENA

**ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTICOLINESTERASE DOS EXTRATOS  
ETANÓLICOS DOS FRUTOS: SIRIGUELA *Spondia purpurea* Linnaeus; UMBU  
*Spondia tuberosa* Arruda; JENIPAPO *Genipa americana* Linnaeus E  
MANGABA *Hancornia speciosa* Gomes**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas tendo como objetivo a obtenção do título de Doutora em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Euzébio Goulart Sant'Ana

Maceió - AL  
Maio de 2012

**Catálogo na fonte**  
**Universidade Federal de Alagoas**  
**Biblioteca Central**  
**Divisão de Tratamento Técnico**

**Bibliotecária Responsável: Fabiana Camargo dos Santos**

- O55a Omena, Cristhiane Maria Bazílio de.  
Atividade antioxidante e anticolinesterase dos extratos etanólicos dos frutos : siguela *Spondia purpurea* Linnaeus; umbu *Spondia tuberosa* Arruda; jenipapo *Genipa americana* Linnaeus e mangaba *Harconia speciosa* Gomes / Cristhiane Maria Bazílio de Omena. – 2012.  
195 f. : il. tabs., grafs.
- Orientador: Antônio Euzébio Goulart Sant’Ana.  
Tese (Doutorado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Maceió, 2012.
- Bibliografia: f. 95-110.
1. Frutas - Extratos. 2. Frutas – Análise fitoquímica. 3. Antioxidantes. 4. Fenóis. 5. Acetilcolinesterase. 6. Ácidos orgânicos I. Título.

CDU: 543.64



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS  
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E  
BIOTECNOLOGIA

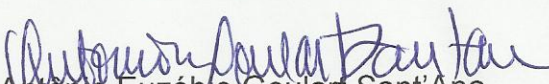


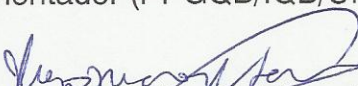
BR 104 Km14, Campus A. C. Simões  
Cidade Universitária, Tabuleiro dos Martins  
57072-970, Maceió-AL, Brasil  
Fone: (82) 3214-1384, Fax: (82) 3214-1384  
email: ppgqb.ufal@gmail.com

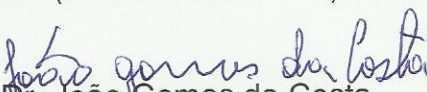
FOLHA DE APROVAÇÃO

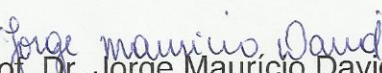
Membros da Comissão Julgadora da Tese de Doutorado de **Cristhiane Maria Bazílio de Omena**, intitulada: **Atividade Antioxidante e Anticolinesterase dos Extratos Etanólicos dos Frutos: Siriguela *Spondia purpurea* Linnaeus; Umbu *Spondia tuberosa* Arruda; Jenipapo *Genipa americana* Linnaeus e Mangaba *Hancornia speciosa* Gomes**, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas em 28 de maio de 2012, às 14h00min, na Sala do Renorbio.

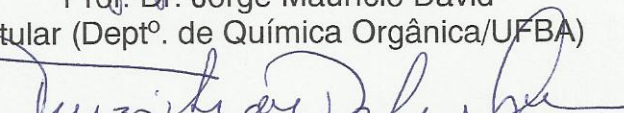
COMISSÃO JULGADORA

  
Prof. Dr. Antonio Euzébio Goulart Sant'Ana  
Orientador (PPGQB/IQB/UFAL)

  
Prof. Dr. Hugo Juárez Vieira Pereira  
Titular (PPGQB/IQB/UFAL)

  
Prof. Dr. João Gomes da Costa  
Titular (PPGQB/UFAL/EMBRAPA)

  
Prof. Dr. Jorge Mauricio David  
Titular (Deptº. de Química Orgânica/UFBA)

  
Prof. Dr. Terezinha da Rocha Ataíde  
Titular (FANUT/UFAL)

“Que teu alimento seja teu remédio; e que teu remédio seja teu alimento”.

Hipócrates.

“Eu pedi Força...

e Deus me deu dificuldades para me fazer forte.

Eu pedi Sabedoria...

e Deus me deu problemas para resolver.

Eu pedi Prosperidade...

e Deus me deu cérebro e músculo para trabalhar.

Eu pedi Coragem...

e Deus me deu perigo para superar.

Eu pedi Amor...

e Deus me deu pessoas com problemas para  
ajudar.

Eu pedi Favores... E Deus me deu oportunidades.

Eu não recebi nada do que pedi...

**Mas eu recebi tudo de que precisava.”**

*Autor desconhecido*

*Dedico a minha família, ao meu marido  
e aos meus amigos pelo apoio e carinho  
durante essa jornada.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus por todas as oportunidades e os ensinamentos concedidos;

Aos meus pais Amaro José Castro de Omena e Givônia Bazílio de Omena, e também aos meus irmãos pelo incentivo, paciência e apoio em todas as horas;

Ao meu marido, Paulo de Mello Messias Junior por compreender as minhas ausências, torcer por meu sucesso e por seguir sempre ao meu lado nessa jornada;

À Universidade Federal de Alagoas, ao Instituto de Química e Biotecnologia e ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia pela oportunidade de meu aperfeiçoamento e crescimento profissional e pessoal;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro obtido através da concessão da bolsa de estudo;

Ao meu orientador Prof<sup>o</sup>. Dr. Antônio Euzébio Goulart Sant'Ana, por toda paciência, compreensão, atenção dedicada e amizade construída durante essa etapa;

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marília Oliveira Fonseca Goulart e à Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Iara Barros Valentim pelo acolhimento, incentivo, paciência, amizade, por acreditar e investir no meu potencial;

Aos membros da banca de qualificação por contribuir na construção desta tese;

Aos membros da banca de defesa, por aceitar o convite e por contribuir na construção desta tese;

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia que fizeram parte dessa jornada, pela paciência e carinho que tiveram por mim durante todo esse processo de crescimento;

Em especial aos Professores das disciplinas cursadas pela contribuição a minha formação profissional;

Aos funcionários da Secretária do Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia pela simpatia, paciência, tolerância e sempre disposição em resolver qualquer problema;

Ao Prof<sup>o</sup> Dr. Etelvino José Henriques Bechara e à Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Maria Teresa Salles Trevisan pela atenção e acolhimento em seus laboratórios e disponibilidade em ajudar nas análises solicitadas;

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Luiza Rabêlo, professora do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Alagoas, e à sua aluna Prof<sup>a</sup> MSc Glaucivane, Professora de Nutrição da Universidade Federal de Alagoas, pela disponibilidade na realização das análises antioxidantes (enzimáticas);

À Professora Dr<sup>a</sup> Roberta Costa Santos Ferreira do Laboratório de Farmacologia Antiviral e Celular do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde - ICBS/UFAL pela disponibilidade na realização das análises de citotoxicidade;

À Pós-doutoranda Alexandra C. H. F. Sawaya do departamento de Biologia Vegetal do Instituto de Biologia da UNICAMP pela ajuda na etapa de identificação dos compostos fenólicos e ácidos orgânicos;

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Emília da Silva Menezes por estar sempre torcendo por mim, pelo apoio no campo profissional e pessoal, pelos conselhos e ajuda em todas as horas;

Às amigas que construí durante essa etapa da vida, e que elas sempre estejam nas seguintes: Cenira Monteiro de Carvalho, Maria Beatriz Farias de



Oliveira, Josiane de Souza Luna, Jaqueline Maria da Silva, Aldy dos Santos, Edjane Vieira Pires, João Gomes, Maria Emília da Silva Menezes, entre outros;

À Danielle de Lima Costa pela ajuda no ensaio quantitativo de inibição da enzima acetilcolinesterase;

O João Gomes Costa pela amizade e ajuda na realização das análises estatísticas;

Aos colegas de sala de aula e aos do laboratório os quais nunca esquecerei;

Às amigadas formadas durante esses últimos anos na Universidade de Pernambuco, da qual hoje faço parte do corpo docente e onde contribuo na formação de profissionais de Nutrição responsáveis e comprometidos com a Nutrição;

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Marianne Louise Mendes Marinho (coordenadora do curso de Nutrição da Universidade de Pernambuco) e ao corpo docente do colegiado de Nutrição da Universidade de Pernambuco por compreender as minhas ausências cujo objetivo era finalizar as obrigações do doutorado;

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Marianne Louise Mendes Marinho pelo apoio em todas as horas com frases de estímulos e apoio;

E a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a execução deste trabalho, deixo o **MEU MUITO OBRIGADA**.

## RESUMO

A partir das cascas, polpas e sementes do jenipapo (*Genipa americana* Linnaeus), umbu (*Spondia tuberosa* Arruda), siriguela (*Spondia purpurea* Linnaeus) e mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes) foram preparados extratos etanólicos, com exceção da mangaba onde o extrato foi preparado utilizando casca e polpa. Os extratos foram submetidos à investigação da capacidade antioxidante através dos métodos de determinação do conteúdo de ácido ascórbico e fenóis totais, sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil e 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico), capacidade antioxidante de redução do ferro e cobre, lipoperoxidação utilizando um sistema de membranas biomimético e mensuração enzimática da catalase e superóxido dismutase. Também foi avaliada a atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase, o efeito citotóxico em células epiteliais da córnea de ovelhas, além da realização de ensaios fitoquímicos e a identificação de compostos fenólicos e ácidos orgânicos presentes nos extratos. Os maiores teores de fenóis totais foram obtidos nos extratos das cascas e sementes e no referente ao ácido ascórbico na semente da siriguela, apresentando melhor atividade antioxidante os extratos das sementes e cascas da siriguela e do umbu. Porém, no ensaio de peroxidação lipídica, o extrato etanólico da polpa de jenipapo demonstrou ser um antioxidante promissor. Os extratos etanólicos da polpa do jenipapo e da semente da siriguela apresentaram uma zona de inibição da enzima acetilcolinesterase semelhantes ao controle positivo, carbacol. Na investigação dos compostos fenólicos e ácidos orgânicos por UPLC-MS verificou-se a presença nos extratos de quercetina (48,38 a 3,88  $\mu\text{g.g}^{-1}$ ), ácido quínico (43,28 a 41,88  $\mu\text{g.g}^{-1}$ ), ácido cítrico (3,78 a 0,43  $\mu\text{g.g}^{-1}$ ) em vários extratos. E ácido clorogênico, na semente da siriguela (356,93  $\mu\text{g.g}^{-1}$ ). Os resultados obtidos desses extratos sugerem novas formas de utilização desses alimentos como potenciais suplementos antioxidantes na indústria alimentícia, farmacêutica e cosmética.

**Palavras-chave:** Antioxidantes. Fenóis. Ácidos orgânicos. Acetilcolinesterase. Frutas.

## ABSTRACT

Ethanol extracts of “jenipapo” (*Genipa americana* Linnaeus), “umbu” (*Spondia tuberosa* Arruda), “siriguela” (*Spondia purpurea* Linnaeus) and “mangaba” (*Hancornia speciosa* Gomes) were prepared from separate pulp, seeds and peel; except mangaba which are used pulp and peel. The investigation of antioxidant capacity of the ethanol extracts were carried out by the methods of determining the content of ascorbic acid and total phenolics; scavenging 2, 2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl and 2, 2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical, antioxidant capacity of reduction of iron and copper and lipid peroxidation using a biomimetic membrane system, and measurement enzymatic of catalase and superoxide dismutase. It was also analyzed the acetylcholinesterase inhibitory activity, cytotoxic effect on corneal epithelial cells of sheep, as well as phytochemicals assays and identification of phenolic compounds and organic acids present in the extracts by UPLC - MS. The highest values of total phenolic content were obtained with peel and seed extracts and to ascorbic acid in the seed of siriguela, showing better antioxidant activities of seeds and peel extracts of siriguela and umbu. Lipid peroxidation assays indicated that genipap pulp is a promising antioxidant. Genipap pulp and siriguela seed ethanol extracts presented an acetylcholinesterase inhibition zone similar to that of the positive control, carbachol. The investigation of phenols and organic acid contents revealed the presence of quercetin (48,38 to 3,88  $\mu\text{g.g}^{-1}$ ), quinic acid (43,28 to 41,88  $\mu\text{g.g}^{-1}$ ) and citric acid (3,78 to 0,43  $\mu\text{g.g}^{-1}$ ) in several extracts and chlorogenic acid with the highest amount found in siriguela seeds (356,93  $\mu\text{g.g}^{-1}$ ). These data suggest new uses for these foods as potential antioxidant supplements for the food, pharmaceutical and cosmetic industries.

**Keywords:** Antioxidant. Phenols. Organics acids. Acetylcholinesterase. Fruit.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Frutos de Jenipapo ( <i>Genipa americana</i> L.).	24
Figura 2 - Frutos de Siriguela ( <i>Spondias purpurea</i> L.).	26
Figura 3 - Frutos de Umbu ( <i>Spondias tuberosa</i> Arr. Cam.).	27
Figura 4 - Frutos de Mangaba ( <i>Hancornia speciosa</i> Gomes).	28
Figura 5 - Reação genérica entre o radical livre DPPH e um antioxidante.	35
Figura 6 - Estabilização do radical ABTS <sup>•+</sup> por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio.	36
Figura 7 - Redução do complexo TPTZ com Fe <sup>3+</sup> .	37
Figura 8 - Reação CUPRAC e cromóforo: Cátion quelato bis (neocuproína) cobre (I).	38
Figura 9 - Sonda fluorescente C11-Bodipy ancorada a um lipossoma.	39
Figura 10 - Formação e liberação da acetilcolina na fenda sináptica e sua degradação.	42
Figura 11 - Hidrólise da acetilcolina pela enzima acetilcolinesterase.	43
Figura 12 - Procedimentos do ensaio de citotoxicidade dos extratos etanólicos dos frutos: (a) adesão celular e (b) avaliação do teste através da exclusão do Azul de Tripán.	50
Figura 13 - Reagente de Folin-Ciocalteu (a) e amostra no final do experimento (b).	52
Figura 14 - Curva de calibração do Ácido Gálico (AG).	53
Figura 15 - Curva de calibração do reagente Trolox <sup>®</sup> (100 - 1.600 mmol.L <sup>-1</sup> ).	55
Figura 16 - Curva de calibração do reagente Trolox <sup>®</sup> (5 - 1.000 µmol.L <sup>-1</sup> ).	56
Figura 17 - Mistura das soluções de CuCl <sub>2</sub> , neocuproína e tampão NH <sub>4</sub> Ac (a), Mistura anterior + amostra e água (b) e mistura após 1 hora de repouso (c).	57
Figura 18 - Curva de calibração do reagente Trolox <sup>®</sup> (5 - 600 µmol.L <sup>-1</sup> ).	58
Figura 19 - Sistema de Extrusão de Membrana.	59
Figura 20 - Ilustração da fluorescência observada no experimento.	60
Figura 21 - Curva de calibração do formaldeído (5 - 150 µM).	61
Figura 22 - Demonstrativo do ensaio da atividade da enzima catalase após leitura.	61

Figura 23 - Demonstrativo do ensaio da atividade da enzima superóxido dismutase.	62
Figura 24 - Demonstrativo da formação dos halos brancos na CCD.	63
Figura 25 - Demonstrativo da placa do Ensaio Quantitativo da Inibição da Acetilcolinesterase.	66
Figura 26 - Padrões utilizados na determinação dos compostos fenólicos e ácidos orgânicos.	68
Figura 27 - Análise do desempenho das partes dos frutos entre os métodos de avaliação da capacidade antioxidante.	79
Figura 28 - Proteção à peroxidação lipídica provenientes dos extratos (0,5 mg mL <sup>-1</sup> ) de diferentes partes dos frutos (a) Jenipapo, (b) Siriguela, (c) Umbu e (d) Mangaba.	80
Figura 29 - Atividade da enzima catalase frente aos extratos (25, 50 e 100 µL/mL) de diferentes partes dos frutos (a) jenipapo, (b) siriguela, (c) umbu e (d) mangaba.	83
Figura 30 - Atividade da enzima superóxido dismutase frente aos extratos (25, 50 e 100 µL.mL <sup>-1</sup> ) de diferentes partes dos frutos (a) jenipapo, (b) siriguela, (c) umbu e (d) mangaba.	86
Figura 31 - Compostos identificados através das análises por UPLC/MS	91
Figura 32 - Cromatograma do padrão de Ácido quínico.	114
Figura 33 - Cromatograma do padrão de Ácido <i>p</i> -cumárico.	115
Figura 34 - Cromatograma do padrão de Ácido Cítrico.	116
Figura 35 - Cromatograma do padrão de Ácido Caféico.	117
Figura 36 - Cromatograma do padrão de Catequina.	118
Figura 37 - Cromatograma do padrão de Epicatequina.	119
Figura 38 - Cromatograma do padrão de Quercetina.	120
Figura 39 - Cromatograma do padrão de Ácido Clorogênico.	121
Figura 40 - Cromatograma da amostra do extrato etanólicos da casca do Jenipapo.	122
Figura 41 - Cromatograma da amostra do extrato etanólicos da semente do Jenipapo.	122
Figura 42 - Cromatograma da amostra do extrato etanólicos da polpa do Jenipapo.	122
Figura 43 - Cromatograma da amostra do extrato etanólicos da casca do	

Umbu.	123
Figura 44 - Cromatograma da amostra do extrato etanólicos da semente do Umbu.	123
Figura 45 - Cromatograma da amostra do extrato etanólicos da polpa do Umbu.	123
Figura 46 - Cromatograma da amostra do extrato etanólicos da casca + polpa da Mangaba.	124
Figura 47 - Cromatograma da amostra do extrato etanólicos da casca da Siriguela.	124
Figura 48 - Cromatograma da amostra do extrato etanólicos da semente da Siriguela.	124
Figura 49 - Cromatograma da amostra do extrato etanólicos da polpa da Siriguela.	125
Figura 50 - Espectro de massa do Ácido quínico, método de ionização: eletrospray, modo negativo.	126
Figura 51 - Espectro de massa do Ácido Cítrico, método de ionização: eletrospray, modo negativo.	126
Figura 52 - Espectro de massa do Quercetina, método de ionização: eletrospray, modo negativo.	127
Figura 53 - Espectro de massa do Ácido Clorogênico, método de ionização: eletrospray, modo negativo.	127

## **LISTA DE FLUXOGRAMA**

Fluxograma 1 - Separação do extrato bruto etanólico da polpa do jenipapo.	112
Fluxograma 2 - Separação do extrato bruto etanólico da semente de Siriguela.	113

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Polifenóis mais estudados e sua fonte alimentar.	31
Tabela 2 - Peso seco inicial (g) e rendimento da extração (%) das partes dos frutos.	46
Tabela 3 - Indicativos da presença de compostos nas amostras	47
Tabela 4 - Indicativos da presença de leucoantocianidinas, catequinas e flavonas	48
Tabela 5 - Prospecção fitoquímica dos extratos dos frutos.	71
Tabela 6 - Efeitos dos extratos etanólicos das frutas sobre a viabilidade celular de células epiteliais da córnea de ovelhas.	72
Tabela 7 - Conteúdo de ácido ascórbico e métodos de avaliação da capacidade antioxidante dos extratos etanólicos das frutas	74
Tabela 8 - Correlações de Spearman entre as variáveis CFT e os métodos de avaliação da capacidade antioxidante DPPH, ABTS, FRAP e CUPRAC.	78
Tabela 9 - Atividade de inibição da enzima acetilcolinesterase dos extratos etanólicos das partes dos frutos.	88



## LISTA DE ABREVIATURAS

- A.A - Ácido Ascórbico;
- AAPH - 2,2'- azinobis (2-amidinopropano) dihidrocloridrato;
- ABTS - Radical 2,2'- azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico);
- AcCoA - Acetil-coenzima A;
- Ach - Acetilcolina;
- AChE - Enzima acetilcolinesterase;
- AG - Ácido gálico;
- ASB - Albumina sérica bovina;
- ATCI - Iodeto de acetiltiocolina;
- C<sub>11</sub>-BODIPY<sup>581/591</sup> - Análogo do ácido graxo fluorescente 4,4' difluoro-5-(4-fenil-1,3-butadienil)-4-bora-3a, 4a-diaza-S-indaceno-3- ácido undecanóico;
- CAT - Catalase;
- CCD - Cromatografia em camada delgada;
- CFT - Conteúdo de fenóis totais.
- CoA - Coenzima A;
- CSR - Capacidade sequestradora de radicais;
- CUPRAC - *Copper reducing antioxidant capacity* (capacidade antioxidante de redução do cobre);
- DA - Doença de *Alzheimer*;
- DCFH - 2,6-diclorofenol-indofenol;
- DPPH - Radical 2,2-difenil-1-picrilidrazila;
- DTNB - 5,5'-ditiobis (2- ácido nitrobenzóico);
- EAG - Equivalente ao ácido gálico;
- EDTA - Ácido tetraacético etilenodiamina;
- EROs - Espécies reativas de oxigênio;
- ET - Equivalentes ao trolox;
- FAO - *Food and Agriculture Organization* (Organização para a Alimentação e Agricultura);
- FC - *Folin-Ciocalteu*;
- FRAP- *Ferric reducing antioxidant power* (poder antioxidante de redução do ferro);

GSH - Glutathiona;

GSH-PX - Glutathiona peroxidase;

MEM - Meio essencial mínimo de *Eagle*;

ORAC - *Oxygen radical absorbance capacity* (capacidade de absorção do radical oxigênio);

PBS - *Phosphate buffered saline* (tampão fosfato-salino);

PMSF - *Phenylmethylsulfonyl fluoride* (fluoreto de fenilmetilsulfonil);

SFB - Soro fetal bovino;

SOD Cu-Zn - Superóxido Dismutase Cobre - Zinco;

SOD - Superóxido dismutase;

TEAC - *Trolox equivalent antioxidant capacities* (capacidade antioxidante equivalente ao trolox);

TPTZ - 2,4,6-tripiridil-s-triazina;

XO - Xantina oxidase.

# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	20
<b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....	22
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	23
<b>4 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	24
<b>4.1 Frutos</b> .....	24
4.1.1 Jenipapo.....	24
4.1.2 Siriguela.....	25
4.1.3 Umbu.....	26
4.1.4 Mangaba.....	27
<b>4.2 Antioxidantes</b> .....	29
4.2.1 Compostos fenólicos.....	30
4.2.2 Teste do sequestro do radical DPPH • ( <i>Radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil</i> ).....	34
4.2.3 Teste do sequestro do radical ABTS [ <i>radical 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)</i> ].....	35
4.2.4 Poder antioxidante de redução do ferro.....	36
4.2.5 Capacidade antioxidante de redução do cobre.....	37
4.2.6 Lipoperoxidação (mensuração através da sonda C <sub>11</sub> -BODIPY <sup>581/591</sup> ).....	38
4.2.7 Enzima catalase.....	39
4.2.8 Enzima superóxido dismutase.....	40
<b>4.3 Acetilcolina</b> .....	41
<b>5 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	45
<b>5.1 Frutos</b> .....	45
<b>5.2 Preparação dos extratos etanólicos</b> .....	45
<b>5.3 Prospecção fitoquímica</b> .....	46
5.3.1 Teste para taninos e fenóis.....	47
5.3.2 Teste para antocianinas, antocianidinas e flavonóides.....	47
5.3.3 Teste para leucoantocianidinas, catequinas e flavonas.....	48
5.3.4 Teste para flavonóis, flavanonas, flavanonóis e xantonas.....	48
5.3.5 Teste para esteróides e triterpenóides.....	48

5.3.6	Teste para saponinas.....	49
5.3.7	Teste para antraquinonas e cumarinas.....	49
<b>5.4</b>	<b>Ensaio de citotoxicidade.....</b>	<b>49</b>
<b>5.5</b>	<b>Determinação de ácido ascórbico.....</b>	<b>51</b>
<b>5.6</b>	<b>Determinação do conteúdo de fenóis totais.....</b>	<b>51</b>
<b>5.7</b>	<b>Métodos de avaliação da capacidade antioxidantes dos extratos.....</b>	<b>53</b>
5.7.1	Atividade sequestradora de radicais livres utilizando o radical $\alpha$ , $\alpha$ -difenil- $\beta$ -picrilhidrazila (DPPH <sup>*</sup> ).....	53
5.7.2	Ensaio ABTS <sup>*+</sup> [radical 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)].....	54
5.7.3	Poder antioxidante de redução do ferro.....	55
5.7.4	Capacidade antioxidante de redução do cobre.....	57
5.7.5	Capacidade antioxidante de um sistema de membranas biomimético.....	58
5.7.6	Mensuração da atividade da enzima catalase.....	60
5.7.7	Mensuração da atividade da enzima superóxido dismutase.....	62
<b>5.8</b>	<b>Detecção da inibição da enzima acetilcolinesterase.....</b>	<b>63</b>
5.8.1	Ensaio qualitativo.....	63
5.8.2	Ensaio quantitativo.....	64
<b>5.9</b>	<b>Fracionamento dos extratos promissores.....</b>	<b>67</b>
<b>5.10</b>	<b>Identificação de compostos fenólicos e ácidos orgânicos.....</b>	<b>67</b>
<b>5.11</b>	<b>Análise estatística.....</b>	<b>69</b>
<b>6.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>70</b>
<b>6.1</b>	<b>Prospecção fitoquímica.....</b>	<b>70</b>
<b>6.2</b>	<b>Ensaio de citotoxicidade.....</b>	<b>72</b>
<b>6.3</b>	<b>Conteúdos de ácido ascórbico (AA), fenóis totais (CFT) e métodos de avaliação de capacidade antioxidante.....</b>	<b>73</b>
<b>6.4</b>	<b>Capacidade antioxidante de um sistema de membranas biomimético (Método sintético).....</b>	<b>79</b>
<b>6.5</b>	<b>Mensuração da atividade da enzima catalase.....</b>	<b>82</b>
<b>6.6</b>	<b>Mensuração da atividade da enzima superóxido dismutase.....</b>	<b>85</b>
<b>6.7</b>	<b>Inibição da enzima acetilcolinesterase (AChe).....</b>	<b>88</b>

6.7.1 Ensaio Qualitativo.....	88
6.7.2 Ensaio Quantitativo em microplaca.....	89
<b>6.8 Análise dos extratos por UPLC/MS.....</b>	<b>91</b>
<b>7. CONCLUSÕES.....</b>	<b>94</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>95</b>
<b>9. APÊNDICES.....</b>	<b>111</b>
9.1 Apêndice 1 - Fluxograma da separação do extrato bruto etanólico da polpa do Jenipapo.....	112
9.2 Apêndice 2 - Fluxograma da separação do extrato bruto etanólico da semente da siriguela.....	113
9.3 Apêndice 3 - Cromatogramas dos padrões utilizados no UPLC – MS.....	114
9.4 Apêndice 4 - Cromatogramas das amostras analisadas por UPLC – MS.....	122
9.5 Apêndice 5 - Espectros de Massa dos compostos encontrados nas amostras analisadas por UPLC – MS.....	126
9.6 Apêndice 6 - Artigo submetido à Revista Food Research International.....	128
9.7 Apêndice 7 - Artigo para submissão à Revista Nutrition.....	168

## 1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, o consumo de alimentos tem adquirido uma importância baseada não só em nutrientes que são essenciais para a vida, mas, também, em outros compostos bioativos presentes nos alimentos que promovem à saúde (Torres-Rodríguez et al., 2011). Compostos fitoquímicos encontrados em vários vegetais, frutas e plantas medicinais têm recebido atenção crescente por seu papel potencial na prevenção e tratamento de doenças (Youdim & Joseph, 2001; Oliveira et al., 2009).

Alguns benefícios à saúde destes fitoquímicos podem ser atribuídos a sua capacidade antioxidante. Os antioxidantes protegem os sistemas biológicos contra os efeitos prejudiciais de processos ou reações que pode causar oxidação excessiva (Arnao et al., 2001). Eles também podem agir como sinalizadores celulares, levando a mudanças na expressão gênica, o que resulta na ativação de enzimas que eliminam as espécies reativas de oxigênio (EROs) (Nzaramba et al., 2009; Finley et al., 2011).

Ocorrendo o desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio e com os sistemas de defesa interrompidos, o estresse oxidativo promovido causa muitas doenças tais como a doença de Alzheimer (DA), envelhecimento acelerado, arteriosclerose, outras doenças cardiovasculares, câncer, diabetes entre outras (Ingkaninan et al., 2003; Valko et al., 2007).

A doença de Alzheimer é uma enfermidade neurológica degenerativa progressiva caracterizada por perturbações da memória e do comportamento. O mecanismo bioquímico exato da patogênese da doença de Alzheimer ainda é desconhecido, mas muita atenção é dada a formação das placas amiloides e ao papel da perda massiva do neurotransmissor acetilcolina e a possível implicação de estresse oxidativo em seu desenvolvimento (Ricciarelli et al., 2007).

Uma das abordagens mais promissoras para o tratamento desta doença é o aumento do nível de acetilcolina no cérebro usando inibidores da enzima acetilcolinesterase (AChE) (Ingkaninan et al., 2003). E, como uma terapia alternativa, a utilização de antioxidantes com o objetivo de minimizar o desequilíbrio oxidativo (Barnham et al., 2004; Zaini et al., 2011).

Os legumes e as frutas têm sido associados com a saúde, devido à presença de antioxidantes como os polifenóis, carotenóides, tocoferóis, tocotrienóis, ácido

ascórbico e tióis diversos (Oliveira et al., 2009). Os antioxidantes podem proteger os sistemas biológicos contra os efeitos prejudiciais de processos ou reações que podem causar oxidação excessiva (Arnao et al., 2001).

Clerici & Carvalho-Silva (2011), referenciando dados publicados pela FAO (*Food and Agriculture Organization*) em 2010, relatam que a produção mundial das principais frutas tropicais deve ter atingido 62 milhões de toneladas em 2010, um aumento de 15 milhões de toneladas em comparação com o período de 1998 – 2000, sendo os países em desenvolvimento os maiores representantes, com 98% da produção global.

No Nordeste do Brasil, existem muitas áreas onde o clima e as características do solo são especialmente favoráveis para a produção de frutas tropicais. A produção de frutas e o processamento já representam importantes atividades econômicas não só devido à comercialização regional relevante, mas, também, devido ao aumento do mercado nacional e internacional (Tiburski et al., 2011). O aumento do consumo de frutas tropicais está crescendo devido ao reconhecimento das propriedades desses alimentos para a saúde (Contreras-Calderon et al., 2010).

O presente estudo visa identificar alimentos, dentre o grupo das frutas, que apresentem atividade antioxidante e também anticolinesterásica e, como consequência, gerar um aumento no consumo dos mesmos. Dessa forma, atribuindo novas funções além as relacionadas diretamente à nutrição humana.

## 2 JUSTIFICATIVA

As frutas têm sido, historicamente, um componente comum, além de necessário na alimentação humana. Portanto, estudos que trazem conhecimento para potencializar a exploração e a expansão de seu cultivo se revestem de um caráter importante. O Nordeste brasileiro destaca-se como um grande produtor de frutos tropicais nativos e cultivados, em virtude das condições climáticas prevalentes. A fruticultura, na região nordeste, constitui-se atividade econômica bastante promissora, devido ao sabor e aroma exótico de seus frutos e à sua enorme diversificação (Noronha et al., 2000).

As matérias-primas *in natura* disponíveis em frutas, vegetais em geral e condimentos contém numerosos fitoquímicos, dentre eles: compostos fenólicos, compostos nitrogenados, carotenóides, ácido ascórbico, tocoferóis, etc. (Degáspari et al., 2004). Muitos destes fitoquímicos apresentam significativa capacidade antioxidante e seu consumo está associado à menor incidência e baixa mortalidade por várias doenças como câncer, arteriosclerose e outras doenças cardiovasculares e diabetes, além de prevenir o envelhecimento acelerado.

A utilização de compostos antioxidantes de origem natural ou mesmo sintética é um dos procedimentos de defesa contra as espécies reativas. Portanto, podem ser empregados nas indústrias de alimentos, cosméticos, bebidas e também na medicina (Bianchi & Antunes, 1999).

Drogas provenientes de produtos naturais, especialmente de plantas, inclusive comestíveis, são eficazes no tratamento de várias doenças, como, por exemplo, a doença de Alzheimer. Esta é a importância de investir na exploração desses alimentos e contribuir para diversificar a sua utilização.

Vale salientar que existem poucos estudos (Rufino et al., 2009; Rufino et al., 2010) e, em alguns casos, inexistem dados sobre atividade antioxidante e atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase (AChE) atribuídas aos frutos jenipapo, siriguela, umbu e mangaba, analisados na presente tese.



### 3 OBJETIVOS

#### Objetivo Geral

Determinar a atividade antioxidante e anticolinesterase dos extratos etanólicos dos frutos: siriguela (*Spondias purpurea* Linnaeus); umbu (*Spondias tuberosa* Arruda); jenipapo (*Genipa americana* Linnaeus) e mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes).

#### Objetivos Específicos

- Realizar a prospecção fitoquímica dos extratos etanólicos das cascas, polpas e sementes dos quatro frutos analisados (jenipapo, siriguela, umbu e mangaba);
- Avaliar a citotoxicidade dos extratos etanólicos das cascas, polpas e sementes dos quatro frutos analisados;
- Quantificar o conteúdo de ácido ascórbico e de fenóis totais dos extratos etanólicos das cascas, polpas e sementes dos quatro frutos analisados;
- Determinar a capacidade antioxidante dos extratos etanólicos das cascas, polpas e sementes dos quatro frutos analisados, por diferentes métodos;
- Detectar a atividade de inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE) dos extratos etanólicos das cascas, polpas e sementes dos quatro frutos analisados;
- Identificar e quantificar compostos fenólicos e ácidos orgânicos presentes nos extratos etanólicos das cascas, polpas e sementes dos quatro frutos analisados.

## 4 REVISÃO DA LITERATURA

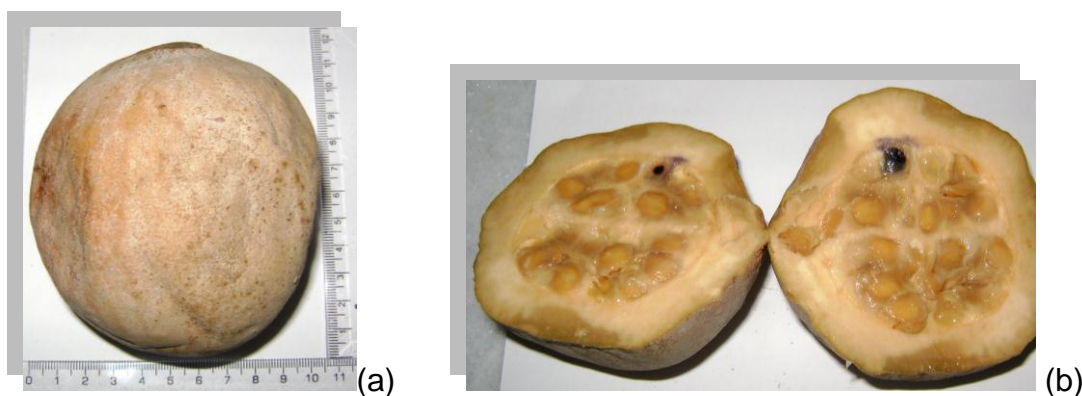
### 4.1 Frutos

#### 4.1.1 Jenipapo (*Genipa americana*)

*Genipa americana* L. é uma planta neotropical pertencente à família Rubiaceae, dispersa nas florestas neotropicais que se estendem do México até o norte da Argentina (Mielke et al., 2003). Seu fruto é usado como alimento e para o preparo de sucos e medicamentos. Possui polpa branca que muda a coloração de amarela a roxo-azulada e, finalmente, adquirindo a coloração preta por sua exposição ao ar (Ono et al., 2005; Ono et al., 2007).

O fruto é uma baga subglobosa de 8 - 10 cm de comprimento e 6 - 7 cm de diâmetro, de casca mole, parda ou pardacento-amarelada, membranosa, fina e enrugada (Figura 1a e 1b). A polpa se apresenta com a coloração parda, sucosa, doce e mole, com teor médio de lipídeos de 0,35%. Envolve numerosas sementes fibrosas, albuminadas, castanho-escuras, de 6 - 12 mm, compridas e achatadas, com teor de lipídeos de 10,90% (Figueiredo et al., 1991).

Figura 1 - Frutos de Jenipapo (*Genipa americana* L.).



Fonte: Autor desta tese, 2012.

Seus brotos crescem rapidamente e sua principal raiz penetra no solo para as fontes mais profundas da água. Além disso, ela mostra capacidades adaptativas a

condições adversas, como a erosão do solo, alagamento, baixo pH e baixa fertilidade (Barbosa et al., 2007). Existem relatos do uso popular da casca do caule no tratamento de torção, lesões, luxações e hematoma (Albuquerque et al., 2007).

#### 4.1.2 Siriguela (*Spondia purpurea*)

A *Spondia purpurea* L. (siriguela) da família Anacardiaceae, originária da América Central, é distribuída desde o México até o norte do Peru e Brasil, e é endêmica em regiões semiáridas (Texeira et al., 2007). A siriguela, também chamada seriguela, ameixa - da - espanha, cajá vermelho, ciruela, jocote, ciruela mexicana etc., é uma das espécies mais cultivadas do gênero *Spondia*, e espécie deste gênero que produz frutos de melhor qualidade (Figueiredo et al., 2006). O fruto é pequeno e avermelhado, possui polpa aromática de sabor agridoce (Augusto et al., 2000).

O gênero *Spondias* possui 18 espécies, seis dessas ocorrem no Nordeste do Brasil e são árvores frutíferas tropicais em domesticação e exploradas pelo seu valor comercial. Dentre as espécies pertencentes ao gênero *Spondia*, destacam-se umbu (*Spondia tuberosa* Arr. Cam.), siriguela (*Spondia purpurea* L.) e cajá (*Spondia mombin* L.) (Lima et al., 2002).

A planta adulta raramente excede 7 m de altura, os frutos são elipsóides de coloração amarela ou amarelo-avermelhada, medindo de 3 a 5 cm de comprimento e 3 cm de diâmetro (Figueiredo et al., 2006) (Figura 2). Apresenta, em média, 0,62% de acidez titulável (ácido cítrico), 21,25 °Brix, 6,70% de açúcares redutores, 1% de amido, pH 3,44 e 70,22% de rendimento médio de polpa, com índice de maturação de 34,32 (Muniz et al., 2002).

Figura 2 - Frutos de Siriguela (*Spondia purpurea* L.).



Fonte: Autor desta tese, 2012.

Devido a sua excelente qualidade organoléptica, a siriguela é muito apreciada no Nordeste brasileiro, refletido pelo contínuo aumento do consumo do fruto *in natura* ou processado na forma de diversos produtos, normalmente disponibilizados no mercado, o que tem proporcionado crescente interesse para seu cultivo comercial (Sacramento & Souza, 2000).

Sob o ponto de vista alimentar, trata-se de um fruto extremamente rico em carboidratos, cálcio, fósforo, ferro e vitaminas A, B e C, sendo utilizado para o preparo de sucos, sorvetes, geléias e compotas e também no preparo de bebidas fermentadas, vinhos e bebidas geladas (Figueiredo et al., 2006).

Segundo Albuquerque et al. (2007), sobre a espécie *Spondia purpurea* L. são relatadas por populares o uso da casca e folhas da árvore no tratamento de cólicas, diarreia e dor de cabeça.

#### 4.1.3 Umbu (*Spondia tuberosa*)

O umbuzeiro (*Spondia tuberosa* Arr. Cam.) - Anacardiaceae é uma frutífera adaptada a sobreviver e produzir sob condição de estresse hídrico. Apesar de sua distribuição ser dispersa, consagra-se como uma espécie frutífera de grande importância econômica, social e ecológica para o semiárido nordestino. A

comercialização dos frutos, colhidos de forma extrativista, representa uma fonte de renda importante para muitas famílias nordestinas (Neves et al., 2004).

Os frutos provenientes do umbuzeiro, conhecidos como umbu, imbu ou ambu, apresentam-se como drupas glabras ou levemente pilosas, arredondadas, com 2 a 4 cm de diâmetro, 10 a 20 g de massa e superfície lisa ou com 4 a 5 pequenas protuberâncias na porção distal (Figura 3). A casca é de cor amarelo-esverdeada e a polpa é branco esverdeada, mole, succulenta, de sabor agridoce agradável. Os frutos são constituídos, em média, por 22% de casca, 68% de polpa e 10% de caroço (Folegatti et al., 2003).

Figura 3 - Frutos de Umbu (*Spondia tuberosa* Arr. Cam.).



Fonte: Autor desta tese, 2012.

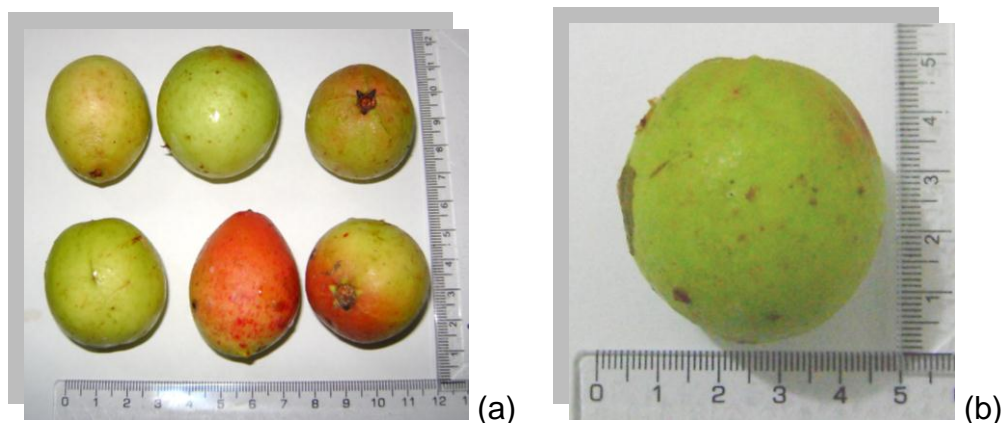
É fonte de vitaminas e minerais e possui um teor de taninos de 126, 27 mg.100 g<sup>-1</sup>. O teor de taninos e a presença de antioxidantes naturais atribuem ao fruto umbu mais uma função, além da nutricional (Narain et al., 1992).

#### 4.1.4 Mangaba (*Hancornia speciosa*)

A mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) é uma planta nativa do Brasil, pertencente à família Apocynaceae, encontra-se vegetando espontaneamente nas regiões Sudeste, Centro-Oeste, Norte e Nordeste. Os frutos dessa espécie são do

tipo baga, de tamanho, formato e cores variados, normalmente elipsoidais ou arredondados, amarelados ou esverdeados, com pigmentação vermelha ou sem pigmentação, polpa amarela adocicada, rica em vitaminas, ferro, fósforo, cálcio e proteínas. Suas sementes são achatadas e discóides, com coloração castanho-clara (Barros et al., 2006) (Figura 4a e 4b).

Figura 4 - Frutos de Mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes).



Fonte: Autor desta tese, 2012.

A mangaba é muito apreciada no Nordeste brasileiro, apresenta boa digestibilidade e valor nutritivo, com teor de proteína (1,3 a 3,0%) superior ao da maioria das frutíferas (Pinheiro et al., 2001).

A polpa é utilizada na fabricação de sorvetes, xaropes, vinhos, vinagres, sucos, compotas e doces, além do látex que produz borracha e da madeira utilizada na carpintaria, também existem relatos da utilização na medicina popular no tratamento de luxações, hipertensão, proteção contra distúrbios gástricos e tuberculose.

Apresenta, em média, 1,77% de acidez titulável, 16,72 °Brix, 12,98% de açúcares totais, pH 2,9 e rendimento de polpa de 87% (Muniz et al., 2002; Nogueira et al., 2003; Machado et al., 2004; Sampaio & Nogueira, 2006).

Devido ao uso dos frutos acima descritos, são importantes os estudos voltados a atribuir novas características e funcionalidades aos mesmos, como a avaliação da capacidade antioxidante e da atividade anticolinesterásica.

## 4.2 Antioxidantes

Os antioxidantes podem ser definidos como “qualquer substância que, quando presente em baixa concentração comparada à do substrato oxidável, regenera o substrato ou previne significativamente a oxidação do mesmo” (Halliwell & Gutteridge, 2010). A ingestão de antioxidantes tem sido sugerida para a proteção contra danos oxidativos e complicações inflamatórias (Puchau et al., 2010) resultantes da ação de espécies reativas.

A espécie reativa (radical livre) é capaz de existir independentemente e possui um elétron desemparelhado em um orbital. A presença de um elétron desemparelhado aumenta a reatividade da espécie, que possui avidez por outro elétron para tornar-se estável. Este elétron pode ser obtido pela abstração de um elétron de um co-reagente. Essa reação resulta na extinção do radical inicial pela redução e formação de um novo radical por oxidação do co-reagente (Benzie, 2003).

Existem vários sistemas intrínsecos capazes de capturar radicais livres, que envolvem reações enzimáticas e não enzimáticas. No que diz respeito às enzimáticas, tem-se a enzima superóxido dismutase cobre-zinco (SOD Cu-Zn), que converte radicais óxidos em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), glutathiona peroxidase (GSH-Px) e catalase (CAT), convertendo  $H_2O_2$  em uma molécula de água. As enzimas SOD Cu-Zn, GSH-Px e CAT oferecem o principal mecanismo antioxidante de defesa enzimática (Kharrazi et al., 2008).

O sistema de defesa antioxidante não enzimático inclui várias substâncias entre elas, o ácido ascórbico (vitamina C),  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E), glutathiona (GSH) e  $\beta$ -caroteno. O equilíbrio entre a atividade e os níveis intracelulares destes antioxidantes é essencial para a sobrevivência dos organismos e sua saúde (Kharrazi et al., 2008).

O estresse oxidativo é resultante do acúmulo de espécies altamente reativas ou da diminuição dos mecanismos de proteção contra danos biológicos provocados por essas espécies. Ocorre devido a um desequilíbrio entre o balanço pró-oxidante/antioxidante, em favor da situação pró-oxidante, promovendo danos. O dano oxidativo que as biomoléculas sofrem está relacionado com um grande número

de doenças crônicas, incluindo doenças cardiovasculares, câncer e doenças neurodegenerativas (Mendel & Youdim, 2004; Wang et al., 2011).

Espécies reativas de oxigênio (EROs) são entidades químicas que incluem o radical ânion superóxido ( $O_2^-$ ), radicais hidroxilas ( $OH^\cdot$ ), óxido nítrico (NO), peroxinitrito e também espécies não radicais, como  $H_2O_2$  e oxigênio singlete ( $^1O_2$ ). EROs em seres humanos podem derivar de fontes endógenas ou exógenas, por exemplo, o tabaco, certos poluentes, solventes orgânicos e/ou pesticidas que levam ao estresse oxidativo (Gulcin et al., 2003) e a própria degeneração celular.

O estresse oxidativo pode causar danos celulares e oxidar componentes celulares críticos, tais como lipídeos de membrana, proteínas e DNA, induzindo apoptose ou necrose (Esposito et al., 2002). O dano oxidativo a mitocôndrias, incluindo danos à membrana, tem sido correlacionado ao aparecimento das doenças neurodegenerativas (Fernandez-Checa et al., 2010), como a doença de Parkinson. Este dano oxidativo mediado pela membrana pode contribuir para a deleção e mutações no DNA mitocondrial que se acumulam com a idade. Danos no DNA têm sido relatados na doença de Alzheimer (Wiseman, 1996).

Diferentes metodologias têm sido empregadas para avaliar a capacidade antioxidante *in vitro* e os resultados obtidos dependem do método utilizado (Huang et al., 2005), incluindo a avaliação do conteúdo de fenóis totais, capacidade sequestrante de radicais peroxila e hidroxila, capacidade de redução de metais, capacidade sequestrante de radical orgânico e análise dos produtos da peroxidação lipídica (Rufino et al., 2010).

#### 4.2.1 Compostos Fenólicos

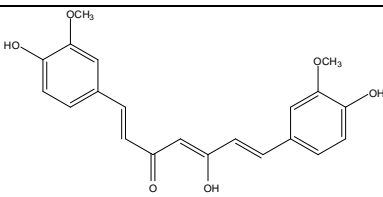
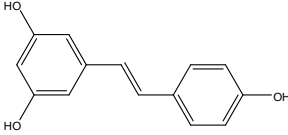
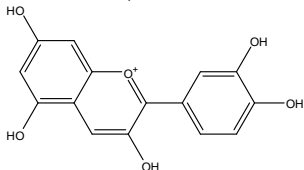
Os antioxidantes polifenólicos de fontes dietéticas são frequentemente um tema de interesse científico, devido a propriedades atribuídas aos mesmos na diminuição da incidência de certos cânceres, prevenção de doenças cardiovasculares, no tratamento de doenças neurodegenerativas, na prevenção de danos ao DNA e até mesmo podem ter propriedades antienvhecimento (Obrenovich et al., 2010).

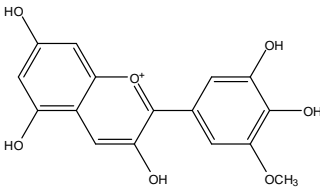
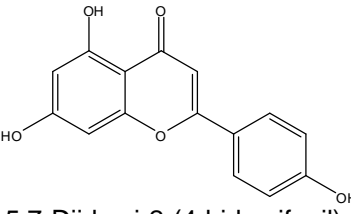
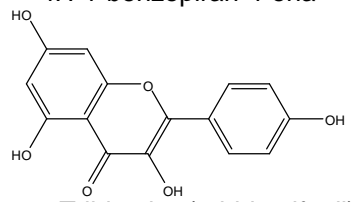
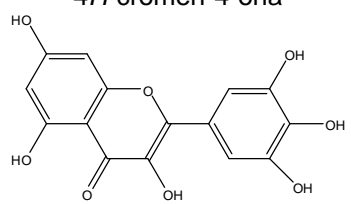
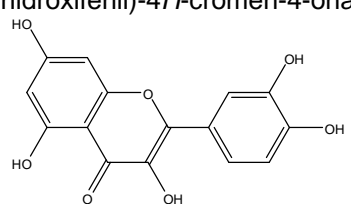
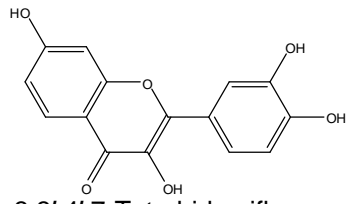
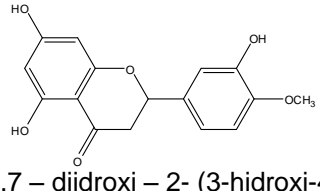


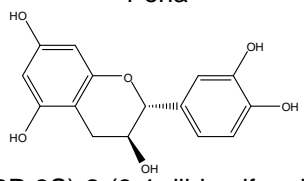
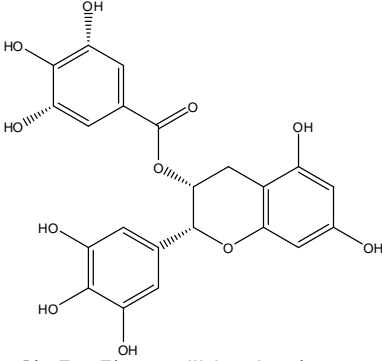
Os compostos fenólicos ou polifenóis ocorrem amplamente em plantas. Interesse em polifenóis como antioxidantes é centrado em um grupo denominado flavonóides que ocorrem em todos os alimentos de origem vegetal e são subdivididos em várias subclasses (flavonóis, flavonas, isoflavonas, flavononas, flavonóides, antocianinas, entre outros). Estão presentes na dieta do mediterrâneo (maior ingestão de frutas e verduras, com consumo de vinho tinto e azeite de oliva), sendo seu consumo associado a uma boa saúde (Angelis, 2001; Kaliora et al., 2006).

Os flavonóides pertencem a um grupo de substâncias naturais com várias estruturas fenólicas e podem ser encontrados em frutas, legumes, grãos, flores, chá e vinho (Middleton, 1998). Na Tabela 1 estão ilustrados alguns exemplos de compostos fenólicos presentes em alimentos.

Tabela 1 - Polifenóis mais estudados de fontes naturais.

Polifenóis			
Classe	Compostos	Estruturas	Fontes naturais
Não flavonóides	Curcumina	 <p>(1E,6E) -1,7- bis (4-hidroxi-3 metoxifenil) -1,6-heptadieno-3,5-diona</p>	Curcuma
	Resveratrol	 <p>(E)-5-(4-hidroxiestiril) benceno-1,3-diol</p>	Casca de uva, vinho tinto.
Antocianinas	Cianidina	 <p>2-(3,4-Diidroxifenil) cromenilium- 3,5,7-triol</p>	Bagas

	Petunidina		Morangos, vinho tinto e chá.
Flavonas	Apigenina		Casca da maçã
	Kaempferol		Brócolis, acerola, pitanga e cajú
	Miricetina		Cascas de frutas, pitanga e cajú
	Quercetina		Alface, azeitona, cebola, acerola, pitanga, caju, mamão, cajá e casca de manga
Flavonol	Fisetina		Frutas cítricas
Flavanonas	Hesperidina		Cascas de frutas cítricas

Catequinas	(+) Catequina	<p>metoxifenil)-2,3-dihidrocromen-4-ona</p>  <p>(2R,3S)-2-(3,4-diidroxifenol)-3,4-dihidro-2H-cromena-3,5,7-triol</p>	Vinho tinto
	(-)-Epigallocatequina-3-galato (EGCG)	 <p>[(2R,3R)-5,7-diidroxi-2-(3,4,5-trihidroxifenil)croman-3-il] 3,4,5-trihidroxibenzoato</p>	Chá verde

Fonte: Adaptado de Rossi et al., 2008.

A grande atenção dirigida aos polifenóis presentes nos alimentos para a proteção contra o envelhecimento do cérebro é devido à capacidade desses compostos de atravessarem a barreira hemato-encefálica, que controla rigidamente o fluxo de metabólitos e nutrientes, bem como de drogas (Andres-Lacueva et al., 2005).

Como exemplo temos a curcumina, um princípio ativo da cúrcuma, curcuminóide fenólico obtido de espécies da família Zingiberaceae, a família do gengibre, e distribuída por todo mundo tropical e regiões subtropicais, amplamente distribuído em países do Sudeste Asiático. É usado a como conservante de alimentos, fitoterápico e possui uma série de propriedades farmacoterapêuticas (Sharma et al., 2005; Begum et al., 2008; Paramapojn & Gritsanapan, 2009).

A cúrcuma tem uso intenso na culinária indiana, como uma especiaria, principalmente como ingrediente em variedades de pó de curry. Curcumina foi extraída do rizoma seco da *Curcuma longa* Linn. e uma série de estudos têm demonstrado suas propriedades antioxidantes e potencial neuroprotetor em vários

modelos experimentais de neurodegeneração (Ishrat et al., 2009; Khuwaja et al., 2011).

O resveratrol, um polifenol presente no vinho tinto, amendoim, feijão, soja e romãs, possui uma vasta gama de efeitos biológicos (Karuppagounder et al., 2009), como a ação neuroprotetora (Pallas et al., 2010), observada *in vitro* e *in vivo* em modelos de doença de Alzheimer. Também foram descritos benefícios no acidente vascular cerebral isquêmico, doença de Parkinson, doença de Huntington e epilepsia (Savaskan et al., 2003).

Pesquisa realizada por Karuppagounder et al. (2009) com resveratrol indica que o início da doença de Alzheimer pode ser atrasada ou atenuada com o uso de dietas com agentes quimiopreventivos que protejam contra a formação de placas  $\beta$  amiloides e o início do estresse oxidativo. Marambaud et al. (2005) também fazem referência ao uso do resveratrol no tratamento da doença de Alzheimer, com resultados positivos.

Estudo realizado por Shih et al. (2010) mostrou a capacidade da amora em proteger contra o envelhecimento e déficits cognitivos induzidos por dano oxidativo.

Flavonóides dietéticos e seus metabólitos podem apresentar efeitos neuroprotetores com relação às doenças neurodegenerativas e demência. Estudo realizado por Beking & Vieira (2010), avaliando a associação com o aparecimento da demência, sugere que o consumo de flavonóides na dieta, especialmente flavonóis, está associado a menores taxas de demência nos países europeus estudados.

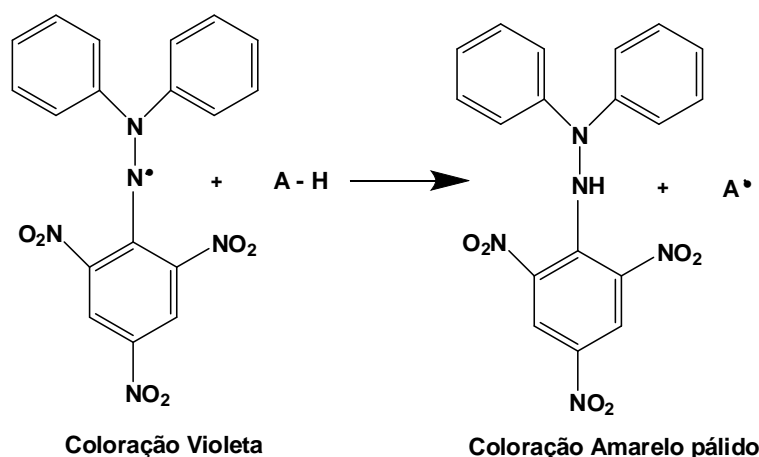
Com base na importância relatada anteriormente, foram desenvolvidos vários métodos para avaliar a atividade antioxidante desses compostos. Dentre eles tem-se:

#### 4.2.2 Teste do sequestro do radical DPPH • (*Radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil*)

A molécula de DPPH é caracterizada como um radical livre estável em virtude da deslocalização do elétron desemparelhado por toda a molécula. Esta deslocalização confere a esta molécula uma coloração violeta, caracterizada por uma banda de absorção em etanol em cerca de 515 - 520 nm. Este ensaio se baseia

na medida da capacidade antioxidante de uma determinada substância em sequestrar o radical DPPH (Figura 5), reduzindo-o a hidrazina com mudança de coloração de violeta a amarelo pálido (Alves et al., 2010).

Figura 5 - Reação genérica entre o radical livre DPPH e um antioxidante.



Fonte: Freitas et al., 2009.

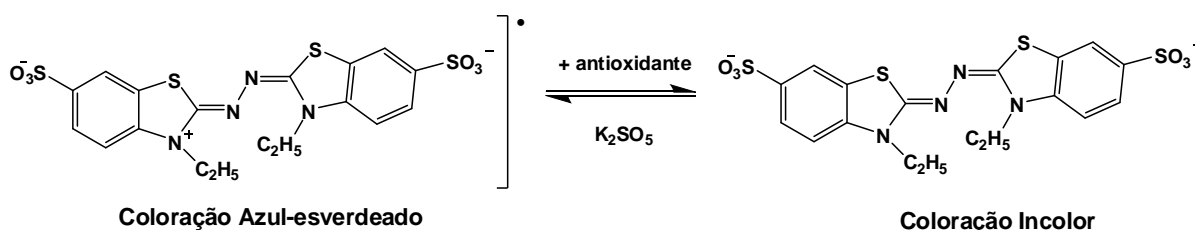
O método DPPH<sup>•</sup> foi relatado inicialmente por Blois (1952), onde se observou a redução do radical DPPH<sup>•</sup> em tiol contendo o aminoácido cisteína e outros compostos ativos. Posteriormente Brand-Willians e colaboradores revisaram o método tornando-o popular para a determinação da capacidade antioxidante. Vários fatores influenciam este método como os solventes, pH, concentração da amostra e o tempo de reação. O fato da dissolução do DPPH<sup>•</sup> ser realizada em solventes orgânicos limita o uso deste radical em solução aquosa (Noipa et al., 2011).

#### 4.2.3 Teste do sequestro do radical ABTS [*radical 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)*]

ABTS é um composto utilizado em análises colorimétricas de diversos oxidantes químicos. O cromóforo é formado através da reação entre ABTS e persulfato de potássio. A molécula de ABTS, incolor, é oxidada, dando origem ao radical ABTS<sup>•+</sup>, de coloração azul-esverdeado (Lee & Yoon, 2008), (Figura 6). A adição de um antioxidante ao cátion-radical pré-formado reduz a molécula do ABTS

tornando-a novamente incolor, em uma dada extensão e escala de tempo, dependendo da atividade antioxidante, concentração do antioxidante e duração da reação (Re et al. 1999).

Figura 6 - Estabilização do radical  $ABTS^{\bullet+}$  por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio.

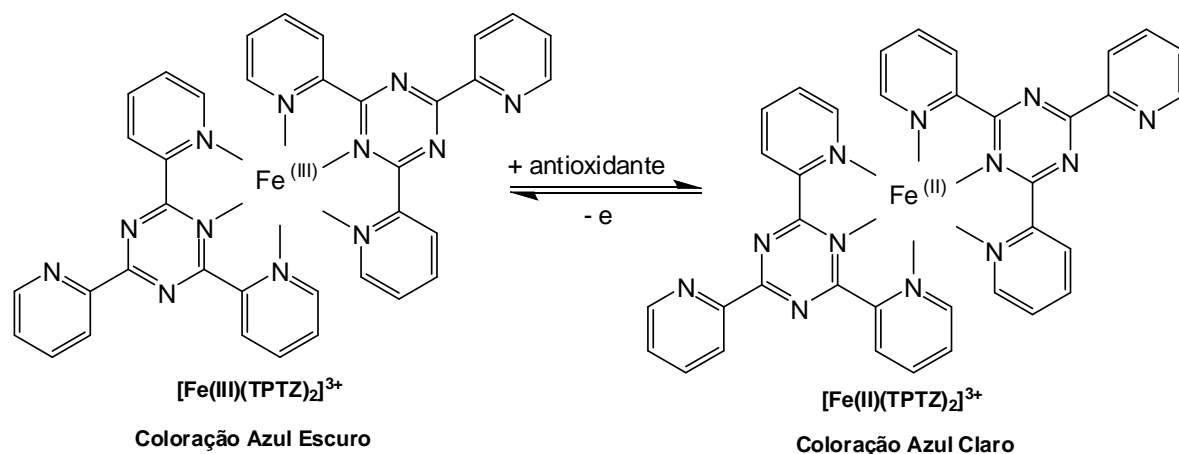


Fonte: Rufino et al., 2007.

Possui absorção máxima nos comprimentos de onda: 645, 734 e 815 nm. O método é aplicável ao estudo de antioxidantes solúveis em água e lipossolúveis, compostos puros e extratos de alimentos (Re et al. 1999).

#### 4.2.4 Poder Antioxidante de Redução do Ferro (*Ferric Reducing Antioxidant Power - FRAP*)

O poder antioxidante de redução do ferro é um procedimento simples e de baixo custo, que mede o nível de antioxidante total em uma amostra, utilizando o potencial de redução dos antioxidantes em reagir com o complexo  $Fe^{3+}$ -TPTZ (ferritripiridiltriazina), transformando em  $Fe^{2+}$ -TPTZ (ferroso-tripiridiltriazina) (Figura 7). No processo ocorre modificação da coloração azul escuro para azul claro e, dependendo do poder antioxidante, tendendo a incolor. A variação da absorvância a 600 nm pode, então, ser comparada a um padrão para determinar o potencial antioxidante em uma determinada amostra (Griffin & Bhagooli, 2004).

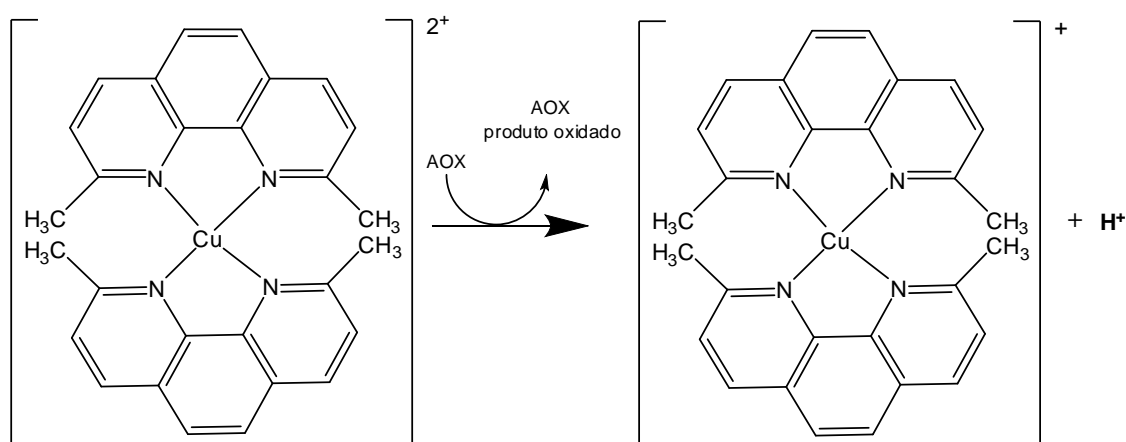
Figura 7 - Redução do complexo TPTZ com  $\text{Fe}^{3+}$ .

Fonte: Rufino et al., 2006.

#### 4.2.5 Capacidade Antioxidante de Redução do Cobre (*Copper Reducing Antioxidant Capacity - CUPRAC*)

O método CUPRAC, que atualmente já apresenta modificações, mensura a capacidade antioxidante baseado na medição da absorção do quelato formado  $\text{Cu(I)} + \text{neocuproína (Nc)}$  como resultado da reação redox entre o antioxidante e o reagente CUPRAC,  $\text{Cu(II)} + \text{neocuproína (Nc)}$ , medindo a absorvância no comprimento de onda máximo de absorção de luz em 450 nm (Lee et al., 2011; Özyürek et al., 2011b) (Figura 8).

Figura 8 - Reação CUPRAC e cromóforo: Cátion quelato bis (neocuproína) cobre (I) [prótons liberados na reação de neutralização pelo tampão  $\text{NH}_4\text{Ac}$ ].



Fonte: Özyürek et al., 2011(a).

O método é baseado na transferência de elétrons. Sendo aplicada em amostras de alimentos (damasco, chás de ervas, plantas silvestres comestíveis, queijos, etc.) e fluidos biológicos (conjuntos de antioxidantes hidrofílicos e lipofílicos ou em frações isoladas) (Özyürek et al., 2011b).

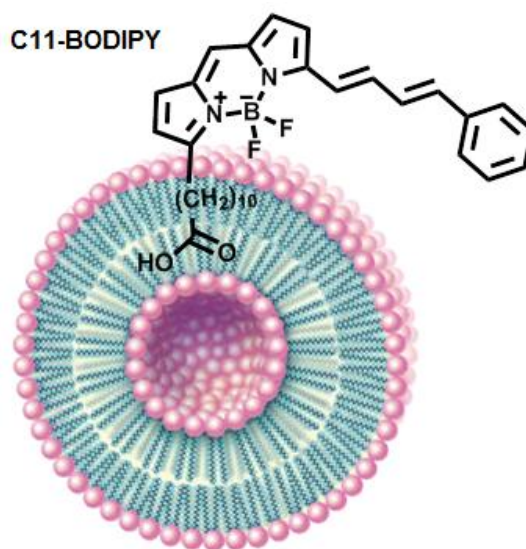
A vantagem desse método sobre o FRAP, anteriormente citado, é devido à química redox do cobre (II) possuir uma cinética mais rápida que as dos íons férricos (Apak et al., 2004). Nesse método existe uma variação de tempo em função da substância analisada, por exemplo, para o ácido ascórbico, ácido úrico, ácido gálico e quercetina o método requer poucos minutos, mas, para moléculas complexas, há a necessidade de 30 – 60 minutos (Prior et al., 2005).

#### 4.2.6 Lipoperoxidação (mensuração através da sonda $\text{C}_{11}\text{-BODIPY}^{581/591}$ )

Como alternativa para a detecção da formação de peróxidos lipídicos tem-se utilizado a sonda fluorescente de membrana 4,4'-difluoro-5-(4-fenil-1,3-butadienil)-4-bora-3a, 4a-diaza-S-indaceno-3-ácido undecanóico ( $\text{C}_{11}\text{-BODIPY}^{581/591}$ ) (Figura 9). As sondas Bodipy são uma classe de moléculas fluorescentes que apresentam fluorescência na região do visível do espectro eletromagnético e possui excelentes propriedades fluorescentes (Drummen et al., 2002).



Figura 9 - Sonda fluorescente C11-Bodipy ancorada a um lipossoma.



Fonte: Ferreira, 2012.

A sonda  $C_{11}$ -BODIPY<sup>581/591</sup> é sensível à oxidação e é um análogo fluorescente de um ácido graxo, sendo facilmente incorporada em membranas e, em seu estado intacto, apresenta fluorescência vermelho brilhante com um máximo de emissão na faixa de 591-595 nm (dependendo do solvente utilizado); mas, se torna verde depois de submetida à peroxidação (Drummen et al., 2004; Partyka et al., 2011).

$C_{11}$ -BODIPY<sup>581/591</sup> é sensível a múltiplas espécies oxidáveis, dentre elas os radicais  $ROO^{\bullet}$ ,  $HO^{\bullet}$ ,  $RO^{\bullet}$  e  $ONOO^{-}$ . A oxidação desta sonda é praticamente insensível às mudanças ambientais e não deixa espontaneamente a bicamada lipídica após a oxidação. O grau de peroxidação é correlacionado com a formação de hidroxila e hidroperoxifosfatidilcolina (Gomes et al., 2005; Partyka et al., 2011).

#### 4.2.7 Enzima Catalase

A enzima catalase (EC 1.11.1.6) é um importante componente do sistema antioxidante endógeno que defende o organismo contra o estresse oxidativo, estando associado às várias condições patológicas, incluindo o câncer, diabetes,

catarata, arteriosclerose, lesão isquêmica, artrite, doenças neurodegenerativas, deficiências nutricionais e envelhecimento (Slaughter & O'Brien, 2000).

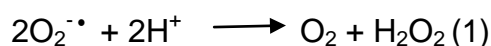
A enzima pode funcionar de dois modos distintos: (i) através de sua atividade catalítica quebrando o peróxido de hidrogênio ou (ii) Também pode utilizar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para oxidar compostos, particularmente quando a concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é mantida constante em um nível baixo (Lardinois & Rouxhet, 1996).

Esta enzima é essencial para proteger organismos aeróbicos dos efeitos tóxicos do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Yoshimoto et al., 2007). É uma enzima ubíqua encontrada em todos os organismos conhecidos. Em células eucarióticas está presente em peroxissomas (Michiels et al., 1994).

#### 4.2.8 Enzima Superóxido dismutase

A enzima superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1) catalisa a dismutação do ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) em H<sub>2</sub>O e O<sub>2</sub>, e pertence à família das metaloproteínas contendo manganês (Mn<sup>+2</sup>), ferro (Fe<sup>+2</sup>), cobre (Cu<sup>+</sup>) / zinco (Zn<sup>+2</sup>) e até o metal níquel (Ni<sup>+2</sup>) como cofator no sítio ativo. Nas plantas, existem vários tipos de isoenzimas SOD, sendo encontradas em diferentes compartimentos celulares (Palatnik et al., 2002). Nos seres humanos tem-se alguns exemplos como a SODCuZn citosólica, SODMn mitocondrial e SODEC extracelular (Michiels et al., 1994; Yoo et al., 2008).

O ânion superóxido é um radical livre altamente reativo produzido pela redução de um elétron do oxigênio. É proveniente de todo o processo respiratório aeróbico, podendo resultar em efeitos fisiológicos deletérios. As SODs são consideradas de grande importância na proteção celular contra a toxicidade do ânion superóxido, de acordo com a equação (1) (Michalski & Prowse, 1991):



Esta enzima parece ser a primeira linha de defesa contra EROs e pode ser rapidamente induzida em algumas condições, quando as células ou organismos são expostos ao estresse oxidativo (Michiels et al., 1994).

No presente estudo além da atividade antioxidante, também se verificou a atividade anticolinesterásica com o objetivo de avaliar as duas atividades ao mesmo alimento.

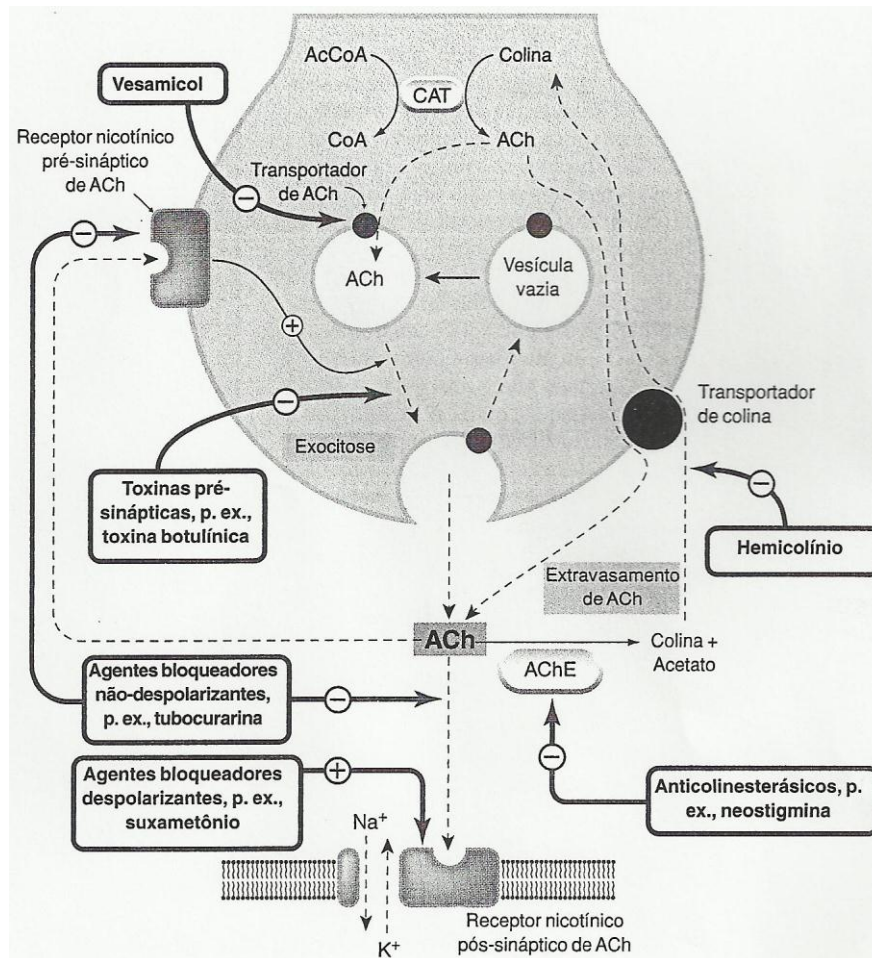
### **4.3 Acetilcolina (ACh)**

A acetilcolina (ACh) é um dos neurotransmissores excitatórios mais estudados no sistema nervoso central e no sistema nervoso periférico, sendo sintetizada a partir de acetil coenzima A (acetil CoA), formada durante a respiração celular, e da colina, um importante produto do metabolismo dos lipídeos (Taylor & Brown, 1994), (Figura 10).

É importante nas funções desempenhadas pelo sistema nervoso central e tem sido associada com as funções cognitivas, processamento de informações sensoriais, organização cortical do movimento e controle do fluxo sanguíneo cerebral (Scremin et al., 1997).

A ACh é encontrada, principalmente, nas sinapses do sistema nervoso central dos gânglios do sistema nervoso periférico, sinapses do parassimpático e junção neuromuscular.

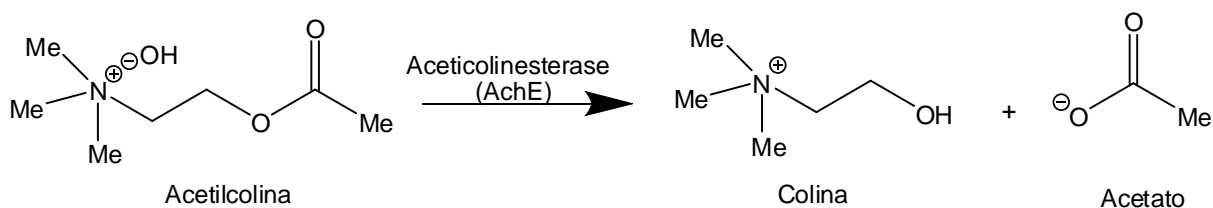
Figura 10 - Formação e liberação da acetilcolina na fenda sináptica e sua degradação. AcCoA = acetil-coenzima A; AChE = Acetilcolinesterase; CAT = Colina acetiltransferase; CoA = coenzima A.



Fonte: Rang et al., 2007.

A enzima acetilcolinesterase (AChE) é uma importante enzima regulatória que controla a transmissão de impulsos nervosos através de sinapse colinérgica pela hidrólise do neurotransmissor excitatório ACh, terminando, portanto, sua ação (Milatovic & Dettbarn, 1996; Müller et al., 2002), (Figura 11). ACh também está relacionada ao aparecimento de sintomas e à evolução de algumas doenças como as neurodegenerativas.

Figura 11- Hidrólise da acetilcolina pela enzima acetilcolinesterase.



Fonte: Ellman et al., 1961.

As doenças neurodegenerativas são desordens progressivas do sistema nervoso central, caracterizadas por disfunções cognitivas, motoras e/ou comportamentais (Woulfe, 2008; Seeley et al., 2009). Doenças neurodegenerativas incluem aquelas caracterizadas por diferentes alterações macro e microscópicas localizadas nas fases iniciais da doença, em diferentes áreas do cérebro (Fratiglioni & Qiu, 2009).

Tais patologias são mais frequentemente diagnosticadas na população idosa; dentre elas tem-se a doença de Alzheimer, doença de Parkinson, demência com Corpos de Lewy, Esclerose Lateral Amiotrófica, Atrofia Sistêmica Múltipla, doença de Huntington e demência Fronto-Temporal. Até o presente momento, essas patologias são incuráveis. Devido ao aumento da notificação dessas doenças, principalmente na população idosa, estas representam um sério desafio para o sistema de saúde (Rockenstein et al., 2007).

A doença de Alzheimer é uma enfermidade neurológica degenerativa progressiva, resultando em prejuízo na memória e no comportamento (Ingkaninan et al., 2003). É caracterizada pela atrofia cerebral, inicialmente localizada em área temporoparietal, com placas amilóides e emaranhados neurofibrilares como típicas alterações microscópicas (Fratiglioni & Qiu, 2009).

A doença está associada a déficits dos diversos neurotransmissores cerebrais, como a acetilcolina, a noradrenalina e a serotonina, e modo que o tratamento sintomático da doença de Alzheimer envolve primariamente a restauração da função colinérgica. Sugere-se, portanto, que uma elevação no nível da acetilcolina poderia ser útil para melhorar, principalmente, um dos sinais da doença, a deficiência de

aprendizagem. Os inibidores da enzima acetilcolinesterase têm demonstrado maior eficiência no tratamento clínico na doença de Alzheimer (Trevisan et al., 2003).

O principal fator patogênico associado à doença de Alzheimer parece ser o aparecimento de oligômeros peptídeo beta-amilóide ( $A\beta$ ), que tendem a acumular-se como depósitos de amilóide extracelular e estão associados à micróglia e astrócitos reativos em processos de degeneração neurais. As placas amilóides são compostas por diferentes formas de beta-amilóide ( $A\beta$ ) derivados de uma proteína precursora de amilóide, que são produzidas pela clivagem dessa proteína por duas enzimas proteolíticas  $\beta$  e  $\gamma$  secretases (Amtul et al., 2011).

O envolvimento da micróglia e astrócitos no aparecimento e evolução desse processo neurodegenerativo está se tornando cada vez mais reconhecido, embora seja comumente aceito que neuroinflamação e estresse oxidativo podem ter influências prejudiciais e benéficas sobre o tecido neural (Agostinho et al., 2010).

Existem muitas hipóteses para o desenvolvimento dessa doença, sendo bem fundamentada a do hipometabolismo cerebral. Neurônios saudáveis possuem uma taxa metabólica extremamente alta e produzem uma quantidade significativa de ATP (adenosina trifosfato), a fim de gerar potenciais de ação e manter a plasticidade sináptica. Considerando-se que as mitocôndrias são responsáveis pela geração de 90% do ATP total celular, essas organelas são críticas para o funcionamento das células com demanda alta de energia, tais como neurônios. O prejuízo da função mitocondrial, portanto, deverá ter consequências graves na viabilidade neuronal e a saúde geral do cérebro (Rettberg et al., 2011).

Atualmente, não existe cura para a doença de Alzheimer e suas causas ainda permanecem desconhecidas (Kanoski & Davidson, 2011). Com base nos relatos anteriores, a presente tese visa detectar nos frutos estudados composto(s) que apresentem atividade antioxidante e anticolinesterásica, com a finalidade de ajudar na melhora dos sintomas e/ou retardar o seu aparecimento. Dessa forma busca-se atribuir mais uma função aos alimentos estudados, além da nutricional, e através da divulgação dos resultados obtidos gerar um aumento do consumo dessas frutas por parte da população.

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 Frutos

Os frutos intactos de jenipapo (*Genipa americana* L., Rubiaceae), siriguela (*Spondia purpurea* L., Anacardiaceae), umbu (*Spondia tuberosa*, Anacardiaceae) e mangaba (*Hancornia speciosa* G., Apocynaceae), em estado de maturação adequado para a colheita, foram adquiridos no Mercado Municipal de Maceió - Alagoas, pela manhã, durante os meses de março e abril de 2008.

Estas frutas são provenientes de pequenas fazendas não comerciais no estado de Alagoas. Os frutos foram armazenados em temperatura ambiente por cerca de dois dias pós-colheita. Foram compradas aleatoriamente, em média, duas caixas de polietileno de umbu e siriguela, quinze frutos de jenipapo e cinquenta frutos de mangaba.

Imediatamente depois de adquiridas, as amostras foram lavadas para remoção de sujidades superficiais e secas a temperatura ambiente. Os frutos a serem utilizados foram selecionados para o processo de separação das partes (cascas, polpas e sementes) e a extração etanólica subsequentes. Os critérios de seleção para a escolha dos frutos foram à ausência de lesões na casca e o estado de maturação adequado para a colheita. No caso do fruto mangaba, a extração etanólica foi realizada com o resultado da união da polpa mais casca.

### 5.2 Preparação dos Extratos Etanólicos

Os extratos foram preparados a partir das cascas, polpas e sementes provenientes dos frutos. A Tabela 2 apresenta o peso inicial das partes das frutas utilizadas para preparar os extratos e os respectivos rendimentos. As cascas foram secas em estufa a 35°C, as sementes em estufa de circulação forçada, a 40°C por 24 horas e as polpas liofilizadas. Após a secagem as amostras foram trituradas e levadas ao procedimento de extração etanólica (extração por três vezes com etanol 95%). O solvente foi evaporado em evaporador rotativo (Buchi Rotavapor R-114) a

40°C e os resíduos foram secos e armazenados a 27°C, embrulhados em papel alumínio, para evitar a incidência de luz.

Tabela 2 - Peso seco inicial (g) e rendimento da extração (%) das partes dos frutos.

<b>Amostras</b>		<b>Peso seco inicial (g)</b>	<b>Rendimento da extração (%)</b>
<b>Jenipapo</b>	Casca	259,9	36,3
	Polpa	50,0	45,4
	Semente	451,1	25,3
<b>Siriguela</b>	Casca	149,8	5,9
	Polpa	50,0	32,3
	Semente	285,7	1,4
<b>Umbu</b>	Casca	88,5	11,3
	Polpa	50,0	17,5
	Semente	149,0	5,6
<b>Mangaba</b>	Casca + Polpa	50,0	49,3

### 5.3 Prospecção Fitoquímica

A presença nos extratos de antocianidinas, antocianinas, antraquinonas, antrona, catequinas, cumarinas, flavonóides, flavanonas, leucoantocianidinas, fenóis, proantocianidinas, saponinas, esteróides, triterpenóides, taninos e xantonas foi verificada, qualitativamente, de acordo com os métodos descritos por Matos (1997) e Souza et al.(2003).

Soluções etanólicas na concentração de 5 mg.mL<sup>-1</sup> dos extratos das partes (casca, polpa e semente) dos frutos foram preparadas. Em seguida, separam-se 7 tubos contendo porções de 4 mL dos extratos etanólicos em tubos de ensaio enumerados, submetendo-os aos testes descritos a seguir, de acordo com a metodologia descrita por Matos (1997).



### 5.3.1 Teste para determinação de Taninos e Fenóis

No tubo de ensaio de número 1 foram adicionadas 3 gotas de solução alcoólica de  $\text{FeCl}_3$  ( $1 \text{ mol.L}^{-1}$ ). Agitou-se bem e observou-se qualquer variação de cor e/ou formação de precipitado escuro abundante. Preparou-se um teste “branco” com água destilada e cloreto férrico para comparações. A presença de fenóis ou taninos foi determinada de acordo com o aparecimento da coloração indicada para cada substância quando o teste “branco” foi negativo. Coloração variável entre o azul e o vermelho é indicativo da presença de fenóis. Precipitado com tonalidade azul escuro indica presença de taninos pirogálicos (taninos hidrolisáveis) e de coloração verde, taninos condensados ou catéquicos.

### 5.3.2 Teste para determinação de Antocianinas, Antocianidinas e Flavonóides

Para este teste o tubo número 2 foi acidulado a pH 3 com  $\text{HCl}$   $3 \text{ mol.L}^{-1}$  e os tubos 3 e 4 alcalinizados a pH 8,5 e 11 com  $\text{NaOH}$   $1 \text{ mol.L}^{-1}$ . A presença de antocianinas, antocianidinas e flavonóides foi identificada pelo aparecimento da coloração indicada para cada substância, conforme apresenta a Tabela 3.

Tabela 3 - Indicativos da presença de compostos fenólicos em amostras segundo o pH.

Constituintes	Cor do meio		
	Ácido (pH = 3)	Alcalino (pH = 8,5)	Alcalino (pH = 11)
Antocianinas e Antocianidinas	Vermelha	Lilás	Azul-púrpura
Flavonas, Flavonóis e Xantonas	—*	—*	Amarela
Chalconas e Auronas	Vermelha	—*	Vermelho púrpura
Flavononóis	—*	—*	Vermelho laranja

\*Não ocorreu modificação da cor.

Fonte: Matos, 1997

### 5.3.3 Teste para a determinação de Leucoantocianidinas, Catequinas e Flavonas

Realizou-se a acidulação do tubo 5 com HCl 3 mol.L<sup>-1</sup> até pH 1 a 3 e a alcalinização do tubo 6 com NaOH 1mol.L<sup>-1</sup> até pH 11. Em seguida, foram aquecidos cuidadosamente em banho-maria até o aparecimento da cor. Observaram-se as possíveis alterações de cor sendo os resultados comparados com os dados da Tabela 4.

Tabela 4 - Indicativos da presença de leucoantocianidinas, catequinas e flavonas

Constituintes	Cor do meio	
	Ácido (pH = 1- 3)	Alcalino (pH = 11)
Leucoantocianidinas	Vermelha	—*
Catequinas	Pardo-amarelada	—*
Flavononas	—*	Vermelho laranja

\*Não ocorreu modificação da cor.

Fonte: Matos, 1997.

### 5.3.4 Teste para a determinação de Flavonóis, Flavanonas, Flavanonóis e Xantonas

Adicionaram-se ao tubo 7 alguns miligramas de magnésio em fita granulada e 0,5 mL de HCl concentrado e, ao fim da reação (fim da efervescência), foram observadas as possíveis mudanças na cor da mistura e comparada com a coloração da mistura do tubo 5. O aparecimento de cor vermelha é indicativo da presença de flavonóis, flavanonas, flavanonóis e xantonas livres ou seus heterosídeos (Matos, 1997).

### 5.3.5 Teste para a determinação de Esteróides e Triterpenóides

Em um béquer foram colocados 10 mL dos extratos etanólicos e levados ao banho-maria até sua secura total. Em seguida, extraiu-se o resíduo seco do fundo

do béquer com 2 mL de clorofórmio (Vetec Química Fina Ltda; Rio de Janeiro, Brasil). Essa solução foi filtrada em um funil fechado com algodão coberto com  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anidro e passada para um tubo de ensaio bem seco. Em seguida, adicionaram-se 1 mL de anidrido acético e 3 gotas de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado, agitou-se suavemente e observou-se a reação. O aparecimento da coloração azul seguida de verde permanente é indicativa da presença de esteróides livres, enquanto que o aparecimento da coloração entre parda a vermelha indica a presença de triterpenóides pentacíclicos livres (Matos, 1997).

#### 5.3.6 Teste para a determinação de Saponinas

A partir do resíduo insolúvel em clorofórmio do teste anterior, este foi solubilizado em 10 mL de água destilada e filtrado para um tubo de ensaio. A solução foi agitada fortemente por 3 minutos e observou-se a formação de espuma. A presença de espuma persistente e abundante indica a presença de saponinas (Matos, 1997).

#### 5.3.7 Teste para a determinação de Antraquinonas, Antronas e Cumarinas

Marcaram-se pontos dos extratos em placas cromatográficas, que foram eluídas em clorofórmio. As placas foram borrifadas com uma solução de hidróxido de potássio a 10% e observou-se a presença de cores indicativas em luz ultravioleta a 365 nm. A cor vermelha indica antraquinona, amarela indica antrona e azul indica cumarina (Matos, 1997).

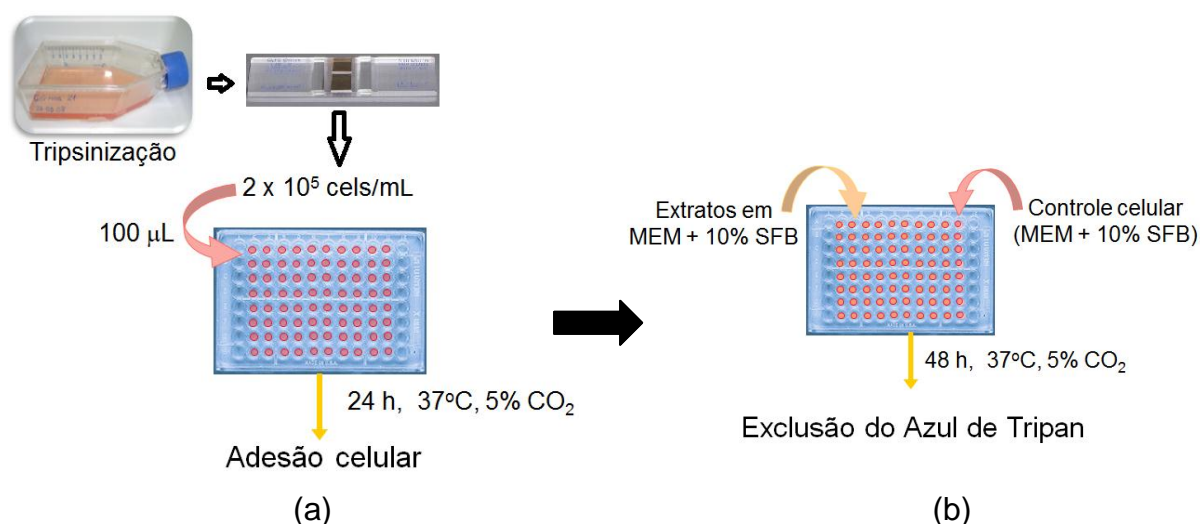
### 5.4 Ensaio da Citotoxicidade dos Extratos

O possível efeito citotóxico dos extratos foi investigado utilizando células epiteliais da córnea de ovinos. As células foram cultivadas em meio essencial mínimo de Eagle (MEM) suplementado com soro fetal bovino (SFB) a 10%, 0,10  $\text{mg.mL}^{-1}$  de estreptomicina, 100  $\text{UI.mL}^{-1}$  de penicilina G e 0,25  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de anfotericina B (Sigma<sup>®</sup>, USA) em uma incubadora com  $\text{CO}_2$  a 5% em 37°C. As

células foram colhidas utilizando uma solução de tripsina a 0,05% e ácido tetraacético etilenodiamina (EDTA) a 0,02% (Sigma<sup>®</sup>, USA). As células foram semeadas em placas de 96 poços ( $1 \times 10^4$  células por poço) e incubadas por 24 h em estufa com CO<sub>2</sub> a 5% em 37°C (Figura 12 a).

O meio de cultura foi, então, substituído por 200 µL de meio fresco (controle) ou meio contendo uma concentração de 100 µg.mL<sup>-1</sup> dos extratos. Após 48 h, as células foram dispersas e avaliadas pelo ensaio de exclusão utilizando azul de Tripán a 0,4% (Sigma<sup>®</sup>, USA) (Figura 12 b) (Weisenthal et al., 1983).

Figura 12 - Procedimentos do ensaio de citotoxicidade dos extratos etanólicos dos frutos: (a) adesão celular e (b) avaliação do teste através da exclusão do Azul de Tripán.



Fonte: Ferreira, 2010.

O Azul de Tripán ( $C_{34}H_{24}N_6Na_4O_{14}S_4$ ) é um corante ácido azul que contém dois grupos cromóforos azo (-N=N-). É um corante indicado para estimar a viabilidade celular e ajuda também na visualização da morfologia celular, facilitando a contagem das células. Baseia-se no princípio de que células viáveis (vivas) apresentam membranas intactas, que evitam a entrada do corante, enquanto que as membranas metabolicamente inativas de células mortas (não viáveis) não conseguem (Ferreira, 2010).

Todos os testes foram realizados em triplicata. Os ensaios foram realizados no Laboratório de Farmacologia Antiviral e Celular do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde - ICBS/UFAL, sob a supervisão da Professora Dr<sup>a</sup> Roberta Costa Santos Ferreira.

### 5.5 Determinação de Ácido Ascórbico

A determinação de ácido ascórbico (AA) foi realizada de acordo com AOAC (1997), adaptado por Oliveira, Godoy & Prado (2010). 500 mg dos extratos foram homogeneizadas em 50 mL de ácido metafosfórico a 1%, sendo a mistura utilizada para titular uma solução de 2 mL de indicador 2,6-diclorofenol-indofenol - DCFI (Vetec Química Fina Ltda; Rio de Janeiro, Brasil) e 18 mL de água destilada. O ponto final da titulação foi definido no momento em que a solução titulada apresentou coloração idêntica à solução titulante (amostra diluída em ácido metafosfórico), reservando-se um período de 15 segundos para a confirmação do ponto de viragem. Para a determinação de AA na amostra utilizou-se a seguinte equação (2):

$$C = [(p \times c \times 50) / (V \times m)], (2)$$

Onde: C é a quantidade de AA (mg) em g de extrato seco; p é o volume (mL) gasto de solução padrão de AA (Sigma<sup>®</sup>, USA), cuja concentração é c (mg.mL<sup>-1</sup>) na padronização do DCFI; V é o volume (mL) da solução titulante utilizada durante a titulação; e m é a quantidade de amostra utilizada na extração.

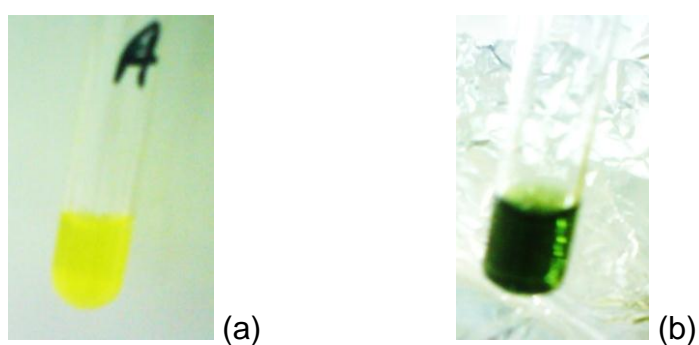
### 5.6 Determinação do Conteúdo de Fenóis Totais

O conteúdo de fenóis totais (CFT) dos extratos foi determinado utilizando o reagente Folin-Ciocalteu (FC) (Sigma<sup>®</sup>, USA), como descrito por Cicco et al. (2009), com modificações. Foram preparadas soluções metanólicas dos extratos na concentração de 50 µg.mL<sup>-1</sup>. Em tubos de ensaios foram colocadas alíquotas de 120 µL dos extratos e 180 µL de água para obter a concentração de metanol a 4% na solução final. Em seguida, 300 µL do reagente FC (Figura 13 a) foram adicionados

em cada tubo e, após 2 minutos, 2,4 mL de uma solução de carbonato de sódio a 5% (Vetec Química Fina Ltda; Rio de Janeiro, Brasil).

A mistura foi agitada e aquecida a 40°C em banho-maria, por 20 minutos. Os tubos foram resfriados rapidamente e a cor desenvolvida, coloração azul esverdeada intensa (Figura 13 b), foi lida a 767 nm em um espectrofotômetro MutiSpec-1501 UV-Vis (Shimadzu, Japão). O mesmo procedimento foi realizado utilizando 120 µL de metanol como controle negativo.

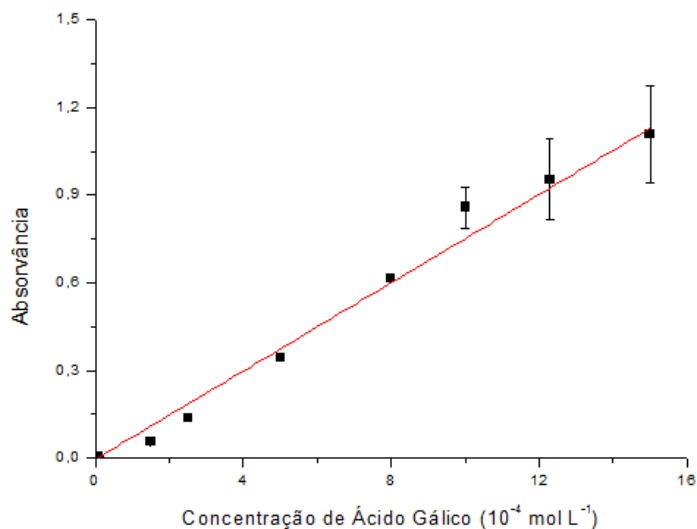
Figura 13 - Reagente Folin-Ciocalteu (a) e amostra no final do experimento (b).



Fonte: Autor desta tese, 2012.

A concentração de fenóis foi estimada através de uma curva de calibração traçada com ácido gálico (AG) (Vetec Química Fina Ltda; Rio de Janeiro, Brasil) em metanol ( $0,10 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$  -  $17,5 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ ), como uma referência de polifenóis ( $n = 3$ ). De acordo com a curva de calibração, obteve-se a equação  $\hat{y} = -0,00389 + 0,07549x$ ;  $R^2 = 0,99651$  (Figura 14). Os resultados foram expressos em mg de equivalentes de AG / g de extrato ( $\text{mg EAG.g}^{-1}$ ).

Figura 14 - Curva de calibração do Ácido Gálico (AG).



Fonte: Autor desta tese, 2012.

## 5.7 Métodos de Avaliação da Capacidade Antioxidante

A capacidade antioxidante dos extratos foi avaliada, por vários métodos descritos a seguir:

### 5.7.1 Atividade sequestradora de espécies reativas utilizando o radical $\alpha$ , $\alpha$ -difeníl- $\beta$ -picrilidrazila (DPPH<sup>\*</sup>)

A capacidade sequestradora de radicais (CSR) pode ser avaliada utilizando o método DPPH, descrito por Sánchez-Moreno et al. (1999). Trezentos microlitros da solução do extrato em uma concentração de 50  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  foram adicionados a 2,7 mL de uma solução radicalar de DPPH (Sigma<sup>®</sup>, USA) (40  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  em metanol) em uma cubeta de quartzo de 3 mL. A mistura foi homogeneizada e armazenada no escuro antes da análise. Os valores de absorção do DPPH<sup>\*</sup> em 516 nm foram registrados em intervalos de 5 minutos até 50 minutos.

A porcentagem de DPPH<sup>•</sup> remanescentes (% DPPH<sup>•</sup><sub>R</sub>) e consumidos (% DPPH<sup>•</sup><sub>C</sub>) foi calculada através da seguinte equação (3):

$$\% \text{DPPH}^{\bullet}_R = [(DPPH^{\bullet})_t / (DPPH^{\bullet})_{t=0}] \times 100, (3)$$

onde: *t* representa o tempo.

A porcentagem da capacidade sequestradora de radicais do DPPH (% CSR - DPPH<sup>•</sup>) de cada extrato foi calculada da seguinte forma (4):

$$\% \text{CSR} = (1 - A_C / A_D) \times 100, (4)$$

onde: *A<sub>C</sub>* é a absorvância da solução quando ao extrato foi adicionado a uma concentração particular em 30 minutos, e *A<sub>D</sub>* é a absorvância da solução de DPPH. Todas as determinações foram realizadas em triplicata.

A IC<sub>50</sub> (concentração da amostra ou padrão que causa 50% de inibição da concentração inicial de DPPH) foi obtida graficamente usando uma curva de calibração na faixa linear pela plotagem da concentração dos extratos *versus* o efeito sequestrante correspondente. A IC<sub>50</sub> ou I% (porcentagem de inibição) foi calculada segundo Scherer & Godoy (2009), utilizando a seguinte equação (5):

$$I\% = [(Abs_0 - Abs_1) / Abs_0] \times 100, (5)$$

onde *Abs<sub>0</sub>* é a absorvância do controle e *Abs<sub>1</sub>* é a absorvância na presença do composto testado. Realizou-se a IC<sub>50</sub> dos extratos mais promissores.

### 5.7.2 Ensaio com o radical 2,2'- azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) - ABTS<sup>•+</sup>

O método descrito por Arnao et al. (2001) foi utilizado com modificações. Soluções estoques de 50 mL foram preparadas, uma contendo ABTS (7 mmol.L<sup>-1</sup>) e

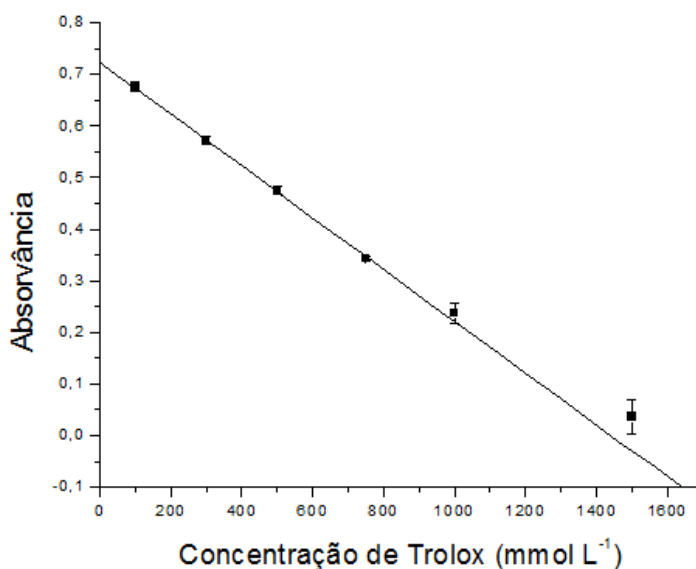


outra de persulfato de potássio ( $140 \text{ mmol.L}^{-1}$ ) (Sigma<sup>®</sup>, USA). A mistura reacional foi então preparada misturando as duas soluções estoque em volumes iguais e permitindo a reação por 16 h em temperatura ambiente, no escuro. A solução final foi diluída pela mistura de 5 mL da solução de ABTS<sup>•+</sup> ( $7 \text{ mmol.L}^{-1}$ ) com 90  $\mu\text{L}$  de metanol, para obter uma absorvância de  $0,70 \pm 0,50$  em 734 nm.

Prepararam-se soluções metanólicas dos extratos na concentração de  $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . Alíquotas de 30  $\mu\text{L}$  foram retiradas dos extratos para reagir com 3,0 mL da solução de ABTS<sup>•+</sup> por 6 minutos no escuro, sendo a absorvância, verificada a 734 nm.

A curva de calibração do Trolox<sup>®</sup> (Merck; Düsseldorf, Alemanha) foi linear entre  $100 \text{ mmol.L}^{-1}$  e  $1.600 \text{ mmol.L}^{-1}$ . De acordo com a curva de calibração, obteve-se a equação  $\hat{y} = 0,7228 + 0,0005x$ ;  $R^2 = 0,99834$  (Figura 15). Os resultados são expressos em mmol Trolox<sup>®</sup> equivalente (TE) / g massa fresca.

Figura 15 - Curva de calibração do reagente Trolox<sup>®</sup> ( $100 - 1.600 \text{ mmol.L}^{-1}$ ).



Fonte: Autor desta tese, 2012.

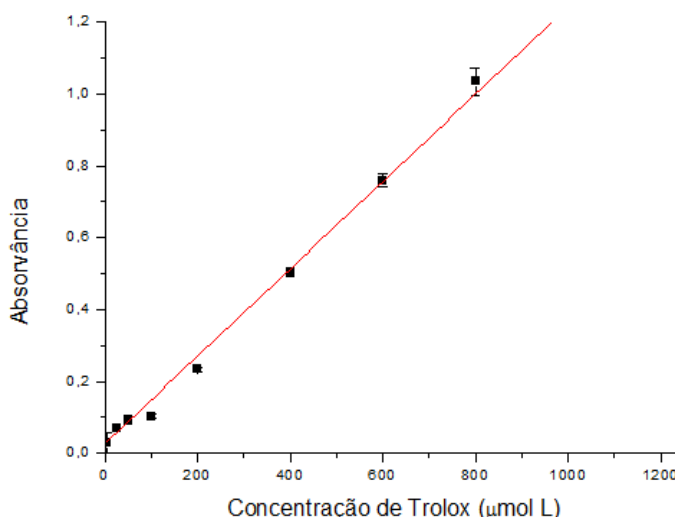
### 5.7.3 Poder Antioxidante de Redução do Ferro – Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP)

O ensaio foi realizado de acordo com o método descrito por Rufino et al.

(2006), onde ocorre a redução do complexo  $\text{Fe}^{3+}$ -TPTZ (ferritripiridiltriazina) [2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina] a ferroso-tripiridiltriazina ( $\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ). Baseado na habilidade de um composto em reduzir  $\text{Fe}^{2+}$  a partir de  $\text{Fe}^{3+}$ , definindo sua força antioxidante. O complexo  $\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ possui a cor azul intenso e pode ser monitorado, a 593 nm, em espectrofotômetro.

O reagente FRAP foi preparado misturando 2,5 mL de uma solução de 2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina (TPTZ)  $10 \text{ mmol.L}^{-1}$  [a solução de TPTZ (Sigma<sup>®</sup>, USA) preparada com uma solução de HCl  $40 \text{ mmol.L}^{-1}$  ], 2,5 mL de uma solução aquosa de  $\text{FeCl}_3$   $20 \text{ mmol.L}^{-1}$  e 25 mL do tampão acetato  $0,30 \text{ mol.L}^{-1}$  (pH = 3,6), sendo utilizada imediatamente após sua preparação. Em ambiente escuro, alíquotas de 90  $\mu\text{L}$  dos extratos foram misturadas com 270  $\mu\text{L}$  de água destilada e 2,7 mL do reagente FRAP, sendo homogeneizadas e posteriormente incubadas a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ , por 30 minutos. A absorvância da mistura reacional foi verificada a 595 nm e uma curva de calibração foi preparada com Trolox<sup>®</sup> ( $5 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$  –  $1.000 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ ), obtendo a equação  $\hat{y} = 0,02734 + 0,00122x$ ;  $R^2 = 0,99978$  (Figura 16). Os resultados foram expressos em  $\text{TEAC}_{\text{FRAP}}$  (Trolox Equivalent Antioxidant Capacities – Capacidade antioxidante equivalente ao Trolox) em  $\text{mmol de Trolox.g}^{-1}$ .

Figura 16 - Curva de calibração do reagente Trolox<sup>®</sup> ( $5 - 1.000 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ ).

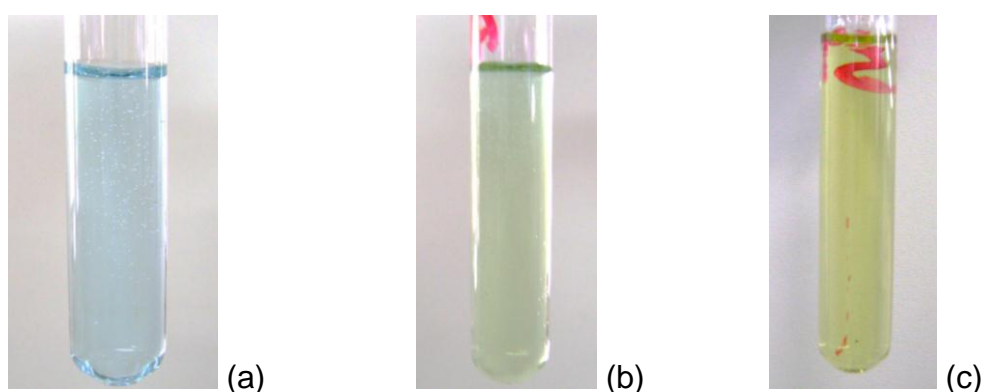


Fonte: Autor desta tese, 2012.

#### 5.7.4 Capacidade Antioxidante de Redução do Cobre - Copper Reducing Antioxidant Capacity (CUPRAC)

Este ensaio é baseado na redução do Cu (II) a Cu (I) pela ação combinada de todos os antioxidantes (redutores) presente na amostra. 1 mL de uma solução aquosa de  $\text{CuCl}_2$  ( $1 \times 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ ), neocuproína ( $7,5 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ ) e de tampão  $\text{NH}_4\text{Ac}$  ( $1,0 \text{ mol.L}^{-1}$ ,  $\text{pH} = 7,0$ ) (Sigma<sup>®</sup>, USA) foram misturados e homogeneizados em um tubo de ensaio (Figura 17 a). Em seguida, adicionaram-se 0,5 mL da solução dos extratos e 0,6 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  à mistura inicial para a obtenção de um volume final de 4,1 mL (Figura 17 b). A mistura ficou em repouso por 1 hora e a absorvância foi observada a 450 nm, (Figura 17 c) (Apak et al., 2004).

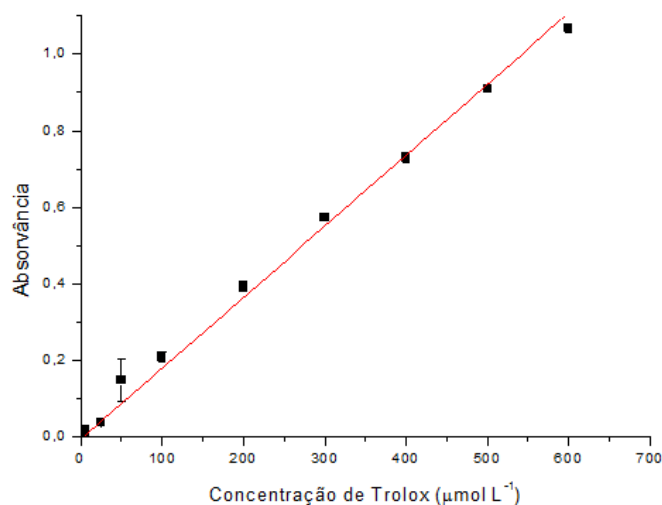
Figura 17 - Mistura das soluções de  $\text{CuCl}_2$ , neocuproína e tampão  $\text{NH}_4\text{Ac}$  (a), Mistura anterior + amostra e água (b) e mistura após 1 hora de repouso (c).



Fonte: Autor desta tese, 2012.

As soluções dos extratos foram preparadas em metanol, na concentração de  $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . A curva de calibração foi realizada com Trolox<sup>®</sup>, nas concentrações de  $5 \mu\text{mol.L}^{-1}$  -  $600 \mu\text{mol.L}^{-1}$ . De acordo com a curva de calibração, obteve-se a equação  $\hat{y} = -0,00616 + 0,00186x$ ;  $R^2 = 0,99921$  (Figura 18).

Figura 18 - Curva de calibração do reagente Trolox<sup>®</sup> (5 - 600  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ).



Fonte: Autor desta tese, 2012.

Os resultados foram expressos como a capacidade antioxidante total em mmol de Trolox.  $\text{g}^{-1}$  de extrato, sendo calculada utilizando a fórmula (6):

$$\text{Capacidade Antioxidante Total (em mmol Trolox/g)} = \frac{AV_f r V_i}{\epsilon_{\text{Trolox}} V_s m} / 1000, \quad (6)$$

onde:  $A$  é a absorvância;  $\epsilon_{\text{Trolox}}$  é a absorvidade molar de Trolox;  $V_f$  é o volume final (após a adição dos reagentes);  $V_s$  é o volume de amostra colhida para análise do extrato diluído;  $r$  é o tempo de repouso antes da análise;  $V_i$  é o volume utilizado para preparar a solução inicial (extrato diluído); e  $m$  é o peso em gramas utilizada na preparação da solução inicial (extrato diluído).

#### 5.7.5 Capacidade Antioxidante de um Sistema de Membranas Biomimético

A capacidade antioxidante foi avaliada através de um modelo de peroxidação lipídica mediada por um radical peroxila utilizando uma membrana biomimética (lipossomas unilamelares de lecitina de soja) acoplada a sonda fluorescente  $\text{C}_{11}$  – BODIPY<sup>581/591</sup> sensível ao radical peroxila (Oliveira et al., 2009).

Preparação das vesículas unilamelares

Vesículas unilamelares de fosfatidilcolina de soja (1 mM) (Sigma<sup>®</sup>, USA) foram preparadas por extrusão em 10 mL de tampão fosfato (50 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 7,4), como descrito por MacDonald et al. (1991), com a incorporação adicional da sonda fluorescente C<sub>11</sub>-BODIPY<sup>581/591</sup> (10<sup>-7</sup> mol.L<sup>-1</sup>) (Molecular Probes; Ontario, Canadá) sensível ao radical peroxila (Drummen et al., 2002). A dispersão multilamelar nesta etapa foi obtida através de um sistema de extrusão de membrana (Figura 19), tendo 100 nm de diâmetro dos poros, operando a 25°C. A dispersão multilamelar foi realizada pela passagem da solução de fosfatidilcolina de soja por 15 vezes no sistema de extrusão, para produzir vesículas unilamelares marcadas com a sonda C<sub>11</sub>-BODIPY<sup>581/591</sup> com diâmetro médio de 120 nm.

Figura 19 - Sistema de Extrusão de Membrana.



Fonte: Autor desta tese, 2012.

#### Mensuração da Peroxidação Lipídica (Método sintético)

Medições da fluorescência (Figura 20) foram realizadas a 37°C, em um fluorímetro Fluorolog Spex 1681<sup>®</sup>, através da mistura, em uma cubeta de quartzo de 1mL, de 800 µL de uma suspensão de vesículas unilamelares, 50 µL de tampão fosfato (50 mmol.L<sup>-1</sup>, pH = 7,4) e 50 µL dos extratos (0,5 mg.mL<sup>-1</sup>). Trolox (1, 5 e 10 µmol.L<sup>-1</sup>), vitamina C e resveratrol (100 µmol.L<sup>-1</sup>) (Sigma<sup>®</sup>, USA) foram utilizados como controles positivos e os solventes (metanol e tampão), como controles negativos. A reação foi iniciada com a adição de 100 µL de 2,2'-azinobis (2-amidinopropano) dihidrocloridrato (AAPH) (Sigma<sup>®</sup>, USA) a 100 mM. O decaimento

da fluorescência ( $\lambda_{\text{excitação}} = 580 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{emissão}} = 600 \text{ nm}$ ) foi monitorado continuamente por 30 minutos.

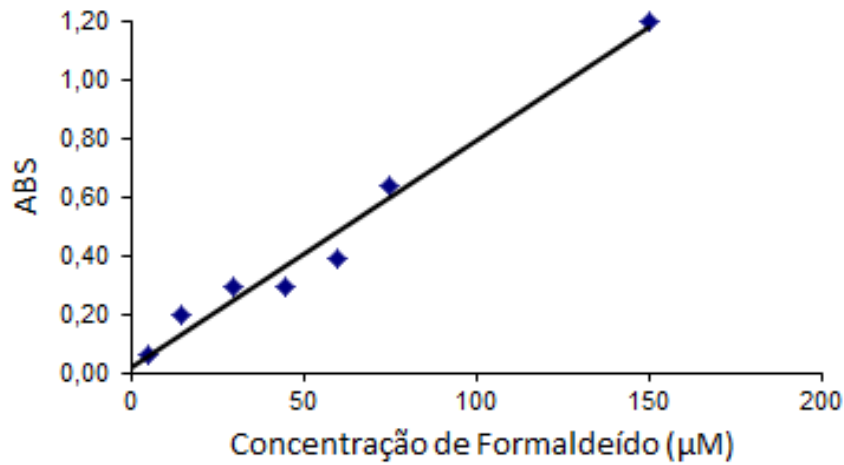
Figura 20 - Ilustração da fluorescência observada no experimento.



Fonte: Autor desta tese, 2012.

#### 5.7.6 Mensuração da atividade da enzima catalase

A mensuração da atividade da enzima catalase (CAT) foi realizada em microplaca (Nunc<sup>®</sup>, Dinamarca), de acordo com o método descrito por Cohen et al. (1996), com adaptações para microplacas. Sucintamente, 100  $\mu\text{L}$  do homogenato hepático, do qual já se conhecia a atividade da enzima catalase, foram adicionados à placa. Para o início da reação, adicionaram-se 20  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Concentração final de 1 mM). Em seguida, foi adicionada uma substância cromógena e o produto reacional foi quantificado em microplaca a 550 nm, utilizando um espectrofotômetro Thermo Scientific - Multiskan Spectrum<sup>®</sup>. Uma curva de calibração foi preparada para calcular a concentração da enzima nas amostras de homogenato de tecido hepático de camundongos, utilizando formaldeído nas concentrações de 5  $\mu\text{M}$  a 150  $\mu\text{M}$ . De acordo com a curva de calibração, obteve-se a equação  $\hat{y} = 0,0149 + 0,0077x$ ;  $R^2 = 0,9791$  (Figura 21).

Figura 21 - Curva de calibração do formaldeído (5 - 150  $\mu\text{M}$ ).

Fonte: Autor desta tese, 2012.

Os reagentes foram preparados imediatamente antes do início da reação. Os extratos foram analisados em três concentrações (25, 50 e 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), (Figura 22). A concentração de catalase foi normalizada pela concentração tecidual protéica medida através do método colorimétrico de Bradford (1976). Salienta-se que a metodologia utilizada foi padronizada no Laboratório de Reatividade Cardiovascular e no Max Delbrück Center for Molecular Medicine (MDC), Berlin-Buch e, no momento, encontra-se em fase final de escrita do documento envolvendo a proteção técnico-científico. Assim, os detalhes relacionados à metodologia não estão aqui expostos.

Figura 22 - Demonstrativo do ensaio da atividade da enzima catalase após leitura.



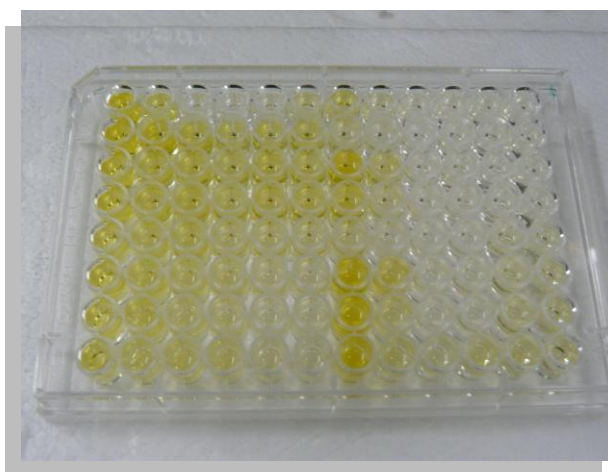
Fonte: Autor desta tese, 2012.

#### 5.7.7 Mensuração da atividade da enzima superóxido dismutase

A atividade da enzima Superóxido Dismutase (SOD) foi determinada no homogenato hepático em microplaca (Nunc<sup>®</sup>, Dinamarca), através da utilização de *kit* comercial Fluka<sup>®</sup>, conforme instruções do fabricante, utilizando-se o comprimento de onda de 450 nm (espectrofotômetro Thermo Scientific - Multiskan Spectrum<sup>®</sup>). Sucintamente, o método é baseado na utilização de um sal solúvel em água, o WST-1 (2-(4-Iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H tetrazólio, sal monossódico), que é reduzido pelo ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ). O produto desta reação é o cromógeno *formazan*.

A taxa de redução é linearmente relacionada à atividade da enzima xantina oxidase (XO) que, por sua vez, é inibida pela SOD (Figura 23). A atividade da SOD é então expressa como porcentagem de inibição da XO pela SOD. Os dados foram normalizados pelo conteúdo tecidual protéico (Bradford, 1976). Utilizaram-se três concentrações dos extratos (25, 50 e 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ).

Figura 23 - Demonstrativo do ensaio da atividade da enzima superóxido dismutase.



Fonte: Autor desta tese, 2012.



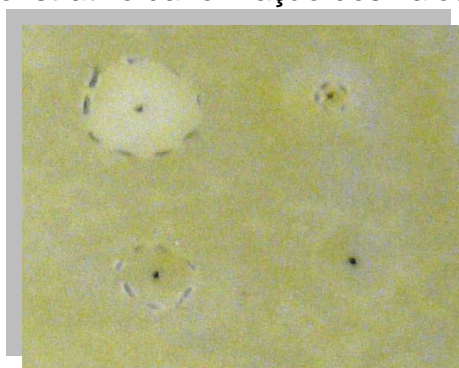
## 5.8 Detecção da inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE)

### 5.8.1 Ensaio qualitativo

Avaliou-se qualitativamente a inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE) por cromatografia em camada delgada (CCD), seguindo a metodologia descrita por Ellman, sendo adaptada por Rhee et al. (2001). Os extratos, frações e subfrações das polpas, cascas e sementes foram dissolvidos individualmente em etanol. Cada amostra foi diluída para uma concentração de  $2 \text{ mg.mL}^{-1}$  e aplicada sobre uma placa cromatográfica de alumina ( $1,5 - 2,5 \mu\text{L}$ ).

A placa foi então pulverizada com os reagentes 5,5'-ditiobis (2- ácido nitrobenzóico) DTNB / (iodeto de acetiltiocolina) ATCI;  $1 \text{ mmol.L}^{-1}$  DTNB (reagente de Ellman) e  $1 \text{ mmol.L}^{-1}$  ATCI em tampão Tris-HCl, pH 8,0 (Sigma<sup>®</sup>, USA) até a sílica ficar saturada com o solvente. As placas de CCD foram deixadas em repouso para secar por 3 minutos; em seguida, foram pulverizadas com  $3 \text{ U.mL}^{-1}$  de solução da enzima AChE (acetilcolinesterase proveniente de *Electrophorus electricus* – enguia elétrica, tipo VI-S). Após 10 minutos, observaram-se, no fundo amarelo, manchas brancas revelando extratos, frações e subfrações com atividade inibitória da enzima (Figura 24).

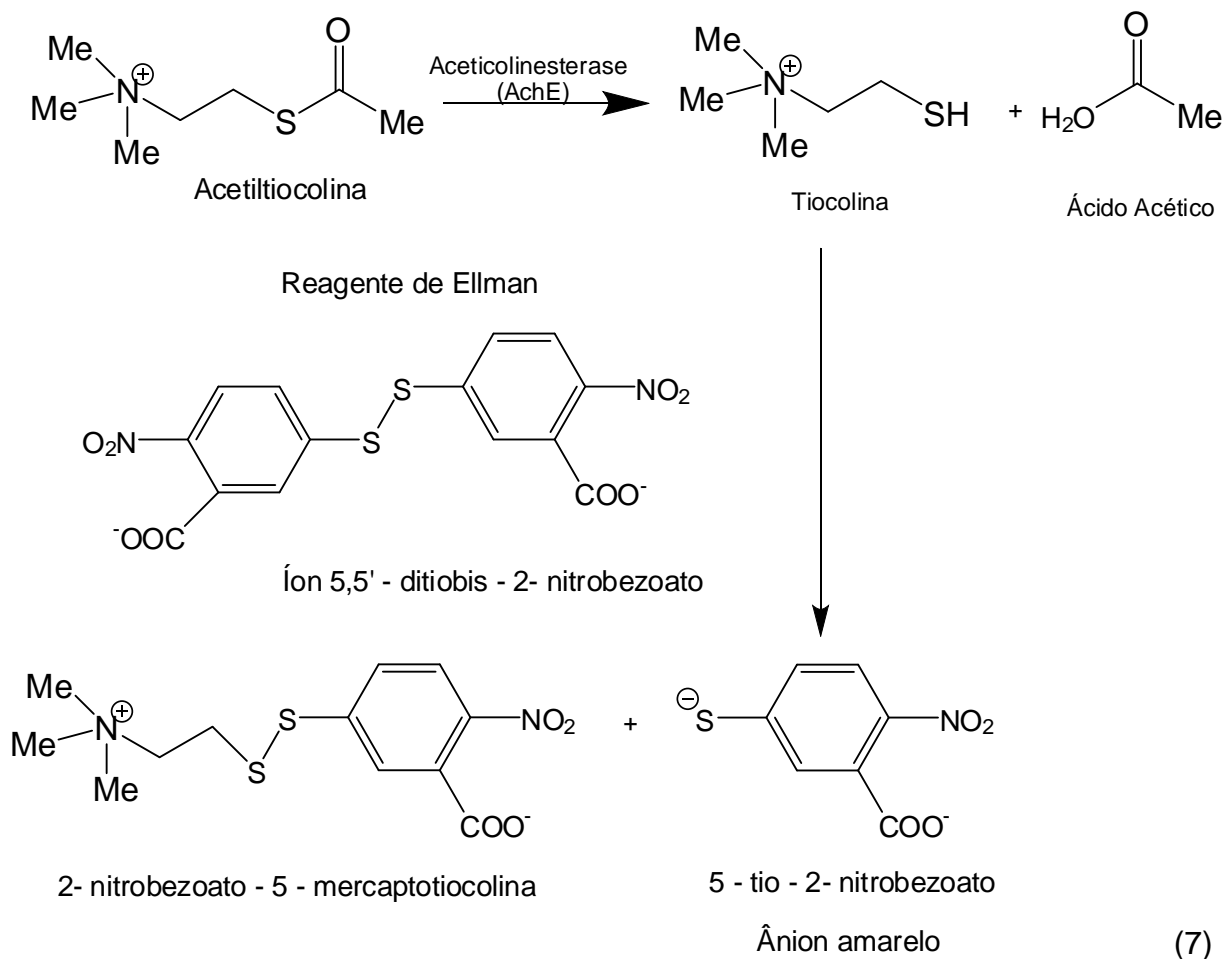
Figura 24 - Demonstrativo da formação dos halos brancos na CCD.



Fonte: Autor desta tese, 2012.

O método de Ellman é baseado na hidrólise da acetiltiocolina (ACTI) pela AChE, dando origem à tiocolina, que reage com o carboxilato do DTNB, formando o

2' - nitrobenzoato 5 - mercaptotocolina e um ânion de coloração amarela, o 5 - tio - 2 - nitrobenzoato, o qual é quantificado espectrofotometricamente no comprimento de onda de 412 nm (Ellman et al., 1961; Marston, 2011), de acordo com a equação (7), a seguir:



Carbacol (0,01 mol.L<sup>-1</sup>) (Sigma<sup>®</sup>, USA) foi utilizado como controle positivo e os solventes etanol e metanol, como controles negativos.

### 5.8.2 Ensaio quantitativo (ensaio em microplaca)

O ensaio quantitativo para avaliação do potencial inibitório da acetilcolinesterase realizou-se utilizando o método de Ellman, com modificações (Trevisan et al., 2003; Rhee, Van & Verpoorte, 2003; Nino et al., 2006). Para os ensaios da atividade de inibição da enzima acetilcolinesterase em microplacas foram

preparadas as seguintes soluções: Tampão A: 50 mM de tampão Tris-HCl (Sigma<sup>®</sup>, USA) em pH 8,0; Tampão B: 50 mM Tris-HCl em pH 8,0, contendo 0,1% de albumina bovina sérica (ABS); Substrato: 15 mM de iodeto de acetilcolina (ATCI); Reagente de Ellman: 3mM de ácido 5,5'-ditiobis-[2-nitrobenzóico](DTNB) dissolvido no tampão A; Enzima: Acetilcolinesterase (pó liofilizado contendo 1,18 mg; 426 U.mg<sup>-1</sup> de sólido) (Sigma<sup>®</sup>, USA).

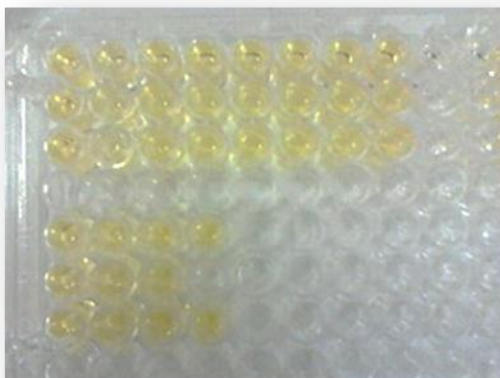
A enzima foi inicialmente dissolvida no tampão A para obtenção de uma solução estoque 502,68 U.mL<sup>-1</sup>. Em seguida, esta solução foi diluída no tampão B para a obtenção de uma solução final a 0,2 U.mL<sup>-1</sup>, concentração necessária para a realização do ensaio em microplaca.

Os ensaios foram realizados com os extratos brutos, frações e subfrações das partes dos frutos analisados solubilizados em metanol para produzir uma solução estoque de 3 mg.mL<sup>-1</sup>. Em seguida, essa solução foi diluída 10 vezes com o tampão A. A eserina (Fisostigmina) 0,018 mM (Ren et al., 2004) dissolvida em metanol foi utilizada como controle positivo e, como controle negativo, o metanol a 10% diluído no tampão A.

Os ensaios foram realizados em triplicata em um espectrofotômetro Thermo Scientific - Multiskan Spectrum<sup>®</sup>. Em cada poço da placa de 96 poços adicionaram-se 125 µL de DTNB, 50 µL de tampão B, 25 µL da amostra ou branco ou controle positivo e 25 µL da enzima acetilcolinesterase 0,2 U.mL<sup>-1</sup>. Em seguida, a velocidade da reação enzimática foi medida 10 vezes a cada 13 segundos. Após este período, adicionaram-se 25 µL do substrato ATCI e a absorvância foi novamente medida por 10 vezes, a cada 13 segundos. Antes de cada leitura, a placa foi levemente agitada por 10 segundos.

Após a leitura espectrométrica, (Figura 25), a velocidade da reação antes de adicionar o substrato foi subtraída da velocidade de reação depois da adição do substrato.

Figura 25 - Demonstrativo da placa do ensaio quantitativo da inibição da acetilcolinesterase.



Fonte: Autor desta tese, 2012.

A porcentagem de inibição das amostras foi calculada por comparação com a inibição observada no branco (10% de metanol em tampão A).

A atividade enzimática foi calculada através da seguinte fórmula (8) (Razzino, 2007):

$$Z / m = (\Delta A \cdot V \cdot 1000) / (e \cdot d \cdot \Delta t \cdot v \cdot p) \quad (8)$$

onde,

$\Delta A$  = variação de absorvância,

$\Delta A / \Delta t$  = coeficiente linear (b da reta),

$V$  = volume do ensaio em L,

$V = 2,5 \cdot 10^{-4}$  L,

$e$  = coeficiente de absorção do ânion formado (5 – tio – 2 – nitrobenzoato),

$e = 1,36 \text{ mmol}^{-1} \cdot \text{mm}^{-1}$ ,

$d$  = caminho óptico em mm,

$v = 2,5 \cdot 10^{-5}$  L,

$\Delta t$  = variação do tempo em min.,

$p = 0,0005164 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,

$v$  = volume da amostra utilizado no ensaio,

$d = 10$  mm,

$p$  = concentração da amostra enzimática utilizada no ensaio em  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ .

A atividade catalítica enzimática  $Z / m$  é dada em  $\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$ . A capacidade de inibição da AChE foi expressa em porcentagem de inibição da enzima sendo determinada pela comparação da atividade da enzima frente a um branco e a uma solução contendo a amostra a ser analisada.

## 5.9 Fracionamentos dos Extratos Promissores

Os extratos mais promissores, que apresentaram atividade antioxidante e anticolinesterásica, foram submetidos a processos de separação (partição) dando origem a 5 frações (hexânica, clorofórmica, butanólica, hidrometanólica e acetato), conforme Apêndices 1 e 2. Posteriormente, cada fração foi submetida a uma filtração em sílica dando origem a subfrações. Das frações hexânica, obtiveram-se subfrações, onde foram utilizados os seguintes solventes: hexano, hexano/clorofórmio (1:1), clorofórmio, clorofórmio/metanol (1:1) e metanol. Nas frações clorofórmicas, os solventes utilizados foram: clorofórmio, clorofórmio/acetato (1:1), acetato, acetato/metanol (1:1) e metanol.

## 5.10 Identificação de Compostos Fenólicos e Ácidos Orgânicos

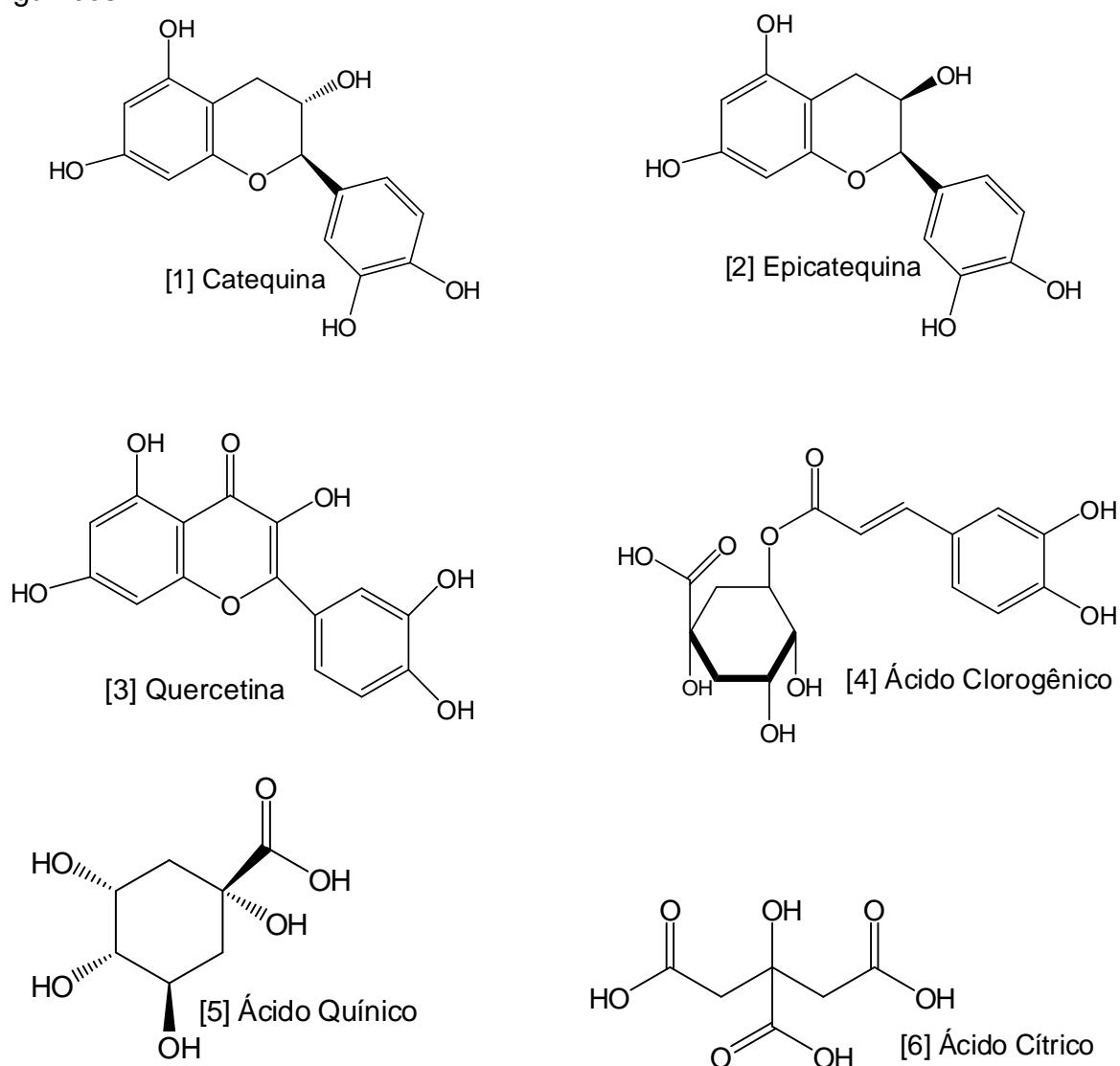
A separação e identificação de compostos fenólicos e ácidos orgânicos foi realizada utilizando Cromatografia Líquida de Ultra Performance diretamente acoplada à espectrometria de massas (Ultra Performance Liquid Chromatography – UPLC – MS), do Departamento de Biologia Vegetal do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP (Figura 27).

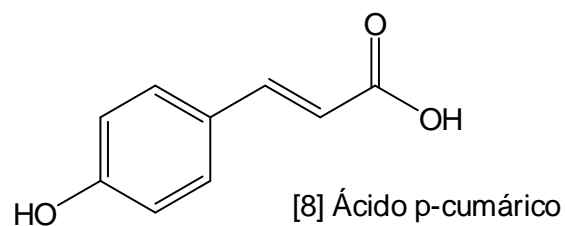
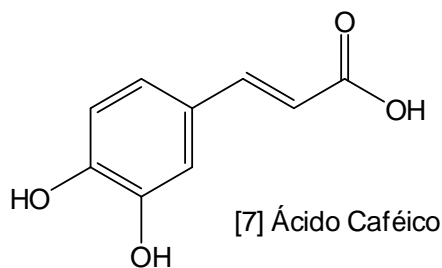
Os extratos foram analisados na concentração de 10 mg.mL<sup>-1</sup>. A separação cromatográfica (com injeção de 3 µL) foi realizada em um sistema Acquity UPLC (Waters, Milford, MA, EUA), utilizando uma coluna BEH UPLC (2,1 x 50 mm, tamanho da partícula de 1,7 mm) a uma temperatura de 30°C. Utilizou-se o gradiente (A): água purificada Milli-Q acidificada com ácido fórmico a 0,1% e o gradiente (B): acetonitrila (Tedia Brazil) começando com 5% do gradiente B e aumentando até 100% do gradiente B, por 9 minutos, mantido até 9,5 minutos e, então, retornando às condições iniciais.

A detecção foi realizada por eletrospray no modo de íons negativos em um espectrômetro de massa Acquity TQD (Micromass Waters, Milford, MA, EUA), operando nas seguintes condições: capilar – 3000 V, cone – 30 V, fonte de temperatura de 150°C, na faixa de 110 a 1000 m / z.

Os padrões utilizados foram a catequina [1], epicatequina [2], quercetina [3], ácido clorogênico [4], ácido quínico [5], ácido cítrico [6], ácido caféico [7] e ácido *p*-cumárico [8] (Sigma®, USA), (Figura 26) (Apêndice 3), todos na concentração de 1 mg.mL<sup>-1</sup>. Os Compostos foram identificados e quantificados em comparação com padrões.

Figura 26 - Padrões utilizados na determinação dos compostos fenólicos e ácidos orgânicos.





Fonte: Autor desta tese, 2012.

### 5.11 Análises Estatísticas

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. Os ensaios foram realizados em triplicata para cada amostra. Resultados expressos como médias e desvios padrões e analisados através do programa estatístico SAEG 9.1 (Sistema para Análise Estatística, MG, Brasil). Análise de variância e teste de média usando teste de Tukey foi realizado para comparação das diversas amostras estudadas. Correlações de Spearman foram utilizadas para determinar se os compostos bioativos contribuem para a capacidade antioxidante.

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 Prospecção Fitoquímica

A prospecção fitoquímica foi realizada com o objetivo de identificar previamente as classes de compostos presentes nos extratos. O conhecimento prévio das classes de componentes químicos encontrados nos vegetais é necessário para fornecer a relação dos princípios ativos. Sendo detectada a presença de determinados grupos químicos, o estudo fitoquímico e biológico é direcionado (Lôbo et al., 2010).

Existem relatos de esteróis, terpenóides, flavonóides, alcalóides e outros compostos fenólicos apresentando atividade antiacetilcolinesterase (Ji & Zhang, 2008). A classe dos compostos fenólicos possui mais de 8.000 substâncias identificadas divididas em grupos, de acordo com sua estrutura química, como ácidos fenólicos, estilbenos, cumarinas, ligninas e flavonóides. Vários estudos *in vitro* demonstraram que os flavonóides, incluindo flavonóis, flavonas, isoflavonas, flavonóides e antocianidinas, possuem atividade antioxidante (Ross & Kasum, 2002).

O interesse pela classe de polifenóis é devido à sua grande abundância na dieta e ao seu papel na prevenção de várias doenças associadas ao estresse oxidativo.

A triagem fitoquímica dos extratos revelou a presença de fenóis e taninos nas cascas e sementes dos frutos de siriguela e umbu; antocianinas, proantocianidinas e flavonóides na casca da siriguela; leucoantocianidinas, catequinas e flavanonas na casca do fruto jenipapo e sementes de siriguela, umbu e jenipapo; antraquinonas, antrona e cumarinas nas cascas e sementes dos frutos de siriguela e umbu; triterpenóides e esteróides em todas as amostras; e saponinas apenas nas sementes da siriguela. Nas polpas não foi possível à identificação de nenhuma classe devido à formação de precipitados durante os testes. A mangaba (casca + polpa) não apresentou nenhum resultado na triagem (Tabela 5).



Tabela 5 - Prospecção fitoquímica dos extratos dos frutos.

Extratos Etanólicos		Fenol e Taninos	Antocianinas, proantocianidinas e flavonóides	Leucoantocianidinas, catequinas e flavanonas	Antraquinonas, antrona e cumarinas	Flavonóis, flavanonas e xantonas	Triterpenóides e esteróides	Saponinas
<b>Jenipapo</b>	Casca	-	-	+	+	-	+	-
	Semente	-	-	+	+	-	+	-
	Polpa <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-	-
<b>Siriguela</b>	Casca	+	+	-	+	-	+	-
	Semente	+	-	+	+	-	+	+
	Polpa <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-	-
<b>Umbu</b>	Casca	+	-	-	+	-	+	-
	Semente	+	-	+	+	-	+	-
	Polpa <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-	-
<b>Mangaba</b>	Casca + Polpa	-	-	-	-	-	-	-

<sup>a</sup> Não foi possível à identificação de nenhuma classe devido à formação de precipitados. (+) = Presença e (-) = Ausência.  
 Fonte: Autor desta tese, 2012.

## 6.2 Citotoxicidade dos Extratos

Alguns produtos derivados de plantas são realmente prejudiciais à saúde. Portanto, estudos de citotoxicidade são necessários e podem indicar o perfil tóxico de extratos de plantas (Oke & Aslim, 2010). Charles et al. (2002) relatam a importância de conhecer o nível de toxicidade dos alimentos devido à presença de inúmeras substâncias, sendo que as mesmas podem variar em diferentes tipos de plantas e entre suas variedades.

Os extratos foram avaliados utilizando células epiteliais da córnea de ovelhas, a fim de avaliar os efeitos citotóxicos dos extratos dos frutos sobre as células normais, utilizando o método de exclusão do azul de Tripan. Os extratos etanólicos das partes dos frutos, em concentrações de 100 ppm, não apresentaram citotoxicidade (Tabela 6).

**Tabela 6.** Efeitos dos extratos etanólicos das frutas sobre a viabilidade celular de células epiteliais da córnea de ovelhas.

<b>Extrato Etanólico (100 ppm)</b>		<b>Viabilidade Celular (%)</b>
<b>Jenipapo</b>	Casca	98,50 ± 0,53
	Semente	99,10 ± 0,18
	Polpa	100,00 ± 0,00
<b>Siriguela</b>	Casca	90,40 ± 0,39
	Semente	92,80 ± 0,61
	Polpa	99,60 ± 0,26
<b>Umbu</b>	Casca	98,90 ± 0,30
	Semente	92,00 ± 0,79
	Polpa	98,80 ± 0,53
<b>Mangaba</b>	Casca + Polpa	97,20 ± 0,53
<b>Controle Negativo:</b>	MEM + SFB a 10%	98,00 ± 0,25
<b>Controle Positivo:</b>	Formaldeído a 1%	16,20 ± 0,68

Nenhum dos extratos levou à redução da viabilidade celular abaixo de 90%. A importância de realizar esse ensaio está no fato das partes dos frutos (semente e casca) não serem comumente consumidas e não existirem relatos da citotoxicidade das polpas analisadas.

A avaliação da citotoxicidade em frutos é realizada ao devido seu grande consumo, principalmente quando são referidas partes como sementes e cascas.

Alguns estudos demonstram a importância dessa avaliação, como no extrato etanólico do fruto de vinha agriçoce (*Celastrus orbiculatus*) (Xu et al., 2008), em frutas e vegetais (Chiang et al., 2004) e para as cascas de coco (*Coco nucifera*), mangostão (*Garcinia mangostana*), pitaiá vermelha (*Hylocereus undulatus*), duku (*Lansium domesticum*), rambutão (*Nephelium lappaceum*), banana (*Musa sapientum*), maracujá (*Passiflora foetida*) e romã (*Punica granatum*) (Okonogi et al., 2007).

### **6.3 Conteúdos de ácido ascórbico (AA), fenóis totais (CFT) e métodos de avaliação de capacidade antioxidante**

Os conteúdos de ácido ascórbico dos extratos estão apresentados na Tabela 7, onde os maiores valores obtidos foram para a semente da siriguela ( $3,32 \text{ mg.g}^{-1}$ ), casca + polpa da mangaba ( $1,93 \text{ mg.g}^{-1}$ ) e polpa do umbu ( $1,74 \text{ mg.g}^{-1}$ ). Segundo a Coordenação Geral da Política de Alimentação e Nutrição, o teor de vitamina C dos frutos analisados demonstraram os seguintes valores:  $0,45 \text{ mg.g}^{-1}$  para siriguela e  $0,33 \text{ mg.g}^{-1}$  para o jenipapo, umbu e mangaba. Não havendo especificação se foi avaliado o fruto íntegro ou apenas a polpa (Brasil, 2002).

A literatura demonstra uma diversidade de valores; dentre estes tem-se  $190 \text{ mg.100 g}^{-1}$  e  $18,4 \text{ mg.100 g}^{-1}$  para a mangaba e o umbu, respectivamente (Rufino et al. 2010). Almeida et al. (2011) também apresentam valores diferentes para siriguela ( $29,6 \text{ mg.100 g}^{-1}$ ), mangaba ( $96,3 \text{ mg.100 g}^{-1}$ ) e umbu ( $12,1 \text{ mg.100 g}^{-1}$ ). Enquanto Genovese et al. (2008) informam  $2,5 \text{ mg.100 g}^{-1}$  para o umbu. Narain et al. (1992) relatam que o teor de ácido ascórbico diminui significativamente durante a maturação do fruto de umbu.

Com relação ao CFT, as sementes de siriguela e umbu e a casca do jenipapo apresentaram os maiores valores; a semente de jenipapo e casca da siriguela, valores intermediários, e as polpas de jenipapo, siriguela e umbu e a casca + polpa da mangaba, os menores valores (Tabela 7). Avaliando as polpas frescas de *H. speciosa* (mangaba), *S. purpurea* (siriguela) e *S. tuberosa* (umbu), Almeida et al. (2011) encontraram valores de 98,8, 55,0 e 44,6 mg de EAG (equivalentes de ácido

**Tabela 7**

gálico).100 g<sup>-1</sup>, respectivamente. Enquanto Rufino, Alves et al. (2010) relatam o valor de 169 mg EAG.100 g<sup>-1</sup> para a polpa fresca de *H. speciosa*.

Os valores observados na presente tese apresentaram-se abaixo do encontrado na literatura, porém, o material presente na literatura não apresenta a mesma característica do material trabalhado, pois os estudos citados só analisaram a polpa e não as partes separadas e nem na forma de extrato.

Tiburski et al. (2011), investigando o fruto cajá (polpa + casca) (*Spondia mombin* L.), que pertence à família Anacardiaceae, demonstraram conteúdo fenólico total de 260,21 mg EAG.100 g<sup>-1</sup>. Os frutos intactos (casca, polpa e sementes) de *Spondia pinnata* K., segundo Satpathy et al. (2011), apresentam valores de 210 mg EAG em 100 mg de extrato para CFT.

Orhan & Aslan (2009), avaliando a atividade antioxidante e anticolinesterásica, também foco da presente tese, em extratos etanólicos de sálvia (*Salvia triloba*), “Felty Germander” (*Teucrium polium*) e erva cidreira (*Melissa officinalis*) referem valores de 10,9 mg EAG.g<sup>-1</sup> de extrato, 107,8 mg EAG.g<sup>-1</sup> de extrato e 68,7 mg EAG.g<sup>-1</sup> de extrato, respectivamente. Em relação à família Anacardiaceae, Moyo et al. (2010), avaliando folha, casca do caule, casca do caule jovem e opérculo de *Sclerocarya birrea* subsp. *caffra* e *Harpephyllum caffrum*, obtiveram atividade anticolinesterásica significativa, com valores de CFT variando de 2,46 a 14,15 mg EAG.g<sup>-1</sup> de extrato.

Todos os extratos das partes dos frutos de jenipapo, siriguela e umbu, no presente estudo, apresentaram valores superiores aos obtidos por Orhan & Aslan (2009) e Moyo et al. (2010). Vale ressaltar que o reagente Folin-Ciocalteu, que é utilizado para determinar CFT, não é específico para compostos fenólicos, podendo também ser reduzido por muitos compostos não fenólicos, incluindo o ácido ascórbico (Karadag et al., 2009).

Quanto ao CFT, DPPH, ABTS, FRAP e CUPRAC, a Tabela 7 mostra os resultados obtidos a partir dos extratos etanólicos das partes dos frutos. Uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ) foi verificada entre todos os extratos analisados sendo, de um modo geral, o melhor desempenho observado no extrato da semente da siriguela.

O maior consumo de DPPH (Tabela 7) foi observado nas sementes e cascas da siriguela e umbu, mantendo a mesma tendência observada nas análises de CFT. O consumo de DPPH\* foi estabilizado em cerca de 27 minutos, o que indica o tempo de ação dos possíveis antioxidantes presentes nas amostras. Moyo et al. (2010), em *Sclerocarya birrea* subsp. *caffra* e *Harpephyllum caffrum* encontraram valores de %CSR, variando de 2,5 a 27,2%.

A IC<sub>50</sub> DPPH dos extratos mais promissores, aqueles que apresentaram, além da atividade antioxidante, a atividade de inibição da enzima acetilcolinesterase foram 36,37 µg.mL<sup>-1</sup>, 173,37 µg.mL<sup>-1</sup> e 1.069,13 µg.mL<sup>-1</sup>, para as sementes da siriguela e umbu e polpa do jenipapo, respectivamente. Gacche & Dhole (2011), avaliando o extrato etanólico de *Morinda cintrifolia* L., da mesma família do jenipapo, obtiveram IC<sub>50</sub> de 620 µg.mL<sup>-1</sup>, um IC<sub>50</sub> abaixo do evidenciado para a polpa do jenipapo.

Os valores de IC<sub>50</sub> para os extratos das folhas, caule jovem e opérculo de *Sclerocarya birrea* subsp. *caffra* e *Harpephyllum caffrum* (Anacardiaceae) variaram de 4,26 a 6,92 µg.mL<sup>-1</sup>, abaixo dos valores encontrados para a siriguela e umbu (Moyo et al., 2010). Estudo realizado por Gonçalves et al. (2010) também faz referência à baixa atividade antioxidante para a polpa do umbu, através dos métodos DPPH e ORAC.

O método ABTS é baseado na habilidade das moléculas antioxidantes em capturar o radical livre ABTS\*<sup>+</sup> (Arnao et al., 2001). Utilizando este método, os maiores valores foram observados nos extratos da casca da siriguela, seguidos pela semente da siriguela, umbu e jenipapo, permanecendo a mesma tendência observada no % DPPH já relatada para a semente e casca da siriguela e semente de umbu (Tabela 7).

Os melhores resultados apresentados pelas sementes são provavelmente atribuídos à sua composição química rica em fenóis e à presença de substâncias necessárias ao processo de germinação, como descrito por Martins et al. (2010). Almeida et al. (2011) encontraram valores de 6,25, 1,07 e 10,84 µM de Equivalentes ao Trolox (ET).g<sup>-1</sup> de massa fresca de siriguela, umbu e mangaba, respectivamente. Para manga da China (*Spondia pinnata* K.), Satpathy et al. (2011) relatam valores para o método ABTS em TEAC de 0,68 a 0,83 para 100 mg de extrato.

Entre os métodos antioxidantes baseados na redução de metais, os métodos FRAP e o CUPRAC foram empregados. Nestes métodos, os maiores valores foram observados nos extratos das cascas e sementes da siriguela e umbu, seguindo a mesma tendência relatada nos métodos anteriormente mencionados (Tabela 7). Satpathy et al. (2011) referem valores, utilizando o método FRAP, de 5,97 a 7,93 mg ET.100 mg<sup>-1</sup> de extrato para *Spondias pinnata* K .

Contreras-Calderon et al. (2010), avaliando a atividade antioxidante e o conteúdo total de fenóis de sementes de 12 famílias: Sapotaceae, Arecaceae, Caesalpinaceae, Myrtaceae, Pasifloraceae, Rubiaceae, Anacardiaceae, Cucurbitaceae, Sterculiaceae, Proteaceae, Caricaceae e Icacinaceae, encontraram valores através do método FRAP (1,40 a 1690 µmol ET.g<sup>-1</sup> por peso fresco), método ABTS (4,92 a 1700 µmol ET.g<sup>-1</sup> por peso fresco) e CTF (20,4 a 4851 mg de EAG.100 g<sup>-1</sup> por peso fresco).

Estudo realizado por Okonogi et al. (2007), avaliando a atividade antioxidante de extratos etanólicos das cascas de coco (*Cocos nucifera*), rambotã (*Nephelium lappaceum*), mangostão (*Garcinia mangostana*), fruta de dragão (*Hylocereus undulatus*), “long-gong” (*Lansium domesticum*), banana (*Musa sapientum*), maracujá (*Passiflora foetida*) e romã (*Punica granatum*), usando os métodos DPPH e ABTS, encontraram alta atividade antioxidante para romã, rambotã e mangostão.

Khonkarn et al. (2010), investigando a atividade antioxidante de extratos etanólicos das cascas de coco (*Cocos nucifera*), rambotã (*Nephelium lappaceum*) e mangostão (*Garcinia mangostana*), relatam excelente atividade antioxidante, utilizando os métodos ABTS e FRAP. Qader et al. (2011), avaliando a atividade antioxidante e o conteúdo total de fenóis, verificaram na maioria das plantas analisadas que os maiores valores obtidos foram para os extratos etanólicos.

Baseado nos resultados obtidos nos métodos anteriormente descritos, os extratos etanólicos da casca e semente de siriguela apresentaram os melhores resultados, enquanto as polpas, de forma geral, demonstraram menor atividade.

Correlação entre o CFT e os métodos de avaliação da capacidade antioxidante DPPH, ABTS, FRAP e CUPRAC

Os dados apresentados na Tabela 8 foram normalizados e analisados por intermédio da análise de variância, teste de Tukey e correlação de Spearman. Os resultados dessas análises estão demonstrados também na Figura 28.

Na Tabela 8 encontram-se os resultados da análise de correlação de Spearman entre as diversas variáveis. Em geral, verifica-se que houve correlação entre todas as variáveis estudadas, destacando-se aquelas que os coeficientes de correlações foram superiores a 0,7000, que apresentaram significância ao nível de 1%.

Tabela 8 - Correlações de Spearman entre as variáveis CFT e os métodos de avaliação da capacidade antioxidante DPPH, ABTS, FRAP e CUPRAC.

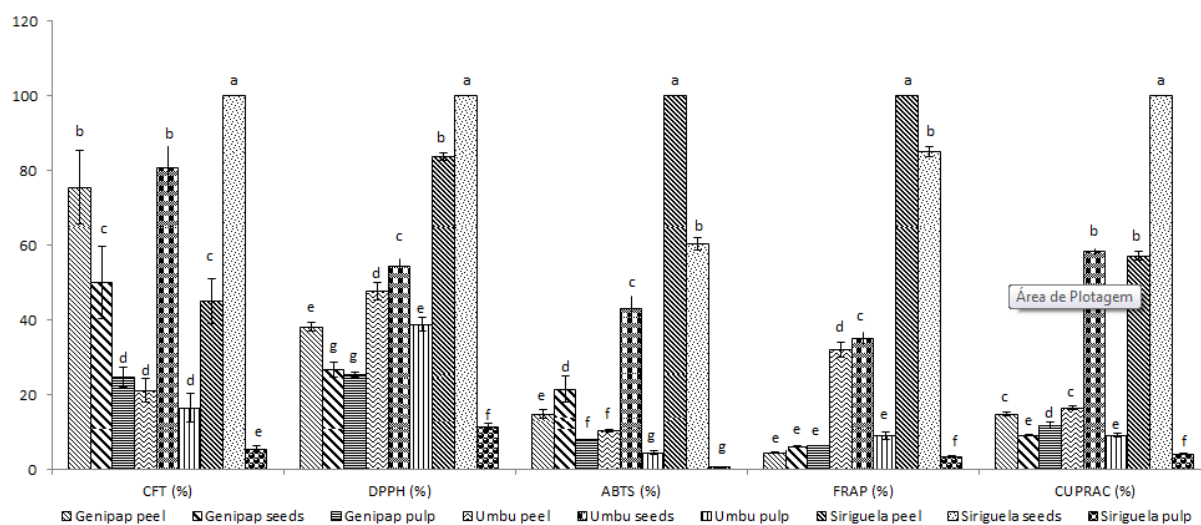
<b>Variável 1</b>	<b>Variável 2</b>	<b>Correlação</b>
CFT	ABTS	0,8036**
CFT	FRAP	0,4745*
CFT	CUPRAC	0,7105**
CFT	DPPH	0,5894*
ABTS	FRAP	0,7631**
ABTS	CUPRAC	0,7234**
ABTS	DPPH	0,7430**
FRAP	CUPRAC	0,7324**
FRAP	DPPH	0,8232**
CUPRAC	DPPH	0,8673**

\*, \*\* Significativo a 5 e 1%, respectivamente.

Verifica-se que as amostras de semente e casca de siriguela apresentaram um desempenho significativo ( $P < 0,05$ ) em relação às demais amostras (Figura 27).



Figura 27 - Análise do desempenho das partes dos frutos entre os métodos de avaliação da capacidade antioxidante.

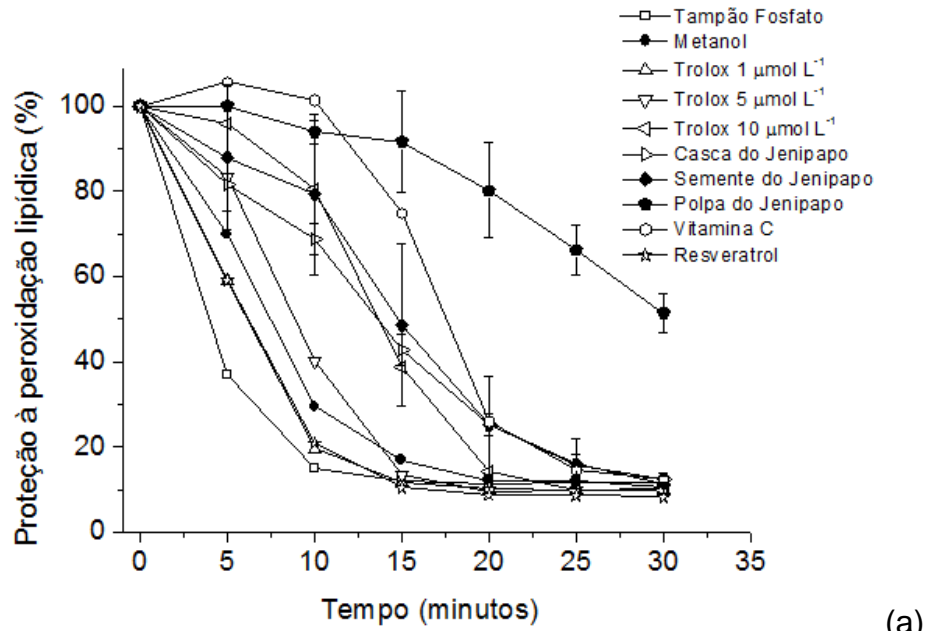


Estudos sugerem uma forte correlação entre os métodos ABTS e CFT (Dykes et al., 2005; Contreras-Calderón et al., 2010) e entre FRAP e ABTS (Vasco et al., 2008; Rufino et al., 2010). Kalt et al. (1999), Thaipong et al. (2006) e Santos et al. (2008) relatam forte correlação entre todos os métodos antioxidantes avaliados. Fato também observado na presente tese.

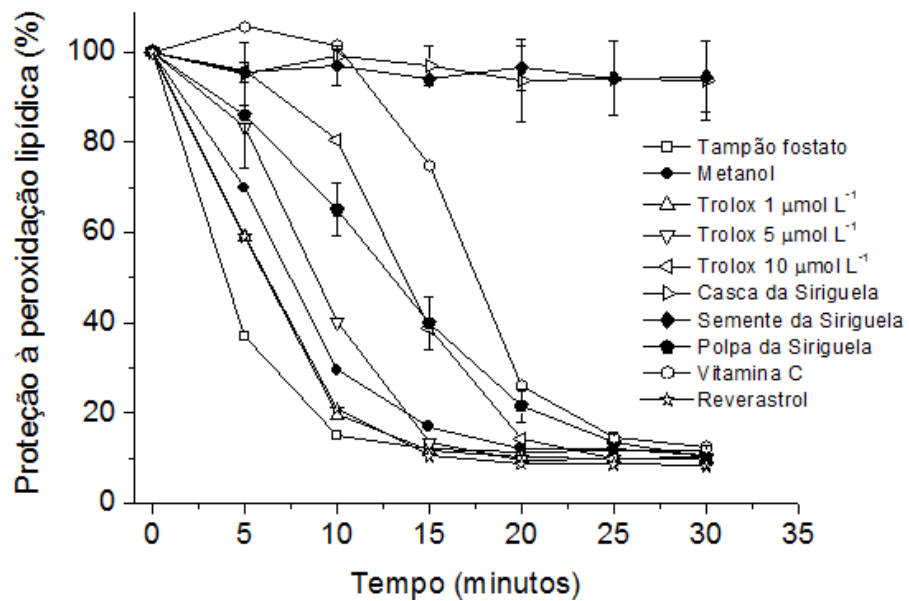
#### 6.4 Capacidade Antioxidante de um Sistema de Membranas Biomimético (Método sintético)

As Figuras 28a, 28b, 28c e 28d apresentam a proteção dos extratos das frutas, na concentração de  $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ , contra a peroxidação lipídica em percentual (%), em função do tempo (tempo total de 30 minutos). O extrato da casca + polpa da mangaba demonstrou uma proteção maior que 95%, por 10 minutos. Os extratos da polpa do jenipapo, casca e semente do umbu mostraram bom desempenho, apresentando mais de 95% de proteção da membrana por 15 minutos. Já os extratos da casca e semente da siriguela apresentaram os melhores resultados, protegendo a membrana, mais de 95%, por mais de 30 minutos. Estes resultados foram considerados melhores do que aqueles observados nos controles positivos (Trolox - 1, 5 e  $10 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ ; vitamina C -  $100 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$  e resveratrol -  $100 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ ).

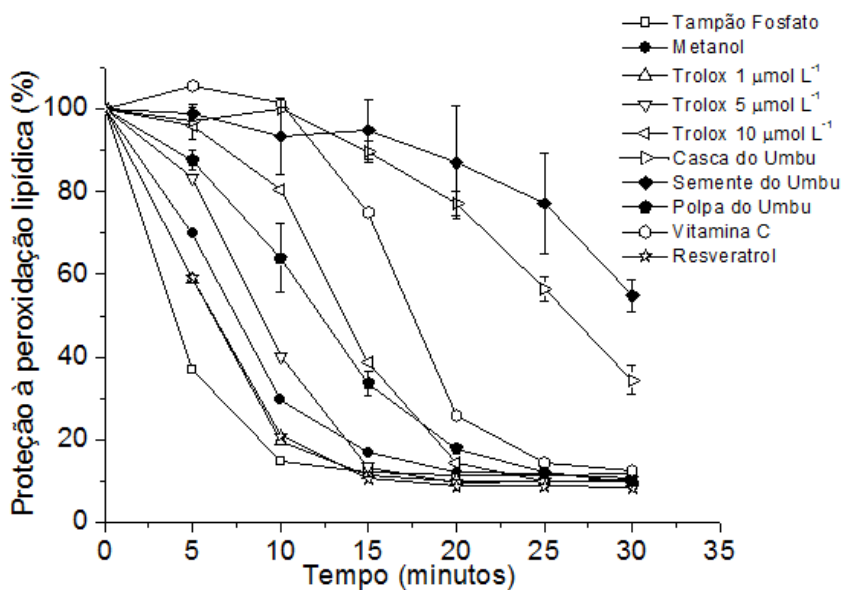
Figura 28 - Proteção contra a peroxidação lipídica provenientes dos extratos (0,5 mg mL<sup>-1</sup>) de diferentes partes dos frutos (a) jenipapo, (b) siriguela, (c) umbu e (d) mangaba.



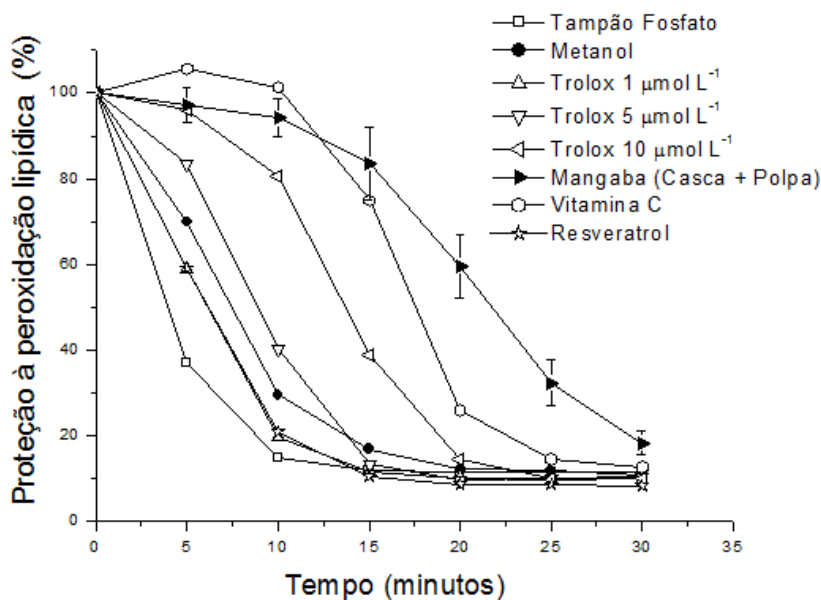
(a)



(b)



(c)



(d)

Os resultados indicam que os extratos da polpa do jenipapo, casca e semente da siriguela e casca e semente do umbu possuem compostos com ação sinérgica, devido possuírem um tempo de proteção maior do que os controles. Com base no relato anterior, não seria possível um único composto antioxidante presente em cada extrato avaliado permanecer com a proteção contra a peroxidação lipídica. Conclusão obtida através da observação do comportamento dos controles.

As interações de vários compostos podem resultar em uma sinergia, dando origem a uma atividade antioxidante prolongada. A interação biológica mais eficiente

parece ser o sinergismo antioxidante entre a vitamina E e a vitamina C. A vitamina C reduz a vitamina E radicalar para regenerá-la, antes que a mesma seja atacada, induzindo a oxidação lipídica (Niki, 2010).

Zaini et al. (2011), investigando a atividade antioxidante *in vitro* de frutas Kundur [*Benincasa hispida* (Thunb.)] verificaram que a semente desta fruta apresentava maior capacidade inibitória contra a oxidação do ácido linoléico e maior ação de captura do radical DPPH<sup>•</sup> do que as outras partes do fruto (casca e polpa). Isto pode ser devido ao maior conteúdo de fenóis totais e à atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) presentes nas sementes, sendo semelhante aos resultados observados no presente estudo para as sementes da siriguela e umbu. Pande & Akoh (2010) relatam que as sementes de vários frutos subutilizados contêm um alto conteúdo de polifenóis, seguido das cascas e polpas.

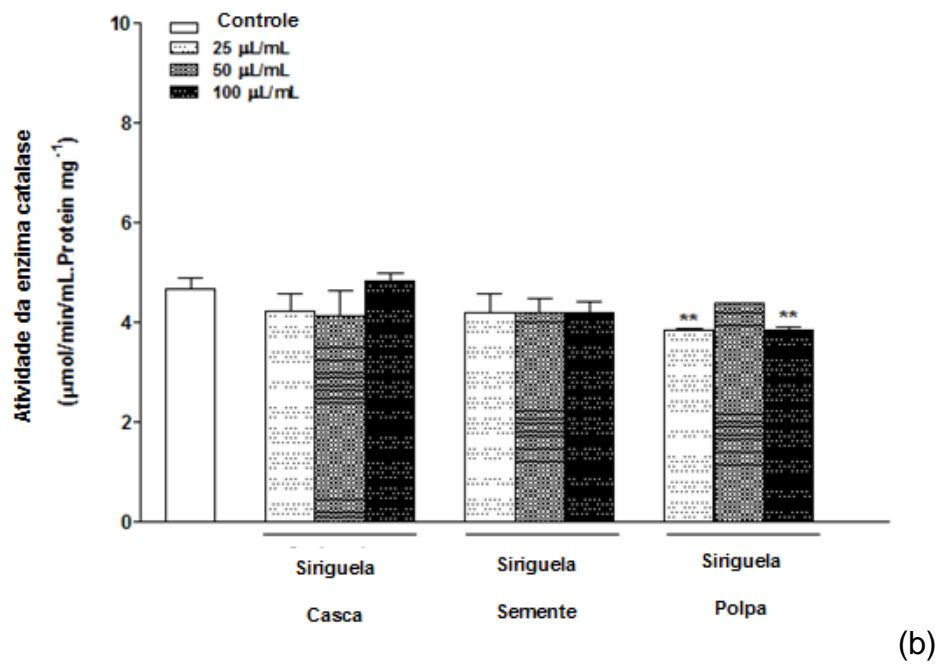
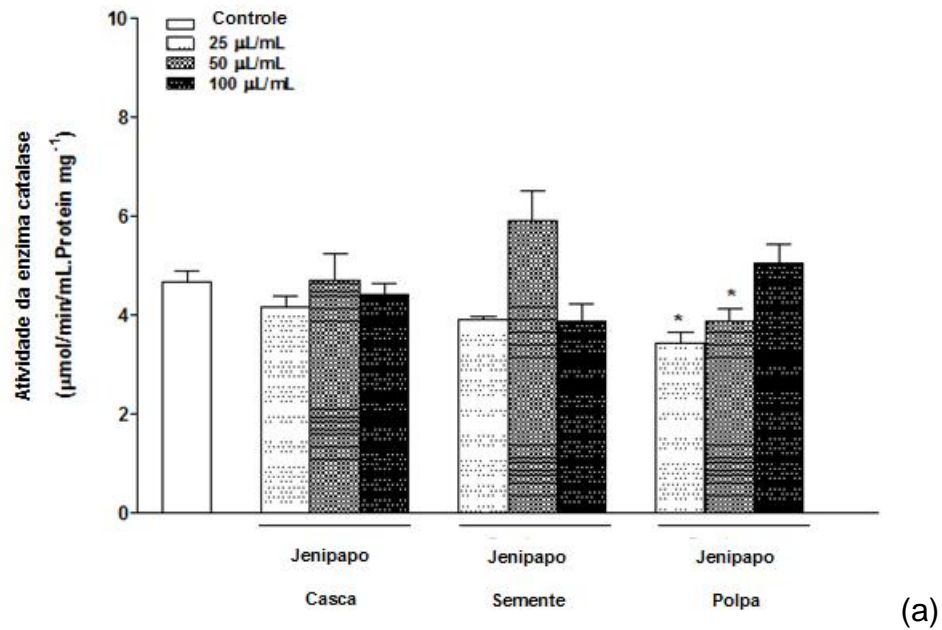
De acordo com Karadag et al. (2009), a capacidade antioxidante de alimentos e sistemas biológicos complexos e heterogêneos pode ser afetada por muitos fatores, incluindo as propriedades de particionamento dos antioxidantes entre as fases aquosa e lipídica, as condições de oxidação e o estado físico do substrato oxidável.

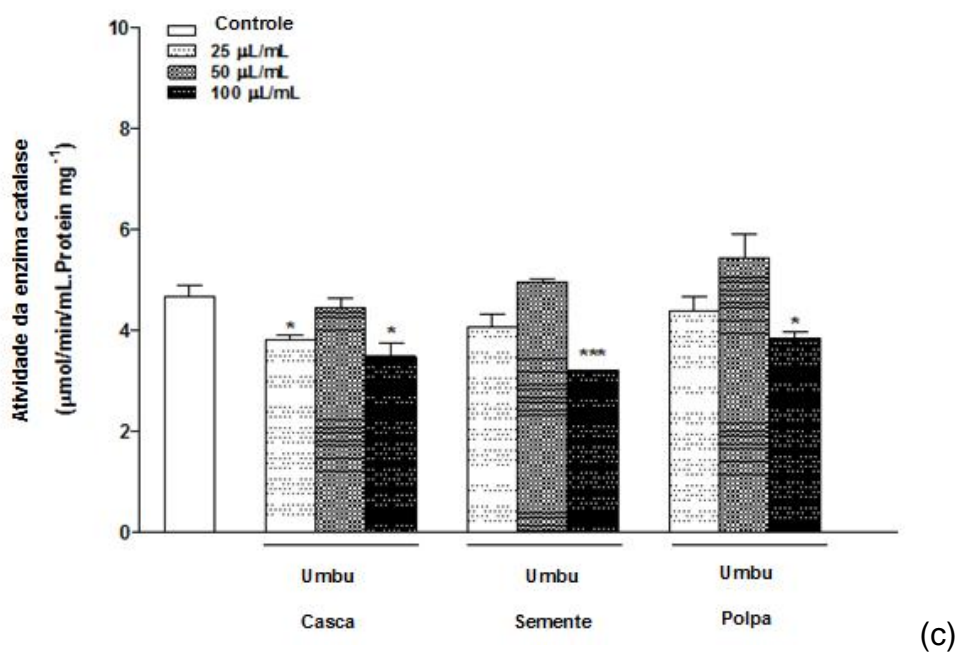
## **6.5 Mensuração da atividade da enzima catalase**

A catalase (EC 1.11.1.6) é uma enzima antioxidante, cujo sítio ativo contém o grupo heme, e está enclausurada no peroxissoma, a principal organela responsável pela desintoxicação celular e pela oxidação de ácidos graxos de cadeia longa, fonte inesgotável de peróxidos orgânicos, produtos carbonílicos e oxigênio singlete. É encontrada, também, nas mitocôndrias das células do tecido cardíaco (Vasconcelos et al., 2007).

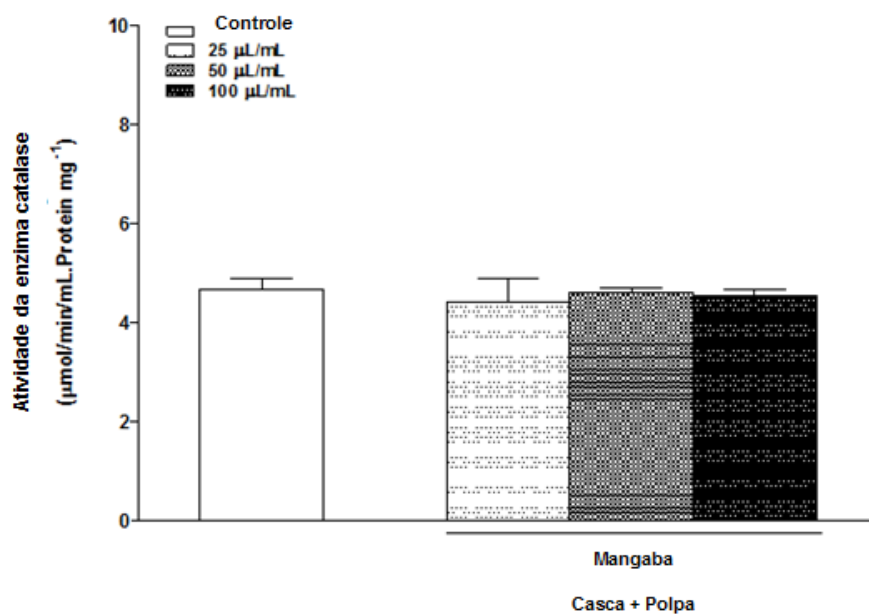
O ensaio foi realizado utilizando um homogenato hepático proveniente de camundongos, no qual já se tinha conhecimento da atividade enzimática da catalase. Este ensaio tem como objetivo verificar a ação do extrato frente à atividade da enzima definindo, dessa forma, a melhor concentração do extrato para a atividade enzimática. Os resultados dos extratos estão expressos na Figura 29.

Figura 29 - Atividade da enzima catalase frente aos extratos (25, 50 e 100  $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) de diferentes partes dos frutos (a) jenipapo, (b) siriguela, (c) umbu e (d) mangaba. \* $P < 0,05$  vs controle; \*\* $P < 0,01$  vs controle; \*\*\* $P < 0,001$  vs controle.





(c)



(d)

Após os experimentos (Figura 29) verificou-se, com relação aos extratos do fruto jenipapo (Figura 29a), que a concentração de 50  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  da casca e semente apresentou uma atividade da enzima maior que o controle. Porém, as concentrações de 25 e 50  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  da polpa demonstraram atividade menor que o controle ( $P < 0,05$ ). Nos extratos da casca mais polpa da mangaba (Figura 29d) e casca e semente da siriguela (Figura 29b) não se observou do controle.

As concentrações de 25 e 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  da polpa da siriguela demonstraram valores menores que o controle ( $P < 0,01$ ). No que se refere aos extratos do fruto umbu (Figura 29c) verificaram-se diferença do controle para as concentrações de 25 e 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  da casca e 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  da polpa ( $P < 0,05$ ), e para 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  da semente ( $P < 0,001$ ), com valores superiores para o controle. De forma geral, a maioria dos extratos não apresentaram diferença do controle utilizado, o homogenato hepático sem os extratos.

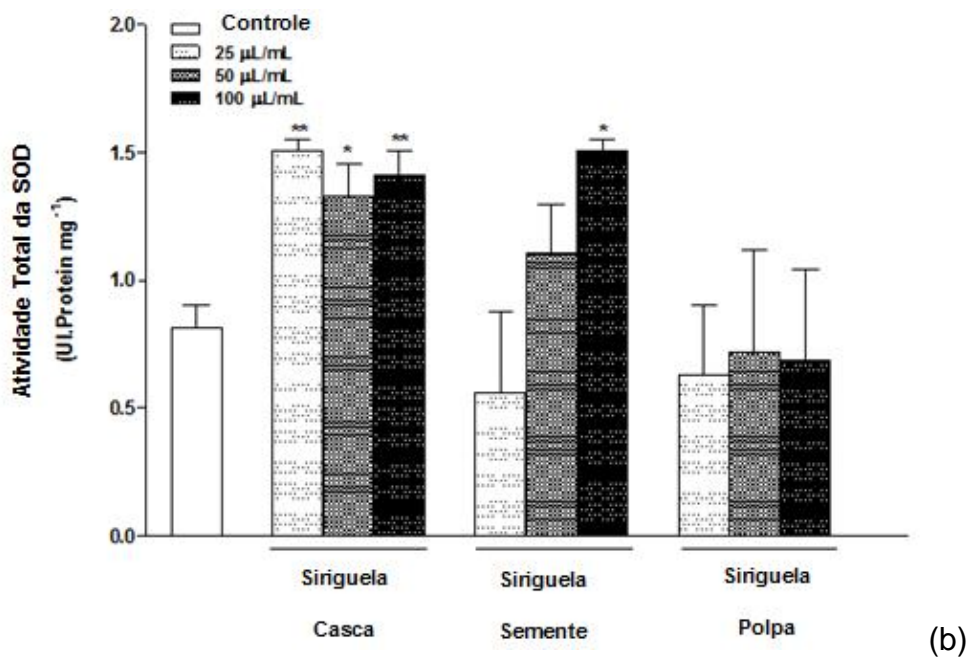
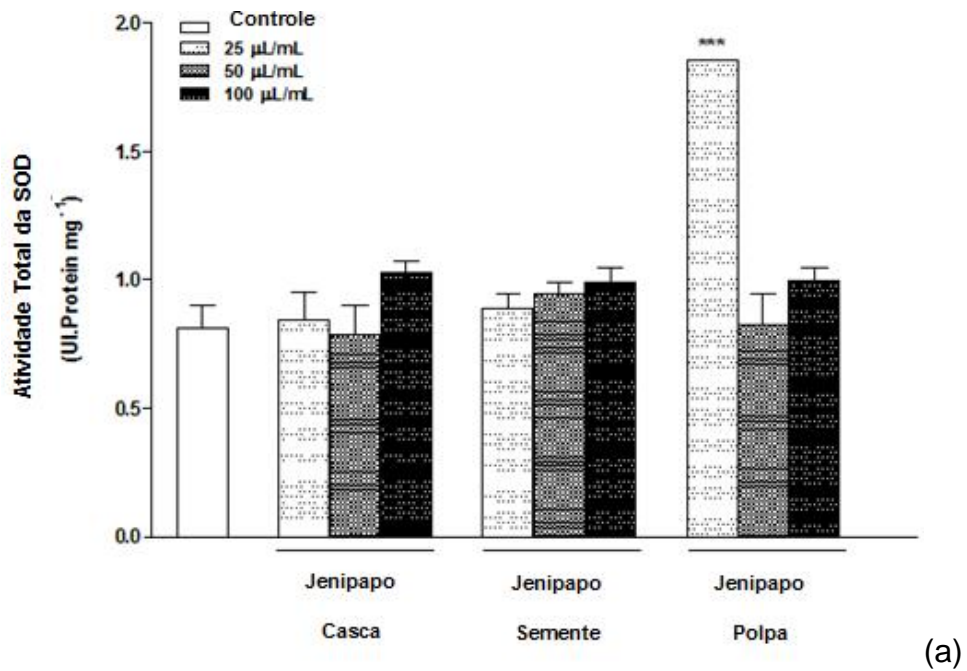
### **6.6 Mensuração da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD)**

Na avaliação da atividade da enzima superóxido dismutase através da inibição da Xantina Oxidase (XO), utilizando o mesmo homogenato hepático descrito anteriormente, observou-se que dentre os extratos das partes do fruto jenipapo (Figura 30a), a concentração de 25  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  da polpa apresentou uma atividade superior à verificada no controle ( $P < 0,001$ ).

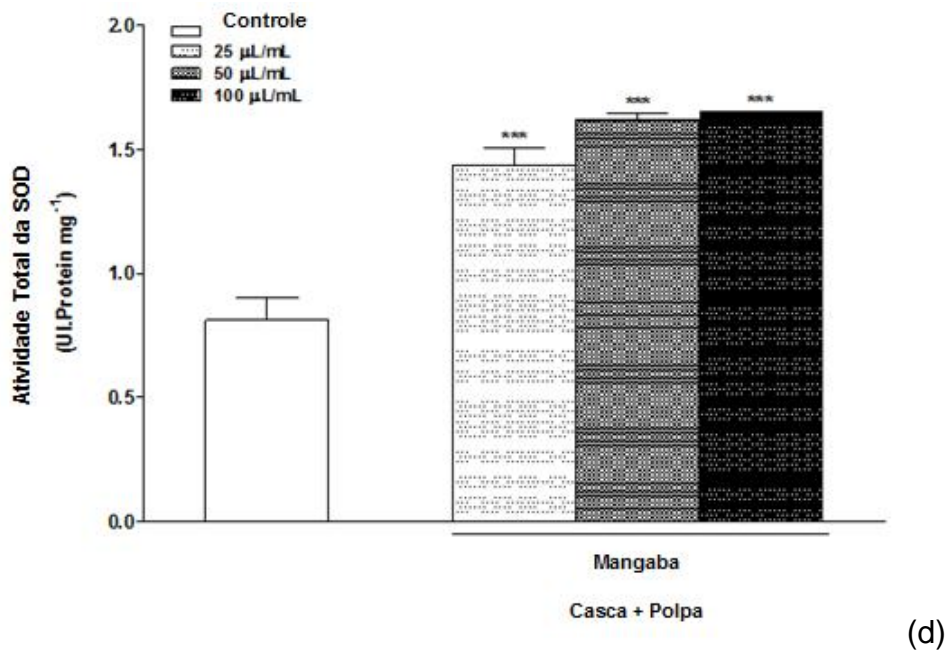
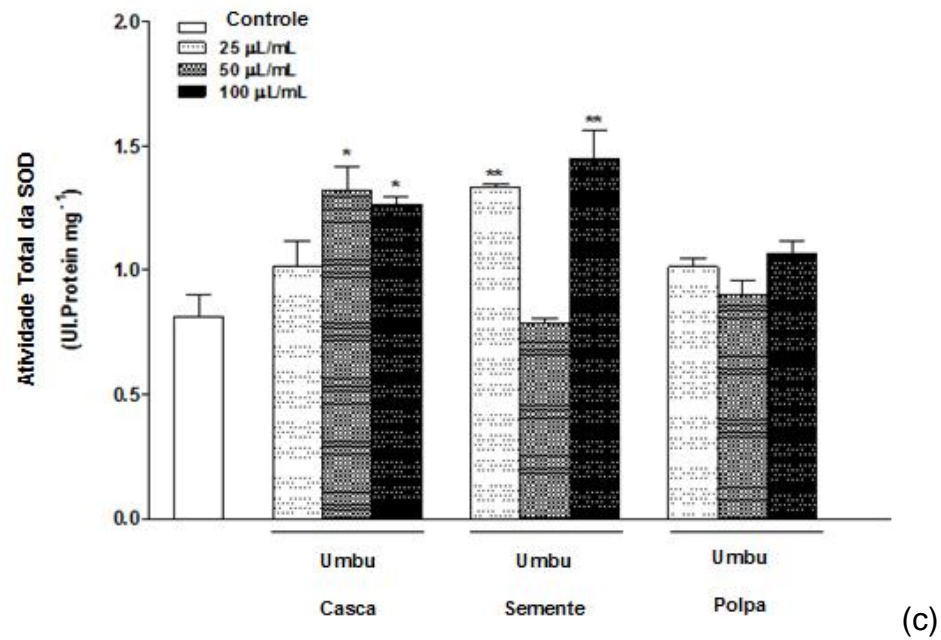
No referente aos extratos da siriguela (Figura 30b), o extrato da casca apresentou as três concentrações; 25 e 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  ( $P < 0,01$ ) e 50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  ( $P < 0,05$ ) quando comparadas com o controle. Também foi observada diferença do controle na concentração de 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  da semente ( $P < 0,05$ ). Em todos os casos, o fruto apresentou melhores resultados.

No que diz respeito ao fruto de umbu (Figura 30c), o extrato da casca nas concentrações de 50 e 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  apresentaram valores superiores ao controle ( $P < 0,05$ ). Também foi observado na semente que as concentrações de 25 e 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  apresentaram valores superiores ao controle ( $P < 0,01$ ). Para o fruto da mangaba (Figura 30d), todas as concentrações apresentaram valores superiores ao observado no controle ( $P < 0,001$ ).

Figura 30 - Atividade da enzima superóxido dismutase frente aos extratos (25, 50 e 100  $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) de diferentes partes dos frutos (a) jenipapo, (b) siriguela, (c) umbu e (d) mangaba. \* $P < 0,05$  vs controle; \*\* $P < 0,01$  vs controle; \*\*\* $P < 0,001$  vs controle.







Xantina oxidase (XO) é a enzima responsável pela transformação tanto da hipoxantina em xantina, quanto desta em ácido úrico, tendo como consequência a produção de peróxido de hidrogênio e radical superóxido; por isso, é considerada uma das principais fontes biológicas de espécies reativas de oxigênio. Devido ao fato relatado anteriormente, é possível que a inibição deste processo enzimático por

compostos que exibem propriedades antioxidante ou inibitória da xantina oxidase possam ter uso terapêutico (Alves et al., 2010).

## 6.7 Inibição da enzima acetilcolinesterase

### 6.7.1 Ensaio Qualitativo

A inibição parcial da atividade da AChE no cérebro demonstra benefícios terapêuticos. Inibidores da AChE que atravessam a barreira hematoencefálica elevam os níveis de acetilcolina endógena e são úteis no tratamento sintomático da doença de Alzheimer (Rosenberry et al., 2008).

A Tabela 9 mostra que os extratos etanólicos da polpa do jenipapo e das sementes de umbu e siriguela apresentaram atividade de inibição da enzima acetilcolinesterase. Os extratos da polpa do jenipapo e semente da siriguela apresentaram uma zona de inibição da AChE semelhante ao controle positivo.

**Tabela 9.** Atividade de Inibição da enzima acetilcolinesterase dos extratos etanólicos das partes dos frutos: jenipapo, siriguela, umbu e mangaba.

Extrato Etanólico (2 mg mL <sup>-1</sup> )		Zona de inibição da AChE (cm)	Extrato Etanólico (2 mg mL <sup>-1</sup> )		Zona de inibição da AChE (cm)
Jenipapo	Casca	–	Umbu	Casca	–
	Semente	–		Semente	0,5 ± 0,1
	Polpa	0,8 ± 0,1		Polpa	–
Siriguela	Casca	–	Mangaba	casca e polpa	–
	Semente	0,9 ± 0,1			–
	Polpa	–			–
Carbacol - 0,01 mol L <sup>-1</sup> (controle positivo)					1,0 ± 0,1
Metanol e etanol (controle negativo)					–

Não existem relatos na literatura sobre essa atividade nos extratos analisados. Com base nos resultados obtidos, os extratos mais promissores foram o da polpa do

jenipapo e da semente da siriguela. Porém, existem alguns relatos sobre plantas da mesma família, como o descrito por Williams et al. (2011), que fazem referência à ingestão de café (*Coffea arabica* L., Rubiaceae), onde se tem associado a um risco reduzido de demência.

De acordo com os dados obtidos observou-se a mesma tendência encontrada nos testes de atividade antioxidante, através dos métodos CFT, DPPH, ABTS, FRAP e CUPRAC, e a inibição da enzima acetilcolinesterase para os extratos das sementes de siriguela e umbu, mas não sendo observado na polpa do jenipapo. Porém, quando o método antioxidante utilizado foi a peroxidação lipídica, utilizando uma membrana biomimética mediada por um radical peroxila, obteve-se uma atividade antioxidante satisfatória para os extratos das sementes de siriguela e umbu e polpa do jenipapo.

No que diz respeito às atividades verificadas no extrato da polpa do jenipapo, pode-se supor que as mesmas não são atribuídas aos compostos fenólicos, devido ao baixo teor encontrado em comparação com os demais extratos. Testou-se a atividade anticolinesterase de uma substância já identificada no fruto do Jenipapo, a genipina, porém, não se observou nenhuma atividade na concentração de 1 mg.mL<sup>-1</sup> e 2 mg.mL<sup>-1</sup>. Enquanto nos extratos da siriguela e umbu, estes compostos podem ser diretamente responsáveis por tais atividades, como indicado na triagem fitoquímica.

Devido à diversidade fitoquímica e às fases aquosa e lipídica em alimentos, é razoável sugerir a existência de várias substâncias que interagem para fins comuns. Desse modo, uma substância responsável pela proteção das plantas pode atuar como um antioxidante e também como um inibidor da enzima acetilcolinesterase.

Esta metodologia tem sido utilizada com o objetivo de promover uma triagem inicial de possíveis inibidores da enzima acetilcolinesterase. Rhee et al. (2001) em triagem de 15 extratos de Amarillidaceae encontraram possíveis candidatos para o isolamento de inibidores da enzima acetilcolinesterase.

#### 6.7.2 Ensaio Quantitativo em microplaca

A restauração dos níveis de ACh, que são perdidos progressivamente durante a evolução de algumas doenças neurodegenerativas, retarda a perda da função cognitiva. Estudos relatam que os inibidores de AChE aliviam sintomas neuropsiquiátricos em pacientes com Alzheimer (Custódio et al., 2012).

A partir do teste qualitativo descrito anteriormente foram selecionados os extratos etanólicos mais promissores (polpa do jenipapo e semente da siriguela) para a realização do teste quantitativo. Devido à grande complexidade dos extratos brutos, fato que poderia dar origem a resultados imprecisos, os extratos foram submetidos a processos de separação (partição), dando origem a 5 frações (em hexano, em clorofórmio, em acetato de etila, em butanol e fração hidrometanólica). Posteriormente cada fração foi submetida a uma filtração em sílica, dando origem a subfrações (Apêndices 1 e 2).

Após o ensaio inibitório quantitativo, as frações e subfrações que apresentaram inibição e os respectivos percentuais foram da polpa do jenipapo: fração hexânica - filtração metanólica (35,60%), fração clorofórmica - filtração metanólica (16,99%) e fração clorofórmica - filtração acetato (11,08%), e da semente da siriguela: fração clorofórmica – filtração acetato/metanol (34,39%), fração hexânica – filtração clorofórmio/metanol (28,69%) e fração hexânica – filtração hexano/clorofórmio (12,45%).

Vinutha et al. (2007) classificam os extratos em quatro categorias, com relação à atividade inibitória da AChE (%): potente (> 50% de inibição), moderada (30 – 50% de inibição), baixa (< 30% de inibição) ou nula (< 5% de inibição) utilizando a concentração de 100 µg.mL<sup>-1</sup>. Segundo esta classificação, dois dos extratos acima estão na classificação de moderada (polpa do jenipapo: fração hexânica - filtração metanólica e semente da siriguela: fração clorofórmica – filtração acetato/metanol) e o restante apresentou baixa inibição. A eserina (Fisostigmina), substância utilizada como padrão no ensaio, apresentou uma atividade inibitória da AChE de 96%.

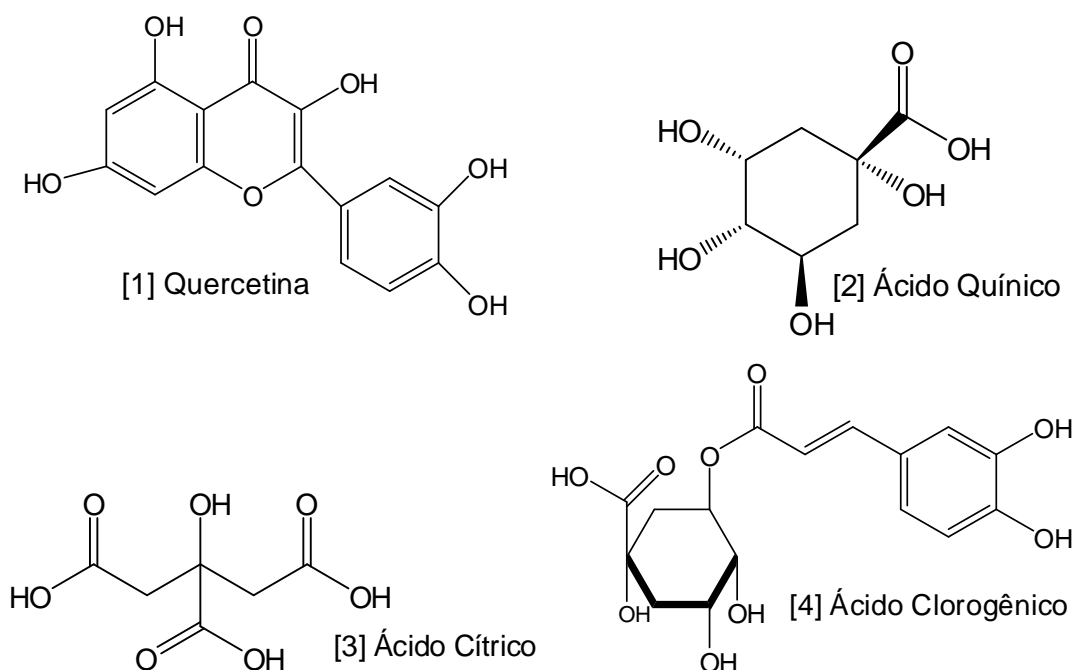
Extratos metanólicos de *Harpephyllum caffrum* (casca) e *Sclerocarya birrea* (tronco jovem), família Anarcadiaceae, a mesma dos frutos siriguela e umbu, apresentaram, na fração diclorometano, as seguintes atividades inibitórias: 59,9 e 59,0%, respectivamente. Já a fração metanol registrou a maior atividade inibitória (73,8%) para o extrato de *Sclerocarya birrea* (Moyo et al., 2010).

Vale ressaltar que a atividade de inibição da enzima acetilcolinesterase pode ser atribuída à interação de uma ou mais substâncias e, dessa forma, após o fracionamento, essa atividade pode ter sido perdida ou diminuída.

### 6.1 Análise dos extratos por UPLC / MS

Por meio da realização das análises por UPLC / MS, foram identificados os seguintes compostos (Figura 31): quercetina [1], ácidos quínico [2] e cítrico [3], e ácido clorogênico [4] (Apêndices 3, 4 e 5).

Figura 31 - Compostos identificados através das análises por UPLC / MS.



Fonte: Autor desta tese, 2012.

A quercetina foi predominante na maioria dos extratos analisados: casca do jenipapo ( $48,38 \pm 0,97 \mu\text{g.g}^{-1}$ ), semente do jenipapo ( $34,73 \pm 0,69 \mu\text{g.g}^{-1}$ ), casca do umbu ( $32,65 \pm 0,65 \mu\text{g.g}^{-1}$ ), casca da siriguela ( $31,44 \pm 0,63 \mu\text{g.g}^{-1}$ ), polpa do jenipapo ( $9,84 \pm 0,20 \mu\text{g.g}^{-1}$ ) e na polpa da siriguela ( $3,88 \pm 0,08 \mu\text{g.g}^{-1}$ ).

Dentre os vários benefícios atribuídos à quercetina, em estudos com modelos neurais *in vivo*, foram observados efeitos sobre a neurodegeneração, focando seus benefícios sobre as deficiências cognitivas, isquemia e lesão traumática (Kelsey et al., 2010). Alguns estudos referem a utilização da quercetina na inibição da enzima acetilcolinesterase, nos quais foram observados percentuais inibitórios significativos (Orhan et al., 2007; Khan et al., 2009). A presença deste composto foi detectada no extrato da polpa do jenipapo, um dos que exibiram atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase.

Akkol et al. (2012), estudando o extrato etanólico das folhas de *Cistus laurifolius* L., relataram um alto percentual de inibição da acetilcolinesterase e o isolamento de três flavonóides, dentre eles dois derivados da quercetina (3-O-metilquercetina e 3,7-O-dimetilquercetina).

Avaliando a presença de ácido clorogênico, observou-se na composição fitoquímica da semente da siriguela uma quantidade considerável ( $356,93 \pm 7,13 \mu\text{g.g}^{-1}$ ). Este ácido (3-cafeoil-D-ácido quínico; CGA), um éster formado pelos ácidos caféico e quínico, é um dos principais polifenóis encontrados em numerosas espécies de plantas (Kono et al., 2007). O CGA possui dois grupos hidroxila vicinal em um resíduo aromático e, *in vitro*, apresenta efeitos cardioprotetores, atividade antimutagênica, anticarcinogênica, inibitória contra a lipoperoxidação e antioxidante, que são responsáveis pela captura das espécies reativas de oxigênio (EROs) (Niggeweg et al., 2004; Kwon et al., 2010; Mullen et al., 2011; Sato et al., 2011).

Kwon et al. (2010) relatam, *in vivo*, a atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase exercida pelo ácido clorogênico no hipocampo e no córtex frontal. O ácido clorogênico também diminuiu os níveis de malonildialdeído no hipocampo e no córtex frontal. *In vitro* foi verificada a atividade inibitória da acetilcolinesterase ( $\text{IC}_{50} = 98,17 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e para a atividade sequestradora de radicais ( $\text{IC}_{50} = 3,09 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), dependente da dose.

Na análise referente aos ácidos orgânicos, foram identificados o ácido cítrico: na casca do umbu ( $3,78 \pm 0,07 \mu\text{g.g}^{-1}$ ), semente do umbu ( $3,11 \pm 0,06 \mu\text{g.g}^{-1}$ ), polpa do umbu ( $2,12 \pm 0,04 \mu\text{g.g}^{-1}$ ), semente da siriguela ( $1,50 \pm 0,03 \mu\text{g.g}^{-1}$ ), casca da siriguela ( $0,88 \pm 0,01 \mu\text{g.g}^{-1}$ ), polpa da siriguela ( $0,52 \pm 0,01 \mu\text{g.g}^{-1}$ ) e polpa do jenipapo ( $0,43 \pm 0,00 \mu\text{g.g}^{-1}$ ), e o ácido quínico: casca do jenipapo ( $43,28 \pm 0,86$

$\mu\text{g.g}^{-1}$ ) e polpa do umbu ( $41,88 \pm 0,84 \mu\text{g.g}^{-1}$ ). Os ácidos orgânicos são metabólitos primários que podem ser encontrados em grande quantidade em todas as plantas, especialmente em frutas (Silva et al., 2011). O ácido cítrico é um ácido orgânico importante para o crescimento da planta e está relacionado com a tolerância ao estresse de metais pesados (Sun & Hong, 2011).

Além dos compostos acima mencionados, Costa et al. (2010) relatam valores de 216 e 233  $\text{mg.100 g}^{-1}$  para o conteúdo total de fitoesterol da polpa e semente do fruto jenipapo, respectivamente. Também observaram a presença de fitosteróis como campesterol, estigmasterol,  $\beta$ -sitosterol + sitostanol,  $\Delta^5$ -Avenasterol +  $\Delta^7$ -estigmasterol e  $\Delta^7$ -Avenasterol.

## 7 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos:

- Nenhum dos extratos analisados apresentou citotoxicidade na concentração testada;
- Os extratos da casca e semente da siriguela e semente do umbu demonstraram propriedades antioxidantes significativas, na maioria dos testes;
- A presença do ácido clorogênico encontrado no extrato da semente da siriguela pode, em parte, explicar o melhor desempenho na maioria dos testes antioxidantes;
- A presença do ácido clorogênico, pode justificar a atividade inibitória contra a enzima acetilcolinesterase verificada no extrato da semente de siriguela;

Considerando as propriedades significativas encontradas nesta tese, recomenda-se que a polpa de jenipapo e sementes de siriguela e umbu sejam utilizados na preparação de alimentos e que o seu consumo também seja estimulado, bem como nas indústrias farmacêutica e de cosméticos para o desenvolvimento de diferentes produtos com a ação de reduzir e/ou prevenir a formação de espécies reativas.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGOSTINHO, P.; CUNHA, R. A.; OLIVEIRA, C. Neuroinflammation, oxidative stress and the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Current Pharmaceutical Design*, v. 16, p. 2766-2778, 2010.

AKKOL, E. K.; ORHAN, I. E.; YESILADA, E. Anticholinesterase and antioxidant effects of the ethanol extract, ethanol fractions and isolated flavonoids from *Cistus laurifolius* L. leaves. *Food Chemistry*, v. 131, p. 626-631, 2012.

ALBUQUERQUE, U. P.; MEDEIROS, P. M.; ALMEIDA, A. L. S.; MONTEIRO, J. M., LINS NETO, E. M. F.; MELO, J. G.; SANTOS, J. P. Medicinal plants of the *caatinga* (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 114, p. 325–354, 2007.

ALMEIDA, M. M. B.; SOUZA, P. H. M.; ARRIAGA, A. M. C.; PRADO, G. M.; MAGALHÃES, C. E. C.; MAIA, G. A.; LEMOS, T. L. G. Bioactive compounds and antioxidant activity of fresh exotic fruits from northeastern Brazil. *Food Research International*, v. 44, p. 2155–2159, 2011.

ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. M. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. *Química Nova*, v. 33, p. 2202-2210, 2010.

AMTUL, Z.; WESTAWAY, D.; CECETTO, D.F.; ROZMAHEL, R.F. Oleic acid ameliorates amyloidosis in cellular and mouse models of Alzheimer's Disease. *Brain Pathology*, v. 21, p. 321-329, 2011.

ANDRES-LACUEVA, C.; SHUKITT-HALE, B.; GALLI, R. L.; JAUREGUI, O.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M.; JOSEPH, J. A. Anthocyanins in aged blueberry-fed rats are found centrally and may enhance memory. *Nutritional Neuroscience*, v. 8, p. 111–20, 2005.

ANGELIS, R. C. Novos conceitos em nutrição. Reflexões a respeito do elo dieta e saúde. *Arquivos de Gastroenterologia*, v. 38, p. 269-271, 2001.

APAK, R.; GÜÇLÜ, K.; ÖZYÜREK, M.; KARADEMIR, S. E. Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC Method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 52, p. 7970-7981, 2004.

ARNAO, M. B.; CANO, A.; ACOSTA, M. The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Food Chemistry*, v. 73, p. 239–244, 2001.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC. *Official methods of analysis of the AOAC*, v. 2, p. 16-17, 1997.

AUGUSTO, F.; VALENTE, A. L. P.; TADA, E. S.; RIVELLINO, S. R. Screening of Brazilian fruit aromas using solid-phase microextraction–gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 873, p. 117–127, 2000.

BARBOSA, R. M. T.; ALMEIDA, A. F.; MIELKE, M. S.; LOGUERCIO, L. L.; MANGABEIRA, P. A. O.; GOMES, F. P. A physiological analysis of *Genipa americana* L.: A potential phytoremediator tree for chromium polluted watersheds. *Environmental and Experimental Botany*, v. 61, p. 264–271, 2007.

BARNHAM, K. J.; MASTERS, C. L.; BUSH, A. I. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 3, p. 205-214, 2004.

BARROS, D. I.; BRUNO, R. L. A.; NUNES, H. V.; SILVA, G. C.; PEREIRA, W. E.; MENDONÇA, R. M. N. Métodos de extração de sementes de mangaba visando à qualidade fisiológica. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 28, p. 25-27, 2006.

BEGUM, A. N.; JONES, M. R.; LIM, G. P.; MORIHARA, T.; KIM, P.; HEATH, D. D.; ROCK, C. L.; PRUITT, M. A.; YANG, F.; HUDSPETH, B.; HU, S.; FAULL, K. F.; TETER, B.; COLE, G. M.; FRAUTSCHY, S. A. Curcumin structure–function, bioavailability, and efficacy in models of neuroinflammation and Alzheimer's disease. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 326, p.196–208, 2008.

BEKING, K.; VIEIRA, A. Flavonoid intake and disability-adjusted life years due to Alzheimer's and related dementias: a population-based study involving twenty-three developed countries. *Public Health Nutrition*, v.13, p.1403–1409 (2010).

BENZIE, I. F. F. Evolution of dietary antioxidants. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology*, v. 136, p. 113-126, 2003.

BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. *Revista de Nutrição*, Campinas, v.12, p.123-130, maio/ago, 1999.

BLOIS, M. S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, v.181, p.1199-1200, 1952.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v.72, p. 248-254, 1976.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Coordenação-Geral da Política de Alimentação e Nutrição - CGPAN. Alimentos regionais brasileiros. *Ministério da Saúde, Secretaria de Políticas de Saúde, Coordenação-Geral da Política de Alimentação e Nutrição*. – 1. ed. – Brasília: Ministério da Saúde, 2002, 140p.

CICCO, N.; LANORTE, M. T.; PARAGGIO, M.; VIGGIANO, M.; LATTANZIO, V. A reproducible, rapid and inexpensive Folin–Ciocalteu micro-method in determining phenolics of plant methanol extracts. *Microchemical Journal*, v. 91, p.107–110, 2009.

CHARLES, G.D.; LINScombe, V.A.; TORNESI, B.; MATTSSON, J.L.; GOLLAPUDI, B.B. An in vitro screening paradigm for extracts of whole foods for detection of potential toxicants. *Food and Chemical Toxicology*, v. 40, p.1391-1402, 2002.

CHIANG, L-C.; CHENG, H-Y.; LIU, M-C.; CHIANG, W.; LIN, C-C. In vitro evaluation of antileukemic activity of 17 commonly used fruits and vegetables in Taiwan. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie*, v. 37, p. 539–544, 2004.

CLERICI, M. T. P. S.; CARVALHO-SILVA, L. B. Nutritional bioactive compounds and technological aspects of minor fruits grown in Brazil. *Food Research International*, v. 44, p. 1658–1670, 2011.

COHEN, G.; KIM, M.; OGWU, V. A modified catalase assay suitable a plate reader and for the analysis of brain cell cultures. *Journal of Neuroscience Methods*. v. 67, p. 53 – 56, 1996.

Contreras-Calderon, J.; Calderon-Jaimes, L.; Gerra-Hernandez, E.; Garcia-Villanova, B. Antioxidant capacity, phenolic content and vitamin C in pulp, peel and seed from 24 exotic fruits from Colombia. *Food Research International*, v. 44, p. 2047–2053, 2010.

COSTA, P. A.; BALLUS, C. A.; TEIXEIRA-FILHO, J.; GODOY, H. T. Phytosterols and tocopherols content of pulps and nuts of Brazilian fruits. *Food Research International*, v. 43, p. 1603–1606, 2010.

CUSTÓDIO, L.; JUSTO, T.; SILVESTRE, L.; BARREIRA, A.; DUARTE, C. V.; PEREIRA, H.; BARREIRA, L.; RAUTER, A. P.; ALBERÍCIO, F.; VARELA, J. Microalgae of different phyla display antioxidant, metal chelating and acetylcholinesterase inhibitory activities. *Food Chemistry*, v.131, p.134–140, 2012.

DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N.; SANTOS, R. J. Atividade Antioxidante de Extrato de Fruto de Aroeira (*Schinus terebenthifolius* Raddi). *Visão Acadêmica*, Curitiba, v. 5, p. 83-90, Jul - Dez, 2004.

DRUMMEN, G. P. C.; GADELLA, B.; POST, J.; BROUWERS, J. C11-bodipy<sup>581/591</sup>, an oxidation-sensitive fluorescent lipid peroxidation probe: (micro) spectroscopic characterization and validation of methodology. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 33, p. 473–490, 2002.

DRUMMEN, G. P. C.; GADELLA, B.; POST, J.; BROUWERS, J. Mass spectrometric characterization of the oxidation of the fluorescent lipid peroxidation reporter molecule C11-BODIPY<sup>581/591</sup>. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 36, p.1635 – 1644, 2004.

DYKES, L.; ROONEY, L.W.; WANISKA, R.D.; ROONEY, W.L. Phenolic compounds and antioxidant capacity of sorghum grains of varying genotypes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 53, p. 6813–6818, 2005.

ELLMAN, G. L.; COURTNEY, K. D.; ANDRES, V.; FEATHERSTONE, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, v. 7, p. 88-95, 1961.

ESPOSITO, E.; ROTILIO, D.; MATTEO, V.D.; GIULIO, C.D.; CACCHIO, M.; ALGERI, S. A review of specific dietary antioxidants and the effects on biochemical mechanisms related to neurodegenerative processes. *Neurobiology of Aging*, v. 23, p. 719–735, 2002.

FERREIRA, F. R. *Estudos bioeletroquímicos de substâncias de interesse biológico utilizando técnicas avançadas*. Qualificação de Doutorado, 2012. Instituto de Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas, Alagoas. 2012.

FERREIRA, R. C. S. *Avaliação da atividade antirretroviral de produtos naturais*. 2010. 144 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas, Alagoas. 2010.

FERNANDEZ-CHECA, J.C.; FERNANDEZ, A.; MORALES, A.; MARI, M.; GARCIA-RUIZ, C.; COLELL, A. Oxidative Stress and Altered Mitochondrial Function in Neurodegenerative Diseases: Lessons From Mouse Models. *CNS & Neurological Disorders-Drug Targets*, v. 9, p. 439-454, 2010.

FIGUEIREDO, R. W.; MAIA, G. A.; MONTEIRO, J. C. S.; FIGUEIREDO, E. A. T. Composição de ácidos graxos na fração lipídica da polpa e sementes do Jenipapo (*Genipa americana*, L.). *Boletim CEPPA*, v. 9, p. 149-154, 1991.

FIGUEIREDO, M. B.; PASSADOR, M. M.; COUTINHO, L. N. A “ferrugem” ou verrugose dos frutos da ciriguela (*Spondias purpurea* L.) causada por *Elsinoe Spondiasdis* Watson e Jenkins. *Biológico*, v. 68, p. 5 - 7, jan/dez, 2006.

FINLEY, J. W.; KONG, A.; HINTZE, K. J.; JEFFERY, E. H.; JI, L. L.; LEI, X. G. Antioxidants in Foods: State of the Science Important to the Food Industry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 59, p. 6837–6846, 2011.

FOLEGATTI, M. I. S.; MATSSUURA, F. C. A. U.; CARDOSO, R. L.; MACHADO, S. S.; ROCHA, A. S.; LIMA, R. R. Aproveitamento industrial do umbu: Processamento de geléia e compota. *Ciência & Agrotecnologia*, v. 27, p. 1308 - 1314, nov/dez, 2003.

FRATIGLIONI, L.; QIU, C. Prevention of common neurodegenerative disorders in the elderly. *Experimental Gerontology*, v. 44, p. 46–50, 2009.

GACCHE, R. N.; DHOLE, N. A. Profile of aldose reductase inhibition, anti-cataract and free radical scavenging activity of selected medicinal plants: An attempt to

standardize the botanicals for amelioration of diabetes complications. *Food and Chemical Toxicology*, v. 49, p.1806–1813, 2011.

GENOVESE, M. I.; PINTO, M. S.; DE SOUZA, S. G. A. E.; LAJOLO, F. M. Bioactive compounds and antioxidant capacity of exotic fruits and commercial frozen pulps from Brazil. *Food Science and Technology International*, v.14, p. 207–214, 2008.

GOMES, A.; FERNANDES, E.; LIMA, J. L. F. C. Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. *Journal Biochemical and Biophysical Methods*, v. 65, p. 45–80, 2005.

GONÇALVES, A. E. S. S.; LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I. Chemical composition and antioxidant/antidiabetic potential of Brazilian native fruits and commercial frozen pulps. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 58, p. 4666–4674, 2010.

Griffin, S. P.; Bhagooli, R. Measuring antioxidant potential in corals using the FRAP assay. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, v. 302, p. 201– 211, 2004.

Gulcin, I.; Oktay, M.; Kirecçi, E.; Kufrevioglu, O. I. Screening of antioxidant and antimicrobial activities of anise (*Pimpinella anisum* L.) seed extracts. *Food Chemistry*, v. 83, p. 371–382, 2003.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Free Radical in Biology and Medicine. Clarendon Press, Oxford, 4 ed., 2010, p. 851.

HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, E.; PONCE-ALQUICIRA, E.; JARAMILLO-FLORES, M. E.; LEGARRETA, G. Antioxidant effect rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and oregano (*Origanum vulgare* L.) extracts on TBARS and colour of model raw pork batters. *Meat Science*, v. 81, p. 410–417, 2009.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 53, p. 1841–1856, 2005.

INGKANINAN, K.; TEMKITTHAWON, P.; CHUENCHOM, K.; YUYAEM, T.; THONGNOI, W. Screening for acetylcholinesterase inhibitory activity in plants used in Thai traditional rejuvenating and neurotonic remedies. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 89, p. 261–264, 2003.

ISHRAT, T.; HODA, M. N.; KHAN, M. B.; YOUSUF, S.; AHMAD, M.; KHAN, M. M.; AHMAD, A.; ISLAM, F. Amelioration of cognitive deficits and neurodegeneration by curcumin in rat model of sporadic dementia of Alzheimer's type (SDAT). *European Neuropsychopharmacology*, v. 19, p. 636–647, 2009.

JI, H. F.; ZHANG, H. Y. Multipotent natural agents to combat Alzheimer's disease. Functional spectrum and structural features. *Acta Pharmacologica Sinica*, v. 29, p. 143–151, 2008.

KALIORA, A. C.; DEDOUSSIS, G. V. Z.; SCHMIDT, H. Dietary antioxidants in preventing atherogenesis. *Atherosclerosis*, v. 187, p. 1-17, 2006.

KALT, W.; FORNEY, C.F.; MARTIN, A.; PRIOR, R.L. Antioxidant capacity, vitamin C, phenolics and anthocyanins after fresh storage of small fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 47, p. 4638-4644, 1999.

KANOSKI, S. E.; DAVIDSON, T. L. Western diet consumption and cognitive impairment: Links to hippocampal dysfunction and obesity. *Physiology & Behavior*, v. 103, p. 59-68, 2011.

KARADAG, A.; OZCELIK, B.; SANNER, S. Review of methods to determine antioxidant capacities. *Food Analytical Methods*, v. 2, p. 41–60, 2009.

KARUPPAGOUNDER, S. S.; PINTO, J. T.; XU, H.; CHEN, H.; BEAL, M. F.; GIBSON, G. E. Dietary supplementation with resveratrol reduces plaque pathology in a transgenic model of Alzheimer's disease. *Neurochemistry international*, v. 54, p. 111-118, 2009.

KELSEY, N. A.; WILKINS, H. M.; LINSEMAN, D. A. Nutraceutical Antioxidants as Novel Neuroprotective Agents. *Molecules*, v.15, p. 7792-7814, 2010.

KHAN, M. T. H.; ORBAN, I.; SENOL, F. S.; KARTAL, M.; SENER, B.; DVORSKA, M.; SMEJKAL, K.; SLAPETOVA, T. Cholinesterase inhibitory activities of some flavonoid derivatives and chosen xanthone and their molecular docking studies. *Chemico-Biological Interactions*, v. 181, p. 383–389, 2009.

KHARRAZI, H.; VAISI-RAYGANI, A.; RAHIMI, Z.; TAVILANI, H.; AMINIAN, M.; POURMOTABBED, T. Association between enzymatic and non-enzymatic antioxidant defense mechanism with apolipoprotein E genotypes in Alzheimer disease. *Clinical Biochemistry*, v. 41, p. 932-936, 2008.

KHONKARN, R.; OKONOJI, S.; AMPASAVATE, C.; ANUCHAPREEDA, S. Investigation of fruit peel extracts as sources for compounds with antioxidant and antiproliferative activities against human cell lines. *Food and Chemical Toxicology*, v. 48, p. 2122–2129, 2010.

KONO, Y.; KOBAYASHI, K.; TAGAWA, S.; ADACHI, K.; UEDA, A.; SAWA, Y.; SHIBATA, H. Antioxidant activity of polyphenolics in diets: Rate constants of reactions of chlorogenic acid and caffeic acid with reactive species of oxygen and nitrogen. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1335, p. 335-342, 1997.

KHUWAJA, G.; KHAN, M. M.; ISHRAT, T.; AHMAD, A.; RAZA, S. S.; ASHAFAQ, M.; JAVED, H.; KHAN, M. B.; KHAN, A.; VAIBHAV, K.; SAFHI, M. M.; ISLAM, F. Neuroprotective effects of curcumin on 6-hydroxydopamine-induced Parkinsonism in rats: Behavioral, neurochemical and immunohistochemical studies. *Brain Research*, v. 1368, p. 254-263, 2011.

KWON, S-H.; LEE, H-K.; KIM, J-A.; HONG, S-I.; KIM, H-C.; JO, T-H.; PARK, Y-I.; LEE, C-K.; KIM, Y-B.; LEE, S-Y.; JANG, C-G. Neuroprotective effects of chlorogenic acid on scopolamine-induced amnesia via anti-acetylcholinesterase and anti-oxidative activities in mice. *European Journal of Pharmacology*, v. 649, p. 210–217, 2010.

LARDINOIS, O. M.; ROUXHET, P. G. Peroxidatic degradation of azide by catalase and irreversible enzyme inactivation. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1298, p. 180-190, 1996.

LEE, C.; YOON, J. UV direct photolysis of 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) (ABTS) in aqueous solution: Kinetics and mechanism. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, v. 197, p. 232–238, 2008.

LEE, G.; ROSSI, M. V.; COICHEV, N.; MOYA, H. D. The reduction of Cu(II)/neocuproine complexes by some polyphenols: Total polyphenols determination in wine samples. *Food Chemistry*, v. 126, p. 679–686, 2011.

LIMA, A. K. C.; REZENDE, L. P.; CÂMARA, F. A. A.; NUNES, G. H. S. Propagação de Cajarana (*Spondias* sp.) e Ciriguela (*Spondias purpurea*) por meio de estacas verdes enfolhadas, nas condições climáticas de Mossoró-RN. *Caatinga*, Mossoró-RN, v. 15, p. 33-38, dez, 2002.

LÔBO, K. M. S.; ATHAYDE, A. C. R.; SILVA, A. M. A.; RODRIGUES, F. F. G.; LÔBO, I. S.; BEZERRA, D. A. C.; COSTA, J. G. M. Avaliação da atividade antibacteriana e prospecção fitoquímica de *Solanum paniculatum* Lam. e *Operculina hamiltonii* (G. Don) D. F. Austin & Staples, do semiárido paraibano. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 12, p. 227-233, 2010.

MACDONALD, R. C.; MACDONALD, R. I.; MENCO, B. P.; TAKESHITA, K.; SUBBARAO, N. K.; HU, L. R. Small-volume extrusion apparatus for preparation of large, unilamellar vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1061, p. 297-303, 1991.

MACHADO, L. L.; RAMOS, M. L. G.; CALDAS, L. S.; VIVALDI, L. J. Seleção de matrizes e clones de mangabeira para o cultivo in vitro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 39, p. 431-435, 2004.

MARAMBAUD, P.; ZHAO, H.; DAVIES, P. Resveratrol Promotes Clearance of Alzheimer's Disease Amyloid- $\beta$  Peptides. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 280, p. 37377-37382, 2005.

MARSTON, A. Thin-layer chromatography with biological detection in phytochemistry. *Journal of Chromatography A*, v. 1218, p. 2676–2683, 2011.

MARTINS, C. M.; VASCONCELLOS, M. A. S.; ROSSETTO, C. A. V.; CARVALHO, M. G. Phytochemical screening of the arils of yellow passion fruits seeds and influence on the seed germination. *Ciência Rural*, v. 40, p. 1934-1940, 2010.

MATOS, F.J.A. Introdução à fitoquímica experimental. *Fortaleza: Edições UFC*; 1997, 141p.

MENDEL, S.; YOUDIM, M.B. Catechin polyphenols: neurodegeneration and neuroprotection in neurodegenerative diseases. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 37, p. 304-317, 2004.

MICHALSKI, W. P.; PROWSE, S. J. Cu, Zn Superoxide dismutase from chicken erythrocytes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, v. 100, p. 371-375, 1991.

MICHIELS, C.; RAES, V.; TOUSSAINT, O.; REMACLE, J. Importance of se-glutathione peroxidase, catalase, and CU/ZN – SOD for cell survival against oxidative stress. *Free Radical Biology & Medicine*, 17, 235-248, 1994.

MIDDLETON, E. J. Effect of plant flavonoids on immune and inflammatory cell function. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, v. 439, p. 175–82, 1998.

MIELKE, M. S.; ALMEIDA, A. F.; GOMES, F. P.; AGUILAR, M. A. G.; MANGABEIRA, P. A. O. Leaf gas exchange, chlorophyll fluorescence and growth responses of *Genipa americana* seedlings to soil flooding. *Environmental and Experimental Botany*, v. 50, p. 221-231, 2003.

MILATOVIC, D.; DETTBARN, W-D. Modification of acetylcholinesterase during adaptation to chronic subcute paraoxon application in rat. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v.136, p. 20-28, 1996.

MOYO, M.; NDHLALA, A. R.; FINNIE, J. F.; STADEN, J. V. Phenolic composition, antioxidant and acetylcholinesterase inhibitory activities of *Sclerocarya birrea* and *Harpephyllum caffrum* (Anacardiaceae) extracts. *Food Chemistry*, v. 123, p. 69-76, 2010.

MUNIZ, C. R.; BORGES, M. F.; ABREU, F. A. P.; NASSU, R. T.; FREITAS, C. A. S. Bebidas fermentadas a partir de frutos tropicais. *Boletim CEPPA*, v. 20, p. 309 – 322, 2002.

MULLEN, W.; NEMZER, B.; OU, B.; STALMACH, A.; HUNTER, J.; CLIFFORD, M. N.; COMBET, E. The antioxidant and chlorogenic acid profiles of whole coffee fruits are influenced by the extraction procedures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 59, p. 3754–3762, 2011.

MÜLLER, T. C.; ROCHA, J. B. T.; MORSCH, V. M.; NEIS, R. T.; SCHETINGER, M. R. C. Antidepressants inhibit human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activity. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1587, p. 92-98, 2002.



NARAIN, N.; BORA, P. S.; HOLSCHUH, H. J.; VASCONCELOS, M. A. S. Variation in physical and chemical composition during maturation of umbu (*Spondias tuberosa*) fruits. *Food Chemistry*, v. 44, p. 255–259, 1992.

NEVES, O. S. C.; CARVALHO, J. G.; RODRIGUES, C. R. Crescimento e nutrição mineral de mudas de umbuzeiro (*Spondias tuberosa* Arr. Cam.) submetidas a níveis de salinidade em solução nutritiva. *Ciência & Agrotecnologia*, v. 28, p. 997 - 1006, set./out., 2004.

NIGGEWEG, R.; MICHAEL, A. J.; MARTIN, C. Engineering plants with increased levels of the antioxidant chlorogenic acid. *Nature Biotechnology*, v. 22, p. 746-754, 2004.

NIKI, E. Assessment of antioxidant capacity in vitro and in vivo. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 49, p. 503–515, 2010.

NINO, J.; HERNÁNDEZ, J. A.; CORREA, Y. M.; MOSQUERA, O. M. *In vitro* inhibition of acetylcholinesterase by crude plant extracts from Colombian flora. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 101, p. 783-785, 2006.

NOGUEIRA, R. J. M. C.; ALBUQUERQUE, M. B.; SILVA JUNIOR, J. F. Efeito do substrato na emergência, crescimento e comportamento estomacal em plântulas de mangabeira. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 25, p. 15-18, 2003.

NOIPA, T.; SRIJARANAI, S.; TUNTULANI, T.; NGEONTAE, W. New approach for evaluation of the antioxidant capacity based on scavenging DPPH free radical in micelle systems. *Food Research International*, v. 44, p. 798–806, 2011.

NORONHA, M. A. S.; CARDOSO, E. A.; DIAS, N. S. Características físico-químicas de frutos de Umbu-Cajá *Spondias sp.* provenientes dos pólos Baixo-Jaguaribe (CE) e Assu-Mossoró (RN). *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, Campina Grande, v. 2, p. 91-96, 2000.

NZARAMBA, M. N.; REDDIVARI, L.; BAMBERG, J. B.; MILLER, J. C. Antiproliferative activity and cytotoxicity of *Solanum jamesii* tuber extracts on human colon and prostate cancer cells in vitro, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 57, p. 8308–8315, 2009.

OBRENOVICH, M. E.; NAIR, N. G.; BEYAZ, A.; ALIEV, G.; REDDY, V.P. The Role of Polyphenolic Antioxidants in Health, Disease, and Aging. *Rejuvenation Research*, v. 13, p. 631-643, 2010.

OKE, F.; ASLIM, B. Biological potentials and cytotoxicity of various extracts from endemic *Origanum minutiflorum* O. Schwarz & P.H. Davis. *Food and Chemical Toxicology*, v. 48, p. 1728–1733, 2010.

OKONOJI, S.; DUANGRAT, C.; ANUCHPREEDA, S.; TACHAKITTIRUNGROD, S.; CHOWWANAPHOONPOHN, S. Comparison of antioxidant capacities and cytotoxicities of certain fruit peels. *Food Chemistry*, v. 103, p. 839-846, 2007.

OLIVEIRA, A. C.; VALENTIM, I. B.; SILVA, C. A.; BECHARA, E. J. H.; BARROS, M. P.; MANO, C. M., et al. Total phenolic content and free radical scavenging activities of methanolic extract powders of tropical fruits residues. *Food Chemistry*, v. 115, p. 469-475, 2009.

OLIVEIRA, R. G.; GODOY, H. T.; PRADO, M. A. Otimização de metodologia colorimétrica para a determinação de ácido ascórbico em geleias de frutas. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 30, p. 244-249, 2010.

ONO, M.; ISHIMATSU, N.; MASUOKA, C.; YOSHIMITSU, H.; TSUCHIHASHI, R.; OKAMA, M. et al. Three new monoterpenoids from the fruit of *Genipa Americana*. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, v. 55, p. 632-634, 2007.

ONO, M.; UENO, M.; MASUOKA, C.; IKEDA, T.; NOHARA, T. Iridoid Glucosides from the Fruit of *Genipa Americana*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, v. 53, p. 1342—1344, 2005.

ORHAN, I.; ASLAN, M. Appraisal of scopolamine-induced anti-amnesic effect in mice and *in vitro* antiacetylcholinesterase and antioxidant activities of some traditionally used Lamiaceae plants. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 122, p. 327–332, 2009.

ORHAN, I.; KARTAL, M.; TOSUN, F.; SENER, B. Screening of various phenolic acids and flavonoid derivatives for their anticholinesterase potential. *Zeitschrift für Naturforschung – section C Journal of Biosciences*, v. 62, p. 829–832, 2007.

ÖZYÜREK, M.; GÜÇLÜ, K.; APAK, R. The main and modified CUPRAC methods of antioxidant measurement. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 30, p. 652-664, 2011 (a).

ÖZYÜREK, M.; GÜÇLÜ, K.; TÜTEM, E.; BASKAN, K. S.; ERÇAG, E.; ÇELİK, S. E.; BAKI, S.; YILDIZ, L.; KARAMAN, S.; APAK, R. A comprehensive review of CUPRAC methodology. *Analytical Methods*, v. 3, p. 2439-2453, 2011 (b).

PALATNIK, J. F.; VALLE, E. M.; FEDERICO, M. L.; GÓMEZ, L. D.; MELCHIORRE, M. N.; PALEO, A. D.; CARRILLO, N.; ACEVEDO, A. Status of antioxidant metabolites and enzymes in a catalase-deficient mutant of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Science*, v. 162, p. 363–371, 2002.

PALLAS, M.; CANUDAS, A. M.; JUNYENT, F.; JIMENEZ, A.; VERDAGUER, E.; CAMINS, A. Resveratrol: A Therapeutic Approach to Neurodegenerative Diseases and Aging. *Mini-Reviews in Organic Chemistry*, v. 7, p. 267-271, 2010.

PANDE, G.; AKOH, C. C. Organic acids, antioxidant capacity, phenolic content and lipid characterisation of Georgia-grown underutilized fruit crops. *Food Chemistry*, v. 120, p. 1067–1075, 2010.

PARAMAPOJN, S.; GRITSANAPAN, W. Free radical scavenging activity determination and quantitative analysis of curcuminoids in *Curcuma zedoaria* rhizome extracts by HPLC method. *Current Science*, v. 97, p. 1069-1073, 2009.

PARTYKA, A.; LUKASZEWICZ, E.; NIZANSKI, W.; TWARDON, J. Detection of lipid peroxidation in frozen-thawed avian spermatozoa using C11-BODIPY581/591. *Theriogenology*, v. 75, p. 1623–1629, 2011.

PINHEIRO, C. S. R.; MEDEIROS, D. N.; MACÊDO, C. E. C; ALLOUFA, M. A. I. Germinação *in vitro* de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomez) em diferentes meios de cultura. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 23, p. 413-416, 2001.

PRIOR, R. L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, p. 4290-4302, 2005.

PUCHAU, B.; ZULET, M. A.; ECHÁVARRI, A. G.; HERMSDORFF, H. H. M.; MARTÍNEZ, J. A. Dietary total antioxidant capacity is negatively associated with some metabolic syndrome features in healthy young adults. *Nutrition*, v. 26, p. 534-541, 2010.

QADER, S. W.; ABDULLA, M. A.; CHUA, L. S.; NAJIM, N.; ZAIN, M. M.; HAMDAN, S. Antioxidant, Total Phenolic Content and Cytotoxicity Evaluation of Selected Malaysian Plants. *Molecules*, v. 16, p. 3433-3443, 2011.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J. *Farmacologia*. 6<sup>o</sup> edição, Rio de Janeiro: Elsevier. 2007, 848p.

RAZZINO, C. A. *Desenvolvimento e caracterização e utilização de um nanobiossensor enzimático para detecção de carbaril*. São Carlos, 2007, 88 f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2007.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved abts radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 26, p. 1231–1237, 1999.

REN, Y.; HOUGHTON, P. J.; HIDER, R. C.; HOWER, M. J. Novel diterpenoid acetylcholinesterase inhibitors from *Salvia miltiorhiza*. *Planta Med.*, v. 70, p. 201-204, 2004.

RETTBERG, J.R.; HAMILTON, R.T.; MAO, Z.; TO, J.; ZHAO, L.; APPT, S.E.; REGISTER, T.C.; KAPLAN, J.R.; BRINTON, R.D. The effect of dietary soy

isoflavones before and after ovariectomy on hippocampal protein markers of mitochondrial bioenergetics and antioxidant activity in female monkeys. *Brain research*, v. 1379, p. 23-33, 2011.

RHEE, I. K.; MEENT, M. V.; INGGANINAN, K.; VERPOORTE, R. Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining. *Journal of Chromatography A*, v. 915, p. 217–223, 2001.

RHEE I. K.; VAN, R. I. J. N. R. M.; VERPOORTE, R. Qualitative determination of false-positive effects in the acetylcholinesterase assay using thin layer chromatography. *Phytochemical Analysis*, v. 14, p.127–131, 2003.

RICCIARELLI, R.; ARGELLATI, F.; PRONZATO, M. A.; DOMENICOTTI, C. Vitamin E and neurodegenerative diseases. *Molecular Aspects of Medicine*, v. 28, p. 591–606, 2007.

ROCKENSTEIN, E.; CREWS, L.; MASLIAH, E. Transgenic animal models of neurodegenerative diseases and their application to treatment development. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 59, p.1093–1102, 2007.

ROSENBERRY, T. L.; SONODA, L. K.; DEKAT, S. E.; CUSACK, B.; JOHNSON, J. Monitoring the reaction of carbachol with acetylcholinesterase by thioflavin T fluorescence and acetylthiocholine hydrolysis. *Chemico-Biological Interactions*, v.175, p. 235–241, 2008.

ROSS, J. A.; KASUM, C. M. Dietary flavonoids: Bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annual Reviews of Nutrition*, v. 22, p. 19–34, 2002.

ROSSI, L.; MAZZITELLI, S.; ARCIELLO, M.; CAPO, C. R.; ROTILIO, G. Benefits from Dietary Polyphenols for Brain Aging and Alzheimer's disease. *Neurochemical Research*, v. 33, p. 2390–2400, 2008.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. (2006) Determinação da atividade antioxidante total em frutas pelo método de redução do ferro (FRAP). *Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical*, 4p, Fortaleza. (Comunicado Técnico on-line:125).

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F.; MANCINI-FILHO, J. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. *Food Chemistry*, v.121, p. 996–1002, 2010.

RUFINO, M. S. M.; FERNANDES, F. A. N.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S. Free radical-scavenging behaviour of some north-east Brazilian fruits in a DPPH<sup>\*</sup> system. *Food Chemistry*, v.114, p. 693–695, 2009.

SACRAMENTO, C. K.; SOUZA, F. X. CAJÁ (*Spondias mombin* L.). Jaboticabal: FUNEP, 2000. 52 p. (Série Frutas Nativas, n.4).

SAEG - SISTEMA PARA ANÁLISES ESTATÍSTICAS, Versão 9.1: *Fundação Arthur Bernardes - UFV - Viçosa*, 2007.

SAMPAIO, T. S.; NOGUEIRA, P. C. L. Volatile components of mangaba fruit (*Hancornia speciosa* Gomes) at three stages of maturity. *Food Chemistry*, v. 95, p. 606–610, 2006.

SANTOS, G. M.; MAIA, G. A.; SOUZA, P. H. M.; COSTA, J. M. C.; FIGUEIREDO, R. W.; PRADO, G. M. Correlação entre atividade antioxidante e compostos bioativos de polpas comerciais de açaí (*Euterpe oleracea* Mart). *Archivos latinoamericanos de nutricion*, v. 58, p. 187-192, 2008.

SAVASKAN, E.; OLIVIERI, G.; MEIER, F.; SEIFRITZ, E.; WIRZ-JUSTICE, A.; MULLER-SPAHN, F. Red wine ingredient resveratrol protects from betaamyloid neurotoxicity. *Gerontology*, v. 49, p. 380–383, 2003.

SATO, Y.; ITAGAKI, S.; KUROKAWA, T.; OGURA, J.; KOBAYASHI, M.; HIRANO, T.; SUGAWARA, M.; ISEKI, K. In vitro and in vivo antioxidant properties of chlorogenic acid and caffeic acid. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 403, p. 136–138, 2011.

SATPATHY, G.; TYAGI, Y. K.; GUPTA, R. K. Preliminary evaluation of nutraceutical and therapeutic potential of raw *Spondias pinnata* K., an exotic fruit of India. *Food Research International*, v. 44, p. 2076–2087, (2011).

SCHERER, R.; GODOY, H. T. Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. *Food Chemistry*, v.112, p. 654–658, 2009.

SCREMIN, O. U.; LI, M. G.; SCREMIN, A. M.; JENDEN, D. J. Cholinesterase inhibition improves blood flow in the ischemic cerebral cortex. *Brain Research Bulletin*, v. 42, p. 59-70, 1997.

SEELEY, W. W.; CRAWFORD, R. K.; ZHOU, J.; MILLER, B. L.; GREICIUS, M. D. Neurodegenerative Diseases Target Large-Scale Human Brain Networks. *Neuron*, v. 62, p. 42-52, 2009.

SHARMA, R. A.; GESCHER, A. J.; STEWARD, W. P. Curcumin: the story so far. *European Journal of Cancer*, v. 41, p. 1955–1968, 2005.

SILVA, B. M.; SANTOS, R. P.; MENDES, L. S.; PINHO, P. G.; VALENTÃO, P.; ANDRADE, P. B.; PEREIRA, J. A.; CARVALHO, M. *Dracaena draco* L. fruit: Phytochemical and antioxidant activity assessment. *Food Research International*, v. 44, p. 2182–2189, 2011.

SHIH, P.; CHAN, Y.; LIAO, J.; WANG, M.; YEN, G. Antioxidant and cognitive promotion effects of anthocyanin-rich mulberry (*Morus atropurpurea* L.) on senescence-accelerated mice and prevention of Alzheimer's disease. *Journal of Nutritional Biochemistry*, v. 21, p. 598–605, 2010.

SLAUGHTER, M. R.; O'BRIEN, P. J. Fully-Automated Spectrophotometric Method for Measurement of Antioxidant Activity of Catalase. *Clinical Biochemistry*, v. 33, p. 525–534, 2000.

SOUZA, O. V. S.; OLIVEIRA, M. S.; RABELLO, S. V.; CUNHA, R. O.; COSTA, B. L. S.; LEITE, M. N. Estudo farmacognóstico de galhos de *Vanillosmopsis erythropappa* Schult. Bip. - Asteraceae. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v. 13 (suppl.1), p. 50–53, 2003.

SUN, Y.; HONG, S. Effects of citric acid as an important component of the responses to saline and alkaline stress in the halophyte *Leymus chinensis* (Trin.). *Plant Growth Regul*, v. 64, p. 129–139, 2011.

TAYLOR, P.; BROWN, J. H. (1994). *Basic neurochemistry: molecular, cellular and medical aspects*. 5.ed. New York : Raven, 213-260.

TEIXEIRA, D. M. A.; BRAGA, R. C.; HORTA, A. C. G.; MOREIRA, R. A.; BRITO, A. C. F.; MACIEL, J. S.; FEITOSA, J. P. A.; PAULA, R. C. M. *Spondias purpurea* Exudate polysaccharide as affinity matrix for the isolation of a galactose-binding-lectin. *Carbohydrate Polymers*, v. 70, p. 369–377, 2007.

THAIPONG, K.; BOONPRAKOB, U.; CROSBY, K.; CISNEROS-ZEVALLOS, L.; BYRNE, D. H. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 19, p. 669–675, 2006.

TIBURSKI, J. H.; ROSENTHAL, A.; DELIZA, R.; GODOY, R. L. O.; PACHECO, S. Nutritional properties of yellow mombin (*Spondias mombin* L.) pulp. *Food Research International*, v. 44, p. 2326–2331, 2011.

TORRES-RODRÍGUEZ, A.; SALINAS-MORENO, Y.; VALLE-GUADARRAMA, S.; ALIA-TEJACAL, I. Soluble phenols and antioxidant activity in mamey sapote (*Pouteria sapota*) fruits in postharvest. *Food Research International*, v. 44, p. 1956 – 1961, 2011.

TREVISAN, M. T. S.; MACEDO, F. V. V.; MEENT, M.; RHEE, I.K.; VERPOORTE, R. Seleção de plantas com atividade anticolinesterase para tratamento da doença de Alzheimer. *Química Nova*, v. 26, p. 301-304, 2003.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M. T. D.; MAZUR, M.; TELSNER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v. 39, p. 44-84, 2007.

VASCO, C.; RUALES, J.; KAMAL-ELDIN, A. Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador. *Food Chemistry*, v. 111, p. 816–823, 2008.

VASCONCELOS, S. M. L.; GOULART, M. O. F.; MOURA, J. B. F.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M. S.; KUBOTA, L. T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. *Química Nova*, 30, 1323-1338, 2007.

VINUTHA, B.; PRASHANTH, D.; SALMA, K.; SREEJA, S.L.; PRATITI, D.; PADMAJA, R.; RADHIKA, S.; AMITA, A.; VENKATESHWARLU, K.; DEEPAK, M. Screening of selected Indian medicinal plants for acetylcholinesterase inhibitory activity. *Journal of Ethnopharmacology*, v.109, p. 359–363, 2007.

WANG, S.; MELNYK, J.P.; TSAO, R.; MARCONE, M. F. How natural dietary antioxidants in fruits, vegetables and legumes promote vascular health. *Food Research International*, v. 44, p. 14-22, 2011.

WEISENTHAL, L. M.; MARSDEN, J. A.; DILL, P. L.; MACALUSO, C. K. A novel dye exclusion method for testing in vitro chemosensitivity of human tumors. *Cancer Research*, v. 43, p. 749-756, 1983.

WILLIAMS, P.; SORRIBAS, A.; HOWES, M. R. Natural products as a source of Alzheimer's drug leads. *Natural Products Reports*, v. 28, p. 48–77, 2011.

WISEMAN, H. Dietary influences on membrane function: Importance in protection against oxidative damage and disease. *Journal Nub. Biochem.*, v. 7, p. 2-15, 1996.

WOULFE, J. Nuclear bodies in neurodegenerative disease. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2195–2206, 2008.

XU, J.; GUO, Y-Q.; LI, X.; WEI, K.; ZHAO, X-J. Cytotoxic sesquiterpenoids from the ethanol extract of fruits of *Celastrus orbiculatus*. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 117, p. 175–177, 2008.

YOO, D. G.; SONGA, Y. J.; CHOA, E. J.; LEEA, S. K.; PARKA, J. B.; YUB, J. H.; LIMB, S. P.; KIMC, & J. M.; JEONA, B. H. Alteration of APE1/ref-1 expression in non-small cell lung cancer: The implications of impaired extracellular superoxide dismutase and catalase antioxidant systems. *Lung Cancer*, v. 60, p. 277–284, 2008.

YOSHIMOTO, M.; SAKAMOTO, H.; YOSHIMOTO, N.; KUBOI, R.; NAKAO, K. Stabilization of quaternary structure and activity of bovine liver catalase through encapsulation in liposomes. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 41, p. 849–858, 2007.

YUODIM, K. A.; JOSEPH, J. A. A possible emerging role of phytochemicals in improving age-related neurological dysfunctions: A multiplicity of effects. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 30, p. 583–594, 2001.

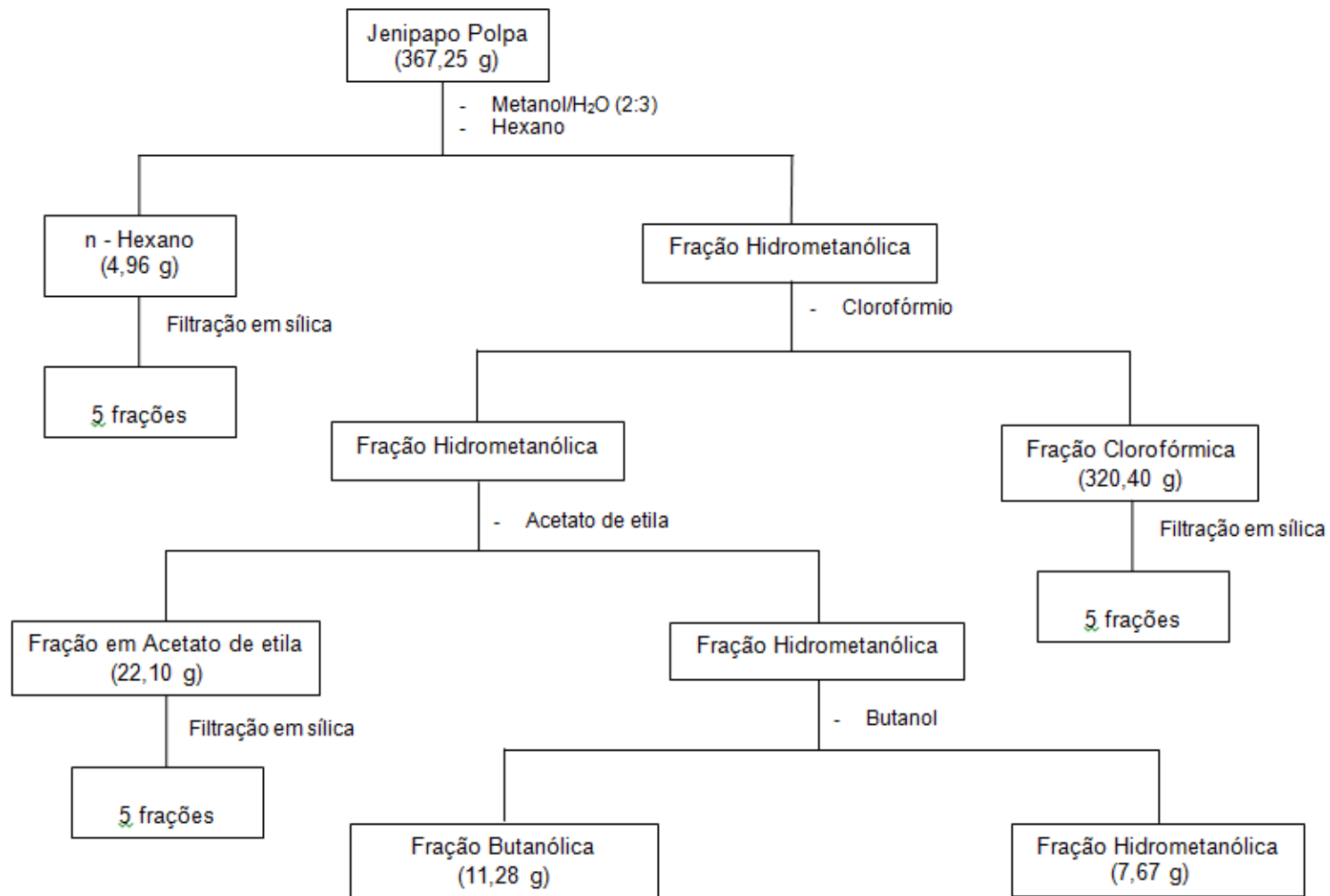
ZAINI, N. A. M.; ANWAR, F.; HAMID, A. A.; SAARI, N. Kundur [*Benincasa hispida* (Thunb.) Cogn.]: A potential source for valuable nutrients and functional foods. *Food Research International*, v. 44, p. 2368–2376, 2011.



**APÊNDICES**

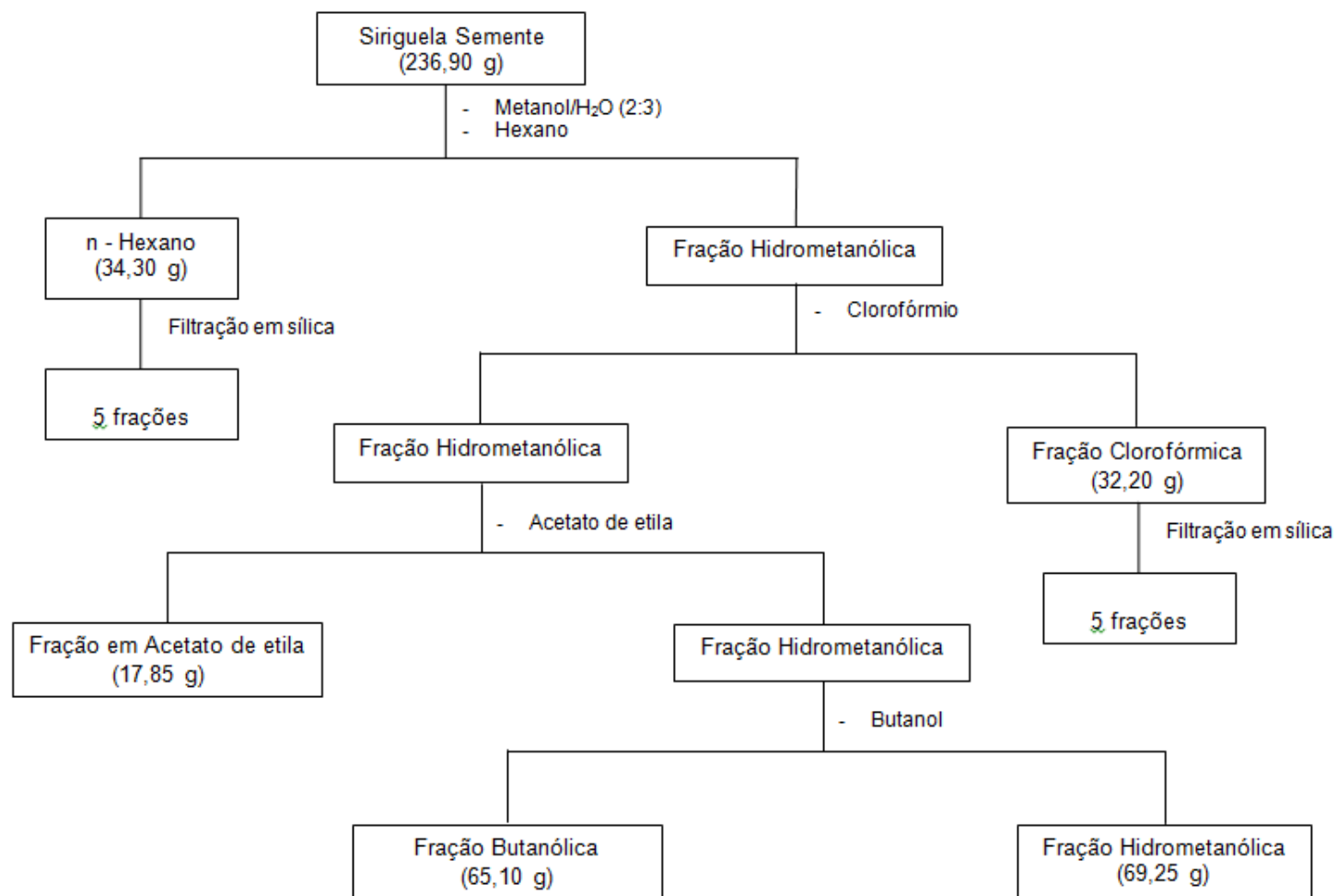
## APÊNDICE 1

Fluxograma 1 - Separação do extrato bruto etanólico da polpa do jenipapo.



## APÊNDICE 2

Fluxograma 2 - Separação do extrato bruto etanólico da semente da siriguela.



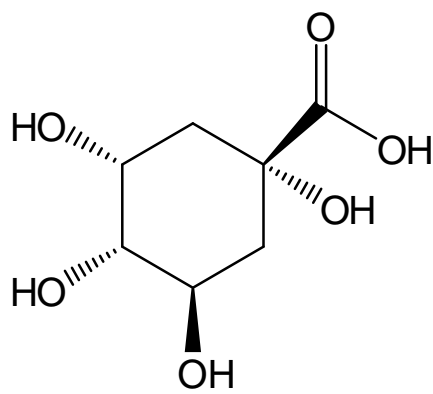
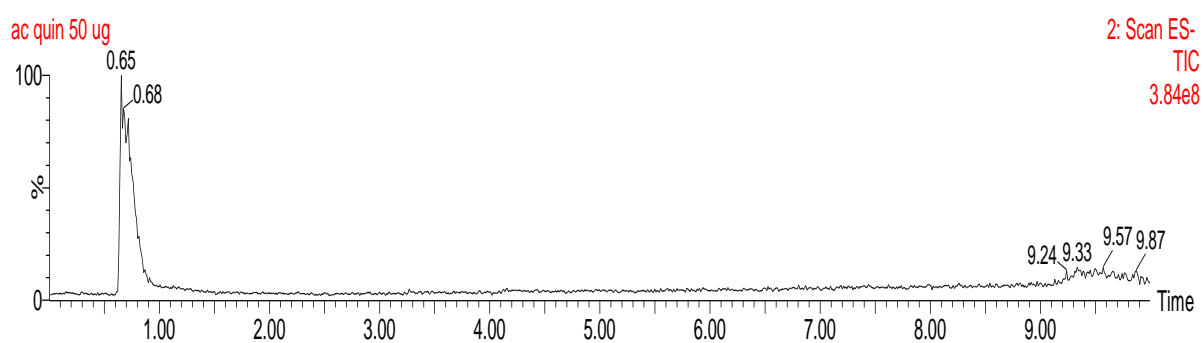
**Fluxograma 2.** Separação do extrato bruto etanólico da semente da siriguela.

## APÊNDICE 3

## PADRÕES

- **Ácido Quínico** (Massa molecular: 192,17; tempo de retenção: 0,66 minutos).

Figura 32. Cromatograma do padrão de Ácido quínico

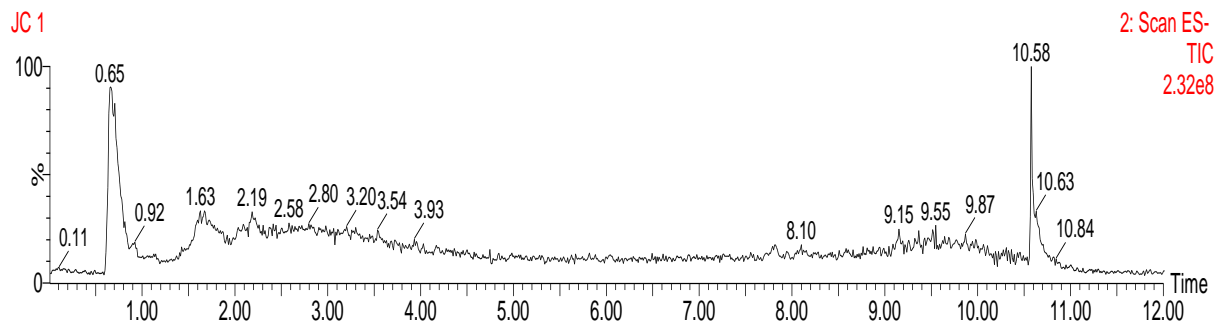


Ácido Quínico

Fonte: Autor desta tese, 2012.

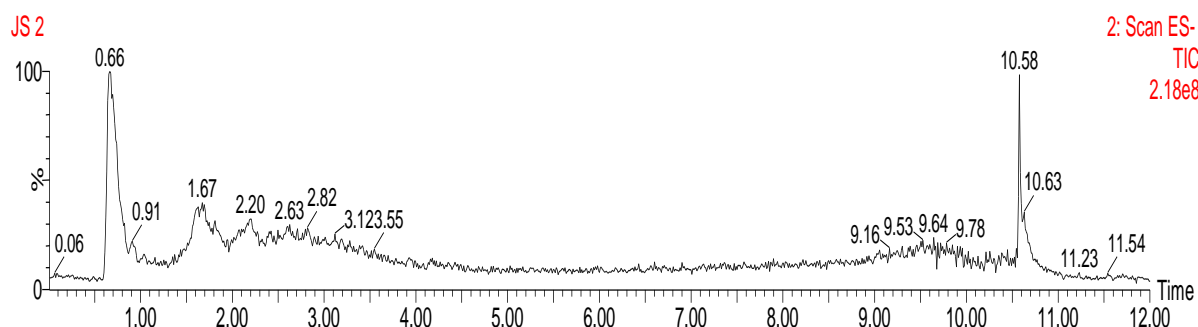
## APÊNDICE 4

**Figura 40.** Cromatograma da amostra do extrato etanólicos da casca do Jenipapo.



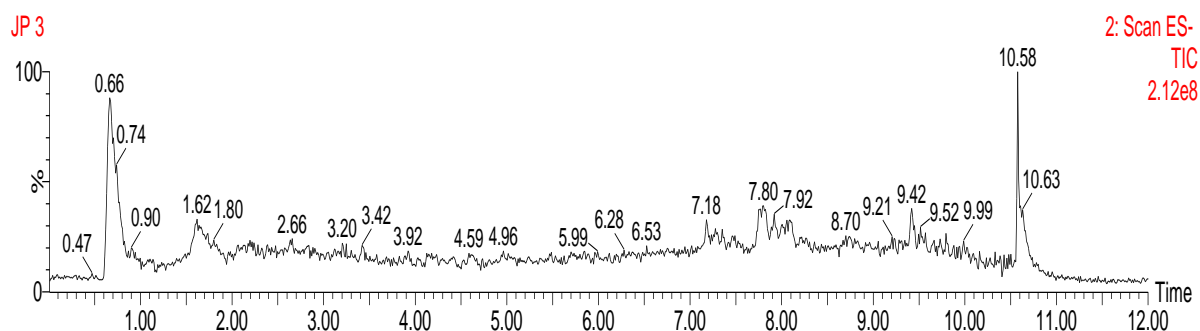
Fonte: Autor desta tese, 2012.

**Figura 41.** Cromatograma da amostra do extrato etanólicos da semente do Jenipapo



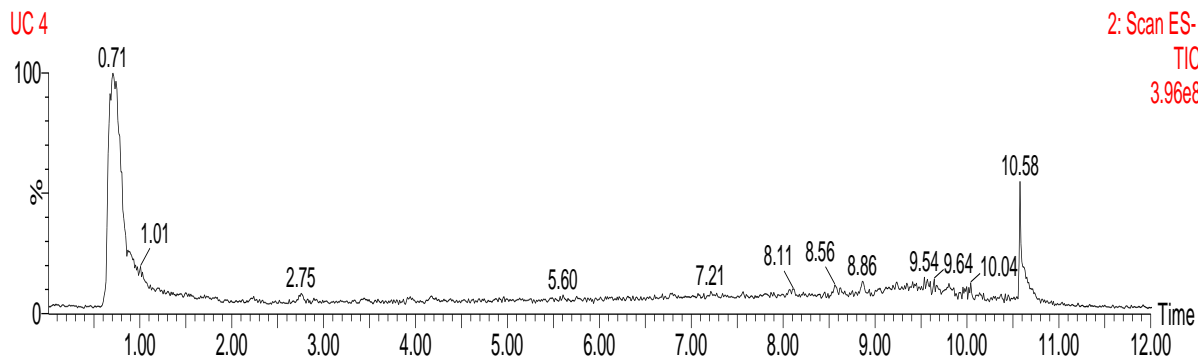
Fonte: Autor desta tese, 2012..

**Figura 42.** Cromatograma da amostra do extrato etanólicos da polpa do Jenipapo



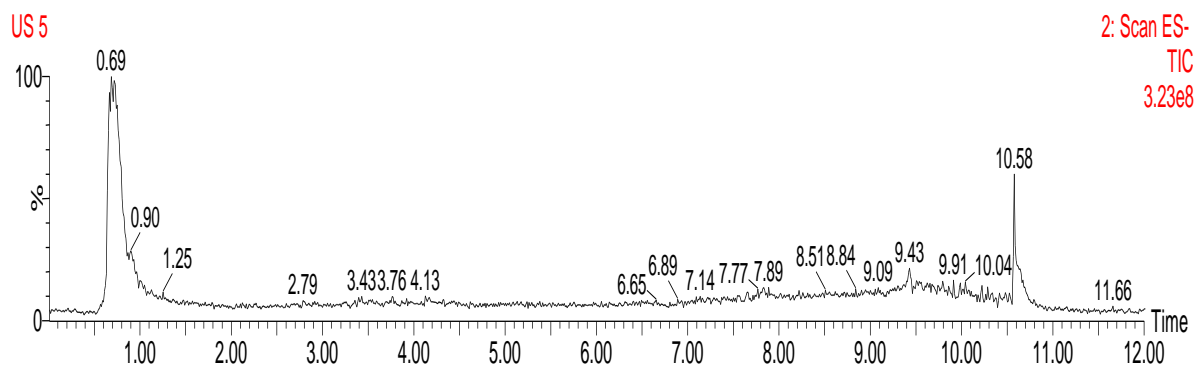
Fonte: Autor desta tese, 2012.

**Figura 43.** Cromatograma da amostra do extrato etanólicos da casca do Umbu.



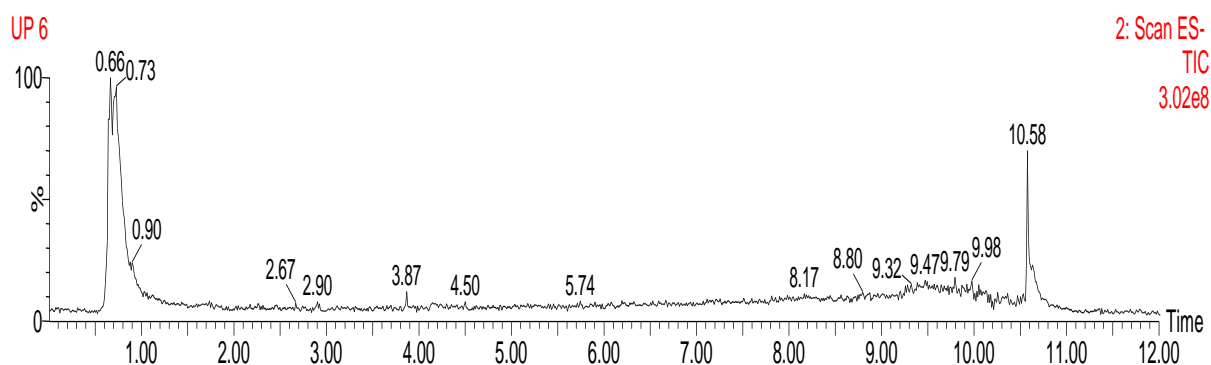
Fonte: Autor desta tese, 2012.

**Figura 44.** Cromatograma da amostra do extrato etanólicos da semente do Umbu.



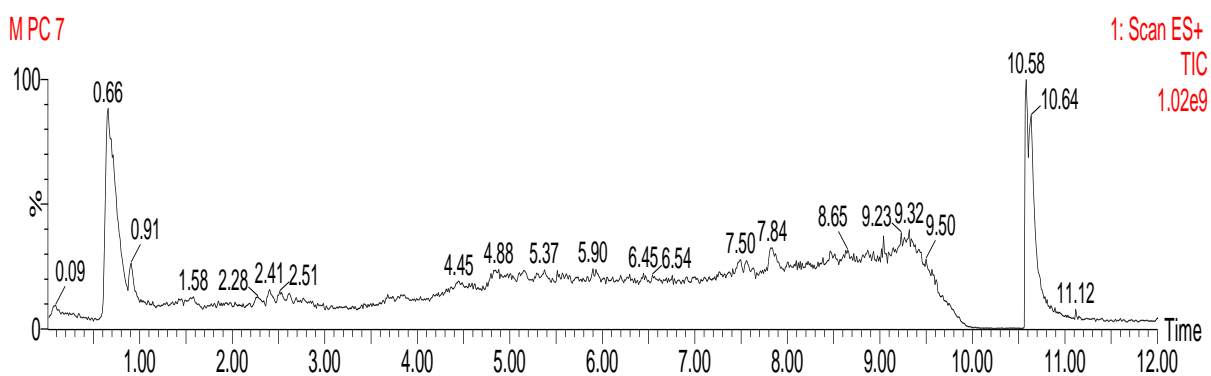
Fonte: Autor desta tese, 2012.

**Figura 45.** Cromatograma da amostra do extrato etanólicos da polpa do Umbu.



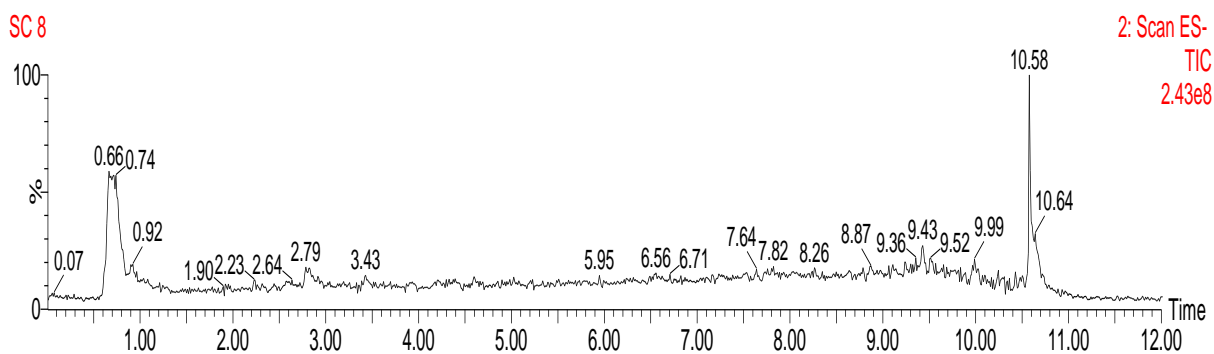
Fonte: Autor desta tese, 2012.

**Figura 46.** Cromatograma da amostra do extrato etanólicos da casca + polpa da Mangaba.



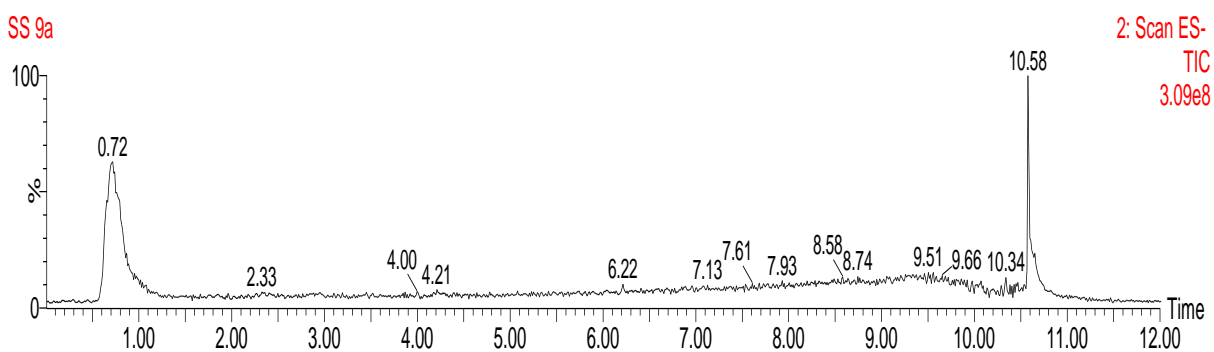
Fonte: Autor desta tese, 2012.

**Figura 47.** Cromatograma da amostra do extrato etanólicos da casca da Siriguela.



Fonte: Autor desta tese, 2012.

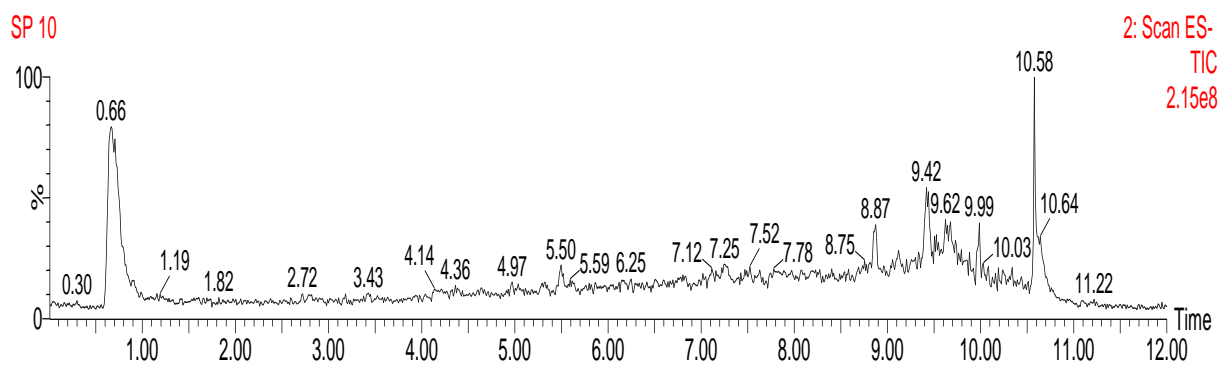
**Figura 48.** Cromatograma da amostra do extrato etanólicos da semente da Siriguela.



Fonte: Autor desta tese, 2012.



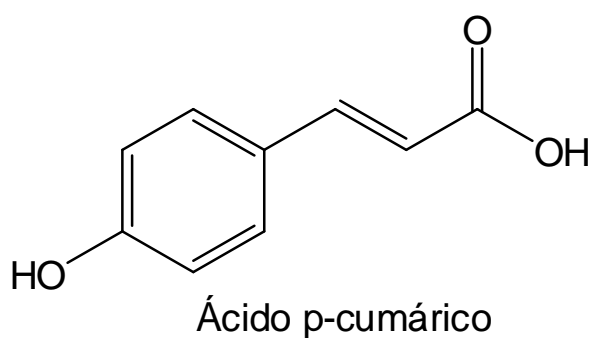
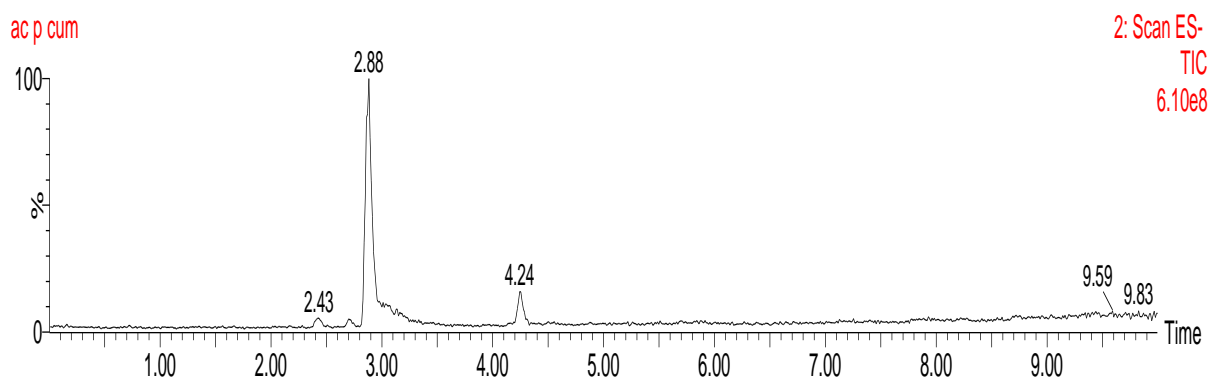
**Figura 49.** Cromatograma da amostra do extrato etanólicos da polpa da Siriguela.



Fonte: Autor desta tese, 2012.

- **Ácido *p*-cumárico** (Massa molecular: 164,16; **tempo de retenção**: 2,88 minutos).

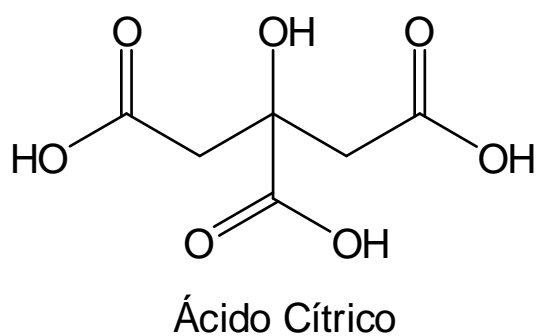
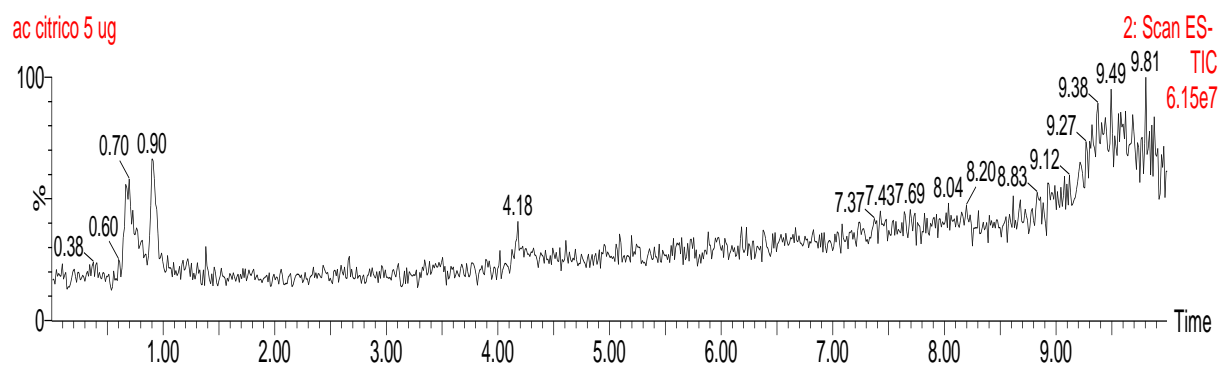
**Figura 33.** Cromatograma do padrão de Ácido *p*-cumárico.



Fonte: Autor desta tese, 2012.

- **Ácido Cítrico** (Massa molecular: 192,12; tempo de retenção: 0,74 – 0,91 minutos).

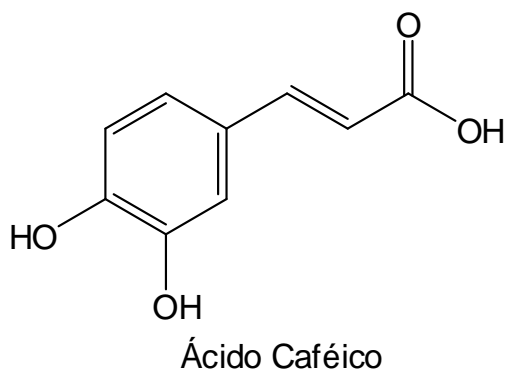
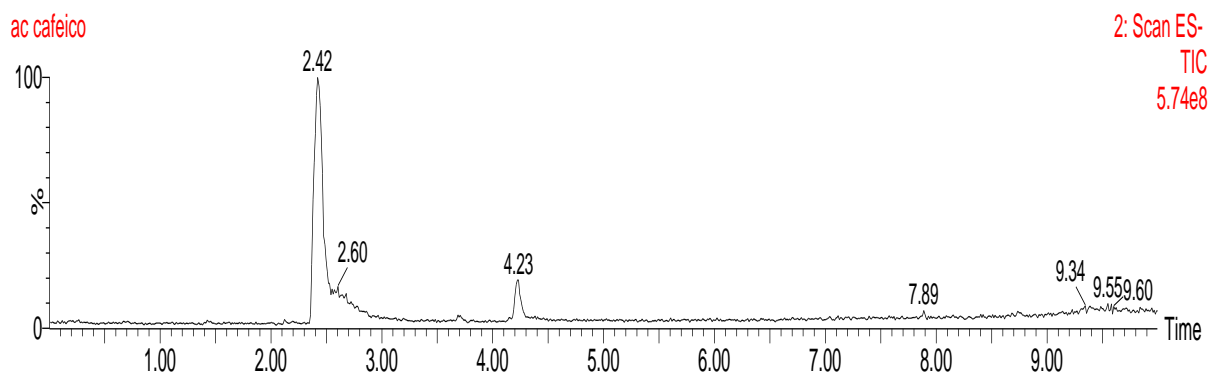
**Figura 34.** Cromatograma do padrão de Ácido Cítrico.



Fonte: Autor desta tese, 2012.

- **Ácido Caféico** (Massa molecular: 180,16; **tempo de retenção**: 2,42 minutos).

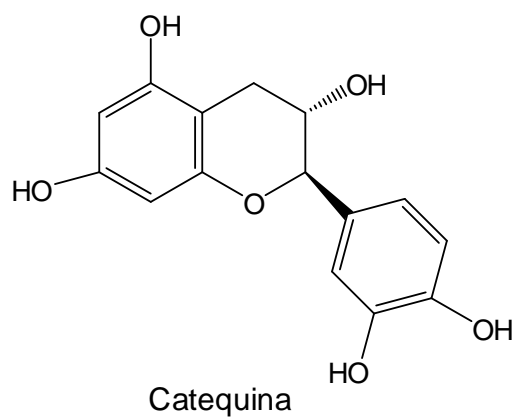
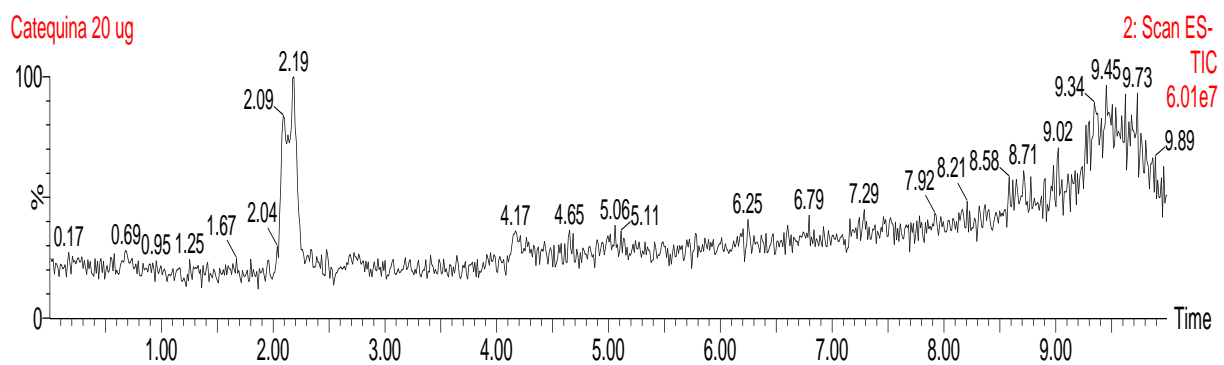
**Figura 35.** Cromatograma do padrão de Ácido Caféico.



Fonte: Autor desta tese, 2012.

- **Catequina** (Massa molecular: 290,27; **tempo de retenção**: 2,11 – 2,18 minutos).

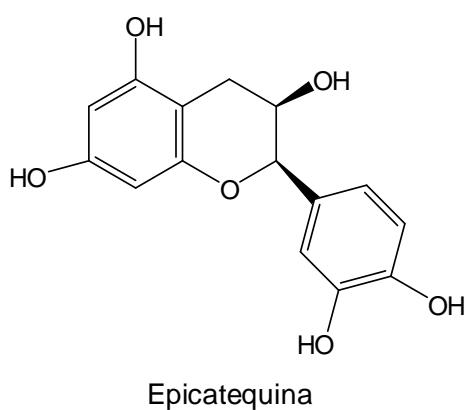
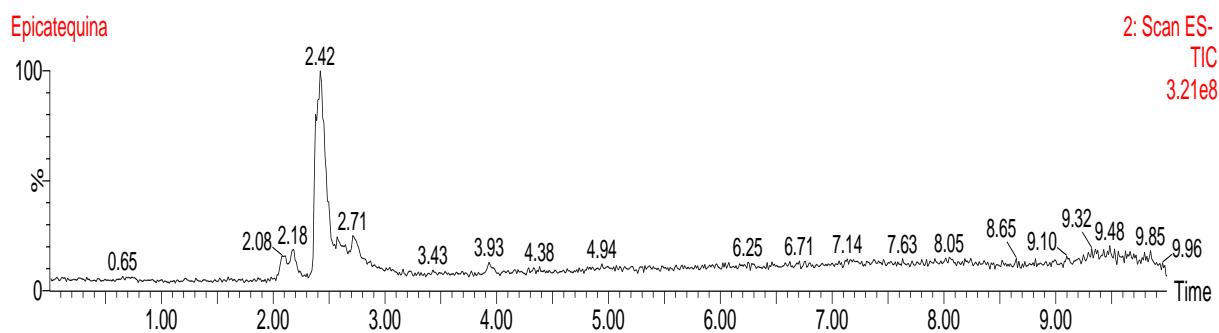
**Figura 36.** Cromatograma do padrão de Catequina.



Fonte: Autor desta tese, 2012.

- **Epicatequina** (Massa molecular: 290,27; **tempo de retenção**: 2,42 minutos).

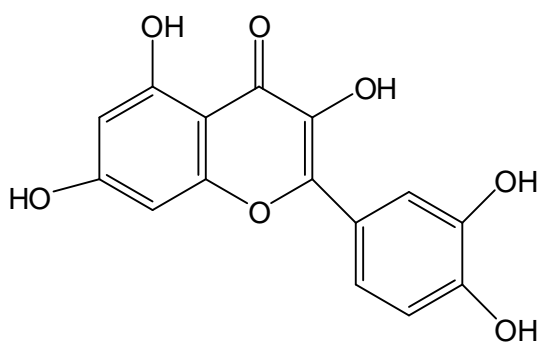
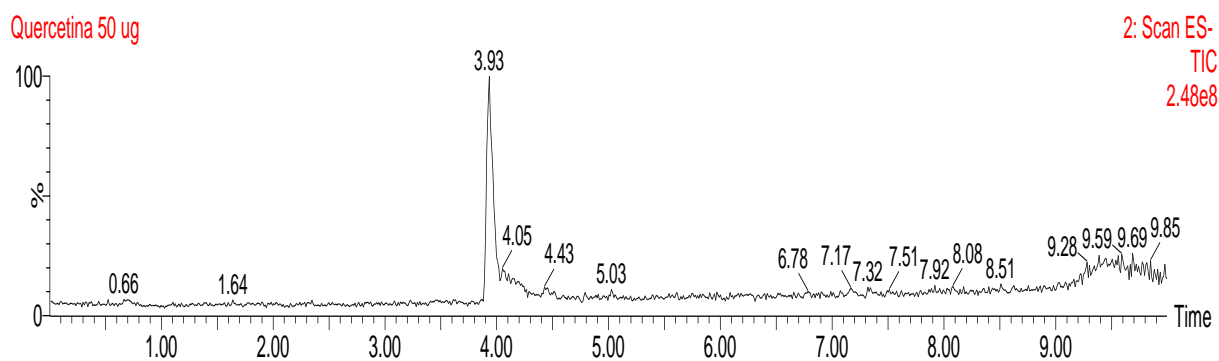
**Figura 37.** Cromatograma do padrão de Epicatequina.



Fonte: Autor desta tese, 2012.

- **Quercetina** (Massa molecular: 302,24; **tempo de retenção**: 3,93 minutos).

**Figura 38.** Cromatograma do padrão de Quercetina.

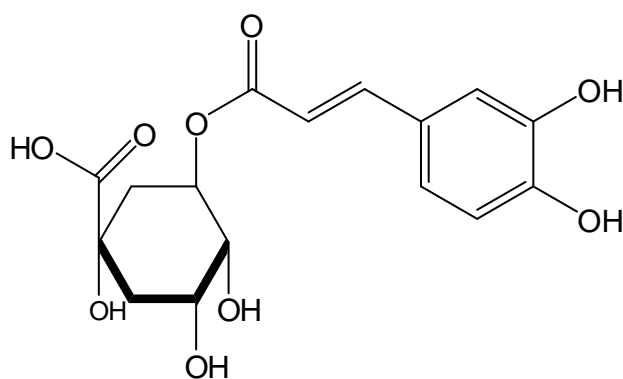
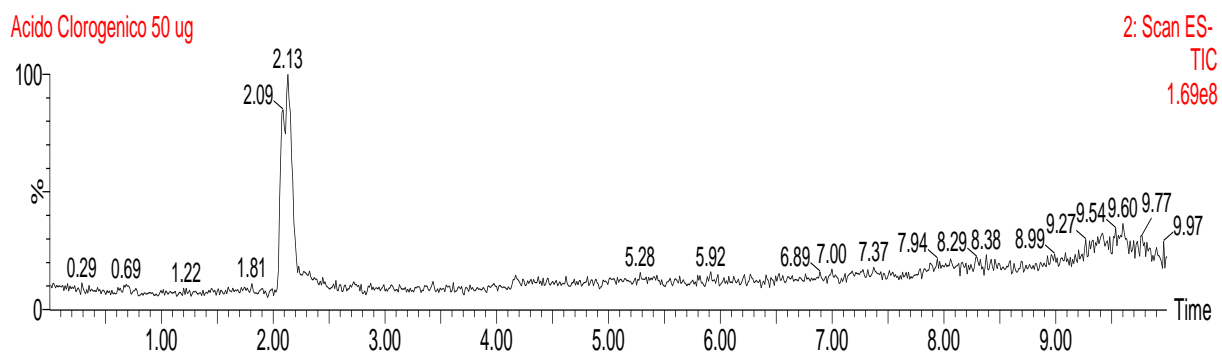


Quercetina

Fonte: Autor desta tese, 2012.

- **Ácido Clorogênico** (Massa molecular: 354,31; tempo de retenção: 2.14 minutos).

**Figura 39.** Cromatograma do padrão de Ácido Clorogênico.



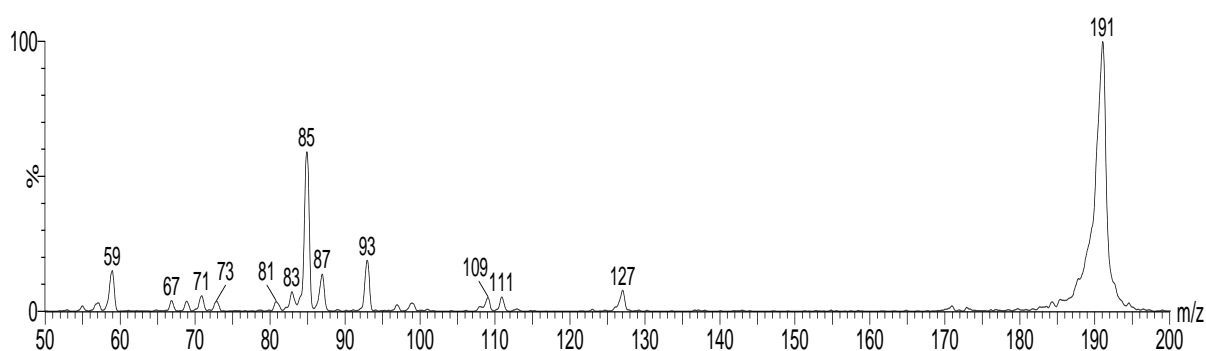
Ácido Clorogênico

Fonte: Autor desta tese, 2012.



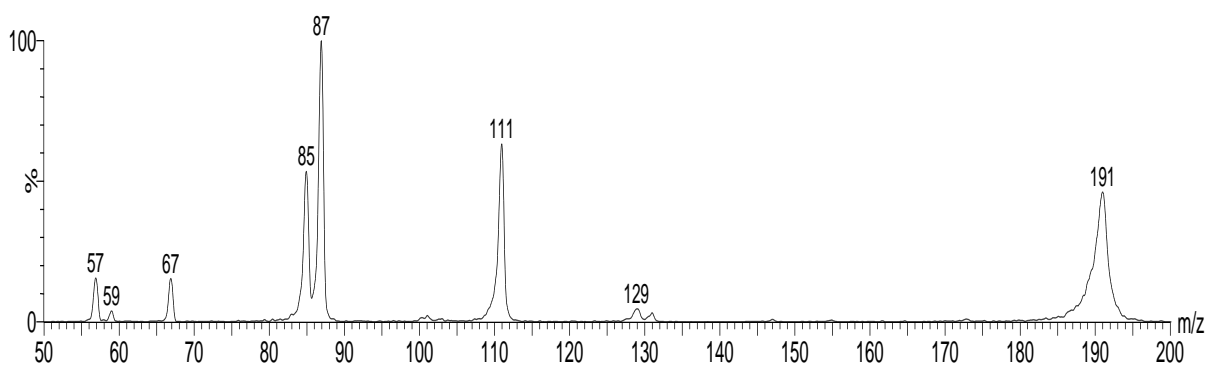
## APÊNDICE 5

**Figura 50.** Espectro de massa do Ácido quínico, método de ionização: eletrospray, modo negativo.



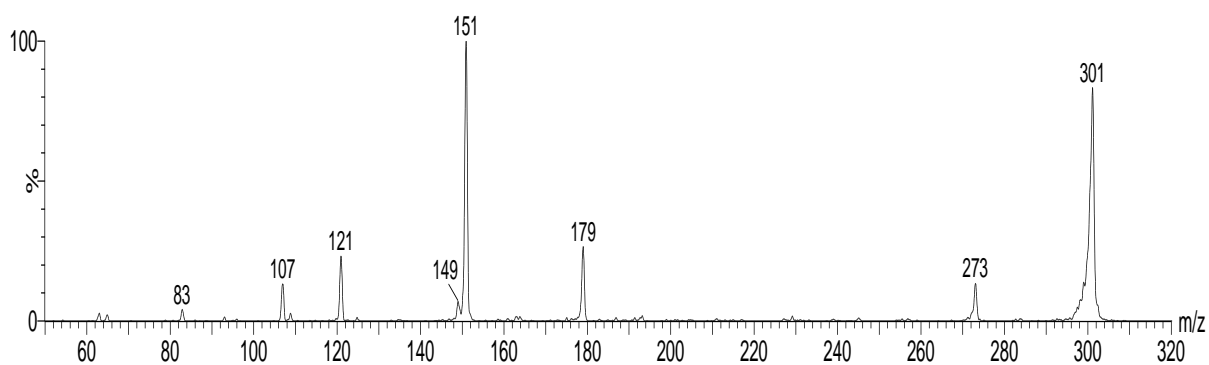
Fonte: Autor desta tese, 2012.

**Figura 51.** Espectro de massa do Ácido Cítrico, método de ionização: eletrospray, modo negativo.



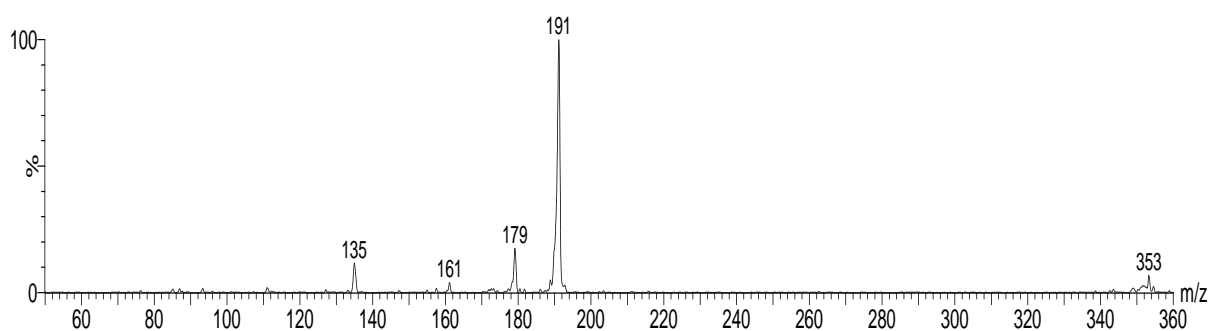
Fonte: Autor desta tese, 2012.

**Figura 52.** Espectro de massa do Quercetina, método de ionização: eletrospray, modo negativo.



Fonte: Autor desta tese, 2012.

**Figura 53.** Espectro de massa do Ácido Clorogênico, método de ionização: eletrospray, modo negativo.



Fonte: Autor desta tese, 2012.

## APÊNDICE 6

Elsevier Editorial System(tm) for Food Research International

### **Manuscript Draft**

**Manuscript Number:** FOODRES-D-11-01283R1

**Title:** Antioxidant, anti-acetylcholinesterase and cytotoxic activities of ethanol extracts of peel, pulp and seed of exotic Brazilian fruits

**Article Type:** Research Article

**Keywords:** total phenolic content; free radical scavenging activity; antioxidant; BODIPY; acetylcholinesterase inhibition; tropical fruits.

**Corresponding Author:** Prof. Marilia Oliveira Fonseca Goulart, Ph.D

**Corresponding Author's Institution:** Universidade Federal de Alagoas

**First Author:** Cristhiane Maria Bazílio de Omena M de Omena, PhD student

Order of Authors: Cristhiane Maria Bazílio de Omena M de Omena, PhD student; Iara B Valentim, PhD; Camila M Marinho, PhD student; Etelvino H Bechara, PhD; Alexandra C Sawaya, PhD; Maria Teresa T Trevisan, PhD; João G da Costa, PhD; Roberta C Ferreira, PhD; Marilia Oliveira Fonseca Goulart, Ph.D; Antonio Euzebio G Santana, PhD

**Abstract:** Ethanol extracts of powdered genipap (*Genipa americana* L.), umbu (*Spondia tuberosa* A.) and siriguela (*Spondia purpurea* L.) prepared from separate pulp, seeds and peel were investigated for their (i) antioxidant capacity, which was evaluated by various known methods, (ii) acetylcholinesterase (AChE) inhibitory activity, and (iii) cytotoxic effect on corneal epithelial cells of sheep. The extracts were also phytochemically screened. Genipap pulp and siriguela seed ethanol extracts presented an AChE inhibition zone similar to that of the positive control, carbachol. The highest values of total phenolic content were obtained with peel and seed extracts. Siriguela and umbu (seeds and peels) extracts displayed the highest antioxidant activities. Lipid peroxidation assays indicated that genipap pulp is a promising antioxidant. The investigation of phenols and organic acid contents revealed the presence of quercetin, citric and quinic acids and chlorogenic acid derivatives in several extracts, with the highest amount found in siriguela seeds. These data suggest that these extracts are potentially important antioxidant supplements for the food, pharmaceutical and cosmetic industries.

Antioxidant, anti-acetylcholinesterase and cytotoxic activities of ethanol extracts of peel, pulp and seed of exotic Brazilian fruits

**Antioxidant, anti-acetylcholinesterase and cytotoxic activities in fruits**

Cristhiane Maria Bazílio de Omena<sup>a,b</sup>, Iara Barros Valentim<sup>a</sup>, Camila Marinho Mano<sup>c</sup>  
Etelvino José Henriques Bechara<sup>c,d</sup>, Alexandra C H F Sawaya<sup>e</sup>, Maria Teresa Salles  
Trevisan<sup>f</sup>, João Gomes da Costa<sup>g</sup>, Roberta Costa Silva Ferreira<sup>a</sup>, Marília Oliveira  
Fonseca Goulart<sup>a\*</sup>, Antônio Euzébio Goulart Sant'Ana<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Universidade Federal de Alagoas (UFAL), Instituto de Química e Biotecnologia, Av. Lourival Melo Mota, s/n, Tabuleiro do Martins, 57072-970 Maceió- AL, Brazil.

<sup>b</sup>Universidade de Pernambuco (UPE), Nutrição, BR 203 Km 2 S/N, Campus Universitário, Vila Eduardo, 56300-000 Petrolina-PE, Brazil.

<sup>c</sup>Universidade de São Paulo (USP), Instituto de Química, Departamento de Bioquímica, Av. Prof. Lineu Prestes, 748, 05508-000 São Paulo- SP, Brazil.

<sup>d</sup>Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), Instituto de Ciências Ambientais, Químicas e Farmacêuticas, Rua Prof. Artur Riedel, 275 - Jd. Eldorado - 09972-270 Diadema – SP, Brazil.

<sup>e</sup>Departamento de Biologia Vegetal, Instituto Biológico, UNICAMP, Campinas, Brazil

<sup>f</sup>Universidade Federal do Ceará (UFC), Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Av. da Universidade, 2853 – Benfica, 60021-970 Fortaleza-CE, Brazil

<sup>g</sup>Embrapa Tabuleiros Costeiros, Tabuleiro do Martins, 57061-970 Maceió-AL, Brazil.

\*Corresponding author:

Dr. Marília Oliveira Fonseca Goulart

Instituto de Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas, Campus A.C. Simões, Tabuleiro do Martins, 57072-970 Maceió, AL, Brazil

Tel./Fax: + 55-82-32141389

E-mail address: [mariliaofg@gmail.com](mailto:mariliaofg@gmail.com) (M.O.F. Goulart)

## Abstract

Ethanol extracts of powdered *genipap* (*Genipa americana* L.), *umbu* (*Spondia tuberosa* A.) and *siriguela* (*Spondia purpurea* L.) prepared from separate pulp, seeds and peel were investigated for their (i) antioxidant capacity, which was evaluated by various known methods, (ii) acetylcholinesterase (AChE) inhibitory activity, and (iii) cytotoxic effect on corneal epithelial cells of sheep. The extracts were also phytochemically screened. Genipap pulp and siriguela seed ethanol extracts presented an AChE inhibition zone similar to that of the positive control, carbachol. The highest values of total phenolic content were obtained with peel and seed extracts. Siriguela and umbu (seeds and peels) extracts displayed the highest antioxidant activities. Lipid peroxidation assays indicated that genipap pulp is a promising antioxidant. The investigation of phenols and organic acid contents revealed the presence of quercetin, citric and quinic acids and chlorogenic acid derivatives in several extracts, with the highest amount found in siriguela seeds. These data suggest that these extracts are potentially important antioxidant supplements for the food, pharmaceutical and cosmetic industries.

Keywords: total phenolic content, free radical scavenging activity, antioxidant, BODIPY, acetylcholinesterase inhibition, tropical fruits.

**Abbreviations Used**

- DPPH,  $\alpha,\alpha$ -diphenyl- $\beta$ -picrylhydrazyl radical;
- ABTS, 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzo-thiazoline-6-sulfonic acid) radical;
- AAPH, 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride;
- TPTZ, 2,4,6-tripyridyl-s-triazine;
- C<sub>11</sub>-BODIPY<sup>581/591</sup>, 4,4'-difluoro-5-(4-phenyl-1,3-butadienyl)-4-bora-3a,4a-diaza-S-indacene-3-undecanoic acid;
- DTNB, 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid);
- AChE, Acetylcholinesterase;
- ATCI, Acetylthiocholine iodide;
- AD, Alzheimer's disease;
- BSA, Bovine serum albumin;
- CUPRAC, Copper reducing antioxidant capacity;
- MEM, Eagle's minimum essential medium;
- EDTA, Ethylenediamine tetraacetic acid;
- FRAP, Ferric reducing antioxidant power;
- FCS, Fetal calf serum;
- FC, Folin-Ciocalteu;
- GA, Gallic acid;
- RSA-DPPH<sup>\*</sup>, Radical scavenging activity of  $\alpha,\alpha$ -diphenyl- $\beta$ -picrylhydrazyl radical;
- SD, Standard deviation;
- TLC, Thin layer chromatography;
- TPC, Total phenolic content.

## 1. Introduction

Various phytochemicals found in vegetables, fruits, and medicinal plants have received increasing attention for their potential role in the prevention and treatment of human diseases (Youdim & Joseph, 2001; Oliveira, Valentim, Goulart, Silva, Bechara, & Trevisan, 2009). They have long been associated with good health due to the presence of polyphenols, carotenoids, tocopherols, tocotrienols, ascorbic acid and several thiols (Oliveira, Valentim, Goulart, Silva, Bechara, & Trevisan, 2009). The health benefits could be attributed to their antioxidant capabilities. Antioxidants can protect biological systems against the potentially harmful effects of processes or reactions that can cause excessive oxidation (Arnao, Cano & Acosta, 2001). They also function as inducers of cell signals, leading to changes in gene expression, which result in the activation of enzymes that eliminate ROS and/or toxins, including those involved in initial cancer events, through redox regulation of thiols, and their influence on digestive and metabolizing enzymes, among other factors (Nzaramba, Reddivari, Bamberg & Miller, 2009; Finley, Kong, Hintze, Jeffery, Ji & Lei, 2011). Once the balance between the production of reactive oxygen species and the defense systems is disrupted, oxidative stress sets in, promoting many diseases such as cancer, arteriosclerosis and other cardiovascular disorders, diabetes, accelerated aging (Valko, Leibfritz, Moncol, Cronin, Mazur & Telser, 2007) and Alzheimer's disease (AD) (Ingkaninan, Temkitthawon, Chuenchom, Yuyaem & Thongnoi, 2003). However, the traditional message that oxidative stress, which involves the production of reactive oxygen species (ROS), is the basis for chronic diseases and aging is being reexamined. Accumulating evidence suggests that ROS exert essential metabolic functions and that removal of too many ROS can upset cell

signaling pathways and actually increase the risk of chronic disease (Finley, Kong, Hintze, Jeffery Ji & Lei, 2011).

Among the diseases, AD, a progressive degenerative neurological disorder characterized by impairment of memory and behavior, is specially relevant, concerning phytotherapy. One of the most promising approaches for treating this disease is to enhance the acetylcholine level in the brain using acetylcholinesterase (AChE) inhibitors (Ingkaninan, Temkitthawon, Chuenchom, Yuyaem & Thongnoi, 2003). An alternative therapy used is to minimize oxidative imbalance through the use of antioxidants, since AD is known to result from oxidative damage to the central nervous system (Barnham, Masters & Bush, 2004; Zaini, Anwar, Hamid & Saari, 2011). Actually most promising drugs for symptomatic treatment of AD are acetylcholinesterase inhibitors. Natural products with AChE inhibitory activity have been recognized as new multipotent drugs for AD treatment (Uriarte-Pueyo & Calvo, 2011; Williams, Sorribas & Howes, 2011; Matthew Joyner, P & Cichewicz, 2011).

Different methodologies have been employed to evaluate the in vitro antioxidant capacity and the results obtained depend on the method used (Huang, Ou & Prior, 2005). The antioxidant ability of natural and synthetic compounds, alone or in mixtures, can be evaluated using several methods, including peroxy and hydroxyl radical-scavenging capacity, metal-reducing capacity, organic radical-scavenging capacity and analysis of lipid peroxidation products (Rufino, Alves, Brito, Pérez-Jiménez, Saura-Calixto & Mancini-Filho, 2010). It is recommended that at least two (or even all) of these assays be combined to provide a reliable picture of the total antioxidant capacity (Contreras-Calderon, Calderon-Jaimes, Guerra-Hernandez & Garcia-Villanova, 2010).



According to [Clerici & Carvalho-Silva \(2011\)](#) on data reported by FAO (Food and Agriculture Organization) in 2010, worldwide production of the major tropical fruits is expected to reach 62,000,000 t by 2010, an increase of 15,000,000 t from 1998 to 2000. Developing countries will continue to account for 98% of global production.

Brazil has a plethora of tropical fruits with distinctive exotic flavors. In the Northeast of Brazil there are many areas where the climate and soil are especially favorable for the production of tropical fruits. Fruit production and processing represent important economical activities not only due to relevant regional commercialization but also to growing national and international markets ([Tiburski, Rosenthal, Deliza, Godoy & Pacheco, 2011](#)). *Genipa americana* L. (Rubiaceae) (genipap), which is edible and a popular source of beverages ([Ono et al., 2007](#)), is widely distributed in tropical Central and South America. *Spondia purpurea* L. (Anacardiaceae) (siriguela), originally from Central America, is distributed from Mexico through Northern Peru and Brazil, and is endemic to semi-arid regions ([Teixeira et al, 2007](#)). The fruit is small and reddish fruits have an aromatic pulp of bittersweet taste ([Augusto et al, 2000](#)). *Spondia tuberosa* A. (Anacardiaceae) (umbu) is a species distributed in Brazil's semi-arid tropical regions. Umbu is a source of vitamins and minerals and has a tannin content of 126.27 mg/100 g. This high tannin content and the presence of natural antioxidants give umbu its functional appeal ([Narain, Bora, Holschuh, & Vasconcelos, 1992](#)). Its fruit, which has a distinctive aroma, is suitable for raw consumption and for the processing industry ([Santos, 1999](#)). To the best of our knowledge, few studies ([Rufino, Fernandes, Alves & Brito, 2009](#); [Rufino, Alves, Brito, Pérez-Jiménez, Saura-Calixto & Mancini-Filho, 2010](#)) have focused on the antioxidant potential of these fruits.

The purpose of this study was to evaluate the anti-acetylcholinesterase and antioxidant activities of peel, pulp and seed ethanol extracts of three exotic and commercially important Brazilian fruits: genipap, siriguela, and umbu. To this end, the acetylcholinesterase inhibition of the extracts was analyzed, their total phenolic content was determined, and antioxidant tests were performed to determine the radical scavenging activities of  $\alpha,\alpha$ -diphenyl- $\beta$ -picrylhydrazyl radical (DPPH) and 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzo-thiazoline-6-sulfonic acid) radical (ABTS), based on ferric reducing antioxidant power (FRAP) and copper reducing antioxidant capacity (CUPRAC) assays, and on measurements of the antioxidant capacity of biomimetic liposomes by the  $C_{11}$ -BODIPY<sup>581/591</sup> method. The preliminary investigation of phenols and organic acid contents was also performed. The properties of these fruit extracts can be attributed to their content of phytochemicals reportedly beneficial to human health.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Standards and reagents

Folin-Ciocalteu reagent, soy phosphatidylcholine, vitamin C, resveratrol, ethanol, methanol, DPPH<sup>\*</sup> ( $\alpha,\alpha$ -diphenyl- $\beta$ -picrylhydrazyl radical), ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzo-thiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt), potassium persulfate, AAPH (2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride), TPTZ (2,4,6-tripyridyl-s-triazine), tris(hydroxymethyl)aminomethane, copper chloride II, neocuproine, ammonium acetate, bovine serum albumin (BSA), NaCl, MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O, acetylcholinesterase (AChE) from *Electrophorus electricus* (electric eel) – Type VI-S, acetylthiocholine iodide (ATCI), 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB), carbachol, Eagle's minimum essential medium (MEM), fetal calf serum (FCS), streptomycin,

penicillin, amphotericin B, trypsin, EDTA (ethylenediamine tetraacetic acid), and trypan blue were purchased from Sigma Aldrich (Steinheim, Germany). Methanol, ethanol, hydrochloric acid, sodium carbonate and gallic acid (GA) were supplied by Vetec Química Fina Ltda (Rio de Janeiro, Brazil); DC-Aluminofolien, Silica gel 60 F<sub>254</sub>, 0.2-mm thickness, and Trolox<sup>®</sup> were supplied by Merck (Düsseldorf, Germany), and the fluorescent fatty acid analogue 4,4'-difluoro-5-(4-phenyl-1,3-butadienyl)-4-bora-3a,4a-diaza-S-indacene-3-undecanoic acid (C<sub>11</sub>-BODIPY<sup>581/591</sup>) was purchased from Molecular Probes (Ontario, Canada). All the reagents were of analytical grade and the stock solutions and buffers were prepared with Milli-Q purified water.

## 2.2. Fruit sampling

Genipap (*Genipa americana* L., Rubiaceae), siriguela (*Spondia purpurea* L., Anacardiaceae) and umbu (*Spondia tuberosa*, Anacardiaceae) fruits, intact and in a suitable state of ripeness for harvesting, were purchased at the municipal market of Maceió, Alagoas, in the morning, during the months of March and April, 2008. These fruits came from small noncommercial farms in the state of Alagoas. Although the fruit were not labeled as organically grown products, they were cultivated without agrochemicals. The fruits were stored at room temperature for about two days post-harvest. Immediately after they were purchased, the samples were washed with tap water and the parts to be analyzed were separated and dried for subsequent ethanol extraction. Siriguela and umbu seeds were dried in an air-circulating oven, at 40 °C for 24 h.

## 2.3. Sample preparation and extraction

The crude extracts were prepared from the peels, pulp and seeds of the fruits. Table 1 lists the weight of fruit parts used to prepare the extracts (column 2). Each part was oven-dried at 35 °C, crushed and then extracted three times with 95 % ethanol. The solvents were eliminated in a rotary evaporator (Buchi rotavapor R-114) at 40 °C and the residues were dried and stored at 27 °C, wrapped in aluminum foil, to avoid incidence of light. Table 1 lists the extraction yields (column 3), obtained after evaporation of the solvent (ethanol).

Table 1 – Initial dry weight (g) and extraction yields (%) from samples

<b>Samples</b>	<b>Initial dry weight (g)</b>	<b>Extraction yield (%)</b>
Genipap peel	259.9	36.3
Genipap pulp	50.0	45.4
Genipap seeds	451.1	25.3
Siriguela peel	149.8	5.9
Siriguela pulp	50.0	32.3
Siriguela seeds	285.7	1.4
Umbu peel	88.5	11.3
Umbu pulp	50.0	17.5
Umbu seeds	149.0	5.6

#### 2.4. Phytochemical screening of extracts

The presence of anthocyanidins, anthocyanins, anthraquinones, anthrone, catechins, coumarins, flavonols, flavonoids, flavanones, leucoanthocyanidins, phenols, proanthocyanidins, saponins, steroids, triterpenoids, tannins and xanthenes

in the extracts was verified, qualitatively, according to the method described by [Souza, Oliveira, Rabello, Cunha, Costa & Leite \(2003\)](#).

#### 2.5. Thin layer chromatography (TLC) bioassay for the detection of AChE inhibition

Inhibition of the enzyme acetylcholinesterase (AChE) was evaluated by TLC following the methodology described by Ellman, which was later adapted by [Rhee, Meent, Ingkaninan & Verpoorte \(2001\)](#). The peel, pulp and seed extracts were dissolved individually in ethanol. Each sample was diluted to a concentration of 2 mg mL<sup>-1</sup> and placed on an alumina chromatography plate of (1.5 - 2.5  $\mu$ L). The plate was then sprayed with DTNB [5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)]/ATCI [acetylthiocholine iodide] reagent [1 mmol L<sup>-1</sup> DTNB (Ellman's reagent) and 1 mmol L<sup>-1</sup> ATCI in Tris-HCl buffer, pH 8.0] until the silica was saturated with the solvent. The TLC plates were allowed to dry for 3 min, after which they were sprayed with 3 U mL<sup>-1</sup> of AChE enzyme solution. After 10 min, a yellow background with white spots revealing compounds with enzyme inhibitory activity became visible. Carbachol (0.01 mol L<sup>-1</sup>) was used as a positive control and ethanol and methanol as negative controls.

#### 2.6. Cytotoxicity assay

The possible cytotoxic effect of the tested plant extracts was examined using sheep corneal epithelial cells. The cells were cultured in MEM supplemented with 10 % fetal bovine serum (FBS), 0.10 mg mL<sup>-1</sup> of streptomycin, 100 UI of penicillin G and 0.25  $\mu$ g of amphotericin B in an incubator with 5 % CO<sub>2</sub> at 37 °C. The cells were harvested using trypsin 0.05 % and 0.02 % EDTA solution. The cells were seeded in 96-well plates (1 $\times$ 10<sup>4</sup> cells per well) and incubated for 24 h with 5 % CO<sub>2</sub> at 37 °C. The culture medium was then substituted for 200 mL of fresh medium (control) or medium

containing a concentration of  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  of the extracts. After 48 h, the cells were dispersed and evaluated by the Trypan Blue Exclusion assay (Weisenthal, Marsden, Dill & Macaluso, 1983). All the tests were performed in triplicate.

## 2.7. Determination of total phenolic content

The total phenolic content (TPC) of the ethanol extracts obtained from the powdered fruits was determined using Folin-Ciocalteu (FC) reagent, as described by Cicco, Lanorte, Paraggio, Viggiano & Lattanzio (2009), with the following modifications. Solutions of dried extracts in methanol were prepared at a concentration of  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Aliquots ( $120 \mu\text{L}$ ) of these solutions were placed in test tubes and  $180 \mu\text{L}$  of water was added to obtain 4 % methanol in the final solution. Then,  $300 \mu\text{L}$  of FC reagent was added to each tube. After 2 min,  $2.4 \text{ mL}$  of a 5 % (w/v) sodium carbonate solution was added. The mixture was shaken and heated at  $40 \text{ }^\circ\text{C}$  in a water bath for 20 min. The tubes were then cooled rapidly and the developed color was read at 767 nm in a MutiSpec–1501 UV-Vis spectrophotometer (Shimadzu, Japan). The concentration of phenolic compounds was estimated using a calibration curve traced with gallic acid (GA) in methanol ( $0.10 \times 10^{-4} - 17.5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ) as a polyphenol reference ( $n = 3$ ). The results are expressed as mg of GA equivalents/g extract ( $\text{mg GAE g}^{-1}$ ). The same procedure was performed using  $120 \mu\text{L}$  of methanol as a negative control.

## 2.8. Radical scavenging activity of $\alpha,\alpha$ -diphenyl- $\beta$ -picrylhydrazyl radical (RSA-DPPH $^{\bullet}$ )

The antioxidant capacity of fruit samples and, for purposes of comparison, the antioxidant activity of Trolox were measured as their radical scavenging ability (RSA),

using the DPPH<sup>•</sup> method ([Sánchez-Moreno, Larrauri, & Saura-Calixto, 1999](#)). Thus, 0.30 mL of powder extract solution (50 µg mL<sup>-1</sup>) was mixed with 2.7 mL of DPPH<sup>•</sup> radical solution (40 µg mL<sup>-1</sup> in methanol) in a 3 mL quartz cuvette. The mixture was homogenized and stored in the dark prior to analysis. The DPPH<sup>•</sup> absorption values at 516 nm were recorded at 5 min intervals for 50 min.

The percentage of DPPH radical-scavenging activity (RSA% - DPPH<sup>•</sup>) of each extract was calculated as follows:

$$\% \text{ RSA} = (1 - A_C / A_D) \times 100,$$

where  $A_C$  is the absorbance of the solution when extract was added at a particular concentration in 30 min, and  $A_D$  is the absorbance of the DPPH<sup>•</sup> solution. All the determinations were performed in triplicate.

The IC<sub>50</sub> (half maximal inhibitory concentration) was calculated graphically using a calibration curve in the linear range by plotting the extract concentration vs. the corresponding scavenging effect. The IC<sub>50</sub> or I% (percentage of inhibition) was calculated according to [Scherer & Godoy \(2009\)](#), using the following equation:

$$I\% = [(Abs_0 - Abs_1) / Abs_0] \times 100,$$

where  $Abs_0$  is the absorbance of the control and  $Abs_1$  the absorbance in the presence of the test compound.

## 2.9. ABTS assay

The method described by [Arnao, Cano & Acosta \(2001\)](#) was used with minor modifications as follows. Stock solutions (50 mL) were prepared, one containing 7 mmol L<sup>-1</sup> ABTS<sup>•+</sup> and the other 140 mmol L<sup>-1</sup> potassium persulfate. The reagent was then prepared by mixing the two stock solutions in equal volumes and allowing them to react for 16 h at room temperature in the dark. The final solution was then diluted

by mixing 5 mL of freshly prepared ABTS<sup>•+</sup> solution (7 mmol L<sup>-1</sup>) with 90 µL methanol to obtain an absorbance of  $0.70 \pm 0.50$  at 734 nm. Extract solutions were prepared in methanol at a concentration of 50 µg mL<sup>-1</sup>. Fruit extracts (aliquot of 30 µL) were allowed to react with 3.0 mL of the ABTS<sup>•+</sup> solution for 6 min in the dark. The absorbance was then measured at 734 nm. The standard curve was linear between 100 and 2,000 µmol L<sup>-1</sup> of Trolox<sup>®</sup>. The results are expressed in mmol Trolox<sup>®</sup> equivalent (TE) / g fresh mass.

#### 2.10. FRAP assay

The assay was performed according to the method described by [Rufino et al. \(2006\)](#), which is based on the reduction of a ferric tripyridyltriazine complex to its dark blue ferrous form, in the absence and presence of antioxidants. Briefly, the FRAP reagent is prepared by mixing 2.5 mL of a solution of 10 mmol L<sup>-1</sup> TPTZ in 40 mmol L<sup>-1</sup> HCl, and adding 2.5 mL of 20 mmol L<sup>-1</sup> FeCl<sub>3</sub> and 25 mL of 0.30 mol L<sup>-1</sup> acetate buffer (pH=3.6), after which the reagent is heated to 37 °C.

Sample aliquots (90 µL) were mixed with 270 µL of distilled water and 2.7 mL of FRAP reagent and incubated at 37 °C for 30 min. The absorbance of the reaction mixture was measured at 595 nm and a calibration curve was prepared with Trolox<sup>®</sup> (5-1,000 µmol L<sup>-1</sup>). The results are expressed as TEAC<sub>FRAP</sub>, i.e., Trolox Equivalent Antioxidant Capacities calculated with respect to the original FRAP in mmol of Trolox g<sup>-1</sup>.

#### 2.11. CUPRAC (Copper Reducing Antioxidant Capacity)

These assays are based on the reduction of Cu(II) to Cu(I) by the combined action of all the antioxidants (reducing agents) in a sample. One mL each of CuCl<sub>2</sub> (1



$\times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ ), neocuproine ( $7.5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ) and  $\text{NH}_4\text{Ac}$  buffer solutions ( $1.0 \text{ mol L}^{-1}$ ,  $\text{pH} = 7.0$ ) were placed in a test tube. Then, 0.5 mL of the extract solution and 0.6 mL of  $\text{H}_2\text{O}$  were added to the initial mixture to reach a final volume of 4.1 mL. The tubes were stoppered, and after 1 h, the absorbance at 450 nm was recorded against a blank reagent. The extract solutions were prepared in methanol at a concentration of  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ . The calibration curve was prepared with Trolox ( $5\text{-}600 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) (Apak, Güçlü, Özyürek & Karademir, 2004). The results are expressed as the total antioxidant capacity in  $\text{mmol Trolox g}^{-1}$  of extract, which was calculated as follows:

$$\text{Total Antioxidant Capacity (in mmol Trolox/g)} = \frac{AV_f r V_i}{\epsilon_{\text{Trolox}} V_s m} / 1000$$

where  $A$  is the absorbance;  $\epsilon_{\text{Trolox}}$  is the molar absorptivity of Trolox;  $V_f$  is the final volume (after the addition of reagents);  $V_s$  is the volume of sample taken for analysis from the diluted extract;  $r$  is the time prior to analysis;  $V_i$  is the volume used to prepare the initial solution (diluted extract); and  $m$  is the weight in grams used in the preparation of the initial solution (diluted extract).

## 2.12. Antioxidant capacity in a biomimetic membrane system

### Preparation of unilamellar vesicles

Unilamellar vesicles of soy phosphatidylcholine (1 mM) were prepared by extrusion in 10 mL of phosphate buffer ( $50 \text{ mmol L}^{-1}$ ,  $\text{pH} 7.4$ ), as previously described (MacDonald, MacDonald, Menco, Takeshita, Subbarao, & Hu, 1991), with the additional incorporation of  $10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$  of the peroxy-sensitive fluorescent probe  $\text{C}_{11}\text{-BODIPY}^{581/591}$  (Drummen, Gadella, Post, & Brouwers, 2002). The multilamellar dispersion obtained in this step was transferred to a membrane extrusion system with 100 nm pore diameter operating at  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ . The multilamellar dispersion was put

through the extruder 15 times to produce BODIPY-labeled unilamellar vesicles with an average diameter of 120 nm.

#### Lipid peroxidation measurements

Fluorescence measurements were carried out at 37 °C in a Spex Fluorolog 1681<sup>®</sup> fluorometer by mixing, in a 1 mL-quartz cuvette, 800 µL of unilamellar vesicle suspension, 50 µL of 50 mmol L<sup>-1</sup> phosphate buffer pH 7.4, and 50 µL of sample (0.5 mg mL<sup>-1</sup> dried extract solution) or Trolox (1, 5 and 10 µmol L<sup>-1</sup>), vitamin C and resveratrol (100 µmol L<sup>-1</sup>) as positive controls. The solvents (methanol and buffer) were used as negative controls. The reaction was initiated with the addition of 100 µL of AAPH (100 mM). The fluorescence decay ( $\lambda_{exc} = 580$  nm,  $\lambda_{em} = 600$  nm) was monitored continuously for 30 min.

#### 2.13. UPLC-MS analysis of phenolic compounds and some organic acids

In order to characterize the plant material, UPLC-MS profiles of the extracts were obtained. Chromatographic separation (3 µL injection) was performed in an Acquity UPLC system (Waters, Milford, MA, USA) using a UPLC BEH column (2.1 x 50 mm, 1.7 µm particle size) at a temperature of 30°C. A gradient of (A) milli-Q purified water with 0.1% formic acid and (B) acetonitrile (Tedia, Brazil) was used, starting with 5% B and ramping up to 100% B at 9 min, holding for 9.50 min, and then returning to the initial conditions. Detection in the negative ion mode was performed in an Acquity TQD mass spectrometer (Micromass Waters, Milford, MA, USA) operating in the following conditions: capillary - 3000 V, Cone - 30 V, source temperature 150°C; in the range of 110 to 1000 m/z. Compounds were identified and quantified in comparison to standards.

#### 2.14. Statistical analysis

The experimental design was completely randomized with 9 treatments and 3 replicates. The data were analysed using analysis of variance (ANOVA), followed by a Tukey test to detect significant differences between treatments. The results were expressed as mean  $\pm$  SD (standard deviation). Statistical analysis was performed using SAEG 9.1 (System for Statistical Analysis, MG, Brazil).

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Phytochemical screening and UPLC/MS analyses of extracts

Phytochemical screening was performed to identify the classes of compounds in the extracts before using them. Sterols, terpenoids, oils, flavonoids, alkaloids and other phenolic compounds have been shown to possess anti-acetylcholinesterase and antioxidant activities ([Ji & Zhang, 2008](#), [Ross & Kasum, 2002](#)).

The interest in polyphenols is due to their great abundance in our diet, and their probable role in the prevention of various diseases associated with oxidative stress. The present phytochemical screening revealed the presence of phenols and tannins in siriguela and umbu (peel and seeds); anthocyanins, proanthocyanidins and flavonoids in siriguela peel; leucoanthocyanidins, catechins and flavanones in genipap peel and in genipap, siriguela and umbu seeds; anthraquinones, anthrone and coumarins in genipap, siriguela and umbu (peel and seeds); triterpenoids and steroids in all the samples; and saponins in siriguela seeds. The pulps were not analyzed due to the formation of precipitates during the tests (Table 2).

Table 2 – Phytochemical screening of extracts of parts of the fruits

Ethanol Extracts	Phenols and tannins	Anthocyanins, proanthocyanidin s and flavonoids	Leucoanthocyanidin s, catechins and flavanones	Anthraquinones, anthrones and coumarins	Flavonols, flavanones and xanthonnes	Triterpenoids, sterols	Saponins
Genipap peel	-	-	+	+	-	+	-
Genipap seed	-	-	+	+	-	+	-
Genipap pulp	- <sup>a</sup>	- <sup>a</sup>	- <sup>a</sup>	- <sup>a</sup>	- <sup>a</sup>	- <sup>a</sup>	- <sup>a</sup>
Siriguela peel	+	+	-	+	-	+	-
Siriguela seed	+	-	+	+	-	+	+
Siriguela pulp	- <sup>a</sup>	- <sup>a</sup>	- <sup>a</sup>	- <sup>a</sup>	- <sup>a</sup>	- <sup>a</sup>	- <sup>a</sup>
Umbu peel	+	-	-	+	-	+	-
Umbu seed	+	-	+	+	-	+	-
Umbu pulp	- <sup>a</sup>	- <sup>a</sup>	- <sup>a</sup>	- <sup>a</sup>	- <sup>a</sup>	- <sup>a</sup>	- <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Could not be performed due to the formation of precipitates.

Albeit not comprehensive in terms of total phytochemical content, UPLC/MS analyses revealed that quercetin predominated in most of the analyzed extracts: genipap peel ( $48.38 \pm 0.97 \mu\text{g g}^{-1}$ ); genipap seeds ( $34.73 \pm 0.69 \mu\text{g g}^{-1}$ ); umbu peel ( $32.65 \pm 0.65 \mu\text{g g}^{-1}$ ); siriguela peel ( $31.44 \pm 0.63 \mu\text{g g}^{-1}$ ); genipap pulp ( $9.84 \pm 0.20 \mu\text{g g}^{-1}$ ) and siriguela pulp ( $3.88 \pm 0.08 \mu\text{g g}^{-1}$ ). The phytochemical composition of siriguela seeds contained a noticeable amount of chlorogenic acid (3-caffeoyl-*D*-quinic acid; CGA) ( $356.93 \pm 7.13 \mu\text{g g}^{-1}$ ). This acid (3-caffeoyl-*D*-quinic acid; CGA), an ester formed between caffeic and quinic acids, is one of major polyphenol compounds found in numerous plant species (Kono et al., 2007). It has two vicinal hydroxyl groups on an aromatic residue and, in vitro, exhibits antimutagenic, carcinogenic and antioxidant activities which are responsible for scavenging reactive oxygen species (ROS) (Sato et al., 2011). When our study focused on analyzing organic acids, we found citric acid (umbu peel –  $3.78 \pm 0.07 \mu\text{g g}^{-1}$ ; umbu seeds –  $3.11 \pm 0.06 \mu\text{g g}^{-1}$ ; umbu pulp –  $2.12 \pm 0.04 \mu\text{g g}^{-1}$ ; siriguela seeds –  $1.50 \pm 0.03 \mu\text{g g}^{-1}$ ; siriguela peel –  $0.88 \pm 0.01 \mu\text{g g}^{-1}$ ; siriguela pulp –  $0.52 \pm 0.01 \mu\text{g g}^{-1}$  and genipap pulp –  $0.43 \pm 0.00 \mu\text{g g}^{-1}$ ) and quinic acid (genipap peel -  $43.28 \pm 0.86 \mu\text{g g}^{-1}$  and

umbu pulp –  $41.88 \pm 0.84 \mu\text{g g}^{-1}$ ). Organic acids are primary metabolites that can be found in large amounts in all plants, especially in fruits (Silva et al., 2011). Citric acid is an important organic acid for plant growth and is related with heavy metal stress tolerance (Sun & Hong, 2011).

Apart from the above mentioned compounds, Costa, Ballus, Texeira-Filho & Godoy (2010) have reported total phytosterol content of genipap pulp and seeds of 216 and 233 mg  $100 \text{ g}^{-1}$ , respectively. They observed the presence of phytosterols such as campesterol, stigmasterol,  $\beta$ -sitosterol + sitostanol,  $\Delta 5$ -avenasterol +  $\Delta 7$ -stigmasterol and  $\Delta 7$ -avenasterol.

### 3.2 Thin layer chromatography (TLC) bioassay for the detection of AChE inhibition

Partial inhibition of AChE activity in the brain has been shown to be therapeutically beneficial. AChE inhibitors that penetrate the blood–brain barrier elevate the levels of endogenous acetylcholine and are useful in the symptomatic treatment of Alzheimer's disease (Rosenberry, Sonoda, Dekat, Cusack & Johnson, 2008). The ethanol extracts of genipap pulp and of umbu and siriguela seeds present anti-acetylcholinesterase activity. The carbamate carbachol was used for comparison because it is an isosteric analogue of the physiological substrate acetylcholine (Rosenberry, Sonoda, Dekat, Cusack & Johnson, 2008). Genipap pulp ( $0.8 \pm 0.01 \text{ cm}$ ) and siriguela seed ( $0.9 \pm 0.01 \text{ cm}$ ) presented an AChE inhibition zone similar to that of the positive control ( $1.0 \pm 0.01 \text{ cm}$ ), a finding that is significant and hitherto unreported. Umbu seeds presented reasonable activity ( $0.5 \pm 0.01 \text{ cm}$ ) and the other extracts were inactive.

### 3.2. Cytotoxicity of plant extracts

Some natural products from plants are reportedly harmful to health. Therefore, cytotoxic studies are necessary and can indicate the toxic profile of plant extracts (Oke & Aslim, 2010). The extracts were evaluated on sheep corneal epithelial cells in order to evaluate their cytotoxic effects on normal cells. The medium [Minimum Essential Medium (MEM) + 10 % Fetal Calf Serum (FCS)] and 1 % formaldehyde were used as negative and positive controls, respectively. In this work, the ethanol extracts of parts of the fruits, at concentrations of 100 ppm, did not show cytotoxicity (Table 3). None of the extracts led to the reduction of cell viability below 90 %. The fruit parts (seed and peel) evaluated here are not commonly eaten and there are no reports of the cytotoxicity of the pulps.

Table 3 – Effects of ethanol extracts of fruits on sheep corneal epithelial cell viability

Ethanol extracts (100 ppm)	Cell viability (%)
Genipap peel	98.5 ± 0.53
Genipap pulp	100.0 ± 0.00
Genipap seeds	99.1 ± 0.18
Siriguella peel	90.4 ± 0.39
Siriguella pulp	99.6 ± 0.26
Siriguella seeds	92.8 ± 0.61
Umbu peel	98.9 ± 0.30
Umbu pulp	98.8 ± 0.53
Umbu seeds	92.0 ± 0.79
Negative Control 1: MEM + 10% FCS	98.0 ± 0.25
Positive Control 2: Formaldehyde 1% (w/v)	16.2 ± 0.68

Based on these results, the most promising extracts were those obtained from genipap pulp and siriguela seeds.

### 3.3. Total Phenolic Content (TPC) and Antioxidant Assays

There are several methods for determining antioxidant capacity. The methods used here were DPPH, ABTS, FRAP, CUPRAC and lipid peroxidation in a biomimetic membrane system. The methods based on organic radical-scavenging capacity used in this study were DPPH and ABTS. The DPPH assay is based on the measurement of the reducing ability of antioxidants toward the 520 nm-absorbing, deep violet DPPH<sup>•</sup> radical.

Table 4 lists the TPC, ABTS, FRAP and CUPRAC results obtained from the ethanol extracts of fruits. A significant difference ( $p < 0.05$ ) among all the analyzed extracts was obtained, with the best general performance shown by siriguela seeds.

With regard to TPC, siriguela and umbu seeds showed the highest values; genipap pulp showed an intermediate value, and siriguela and umbu pulp showed the lowest values (Table 4). Evaluating only the fresh pulp of *S. purpurea* (siriguela) and *S. tuberosa* (umbu), [Almeida et al. \(2011\)](#) found moderate values of 55.0 and 44.6 mg of GAE/100 g, respectively. [In an investigation of the yellow mombin \(pulp + peel\) \(\*Spondia mombin\* L.\), which belongs to the Anacardiaceae family, \[Tiburski, Rosenthal, Deliza, Godoy & Pacheco \\(2011\\)\]\(#\) found a total phenolic content of 260.21 mg GAE/100 g. Assessing the intact fruit \(peel, pulp and seed\) of \*Spondia pinnata\* K., \[Satpathy, Tyagi & Gupta \\(2011\\)\]\(#\) reported the highest value of 210 mg GAE for TPC in 100 mg of the extract.](#)

[Orhan & Aslan \(2009\)](#) studied anti-acetylcholinesterase and antioxidant activities in ethanol extracts of *Salvia triloba*, *Teucrium polium* and *Melissa officinalis*

and found values of 10.9, 107.8 and 68.7 mg GAE g<sup>-1</sup> extract, respectively. In relation to the Anacardiaceae family; [Moyo, Ndhlala, Finnie & Staden \(2010\)](#) evaluated leaf, stem bark, young stem and opercula of *Sclerocarya birrea* subsp. *caffra* e *Harpephyllum caffrum* and obtained significant anti-acetylcholinesterase activity, with TPC values varying from 2.46 to 14.15 mg GAE g<sup>-1</sup> extract.

All the extracts of genipap, siriguela and umbu parts, in our study, presented higher values than those obtained by [Orhan & Aslan \(2009\)](#) and [Moyo, Ndhlala, Finnie & Staden \(2010\)](#). It is noteworthy that Folin-Ciocalteu reagent, which is used to determine TPC, is not specific for phenolic compounds because it can also be reduced by many non-phenolic compounds, including ascorbic acid ([Karadag, Ozcelik & Saner, 2009](#)).

Table 4 – TPC, DPPH, ABTS, FRAP and CUPRAC of ethanol extracts of fruits

Ethanol Extracts	TPC g GAE <sup>h</sup> g <sup>-1</sup> dry extract	DPPH RSA% - DPPH <sup>•i</sup>	ABTS TEAC <sup>j</sup>	FRAP TEAC <sub>FRAP</sub> (mmol Trolox. g <sup>-1</sup> )	CUPRAC TEAC <sub>CUPRAC</sub> (mmol Trolox. g <sup>-1</sup> )
Genipap peel	187.7 ± 11.3 <sup>b</sup>	15.43 ± 0.70 <sup>d</sup>	0.75 ± 0.09 <sup>d,e</sup>	0.71 ± 0.06 <sup>d</sup>	1.32 ± 0.05 <sup>e,d</sup>
Genipap seeds	122.7 ± 18.9 <sup>c</sup>	11.61 ± 0.47 <sup>e</sup>	1.09 ± 0.35 <sup>d</sup>	1.0 ± 0.07 <sup>d</sup>	0.81 ± 0.30 <sup>f</sup>
Genipap pulp	61.6 ± 3.6 <sup>d</sup>	10.17 ± 0.36 <sup>e</sup>	0.40 ± 0.00 <sup>e,f,g</sup>	1.02 ± 0.11 <sup>d</sup>	1.04 ± 0.13 <sup>d,e</sup>
Siriguela peel	112.2 ± 13.2 <sup>c</sup>	31.89 ± 0.92 <sup>b</sup>	5.06 ± 0.15 <sup>a</sup>	16.20 ± 1.05 <sup>a</sup>	5.06 ± 0.15 <sup>b</sup>
Siriguela seeds	254.7 ± 42.1 <sup>a</sup>	37.64 ± 1.26 <sup>a</sup>	3.06 ± 0.22 <sup>b</sup>	13.73 ± 0.53 <sup>b</sup>	8.87 ± 0.23 <sup>a</sup>
Siriguela pulp	13.5 ± 1.3 <sup>e</sup>	6.40 ± 0.35 <sup>f</sup>	0.03 ± 0.01 <sup>g</sup>	0.28 ± 0.09 <sup>d</sup>	0.37 ± 0.01 <sup>f</sup>
Umbu peel	52.5 ± 5.9 <sup>d</sup>	19.71 ± 1.47 <sup>c</sup>	0.53 ± 0.01 <sup>e,f</sup>	4.98 ± 0.21 <sup>c</sup>	1.46 ± 0.07 <sup>c</sup>
Umbu seeds	202.2 ± 6.9 <sup>b</sup>	20.78 ± 0.34 <sup>c</sup>	2.18 ± 0.35 <sup>c</sup>	5.46 ± 0.08 <sup>c</sup>	5.17 ± 0.13 <sup>b</sup>
Umbu pulp	40.4 ± 8.7 <sup>d</sup>	16.10 ± 0.88 <sup>d</sup>	0.22 ± 0.05 <sup>f,g</sup>	1.19 ± 0.15 <sup>d</sup>	0.80 ± 0.04 <sup>e</sup>

<sup>h</sup> Gallic Acid Equivalents. <sup>i</sup> Percentage of DPPH radical-scavenging activity in 30 min.

<sup>j</sup> TEAC: Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (mmol TE/g dry extract). Mean values followed by the same letters in each column do not differ significantly at  $p < 0.05$  by a Tukey test.



The highest consumption of DPPH<sup>\*</sup> (Table 4, column 3) was observed in siriguela (seed and peel) and umbu seed extracts, with a positive association between anti-acetylcholinesterase activity and TPC (Table 4, column 2), which showed the same tendency, i.e., higher values for siriguela seed. The consumption of DPPH<sup>\*</sup> was found to stabilize at about 27 min, which indicates the time of action of possible antioxidants present in the samples. [Moyo, Ndhala, Finnie & Staden \(2010\)](#), in *Sclerocarya birrea* subsp. *caffra* e *Harpephyllum caffrum*, found % RSA values, varying from 2.5 up to 27.2.

IC<sub>50</sub> values for most promising extracts were determined as 36.37 µg mL<sup>-1</sup>, 173.37 µg mL<sup>-1</sup>, 1069.13 µg mL<sup>-1</sup>; for siriguela seeds, umbu seeds and genipap pulp, respectively. [Gacche & Dhole \(2011\)](#) evaluating the ethanolic extract of *Morinda centrifolia* L., from the same family as genipap, exhibited IC<sub>50</sub> of 0.620 mg mL<sup>-1</sup>, a lower value genipap pulp. The IC<sub>50</sub> values of *Sclerocarya birrea* and *Harpephyllum caffrum* extracts (Anacardiaceae) – leaf, young stem and opercula from 4.26 to 6.92 µg mL<sup>-1</sup>, below the values found for siriguela and umbu ([Moyo, Ndhala, Finnie & Staden, 2010](#)).

The ABTS method is based on the ability of antioxidant molecules to quench the long-lived ABTS<sup>•+</sup> radical ([Arnao, Cano & Acosta, 2001](#)). The highest ABTS values were observed in siriguela peel and in the seed extracts of all the fruits, showing the same trend already observed for siriguela (seed and peel) and umbu seed (Table 4). The best results shown by seeds are probably attributable to their chemical compositions rich in phenols and the presence of substances required for the germination process, as described by [Martins, Vasconcellos, Rossetto & Carvalho \(2010\)](#). [Almeida et al. \(2011\)](#) found values of 6.25 and 1.07 µM of Trolox

equivalents/g fresh mass of siriguela and umbu, respectively. For *Spondia pinnata* K., [Satpathy, Tyagi & Gupta \(2011\)](#) reported ABTS (TEAC) values of 0.68 to 0.83 in 100 mg extract.

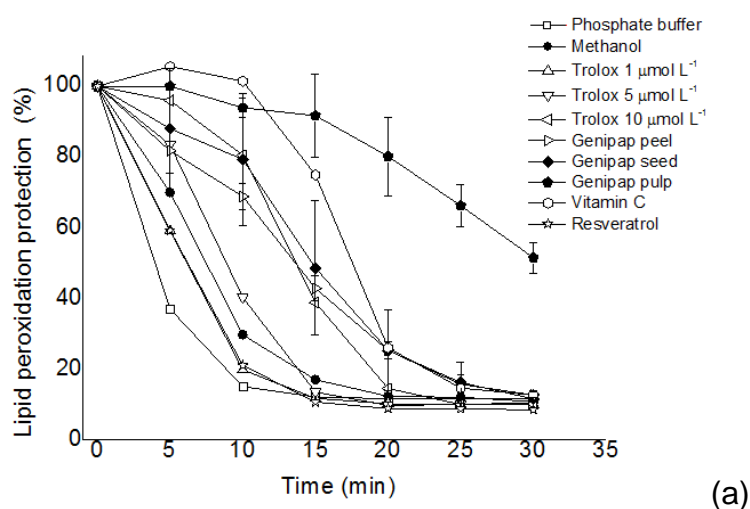
Among the metal reduction-based antioxidant methods, the FRAP method reduces the Fe(III)-TPTZ complex to Fe(II)-TPTZ at low pH ([Rufino et al., 2006](#)). Another method employed here was CUPRAC, which uses Cu(II)-neocuproine [Cu(II)-Nc] as the chromogenic oxidizing agent. This method offers advantages over the FRAP method because the redox chemistry of Cu(II) involves faster kinetics than that of ferric ions ([Apak, Güçlü, Özyürek & Karademir, 2004](#)). According to the metal reduction potential in the the Iron-FRAP and Copper-CUPRAC complexes, the latter method has shown higher selectivity due to its lesser ability to receive electrons. [Satpathy, Tyagi & Gupta \(2011\)](#) report FRAP values of 5.97 to 7.93 mg TE/100 mg<sup>-1</sup> extract from *Spondia pinnata* K.

FRAP and CUPRAC methods showed higher values for siriguela and umbu (peels and seeds). Genipap pulp showed the worst profile, following the same tendency as that of the other aforementioned methods (Table 4). [Contreras-Calderon, Calderon-Jaimes, Guerra-Hernandez & Garcia-Villanova \(2010\)](#) tested seed samples of 12 families: Sapotaceae; Arecaceae; Caesalpinaceae; Myrtaceae; Pasifloraceae; Rubiaceae; Anacardiaceae; Cucurbitaceae; Sterculiaceae; Proteaceae; Caricaceae and Icacinaceae for antioxidant activity and TPC. Their findings showed that the seeds present a wide range of FRAP (1.40 to 1690 FRAP  $\mu\text{mol TEs/g}$  of fresh weight), ABTS (4.92 to 1700 ABTS  $\mu\text{mol TEs/g}$  of fresh weight) and TPC (20.4 to 4851TP mg of GAEs/100 g of fresh weight) values.

To summarize, siriguela peel and seed showed the best results in most of the antioxidant assays, while the pulps showed the lowest activity.

Based on the results, a positive correlation was found between acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity in the siriguela and umbu seed extracts, but not in genipap pulp. In the case of genipap, a non-phenolic compound is expected to be an acetylcholinesterase inhibitor.

The antioxidant capacity was also evaluated using a peroxy radical-mediated lipid peroxidation membrane model (soy lecithin unilamellar liposomes) loaded with the peroxy radical-sensitive fluorescent probe  $C_{11}$ -BODIPY<sup>581/591</sup> (Oliveira et al., 2009). Figures 1a, 1b and 1c present lipid peroxidation protection (%) as a function of time (total time 30 min) of fruit extracts (0.5 mg mL<sup>-1</sup>). Genipap pulp extract showed the best performance, providing more than 95 % protection of the membrane for 15 min. Siriguela peel and seed extracts protected the membrane (more than 95 %) for more than 30 min, while umbu peel and seed extracts offered more than 95 % protection of the membrane for 15 min. These results were considered better than those of the positive controls (Trolox - 1, 5 and 10  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ; vitamin C - 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$  and resveratrol - 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ). The extracts that presented acetylcholinesterase inhibitory activity also showed positive performance by this method.



(a)

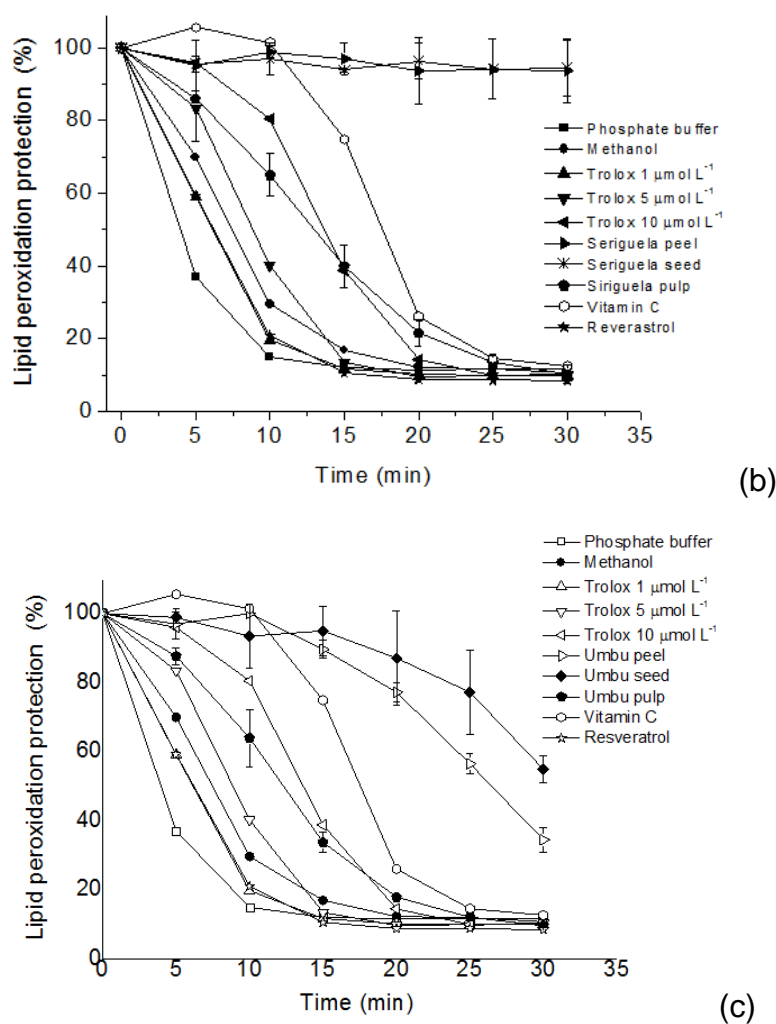


Figure 1 – Protection against lipid peroxidation provided by the extracts ( $0.5 \text{ mg mL}^{-1}$ ) of different parts of the fruits of (a) genipap, (b) siriguela and (c) umbu

The results indicate that the extracts of genipap pulp, siriguela (peel and seed) and umbu (peel and seed) can work synergistically, since they provided longer protection of the membrane than the controls. It could be meaningless to analyze membrane protection afforded by a single antioxidant present in each extract over time, since some antioxidants play cooperative roles against lipid peroxidation. Such interactions may result in synergistic rather than cumulative antioxidant activity. The most efficient biological interaction seems to be the antioxidant synergism between

vitamin E and vitamin C. Vitamin C reduces vitamin E radical to regenerate vitamin E, before the vitamin E radical attacks lipids to induce lipid oxidation (Niki, 2010).

Zaini, Anwar, Hamid & Saari (2011) investigated the in vitro antioxidant activity of Kundur fruit and demonstrated that the seed had higher inhibitory capacity against linoleic acid oxidation and scavenging of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radicals than the peel, pulp and core of the fruit. This may be due to the higher total phenolic content and superoxide dismutase (SOD) activity of the seeds, which is similar to the results observed in the present study for siriguela and umbu seeds. Pande & Akoh (2010) reported that the seeds of numerous underutilized fruits contain a high polyphenol content, followed by their peels and pulp.

According to Karadag, Ozcelik & Saner (2009), the antioxidant capacity of complex heterogeneous foods and biological systems is affected by many factors, including the partitioning properties of the antioxidants between lipid and aqueous phases, the conditions of oxidation and the physical state of the oxidizable substrate.

Because of the phytochemical diversity and aqueous and lipid phases in foods, it is reasonable to suggest the existence of various substances that interact for common purposes. Thus, a substance responsible for protecting plants can act as an antioxidant and also as an acetylcholinesterase inhibitor.

As regards the activities found in genipap pulp, it can be assumed that they are not attributable to phenolic compounds due to the low content obtained, while in siriguela and umbu fruits, these compounds may be directly responsible for the activities, as indicated by phytochemical screening.

#### **4. Conclusions**

Extracts obtained from siriguela and umbu (seeds and peels) and genipap pulp displayed significant antioxidant properties in most of the tests. The large amount of chlorogenic acid found in siriguela seeds may, in part, explain its better performance in the majority of antioxidant assays. With the exception of genipap pulp, a positive correlation was found between acetylcholinesterase inhibitory and antioxidant activities. In view of the significant properties found in this study, including possible beneficial effects on the brain, we recommend that genipap pulp and seed be used in the preparation of foods and that their consumption be encouraged, as well as in the pharmaceutical and cosmetic industries for the development of different products to delay and/or prevent the action of free radicals.

#### **Acknowledgements**

The authors gratefully acknowledge the financial support of the Brazilian research funding agencies CNPq/PNPD, CAPES/PROCAD/NF, FAPESP, INCT-Redoxoma, INCT-Bioanalítica and FAPEAL.

**Table captions**

Page 6, Table 1 – Initial dry weight (g) and extraction yields (%) from samples

Page 13, Table 2 – Phytochemical screening of extracts of parts of the fruits

Pages 18-19, Table 3 – Effects of ethanol extracts of fruits on sheep corneal epithelial cell viability

Pages 20-21, Table 4 – TPC, DPPH, ABTS, FRAP and CUPRAC of ethanol extracts of fruits

**Figure captions**

Page 17, Figure 1 – Protection against lipid peroxidation provided by the extracts (0.5 mg mL<sup>-1</sup>) of different parts of the fruits of (a) genipap, (b) siriguela and (c) umbu



## References

- Almeida, M. M. B., Souza, P. H. M., Arriaga, A. M. C., Prado, G. M., Magalhães, C. E. C., Maia, G. A., & Lemos, T. L. G. (2011). Bioactive compounds and antioxidant activity of fresh exotic fruits from northeastern Brazil. *Food Research International*, *44*, 2155–2159.
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., & Karademir, S. E. (2004). Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC Method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *52*, 7970-7981.
- Arnao, M. B., Cano, A., & Acosta, M. (2001). The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Food Chemistry*, *73*, 239–244.
- Augusto, F., Valente, A. L. P., Tada, E. S., & Rivellino, S. R. (2000). Screening of Brazilian fruit aromas using solid-phase microextraction–gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, *873*, 117–127.
- Barnham, K. J., Masters, C. L., & Bush, A. I. (2004). Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Nature Reviews Drug Discovery*, *3* (3), 205-214.
- Cicco, N., Lanorte, M. T., Paraggio, M., Viggiano, M., & Lattanzio, V. (2009) A reproducible, rapid and inexpensive Folin–Ciocalteu micro-method in determining phenolics of plant methanol extracts. *Microchemical Journal*, *91*, 107–110.

Clerici, M.T.P.S., & Carvalho-Silva, L.B. (2011). Nutritional bioactive compounds and technological aspects of minor fruits grown in Brazil. *Food Research International*, *44*, 1658–1670.

Contreras-Calderon, J., Calderon-Jaimes, L., Gerra-Hernandez, E. & Garcia-Villanova, B. (2010). Antioxidant capacity, phenolic content and vitamin C in pulp, peel and seed from 24 exotic fruits from Colombia. *Food Research International*, *44*, 2047–2053.

Costa, P. A., Ballus, C. A., Teixeira-Filho, J., & Godoy, H. T. (2010). Phytosterols and tocopherols content of pulps and nuts of Brazilian fruits. *Food Research International*, *43*, 1603–1606.

Drummen, G. P. C., Gadella, B., Post, J., & Brouwers, J. (2002). C11-bodipy581/591, an oxidation-sensitive fluorescent lipid peroxidation probe: (micro) spectroscopic characterization and validation of methodology. *Free Radical Biology and Medicine*, *33*, 473–490.

Finley, J. W., Kong, A., Hintze, K. J., Jeffery, E. H., Ji, L. L., & Lei, X. G. (2011). Antioxidants in Foods: State of the Science Important to the Food Industry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *59*, 6837–6846.

Gacche, R.N., & Dhole, N.A. (2011). Profile of aldose reductase inhibition, anti-cataract and free radical scavenging activity of selected medicinal plants: An

attempt to standardize the botanicals for amelioration of diabetes complications.

*Food and Chemical Toxicology*, 49, 1806–1813.

Huang, D., Ou, B., & Prior, R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1841–1856.

Ingkaninan, K., Temkitthawon, P., Chuenchom, K., Yuyaem, T., & Thongnoi, W. (2003) Screening for acetylcholinesterase inhibitory activity in plants used in Thai traditional rejuvenating and neurotonic remedies. *Journal of Ethnopharmacology*, 89, 261–264.

Ji, H. F., & Zhang, H. Y. (2008). Multipotent natural agents to combat Alzheimer's disease. Functional spectrum and structural features. *Acta Pharmacologica Sinica*, 29, 143–151.

Karadag, A., Ozcelik, B., & Sanner, S. (2009). Review of methods to determine antioxidant capacities. *Food Analytical Methods*, 2, 41–60.

Kono, Y., Kobayashi, K., Tagawa, S., Adachi, K., Ueda, A., Sawa, Y., Shibata, H. (1997). Antioxidant activity of polyphenolics in diets: Rate constants of reactions of chlorogenic acid and caffeic acid with reactive species of oxygen and nitrogen. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1335 (3), 335-342.

MacDonald, R. C., MacDonald, R. I., Menco, B. P. Takeshita, K., Subbarao, N. K., & Hu, L. R. (1991). Small-volume extrusion apparatus for preparation of large, unilamellar vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1061, 297-303.

Martins, C. M., Vasconcellos, M. A. S., Rossetto, C. A. V., & Carvalho, M. G. (2010) Phytochemical screening of the arils of yellow passion fruits seeds and influence on the seed germination. *Ciência Rural*, 40 (9), 1934-1940.

Matthew Joyner, P & Cichewicz, R. H. (2011) Bringing natural products into the fold – exploring the therapeutic lead potential of secondary metabolites for the treatment of protein-misfolding related neurodegenerative diseases. *Nat. Prod. Rep.*, 28, 26-47.

Moyo, M., Ndhlala, A. R., Finnie, J. F., & Staden, J. V. (2010) Phenolic composition, antioxidant and acetylcholinesterase inhibitory activities of *Sclerocarya birrea* and *Harpephyllum caffrum* (Anacardiaceae) extracts. *Food Chemistry*, 123 (1), 69-76.

Narain, N., Bora, P. S., Holschuh, H. J., & Vasconcelos, M. A. S. (1992). Variation in physical and chemical composition during maturation of umbu (*Spondia tuberosa*) fruits. *Food Chemistry*, 44, 255–259.

Nzaramba, M. N., Reddivari, L., Bamberg, J. B., & Miller, J. C. (2009). Antiproliferative activity and cytotoxicity of *Solanum jamesii* tuber extracts on

human colon and prostate cancer cells in vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57 (18), 8308–8315.

Niki, E. (2010). Assessment of antioxidant capacity in vitro and in vivo. *Free Radical Biology & Medicine*, 49, 503–515.

Oke, F., & Aslim, B. (2010) Biological potentials and cytotoxicity of various extracts from endemic *Origanum minutiflorum* O. Schwarz & P.H. Davis. *Food and Chemical Toxicology*, 48, 1728–1733.

Oliveira, A.C., Valentim, I.B., Goulart, M.O.F., Silva, C.A., Bechara, E.J.H., Trevisan, M.T.S. (2009). Fontes vegetais naturais de antioxidantes. *Quimica Nova*, 32 (3), 689-702.

Oliveira, A. C., Valentim, I. B., Silva, C. A., Bechara, E. J. H., Barros, M. P., Mano, C. M., et al. (2009). Total phenolic content and free radical scavenging activities of methanolic extract powders of tropical fruits residues. *Food Chemistry*, 115 (2), 469-475.

Ono, M., Ishimatsu, N., Masuoka, C., Yoshimitsu, H., Tsuchihashi, R., Okama, M., et al. (2007). Three new monoterpenoids from the fruit of *Genipa americana*. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, 55 (4), 632-634.

Orhan, I., & Aslan, M. (2009). Appraisal of scopolamine-induced anti-amnesic effect in mice and *in vitro* anti-acetylcholinesterase and antioxidant activities of

some traditionally used Lamiaceae plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 122, 327–332.

Pande, G., & Akoh, C. C. (2010). Organic acids, antioxidant capacity, phenolic content and lipid characterisation of Georgia-grown underutilized fruit crops. *Food Chemistry*, 120, 1067–1075.

SAEG - Sistema para Análises Estatísticas, Versão 9.1: *Fundação Arthur Bernardes - UFV - Viçosa*, 2007.

Sato, Y., Itagaki, S., Kurokawa, T., Ogura, J., Kobayashi, M., Hirano, T., Sugawara, M., Iseki, K. (2011). In vitro and in vivo antioxidant properties of chlorogenic acid and caffeic acid. *International Journal of Pharmaceutics*, 403, 136–138.

Satpathy, G., Tyagi, Y. K., Gupta, R. K. (2011). Preliminary evaluation of nutraceutical and therapeutic potential of raw *Spondia pinnata* K., an exotic fruit of India. *Food Research International*, 44, 2076–2087.

Silva, B. M., Santos, R. P., Mendes, L. S., Pinho, P. G., Valentão, P., Andrade, P. B., Pereira, J. A., Carvalho, M. (2011). *Dracaena draco* L. fruit: Phytochemical and antioxidant activity assessment. *Food Research International*, 44, 2182–2189.

Souza, O. V. S., Oliveira, M. S., Rabello, S. V., Cunha, R. O., Costa, B. L. S., & Leite, M. N. (2003). Estudo farmacognóstico de galhos de *Vanillosmopsis erythropappa* Schult. Bip. - Asteraceae. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 13 (suppl.1), 50-53.

Sun, Y., & Hong, S. (2011). Effects of citric acid as an important component of the responses to saline and alkaline stress in the halophyte *Leymus chinensis* (Trin.). *Plant Growth Regul*, 64, 129–139.

Rhee, I. K., Meent, M. V., Ingkaninan, K., & Verpoorte, R. (2001). Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining. *Journal of Chromatography A*, 915, 217–223.

Rosenberry, T. L., Sonoda, L. K., Dekat, S. E., Cusack, B., & Johnson, J., (2008). Monitoring the reaction of carbachol with acetylcholinesterase by thioflavin T fluorescence and acetylthiocholine hydrolysis. *Chemico-Biological Interactions*, 175, 235–241.

Ross, J. A., & Kasum, C. M. (2002). Dietary flavonoids: Bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annual Reviews of Nutrition*, 22, 19–34.

Rufino, M. S. M., Alves, R. E., Brito, E. S., Morais, S. M., Sampaio, C. G., Pérez-Jiménez, J., et al. (2006). Determinação da atividade antioxidante total em frutas pelo método de redução do ferro (FRAP). *Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical*, 4p, Fortaleza. (Comunicado Técnico on-line:125).

Rufino, M. S. M., Alves, R. E., Brito, E. S., Pérez-Jiménez, J., Saura-Calixto, F., & Mancini-Filho, J. (2010) Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. *Food Chemistry*, 121(4), 996–1002.

Rufino, M. S. M., Fernandes, F. A. N., Alves, R. E., & Brito, E. S. (2009). Free radical-scavenging behaviour of some north-east Brazilian fruits in a DPPH<sup>•</sup> system. *Food Chemistry*, 114, 693–695.

Sánchez-Moreno, C., Larrauri, J., & Saura-Calixto, F. (1999). Free radical scavenging capacity and inhibition of lipid oxidation of wines, grape juices and related polyphenolic constituents. *Food Research International*, 32, 407-412.

Santos, C. A. (1999). In situ evaluation of fruit yield and estimation of repeatability coefficient for major fruit traits of umbu tree [*Spondia tuberosa* (Anacardiaceae)] in the semi-arid region of Brazil. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 46, 455–460.

Scherer, R., & Godoy, H. T. (2009). Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. *Food Chemistry*, 112, 654–658.

Teixeira, D. M. A., Braga, R. C., Horta, A. C. G., Moreira, R. A., Brito, A. C. F., Maciel, J. S., et al. (2007). *Spondia purpurea* Exudate polysaccharide as affinity matrix for the isolation of a galactose-binding-lectin. *Carbohydrate Polymers*, 70, 369–377.



Tiburski, J. H., Rosenthal, A., Deliza, R., Godoy, R. L. O., & Pacheco, S. (2011). Nutritional properties of yellow mombin (*Spondia mombin* L.) pulp. *Food Research International*, *44*, 2326–2331.

Uriarte-Pueyo, I., & Calvo, M. I. (2011). Flavonoids as Acetylcholinesterase Inhibitors. *Current Medicinal Chemistry*, *18*, 5289 - 5302.

Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *39* (1), 44-84.

Zaini, N. A. M., Anwar, F., Hamid, A. A., & Saari, N. (2011). Kundur [*Benincasa hispida* (Thunb.) Cogn.]: A potential source for valuable nutrients and functional foods. *Food Research International*, *44*, 2368–2376.

Weisenthal, L. M., Marsden, J. A., Dill, P. L., & Macaluso, C. K. (1983). A novel dye exclusion method for testing in vitro chemosensitivity of human tumors. *Cancer Research*, *43*, 749-756.

Williams, P., Sorribas, A., & Howes, M. J. R. (2011). Natural products as a source of Alzheimer's drug leads. *Natural Product Reports*, *28*, 48-77.

Youdim, K. A., & Joseph, J. A. (2001). A possible emerging role of phytochemicals in improving age-related neurological dysfunctions: A multiplicity of effects. *Free Radical Biology & Medicine*, 30 (6), 583–594.

## APÊNDICE 7

### Artigo de Revisão para Submissão à Revista Nutrition

#### Efeitos dos Antioxidantes Dietéticos sobre as Doenças Neurodegenerativas

Cristhiane Maria Bazílio de Omena **M.Sc.**<sup>a,b</sup> e Antônio Euzébio Goulart  
Sant'Ana **Ph.D.**<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Universidade Federal de Alagoas (UFAL), Instituto de Química e Biotecnologia, Av. Lourival Melo Mota, s/n, Tabuleiro do Martins, 57072-970, Maceió- AL, Brasil.

<sup>b</sup>Universidade de Pernambuco (UPE), Nutrição, BR 203 Km<sup>2</sup> S/N, Campus Universitário, Vila Eduardo, 56.300-000, Petrolina-PE, Brasil.

\* Autor Correspondente:

Antônio Euzébio Goulart Sant'Ana **Ph.D.**

Instituto de Química e Biotecnologia – Laboratório de Recursos e Produtos Naturais, Universidade Federal de Alagoas, Campus A.C. Simões, Tabuleiro do Martins, 57072-970, Maceió, AL, Brasil.

Tel./Fax: + 55-82-32141388 / + 55-82-32141389

E-mail: [aegs@qui.ufal.br](mailto:aegs@qui.ufal.br)

## RESUMO

O objetivo desta revisão é relatar sobre as doenças neurodegenerativas e os efeitos que o consumo de antioxidantes de fonte alimentar pode exercer sobre a evolução e/ou o tratamento dessas patologias. Doenças neurodegenerativas estão se tornando frequentes, principalmente na população idosa, e dessa forma representam um problema de saúde pública, devido ao aumento da expectativa de vida. Atualmente são consideradas patologias incuráveis sendo o foco do tratamento retardar o aparecimento dos sintomas. Existe uma variedade de patologias denominadas de neurodegenerativas, como doenças de Parkinson, Alzheimer, Huntington, esclerose lateral amiotrófica, entre outras. A maioria apresenta como consequência disfunções cognitivas, motoras e/ou comportamentais, tendo sua gravidade aumentada no decorrer da doença. Devido à alta taxa metabólica encontrada no cérebro, acredita-se que o estresse oxidativo pode contribuir para a morte de neurônios e consequentes perdas funcionais. Pesquisas relatam a importância da alimentação sobre a melhora de várias patologias dentre elas, as neurodegenerativas. Propriedades benéficas ao organismo têm sido atribuídas a vários alimentos, principalmente pela presença de compostos bioativos, denominados antioxidantes, que combatem o estresse oxidativo. São exemplos desses alimentos as frutas, legumes, grãos, chá e vinho. Dentre os antioxidantes conhecidos tem-se as vitaminas C, E e ácido fólico, flavonóides, etc. Existe um grande interesse em identificar novos compostos ou atribuir novas propriedades aos já conhecidos. Porém, são necessários mais estudos visando definir a concentração e o tempo de ação desses compostos em diferentes contextos, inclusive frente ao tratamento das doenças neurodegenerativas.

**Palavras – chave:** dieta, doença, cérebro, idoso, envelhecimento.

## INTRODUÇÃO

Doenças neurodegenerativas como as doenças de Parkinson, Alzheimer, Huntington e a esclerose lateral aminotrófica são atualmente patologias incuráveis, com enormes impactos sociais e econômicos relacionadas intimamente com o aumento da expectativa de vida. Embora os aspectos clínicos e neuropatológicos dessas doenças debilitantes serem distintos, eles compartilham um padrão de neurodegeneração relacionados em regiões anatomicamente ou funcionalmente do cérebro. Para cada doença, os tratamentos atualmente disponíveis apenas abordam os sintomas e fazer não alterar o curso ou a progressão da doença subjacente<sup>1</sup>.

As intensas investigações sobre os mecanismos pelos quais os neurônios morrem, e as recentes descobertas sobre o envolvimento do estresse oxidativo em doenças neurodegenerativas, levaram à idéia de que o uso terapêutico de antioxidantes poderia ajudar a combater o envelhecimento e doenças neurodegenerativas<sup>2</sup>.

As fontes de espécies reativas de oxigênio em células nervosas são inúmeras, portanto, células possuem um sistema antioxidante eficiente para se proteger contra a sobrecarga dessas espécies reativas e posteriores danos. Antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos mantem o perfeito equilíbrio entre a produção fisiológica de espécies reativas de oxigênio e sua desintoxicação<sup>3</sup>.

Existem evidências crescentes de que as doenças de Alzheimer, Parkinson e a esclerose amiotrófica lateral sejam manifestações adversas de estados de estresse oxidativo. Pequenos estudos de intervenção têm mostrado

melhoria sintomática em pacientes já acometidos por essas doenças, quando tratados com vitaminas C ou E<sup>4</sup>.

Esta revisão tem a finalidade de agrupar os dados da literatura referente ao papel benéfico dos antioxidantes dietéticos na prevenção e/ou tratamento de doenças neurodegenerativas.

## **DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS**

As doenças neurodegenerativas são desordens progressivas implacavelmente do sistema nervoso central, caracterizadas por disfunções cognitivas, motoras e/ou comportamentais<sup>5,6</sup>.

Tais patologias são mais frequentemente diagnosticadas na população idosa, dentre elas a doença de Alzheimer, doença de Parkinson, demência com corpos de Lewy, esclerose lateral amiotrófica, atrofia sistêmica múltipla, doença de Huntington e demência fronto-temporal até o presente momento essas patologias são incuráveis. Por causa da epidemia verificada na população idosa, estas doenças representam um sério desafio para o sistema de saúde<sup>8</sup>.

A doença de Alzheimer é uma doença neurológica degenerativa progressiva, resultando em prejuízo na memória e comportamento<sup>9</sup>. É caracterizada pela atrofia cerebral, inicialmente localizadas na área temporoparietal, com placas amilóides e emaranhados neurofibrilares como típicas alterações microscópicas<sup>7</sup>.

O principal fator patogênico associado à doença de Alzheimer parece ser o aparecimento de oligômeros de peptídeo beta-amilóide ( $\alpha\beta$ ), que tendem a acumular-se como depósitos de amilóide extracelular e estão associados à micróglia e astrócitos reativos em processos de degeneração neurais. As placas amilóides são compostas por diferentes formas de beta-amilóide ( $\alpha\beta$ ) derivados de uma proteína precursora de amilóide, que são produzidas pela clivagem dessa proteína por duas enzimas proteolíticas  $\beta$  e  $\gamma$  secretases<sup>10</sup>.

O envolvimento da micróglia e astrócitos no aparecimento e evolução desse processo neurodegenerativo está se tornando cada vez mais reconhecido, embora seja comumente aceito que neuroinflamação e estresse oxidativo podem ter influências prejudiciais e benéficas sobre o tecido neural<sup>11</sup>.

Embora existam muitas hipóteses para o desenvolvimento dessa patologia, uma bem caracterizada é hipometabolismo cerebral. Neurônios saudáveis possuem uma taxa metabólica extremamente alta e produzem uma quantidade significativa de ATP, a fim de gerar potenciais de ação e manter plasticidade sináptica. Considerando-se que as mitocôndrias são responsáveis pela geração de 90% do ATP total celular, essas organelas são críticas para o funcionamento das células com as demandas de alta energia, tais como neurônios. O prejuízo da função mitocondrial, portanto, poderá ter consequências graves na viabilidade neuronal e a saúde do cérebro<sup>12</sup>.

Atualmente, não existe cura para doença de Alzheimer e suas causas ainda permanecem desconhecidas apesar de várias hipóteses<sup>13</sup>. O mecanismo bioquímico exato da patogênese da doença de Alzheimer também ainda é desconhecido, mas muita atenção tem sido dada ao papel da perda massiva do

neurotransmissor acetilcolina e para a possível implicação de estresse oxidativo em seu desenvolvimento<sup>14</sup>.

Doença de Parkinson (DP) é uma desordem neurodegenerativa progressiva e terminal marcada pela perda primária de dopamina (DA) nos gânglios da base cerebelar e fisicamente caracterizadas pela perda debilitante dos movimentos espontâneos e voluntários, tremores de repouso, bem como outras alterações comportamentais<sup>15</sup>. Os mecanismos de morte celular na DP ainda não foram completamente elucidados, mas o aumento do estresse oxidativo, função mitocondrial anormal e excitotoxicidade são considerados como os mais prováveis iniciadores ou mediadores da lesão neuronal<sup>16</sup>.

Demência com corpos de Lewy (DCL) é a segunda doença neurodegenerativa mais frequente depois da doença de Alzheimer e caracteriza-se clinicamente por demência progressiva, que é frequentemente acompanhada pelo parkinsonismo e sintomas psiquiátricos incluindo as alucinações visuais. É patologicamente caracterizada pela ocorrência de corpos de Lewy (CL) no cérebro<sup>17</sup>.

A esclerose lateral amiotrófica é a patologia mais frequente na idade adulta sendo uma doença neuromotora. As características patológicas da doença são atrofia seletivas e progressivas dos neurônios no trato corticoespinal, inchaço de pericário e axônios proximais, presença de corpos Bunina, esferóides axonais e inclusões. Essas características patológicas resultam na degeneração de neurônios motores superiores no córtex cerebral e neurônios motores inferiores do tronco cerebral e da medula espinal<sup>18</sup>.



A atrofia sistêmica múltipla (ASM) é uma doença esporádica que engloba uma degeneração estriatonigral (quando há predomínio dos sintomas parkinsonianos), atrofia olivopontocerebelar (quando o predomínio de sintomas cerebelares) e síndrome de Shy-Drager (quando há predomínio de sintomas autonômicos)<sup>19,20</sup>.

Doença de Huntington é uma doença fatal com um modo de herança autossômica dominante, se um pai é afetado, cada progênie tem uma chance de 50% de desenvolver a doença. Isso leva a demência progressiva, sintomas psiquiátricos e uma desordem de movimento incapacitante choreiform, culminando na morte prematura. A identificação, em 1993, do gene que falta na codificação da proteína Huntingtin ofereceu a possibilidade de diagnóstico genético. Em indivíduos normais, a proteína contém 11- 34 glutaminas em uma sequência repetida na porção N-terminal (que começa na posição 18 do aminoácido). A expansão para mais de 37 glutaminas leva a doença de Huntington, quanto maior número de glutaminas mais precoce será o desenvolvimento da doença<sup>21,22</sup>.

A demência fronto-temporal (DFT) é uma doença neurodegenerativa progressiva. A idade de início é geralmente entre 45 e 65 anos, mas pode ocorrer mais cedo ou mais tarde na vida. Sendo caracterizada pelo comprometimento cognitivo, disfunção de linguagem e/ou mudanças na personalidade<sup>23</sup>.

Os tratamentos atuais para tais patologias, principalmente melhoram os sintomas das doenças e os efeitos do tratamento são moderados<sup>24</sup>. Evidências indicam que a perda de neurônios resultante ocorre a partir de uma interação

complexa entre danos oxidativos, a estimulação excitotóxica, disfunção das proteínas críticas, e fatores genéticos. Devido à sua alta taxa de metabolismo acredita-se que o cérebro pode ser particularmente suscetível a espécies reativas de oxigênio<sup>25, 26, 27,28</sup>.

O tecido cerebral parece ser particularmente vulneráveis aos danos dos radicais livres devido ao seu baixo teor de antioxidantes, alto teor de ácidos graxos polinsaturados das membranas neuronais e as exigências elevadas de oxigênio para seu metabolismo<sup>28</sup>.

A peroxidação dos lipídeos da membrana celular gera aldeídos altamente reativos, como o 4-hidroxinonenal sendo o aumento dos níveis de 4-hidroxinonenal observado nas doenças de Alzheimer, Parkinson, esclerose lateral amiotrófica e outras patologias neurodegenerativa confirmando um papel fisiopatológico do estresse oxidativo<sup>2</sup>.

Idosos com comprometimento cognitivo leve e sujeitos a doença de Alzheimer apresentaram menores níveis de vitaminas A, C, E, ácido úrico, alfa-caroteno e uma menor atividade de plasma e eritrocitários da superóxido dismutase, bem como a glutathione peroxidase<sup>28</sup>.

## **ANTIOXIDANTES: CONCEITO E FUNCIONALIDADE**

Os antioxidantes podem ser definidos como substâncias capazes de retardar ou inibir a oxidação de substratos oxidáveis, podendo estes ser enzimáticos ou não enzimáticos<sup>29</sup>. A ingestão de antioxidantes tem sido

sugerida para a proteção contra danos oxidativos e complicações inflamatórias<sup>30</sup> resultantes da formação de radicais livres.

O radical livre é capaz de existir independentemente e possui um elétron desemparelhado em um orbital. A presença de um elétron desemparelhado aumenta a reatividade da espécie que possui avidéz por outro elétron para tornar-se estável. Este elétron pode ser obtido pela abstração de um elétron de um co-reagente. Essa reação resulta na extinção do radical pela redução (adição de elétrons) e formação de um novo radical por oxidação (perda de elétrons) do co-reagente<sup>31</sup>.

Existem vários sistemas intrínsecos capazes de capturar radicais livres, que envolvem reações enzimáticas e não enzimáticas. Dentre as enzimáticas temos a enzima superóxido dismutase cobre-zinco (SOD Cu-Zn), que converte óxidos radicalares em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ); glutathione peroxidase (GSH-Px) e catalase (CAT) iram converter  $H_2O_2$  a uma molécula de água. Cu-Zn SOD, GSH-Px e CAT oferecem o principal mecanismo de defesa antioxidante. O sistema de defesa antioxidante não enzimático inclui o ácido ascórbico (vitamina C),  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E), glutathione (GSH) e  $\beta$ -caroteno (antioxidante total). Há um equilíbrio entre a atividade e os níveis intracelulares destes antioxidantes que são essenciais para a sobrevivência dos organismos e sua saúde<sup>32</sup>. Na Tabela 1 estão relacionados antioxidantes neuroprotetores e o modo de ação.

**Tabela 1.** Classificação dos antioxidantes neuroprotetores e modo de ação

---

- Antioxidantes Diretos

- Compostos químicos que interferem com os radicais livres formados.

Aril aminas e indóis.

Caroteno, licopeno, retinol e outros polienóis.

Ebselen e outros compostos contendo selênio.

Flavonóides e outros polifenóis

Manganês contendo miméticos de catalase/superóxido dismutase

Tocoferóis e outros monofenóis.

- Antioxidantes Indiretos

- Compostos que impedem a formação de radicais livres.

Inibidores Aminooxidase

Antagonistas do cálcio

Receptores agonistas da dopamina

Antagonistas dos receptores de glutamato

Quelantes de íons

Inibidores da óxido nítrico sintase

- Antioxidantes Metabólicos

- Compostos que limitam a extensão dos danos para a célula através da

redução da carga metabólica secundária dos níveis aumentados de radicais livres.

N-acetil-cisteína, glutathiona, 2-oxo-tiazolidina-4-carboxilato e outros compostos derivados de tióis.

N-butil- $\alpha$ -fenilnitrona e outras armadilhas de spin

Carnitina

Creatina

Ácido lipóico

Ubiquinona e idebenona

---

Fonte: Behl & Moosmann<sup>33</sup>.

O estresse oxidativo é o acúmulo de espécies de radicais livres altamente reativas ou a diminuição da defesa mecanismos de proteção contra danos biológicos por radicais livres. O estresse oxidativo ocorre como um desequilíbrio entre o balanço pró-oxidante/antioxidante, em favor da situação pró-oxidante, promovendo um dano potencial. O dano oxidativo que as biomoléculas sofrem está relacionado com as patologias de um grande número de doenças crônicas, incluindo doenças cardiovasculares, câncer e doenças neurodegenerativas<sup>34,35</sup>.

Espécies reativas de oxigênio (EROs) são entidades químicas que incluem radicais livres de oxigênio, como o radical ânion superóxido ( $O_2^-$ ), radicais hidroxilas (OH $\cdot$ ), óxido nítrico (NO), peroxinitrito e também espécies não radicalar, como  $H_2O_2$  e oxigênio singleto ( $^1O_2$ ). EROs em seres humanos

pode ter sua origem em fontes endógenas ou externas, como por exemplo através do tabaco, certos poluentes, solventes orgânicos e/ou pesticidas que levam ao estresse oxidativo<sup>36</sup>.

O estresse oxidativo pode causar danos celulares e oxidar componentes celulares críticos, tais como lipídeos de membrana, proteínas e DNA, induzindo apoptose ou necrose<sup>37</sup>. O dano oxidativo a mitocôndrias, incluindo danos à membrana mitocondrial, tem sido implicado em doenças neurodegenerativas<sup>38</sup>, como a doença de Parkinson. Este dano oxidativo mediado pela membrana pode contribuir para a deleção e mutações no DNA mitocondrial que se acumulam com a idade. Danos no DNA têm sido relatados na doença de Alzheimer<sup>39</sup>.

Estudos recentes indicam que o peptídeo beta-amilóide, presente na doença de Alzheimer, pode ser neurotoxina gerada por mecanismos que envolvem a geração de  $H_2O_2$ , a peroxidação lipídica e a formação de espécies reativas de oxigênio. A toxicidade da  $\beta$ -amilóide é eliminada por mecanismos de defesa antioxidante<sup>32</sup>.

## **EFEITOS DOS ANTIOXIDANTES DE FONTE ALIMENTAR SOBRE AS DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS**

Alguns estudos como o realizado por Kanoski & Davidson<sup>13</sup> relatam a influência da alimentação sobre o desempenho da aprendizagem e o desempenho da memória.

Experimentos relatam que dietas enriquecidas com blueberry (*Vaccinium corymbosum*) ou espinafre (*Spinacia oleracea*) podem evitar diminuições relacionadas à idade na atividade da função do receptor noradrenérgico cerebelar<sup>40</sup>. Os efeitos antioxidantes do ginseng (*Panax sp.*) são relatados por milhares de anos mostrando em animais ações neuroprotetoras, como na doença de Parkinson<sup>41</sup>.

Os mecanismos de defesa antioxidante associados ao consumo adequado de fontes alimentares ricas em antioxidantes são essenciais para atenuar os efeitos do estresse oxidativo. As doenças neurodegenerativas associadas ao aumento da idade revelam frequentemente um baixo conteúdo energético das células nervosas e benefícios de uma dieta rica em antioxidantes e co-factores implicados no metabolismo energético<sup>42</sup>.

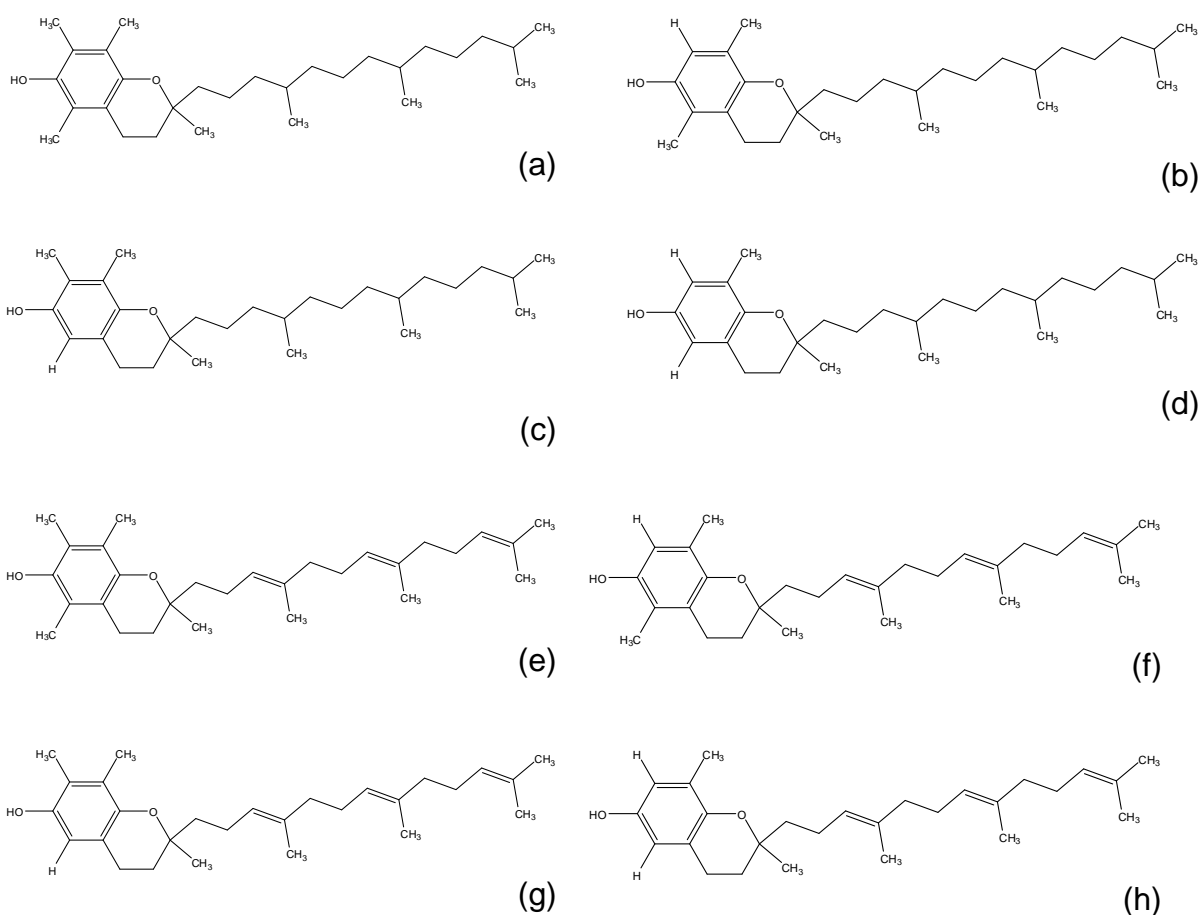
Pesquisadores relatam um aumento na capacidade antioxidante após o consumo alimentar de antioxidantes trazendo evidências de que haveria benefícios para o sistema e processos biológicos<sup>43</sup>. O consumo de antioxidantes naturais, como os compostos fenólicos presentes na maioria das plantas que inibem a formação de radicais livres, também chamados de substâncias reativas, tem sido associado a uma menor incidência de doenças relacionadas com o estresse oxidativo<sup>44</sup>. Os antioxidantes presentes na dieta incluem a vitamina A, C e E, carotenóides, flavonóides e polifenóis.

### *Vitaminas*

Dentre as fontes de antioxidantes mais conhecidas estão a vitamina C, solúvel em água, e responsável pela regeneração da vitamina E. As principais

fontes de vitamina C são frutas cítricas e tomates. A vitamina natural E, uma mistura de tocoferóis e tocotrienóis ( $\alpha$ ,  $\beta$ -,  $\gamma$ - e  $\delta$ -tocoferol e  $\alpha$ ,  $\beta$ -,  $\gamma$ - e  $\delta$ -tocotrienol) Figura 1, sintetizada apenas por plantas. As fontes naturais são os óleos vegetais.

O azeite contém vitamina E e muitos dos seus efeitos benéficos são atribuídos a esse componente.  $\beta$ -caroteno, também uma vitamina lipossolúvel, que é transportado com a vitamina E nos núcleos graxos das partículas de lípidios. É principalmente encontrada em altas concentrações na cenoura e em vegetais folhosos verdes escuros<sup>45,46</sup>.



**Figura 1.** (a)  $\alpha$ , (b)  $\beta$ -, (c)  $\gamma$ - e (d)  $\delta$ -tocoferol; (e)  $\alpha$ , (f)  $\beta$ -, (g)  $\gamma$ - e (h)  $\delta$ -tocotrienol.



Os tratamentos com vitaminas antioxidantes (vitamina E e análogos, e vitamina C) têm sido bem caracterizados pela literatura. Muitas vitaminas diretamente sequestram espécies reativas de oxigênio e em paralelo podem regular a capacidade antioxidante do sistema de defesa do corpo humano <sup>39,47</sup>.

A depleção de vitamina E pode resultar em dano oxidativo e sua suplementação através da dieta pode enriquecer as membranas do cérebro e proporcionar um maior nível de proteção contra a peroxidação lipídica<sup>39</sup>. O uso da suplementação de vitamina E para prevenir ou retardar a progressão da doença de Parkinson demonstrou em ambos os modelos de estudos (animais e clínicos) que sua deficiência contribui para a neurodegeneração estriato-nigral e para o início ou o progresso da doença<sup>48</sup>.

O  $\alpha$ -tocoferol é bem estabelecido como o maior antioxidante lipossolúvel sendo importante para proteger a integridade das estruturas lipídicas, especialmente a membrana celular<sup>49</sup>. A avaliação clínica do uso do antioxidante ( $\alpha$ -tocoferol) verificou efeitos positivos em 341 pacientes com doença de Alzheimer (no estágio de demência moderada), com aumento no tempo médio de sobrevivência de 230 dias quando comparado com o grupo controle e um atraso significativo na deterioração funcional<sup>50</sup>.

De Rijk e colaboradores<sup>51</sup> investigando a ingestão de antioxidantes e a possível relação com diminuição do risco de desenvolver a doença de Parkinson em 5.342 indivíduos, estudo transversal, sugeriu que a ingestão elevada de vitamina E na dieta pode proteger contra a ocorrência dessa doença.

Miyake et al.<sup>52</sup> avaliando a relação entre a ingestão de vitaminas antioxidantes selecionadas, legumes e frutas e o risco de doença de Parkinson no Japão em um estudo multicêntrico com 249 pacientes e 368 pacientes (controle) verificou que a maior ingestão de vitamina E e  $\beta$ -caroteno podem ser associados com uma diminuição do risco de desenvolvê-la .

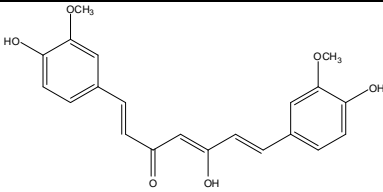
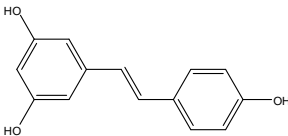
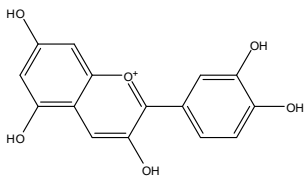
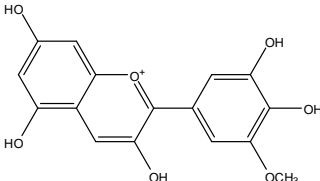
Poucos estudos relatam nenhuma relação como o realizado por Nicoletti et al.<sup>53</sup> para elucidar o possível papel da vitamina E na patogênese da doença de Parkinson analisando os níveis plasmáticos de vitamina E em 54 pacientes não detectaram diferença entre os grupos (pacientes e controle) sugerindo que os níveis plasmáticos não desempenham um papel importante.

#### *Compostos Fenólicos*

Os antioxidantes polifenólicos de fontes dietéticas são frequentemente um tema de interesse científico devido a propriedades atribuídas aos mesmos na diminuição da incidência de certos cânceres, doenças cardiovasculares, no tratamento de doenças neurodegenerativas, danos ao DNA e até mesmo pelas propriedades antienvhecimento<sup>54</sup>.

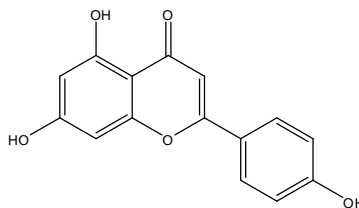
Compostos fenólicos ou polifenóis ocorrem amplamente em plantas. O interesse em polifenóis como antioxidantes é centrado em um grupo denominado flavonóides que ocorrem em todos os alimentos de origem vegetal e possui variações estruturais (flavonóis, flavonas, isoflavonas, flavononas, flavonóides e antocianinas)<sup>45</sup>. Os flavonóides são encontrados em frutas, legumes, grãos, flores, chá e vinho<sup>55</sup>. Na Tabela 2 estão alguns exemplos de compostos presentes em alimentos.

**Tabela 2.** Polifenóis mais estudados e sua fonte alimentar

Polifenóis			
Classe	Compostos	Estruturas	Fontes naturais
Não flavonóides	Curcumina	 <p>(1<i>E</i>,6<i>E</i>)-1,7- bis (4-hidroxi-3 metoxifenil) -1,6- heptadieno-3,5-diona</p>	Curcuma
	Resveratrol	 <p>(<i>E</i>)-5-(4-hidroxiestiril) benceno- 1,3-diol</p>	Uva, vinho tinto.
	Antocianinas	Cianidina	 <p>2-(3,4-Dihidroxifenil) cromenilium- 3,5,7-triol</p>
	Petunidina	 <p>2-(3,4-dihidroxi-5-metoxifenil)- 3,5,7-trihidroxicromenilium</p>	Morangos, vinho tinto e chá.

Flavonas

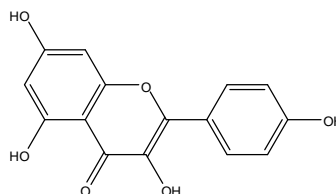
Apigenina



5,7-Dihidroxi-2-(4-hidroxifenil)-  
4*H*-1-benzopiran-4-ona

Casca da  
maçã

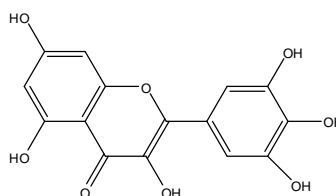
Kaempferol



3,5,7-Trihidroxi-2-(4-  
hidroxifenil)- 4*H*-cromen-4-ona

Brócolis

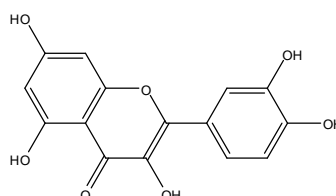
Miricetina



3,5,7-Trihidroxi-2-(3,4,5-  
hidroxifenil)-4*H*-cromen-4-ona

Casca de  
frutas

Quercetina

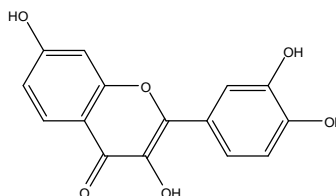


2-(3,4-dihidroxifenil)- 3,5,7-  
trihidroxi-4*H*-cromen-4-ona

Alface,  
azeitona e  
cebola.

Flavanonas

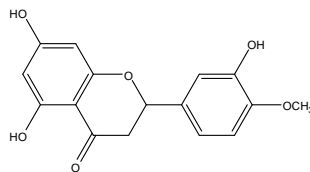
Fisetina



3,3',4',7-Tetrahidroxiflavona

Frutas Cítricas

Hesperitina

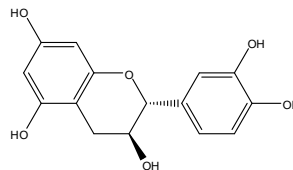


Cascas  
Cítricas

5,7 – dihidroxi – 2- (3-hidroxi-4-  
metoxifenil)-2,3-dihidrocromen-  
4-ona

Catequinas

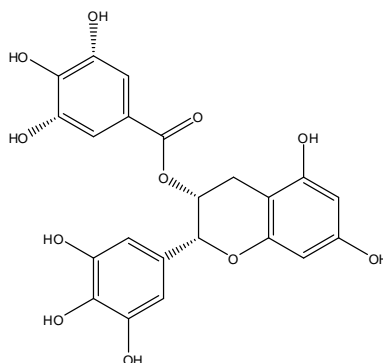
(+ ) Catequina



Vinho tinto

(2R,3S)-2-(3,4-dihidroxifenol)-  
3,4-dihidro-2H-cromena-3,5,7-  
triol

(-)-Epigalocatequina-3-  
galato (EGCG)



Chá

[(2R,3R)-5,7-dihidroxi-2-(3,4,5-  
trihidroxifenil)croman-3-il] 3,4,5-  
trihidroxibenzoato

Fonte: Adaptado de Rossi et al.<sup>56</sup>.

Flavonóides dietéticos e seus metabólitos podem apresentar efeitos neuroprotetores com relação às doenças neurodegenerativas e demência. Um estudo realizado por Beking & Vieira<sup>57</sup> avaliando o consumo e a associação com o aparecimento da demência sugere que o consumo de flavonóides na dieta, especialmente flavonóis, está associado a menores taxas de demência nos países europeus estudados.

A grande atenção dirigida aos polifenóis presente nos alimentos para a proteção contra o envelhecimento do cérebro é devido à capacidade desses compostos atravessarem a barreira hematoencefálica, que controla rigidamente o fluxo no cérebro de metabólitos e nutrientes, bem como de drogas<sup>58</sup>.

Dentre as fontes temos a curcumina, um princípio ativo da cúrcuma, que é um curcuminóide fenólico natural pertencente à família Zingiberace ou do gengibre e distribuídos por todo mundo tropical e regiões subtropicais sendo amplamente distribuído em países do Sudeste Asiático. É usado como conservante de alimentos, fitoterápico e possui uma série de propriedades farmacoterapêuticas<sup>59,60,61</sup>.

A cúrcuma é usada em comida indiana, como uma especiaria, principalmente como ingrediente em variedades de pó de carry. Curcumina é extraída do rizoma seco da *Curcuma longa* Linn. Uma série de estudos experimentais têm demonstrado suas propriedades antioxidantes e potencial neuroprotetor em vários modelos experimentais de neurodegeneração<sup>62,63</sup>.

O resveratrol, um polifenol presente no vinho tinto, amendoim, feijão, soja e romãs, possui uma vasta gama de efeitos biológicos<sup>64</sup>. Recentemente as atenções estão voltadas ao resveratrol devido à sua ação neuroprotetora<sup>65</sup> *in vitro* e *vivo* em modelos da doença de Alzheimer, mas também apresentou benefícios em acidente vascular cerebral isquêmico, doença de Parkinson, doença de Huntington e epilepsia<sup>66</sup>.

Pesquisa realizada por Karuppagounder et al.<sup>64</sup> com resveratrol concluem que o início da doença de Alzheimer pode ser atrasada ou atenuada com o uso de dietas com agentes quimiopreventivos que protejam contra a

formação de placas  $\alpha\beta$  e estresse oxidativo. Marambaud, Zhao and Davies<sup>67</sup> também fazem referência ao uso do resveratrol no tratamento da doença de Alzheimer com resultados positivos.

Frutas ricas em antocianina têm sido descritas com eficácia na melhoria da memória em modelos animais<sup>58</sup>. Estudo realizado por Shih et al.<sup>68</sup> mostraram a capacidade da amora em proteger contra o envelhecimento e déficits cognitivos induzidos por dano oxidativo.

#### *Outras Substâncias*

Avaliando outras substâncias Prasanthi et al.<sup>69</sup> demonstram que a cafeína possui propriedades antioxidantes e apresenta uma redução dos níveis cerebrais de peptídeo  $\beta$ -amiloíde em modelos animais para o início precoce da doença de Alzheimer familiar.

## **CONCLUSÃO**

É evidente o efeito benéfico dos antioxidantes na saúde da população, principalmente na idosa. Com relação às doenças neurodegenerativas há a necessidade de estudos voltados à determinação da quantidade necessária de ingestão dos antioxidantes já conhecidos e outras fontes que terão ação no tratamento ou prevenção de tais patologias.

## REFERÊNCIAS

Campos HC, Rocha MD, Viegas FPD, Nicastro PC, Fossaluzza PC, Fraga CAM et al. The role of natural products in the discovery of new drug candidates for the treatment of neurodegenerative disorders i: Parkinson's disease. *CNS and Neurological Disorders – Drug Targets* 2011; 10 (2): 239-250.

Migliore L, Fontana I, Colognato R, Coppede F, Siciliano G, Murri L. Searching for the role and the most suitable biomarkers of oxidative stress in Alzheimer's disease and in other neurodegenerative diseases. *Neurobiology of Aging* 2005; 26(5): 587-595.

Ono K, Hamaguchi T, Naiki H, Yamada M. Anti-amyloidogenic effects of antioxidants: Implications for the prevention and therapeutics of Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2006; 1762: 575–586.

Amaya-Farfan J, Domene SMA, Padovani RM. DRI: síntese comentada das novas propostas sobre recomendações nutricionais para antioxidantes. *Rev. Nutr.* 2001; 14 (1):71-78.

Woulfe J. Nuclear bodies in neurodegenerative disease. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2008; 2195–2206.

Seeley WW, Crawford RK, Zhou J, Miller BL, Greicius MD. Neurodegenerative Diseases Target Large-Scale Human Brain Networks. *Neuron* 2009; 62 (1): 42-52.

Fratiglioni L, Qiu C. Prevention of common neurodegenerative disorders in the elderly. *Experimental Gerontology* 2009; 44: 46–50.

Rockenstein E, Crews L, Masliah E. Transgenic animal models of neurodegenerative diseases and their application to treatment development. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2007; 59: 1093–1102.

Ingkaninan K, Temkitthawon P, Chuenchom K, Yuyaem T, Thongnoi W. Screening for acetylcholinesterase inhibitory activity in plants used in Thai traditional rejuvenating and neurotonic remedies. *Journal of Ethnopharmacology* 2003; 89: 261–264.

Amtul Z, Westaway D, Cechetto DF, Rozmahel RF. Oleic acid ameliorates amyloidosis in cellular and mouse models of Alzheimer's Disease. *Brain Pathology* 2011; 21: 321-329.



Agostinho P, Cunha RA, Oliveira C. Neuroinflammation, oxidative stress and the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Current Pharmaceutical Design* 2010; 16 (25): 2766-2778.

Rettberg JR, Hamilton RT, Mao Z, To J, Zhao L, Appt SE, Register TC, Kaplan JR, Brinton RD. The effect of dietary soy isoflavones before and after ovariectomy on hippocampal protein markers of mitochondrial bioenergetics and antioxidant activity in female monkeys. *Brain research* 2011; 1379: 23-33.

Kanoski SE, Davidson T L. Western diet consumption and cognitive impairment: Links to hippocampal dysfunction and obesity. *Physiology & Behavior* 2011; 103: 59-68.

Ricciarelli R, Argellati F, Pronzato MA, Domenicotti C. Vitamin E and neurodegenerative diseases. *Molecular Aspects of Medicine* 2007; 28: 591–606.

Ahmad AS, Ansari MA, Ahmad M, Saleem S, Yousuf S, Hoda MN, Islam F. Neuroprotection by crocetin in a hemi-parkinsonian rat model. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 2005; 81: 805 – 813.

Abou-Sleiman PM, Muqit MM, Wood NW. Expanding insights of mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 2006; 7:207–219.

Marui W, Iseki E, Nakai T, Miura S, Kato M, Uéda K, Kosaka K. Progression and staging of Lewy pathology in brains from patients with dementia with Lewy bodies. *Journal of the Neurological Sciences* 2002; 195: 153– 159.

Patel BP, Hamadeh MJ. Nutritional and exercise-based interventions in the treatment of amyotrophic lateral sclerosis. *Clinical Nutrition* 2009; 28: 604–617.

Wakabayashi K, Ikeuchi T, Ishikawa A, Takahashi H. Multiple system atrophy with severe involvement of the motor cortical areas and cerebral white matter. *Journal of Neurological Sciences* 1998; 156: 114–117.

Knopp DB, Barsottini OGP, Ferraz HB. Avaliação fonoaudiológica na atrofia de múltiplos sistemas: estudo com cinco pacientes. *Arq. Neuro-Psiquiatr.* 2002; 60(3A): 619-623.

Mariani E, Polidori MC, Cherubini A, Mecocci P. Oxidative stress in brain aging, neurodegenerative and vascular diseases: An overview. *Journal of Chromatography B* 2005; 827 (1): 65-75.

Subramaniam S, Snyder SH. Huntington's disease is a disorder of the corpus striatum: Focus on Rhes (Ras homologue enriched in the striatum). *Neuropharmacology* 2011; 60: 1187-1192.

Chiang H, Rosvall L, Brohede J, Axelman K, Björk BF, Nennesmo I, Robins T, Graff C. Progranulin mutation causes frontotemporal dementia in the Swedish Karolinska family. *Alzheimer's & Dementia* 2008; 4: 414–420.

Waldmeier PC, Tatton WG. Interrupting apoptosis in neurodegenerative disease: potential for effective therapy? *DDT* 2004; 9 (5): 210-218.

Gorman AM, McGowan A, O'Neill C, Cotter T. Oxidative stress and apoptosis in neurodegeneration. *Journal of the Neurological Sciences* 1996; 139 (Suppl.): 45-52.

Behl C. Amyloid b-protein toxicity and oxidative stress in Alzheimer's disease. *Cell Tissue Research* 1997; 290:471–480.

Barbosa LF, Medeiros MHG, Augusto O. Danos oxidativos e neurodegeneração: o quê aprendemos com animais transgênicos e nocautes? *Quím. Nova*. 2006; 29 (6):1352-1360.

Rinaldi P, Polidori MC, Metastasio A, Mariani E, Mattioli P, Cherubini A et al. Plasma antioxidants are similarly depleted in mild cognitive impairment and in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging* 2003; 24 (7): 915-919.

Halliwell B. Free radicals and other reactive species in disease. In: *Encyclopedia of Life Sciences*. Nature Publishing Group 2001; 1-7.

Puchau B, Zulet MA, Echávarri AG, Hermsdorff HHM, Martínez JA. Dietary total antioxidant capacity is negatively associated with some metabolic syndrome features in healthy young adults. *Nutrition* 2010; 26 (5): 534-541.

Benzie IFF. Evolution of dietary antioxidants. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology* 2003; 136 (1):113-126.

Kharrazi H, Vaisi-Raygani A, Rahimi Z, Tavilani H, Aminian M, Pourmotabbed T. Association between enzymatic and non-enzymatic antioxidant defense mechanism with apolipoprotein E genotypes in Alzheimer disease. *Clinical Biochemistry* 2008; 41(12): 932-936.

Behl C, Moosmann B. Antioxidant neuroprotection in alzheimer's disease as preventive and therapeutic approach. *Free Radical Biology & Medicine* 2002; 33 (2):182–191.

Mendel S, Youdim MB. Catechin polyphenols: neurodegeneration and neuroprotection in neurodegenerative diseases. *Free Radical Biology and Medicine* 2004; 37: 304-317.

Wang S, Melnyk, JP, Tsao R, Marcone MF. How natural dietary antioxidants in fruits, vegetables and legumes promote vascular health. *Food Research International* 2011; 44 (1): 14-22.

Gulcin I, Oktay M, Kirecçi E, Kufrevioglu OI. Screening of antioxidant and antimicrobial activities of anise (*Pimpinella anisum* L.) seed extracts. *Food Chemistry* 2003; 83: 371–382.

Esposito E, Rotilio D, Matteo VD, Giulio CD, Cacchio M, Algeri S. A review of specific dietary antioxidants and the effects on biochemical mechanisms related to neurodegenerative processes. *Neurobiology of Aging* 2002; 23: 719–735.

Fernandez-Checa JC, Fernandez A, Morales A, Mari M, Garcia-Ruiz C, Colell A. Oxidative Stress and Altered Mitochondrial Function in Neurodegenerative Diseases: Lessons From Mouse Models. *CNS & Neurological Disorders-Drug Targets* 2010; 9 (4): 439-454.

Wiseman H. Dietary influences on membrane function: Importance in protection against oxidative damage and disease. *J. Nub. Biochem.* 1996; 7: 2-15.

Bickford P, Gould T, Briederick L, Chadman K, Pollock A, Young S, Shukitt-Hale B, Joseph J. Antioxidant-rich diets improve cerebellar physiology and motor learning in aged rats. *Brain Res.* 2000; 866: 211– 217.

Van Kampen J, Robertson H, Hagg T, Drobitch R. Neuroprotective actions of the ginseng extract G115 in two rodent models of Parkinson's disease. *Exp. Neurol.* 2003; 184 (1): 521– 529.

Calixto F, Silva L. O consumo de antioxidantes e o balanço energético na dieta de praticantes de hidroginástica em idade sénior. *Motricidade* 2007; 3 (2): 7-8.

Youdim KA, Joseph JA. A possible emerging role of phytochemicals in improving age-related neurological dysfunctions: A multiplicity of effects. *Free Radical Biology & Medicine* 2001; 30 (6): 583–594.

Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews* 2002; 82: 47-95.

Kaliora AC, Dedoussis GVZ, Schmidt H. Dietary antioxidants in preventing atherogenesis. *Atherosclerosis* 2006; 187 (1): 1-17.

Shireen KF, Pace RD, Mahboob M, Khan AT. Effects of dietary vitamin E, C and soybean oil supplementation on antioxidant enzyme activities in liver and muscles of rats. *Food and Chemical Toxicology* 2008; 46 (10): 3290-3294.

Gibson GE, Zhang H, Sheu KR, Park LC. Differential alterations in antioxidant capacity in cells from Alzheimer patients. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1502: 319–329.

Dexter DT, Nanayakkara I, Muller DP, Goss-Sampson MA, Harding AE, Jenner P et al. Nigral dopaminergic loss in vitamin E deficient rats. *Neuroreport* 1994; 33 (5): 1773-1776.

Burton GW, Traber MG. Vitamin E: antioxidant activity, biokinetics, and bioavailability. *Ann. Rev. Nutr.* 1990; 10:357–382.

Sano M, Ernesto C, Thomas RG, Klauber MR, Schafer K, Grundman M et al. A controlled trial of selegiline, alfa-tocopherol, or both as treatment for Alzheimer's disease. The Alzheimer's Disease Cooperative Study. *N. Engl. J. Med.* 1997; 336: 1216–1222.

De Rijk MC, Breteler MM, Den Breeijen JH, Launer LJ, Grobbee DE, Van der Meche FG et al. Dietary antioxidants and Parkinson disease. The Rotterdam Study. *Arch. Neurol.* 1997; 54: 762–765.

Miyake Y, Fukushima W, Tanaka K, Sasaki S, Kiyohara C, Tsuboi Y et al. Dietary intake of antioxidant vitamins and risk of Parkinson's disease: a case-control study in Japan. *European Journal of Neurology* 2011; 18: 106–113.

Nicoletti G, Crescibene L, Scornaienchi M, Bastone L, Bagalá A, Napoli ID et al. Plasma levels of vitamin E in Parkinson's disease. *Archives of Gerontology and Geriatrics* 2001; 33: 7-12.

Obrenovich ME, Nair NG, Beyaz A, Aliev G, Reddy VP. The Role of Polyphenolic Antioxidants in Health, Disease, and Aging. *Rejuvenation Research* 2010; 13(6): 631-643.

Middleton EJ. Effect of plant flavonoids on immune and inflammatory cell function. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1998; 439: 175–82.

Rossi L, Mazzitelli S, Arciello M, Capo C R, Rotilio G. Benefits from Dietary Polyphenols for Brain Aging and Alzheimer's Disease. *Neurochem. Res.* 2008; 33: 2390–2400.

Beking K, Vieira A. Flavonoid intake and disability-adjusted life years due to Alzheimer's and related dementias: a population-based study involving twenty-three developed countries. *Public Health Nutrition* 2010; 13(9):1403–1409.

Andres-Lacueva C, Shukitt-Hale B, Galli RL, Jauregui O, Lamuela-Raventos RM, Joseph JA. Anthocyanins in aged blueberry-fed rats are found centrally and may enhance memory. *Nutr. Neurosci.* 2005; 8:111–120.

Paramapojn S, Gritsanapan W. Free radical scavenging activity determination and quantitative analysis of curcuminoids in *Curcuma zedoaria* rhizome extracts by HPLC method. *Current Science* 2009; 97 (7): 1069-1073.

Begum AN, Jones MR, Lim GP, Morihara T, Kim P, Heath DD, Rock CL, Pruitt MA, Yang F, Hudspeth B, Hu S, Faull KF, Teter B, Cole GM, Frautschy SA. Curcumin structure–function, bioavailability, and efficacy in models of neuroinflammation and Alzheimer's disease. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2008; 326 (1): 196–208.

Sharma RA, Gescher AJ, Steward WP. Curcumin: the story so far. *Eur. J. Cancer* 2005; 41 (13): 1955–1968.

Ishrat T, Hoda MN, Khan MB, Yousuf S, Ahmad M, Khan MM, Ahmad A, Islam F. Amelioration of cognitive deficits and neurodegeneration by curcumin in rat model of sporadic dementia of Alzheimer's type (SDAT). *Eur. Neuropsychopharmacol.* 2009; 19 (9): 636–647.

Khuwaja G, Khan MM, Ishrat T, Ahmad A, Raza SS, Ashafaq M, Javed H, Khan MB, Khan A, Vaibhav K, Safhi MM, Islam F. Neuroprotective effects of curcumin on 6-hydroxydopamine-induced Parkinsonism in rats: Behavioral, neurochemical and immunohistochemical studies. *Brain Research* 2011; 1368: 254-263.

Karuppagounder SS, Pinto JT, Xu H, Chen H, Beal MF, Gibson GE. Dietary supplementation with resveratrol reduces plaque pathology in a transgenic model of Alzheimer's disease. *Neurochemistry international* 2009; 54 (2): 111-118.

Pallas M, Canudas AM, Junyent F, Jimenez A, Verdaguer E, Camins A. Resveratrol: A Therapeutic Approach to Neurodegenerative Diseases and Aging. *Mini-Reviews in Organic Chemistry* 2010; 7 (4): 267-271.

Savaskan E, Olivieri G, Meier F, Seifritz E, Wirz-Justice A, Muller-Spahn F. Red wine ingredient resveratrol protects from betaamyloid neurotoxicity. *Gerontology* 2003, 49: 380–383.

Marambaud P, Zhao H, Davies P. Resveratrol Promotes Clearance of Alzheimer's Disease Amyloid- $\beta$  Peptides. *The Journal of Biological Chemistry* 2005; 280: 37377-37382.

Shiha P, Chanb Y, Liaoc J, Wangb M, Yena G. Antioxidant and cognitive promotion effects of anthocyanin-rich mulberry (*Morus atropurpurea* L.) on senescence-accelerated mice and prevention of Alzheimer's disease. *Journal of Nutritional Biochemistry* 2010; 21: 598–605.

Prasanthi JRP, Dasari B, Marwarha G, Larson T, Chen X, Geiger JD, Ghribi O. Caffeine protects against oxidative stress and Alzheimer's disease-like pathology in rabbit hippocampus induced by cholesterol-enriched diet. *Free radical biology & medicine* 2010; 49: 1212-1220.