UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

LUCIANA GOMES MALTA

AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DE FRUTAS DO CERRADO BRASILEIRO: GUAPEVA, GABIROBA E MURICI

TESE DE DOUTORADO APRESENTADA À FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS UNICAMP PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS.

ORIENTADORA: Prof^{a}. Dr$^{a.}$ GLÁUCIA MARIA PASTORE

Este exemplar corresponde à versão final da tese defendida por Luciana Gomes Malta, aprovada pela comissão julgadora em ___/___/___ e orientado(a) pelo Prof.(a) Dr. (a) Gláucia Maria Pastore.

_____

Assinatura do Orientador

CAMPINAS, 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
CLAUDIA AP. ROMANO DE SOUZA – CRB8/5816 - BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS – UNICAMP

Malta, Luciana Gomes, 1980.
M298a Avaliação biológica de frutas do Cerrado brasileiro: Guapeva, Gabiroba e Murici / Luciana Gomes Malta. -- Campinas, SP: [s.n], 2011.

Orientador: Gláucia Maria Pastore.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Frutas. 2. Cerrados. 3. Antioxidantes. 4. Alimentos funcionais. 5. Atividade biológica. I. Pastore, Gláucia Maria. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Biological evaluation of fruits from the Brazilian Cerrado: Guapeva, Gabiroba and Murici
Palavras-chave em inglês (Keywords):
Fruits
Cerrados
Antioxidans
Functional foods.
Biological activity
Área de concentração: Engenharia de Alimentos
Titulação: Doutor em Engenharia de Alimentos
Banca examinadora:
Gláucia Maria Pastore
Ana Lúcia Tasca Gois Ruiz
Luciano Bruno de Carvalho Silva
Mário Roberto Maróstica Júnior
Raimundo Wilane de Figueiredo
Data da defesa: 15/07/2011
Programa de Pós Graduação: Ciência de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Prof.(a) Dr.(a) Gláucia Maria Pastore
(Orientadora)

Prof.(a) Dr.(a) Ana Lúcia Tasca Gois Ruiz
(Membro)

Prof. Dr. Luciano Bruno de Carvalho Silva
(Membro)

Prof. Dr. Mário Roberto Maróstica Júnior
(Membro)

Prof. Dr. Raimundo Wilane de Figueiredo
(Membro)

Prof. Dr. Flávio Luís Schmidt
(Suplente)

Prof.(a) Dr.(a) Gabriela Alves Macedo
(Suplente)

Prof. Dr. Yong Kun Park
(Suplente)

Dedico e agradeço especialmente a meus pais José Malta e Mara, como também à minha irmã, Tatiana, pelo apoio ao longo de minha formação acadêmica.

AGRADECIMENTOS

Mais difícil que realizar este trabalho, é encontrar uma forma de agradecer por toda ajuda que recebi das pessoas especiais com quem convivo e que tanto me ajudaram nesta etapa de minha vida.

Primeiramente agradeço a Deus, pela ajuda e luz que me guiaram por toda minha vida, dando-me força para acreditar em meu potencial e nunca desistir diante dos problemas.

Aos meus pais, sem palavras para descrever o apoio, a confiança e o empenho de sempre para a construção da minha carreira profissional. Ofereço a vocês este título de doutora.

À minha família, obrigada pelo apoio e encorajamento.

Aos membros da banca, pelas sugestões valiosas.

À professora Gláucia Pastore, minha orientadora, que sempre acreditou em meu potencial, e ofereceu-me ótimas oportunidades durante todos estes anos.

A todos os amigos do laboratório de Bioaromas (CD, Fábio, Juliano Bicas, Janaína, Lívia Seno, Rosângela, Luciana Carrasco, Roseanne Barata, Mário Mano, Mário Maróstica, Angélica, Mariana Pimentel, Gustavo Molina, Dani Bio, Juliana Bueno, Beth, Junio, Érica, Ana Simiqueli, Adriane, Grethel, Cristiano, Renata Sancho, Nadir, Dora). Bons momentos passamos juntos, obrigada a todos. Em especial à Danizinha (“Gigante”) e Ceci, e mais uma vez não tenho palavras para expressar tamanho agradecimento, vocês são muito especiais!

Meus alunos de iniciação: Renata Shiguematsu, Renata Ikari, Tiago Coroa, Renato Reis (um “filho” que se dedicou de corpo e alma ao meu trabalho, não sei como te agradecer...) e ao Carlos.

Ao pessoal do laboratório de Bioquímica, em especial à Priscila, Val e Bia (ahhh Bia como sentirei falta de nossas conversas).

À Flávia Ghiraldini, no início uma colega de trabalho, hoje sei que tenho uma grande amiga e uma chefinha brava!

À professora Clélia, a senhora me mostrou o quão linda é a carreira acadêmica! Sem palavras para agradecer.

Aos amigos da UNIFAL, Luciano Bruno, Maysa e Williana.

Ao Dr. Liu que me recebeu de braços abertos na Universidade de Cornell. Um grande abraço a todos os amigos do laboratório, em especial à Christopher de Rito, Yang e Ana Faller.

Aos amigos Bruno Martins, Roberta Drekener, Rose Barcelos, Alice Vieira.

Aos amigos Viena Quaresma, Angélica Fleury e Fábio Quaresma. “O destino une e separa as pessoas, mas nenhuma força é tão grande para fazer esquecer pessoas que por algum motivo um dia nos fizeram felizes”.

Às amigas Verônica (“Bis”, Verônica Alvarenga Gomes Malta, um grande nome para descrever esta pessoa tão, tão, tão especial), Maricy Raquel (já discutimos, choramos juntas, mas o importante é que sei que tenho uma grande amiga), Kiara (duas pessoas tão diferentes mas tão iguais!), Daniele e Lívia (hoje sei que tenho duas novas amigas muito especiais!). Obrigada meninas pelo convívio e amizade.

À todos os funcionários da FEA, sobretudo ao Cosme, Marcão, também ao pessoal da manutenção, almoxarifado e administração. Sem dúvida essa tese não seria possível sem o apoio de todos.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro que possibilitou a execução desse projeto.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro durante o doutorado sanduíche realizado na Universidade de Cornell / EUA.

A todos que de alguma forma contribuíram para que eu me tornasse uma pessoa melhor, tanto como profissional como ser humano. A todos vocês, fica a minha eterna gratidão.

Lu Malta

“Uma longa caminhada começa sempre pelo primeiro passo.”

(Lao-Tsé)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 29

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 32

2.1 ESTRESSE OXIDATIVO 32

2.2 ANTIOXIDANTES 34

2.2.1 Antioxidantes enzimáticos 36

2.2.2 Antioxidantes não enzimáticos 36

2.3 POLIFENÓIS 37

2.3.1 Biodisponibilidade dos compostos fenólicos 39

2.4 ALIMENTOS FUNCIONAIS 41

2.5 DANOS OXIDATIVOS AO DNA 42

2.5.1 Genotoxicidade 44

2.5.2 Mutação 45

2.5.3 Carcinogênese 50

2.6 ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA 54

2.7 USO DE PLANTAS MEDICINAIS E SAÚDE 56

2.8 CERRADO 59

2.8.1 Frutos do Cerrado 62

3 OBJETIVOS 67

3.1 OBJETIVO GERAL 67

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 67

4 MATERIAL E MÉTODOS 68

4.1 OBTENÇÃO DAS FRUTAS DO CERRADO 68

4.2 PREPARO DOS EXTRATOS 68

4.2.1 Extração hidrofílica 69

4.2.2 Extração lipofílica ____ *69*

4.3 ENSAIOS ____ 70

4.3.1 Ensaios in vitro ____ *70*

4.3.2 Atividade antioxidante em plasma de animais alimentados com frutas ____ *78*

4.3.3 Ensaio de mutagenicidade (Teste de Micronúcleo) ____ *82*

4.3.4 Teste antiinflamatório (Edema de Pata) ____ *87*

4.3.5 Teste de genotoxicidade (Ensaio Cometa) ____ *90*

4.3.6 Atividade antiproliferativa ____ *99*

4.3.7 Ensaio de Citotoxicidade ____ *101*

4.3.8 Medida de proliferação celular ____ *102*

4.3.9 Atividade Antioxidante Celular (CAA) ____ *103*

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA ____ 104

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO ____ 104

5.1 ENSAIOS *IN VITRO* ____ 104

5.1.1 Fenóis totais ____ *104*

5.1.2 Flavonóides totais ____ *109*

5.1.3 2,2- Diphenyl – 1- picrylhydrazil (DPPH) ____ *111*

5.1.4 Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) ____ *118*

5.1.5 Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) ____ *123*

5.1.6 Peroxyl Radical Scavenging Capacity (PSC) ____ *128*

5.1.7 Cromatografia Líquida de Alta eficiência (CLAE) ____ *130*

5.1.8 Atividade antioxidante em plasma de animais tratados com frutas 140

5.1.9 Ensaio de mutagenicidade (Teste Micronúcleos) 150

5.1.10 Teste Antiinflamatório (Edema de Pata) 158

5.1.11 Teste de Genotoxicidade (Ensaio Cometa) 166

5.1.12 Atividade antiproliferativa 172

5.1.13 Ensaios de citotoxicidade / antiproliferativo ($HepG_2$) 177

5.1.14 Atividade antioxidante celular ($HepG_2$) 182

6 CONCLUSÕES 187

7 REFERÊNCIAS 191

8 ANEXOS 222

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Gradiente utilizado no ensaio de Cromatografia líquida de alta eficiência 75

Tabela 2. Ensaio Antioxidante *in vivo*, grupos / extratos 78

Tabela 3. Desenho experimental para ensaio de mutagenicidade pelo teste de Micronúcleo em medula óssea 83

Tabela 4. Desenho experimental para ensaio antiinflamatório pelo teste de Edema de pata 88

Tabela 5. Desenho experimental para ensaio Cometa *in vivo* 91

Tabela 6. Densidade de inoculação das linhagens celulares (ensaio antiproliferativo) 99

Tabela 7. Resultados para extrações aquosa e etanólica no ensaio *in vitro* de Fenóis Totais 106

Tabela 8. Determinação de cor, fenóis totais (mg de ácido gálico/ 100 g fruta), flavonóides totais (mg de catequina/100 g fruta), antocianinas e sensor optico para variedades de Raspberries, determinados por Liu et al. (2002) 109

Tabela 9. Determinação de flavonóides totais nos cinco extratos etanólicos avaliados: Gabiroba, Guapeva (casca, semente e polpa) e Murici 110

Tabela 10. Determinação da atividade antioxidante in vitro pelo método *DPPH - Trolox* nos cinco extratos etanólicos avaliados: Gabiroba, Guapeva (casca, semente e polpa) e Murici 112

Tabela 11. Determinação da atividade antioxidante *in vitro* pelo método *DPPH – IC_{50}* nos cinco extratos avaliados: Gabiroba, Guapeva (casca, semente e polpa) e Murici 117

Tabela 12. Determinação da atividade antioxidante *in vitro* pelo método *DPPH – IC_{50}* para padrões antioxidantes.....118

Tabela 13. Determinação da atividade antioxidante *in vitro* pelo método *TEAC* nos cinco extratos avaliados: Gabiroba, Guapeva (casca, semente e polpa) e Murici 121

Tabela 14. Determinação da atividade antioxidante *in vitro* pelo método *ORAC* nos cinco extratos avaliados: Gabiroba, Guapeva (casca, semente e polpa) e Murici 125

Tabela 15. Resultados para padrões antioxidantes no ensaio antioxidante *in vitro ORAC* 127

Tabela 16. Resultados do ensaio *in vitro Peroxyl Radical Scavening Capacity* (*PSC*) para os extratos de frutas do Cerrado 129

Tabela 17. Resultados para frutas analisadas através do ensaio *Peroxyl Radical Scavening Capacity -PSC* (ADOM & LIU, 2005) 130

Tabela 18. Linearidade no ensaio de cromatografia líquida de alta eficiência (áreas e concentrações dos padrões utilizados) 134

Tabela 19. Repetitividade no ensaio de cromatografia líquida de alta eficiência (áreas e concentrações dos padrões utilizados) 136

Tabela 20. Limite de Detecção e Limite de Quantificação no ensaio de cromatografia líquida de alta eficiência 138

Tabela 21. Quantificação e Identificação dos padrões nos extratos do Cerrado avaliados: Gabiroba, Murici e Guapeva (semente, casca e polpa) por cromatografia líquida de alta eficiência.....140

Tabela 22. Concentração de fenóis totais de extratos etanólicos de frutas do Cerrado e cálculo da massa de extrato utilizada no ensaio antioxidante *in vivo* em ratos Wistar machos 141

Tabela 23. Resultados da atividade antioxidante *ORAC* para amostras de plasma de animais tratados após teste de extração dos compostos fenólicos.....141

Tabela 24. Dosagem de Fenóis totais em amostras de plasma de animais tratados com extratos de frutas do Cerrado.....144

Tabela 25. Potencial antioxidante pelo ensaio *TEAC* para amostras de plasma de animais tratados com extratos de frutas do Cerrado 144

Tabela 26. Potencial antioxidante pelo ensaio ORAC para amostras de plasma de animais tratados com extratos de frutas do Cerrado 144

Tabela 27. Peso dos animais utilizados no ensaio *in vivo* de Micronúcleo 151

Tabela 28. Resultados no teste de Micronúcleos, apresentando % MNPCE e % Redução 153

Tabela 29. Resultados do teste de Micronúcleos apresentando resultados de número de células analisadas, número de micronúcles, número e micronúcleos esperados e análise estatística por Qui Quadrado.....154

Tabela 30. Peso animais Teste Edema de Pata 159

Tabela 31. Porcentagem de efeito Antiinflamatório no ensaio in vivo de Edema de Pata para os extratos de frutos do Cerrado 165

Tabela 32. Resultados para porcentagem de dano no DNA e células danificadas a partir do tratamento de animais com extratos de frutas do Cerrado, avaliados no Ensaio Cometa 169

Tabela 33. Resultados de GI_{50} no Ensaio antiproliferativo para os extratos de frutas do Cerrado analisados.....176

Tabela 34. Resultado de IC_{50} para os extratos de frutas do Cerrado avaliados no Ensaio Antiproliferativo ($HepG_2$).....181

Tabela 35. Resultados para ensaio *CAA*.....185

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ação Antioxidante (RAO & RAO, 2007) 35

Figura 2. Modelo de múltiplas etapas do processo carcinogênico (PITOT, 1993) 51

Figura 3. Formação do processo inflamatório (Rubin & Farber, 2002 - modificado).....56

Figura 4. Gabiroba (MOREIRA, 2011).....64

Figura 5. Guapeva (SILVA et al., 2001).....65

Figura 6. Murici (MARIANO, 2011).....66

Figura 7. Representação fotográfica do teste Edema de pata 90

Figura 8. Fluxograma para Ensaio Cometa.....96

Figura 9. Níveis de danos (0 a 4) - Ensaio Cometa *in vivo* (COLLINS et al., 1994).....97

Figura 10. Curva do padrão Ácido Gálico para ensaio de Fenóis Totais 105

Figura 11. Fenóis Totais para frutas consumidas nos Estados Unidos (WOLFE & LIU, 2008).....108

Figura 12. Curva do padrão Catequina para ensaio de Flavonóides totais.....110

Figura 13. Gráfico de *DPPH* IC_{50} para Guapeva casca extração etanólica 114

Figura 14.Gráfico de *DPPH* IC_{50} para Guapeva casca extração aquosa 114

Figura 15. Gráfico de *DPPH* IC_{50} para Guapeva semente extração etanólica 115

Figura 16. Gráfico de *DPPH* IC_{50} para Guapeva polpa extração etanólica 115

Figura 17. Gráfico de *DPPH* IC_{50} para Gabiroba extração etanólica.....115

Figura 18. Gráfico de *DPPH* IC_{50} para Gabiroba extração aquosa 116

Figura 19. Gráfico de *DPPH* IC_{50} para Murici extração etanólico.....116

Figura 20. Gráfico *TEAC – ABTS* / água – 6 minutos 120

Figura 21. Gráfico *TEAC – ABTS* / água – 30 minutos 120

Figura 22. Gráfico *TEAC – ABTS* / etanol – 6 minutos.....120

Figura 23. Gráfico *TEAC – ABTS* / etanol – 30 minutos.....121

Figura 24. Gráfico com curva do padrão *Trolox* hidrofílico – Ensaio *ORAC* 124

Figura 25. Gráfico com curvas de decaimento da fluorescência (*Trolox* hidrofílico) – Ensaio *ORAC* 124

Figura 26. Gráfico com curva do padrão *Trolox* Lipofílico – Ensaio *ORAC*.....124

Figura 27. Gráfico com curvas de decaimento da fluorescência (*Trolox* lipofílico) – Ensaio *ORAC* 125

Figura 28. Resultado a partir do ensaio *in vitro ORAC* para frutas consumidas nos Estados Unidos (WOLFE & LIU, 2008) 127

Figura 29. Curva Ácido ascórbico (*PSC*).....128

Figura 30. Gráfico de Linearidade para padrão Ácido Gálico (CLAE).....131

Figura 31. Gráfico de Linearidade para padrão Catequina (CLAE).....131

Figura 32. Gráfico de Linearidade para padrão Epicatequina (CLAE) 132

Figura 33. Gráfico de Linearidade para padrão Etil Galato (CLAE) 132

Figura 34. Gráfico de Linearidade para padrão Ácido Ferrúlico (CLAE) 132

Figura 35. Gráfico de Linearidade para padrão Propil Galato – linearidade (CLAE).....133

Figura 36. Gráfico de Linearidade para padrão Resveratrol (CLAE).....133

Figura 37. Gráfico de Linearidade para padrão Ácido Cinâmico (CLAE).....133

Figura 38. Espectro de Massas (Grupo 2 Gabiroba).....147

Figura 39. Espectro de Massas (Grupo 3 Guapeva casca).....148

Figura 40. Espectro de Massas (Grupo 4 Guapeva semente) 148

Figura 41. Espectro de Massas (Grupo 5 Guapeva polpa) 149

Figura 42. Espectro de Massas (Grupo 6 Murici).....149

Figura 43. Ensaio de Micronúcleos, aplicação da droga Ciclofosfamida 151

Figura 44. Visualização da lâmina fotografada no Ensaio de Micronúcleos in vivo. “A” (NCE, eritrócito maduro, corado de rosa), e “B” (PCE, eritrócito imaturo, corado de azul), “C” (MNPCE, micronúcleos, porção citoplasmática de cromatina de forma redonda ou ovalada que se localiza perto do núcleo) 152

Figura 45. Gráfico com resultados para extrato da fruta Gabiroba no teste de Edema de pata.....160

Figura 46. Gráfico com resultados para extrato da fruta Murici no teste de Edema de pata 160

Figura 47. Gráfico com resultados para extrato da fruta Guapeva semente no teste de Edema de pata 161

Figura 48. Gráfico com resultados para extrato da fruta Guapeva casca no teste de Edema de pata 161

Figura 49. Gráfico com resultados para extrato da fruta Guapeva polpa no teste de Edema de pata.....162

Figura 50. Níveis 1 e 3 de danos no DNA no Ensaio Cometa.....167

Figura 51. Níveis 3, 2 e 0 de danos no DNA no Ensaio Cometa.....167

Figura 52. Níveis 4, 0 e 1 de danos no DNA no Ensaio Cometa.....168

Figura 53. Apoptose (não determinado no Ensaio Cometa) 168

Figura 54. Resultado para Doxorrubina no Teste Antiproliferativao. Pulmão (NCI-H460), Mama (MCF-7), Mama com fenótipo resistência multidroga (NCI-ADR/RE), Cólon (HT-29), Próstata (PC-3), Melanoma (UACC-62), Ovário (OVCAR-3), Renal (786-O) 173

Figura 55. Resultado para extrato da fruta Murici no Teste Antiproliferativao. Pulmão (NCI-H460), Mama (MCF-7), Mama com fenótipo resistência multidroga (NCI-ADR/RE), Cólon (HT-29), Próstata (PC-3), Melanoma (UACC-62), Ovário (OVCAR-3), Renal (786-O) 173

Figura 56. Resultado para extrato da fruta Gabiroba no Teste Antiproliferativao. Pulmão (NCI-H460), Mama (MCF-7), Mama com fenótipo resistência multidroga (NCI-ADR/RE), Cólon (HT-29), Próstata (PC-3), Melanoma (UACC-62), Ovário (OVCAR-3), Renal (786-O) 174

Figura 57. Resultado para extrato da fruta Guapeva polpa no Teste Antiproliferativao. Pulmão (NCI-H460), Mama (MCF-7), Mama com fenótipo resistência multidroga (NCI-ADR/RE), Cólon (HT-29), Próstata (PC-3), Melanoma (UACC-62), Ovário (OVCAR-3), Renal (786-O).....174

Figura 58. Resultado para extrato da fruta Guapeva semente no Teste Antiproliferativao. Pulmão (NCI-H460), Mama (MCF-7), Mama com fenótipo resistência multidroga (NCI-ADR/RE), Cólon (HT-29), Próstata (PC-3), Melanoma (UACC-62), Ovário (OVCAR-3), Renal (786-O).....175

Figura 59. Resultado para extrato da fruta Guapeva casca no Teste Antiproliferativao. Pulmão (NCI-H460), Mama (MCF-7), Mama com fenótipo resistência multidroga (NCI-ADR/RE), Cólon (HT-29), Próstata (PC-3), Melanoma (UACC-62), Ovário (OVCAR-3), Renal (786-O). 175

Figura 60. Resultado dos ensaios de citotoxicidade e proliferação celular ($HepG_2$) para extrato Murici. Tempo de exposição T_{24} horas para citotoxicidade e T_4 horas para proliferação celular 179

Figura 61. Resultado dos ensaios de citotoxicidade e proliferação celular ($HepG_2$) para extrato Gabiroba. Tempo de exposição T_{24} horas para citotoxicidade e T_4 horas para proliferação celular 179

Figura 62. Resultado dos ensaios de citotoxicidade e proliferação celular ($HepG_2$) para extrato Guapeva polpa. Tempo de exposição T_{24} horas para citotoxicidade e T_4 horas para proliferação celular 180

Figura 63. Resultado dos ensaios de citotoxicidade e proliferação celular ($HepG_2$) para extrato Guapeva casca. Tempo de exposição T_{24} horas para citotoxicidade e T_4 horas para proliferação celular 180

Figura 64. Resultado de EC_{50} (mg/mL) para o teste de proliferação celular realizado para frutas Raspberries (LIU et al., 2002)....181

Figura 65. Curvas de diferentes concentrações do padrão Quercetina no ensaio antioxidante celular....183

Figura 66. Curva padrão da Quercetina no ensaio antioxidante celular....183

Figura 67. Curvas de concentração (mg/mL) no ensaio antioxidante celular para extrato da Guapeva semente 184

Figura 68. Resultado do potencial antioxidante celular através do método *CAA* para frutas consumidas nos Estados Unidos (WOLFE & LIU, 2008) 186

RESUMO GERAL

A ingestão de muitas frutas convencionais, exóticas e nativas está associada com a redução do risco de doenças crônicas não transmissíveis e até mesmo o câncer. Neste contexto, o presente trabalho tem como proposta estudar atividades biológicas bem como identificar e quantificar os compostos fenólicos das frutas do Cerrado brasileiro, Guapeva (*Pouteria cf. guardneriana* Radlk.), Murici (*Byrsonima verbascifolia* Rich.) e Gabiroba (*Compomanesia cambessedeana O*. Berg.). Além dos compostos fenólicos, foram investigadas as atividades antioxidante, antiinflamatória, antimutagência, antigenotóxica, antiproliferativa e citotóxica. Os compostos fenólicos foram extraídos com etanol 95% e com água. Os fenólicos lipofílicos foram extraídos, a partir da fruta, com hexano. A quantificação dos compostos fenólicos foi realizada e os extratos etanólicos apresentaram melhores resultados quando comparados com os aquosos. O extrato etanólico da Gabiroba concentração de fenólicos de 4610,46 mg Ácido Gálico/100g fruta fresca, sendo superior a todos os outros extratos. Também foi realizada a quantificação dos flavonóides totais, mas apenas para os extratos etanólicos, e a semente da Guapeva apresentou o resultado mais relevante, no valor de 2915,62 mg Catequina/100g fruta fresca. Os extratos do Cerrados foram avaliados quanto a capacidade antioxidante *in vitro* através dos métodos *2,2- Diphenyl – 1- picrylhydrazil (DPPH), Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC), Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) e Peroxyl Radical cavenging Capacity (PSC).* Os resultados do teste *DPPH* foram expostos de duas formas diferentes, como equivalentes de *Trolox* onde o extrato etanólico da casca da Guapeva destacou-se por apresentar maior potencial antioxidante nos 3 tempos analisados (30, 60 e 90 minutos) e também como IC_{50}, onde o extrato etanólico da Gabiroba apresentou

melhor resultado no valor de 11,10 µg/mL de fruta fresca. Para o teste *TEAC* os extratos etanólicos da casca da Guapeva e a Gabiroba apresentaram maior potencial antioxidante, com resultados de 1543,53 e 1014,25 µM Trolox Equivalentes/100g fruta fresca, respectivamente. Já para os ensaios *ORAC* e *PSC* o extrato etanólico da Gabiroba apresentou maior atividade, com resultados de 43780,00 µM TE/100g de fruta e 2342,52 µM Vitamina C/100 g fruta fresca, respectivamente. A identificação e quantificação dos compostos fenólicos presentes nos extratos foram realizadas por Cromatografia líquida de alta eficiência. Foram identificados Ácido ferrúlico, Resveratrol, Etil galato, Catequina, Propil galato e Epicatequina. Ratos foram tratados com os extratos de frutas e o plasma foi coletado 30, 60 e 90 minutos após a gavagem para análise pelos métodos *ORAC*, *TEAC* e fenóis totais. O extrato de casca da Guapeva apresentou maior concentração de fenóis totais após trinta minutos da ingestão e o Murici após 1 hora. Através da análise *TEAC*, todos os extratos apresentaram maior atividade antioxidante no tempo de 30 minutos quando comparado com os demais tempos. No ensaio *ORAC* todos os extratos apresentaram maior potencial nos períodos de 30 e 60 minutos. A identificação dos compostos fenólicos no plasma foi determinada por Espectrometria de Massas, sendo que apenas a Catequina foi identificada no grupo que foi tratado com Gabiroba. O potencial antimutagênico/mutagênico foi determinado pelo teste *in vivo* de Micronúcleos. Todos os extratos mostraram-se antimutagênicos e não mutagênicos. O extrato com maior efeito protetor contra a droga Ciclofosfamida foi o Murici 400 mg extrato/kg P.C. com efeito redutor de 97,71%. A avaliação do efeito antiinflamatório foi realizada pelo teste de Edema de pata, induzido por Carragenina e todos os extratos apresentaram ação antiinflamatória. Também verificou-se que a partir da segunda hora após a injeção da Carragenina, o efeito antiinflamatório apresentado por todos extratos, aumentou. O efeito antigenotóxico foi avaliado pelo ensaio Cometa *in vivo*. Todos os extratos avaliados não

danificaram o DNA e os que apresentaram maior proteção contra dano/lesão no DNA foram a polpa, casca e semente da Guapeva na concentração de 200 mg extrato/kg P.C. e o Murici na concentração de 400 mg extrato/kg P.C. Oito linhagens tumorais humanas foram utilizadas na determinação do potencial antiproliferativo, apenas a Guapeva casca, polpa e o Murici apresentaram início de efeito citostático. A atividade citotóxica e antiproliferativa foi avaliada em hepatocarcinoma humano ($HepG_2$), a semente da fruta Guapeva apresentou citotoxicidade, e a casca e polpa da fruta Guapeva, assim como a Gabiroba se destacaram no potencial antiproliferativo com valores de 11,75; 12,57 e 8,35 mg/mL. O potencial antioxidante celular foi avaliado e a casca da fruta Guapeva apresentou maior atividade, no valor de 99,91 µmol Quercetina/100g fruta de fresca. De acordo com nosso conhecimento, este foi o estudo mais aprofundado sobre as propriedades biológicas das frutas do Cerrado, e que possivelmente possibilitará a utilização destes como alimento funcional.

ABSTRACT

There is an association between the conventional intake of many fruits (exotic native species) with reduced risk of chronic diseases and even cancer. In this context, this work aims to study the biological activities, identify and quantify the phenolic compounds of Cerrado´s fruits, the Guapeva (*Pouteria cf. Guardneriana* Radlk), Murici (*verbascifolia Byrsonima* Rich) and Gabiroba (*Compomanesia cambessedeana* O. Berg). In addition, we investigated the antioxidant, anti-inflammatory, antimutagenic, antigenotoxic, antiproliferative and cytotoxic properties of these fruits. Phenolic compounds were extracted with 95% ethanol and water. The lipophilic phenolics were extracted from the fruit with hexane. The quantification of phenolic compounds was performed and the ethanol extracts presented better results when compared with aqueous extracts. The Gabiroba extract showed the total phenolic concentration of 4610.46 mg Gallic acid/100g fresh fruit, higher than all other analyzed extracts. Total flavonoids were also quantified, but only the ethanol extracts were used. The seed of the Guapeva presented the most relevant results, amounting to 2915.62 mg Catechin /100g fresh fruit. The Cerrado´s extracts were evaluated for antioxidant capacity in vitro using the methods 2,2- Diphenyl – 1- picrylhydrazil (DPPH), Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC), Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) e Peroxyl Radical cavenging Capacity (PSC). The DPPH test results were presented in two different ways, one as Trolox equivalents, in which the ethanol extract of the peel of the Guapeva resulted in the highest antioxidant potential for the three analyzed times (30, 60 and 90 minutes) and the other way as EC_{50}, in which it was observed that the ethanol extract of Gabiroba had the best result with a value of 11.10 µg/mL of fresh fruit. From the TEAC test, ethanol extracts of the peel of Guapeva and

Gabiroba showed higher antioxidant potential, the results were 1543.53 and 1014.25 uM Trolox Equivalents/100g of fresh fruit, respectively. For the ORAC and PSC tests, the ethanol extract of the Gabiroba presented the highest activity, with results of 43,780.00 μM TE/100g of fresh fruit and 2342.52 μM Vitamin C/100g of fresh fruit, respectively. The identification and quantification of phenolic compounds in the extracts were performed by high performance liquid chromatography. The following standards were identified: Ferrulic acid, resveratrol, ethyl gallate, catechin, Propyl gallate, and epicatechin. Rats were treated with the extract of fruits and plasma was collected 30, 60 and 90 min after gavage for analysis by the methods ORAC, TEAC and Total phenolics. The peel of the Guapeva extract showed the highest concentration of phenolics thirty minutes after treatment and the Murici presented the highest concentration after 1 hour of ingestion. For the TEAC test, all extracts showed higher antioxidant activity at 30 minutes compared to the other analyzed periods. For the ORAC assay, all the extracts had the greatest potential in periods between 30 and 60 minutes. The identification of phenolic compounds in plasma was determined by mass spectrometry, and only the Catechin was identified in the group of animals that received the Gabiroba extract. The antimutagenic / mutagenic test was determined by in vivo micronucleus test. None of the extracts show mutagenic properties. The extract with the greatest protective effect against Cyclophosphamide drug was the Murici at 400 mg extract / kg body weight, presenting reduction effect of 97.71%. The evaluation of anti-inflammatory effect was accomplished by testing the paw edema induced by the Carrageenan drug and it was observed that all extracts showed anti-inflammatory properties. It was also found that from the second hour after injection of Carrageenan, all extracts presented an increase of anti-inflammatory effects. The antigenotoxic effect was evaluated by Comet assay in vivo. All the extracts evaluated did not induce DNA damage, the extracts that provided greater protection against DNA

damage were the pulp, peel and seed of Guapeva at 200 mg extract/kg body weight and Murici at 400 mg extract/kg body. Eight human tumor cell lines were used to determine the potential antiproliferative effects of the fruits, however just the peel, pulp of Guapeva and Murici showed cytostatic effects. The antiproliferative and cytotoxicity activities were evaluated in human hepatocellular carcinoma cells ($HepG_2$). The seeds of Guapeva presented cytotoxicity, and the peel and pulp of Guapeva, and Gabiroba showed the highest antiproliferative potential with values of 11.75, 12.57 and 8.35 mg/mL, respectively. The cellular antioxidant potential was tested and the peel of the Guapeva showed the highest activity, amounting to 99.91 µmol Quercetin/100g fresh fruit. This study furthers the investigation of the biological properties of the fruits of the Cerrado, and possibly allow the use of these as functional food.

1 INTRODUÇÃO

O crescente interesse no consumo de frutas e hortaliças deve-se principalmente pelos benefícios trazidos ao organismo. Sendo assim, o Brasil, por apresentar grande biodiversidade, adquire extrema importância neste contexto (FUNARI & FERRO, 2005).

Dentre os biomas encontramos o Cerrado, que é o segundo maior bioma da América do Sul, perdendo em tamanho somente para a floresta Amazônica. O Cerrado é a mais diversificada savana tropical do mundo (KLINK & MACHADO, 2005), ocupando 25% do Brasil e é também o mais brasileiro dos biomas sulamericanos, pois, excetuando algumas pequenas áreas na Bolívia e no Paraguai, está totalmente inserido no território Nacional (PROENÇA et al., 2000). Nos últimos 30 anos, a progressiva mecanização da lavoura e a facilidade de limpar e adubar a terra tem contribuindo para uma devastação acelerada de vegetação nativa e estima-se que cerca de 40% do bioma já tenha sido desmatado (RATTER et al., 1997).

O bioma Cerrado possui uma diversidade grande de frutos importantes na sustentabilidade da região. Com esta enorme biodiversidade criou-se na região do Cerrado, uma tradição de usos, em diferentes formas, dos recursos vegetais. Detacam-se pela importância na região, as espécies alimentícias, medicinais, madeireiras, tintoriais, ornamentais, além de outros usos. Das espécies com potencial de utilização agrícola, na região do Cerrado, destacam-se as frutíferas. São algumas dezenas de espécies de diferentes famílias que produzem frutos comestíveis, com formas variadas, cores atrativas e sabor característico (RODRIGUEZ, 2001).

Muitos frutos das plantas nativas do cerrado, provenientes de atividade extrativista e muitas vezes predatória, são comercializados e consumidos *in natura* ou beneficiados por indústrias caseiras na forma de sorvetes, sucos, licores, geléias com grande aceitação popular. A maioria desses frutos possui elevados teores de açúcar, proteína, vitaminas e sais minerais, além de sabor muito característico. Muitos dos frutos do país ainda são desconhecidos ou pouco utilizados (SILVA et al., 1994).

O benefício vindo de frutas e verduras, ricos em antioxidantes, pode ser atribuído à presença de ingredientes específicos como vitaminas, fibras, minerais e aos fitoquímicos e estes estão intimamente relacionados com a redução no risco de incidência de doenças cardiovasculares e outras doenças crônicas (BRAVO, 1998; VASCO et al., 2008).

Dentre esses, os compostos fenólicos compõem um grupo heterogêneo de moléculas que atuam como antioxidantes não somente por sua habilidade em doar hidrogênio ou elétrons, mas também devido aos radicais intermediários estáveis, que impedem a oxidação de moléculas no organismo, além de vários ingredientes de alimentos, particularmente ácidos graxos (SOARES, 2002). Os compostos fenólicos, além de proporcionar atividade antioxidante têm demonstrado importante atividade *in vivo* e podem ser benéficos no controle de diversas doenças relacionadas à formação excessiva de radicais livres que excedem a capacidade de defesa antioxidante do corpo humano como aterosclerose, cataratas e câncer (OFFORD et al., 1997).

Há várias classes de compostos fenólicos naturalmente presentes em alimentos. Entre essas, os flavonóides formam o grupo de maior importância. Entre as possíveis ações dos flavonóides no organismo humano destacam-se a inibição da proliferação de células cancerígenas e efeitos antiinflamatórios e antiateroscleróticos. Agem como seqüestrantes de ânions superóxido e outros compostos reativos, formando compostos menos reativos (CAMPOS et al., 2008).

A ingestão insuficiente de compostos bioativos constitui componente de risco para as doenças crônicas não transmissíveis. Estes compostos interferem em alvos fisiológicos específicos, modulando a defesa antioxidante, defesa frente a processos inflamatórios e mutagênicos, os quais estão relacionados a várias doenças e não há dúvida de que sejam essenciais para a manutenção da saúde (BRAVO, 1998; OLIVEIRA & BASTOS, 2011).

Assim, recomendações para o consumo de uma alimentação rica em substâncias antioxidantes, equilibrada em açúcares de alto e baixo índice glicêmico, em gorduras saturadas, mono e poliinsaturadas, e de uma crescente ingestão de frutas e verduras não parecem ser prejudiciais e podem ter benefícios tanto na redução do risco, quanto no tratamento de diversas doenças (LIMA et al., 2007).

Embora nem todos os antioxidantes estejam listados em farmacopéias, várias pesquisas são feitas sobre estes compostos para que seja comprovada a ação farmacológica dos mesmos. No momento, constituintes ativos dos antioxidantes presentes em fontes vegetais têm sido extraídos, purificados e testados quanto ao seu potencial (PELLEGRINI et al., 2000).

Com vistas a fomentar informações para a aplicação nos diversos seguimentos da indústria alimentícia e farmacêutica, o presente trabalho visa identificar e quantificar os compostos fenólicos presentes nas frutas Gabiroba, Guapeva e Murici, provenientes do bioma Cerrado brasileiro, bem como a determinação de atividades biológicas como a antioxidante, anticâncer, antiinflamatória, antimutagência, antigenotóxica foram avaliadas procurando caracterizar de forma completa estes três frutos selecionados a fim de que eles possam ser utilizados como alimento funcional, cosméticos e em indústrias farmacêuticas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ESTRESSE OXIDATIVO

O oxigênio, essencial à vida do organismo aeróbico, é imprescindível no processo de respiração celular nas mitocôndrias, pois participa como aceptor final de elétrons (TODA & SHIRATAKI, 1998). Contudo, o oxigênio é uma fonte oxidante, tornando-se impossível impedir oxidações secundárias, não envolvidas no metabolismo fisiológico e que podem ter conseqüências graves se seus produtos não forem neutralizados por um sistema antioxidante eficiente. A oxidação é um fenômeno metabólico espontâneo e inevitável para a atividade das células no corpo humano (INSERRA et al., 1997).

Embora o organismo tenha capacidade de prevenir reações indesejáveis e de reparar moléculas e tecidos danificados, estes mecanismos de defesa não são suficientemente abrangentes para prevenir e reparar os danos causados por todas as reações indesejáveis, ocorrendo então o acúmulo dos produtos destas reações, que se tornará prejudicial ao fim de certo período de tempo (INSERRA et al., 1997).

Quando há um desequilíbrio entre os fatores pró-oxidantes (como inflamação, exposição a certos agentes químicos, radiação, luz ultravioleta, álcool, fumar cigarro, ar poluído, dieta rica em gordura, entre outros) e antioxidantes (vitamina E, vitamina C, β-caroteno, glutationa peroxidase, catalase, glutationa, superóxido dismutase, ácido úrico) ocorre um processo chamado Extresse Oxidativo. Este pode conduzir a um metabolismo anormal, perda de funções fisiológicas, doenças, e inclusive, a morte (INSERRA et al., 1997; COSTA & ROSA, 2010).

Todos os organismos vivos estão expostos à ação de radicais livres, que são espécies que possuem pelo menos um elétron desemparelhado, sendo bastante instáveis e promovendo transferências eletrônicas rápidas. Conseqüentemente, um radical livre inicia o processo destrutivo ao remover elétrons de compostos estáveis gerando assim várias espécies reativas de oxigênio (ROS).

As espécies reativas de oxigênio (ERO) e de nitrogênio (ERN) são continuamente produzidas no organismo humano e, em concentrações fisiológicas, desempenham funções essenciais relacionadas com a sinalização do ciclo celular, a defesa imunológica e a biologia reprodutiva (COSTA & ROSA, 2010).

Ao mesmo tempo, os radicais livres causam danos nos compostos celulares, como lipídeos, proteínas e ácidos nucléicos resultando em degradação acelerada. Nas proteínas, a oxidação conduz à perda de função e/ou à degradação prematura nos proteossomas. A oxidação dos lipídeos presentes nas membranas celulares altera as propriedades físicas e, conseqüentemente, a função. E no DNA o processo oxidativo pode conduzir a mutações gênicas, a síntese protéica anormal, a alteração na expressão gênica, a apoptose e à morte celular (Figura 1) (PRINCEN et al., 1992; TODA & SHIRATAKI, 1998).

O acúmulo irreparável de produtos danificados parece estar relacionado a genes de mais de 100 doenças humanas, principalmente aquelas associadas ao envelhecimento, como diabetes, cardiomiopatias, câncer, doença de Alzheimer e catarata (KOLEVA et al., 2002). O aumento das ERO e das ERN predispõe ao rompimento da homeostase do tecido. Por conseguinte, instala-se o processo da doença, e os mecanismos patológicos, tais como lesões teciduais, traumatismo, toxinas, isquemia, intensificando as lesões celulares (COSTA & ROSA, 2010).

2.2 ANTIOXIDANTES

Antioxidantes são substâncias que, presentes em pequenas concentrações, em comparação ao substrato oxidável, neutralizam os radicais livres e previnem os danos causados por eles. Estas substâncias podem reduzir os danos adversos, desintegrando os oxidantes antes que estes reajam com os alvos biológicos, impedindo assim as reações em cadeia ou a ativação do oxigênio a produtos altamente reativos (AZZI & DAVIES, 2004).

Além do sistema de proteção endógeno, o consumo de compostos bioativos pela dieta é um fator protetor adicional para se manter o equilíbrio do estado redox da célula. Este complexo sistema de proteção antioxidante, endógeno e exógeno, interage entre si e atua sinergicamente para neutralizar os radicais livres (KALIORA et al., 2006).

Os antioxidantes podem desativar as moléculas de radicais livres instáveis, tendo assim um papel importante na prevenção de dano adicional (LIMA et al, 2007).

Nos últimos anos os antioxidantes têm ganhado muita importância por serem potenciais profiláticos e/ou agentes terapêuticos em muitas doenças (SPIGNO et al., 2007). A descoberta da relação entre os radicais livres com o câncer, diabetes, doenças cardiovasculares, envelhecimento, entre outras, conduziu a uma mudança médica sobre os cuidados com a saúde. Com isso, a literatura sobre antioxidantes expandiu-se tremendamente por causa da evidência que estes podem contribuir trazendo benefícios nutritivos (WU et al., 2004 a).

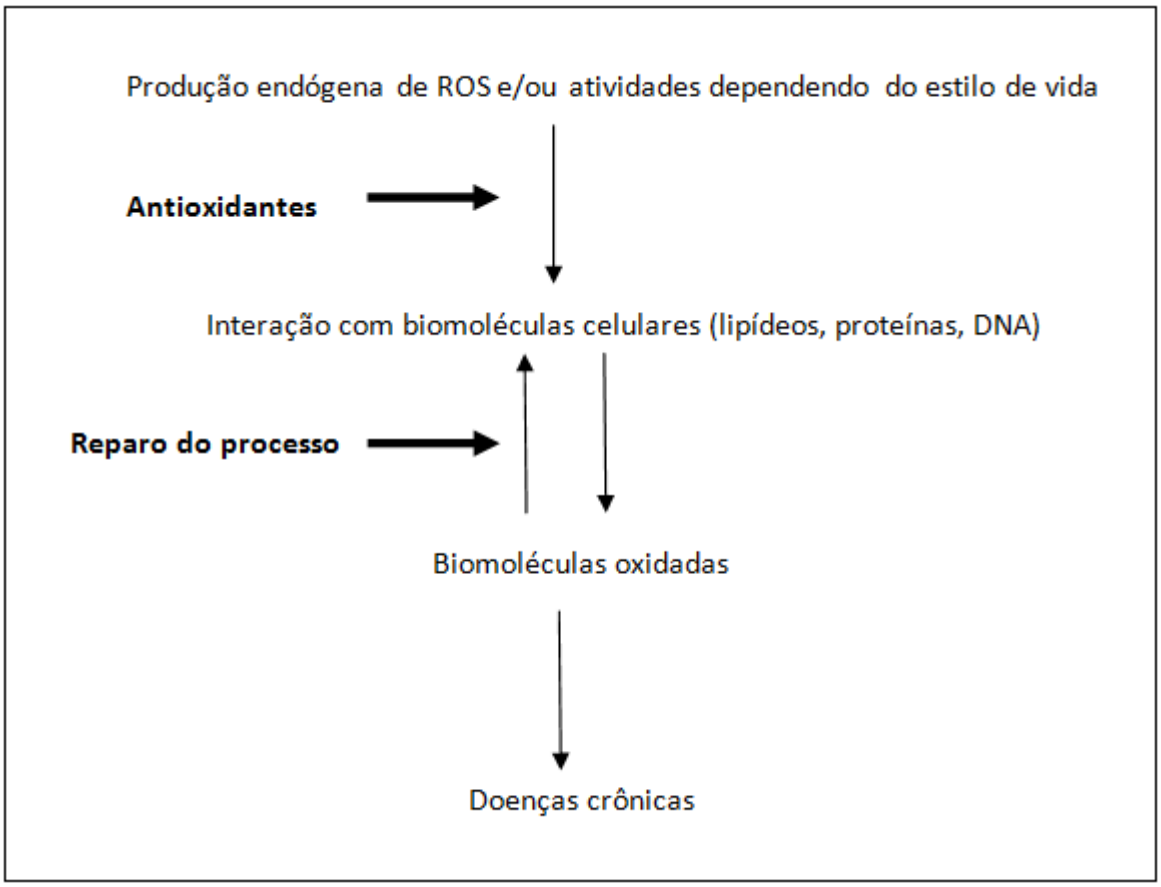

Figura 1. Ação Antioxidante (RAO & RAO, 2007)

Os antioxidantes podem ser classificados em dois grandes grupos: enzimáticos e não enzimáticos. Alguns destes antioxidantes são endogicamente produzidos como as enzimas, algumas moléculas com baixo peso molecular e cofatores. Entre os antioxidantes não enzimáticos, muitos são obtidos pela dieta (LIU, 2004). Estes podem ser classificados em várias classes, sendo que os polifenóis são os maiores constituintes deste grupo. Além dos polifenóis também estão inclusos na classe dos antioxidantes não enzimáticos, as vitaminas, carotenóides, compostos organosulfurados e minerais.

2.2.1 Antioxidantes enzimáticos

O sistema antioxidante enzimático constitui a primeira defesa endógena a agir aos ataques das espécies reativas de oxigênio, impedindo sua formação impedindo sua interação com alvos celulares, ou seja, bloqueando a etapa de iniciação da cadeia radicular (ROVER JÚNIOR et al., 2001).

Através da ação das enzimas antioxidantes, as células tentam manter baixas as quantidades do radical superóxido e de peróxido de hidrogênio, evitando assim a formação do radical hidroxila, que é extremamente reativo e deletério às células (HALLIWELL, 2000).

O sistema antioxidante enzimático é formado por diversas enzimas, entre elas, a superóxido dismutase (SOD), a catalasse (CAT) e a glutationa peroxidase (GPx) (HALLIWELL, 2000).

O equilíbrio entre a atividade destas três enzimas antioxidantes é de extrema importância para a remoção dos intermediários tóxicos de oxigênio dos sistemas biológicos.

A atividade da SOD, que consiste na dismutação de íons superóxido formando peróxido de hidrogênio, deve ser complementada pela CATE e GPx, gerando água e oxigênio molecular ou água e glutrationa oxidada (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

2.2.2 Antioxidantes não enzimáticos

O sistema de defesa antioxidante humano se torna incompleto sem os antioxidantes provindos da dieta. Os seres humanos são incapazes de sintetizar alguns

antioxidantes importantes para a defesa do organismo, como por exemplo, o ácido ascórbico, vitamina E, carotenóides e polifenóis. Logo existe a necessidade de se adquirir estes antioxidantes não enzimáticos por fontes dietéticas (RATNAM et al., 2006).

Sugeriu-se que a suplementação com antioxidantes pudesse minimizar os efeitos prejudiciais de processos oxidativos em organismos vivos. Conseqüentemente, a função de manutenção da saúde exercida pelos componentes antioxidantes presentes em vários alimentos tem recebido muita atenção (SUN et al., 2007).

Umas das principais recomendações das novas dietas é o aumento no consumo de alimentos de origem vegetal como frutas e verduras, por serem boas fontes de carotenóides e outros compostos biologicamente ativos. Os benefícios das frutas e verduras incluem efeitos por vários mecanismos como o metabolismo, modulação da resposta imune e indução hormonal (HEBER, 2004; RAO & RAO, 2007). Há indicativos de que a ingestão de frutas e verduras reduz os riscos de algumas doenças como as cardiovasculares e certas formas de cânceres. Numerosas doenças são associadas com a diminuição dos antioxidantes e aumento do estresse oxidativo (PRIOR et al., 2003; RANGKADILOK et al., 2007).

2.3 POLIFENÓIS

Várias classes de substâncias bioativas encontradas naturalmente nos alimentos atuam como antioxidantes no meio biológico, em ambos os compartimentos: hidrofílico (compostos fenólicos, vitamina C) e lipofílico (carotenóides, Vitamina E) (VELIOGLU et al., 1998; TEOW et al., 2007).

Várias moléculas que possuem estrutura de polifenol (com grupos hidroxilas nos anéis aromáticos) têm sido identificadas (BACCHIOCCA et al., 2006). Estas moléculas são metabólitos secundários de plantas e podem ser classificados em diferentes grupos como pelo número de anéis fenólicos que eles contêm e dos elementos estruturais que ligam os anéis uns aos outros. Eles podem ser classificados em ácidos fenólicos, flavonóides, estil benzenos e ligninas (MANACH et al., 2004).

Os flavonóides podem ocorrer como agliconas, glicosídeos ou como parte de outras estruturas que contenham flavonóides, como as flavolignanas, porém freqüentemente ocorrem como glicosídeos. Eles podem ser subdivididos em 13 classes, com mais de 5000 compostos descritos até 1990. As subclasses dos flavonóides são: calconas, dihidrocalconas, auronas, flavonas (apegenina, luteolina, diosmetina), flavonóis (quercetina, miracetina, kaempferol), dihidroflavonol, flavanonas (naringina, hesperidina), flavanol, flavandiol, antocianidina, isoflavonóides (genisteína, daizdeína), bioflavonóides e proantocianinas (BEHING et al., 2004).

Nos últimos anos, o mundo em geral tem dado uma atenção considerável aos polifenóis. A razão deste interesse está sobre suas propriedades antioxidantes. Diversos estudos epidemiológicos sugerem a importância do consumo elevado dos produtos secundários de plantas - distribuídos extensamente nas frutas e nas verduras – na redução a incidência de doenças degenerativas (VELIOGLU et al., 1998).

Os compostos fenólicos estão presentes na maioria das frutas e verduras e possuem um importante papel na proteção do organismo contra efeitos prejudiciais dos radicais livres e outras espécies reativas de oxigênio, protegendo desde o código genético (DNA) aos lipídios e, desta forma, podendo inibir as etapas iniciais de processos carcinogênicos (SCHLESIER et al., 2002).

A maioria dos flavonóides possui habilidade de seqüestrar os radicais livres. Alguns flavonóides podem agir como antioxidantes pela reação direta com radicais para formar produtos menos reativos. Já outros flavonóides são fortes inibidores de certas enzimas metabólicas que geram como produtos radicais livres, tais como cicloxigenase, lipoxigenase, monoamina oxidase e xantina oxidase (HIGDON & FREI, 2003; AGUILAR-GARCIA et al., 2007).

Ao lado da ação biológica dos compostos naturais como vitaminas C e E, β-caroteno e outras substâncias químicas de frutas e verduras que funcionam também como antioxidantes estão ganhando importância e com isso cresce cada vez mais o estudo destas como agentes contra a degradação oxidativa (KINSELLA et al., 1993; JADHAV et al., 1995; HASSIMOTTO et al., 2005).

Os compostos polifenólicos atuam por mecanismos variados dependendo da sua concentração e do tipo de composto presente no alimento, podendo existir sinergismo ou antagonismo entre os diferentes compostos (HASSIMOTTO et al., 2005).

2.3.1 Biodisponibilidade dos compostos fenólicos

Vários fatores alteram a biodisponibilidade de compostos bioativos presentes nos alimentos: a complexidade da matriz alimentícia, a forma química do composto de interesse, estrutura e quantidade de outros compostos ingeridos concomitantemente (fatores exógenos) e ainda o tempo de trânsito intestinal, esvaziamento gástrico, metabolismo do composto e grau de conjugação, possíveis interações com proteínas na circulação sanguínea e tecidos, composição da microflora intestinal e o perfil genético do indivíduo (fatores endógenos). Avaliados em conjunto, estes fatores respondem pelas

variações intra e inter-individuais na biodisponibilidade de uma determinada substância (OLIVEIRA & BASTOS, 2011).

A biodisponibilidade dos compostos fenólicos possui papel determinante nos possíveis efeitos biológicos a eles atribuídos. Fatores que influenciam a atividade fisiológica de tais compostos no organismo são: a estrutura do composto e a forma em que se apresenta livre (chamada aglicona) ou ligada a outros compostos (NACZK & SHAHIDI, 2004).

Nos vegetais, os compostos fenólicos estão presentes também na forma de glicosídeos. A ação de enzimas pode, no entanto, liberar as correspondentes agliconas, às quais se atribui maior capacidade antioxidante que aos glicodídeos correspondentes (RICE – EVANS et al., 1996).

A absorção dos compostos fenólicos tem sido medida de forma direta e indireta. Evidências indiretas da absorção desses compostos são observadas pelo aumento da capacidade antioxidante no plasma após o consumo de alimentos ricos em polifenóis (GERMANO et al., 2006).

Após a ingestão e o tempo necessário para a digestão de uma dose relativamente alta de um dado composto fenólico, a quantidade desse composto na circulação sanguínea é muito baixa ou quase nula. Os testes para determinação dos compostos antioxidantes no sangue ainda não são capazes de detectar com precisão todos os metabólitos formados a partir dos fenólicos ingeridos. Isso pode subestimar o potencial antioxidante do composto pesquisado (MANACH et al., 2004).

Ainda, a flora microbiana do cólon exerce um papel essencial no metabolismo dos ácidos clorogênicos e de compostos fenólicos em geral. Após a clivagem da ligação éster, os ácidos livres podem seguir por duas rotas: absorção pela mucosa intestinal e passagem para a corrente sanguínea (na forma livre ou após conjugação por enzimas da

fase II) ou podem permanecer no cólon e sofrer metabolização adicional pela microflora. A maior parte dos fenólicos ingeridos é encontrado no plasma e na urina na forma de metabólitos formados pela ação da microflora e posterior metabolização tecidual, sendo os mais abundantes os ácidos hipúrico, hidroxipúrico, *m*-cumárico, ferúlico, isoferúlico, hidroxifenilpropiônico, hidroxibenzoico e vanílico (OLIVEIRA & BASTOS, 2011).

2.4 ALIMENTOS FUNCIONAIS

Nos últimos anos vem crescendo a quantidade de evidências científicas sugerindo que vários componentes presentes nos alimentos podem reduzir o risco de doenças crônicas e melhorar a saúde humana. Essas substâncias bioativas ou funcionais podem estar presentes naturalmente no alimento ou serem adicionadas aos alimentos industrializados (MELO et al., 2004). Este é o caso dos carotenóides, ácidos graxos ômega-3, fibras e antioxidantes naturais, como antocianinas e outros polifenóis (PRINCEN et al., 1992).

O conceito de alimentos funcionais foi proposto inicialmente no Japão, em meados da década de 1980. Nos anos 90, foi cunhada a designação, em inglês, FOSHU (*foods for specified health use*, alimentos para uso específico de saúde), referindo-se aos alimentos usados como parte de uma dieta normal que demonstram benefícios fisiológicos e/ou reduzem o risco de doenças crônicas, além de suas funções básicas nutricionais (COSTA & ROSA, 2010).

Assim, os alimentos funcionais contêm alguns compostos “promotores” de saúde além dos nutrientes tradicionais e isso faz com que estes alimentos desempenhem um papel importante na saúde humana. Recentemente os efeitos benéficos de muitos

gêneros alimentícios e bebidas foram reconhecidos pelo fato das substâncias naturais originarem atividade antioxidante (SUN et al., 2007).

De acordo com Angelis (2001) são identificados fortes indícios sobre a existência de relações entre os efeitos benéficos de nutrientes essenciais ou não e as modificações nos processos celulares que desencadeiem efeitos fisiológicos protetores à saúde. Tais contatações decorreram da ênfase atribuída às pesquisas que visam compreender, cada vez mais, a relação entre dieta e saúde e a influência na ocorrência de doenças crônico-degenerativas, como câncer e doenças cardiovasculares.

Os problemas crônicos de saúde sinalizam que a dieta adequada, para o alcance de melhor qualidade de vida associdada ao estilo de vida ativo, pode ser adotada como uma alternativa segura e de baixo custo em relação aos medicamentos e outras terapias convencionais (COLLI et al., 2002).

Embora os alimentos funcionais sejam responsáveis por percentuais em torno de 5 a 7 do mercado mundial há uma preocupação crescente, por parte da população para que seja disponibilizada a comprovação dos resultados benéficos para a saúde decorrentes do consumo destes alimentos (COLLI et al., 2002).

2.5 DANOS OXIDATIVOS AO DNA

O DNA (ácido desoxirribonucléico) é o material genético de todos os seres vivos e de muitos vírus, sendo a seqüência de bases nitrogenadas a forma na qual a informação genética é armazenada (LEWIN, 2001). Por apresentar essa função fundamental, o DNA é bastante protegido, sendo a única molécula biológica que apresenta um mecanismo

próprio para prevenção e reparo de falhas em seu metabolismo (LEHNINGER et al., 1995).

Desde a origem da vida na Terra, foram selecionados organismos que têm capacidade de manter sua informação genética. Se por um lado, as mudanças ocorridas nessa informação propiciam diversidade fundamental para o processo evolutivo, por outro, colocam em risco a própria existência do organismo. Esse delicado equilíbrio entre a necessidade da mutagênese para a evolução das espécies e seus efeitos deletérios para o organismo, tem sido central na manutenção da vida em nosso planeta. Os processos precisos de replicação do DNA e os que removem lesões no material genético (conhecidos como processos de reparo de DNA) constituem os principais mecanismos celulares que garantem a estabilidade gênica (RIBEIRO & MARQUES, 2003).

De fato, o DNA não é uma molécula estável, pois é constantemente agredida por fatores físicos, como luz ultravioleta e radiação gama, ou químicos, incluindo produtos do próprio metabolismo celular, como os radicais de oxigênio provenientes da respiração (RIBEIRO et al., 2003).

Os principais alvos de ROS incluem DNA, lipídeos, proteínas e açúcares, sendo que a ordem de preferência de ataque depende de muitos fatores, como o local onde a espécie reativa é gerada, a habilidade relativa de uma biomolécula ser oxidada e a disponibilidade de íons metálicos associados a essa biomolécula. No entanto, enquanto lipídeos, proteínas e açúcares podem ser removidos via degradação, o mesmo não deve ocorrer com o DNA (BERRA & MENCK, 2006). Os danos mais graves são aqueles causados ao DNA e RNA. Se a cadeia do DNA é quebrada, pode ser reconectada em outra posição alterando a ordem de suas bases (FREITAS et al., 2007).

Todas as células têm vários sistemas que renovam lesões no DNA ou, simplesmente, auxiliam as células a tolerá-las (POWELL & BINDRA, 2009). Os sistemas

de reparo de DNA constituem mecanismos de defesa extremamente eficientes que garantem a estabilidade do genoma e, consequentemente, a próxima existência da célula e/ou organismo. Esses sistemas eventualmente falham e algumas lesões podem alterar o código genético de modo permanente, causando mutações (AGNEZ- LIMA et al., 2003). No caso dos seres humanos, as lesões podem ser diretamente responsáveis por processos degenerativos, como o envelhecimento e o câncer (RIBEIRO et al., 2003).

O estudo de danos ao DNA induzido por substâncias de origem natural ou sintética ou até mesmo pela atividade física é uma área essencial da toxicologia genética uma vez que mutação em cromossomos é um evento importante na carcinogênese (FENECH, 2005).

2.5.1 Genotoxicidade

A genotoxicidade é o setor da genética que estuda os processos que alteram a base genética da vida, quando se trata da estrutura físico-química no DNA, o processo é classificado de mutagênese ou carcinogênese e ao se referir à alteração genética celular e / ou orgânico, denomina-se teratogênese (FAGUNDES et al., 2005).

A genotoxicidade é produzida por algum agente que, em virtude de suas propriedades físicas ou químicas, pode induzir ou produzir mudanças hereditárias naquelas peças dos instrumentos genéticos que exerciam o controle homeostático sobre células somáticas, determinando desse modo sua transformação maligna (ASHBY, 1995).

Substâncias genotóxicas têm em comum propriedades químicas e físicas que permitem suas interações com os ácidos nucléicos. Devido à sua alta reatividade, podem levar a defeitos hereditários através de mutações em células germinativas, e quando a

mutação ocorre em células somáticas, a conseqüência mais comum é a formação de tumores benignos ou malignos. Além disso, recentemente, foi proposto que as mutações em células somáticas podem também estar envolvidas na patogênese de algumas doenças crônicas degenerativas tais como as cardiovasculares e as neurodegenerativas, em adição ao processo de carcinogênese (VARANDA, 2006).

O dano ao DNA é um evento fundamental no processo da carcinogênese e mutagênese. A compreensão dos mecanismos de reparo de DNA pode auxiliar a entender como agentes genotóxicos podem se tornar mutagênicos, e como podemos indentificá-los, de modo a reduzir os riscos associados a eles (MACIEL et al., 2002).

2.5.2 Mutação

Embora de origens e causas ainda não muito esclarecidas, as neoplasias surgem devido a mutações genéticas, espontâneas ou induzidas por agentes como metais, radiações, radicais livres do oxigênio, inflamações crônicas e xenobióticos (cigarro, álcool, pesticidas, etc), dentre outros. Essas mutações que promovem desordens no ciclo celular, ocorrendo excesso nas taxas de proliferação e deficiência nas taxas de morte celular, culminando com a formação de agrupamentos de clones de células neoplásicas, os tumores (BALMAIN & HARRIS, 2000; FERRARI & TORRES, 2002).

A mutação é uma conseqüência do dano no DNA e este pode ser o estágio inicial no processo pelo qual a maioria dos carcinógenos químicos inicia a formação do tumor (RIBEIRO & MARQUES, 2003).

Segundo Gardner (1977), mutação é o processo pelo qual um gene sofre mudança estrutural. Dá-se o mesmo nome ao gene modificado por este processo. Mais amiúde, porém, a palavra mutação indica mudança fenotípica resultante de um gene mutado. O termo mutante é usado para designar um indivíduo que expressa a alteração do genótipo resultante de mutação.

No decorrer da vida, o DNA sofre alterações, que podem ser causadas por erros durante a sua duplicação, na divisão celular. O aparecimento de mutações ocorre em todos os seres vivos, sendo um processo fundamental para a evolução e diversidade das espécies. Muitas das mutações não implicam mudanças detectáveis na atividade metabólica da célula ou do organismo e, portanto, passam despercebidas. Outras mutações podem determinar a morte celular e, por conseqüência, não são, também, detectáveis. Assim, apenas um pequeno número de mutações que ocorrem em genes específicos pode determinar vantagens ou um crescimento desordenado das células (GARDNER, 1977; RIBEIRO & MARQUES, 2003).

As mutações despertam grandes interesses por estarem diretamente relacionadas ao desenvolvimento de diversas doenças degenerativas tais como câncer e arteriosclerose (DE FLORA, 1998; SEO, et al., 2000). A conversão de células normais em células neoplásicas normalmente envolve vários passos. Uma das fases iniciais desse processo envolve a ação de um carcinógeno genotóxico (WEISBURGER, 2000). Entretanto, uma única mutação não é suficiente para converter uma célula sadia típica numa célula cancerosa (LOPACZYNSKI & ZEISEL, 2001; ALBERTS et al., 2002)

Os chamados agentes mutagênicos que vão alterar a sequência das bases no DNA podem acelerar ou aumentar o aparecimento de mutações que estão associadas ao desenvolvimento de neoplasias. Após passar por várias divisões, uma célula poderá

acumular mutações que, se em número elevado, poderão determinar a perda do controle de sua divisão, determinando, assim, o aparecimento do câncer (GARDNER, 1977).

Muitas evidências indicam que as mutações de ponto causam doenças genéticas humanas. Mutações em células somáticas e/ou células germinativas estão envolvidas em casos de câncer e doenças hereditárias e outras moléstias, como a anemia, e em distúrbios cardiovasculares, neurocomportamentais e de desenvolvimento, além de interferirem no processo de envelhecimento (MARON & AMES, 1983).

Há uma clara relação entre mutagênese, teratogênese e carcinogênese. Uma mudança no material genético (mutação) pode ocasionar mudanças morfológicas sérias, portanto, tornando-se teratogênica (surpreendente ou monstruoso); e a mutação pode também ser o evento desencadeador do processo que leva ao câncer, portanto, tornando-se carcinogênica (CASTRO et al.; 2004; VILAR et al., 2008).

A pesquisa por agentes que possam reduzir a freqüência de alterações no DNA tem se mostrado promissora e com importantes implicações nas práticas terapêuticas devido à possibilidade da redução da taxa de mutação e consequente redução na incidência de câncer. Qualquer substância capaz de reduzir a frequência de mutações espontâneas ou induzidas, independentemente do mecanismo de ação, é considerada antimutagênica (WATERS et al., 1990; ANDERSON et al., 1995).

Os estudos com os agentes antimutagênicos foram iniciados nos anos cinquenta, porém recentemente é que o interesse de diversos grupos de pesquisa, distribuídos por todo o mundo, têm se concentrado na identificação de agentes antimutagênicos, principalmente os de origem natural. A identificação de agentes antimutagênicos e/ou anticarcinogênicos em alimentos é indispensável e extremamente importante na busca de estratégias para a prevenção do câncer, por meio de modificações do hábito alimentar (ANTUNES & ARAÚJO, 2000; COSTA et al., 2008).

A atividade antimutagênica tem sido demonstrada em frutas e verduras. Várias substâncias obtidas a partir de fontes naturais têm sido isoladas, identificadas e alguns dos mecanismos de sua atividade estão sendo esclarecidos. A clorofila e derivados, glutationa, vitamina C, vitamina E, vitamina A, flavonóides, ácidos graxos, fibras dietéticas são algumas das substâncias antimutagênicas conhecidas e encontradas na dieta. Estudos epidemiológicos corroboram com estes dados citados anteriormente, uma vez que há um grande volume de evidências associadas a dados obtidos a partir de estudos *in vitro* e *in vivo,* que apontam para a estreita relação entre constituintes da dieta e o risco de desenvolvimento de determinados tipos de câncer. De modo geral, verduras, frutas, fibras e alguns micronutrientes diminuem a incidência de câncer; enquanto gorduras, excesso de calorias e consumo de álcool aumentam o risco de desenvolvimento de patologias (NISHINA & SCHNEEMAN, 1991).

A atividade biológica dos compostos bioativos denominados antioxidantes ocorre por mecanismos diversos, sendo que a inibição da peroxidação de lipídios e a proteção contra a mutagenicidade foram os primeiros aspectos explorados (SHI et al., 2001).

A identificação de agentes antimutagênicos e/ou anticarcinogênicos em alimentos é indispensável e extremamente importante na busca de estratégias para a prevenção do câncer, por meio de modificações do hábito alimentar. Se, por um lado, encontramos na dieta uma mistura complexa de compostos que apresentam atividade mutagênica e/ou carcinogênica, por outro, a dieta também pode incluir compostos que impedem ou inibem a ocorrência destes processos. Após a observação inicial de efeitos antimutagênicos de certas verduras, vários compostos têm sido isolados de plantas e testados quanto à ação protetora sobre lesões induzidas no DNA (ANTUNES & ARAÚJO, 2000).

O potencial antimutagênico de uma substância pode ser avaliado em sistemas biológicos diversos, os mesmos empregados para o estudo e identificação dos agentes

mutagênicos. Os sistemas celulares de mamíferos, utilizados para a avaliação da mutagenicidade e/ou antimutagenicidade, abrangem os testes *in vitro* e *in vivo*. Nos testes *in vivo* são utilizados freqüentemente ratos e camundongos. Nos testes *in vitro* são usadas diferentes linhagens celulares, inclusive células humanas (ANTUNES & ARAÚJO, 2000).

Em qualquer um desses sistemas-teste, o tratamento com os agentes mutagênicos, que induzem as mutações, e com o antimutagênico, que poderá inibir o aparecimento de lesões no DNA, pode ocorrer simultaneamente ou em momentos diferentes, por meio de pré ou pós-tratamento. Os agentes antimutagênicos usados em pré-tratamento ou tratamento simultâneo podem atuar como agentes desmutagênicos. A efetividade do agente antimutagênico no pós-tratamento sugere que ele esteja atuando pelo mecanismo de bio-antimutagênese e relacionado ao processo de reparo das mutações (ANTUNES & ARAÚJO, 2000).

Há muitos anos se sabe que a maioria dos agentes mutagênicos mais potentes, tais como radiações ionizantes, a luz ultravioleta e produtos químicos são também carcinogênicos.

A mutagenicidade é um prognóstico razoável para a carcinogenicidade. Após passar por várias divisões, uma célula poderá acumular mutações que, se em número elevado, poderão determinar a perda do controle de sua divisão, causando, assim, o aparecimento do câncer (ANDERSON et al., 1995).

2.5.3 Carcinogênese

A correlação entre mutagenicidade e carcinogenicidade se apoia em teorias de que o câncer é causado por mutações somáticas. Então, infinitos tipos de substâncias podem interagir com o genoma do homem e de outros animais, levando a mutações. Neste contexto, investigações estão sendo centradas em estudos de mutagenicidade e/ou antimutagenicidade, como preditivos da carcinogênese e/ou de anticarcinogênese, com grande ênfase na área de alimentos (MCGREGOR et al., 1987).

Carcinogênese é um termo genérico que compreende os vários mecanismos que participam do desenvolvimento de neoplasias malignas. Ela pode ocorrer de forma espontânea ou ser induzida por agentes físicos, químicos, biológicos ou genéticos (PITOT & DRAGAN, 1991).

A carcinogênese é um processo de múltiplos estágios, no qual ocorre a transformação seqüencial de células normais para malignas via algumas populações de células intermediárias. A formação e o desenvolvimento destas populações intermediárias de células resultam de etapas de iniciação, promoção e progressão (Figura 2) (PITOT & DRAGAN, 1991; COSTA & ROSA, 2010). Freqüentemente, após a alteração inicial, aparecem novas populações celulares que representam a evolução de células normais para células pré-neoplásicas, pré-malignas e malignas (LOUREIRO et al., 2002).

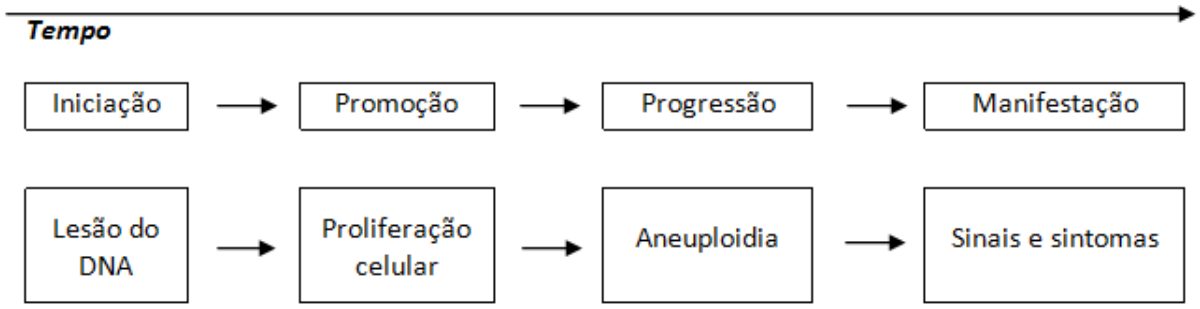

Figura 2. Modelo de múltiplas etapas do processo carcinogênico (PITOT, 1993)

A iniciação é causada por uma alteração irreversível do DNA, como a reação dessa molécula com substâncias carcinogênicas. Assim, mecanismos de detoxificação de carcinógenos, reparo do DNA e eliminação das células que tenham DNA modificado (por apoptose, por exemplo) são importantes para a proteção contra a iniciação do câncer. Para que a iniciação ocorra, é necessário que haja não só a modificação do DNA, mas também a sua replicação e a proliferação celular, de modo que a mutação inicial possa se fixar (FURTADO et al., 2008).

A iniciação é seguida pela promoção, a qual envolve a seleção e expansão das células iniciadas, podendo levar ao desenvolvimento de um tumor benigno. Durante a promoção do tumor, o material genético alterado da célula iniciada altera a expressão dos genes que regulam a diferenciação e o crescimento celular (HEDDLE, 1973; HAYSTSU et al.; 1988). Quando administrados em altas doses, muitos carcinógenos são tanto iniciadores como promotores. Entretanto, uma dose baixa não indutora de tumor se torna efetiva se administrada juntamente com certas substâncias não carcinogênicas conhecidas como promotoras de tumor (LOUREIRO et al., 2002).

Finalmente, o estágio da progressão é caracterizado por instabilidade genômica e contínua evolução para formação neoplásica. As alterações na estrutura do gene da

célula neoplásica durante a progressão estão diretamente relacionadas ao aumento da velocidade de crescimento celular, à capacidade de invasão, ao crescimento autônomo e às alterações bioquímicas nas células malignas. Estas alterações, como reflexo da instabilidade genômica, continuam a evoluir (progredir) durante o estágio de progressão (PITOT & DRAGAN, 1991).

A quimioproteção contra o câncer pode resultar da ação de uma substância que possa bloquear o início do processo neoplásico, deter ou reverter a progressão das células iniciadas para fenótipos malignos. A quimioproteção pode ocorrer por diferentes mecanismos que incluem redução da intoxicação por metabólitos carcinogênicos e/ou aumento da desintoxicação (CHEN &KONG, 2004).

Uma nutrição adequada e apropriada é indispensável para a manutenção da saúde. Contribui tanto para a diminuição de riscos de doenças como também para a restauração da homeostasia em casos de enfermidades. Por meio da alimentação é possível promover a recuperação, reabilitação, desintoxicação e reparo de células, proporcionando maior vitalidade a órgãos e tecidos. A alimentação pode modificar o processo de carcinogênese, principalmente nos estágios iniciais, proporcionando melhores resultados no tratamento e diagnóstico clínico (AMES, 2001). Dessa forma, através de um padrão nutricional normal ou equilibrado pode-se reduzir o risco de câncer (MORI, 2002).

Diversos estudos têm comprovado, sem dúvida alguma, que existe uma forte associação inversa (ou negativa) entre o consumo de frutas e verduras e o risco de diversos tipos de cânceres e outras causas de morbi-mortalidade. Assim, o homem há várias décadas vem isolando compostos presentes em alimentos de origem vegetal para testá-los como possíveis agentes anticarcinogênicos (FERRARI & TORRES, 2002).

As células cancerígenas absorvem antioxidantes de maneira diversa das células normais. Células sadias e normais consomem apenas a quantidade necessária de antioxidantes e nutrientes de apoio. Esse é o fato científico de grande importância quando se trata dos princípios da nutrição celular (WELCH et al., 2002).

Células cancerígenas, por outro lado, continuam a absorver antioxidantes e nutrientes de apoio sem saber quando parar. Essa ingestão excessiva de antioxidantes as torna, na verdade, mais vulneráveis a morte (COLLINS, 2005). Os antioxidantes não somente ajudam na batalha contra as células cancerígenas como contribuem para a defesa das células saudáveis frente aos efeitos nocivos da radiação e da quimioterapia (WELCH et al., 2002).

Não somente os antioxidantes podem otimizar o sistema natural de defesa antioxidante do corpo, como pode fortalecer nosso sistema imunológico e controlar a resposta inflamatória. Eles podem ajudar a restaurar o controle sobre o estresse oxidativo e evitar esse ciclo vicioso. A suplementação de antioxidantes seria, portanto, ideal para pacientes que sofrem de doenças auto-imunes (BIANCHI & ANTUNES, 1999; SINGH et al., 2009).

Embora ainda seja necessário acumular conhecimentos, observações recentes sugerem que os mecanismos, pelos quais os quimiopreventivos alimentares exercem seu efeito são complexos, podendo algumas substâncias apresentar efeitos benéficos em determinadas doses ou em determinados tecidos ou estágios da carcinogênese ou efeitos maléficos em outras condições (COSTA & ROSA, 2010).

2.6 ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA

A resposta inflamatória é um mecanismo que provoca alterações do sistema vascular, componentes líquidos e celulares, visando destruir, diluir ou isolar o agente lesivo, sendo assim uma reação de defesa e de reparação do dano tecidual. Sem o sistema de reparo, as infecções prosseguiriam desimpedidas, as feridas jamais cicatrizariam, não haveria cura e reparo das lesões, e os órgãos danificados poderiam tornar-se lesões ulceradas permanentes. Contudo, a resposta inflamatória pode também ser potencialmente lesiva como a que ocorre na asma, na doença pulmonar obstrutiva crônica, entre outras (MADDOX & SCHWARTZ, 2002). A resposta inflamatória é o resultado de uma complexa corrente de eventos envolvendo a resposta imunológica, que libera quantidades enormes de radicais livres, enzimas cáusticas e citocinas inflamatórias (BIANCHI &ANTUNES, 1999; CASTARDO et al., 2008).

O edema tecidual comprime as terminações nervosas causando edema e dor, os tecidos afetados perdem suas funções normais. Em decorrência do aumento da permeabilidade vascular, a velocidade da circulação diminui (estase sanguínea) contribuindo para a marginação dos leucócitos, como pode ser visualizado na Figura 3 (SIEGGELMAN et al., 2000).

A evolução do edema passa por várias etapas, entre elas, estão os fenômenos básicos do agente inflamatório que envolve a mediação química de fármacos e que poderá ocorrer em qualquer inflamação sendo ela aguda ou crônica (CARVALHO et al.,1999; CONE, 2001).

A inflamação crônica é associada com uma alta incidência de câncer. O processo inflamatório é geralmente acompanhado de estresse oxidativo, responsável por gerar mutações progressivas levando ao desenvolvimento tumoral (VECHIA et al., 2009).

De maneira geral, uma substância para ser classificada como antiinflamatória deve ser capaz de inverter as manifestações clínicas decorrentes da resposta inflamatória, ou seja, a dor, o rubor, calor e o tumor. Entretanto, o termo antiinflamatório é amplo e pode ser aplicado a drogas ou a substâncias que inibem um dos eventos inflamatórios induzidos experimentalmente (SINGLA et al., 2000).

Pode-se afirmar que ainda não dispomos do fármaco antiinflamatório ideal, com efeitos indesejáveis mínimos e que seja realmente eficaz nos transtornos inflamatórios. Por outro lado, devido ao melhor conhecimento que se vai adquirindo da fisiopatologia dos processos inflamatórios, tem-se sugerido diversos níveis de atuação ou estratégia na busca de novos fármacos antiinflamatórios, dirigidos ao controle de mecanismos específicos relevantes na resposta inflamatória (LYSS et al., 1997).

Existem numerosos agentes, obtidos de fontes naturais, de grande diversidade química, que envolvem diferentes tipos de princípios ativos. Entre eles se encontram triterpenos, esteroides, lactonas sesquiterpênicas, flavonóides, cumarinas e alcalóides que tem demonstrado atividade antiinflamatória em vários modelos de inflamação, atuando sobre distintos mediadores deste processo (ROMAY et al., 1998).

Os suplementos antioxidantes melhoram o sistema imunológico, ajudam a controlar a resposta inflamatória e fortalecem a defesa antioxidante, que por sua vez, protege as células normais do ataque da inflamação (WELCH et al., 2002; LEY, 2002; MIRANDA-VILELA et al., 2008).

No século 19 percebeu-se que o câncer está ligado ao processo inflamatório. Esta idéia da conexão câncer-inflamação promove diversas linhas de pesquisa. Estudos epidemiológicos revelaram que a inflamação crônica predispõe a diferentes formas de câncer. O uso de agentes antiinflamatórios não-esteroidal está associado com a proteção contra vários tumores (COLOTTA et al., 2009).

A atividade antioxidante, assim como a atividade antiinflamatória, também está relacionada às atividades antitumoral e quimiopreventiva, pois, como apresentado anteriormente, o estresse oxidativo, ou seja, a produção de radicais livres pode causar dano ao DNA provocando, assim, mutações que podem ser permanentes e, muitas vezes, levar à malignidade (VECHIA et al., 2009).

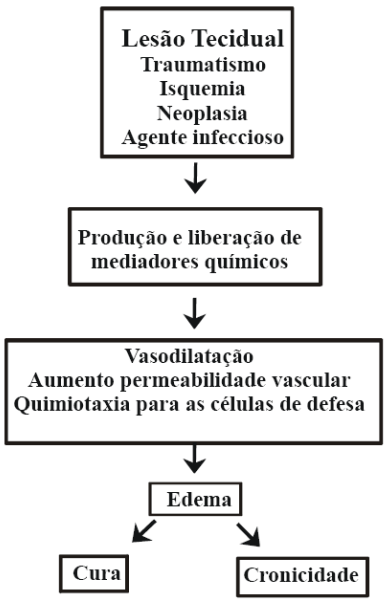

Figura 3. Formação do processo inflamatório (Rubin & Farber, 2002 - modificado)

2.7 USO DE PLANTAS MEDICINAIS E SAÚDE

No Brasil, existe uma flora bastante diversificada em toda a sua extensão, com vegetações de diferentes características e cujos princípios ativos são desconhecidos. No Brasil, há cerca de 100.000 espécies vegetais catalogadas, mas somente 8% foram estudadas quanto a sua química, e estima-se que apenas 1.100 espécies tenham sido avaliadas quanto às suas propriedades terapêuticas. O Brasil gasta cerca de dois a três

bilhões de dólares por ano na importação de matérias– primas utilizadas no preparo de medicamentos. O panorama, nessa área, mostra que 84% dos fármacos consumidos no Brasil são importados e que 78 a 80% da produção é feita por empresas multinacionais, índice que justifica a busca de alternativas para superar a dependência externa por parte da indústria químico-farmacêutica brasileira (VARANDA, 2006).

A biodiversidade brasileira é considerada uma fonte de substâncias biologicamente ativas e sua preservação é fundamental tanto pelo valor intrínseco dessa imensa riqueza biológica como pelo seu enorme potencial como fonte de novos fármacos, a qual vem despertando a cobiça de laboratórios de pesquisa das empresas farmacêuticas. Diante desta realidade, várias pesquisas de bioprospecção dos nossos biomas vêm sendo incrementadas objetivando a busca racional de bioprodutos de valor agregado (BARREIRO, 2009).

O homem moderno está exposto no seu dia-a-dia a inumerável quantidade de substâncias químicas sintéticas ou de origem natural. Não há dúvidas de que muitos destes compostos são essenciais para o conforto e a segurança do ser humano, como por exemplo, os medicamentos, os corantes, conservantes, cosméticos, inseticidas, desinfetantes e muitos outros. Por outro lado, muitos destes produtos podem causar grandes transtornos à sociedade como poluentes do ar, água e solo. Além disso, cresce o número de evidências acerca da associação entre a exposição a determinados agentes químicos e uma série de doenças e alterações metabólicas prejudiciais à saúde humana. O entusiasmo em relação ao estudo de plantas medicinais e seus extratos vêm crescendo na assistência à saúde em função de sua fácil aceitabilidade, disponibilidade e baixo custo. Grande parte da população mundial utiliza a medicina popular para seus cuidados primários em relação à saúde, e se presume que a maior parte dessa terapia tradicional envolve o uso de extratos de plantas ou seus princípios ativos (VARANDA, 2006).

Compostos com atividades biológicas continuam sendo reconhecidos, entretanto, muitos deles ainda não podem ser utilizados na terapêutica devido às suas propriedades tóxicas, carcinogênicas e mutagênicas. Na produção de uma nova droga, os resultados de testes de genotoxicidade representam considerável peso, pois, a maioria das indústrias farmacêuticas delibera o processamento de um novo agente terapêutico com base nos resultados de testes de genotoxicidade *in vitro* e *in vivo*. Nesse contexto, os ensaios para avaliação da atividade mutagênica das plantas usadas pela população bem como suas substâncias isoladas, são necessários e importantes para estabelecer medidas de controle no uso indiscriminado. Além disso, é preciso esclarecer os mecanismos e as condições que mediaram o efeito biológico, antes que as plantas sejam consideradas como agentes terapêuticos (VARANDA, 2006).

O uso das plantas medicinais vem sendo aceito e utilizado por vários profissionais por apresentarem propriedades químicas que ajudam no tratamento das doenças inflamatórias (MARTINS et al., 2000).

Das várias aplicações terapêuticas de verduras, muitos apresentam atividade antiinflamatória e analgésica, sendo largamente utilizados na medicina popular e por isso, há necessidade de pesquisas e estudos para comprovar tanto essas atividades, quanto um possível efeito tóxico, em ensaios biológicos.

Muitas substâncias fitoterápicas têm sido analisadas e testadas como possíveis substâncias antitumorais e anticancerígenas (RODRIGUES et al., 2003).

A ingestão de alimentos é uma das principais vias de exposição do homem a diferentes compostos, visto que uma mistura complexa de agentes químicos é encontrada na dieta. Algumas substâncias presentes nos alimentos podem ter efeitos mutagênicos, carcinogênicos ou antimutagênicos; isto é, podem induzir mutações no ácido desoxirribonucléico (DNA) e/ ou podem favorecer o desenvolvimento de tumores,

enquanto outras podem atenuar ou anular estes efeitos. Muitos compostos presentes nos alimentos, tanto naturalmente como adicionados ou produzidos durante o processamento, já foram testados quanto à mutagenicidade ou antimutagenicidade em diferentes sistemas experimentais (ANTUNES & ARAÚJO, 2000).

Vários compostos nutritivos e não nutritivos estão sendo avaliados em ensaios de intervenção quanto ao seu potencial como agentes quimiopreventivos. A despeito dos amplos conhecimentos atuais sobre os processos da carcinogênese, pouco se conhece a respeito dos mecanismos de ação da maioria dos agentes quimiopreventivos. Muitos agentes antimutagênicos e anticarcinogênicos têm mostrado também efeitos mutagênicos e carcinogênicos, dependendo da concentração utilizada nos ensaios, do sistema testado e da via fisiológica investigada (COSTA & ROSA, 2010).

A investigação de agentes anticancerígenos derivados de produtos naturais é uma importante ferramenta de pesquisa para obtenção de novos fármacos, para o estudo de funções celulares, função imune, carcinogênese, novos alvos de ação farmacológica, tais como moléculas fundamentais na mitose celular ou proteínas implicadas na replicação do DNA (LIU, 1989).

2.8 CERRADO

O Brasil, com 8.511.965 Km^2 é o quinto maior território do planeta, e apresenta uma grande diversidade de clima, fisiografia, de solo, de vegetação e de fauna. Representando cerca de 20% dessa área, o domínio do Cerrado, contabilizando-se as áreas periféricas que se encontram encravadas em outros domínios e áreas de transição (COUTINHO, 2002; GOMES et al., 2004).

A região do Cerrado abrange uma área de 204 milhões de hectares, distribuídos principalmente nos Estados de Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Tocantins, Bahia, Piauí, Maranhão e Distrito Federal, correspondendo a aproximadamente 22% do território brasileiro (GOEDERT, 1989; RIBEIRO & WALTER, 1998). O Cerrado é o segundo maior bioma da América do Sul, perdendo em tamanho somente para a Floresta Amazônica (PEREIRA-SILVA et al.; 2004; ROESLER et al., 2007).

O solo do Cerrado apresenta, em condições naturais, baixa fertilidade, acidez elevada e altos teores de alumínio, necessitando de aplicações de corretivos como calcário e fertilizantes para atingirem produtividades satisfatórias (SILVA et al., 2001). Devido à sua extensão e situação geográfica, essa região apresenta grandes variações de solo, clima, fauna e flora. O clima é sazonal, com uma estação chuvosa- cuja precipitação média anual varia de 1200 a 1800 mm- e uma estação seca que acontece por 5 a 6 meses por ano (SILVA et al., 1994).

O Cerrado apresenta cerca de 2000 espécies arbustivas-arbóreas e cerca de 5000 espécies herbáceo-subarbustivas compondo sua flora (BORGES & SHEPHERD, 2005), sendo considerado um *Hotspot* de biodiversidade (MYERES et al., 2000), o que é definido como uma área que contém, como endêmicas, pelo menos 0,5% das 300 mil espécies vegetais conhecidas no planeta. Mas não é apenas em termos de biodiversidade vegetal que o Cerrado tem sua importância. Existem cerca de 120 espécies de répteis, 160 espécies de mamíferos, 800 espécies de aves e 150 espécies de anfíbios que são nativos desta região (MOFFAT, 2002).

Como podemos verificar o Cerrado não é apenas uma região de solo pobre e espécies vegetais de aspecto estranho que sofrem com a seca. Muito pelo contrário, esse domínio tem se mostrado de grande importância em termos de biodiversidade e com aspectos ecológicos muito peculiares. Porém, esse domínio vem sendo devastado

rapidamente, sem que antes possamos ter o devido conhecimento de suas características ecológicas, botânicas ou fitoquímicas (GOMES et al., 2004).

Devido ao processo acelerado de ocupação agrícola do Cerrado e à exploração extrativista e predatória, tem-se observado quedas anuais significativas nas safras desses produtos, tornando imprescindível que seu cultivo seja iniciado (SILVA et al., 2001). Nos últimos 30 anos, a progressiva mecanização da lavoura e a facilidade de limpar e adubar a terra tem contribuindo para uma devastação acelerada de vegetação nativa e estima-se que cerca de 40% do bioma já tenha sido desmatado (ROESLER et al., 2007).

Nos últimos 35 anos mais de metade da extensão original do Cerrado foi substituída por plantações de soja e por pastos para a criação de gado de corte. Um relatório técnico da Conservação Internacional – Brasil demonstra que os desmatamentos anuais das áreas de Cerrado chegam a 1,1%, o que representa uma perda de 2,2 milhões de hectares ao ano. Se esse ritmo for mantido, ainda de acordo com esse relatório, que se baseou em dados obtidos por satélite, o Bioma Cerrado terá sido eliminado por volta do ano 2030. Essa intensa destruição do Cerrado é resultado do aumento na freqüência e na intensidade das atividades antrópicas, como a exploração madeireira, a pecuária, o uso indiscriminado do fogo e da expansão de culturas como a de cana-de-açúcar e de frutos cítricos (PEREIRA-SILVA et al., 2004).

Apesar da iniciativa de proteção ambiental, a exploração dos recursos naturais não se dá de forma racional e sustentável. Devido ao crescimento econômico, esta exploração privilegia o lucro em detrimento da preservação, contribuindo para a devastação acelerada e mudanças da paisagem e coberturas vegetais, antes mesmo que a comunidade científica promova o conhecimento necessário para a proteção e conservação da biodiversidade. Vários pesquisadores estimaram que, até o ano de 1992,

aproximadamente 50% do bioma cerrado já perdeu sua cobertura natural e que, provavelmente, mais de 40% do restante estão comprometidos (MARTINS, 2006).

O nível de conhecimento sobre técnicas de plantio de frutas nativas do Cerrado ainda é incipiente, pois essas plantas encontram-se ainda em estado selvagem, apresentando grande variabilidade genética (SILVA et al., 1987).

Os frutos nativos do Cerrado – base de sustentação da vida silvestre e fonte de alimento para as populações rurais – possuem enorme valor nutritivo. A comercialização das frutas nativas do Cerrado é realizada às margens das rodovias, em alguns mercados e em feiras da região, com grande aceitação popular. Além de consumidas in natura, essas frutas podem ser transformadas em sucos, sorvetes, licores, pães e bolos (ALMEIDA, 1998).

Muitas espécies nativas do cerrado possuem características peculiares, formas variadas, cores atrativas e sabores característicos; e constituem importantes fontes em potencial de exploração econômica, tais como Murici, Guapeva, Gabiroba, Cajuzinho do Cerrado, Araticum, Cagaita, Mangaba, Lobeira, Baru, Jatobá e outros (MARTINS, 2006).

2.8.1 Frutos do Cerrado

2.8.1.1 Gabiroba

A Gabiroba também é conhecida por Guavira ou Gabiroba do campo. Seu nome científico é *Compomanesia cambessedeana* O. Berg. Ela pertence à família Myrtaceae (GOMES, 1977; SILVA et al., 2001). A família inclui cerca de 130 gêneros e 4000 espécies com distribuição predominantemente pantropical e subtropical, concentrada na região neotropical e Austrália. Myrtaceae representa uma das maiores famílias da fl ora

brasileira, com 23 gêneros e aproximadamente 1000 espécies (CASTRO & LORENZZI, 2005).

A árvore da Gabiroba pode atingir até 15 m de altura, tronco ereto com casca levemente sulcada e copa densa. As folhas são verde-claras, que exalam aroma característico quando maceradas. Flores pequenas de coloração creme-esbranquiçada. Florescem de setembro a novembro (ALMEIDA et al.,1998).

Os frutos possuem de 1 a 3 cm de comprimento por 2 a 3 cm de diâmetro, com peso de 1 a 3 gramas. Os frutos são arredondados de coloração verde- amarelada. A polpa é esverdeada, suculenta, envolvendo numerosas sementes (Figura 4). Frutifica de dezembro a maio. O cultivo ocorre de forma nativa nas regiões de mata. Multiplica-se por sementes, preferindo climas quentes, porem com poucas chuvas (MARTINS, 2006).

Existem no Brasil, no entanto, muitas espécies e variedades de frutas que levam esse mesmo nome de origem indígena. Algumas se desenvolvem em formações arbustivas; outras têm o porte de grandes árvores e chegam a alcançar entre 8 e 25 metros de altura (GOMES, 1977).

A gabiroba ocorre no cerrado, cerradão, campo sujo (Silva et al., 2001) e mata ciliar (DURIGAN e NOQUEIRA, 1990; MARINHO et al., 2002). É uma planta de ampla distribuição, podendo ser encontrada nos estados de São Paulo, Tocantins, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás, Distrito Federal, Bahia, parte austral de Minas Gerais até a Santa Catarina, chegando às regiões adjacentes da Argentina, do Paraguai (LEGRAND e KLEIN, 1977) e do Paraná.

A polpa é consumida in natura e em forma de sucos e geléias (GOMES, 1977). Os frutos são utilizados também como matériaprima para a fabricação de licor e vinho. Planta considerada medicinal possui propriedades antidiarréicas, sendo suas cascas e suas

folhas usadas sob a forma de chás (FERREIRA, 1972). Além disso, a planta é melífera, sendo importante para o pasto apícola.

Figura 4. Gabiroba (MOREIRA, 2011)

2.8.1.2 Guapeva

A Guapeva pertence à família Sapotaceae, seu nome científico é *Pouteria cf. guardneriana* Radlk. Também conhecida por pêssego do campo e cabo de machado. Seus frutos possuem dimensões de 4 a 5 cm de comprimento por 4 a 5 de diâmetro, como pode ser visualizada na Figura 5.

A polpa pode ser consumida in natura. Os frutos devem ser partidos e lavados em água corrente para a retirada do látex ou leite (GOMES, 1977).

As plantas do gênero *Pouteria* têm sido utilizadas na alimentação e também na medicina popular. Algumas atividades biológicas são reportadas às espécies desse gênero, tais como, antioxidante, antiinflamatória, antibacteriana e antifúngica (SILVA et al., 2009).

Figura 5. Guapeva (SILVA et al., 2001)

2.8.1.3 Murici

O Murici possui nome científico *Byrsonima verbascifolia* Rich. Ele é pertencente à família Malpighiaceae (MARINHO et al., 2002). A família Malpighiaceae possui 66 gêneros e 1200 espécies. No Brasil ocorrem 38 gêneros e aproximadamente 300 espécies.O Gênero *Byrsonima* possui 150 espécies (CASTRO, 2005).

Em suas diferentes variedades, os muricis distinguem-se, também, por suas cores e locais de ocorrência. Assim, são conhecidos o murici-amarelo, o murici-branco, o murici-vermelho, o murici-de-flor- branca, o murici-de-flor-vermelha, o murici-da-chapada, o murici-da-mata, o murici-da-serra, o murici-das- capoeiras, o murici-do-campo, o murici-do-brejo, o murici-da-praia, entre outros (SILVA et al., 2001).

Seus frutos possuem de 1 a 2 cm de comprimento por 1 a 2 cm de diâmetro. A árvore do Murici possui até 5 m de altura com tronco cilíndrico, casca escura, áspera e copa estreita. As folhas são verdes e rígidas. As flores possuem coloração alaranjada aparecendo de janeiro a março (SILVA, et al., 2001).

A polpa do fruto é branca e a casca amarelada, como pode ser vista na Figura 6. Possui forma arredondada, com polpa carnosa e translúcida e sementes de coloração creme. Frutifica de abril a junho (MARTINS, 2006).

A espécie tem ampla distribuição nos cerrados brasileiros (RATTER & DARGIE, 1992), principalmente no Cerrado *sensu stricto* e Campos Cerrados, também, na Mata Atlântica. Ocorre no Distrito Federal e nos Estados do Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, São Paulo, Minas Gerais, Goiás, Bahia, Tocantins e Paraíba.

A floração ocorre entre agosto e dezembro e a frutificação entre outubro e fevereiro em áreas de cerrado (SILVA JÚNIOR, 2005).

Na medicina popular, a casca é antidiarréica, febrífuga e adstringente.Contém 15 a 20% de tanino (Brandão, 1991). Os frutos, quando ingeridos comaçúcar, fornecem um laxante brando, além de serem utilizados para combater tosse e bronquite. O ramo com folhas é anti-sifi lítico, emético e diurético. É tóxico em doses elevadas. A espécie possui potencial forrageiro podendo, também, ser empregada como ornamental. Da semente é extraído um óleo utilizado pela indústria alimentícia e farmacêutica. O murici vem sendo explorado de forma extrativista em agrupamentos nativos e, esporadicamente, é cultivado em pomares domésticos (SOUZA et al., 2003)

Figura 6. Murici (MARIANO, 2011)

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Identificar e quantificar os compostos fenólicos presentes nas frutas Gabiroba, Guapeva e Murici, provenientes do bioma Cerrado brasileiro, bem como a determinação de atividades biológicas como a antioxidante, anticâncer, antiinflamatória, antimutagência, antigenotóxica foram avaliadas procurando caracterizar de forma completa estes três frutos selecionados a fim de que eles possam ser utilizados como alimento funcional, cosméticos e em indústrias farmacêuticas.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Quantificar os compostos fenólicos pelo método de Folin Ciocalteau;
- Quantificar os flavonóides totais para amostras de frutas;
- Determinar a atividade antioxidante através dos métodos *2,2- Diphenyl – 1- picrylhydrazil (DPPH), Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC), Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) e Peroxyl Radical cavenging Capacity (PSC);*
- Identificar e quantificar dos compostos fenólicos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE);
- Quantificar os compostos fenólicos pelo método de Folin Ciocalteau das amostras de plasma;
- Determinar a atividade antioxidante através dos métodos *TEAC* e *ORAC* das amostras de plasma;

- Identificar os compostos fenólicos das amostras de plasma por Espectrometria de Massas;

- Avaliar o potencial mutagênico / antimutagênico *in vivo* pelo teste de micronúcleo;

- Determinar a atividade antiproliferativa frente a 8 linhagens tumorais humanas;

- Avaliar a atividade genotóxica *in vivo* pelo ensaio cometa;

- Determinação da atividade antiproliferativa / citotóxica frente a linhagens de linhagem $HepG_2$;

- Determinação da atividade antioxidante celular *in vitro* em linhagem $HepG_2$.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO DAS FRUTAS DO CERRADO

Frutas maduras foram coletadas na região Centro Oeste do Brasil, no Bioma Cerrado, especificamente na Fazenda Boa Vista, Município de Itapirapuã, Estado de Goiás. Estas frutas foram transportadas até a Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP, por via rodoviária, e mantidas a 6°C até o momento da extração.

4.2 PREPARO DOS EXTRATOS

As frutas do Cerrado selecionadas para o estudo foram: Guapeva, Murici e Gabiroba. Apenas a Guapeva foi separada em semente, casca e polpa, as demais foram analisadas inteiramente.

Foram realizados dois tipos de extração, hidrofílica e lipofílica. Para a extração hidrofílica testou-se dois solventes, água e etanol.

4.2.1 Extração hidrofílica

- Solvente: água

A fruta foi triturada no liquidificador com água (1:3, m/v) durante 30 minutos. Posteriormente este extrato foi filtrado com gaze e liofilizado.

- Solvente: etanol

A fruta foi triturada no liquidificador com etanol 95% (1:3, m/v) durante 30 minutos. Posteriormente este extrato foi filtrado com gaze, o solvente foi evaporado no rotaevaporador (45°C) e liofilizado.

4.2.2 Extração lipofílica

A fruta foi triturada no liquidificador com hexano (1:3, m/v), durante 30 minutos. Posteriormente este extrato foi filtrado com gaze, o solvente foi evaporado no rotaevaporador (45°C) e liofilizado.

4.3 ENSAIOS

4.3.1 Ensaios in vitro

4.3.1.1 Fenóis totais

A determinação de fenóis totais foi realizada de acordo com o método de Folin Ciocalteau, descrito por Roesler et al. (2007).

A solução de extrato foi preparada na concentração de 0,5 mg/mL em metanol, ultrassonificado por duas horas e filtrado com membrana de acetato celulose 0,45 micras. A reação ocorreu pela mistura de 0,5 mL extrato, 2,5 mL folin ciocalteau (10%) e 2,0 mL carbonato de sódio (7,5%). A mistura foi incubada por 5 minutos a 38°C. A leitura foi realizada no espectrofotômetro com leitor em cubetas, a 760 nm.

Fez-se uma curva padrão utilizando-se diferentes concentrações de ácido gálico. O resultado final foi expresso em miligrama (mg) de ácido gálico por 100 gramas (g) de fruta fresca.

4.3.1.2 Flavonóides totais

O conteúdo total de flavonóides foi determinado pelo método colorimétrico descrito por Yang et al. (2009).

Primeiramente 1,0 mL do extrato (1mg/mL, dissolvido na solução de tetrahidrofurano:etanol (1:1, v/v)) foi misturado com 0,5 mL de boroidreto de sódio (50 mM) e 0,5 mL de cloreto de alumínio (74,6 mM). Os tubos foram agitados a temperatura ambiente por 30 minutos. Adicionou-se mais 0,5 mL de boroidreto de sódio, na mesma

concentração, e a reação continuou em agitação por mais 30 minutos. 2,0 mL de ácido acético resfriado (0,8 M) foram adicionados e os tubos foram cobertos contra a luz, agitando-se por mais 15 minutos. 1,0 mL de cloranil (20,0 mM) foi adicionado à reação e os tubos foram colocados em banho seco a 95°C, sob agitação por 60 minutos. A reação foi interrompida no banho de gelo. Completou-se o volume dos tubos com metanol até 4,0 mL. 1,0 mL de vanilina (16%) foi adicionada a cada tubo, então 2 mL de ácido clorídrico (12 M) foram adicionados e os tubos foram mantidos a temperatura ambiente por 15 minutos. Os tubos foram centrifugados a 2500 rpm (rotações por minuto) por 3 minutos. 200 µL foram adicionados em microplacas e a leitura foi realizada a 490 nm.

Construiu-se uma curva padrão de Catequina e o resultado do conteúdo de flavonóides foi expresso em mg de Catequina por 100 g de fruta fresca.

4.3.1.3 2,2- Diphenyl – 1- picrylhydrazil (DPPH)

4.3.1.3.1 *DPPH* / *Trolox*

A atividade antioxidante foi determinada seguindo-se o protocolo descrito por Thaipong, et al. (2006). A reação ocorreu pela mistura de 50 µL de amostra (na concentração de 1mg/mL, dissolvida em etanol), ou *Trolox* com 250 µL de *DPPH (2,2- Diphenyl – 1 – picrylhydrazil-* Sigma, Aldrich) na concentração de 0,004%. No branco adicionou-se 50 uL de etanol com 250 uL do radical. A leitura foi realizada no espectrofotômetro com leitor de microplacas, no intervalo de 30 minutos durante 1 hora e meia, a 517 nm.

Para o cálculo da % de inibição foi utilizada a equação: % Inibição= [(ABS - $ABS_{Extr.}$)/ A_{DPPH}] x 100, onde: ABS_{DPPH} = Absorbância da mistura de 250µL de *DPPH* com

50uL de etanol e $ABS_{Extr.}$ = Absorbância da mistura de 250µL de *DPPH* com 50uL de extrato

Foi construída uma curva do padrão *Trolox (Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid,* Sigma, Aldrich), com concentração de *Trolox* (µM) em função da inibição (%). O resultado foi expresso em µM *Trolox* equivalentes por 100 gramas de fruta fresca.

4.3.1.3.2 *DPPH* / IC_{50}

A atividade antioxidante pelo método *DPPH* / IC_{50} foi determinada de acordo com metodologia descrita por Roesler et al. (2006). A reação ocorreu pela mistura de diferentes concentrações de amostra (concentrações necessárias para que a redução seja no mínimo de 70%), utilizou-se volume máximo de 200 µL, com volume fixo de 1000 µL de *DPPH* (concentração de 0,004%). A leitura foi realizada no espectrofotômetro com leitor em cubetas, no intervalo de 30 minutos durante 1 hora e meia, a 517 nm. O resultado foi expresso em EC 50 (µg/mL de fruta fresca).

4.3.1.4 Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC)

A atividade antioxidante foi medida pelo método *TEAC* baseada no método descrito por Le et al, 2007.

O radical cátion *ABTS´ (2,2´-azinobis (3-ethylbenzothiazoline 6- sulfonate*, Sigma) foi preparado de 12 a 16 horas antes do ensaio. A produção do radical deu-se pela mistura de uma solução aquosa de 7 mM de *ABTS* com 140mM de persulfato de potássio. Este radical foi diluído com água, para o ensaio hidrofílico e com etanol para o lipofílico,

até que a absorbância atingisse valor de 0,7000 +/- 0,02 a 734nm. Foram analisados os extratos hidrofílicos e lipofílicos, na concentração de 1mg/mL, dissolvidos em 7% *Randomly Methylated* β *- Cyclodextrin*, Cyclodex (*RMCD*).

O ensaio foi realizado em espectrofotômetro com leitor de microplacas, adicionando-se 50 µL de amostra / *Trolox* e 250 µL de radical *ABTS´*.

Foi construída uma curva com o padrão *Trolox*, redução (%) em função da concentração de *Trolox*. Os resultados foram expressos em µM *Trolox* equivalentes por grama de extrato.

4.3.1.5 Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC)

O ensaio *ORAC* foi realizado de acordo com o método descrito por Dávalos et al, 2004, com modificações. Foram analisados neste experimento os extratos hidrofílicos e lipofílicos.

O experimento foi realizado no leitor de fluorescência (Fluorímetro Novo Star, *BMG Labtechnologies*, adquirido com verba CNPq, processo 481001/2007-7). A leitura foi realizada a cada 1 minuto, durante 80 minutos, com emissão à 520 nm e excitação à 485 nm e temperatura controlada a 37°C.

Para o *ORAC* hidrofílico misturou-se 20 µL de extrato (concentração de 1mg/mL, diluído em etanol), 120 µL Fluoresceína (0,4 µg/mL) e 60 µL do radical *AAPH (2,2´-azobis (2-methylpropionamidine) dihydrochloride, Aldrich*) na concentração de 108 mg/mL. O tampão fosfato de potássio (pH 7,4; 75 mM) foi utilizado como solvente. Já no *ORAC* lipofílico adicionou-se 120 µL do radical e a solução de 7% *RMCD* foi o solvente.

Para os cálculos foi utilizada a equação da área abaixo da curva (*AUC*).

$$AUC = 1 + f_2/f_1 + f_3/f_1 + f_4/f_1 + fn/f_1$$

Onde: f_1 = leitura da fluorescência no tempo 1 minuto, f_2 = leitura da fluorescência no tempo 2 minutos e fn = leitura da fluorescência no tempo 80 minutos

O resultado final foi expresso em µM *Trolox* equivalentes por 100 gramas de fruta fresca.

4.3.1.6 Peroxyl Radical Scavenging Capacity (PSC)

A atividade antioxidante foi medida pelo método *PSC* seguindo-se o método proposto por He & Liu, 2006.

O composto diacetato de diclorofluoresceína (*DCFH-DA*, Sigma, Aldrich) (2,48 mM, em metanol) foi hidrolisado com 893 µL de Hidróxido de potássio durante 5 minutos para remoção do diacetato. Posteriormente esta mistura foi diluída com tampão fosfato de potássio (75 mM, pH 7,4) até volume final de 8 mL.

O extrato foi preparado nas concentrações de 1, 5, 10, 15 e 20 mg/mL, sendo diluído em tampão fosfato de potássio). O volume de 100 µL de extrato foi misturados com 100 µL de diclorofluoresceína e agitados a 1200 rpm por 20 segundos. A reação foi iniciada pela adição de 50 µL de *ABAP* (*2,2´-Azobis (amidinopropane), Wako Chemicals*) na concentração de 200 mM (preparado em tampão fosfato de potássio). A leitura foi realizada no leitor de fluorescência durante 40 minutos, com emissão à 520 nm e excitação à 485 nm e temperatura controlada a 37°C.

A *AUC* foi integrada e usada como base para o cálculo da atividade antioxidante por meio da equação:

PSC unidade = 1 - (SA/CA)

Onde, SA é a *AUC* para a amostra ou padrão e CA é a *AUC* do controle de reação (ácido ascórbico).

4.3.1.7 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

O ensaio CLAE foi realizado de acordo com metodologia descrita por Scherer & Godoy (2007). Os ensaios cromatográficos de validação do método, identificação e quantificação foram realizados no Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência, HP 1100 (Agilent), com detector de arranjo de diodos (280 e 320 nm), e coluna RP-C18 VYDAC™ (5µm, 250 x 4,6mm). O fluxo utilizado foi de 0,7 mL por minuto. A fase móvel e o gradiente estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Gradiente utilizado no ensaio de Cromatografia líquida de alta eficiência

TEMPO (minutos)	Água + 0,1% Ácido fórmico	Metanol + 0,1% Ácido fórmico
0	85	15
10	50	50
25	20	80
35	85	15

4.3.1.7.1 Validação

A validação do método cromatográfico foi realizada seguindo os parâmetros da linearidade, repetitividade, limite de quantificação e limite de detecção.

4.3.1.7.1.1 Linearidade

Misturaram-se oito padrões antioxidantes, sendo eles: Ácido Gálico (Sigma), Catequina (Sigma), Epicatequina (Sigma), Etil Galato (Fluka), Ácido Ferrúlico (Aldrich), Propil Galato (Aldrich), Resveratrol (Sigma) e Ácido Cinâmico (Aldrich) e foram feitos sete soluções, cada uma com concentração diferente. Realizou-se a média das áreas e construiu-se uma curva para cada um dos padrões, o R^2 deveria ser acima de 0,99 para que a linearidade fosse aceita.

4.3.1.7.1.2 Repetibilidade

Foram feitas dez injeções de uma mistura de quinze padrões antioxidantes, ambos na concentração de 0,025 mg/mL, sendo eles: Ácido gálico, Ácido protocatecuico (Fluka), Catequina, Metil Galato (Fluka), Ácido vanílico (Fluka), Etil galato, Ácido ferrúlico, Propil galato, Rutina (Sigma), Miricetina (Fluka), Ácido Cinâmico, Quercetina, Luteolina (Sigma), Kaempferol (Sigma), Apigenina (Sigma).

Foi encontrada a área de cada um dos padrões presentes na mistura. Fez-se a média, desvio padrão e o coeficiente de variação (%).

4.3.1.7.1.3 Limite de Detecção / Limite de Quantificação

Para a determinação dos limites de detecção e quantificação, foram seguidas as seguintes etapas: No cromatograma onde se injetou apenas metanol, mediu-se a amplitude do sinal ruído no tempo de retenção de cada um dos padrões, levando em consideração o início e final do pico. Fez-se a diferença entre o valor final e inicial. Mediu-se a amplitude do sinal ruído para cada um dos padrões, esta medida foi feita no

cromatograma de concentração mais baixa do padrão ou na concentração em que a amplitude do sinal ruído do padrão se aproximasse mais do valor da amplitude do sinal ruído do branco.

O pico do padrão presente na amostra deve ter amplitude no valor de 3 vezes o sinal ruído no branco, no caso da determinação do limite de detecção. Para o limite de quantificação, a amplitude do sinal ruído do branco deve ser multiplicada por 5.

Para a determinação dos limites, seguiu-se a seguinte equação:

$$LD = \frac{\text{Concentração do padrão x (Amplitude sinal ruído}_{\text{no branco}} \text{ x 3)}}{\text{Amplitude sinal ruído}_{\text{na mesma concentração do padrão}}}$$

$$LQ = \frac{\text{Concentração do padrão x (Amplitude sinal ruído}_{\text{no branco}} \text{ x 5)}}{\text{Amplitude sinal ruído}_{\text{na mesma concentração do padrão}}}$$

4.3.1.7.2 Identificação e Quantificação dos padrões presentes nas amostras

Os picos foram identificados pela comparação do tempo de retenção, comparação do espectro UV-visível e eluição com padrões antioxidantes.

A quantificação foi feita usando curva de padronização externa com no mínimo seis pontos.

4.3.2 Atividade antioxidante em plasma de animais alimentados com frutas

O ensaio animal foi realizado com ratos Wistar machos, procedentes do Centro multidisciplinar para investigação na área de animais de laboratório (CEMIB) da UNICAMP.

O experimento foi conduzido em conformidade com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal CEEA/Unicamp/Brasil (Protocolo nº 1053-1).

Os animais foram mantidos durante todo o experimento em temperatura controlada (22 ± 2°C), com períodos alternados de claro e escuro de 12 horas. Os animais foram divididos aleatoriamente em 7 grupos (com 6 animais cada) (Tabela 2).

Tabela 2. Ensaio Antioxidante *in vivo*, grupos / extratos

GRUPOS	EXTRATO
G1	Controle
G2	Gabiroba
G3	Guapeva casca
G4	Guapeva semente
G5	Guapeva polpa
G6	Murici

A solução aquosa do extrato de fruta foi preparada na concentração de 50 mg de ácido gálico/kg de P.C., com base no ensaio *in vitro* de Fenóis Totais, e administrada por gavagem (2,0 mL). O grupo controle recebeu água por gavagem (BOMBARDELLI & MORAZZONI, 1995). O peso dos ratos deve ser de aproximadamente 180 g.

Para a determinação da cinética de absorção, o sangue dos animais tratados foi retirado nos períodos de 30, 60 e 120 minutos após a gavagem. O sangue foi coletado sem sacrifício dos animais. O objetivo foi a verificação da concentração dos antioxidantes no plasma por meio dos métodos *ORAC* e *TEAC*, como também a concentração de fenóis totais pelo método de Folin Ciocalteau, previamente descritos anteriormente. A partir dos resultados obtidos pelos ensaios *ORAC* / *TEAC* e Fenóis Totais, as amostras de plasma com melhores resultados foram analisadas por Espectrometria de Massas (ESI-MS) para identificação dos compostos fenólicos presentes em cada grupo de animais.

Os animais foram anestesiados individualmente com halotano. Aproximadamente 500 µL de sangue foram retirados do pleso retro-orbitalar com capilar contendo heparina. O sangue foi colocado em tubos heparinizados, depois seguiu-se para a centrifugação a 3000 rpm, durante 15 minutos, a 4°C, e depois foi armazenado a –70°C. Após a coleta de sangue os animais foram sacrificados por deslocamento cervical.

4.3.2.1 Testes de extração de polifenóis em plasma

Foram selecionadas cinco métodos para teste de extração de polifenóis em plasma, a saber os protocolos descritos por: Prior et al, 2003, Serafini et al, 2002, Gardana et al, 2007, Serafini et al 1998 e Ghiselli et al., 1995, os quais são descritos em seguida. O melhor método de extração foi avaliado pelo ensaio ORAC preliminar.

a. Método segundo Ghiselli et al. (1995)

As proteínas do plasma foram precipitadas com sulfato de amônio. Um volume de 100 µL de plasma foi diluído com 100 µL de tampão fosfato (75mM, pH 7,0) e 800 uL de solução saturada de sulfato de amônio. Esta mistura foi agitada e mantida em banho de

gelo por 90 minutos. As amostras foram centrifugadas a 100.000 g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi estocado em banho de gelo, enquanto o sobrenadante foi ressuspenso em 1 de solução saturada de sulfato de amônio (80%) e centrifugada como anteriormente descrito. O primeiro sobrenadante foi misturado com o segundo, e ressuspenso com tampão fosfato.

b. Método segundo Serafini et al. (1998)

Os compostos fenólicos foram determinados após o procedimento de extração / hidrólise, precipitando proteína com ácido Metafosfórico 0,75 mol/L. Para hidrólise das formas de fenólicos conjugados, 1mL de HCl 1,0 mol/L foi adicionado para 500 µL de amostra (plasma), e agitou-se por 60 segundos vigorosamente. Esta mistura foi incubada por 30 minutos a 37°C. Este passo quebra as ligações dos polifenóis com os lipídios e promove a primeira extração dos polifenóis. Então 1,0 de ácido metafosfórico 0,75 mol/L foi adicionado e agitado por 3 minutos para remover as proteínas do plasma, a amostra foi centrifugada a 1500 g por 10 minutos. O sobrenadante foi removido e mantido em gelo e no escuro. Enquanto isso os polifenóis foram extraídos novamente na porção do precipitado, pela adição de 1,0 da solução de acetona:água (1:1, v/v) e centrifugada por 10 minutos a 2700g. Os dois sobrenadantes foram combinados e filtrados. Um volume de 200 µL de amostra foi utilizado nos ensaios.

c. Método segundo Prior et al. (2003)

As amostras de plasma estocadas a –70°C foram descongeladas lentamente, misturando no vórtex e centrifugando se necessário. Um volume de 100 µL de plasma foi transferido para um tubo de vidro, 200 µL de etanol e 100 µL de água foram adicionados e misturados. Um volume de 400 µL de ácido perclórico 0,5M foi adicionado para a

precipitação de proteína. A amostra foi centrifugada por 5 minutos a 14000 rpm. Do sobrenadante 160 µL foram adicionados a 840 µL de tampão fosfato.

d. Método segundo Gardana et al. (2007)

Os polifenóis conjugados foram hidrolisados pela incubação de 100 µL de plasma heparinizado com 100 µL de glucuronidase / sulfatase (1 unidade/µL) e 50 µL de tampão acetato de sódio 0,1mol/L, pH 5,2 contendo morina (50ng/mL) como padrão interno a 37°C por 18 horas. A mistura foi extraída com 500 µL de acetato de etila, agitando no vórtex e centrifugando a 1000g por 1 minuto. Um volume de 400 µL de sobrenadante foi seco com nitrogênio e o resíduo foi dissolvido com 100 µL metanol.

e. Método segundo Serafini et al. (2002)

Para a hidrólise enzimática, 0,5 mL de solução da enzima Sulfatase da *Helix pomatia (Sigma)* ($5,5x10^5$ unidades/litro) foram adicionados a 0,5 mL de plasma. A mistura foi incubada a 37°C por 45 minutos. Imediatamente realizou-se a hidrólise ácida adicionando 1 mL de HCl – Metanol (1:1, v/v) por 30 minutos a temperatura ambiente. Os fenóis foram extraídos pela adição de 2 mL de acetato de etila, seguido pela agitação e sonificação por 1 minuto antes da centrifugação a 1700 g por 5 minutos. O procedimento de extração foi repetido duas vezes e as duas fases orgânicas foram combinadas e evaporadas com nitrogênio. Os resíduos foram dissolvidos em 250 µL de tampão fosfato pH 2,8 e metanol (1:1, v/v).

4.3.2.2 Espectrometria de massas (ESI-MS)

A identificação dos compostos fenólicos presentes nas amostras de plasma seguiu protocolo descrito por Leite et al. (2011). A quantidade de 5 µL de extrato foi diluído em 995 µL de metanol/água (1:1) e 0,1% de ácido fórmico. A análise foi realizada no Micromass Q-TOF mass spectrometer (Micromass, Manchester, UK). As condições gerais do equipamento foram: temperatura da fonte 100°C, voltagem do capilar 3 kV. As medidas foram realizadas por infusão direta com fluxo de 10µL por minuto.

4.3.3 Ensaio de mutagenicidade (Teste de Micronúcleo)

O ensaio de Mutagenicidade foi realizado pelo teste de Micronúcleos descrito por Delmanto, et al, 2001. Todos os Princípios Éticos para Experimentação Animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) foram cumpridos na realização deste experimento, mediante aprovação do Comitê de Ética na Experimentação Animal da Universidade Federal de Alfenas (CEEA-Unifal-MG, protocolo número 226/2009).

Para avaliação da mutagenicidade *in vivo* dos extratos selecionados obtidos de frutas nativas do bioma Cerrado brasileiro, Guapeva (semente, casca e polpa), Gabiroba e Murici, foram utilizados camundongos Swiss albinos machos, com 6-7 semanas de idade e 25 ± 5g de P.C. médio. Os animais permaneceram durante todo o período em caixas de polietileno do Biotério Central da instituição sob temperatura de 22 ± 2°C sendo uma caixa para cada grupo de animais; umidade relativa do ar de 50 ± 20% e ciclo claro/escuro de 12h/12h. Durante todo o experimento, os camundongos receberam ração comercial sob a forma de *pellets* e água *ad libitum*.

Foram utilizados 136 animais, sendo 6 animais para cada um dos grupos dos extratos e 8 animais para os grupos controles. Foi estabelecido um grupo controle positivo e outro negativo, ambos receberam via gavagem, 0,1 mL de água destilada.

Foram avaliadas duas concentrações (200 e 400 mg de extrato por kg P.C.) de cada um dos extratos vegetais, previamente solubilizados em água filtrada, administrados aos animais via gavagem, uma vez ao dia, sempre no mesmo horário, no volume de 0,1 mL.

Grupos específicos de animais receberam, ao 15° dia do experimento, aplicação intraperitoneal de Ciclofosfamida (*Cyclophosphamide Monohydrate, Sigma, CPA*), substância mutagênica órgão-específica da medula óssea. A dose única foi padronizada em 50 mg/kg de P.C. (POÇA et al., 2008). Enquanto os demais grupos receberam aplicação intraperitoneal de soro fisiológico (NaCl, 0,9%).

Na Tabela 3 está descrito o desenho experimental.

Tabela 3. Desenho experimental para ensaio de mutagenicidade pelo teste de Micronúcleo em medula óssea

EXTRATOS	**1° ao 15° dia**	**15° dia**
Murici	200 mg/kg P.C[*].	CPA[**]
Murici	200 mg/kg P.C[*].	NaCl[***]
Murici	400 mg/kg P.C[*].	CPA[**]
Murici	400 mg/kg P.C[*].	NaCl[***]
Gabiroba	200 mg/kg P.C[*].	CPA[**]
Gabiroba	200 mg/kg P.C[*].	NaCl[***]
Gabiroba	400 mg/kg P.C[*].	CPA[**]
Gabiroba	400 mg/kg P.C[*].	NaCl[***]
Guapeva semente	200 mg/kg P.C[*].	CPA[**]
Guapeva semente	200 mg/kg P.C[*].	NaCl[***]
Guapeva semente	400 mg/kg P.C[*].	CPA[**]
Guapeva semente	400 mg/kg P.C[*].	NaCl[***]
Guapeva casca	200 mg/kg P.C[*].	CPA[**]
Guapeva casca	200 mg/kg P.C[*].	NaCl[***]
Guapeva casca	400 mg/kg P.C[*].	CPA[**]

EXTRATOS	1° ao 15° dia	15° dia
Guapeva casca	400 mg/kg P.C*.	NaCl***
Guapeva polpa	200 mg/kg P.C*.	CPA**
Guapeva polpa	200 mg/kg P.C*.	NaCl***
Guapeva polpa	400 mg/kg P.C*.	CPA**
Guapeva polpa	400 mg/kg P.C*.	NaCl***
Controle positivo	NaCl***	CPA**
Controle negativo	NaCl***	NaCl***

*mg/Kg P.C = mg de extrato por quilo de P.C. animal, CPA** = Ciclofosfamida, NaCl*** = Soro fisiológico

Após o sacrifício do animal, limpou-se a perna com álcool 70%, cortou-se a pele que cobre a perna, e retirou-se o fêmur (mantendo o máximo possível a integridade da peça). O excesso de tecido foi retirado com tesoura, pinça e papel toalha. O procedimento foi repetido para o segundo fêmur. A epífise proximal do fêmur foi cortada para expor o canal da medula. A agulha da seringa (que foi previamente preenchida com soro fetal bovino) foi inserida firmemente na abertura do fêmur, injetando-se o soro fetal bovino, de modo a empurrar a medula para dentro de um tubo de centrífuga (tubo falcon), previamente marcado com código do animal. O material da medula óssea foi ressuspendido em soro fetal bovino, por várias vezes, com o auxílio de uma pipeta p*asteur*, até a obtenção de uma suspensão homogênea. A suspensão foi centrifugada por 5 minutos, a 1000 rpm e o sobrenadante o sobrenadante descartado e o sedimento ressuspendido. Os esfregaços foram preparados pingando-se duas gotas da suspensão na extremidade fosca de uma lâmina (previamente marcada com o código do animal), e, com o auxílio de outra lâmina fez-se o esfregaço (RIBEIRO, & MARQUES, 2003). As preparações foram secas ao ar. Foram preparadas duas lâminas de cada animal. As células são coradas após 24 horas da preparação das lâminas.

As lâminas foram coradas com corante Leishman (Eosina azul de metileno, *Merck*), seguindo o procedimento a seguir.

a) Cuba A = contendo corante Leishman puro por 3 minutos
b) Cuba B = contendo corante diluído (1 parte corante Leishman : 6 partes de água) por 15 minutos
c) Lavagem com água corrente
d) Lavagem com água destilada
e) Secagem

Acerca da preparação das lâminas dos eritrócitos monocromáticos de medula óssea, foi utilizada a metodologia segundo McGregor et al. (1987), técnica realizada por diversos pesquisadores para o estudo de ação mutagênica / antimutagênica em alimentos.

O exato número de 1000 eritrócitos policromáticos (PCE, eritrócito imaturo, em um estágio intermediário de desenvolvimento, que ainda contém ribossomos) de cada animal foi analisado, utilizando microscópio óptico em aumento de 1000 vezes (imersão). A análise das lâminas foi realizada sob teste cego e as mesmas foram decodificadas ao final do experimento. A proporção (PCE): Eritrócito normocromático (NCE, eritrócito maduro, sem ribossomos) em 500 células foi utilizada para teste de citotoxicidade. Outro conceito importante é o de micronúcleos, que consiste numa porção citoplasmática de cromatina de forma redonda ou ovalada que se localiza perto do núcleo (ANDRADE et al., 2005).

A porcentagem de micronúcleos (MNPCE) foi determinada pela seguinte equação:

$$\% \text{ MNPCE} = \frac{\Sigma \text{ MNPCE}}{\text{Nº de células analisadas}} \times 100$$

O número de micronúcleos esperado foi obtido pela equação a seguir e utilizado para análise estatística:

$$MN_{esperado} = \frac{\text{Nº células analisadas}}{\Sigma \text{ nº células analisadas do grupo}} \times MN$$

A porcentagem de redução foi calculada pela seguinte equação (Delmanto, et al, 2001):

$$\text{Redução (\%)} = \frac{\text{MN “A” – MN “B”}}{\text{MN “A” – MN “C”} \times 100}$$

Onde, “A” é o controle positivo, “B” é o grupo tratado com extrato + CPA, e “C” é o controle negativo.

Por fim, a freqüência de PCEs micronucleados de todos os grupos foi testada pelo método estatístico Qui-quadrado com significância de $p<0,05$.

O cálculo do Qui – quadrado (x^2), pode variar de acordo com o número de células analisadas:

1. Quando o número de células analisadas dos dois grupos comparados foi igual, o valor do x^2 foi obtido pela equação:

$$x^2 = \frac{(MN_1 - MN_{\text{esperado total}})^2}{MN_{\text{esperado total}}} + \frac{(MN_2 - MN_{\text{esperado total}})^2}{MN_{\text{esperado total}}}$$

2. Quando o número de células analisadas dos dois grupos comparados foi diferente, o valor do x^2 foi obtido pela equação:

$$x^2 = \frac{(MN_1 - MN_{\text{esperado 1}})^2}{MN_{\text{esperado 1}}} + \frac{(MN_2 - MN_{\text{esperado 2}})^2}{MN_{\text{esperado 2}}}$$

De acordo com a tabela do x^2, com $p < 0,05$, quando x^2 for maior que 3,84, significa que os dois grupos comparados são estatisticamente diferentes.

4.3.4 Teste antiinflamatório (Edema de Pata)

Todos os Princípios Éticos para Experimentação Animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) foram cumpridos na realização deste experimento, mediante aprovação do Comitê de Ética na Experimentação Animal da Universidade Federal de Alfenas (CEEA-Unifal-MG protocolo número 226/2009).

Ratos machos Wistar, pesando entre 200-300 g, foram separados em 12 grupos, com 6 animais por grupo.

Os animais permaneceram durante o período de crescimento em caixas de

polietileno no Biotério Central sob temperatura de 22 ± 2°C; umidade relativa do ar de 50 ± 20% e ciclo claro/escuro de 12h/12h. Durante todo o experimento, os ratos receberam ração comercial sob a forma de *pellets* e água filtrada *ad libitum*

Vinte e quatro horas antes do início dos experimentos, os animais foram transferidos para o laboratório e mantidos somente com água *ad libitum*.

Foram avaliadas duas concentrações (200 e 400 mg extrato por kg P.C.) de cada um dos extratos, Guapeva (semente, casca e polpa), Gabiroba e Murici. Além do grupo dos extratos, também havia dois controles, um recebeu apenas o veículo, água, e o controle positivo que recebeu Indometacina (5mg/kg P.C.) (Tabela 4).

Tabela 4. Desenho experimental para ensaio antiinflamatório pelo teste de Edema de pata

EXTRATOS	CONCENTRAÇÃO EXTRATO
Murici	200 mg/ kg P.C.*
Murici	400 mg/ kg P.C.*
Gabiroba	200 mg/ kg P.C.*
Gabiroba	400 mg/ kg P.C.*
Guapeva semente	200 mg/ kg P.C.*
Guapeva semente	400 mg/ kg P.C.*
Guapeva casca	200 mg/ kg P.C.*
Guapeva casca	400 mg/ kg P.C.*
Guapeva polpa	200 mg/ kg P.C.*
Guapeva polpa	400 mg/ kg P.C.*
Controle negativo	Indometacina
Controle positivo	Água

*mg/Kg P.C = mg de extrato por quilo de peso corpóreo animal

O teste antiinflamatório foi realizado pelo ensaio de Edema de pata descrito por Winter et al. (1962). Os extratos de frutas / veículo foram administrados por gavagem. Após 60 minutos, os animais foram submetidos a uma injeção sub-plantar de 0,1 mL de carragenina 1% em soro fisiológico (NaCl) na pata traseira direita.

O volume da pata do animal foi medido imediatamente antes e após a injeção do agente edematôgenico e em intervalos pré-estabelecidos, utilizando um hidropletismômetro (modelo 7150, Ugo Basile, Itália) submergindo as patas direitas posteriores dos animais, até o maléolo lateral (Figura 7), em um recipiente contendo uma solução de extran neutro 2,5% em salina 0,9%, conectado por um sistema de vasos comunicantes a um outro menor, contendo um transdutor de volume ligado a um multímetro digital. As variações de volume, mediante a imersão das patas no recipiente maior, foram numericamente registrados no multímetro digital nos tempos zero (imediatamente após as injeções de carragenina, volume basal) 60, 120, 180 e 240 minutos após a injeção do agente flogístico (Figura 7).

As respostas edematogênicas foram expressas como aumento de volume da pata (mL), calculado por subtração do volume basal. Os resultados do efeito antiinflamatório (%) foram apresentados como média ± erro padrão da média, para cada grupo de tratamento, de acordo com a equação:

$$\text{Efeito antiinflamatório (\%)} = \frac{100 - (\text{Volume}_{\text{pata extrato}} \times 100)}{(\text{Volume}_{\text{pata controle negativo}})}$$

Figura 7. Representação fotográfica do teste Edema de pata

4.3.5 Teste de genotoxicidade (Ensaio Cometa)

O ensaio Cometa foi realizado de acordo com protocolo descrito por Olive & Banáth (2006).

O teste foi realizado em conformidade com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal CEE/Unicamp/Brasil (Protocolo nº 2112-1).

Para avaliação da genotoxicidade *in vivo* dos extratos selecionados obtidos de frutas nativas do bioma Cerrado brasileiro, Guapeva (semente, casca e polpa), Gabiroba e Murici, foram utilizados camundongos Swiss albinos machos, com 6-7 semanas de idade e 25 ± 5g de P.C. médio. Os animais permaneceram durante todo o período em caixas de polietileno do Biotério Central da instituição sob temperatura de 22 ± 2°C

umidade relativa do ar de 50 ± 20 % e ciclo claro/escuro de 12h/12h. Durante todo o experimento, os camundongos receberam ração comercial sob a forma de *pellets* e água filtrada *ad libitum*.

Foram utilizados 66 animais, divididos em 11 grupos, sendo 2 grupos para cada extrato de fruta (2 concentrações diferentes) e 1 grupo controle.

Foram avaliadas duas concentrações (200 e 400 mg extrato por kg P.C.) de cada um dos extratos, previamente dissolvidos em água, administrados aos animais via gavagem, uma vez ao dia durante 1 semana de tratamento, sempre no mesmo horário, no volume de 0,1 mL. O grupo controle recebia o mesmo volume de água destilada por gavagem (Tabela 5).

Tabela 5. Desenho experimental para ensaio Cometa *in vivo*

EXTRATOS	**CONCENTRAÇÃO EXTRATO**
Murici	200 mg/ kg P.C.*
Murici	400 mg/ kg P.C.*
Gabiroba	200 mg/ kg P.C.*
Gabiroba	400 mg/ kg P.C.*
Guapeva semente	200 mg/ kg P.C.*
Guapeva semente	400 mg/ kg P.C.*
Guapeva casca	200 mg/ kg P.C.*
Guapeva casca	400 mg/ kg P.C.*
Guapeva polpa	200 mg/ kg P.C.*
Guapeva polpa	400 mg/ kg P.C.*
Controles	Água

*mg/kg P.C = mg de extrato por quilo de peso corpóreo animal

Seguem abaixo protocolos para preparo das soluções utilizadas no ensaio Cometa.

a) Solução de Lise (estoque)

Para 1 litro de solução utilizou-se: 146,1 g de NaCl (2,5 M), 37,2 g de EDTA sal dissódico P.A. (100mM, Synth) e 1,2 g de Tris (*Merck*, $C_4H_{11}NO_3$). Os reagentes foram misturas e dissolvidos em 1 litro de água Milli Q. Acertou-se o pH para 10 utilizando NaOH (hidróxido de sódio, puro, pó, Synth). Esta solução foi conserda em gelaeira, abrigada da luz por no máximo 1 mês.

b) Solução de Lise (uso)

Para 100 mL de solução utilizou-se: 1 mL de Triton 100x (*Merck*) e 10 mL de DMSO (Synth), a solução foi completada com a solução lise estoque. Esta solução foi preparada no escuro apenas no momento de uso, e mantida na geladeira até atingir 4ºC.

c) Solução de eletroforese

Foram preparadas separadamente duas soluções, (i) EDTA e (ii) NaOH. Misturou-se 5 mL da solução (i) com 30 mL de solução (ii), completando o volume para 1 L com água Milli Q. O pH foi acertado para 13. Esta solução não foi reaproveitada.

d) Solução de EDTA (i)

Adicionou-se 14,89 g de EDTA em 200 mL de água Milli Q. O pH foi acertado para 10 utlizando HCl. Conservação em temperatura ambiente.

e) Solução de NaOH (ii)

Adicionou-se 200 g de NaOH em 500mL de água Milli Q. Conservação em temperatura ambiente abrigada da luz.

f) Solução Tampão de neutralização

Adicionou-se 48,5 g de Tris (0,4M) em 1 L de água Milli Q. Acertou-se o pH até 7,5 utlizando HCl. Conservação em temperatura ambiente, abrigado da luz.

g) Solução de coloração (estoque)

Adicionou-se 10 mg de Brometo de etídio (Sigma) em 50 mL de água Milli Q. Conservação em geladeira, abrigada da luz.

h) Solução de coloração (uso)

Dilui-se a solução de coloração estoque em 1 para 10 em água Milli Q. Conservação em geladeira, abrigada da luz.

i) Agarose Normal 1% (*Merck*)

Dilui-se 1 g de agarose normal em 100 mL de PBS (10x), a solução foi levada ao microondas deixando-a quase ferver de 2 a 3 vezes. Esta solução já diluída foi colocada no banho maria a 60°C minutos antes do preparo das lâminas.

j) Agarose Low Melting Point (LMP) 0,5% (*Sigma*)

Dilui-se 0,5 g de LMP em 100 mL de PBS (10x), a solução foi levada ao microondas deixando-a quase ferver de 2 a 3 vezes. Esta solução já diluída foi colocada no banho maria a 37°C minutos antes da utilização no ensaio cometa.

k) Peróxido de hidrogênio (H_2O_2), 100 mM (Merck 30 volumes)

Para preparo da solução, realizado em solução de gelo, seguiu-se as seguintes diluições.

Eppendorf 1: 1mL de PBS + 11,5 uL de H_2O_2

Eppendorf 2: 1mL de PBS + 100uL da mistura do Eppendorf 1

Eppendorf 3: 900 uL de PBS + 100 uL da mistura do Eppendorf 2

l) Solução de Hanks

Para 1 L de solução utilizou-se: 0,40 g de KCl, 0,06 g de KH_2PO_4, 0,04 g de Na_2HPO_4, 0,35 g de $NaHCO_3$, 8 g de NaCl (Cloreto de Sódio, Synth) e 1 g de Glicose.

m) PBS

Para 1 L de solução utilizou-se: 8 g de NaCl, 0,2 g de KCl, 1,44 g de Na_2HPO_4 e 0,24 g de KH_2PO_4. Acertou-se pH com HCl ou NaOH até 7,4.

As lâminas foram preparadas, antes do início do experimento, seguindo-se o protocolo:

a) Diluir a agarose ponto de fusão normal na concentração de 1% no banho a 60°C.
b) Com o auxílio de uma pinça, mergulhar as lâminas limpas no gel sem deixar escorrer.
c) Colocá-las na posição horizontal em frente a um aquecedor, deixando-as secar por algumas horas.
d) Conservação: geladeira 4°C. Podem ser utilizadas por aproximadamente 1 mês.

Segue Figura 8 o procedimento do ensaio Cometa.

Todo procedimento foi realizado com as luzes apagadas

Sacrificar o camundongo, retirar fígado do animal, em uma placa de petri (colocada sobre gelo triturado) picotar o fígado com auxílio de duas lâminas, adicionar 3 mL de tampão Hanks gelado. Filtrar os hepatócitos com gaze e armazenar em um eppendorf codificado.

A partir dos hepatócitos fazer teste de viabilidade celular - Método Trypan Blue (câmara de Neubauer)

i. Dissolver o corante Trypan Blue em PBS pH 7,4 a 0,1%
ii. Misturar volumes iguais da solução corante e do material.

Tratamento 1: Normal	**Tratamento 2: com H_2O_2**
Misturar 30 µL de hepatócitos com 120 µL de LMP, homogeneizar com pipeta	Misturar 200 µL de hepatócitos com 100 µL de H_2O_2. Deixar agir por 30 minutos no gelo. Após este tempo, misturar 30 µL de hepatócitos "tratados" com 120 µL de LMP.

Colocar 120 µL da solução preparada (hepatócito + LMP) na lâmina previamente preparada com Agarose normal. Cobrir com lamínula

Deixar as lâminas na geladeira por 5 minutos

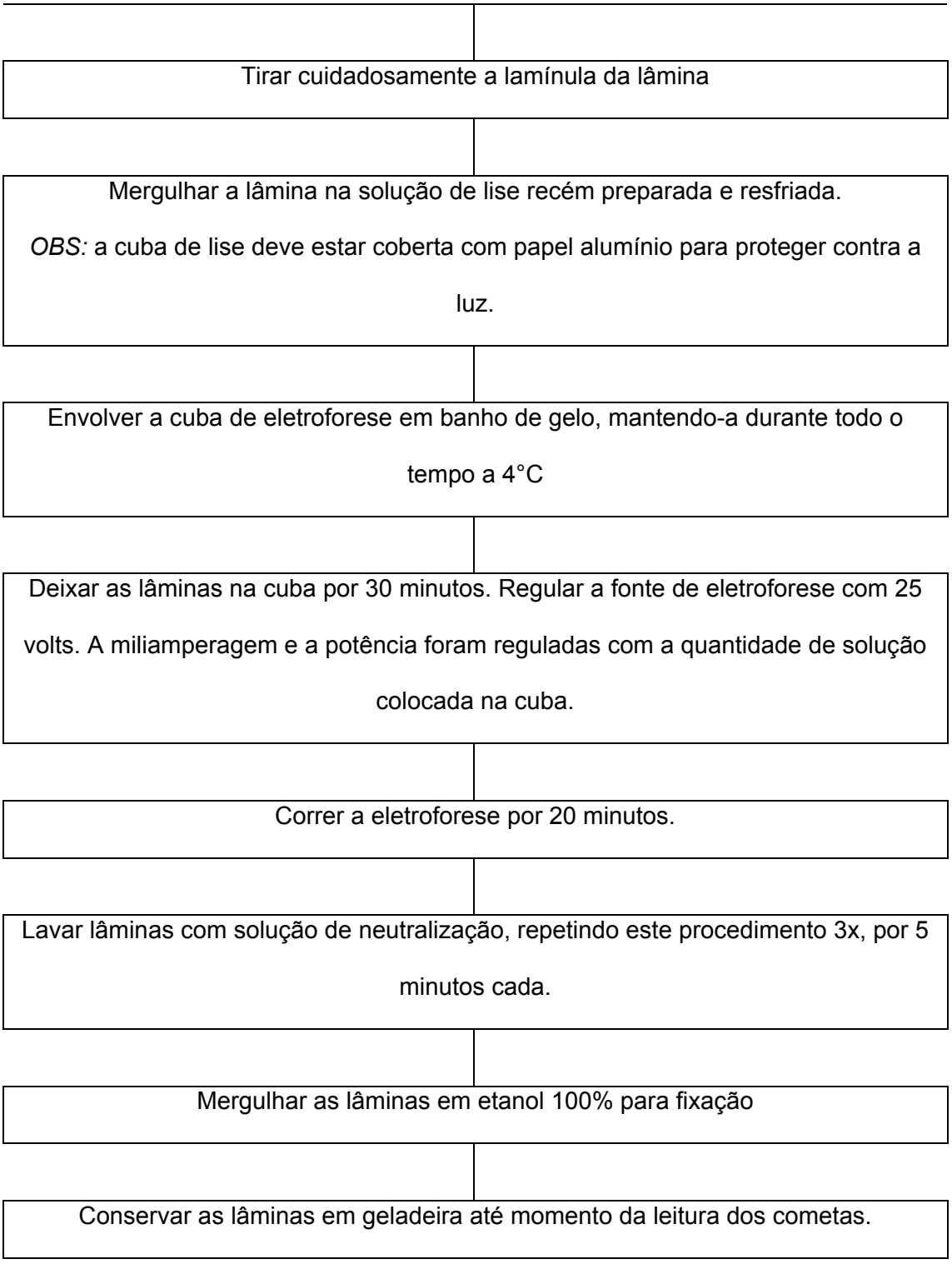

Figura 8. Fluxograma para Ensaio Cometa

Para coloração das lâminas seguiram-se as recomendações gerais a seguir:

a) Utilizar 30 µl de solução de brometo de etídio (solução de uso);
b) Cobrir cuidadosamente com uma lamínula grande;
c) As lâminas devem ser lidas imediatamente após a coloração;
d) Ao retirar a lamínula mergulhá-las em etanol 100%.

As lâminas foram analisadas com um microscópio de fluorescência (filtro de 516-560 nm, barreira de filtro 590 nm e aumento total de 400x). A extensão da imagem significa a distância de migração da fita de DNA danificada. Na Figura 9 estão demonstrados os 5 níveis (nível 0 a 4) de danos ao DNA.

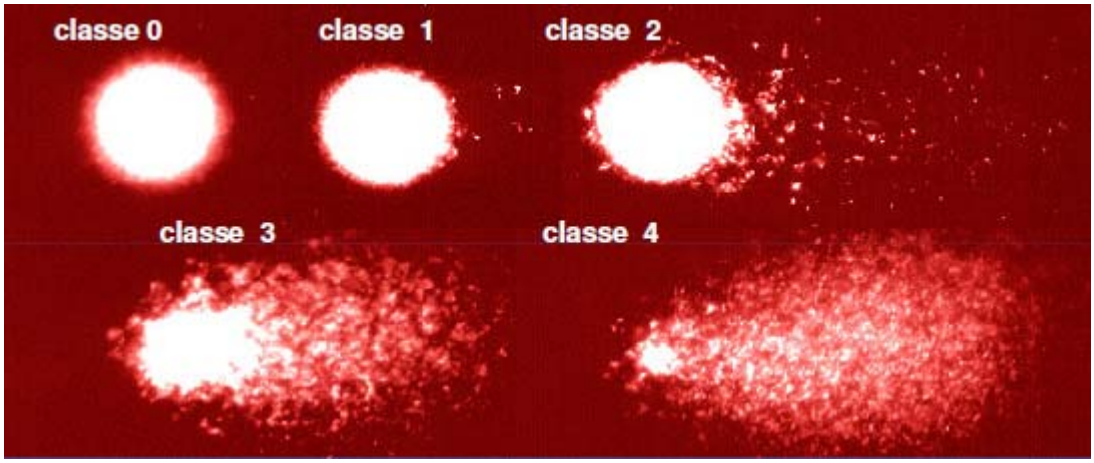

Figura 9. Níveis de danos (0 a 4) - Ensaio Cometa *in vivo* (COLLINS et al., 1994)

Com base na extensão da cauda (“cometa”) formada a partir do nucleóide, a célula foi respectivamente classificada segundo os critérios descritos por Biri et al., 2002 como:

Nível 0: a célula não apresenta cauda, significando que não houve fragmentação no DNA (danos < 5%);

Nível 1: a célula apresenta o início de formação de uma cauda, com apenas alguns pontos fluorescentes próximos ao nucleóide, significando que houve pouca fragmentação do DNA (danos: 5-20%);

Nível 2: a célula apresenta uma cauda um pouco maior do que a do nível 1, com uma quantidade maior de fragmentos de DNA (danos 20-40%);

Nível 3: a cauda apresentada nesse nível é maior do que a do nível 2 e o nucleóide apresenta-se reduzido em tamanho, se comparado com o dos níveis anteriores. Neste estágio há um número significativo de fragmentos de DNA (danos: 0-95%).

Nível 4: a cauda é a mais longa possível. O nucleóide da célula é muito pequeno se comparado ao tamanho da cauda, significando que o DNA da célula encontra-se quase totalmente fragmentado (danos: > 95%).

A porcentagem de células danificadas foi calculada de acordo com Ghiraldini & Mello, 2010. E o dano no DNA foi avaliado por meio da soma dos níveis das 100 células analisadas, seguindo a equação descrita por Biri et al. (2002):

$$\text{DANO NO DNA (\%)} = \frac{L1 + 2\,L2 + 3\,L3 + 4\,L4}{\Sigma} * 100$$

Onde L1–L4 são os números de cometas níveis 1-4, respectivamente, e Σ é a somatória de todos os cometas, incluindo os de nível Zero.

4.3.6 Atividade antiproliferativa

A análise da atividade antiproliferativa foi realizada de acordo com protocolo proposto por Romero et al. (2008).

Os cinco extratos de frutas do Cerrado, Gabiroba, Murici, Guapeva (semente, casca e polpa) foram expostos a 8 linhagens de diferentes origens histológicas e embrionárias humanas, sendo elas: UACC-62, MCF-7, NCI-H460, OVCAR-3, PC-3, HT-29, 786-O e NCI-ADR/RES. Todas as linhagens foram cedidas pelo National Center Institute (NCI) (EUA). Na Tabela 6 estão descritas cada uma das linhagens e com a densidade de inoculação para cada uma.

Tabela 6. Densidade de inoculação das linhagens celulares (ensaio antiproliferativo)

LINHAGEM CELULAR	**NOME**	**DENSIDADE DE INOCULAÇÃO (x 10^4 células /mL)**
Pulmão	NCI-H460	4
Mama	MCF-7	6
Mama com Fenótipo Resistência Multidroga	NCI-ADR/RES	5
Cólon	HT-29	4
Próstata	PC-3	5
Melanoma	UACC-62	5
Ovário	OVCAR-3	7
Renal	786-O	4,5

As culturas foram mantidas em meio de cultura RPMI-1640 (Gibco®, NY, USA) com 5% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco®, NY, USA), sem antibiótico, sendo esse adicionado (gentamicina, 50 μg/mL).

A atividade antiproliferativa / anticâncer foi avaliada inoculando-se 100 μL/compartimento de células (das diferentes linhagens citadas acima) em placas de 96

compartimentos e expostas a oito concentrações de extrato de frutas do Cerrado (0,25; 2,5; 10; 25; 100; 250 e 1000 μg/mL). As soluções estoque dos extratos foram preparadas em meio RPMI/DMSO (Sigma) na concentração de 0,1 g/mL e então diluídas com meio de cultura, a fim de que a concentração final de dimetilsulfóxido de sódio (DMSO, Sigma) não afete a viabilidade celular. As placas foram incubadas a 37°C, em atmosfera úmida com 5% de CO_2 por 48 horas.

Para determinação da influência das amostras no crescimento celular, após as 48 horas, uma solução de ácido tricloroacético 50% (Merck, Darnstadt, Germany) foi adicionada 50 μL/compartimento e incubada por 60 minutos a 4°C. Após lavagem e secagem, o número de células foi determinado pela quantificação espectrofotométrica (540 nm) do conteúdo protéico celular total utilizando-se a sulforrodamina B (0,4g/mL em ácido acético 1%) (Sigma Chemical Co®, St Louis, MO, USA) (Skehan et al, 1990). A sulforrodamina é um corante protéico que se liga a aminoácidos básicos das proteínas de células viáveis e, portanto, sua presença é uma medida indireta da quantidade de células vivas no momento da fixação. Com esses resultados serão elaborados gráficos relacionando a concentração com o efeito observado (Figueiredo et al, 2006; Russowsky et al, 2006). Logo, quanto maior a quantidade de sulforrodamina ligada por compartimento, menor a atividade antiproliferativa da amostra (Skehan et al., 1990).

Para a avaliação dos resultados, os dados de absorbância foram utilizados na elaboração dos gráficos relacionando o crescimento celular, expresso em % com a concentração de extrato. Para disso, foram calculadas as médias das absorbâncias descontadas de seus respectivos brancos o crescimento celular foi calculao por:

Se T>C o extrato testado estimulou o crescimento, não apresentou IC.

Se T>=T_0 mas <C, o extrato testado foi citostático.

A equação utilizada para cálculo do crescimento foi:

$$\text{Crescimento} \quad 100 \times \frac{[T-T_0]}{(C-T_0)}$$

Sendo que T é a média da absorbância da célula tratada; C é o controle de célula; T_0 é o controle das células no dia da adição das amostras.

4.3.7 Ensaio de Citotoxicidade

O ensaio de citotoxicidade com linhagem humana hepatócita ($HepG_2$) foi realizado seguindo-se o protocolo descrito por Wolfe & Liu (2007). Esta linhagem foi cedida pela "The American Type Culture Collection, ATCC, Rockville, MD".

As células hepatócitas ($HepG_2$) cresceram em meio de cultura (WME suplementado com 5% Soro Bovino Fetal, 10 mM Hepes, 2 mM L-glutamina, 5 μg/mL insulina, 0.05 μg/mL hidrocortisona, 50 unidades/mL penicilina, 50 μg/mL estreptomicina, e 100 μg/mL gentamicina) e foram mantidas a 37°C e 5% CO_2.

Para o teste de citotoxicidade, 100 µL de células $HepG_2$ em meio de cultura foram plaqueadas na densidade de 4×10^4 células/compartimento em placa de 96 compartimentos e incubadas por 24 horas a 37°C. O meio foi removido e as células lavadas com 100 µL de tampão PBS. Foram adicionados 100 µL de extrato de frutas em meio completo e a placa foi incubada a 37 °C por 24 horas.

Após este período as células foram lavadas com PBS e passaram pelo método de coloração por Azul de metileno. Um volume de 50 µL por poço de solução de corante azul de metileno foi aplicado e a placa foi incubada a 37 °C por 1 hora. O corante foi removido e a placa foi imersa em água destilada repetindo-se o procedimento 6x ou até que a água estive limpa. A água foi retirada totalmente dos poços. Acrescentou-se 100 µL de tampão de eluição (50% etanol, 49% PBS e 1% ácido acético) em cada um dos poços.

A placa foi agitada por 20 minutos para dissolução uniforme. A absorbância foi lida a 570 nm, subtraindo-se o valor do branco.

A concentração do extrato de frutas que apresentou decaimento no valor da absorbância acima de 10% quando comparada com o controle foi considerada citotóxica.

4.3.8 Medida de proliferação celular

O ensaio antiproliferativo com linhagem humana hepatócita ($HepG_2$) foi realizado seguindo-se o protocolo descrito por Liu et al. (2002).

Células $HepG_2$ foram mantidas em meio de cultura a 37°C em 5% CO_2 em uma estufa. Uma suspensão celular de 100 µL na densidade de 2,5 x 10^4 células por mL de células em meio completo foi plaqueada em cada poço da placa transparente de 96 poços. Após 4 horas, o meio completo foi removido e um meio contendo várias concentrações do extrato de fruta foi adicionado às células.

Após 72 horas de incubação as células foram lavadas com PBS. Foi realizado o protocolo de coloração por azul de metileno descrito no ensaio de Citotoxicidade.

O teste antiproliferativo foi realizado apenas para as concentrações de extratos que não apresentaram níveis de citotoxicidade contra as células $HepG_2$.

4.3.9 Atividade Antioxidante Celular (CAA)

O ensaio da atividade antioxidante celular com linhagem humana hepatócita ($HepG_2$) foi realizado seguindo-se o protocolo descrito por Wolfe & Liu (2008).

Um volude de 100 µL de células foram incubadas a uma densidade de 6×10^4 células/compartimento em microplaca estéril preta de 96 poços em meio de cultura. 24 horas após a incubação, o crescimento de células excessivo foi removido através da lavagem dos compartimentos da placa com PBS. As células foram tratadas em triplicata, por 1 hora, com 100 *µ*L de meio contendo o extrato de frutas mais 25 *µ*M de *DCFH-DA* (*2',7'-dichlorofluorescein diacetate, Sigma*). Os poços foram lavados com 100 *µ*L de PBS. Então 600 *µ*M de *ABAP* (2,*2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride, Wako Chemicals*) foi aplicado às células em 100 *µ*L de HBSS (*Hanks' Balanced Salt Solution*, + 10 mM Hepes, Gibco). A placa foi colocada em um leitor de fluorescência a 37°C, com filtros de emissão a 538 nm e excitação a 485 nm, a leitura foi realizada a cada 5 minutos por 1 hora.

Após a subtração do branco e subtração inicial os valores da fluorescência, a área abaixo da curva de fluorescência em função do tempo foi integrada para o cálculo do valor do *CAA*.

$$\text{Unidade de } CAA = 1 - \frac{\int SA}{\int CA}$$

Onde, ∫SA representou a área integrada da amostra em função do tempo e ∫CA a área integrada da curva controle.

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os resultados foram descritos como média ± desvio padrão da triplicata analisada. Os dados foram analisados pelo programa estatístico SAS 9.1.3 Service Pack 3 XP-Pro Platform statistical software. Diferença entre os grupos foi determinada pelo "one-way ANOVA" usando o teste de Tukey. $P < 0,05$ foi considerado significante. O teste de mutagenicidade (Ensaio de Micronúcleos) foi analisado pelo método estatístico Qui-quadrado com significância de $p<0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ENSAIOS *IN VITRO*

5.1.1 Fenóis totais

O método Folin Ciocalteau é comumente utilizado na determinação de componentes fenólicos em extratos de plantas e sucos (STRATIL et al., 2007). Ele é baseado na redução dos reagentes pelos componentes fenólicos totais presentes nas

amostras, até a formação concomitante de um complexo com coloração azul, cuja intensidade aumenta linearmente a 760nm (ROESLER et al., 2007).

A análise de fenóis totais é importante por ser o primeiro indicativo quanto ao possível potencial antioxidante de um extrato porque a funcionalidade de frutas está intimamente relacionada com a presença dos compostos fenólicos. Logo uma alta concentração de fenóis aumentará as chances de um maior potencial antioxidante.

A quantificação de fenóis totais nas frutas do Cerrado, Guapeva (semente, casca, polpa), Murici e Gabiroba, foi realizada pelo método de Folin Ciocalteau para os extratos extraídos com água e etanol 95%. Foi construída uma curva padrão com o Ácido gálico, e esta apresentou R^2 de 0,9884 (Figura 10).

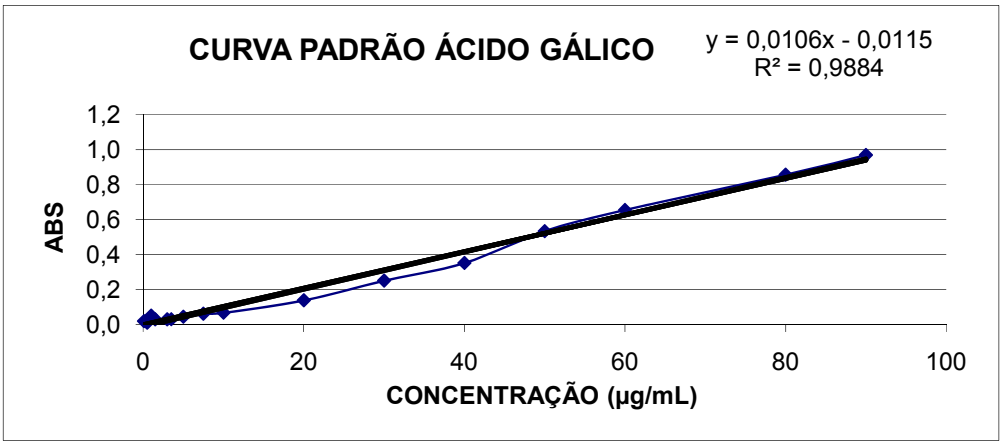

Figura 10. Curva do padrão Ácido Gálico para ensaio de Fenóis Totais

Os resultados obtidos na análise de fenóis totais estão descritos na Tabela 7.

Tabela 7. Resultados para extrações aquosa e etanólica no ensaio *in vitro* de Fenóis Totais

FENÓIS TOTAIS (mg ácido gálico/100g de fruta fresca)		
	Extração etanólica	**Extração aquosa**
Gabiroba	4610,46 ± 2,77 ^{aA}	2000,26 ± 2,82 ^{fB}
Guapeva casca	2116,62 ± 2,52 ^{bA}	689,11 ± 4,21 ^{gB}
Guapeva semente	1204,96 ± 0,56 ^{cA}	267,06 ± 0,20 ^{hB}
Guapeva polpa	523,22 ± 0,73 ^{dA}	202,59± 0,76 ^{iB}
Murici	790,31 ± 1,52 ^{eA}	246,15 ± 0,08 ^{iB}

Análise estatística pelo método Tukey, com $p<0,05$. Letras minús culas foram usadas na comparação vertical (entre o mesmo tipo de extração) e letras maiúsculas na comparação horizontal (entre as duas extrações realizadas).

Após análise estatística comparando as duas extrações realizadas observou-se que extração etanólica mostrou-se mais eficiente para todas as frutas analisadas quando comparada com a aquosa, havendo diferença estatística ($p<0,05$) entre elas. No estudo realizado anteriormente por Roesler et al. (2006), foi demonstrado a mesma eficiência da extração etanólica quando comparada com a aquosa para frutas.

Dentre as frutas estudadas, a que mais se destacou na quantidade de fenóis totais extraídos com etanol foi a Gabiroba, apresentando concentração de 4610,46 ± 2,77 mg de ácido gálico por 100 gramas de fruta fresca. Este valor é maior que o dobro da concentração de fenóis totais obtido para a segunda fruta, a Guapeva casca, que apresentou 2116,62 ± 2,52 mg de ácido gálico por 100 gramas de fruta fresca. Seguindo a ordem decrescente de concentração de fenóis totais das frutas analisadas extraídas com etanol, temos a Guapeva semente, Murici e por último a Guapeva polpa.

Na extração aquosa a Gabiroba também se destacou na concentração destes compostos, apresentando 2000,26 ± 2,82 mg de ácido gálico por 100 gramas de fruta fresca. Sendo seguida pela Guapeva casca, Guapeva semente e por último, a Guapeva polpa e Murici, que são estatisticamente iguais ($p<0,05$). Ou seja, apesar de uma concentração menor, observou-se a mesma ordem.

A fruta Guapeva foi separada em semente, casca e polpa, e a fração que apresentou maior concentração de fenóis totais foi a casca, sendo seguida pela semente e por último a polpa. A presença de uma maior concentração de componentes fenólicos na casca também foi verificado em estudo realizado com outras frutas do Cerrado, como Banha de Galinha, Cagaita, Pequi, Araticum e Lobeira (ROESLER et al., 2006; ROESLER et al., 2007).

Ao comparar os resultados das frutas analisadas com outras previamente descritas na literatura por Wolfe & Liu (2008) (Figura 11), observa-se uma diferença no que se refere à concentração de fenóis totais entre as frutas do Cerrado brasileiro avaliadas neste trabalho com as frutas consumidas nos Estados Unidos. Todos os extratos etanólicos de Guapeva (semente, casca e polpa), Murici e Gabiroba apresentaram resultados de fenóis totais maiores que a melhor fruta descrita por Wolfe & Liu (2008). A Gabiroba apresentou concentração de fenóis totais 11 vezes maior que a Wild blueberry e Blackberry. Ainda comparando as frutas americanas com os extratos aquosos do Cerrado, a Gabiroba e Guapeva casca também apresentaram resultados mais relevantes.

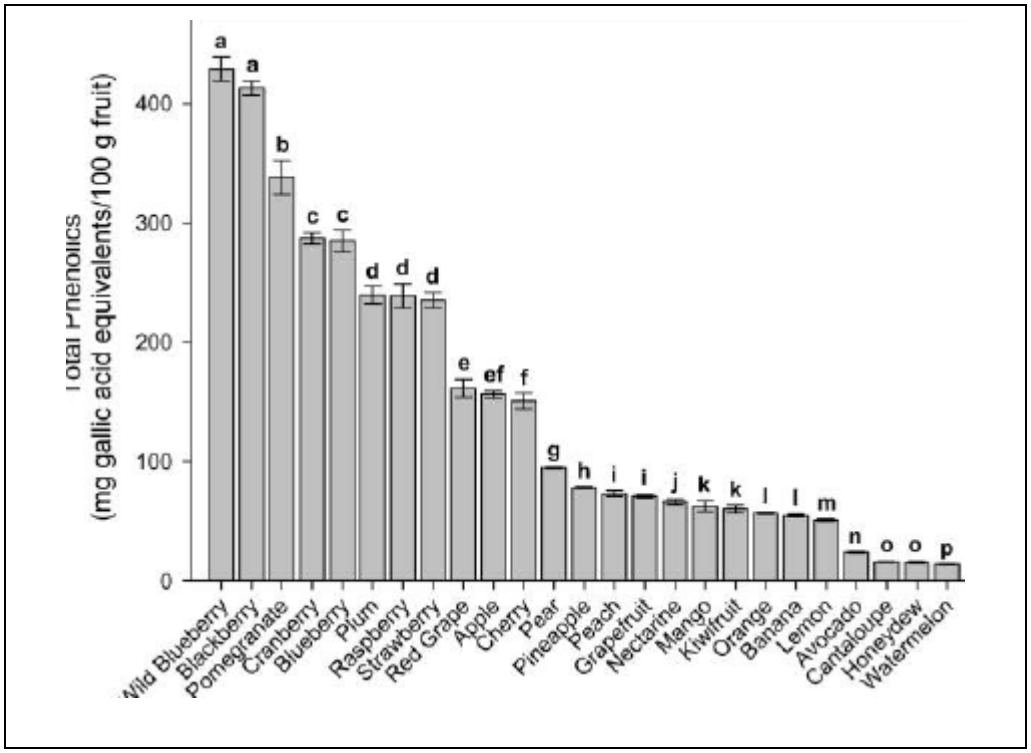

Figura 11. Fenóis Totais para frutas consumidas nos Estados Unidos (WOLFE & LIU, 2008)

Comparando os extratos do Cerrado com algumas variedades da fruta Raspberry (Tabela 8), analisados por Liu et al. (2002), verificou-se que a variedade desta fruta com maior concentração de fenóis totais, a Heritage, apresentou 512,7 ± 4,7 mg de ácido gálico equivalentes por 100 g de fruta fresca, valor inferior aos resultados encontrados no presente estudo pelos extratos etanólicos Gabiroba, casca e semente da Guapeva e extrato aquoso da Gabiroba.

Tabela 8. Determinação de cor, fenóis totais (mg de ácido gálico/ 100 g fruta), flavonóides totais (mg de catequina/100 g fruta), antocianinas e sensor optico para variedades de Raspberries, determinados por Liu et al. (2002)

RASPBERRY **VARIEDADES**	**COR**	**FENÓIS TOTAIS**	**FLAVONÓIDES TOTAIS**	**ANTOCIANINAS**	**SENSOR OPTICO a/b**
Heritage	Vermelho escuro	512,7 ± 4,7	103,4 ± 2,0	57,60 ± 0,76	4,92
Kiwigold	Rosa escuro	451,1 ± 4,5	87,3 ± 1,8	2,56 ± 0,03	2,84
Goldie	Rosa escuro	427,5 ± 7,5	84,2 ± 1,8	4,56 ± 0,1	2,24
Anne	Amarelo	359,2 ± 3,4	63,5 ± 0,7	0,17 ± 0,02	0,18

5.1.2 Flavonóides totais

O conteúdo de flavonóides totais foi determinado usando o método colorimétrico descrito por Dewanto, et al 2002. Os extratos etanólicos foram diluídos em Tetrahidrofurano (THF) e Etanol (1:1).

Foi preparada uma curva padrão de Catequina, variando – se a concentração de 2,5 a 8,0 mM em THF:EtOH (1:1). Observa-se a curva da Catequina utilizada para quantificação dos flavonóides nos cinco extratos de frutas do Cerrado analisados (Figura 12).

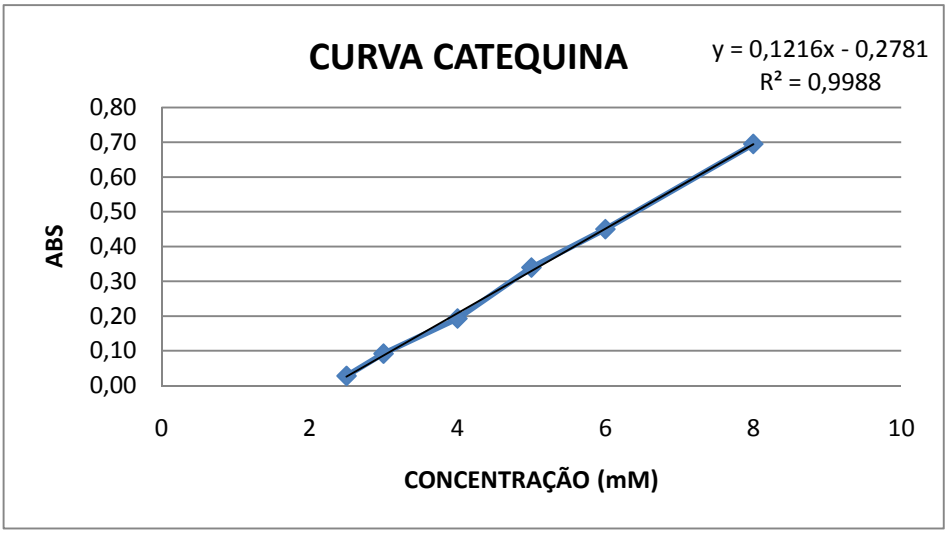

Figura 12. Curva do padrão Catequina para ensaio de Flavonóides totais

Os resultados para flavonóides totais encontram-se resumidos na Tabela 9.

Tabela 9. Determinação de flavonóides totais nos cinco extratos etanólicos avaliados: Gabiroba, Guapeva (casca, semente e polpa) e Murici

FLAVONÓIDES TOTAIS (mg de catequina/100g de fruta fresca)	
	Extração etanólica
Gabiroba	905,01 ± 58,72 [a]
Guapeva casca	1277,65 ± 38,61 [b]
Guapeva semente	2915,63 ± 49,35 [c]
Guapeva polpa	790,35 ± 2,07 [a]
Murici	802,89 ± 31,22 [a]

Análise estatística pelo método Tukey, com $p<0,05$. Letras minúsculas foram utilizadas na comparação entre os extratos analisados.

Dentre os extratos analisados, a maior concentração de flavonóides totais foi encontrado na Guapeva semente, com concentração de 2915,63 ± 49,35 mg de Catequina por 100 gramas de fruta fresca, sendo seguida pelo extrato da Guapeva casca

que apresentou 1277,65 ± 38,61 mg de Catequina por 100 gramas de fruta fresca. Não foi observada diferença significativa nos resultados apresentados pela polpa da fruta Guapeva, Gabiroba e Murici. Este grupo de extratos apresentou o terceiro melhor valor para a concentração de flavonóides totais.

Ao comparar os resultados obtidos das frutas do Cerrado com algumas variedades da fruta Raspberry, analisados por Liu et al. (2002), observa-se que a concentração de flavonóides totais das frutas brasileiras analisadas é mais do que o maior valor para as Raspberries.

5.1.3 2,2- Diphenyl – 1- picrylhydrazil (DPPH)

O teste *DPPH* é um dos mais antigos e mais frequentemente usados para a determinação da capacidade antioxidante em extratos de alimentos. O decaimento na absorbância do *DPPH* quando este está na presença de um antioxidante, indica a transferência do átomo de hidrogênio e isso pode ser visualizado pela mudança da cor de violeta para amarelo (SUN, et al., 2007).

Existem algumas formas de se apresentar os resultados obtidos por este ensaio. Uma delas é analisar uma concentração conhecida do extrato e utilizar uma curva padrão (*Trolox*, Ácido Gálico, Ácido Clorogênico, Ácido Ferrúlico, entre outros) representando o resultado final como concentração do padrão por peso de fruta (SUN et al., 2007). Outra forma é analisar diferentes concentrações do mesmo extrato, e determinar a concentração necessária para a redução de 50% do radical *DPPH* (IC_{50}) (ROESLER et al., 2006).

Foram realizados os dois procedimentos no ensaio *DPPH* com as frutas Guapeva (semente, casca e polpa), Murici e Gabiroba, sendo os resultados apresentados como µM *Trolox* equivalentes por 100 gramas de fruta fresca e como IC_{50} (µg/mL de fruta fresca). Além disso, a reação entre os extratos e o radical foi observada em três tempos diferentes, 30, 60 e 90 minutos (Tabela 10).

Tabela 10. Determinação da atividade antioxidante in vitro pelo método *DPPH - Trolox* nos cinco extratos etanólicos avaliados: Gabiroba, Guapeva (casca, semente e polpa) e Murici

		DPPH - Trolox *(*µM *Trolox* **equivalentes / 100 gramas de fruta fresca)**		
		30 minutos	**60 minutos**	**90 minutos**
Extração Aquosa	**Gabiroba**	1850,50 ± 2,57 ^{aA}	1828,25 ± 0,73 ^{aA}	1808,25 ± 0,25 ^{aA}
	Guapeva casca	120,45 ± 0,36 ^{b}	296,59 ± 0,24 ^{d}	326,14 ± 0,85 ^{b}
	Guapeva semente	52,89 ± 0,13 ^{c}	372,73 ± 0,61 ^{eD}	357,02 ± 0,30 ^{bD}
	Guapeva polpa	661,76 ± 1,02 ^{d}	847,44 ± 0,58 ^{b}	952,76 ± 1,23 ^{c}
	Murici	5,00 ± 0,08 ^{eB}	60,00 ± 0,21 ^{c}	5,25 ± 0,05 ^{dB}
Extração Etanólica	**Gabiroba**	2018,80 ± 2,05 ^{aE}	2015,24 ± 1,27 ^{aE}	2006,61 ± 3,29 ^{aE}
	Guapeva casca	3015,04 ± 0,12 ^{fF}	3014,78 ± 1,57 ^{fF}	3003,03 ± 1,13 ^{eF}
	Guapeva semente	23,14 ± 0,04 ^{g}	64,41 ± 1,78 ^{c}	106,50 ± 0,54 ^{f}
	Guapeva polpa	757,25 ± 0,34 ^{h}	858,53 ± 1,48 ^{bG}	928,94 ± 0,85 ^{gG}
	Murici	450,72 ± 0,02 ^{i}	568,05 ± 0,21 ^{g}	646,14 ± 0,53 ^{h}

Análise estatística pelo método Tukey, com $p<0,05$. Letras minúsculas foram usadas na comparação vertical entre as duas extrações realizadas e letras maiúsculas na comparação horizontal entre os 3 diferentes tempos de reação.

O tempo em que a maioria dos autores, como Roesler et al. (2006), realizaram a leitura foi de 30 minutos de reação. Neste tempo os extratos etanólicos apresentaram resultado superior, com diferença estatística ($p<0,05$) em relação aos extratos aquosos. Roesler et al. (2006) também observou em seu trabalho com frutas do Cerrado maior eficiência na extração etanólica.

Nos três tempos de reação analisados, neste trabalho não houve diferença significativa para o extrato que apresentou maior potencial antioxidante, que foi o etanólico da casca da Guapeva com valores de 3015,04 ± 0,12, 3014,78 ± 1,57 e 3003,03

± 1,13 µM *Trolox* equivalentes por 100 gramas de fruta fresca para 30, 60 e 90 minutos respectivamente. Os extratos etanólico e aquoso da Gabiroba apresentaram potencial antioxidante inferior apenas ao do extrato etanólico da casca da Guapeva. Não foi observada diferença estatística nos resultados para as duas extrações assim como nos três diferentes períodos de reação para a Gabiroba.

Melo et al. (2006) analisaram algumas verduras no ensaio de *DPPH*, como alface, cebola, cenoura, couve-flor, tomate, entre outros, e observaram um aumento do potencial com o passar do tempo. Este fato também foi observado no presente trabalho nos extratos aquosos da casca, polpa e semente da Guapeva como também nos extratos etanólicos da semente e polpa da Guapeva e Murici.

Ao comparar os resultados da análise de Fenóis Totais com os resultados do *DPPH* - *Trolox* verificou-se que a proporção esperada, ou seja, quanto maior a concentração de compostos fenólicos nos extrato, maior a capacidade antioxidante (*DPPH*) foi verificada apenas para os extratos de Gabiroba e Guapeva casca. E, assim como na análise de Fenóis totais, também foi verificado no ensaio *DPPH* - *Trolox* que a extração etanólica foi mais eficiente que a aquosa em todos os extratos analisados.

O ensaio *DPPH* que apresenta os resultados como IC_{50} é o mais conhecido na literatura, o que facilita a comparação dos dados. Os resultados obtidos pelo ensaio *DPPH* (IC_{50}) estão descritos na Tabela 11. Os gráficos obtidos no mesmo ensaio aparecem nas Figuras 13 a 19.

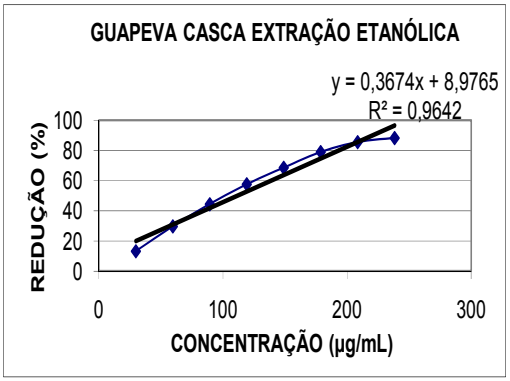

Figura 13. Gráfico de *DPPH* IC_{50} para Guapeva casca extração etanólica

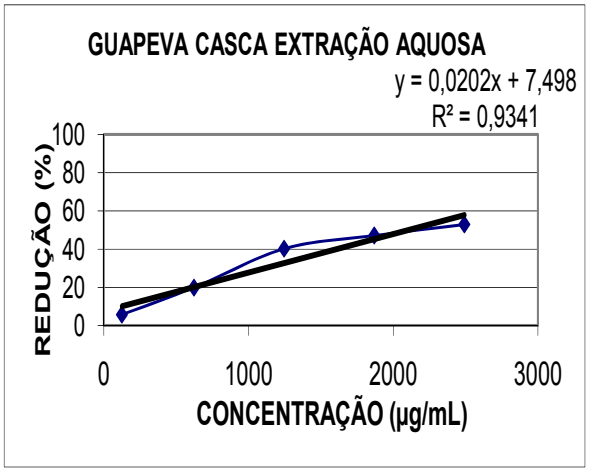

Figura 14.Gráfico de *DPPH* IC_{50} para Guapeva casca extração aquosa

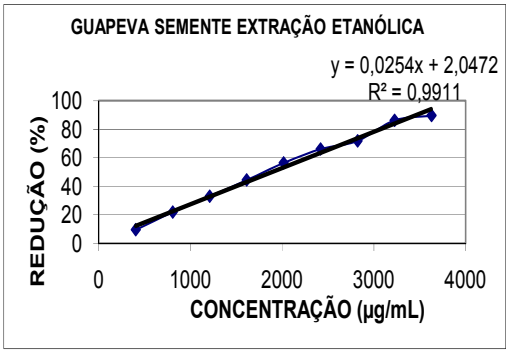

Figura 15. Gráfico de *DPPH* IC_{50} para Guapeva semente extração etanólica

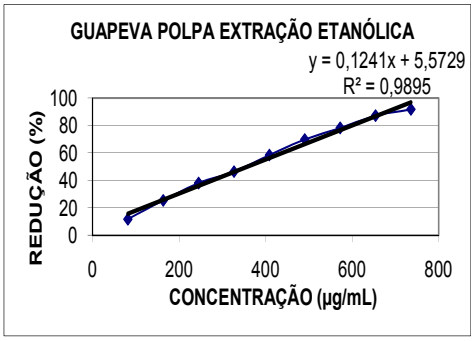

Figura 16. Gráfico de *DPPH* IC_{50} para Guapeva polpa extração etanólica

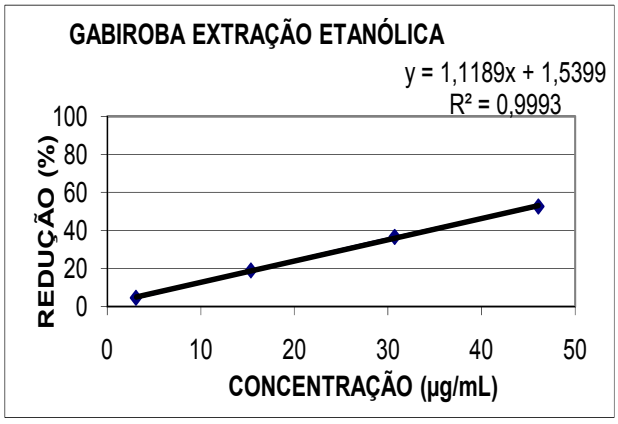

Figura 17. Gráfico de *DPPH* IC_{50} para Gabiroba extração etanólica

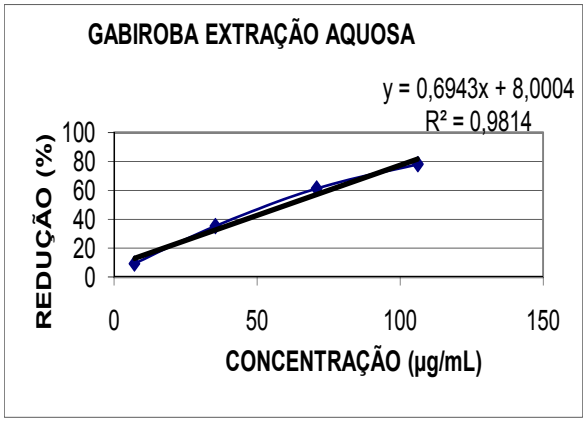

Figura 18. Gráfico de *DPPH* IC_{50} para Gabiroba extração aquosa

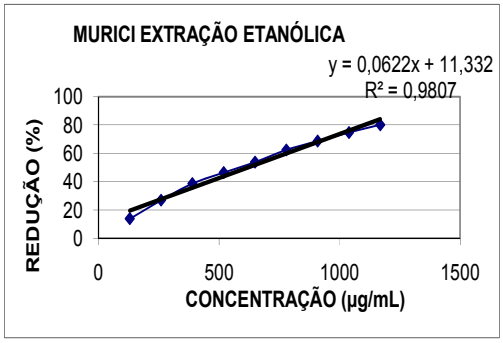

Figura 19. Gráfico de *DPPH* IC_{50} para Murici extração etanólico

Foram utilizadas diferentes concentrações para cálculo do IC_{50} para os extratos de frutas do Cerrado (Figura 13 a 19). Isso foi necessário devido ao diferente potencial antioxidante apresentado por cada um, logo, quanto maior a concentração utilizada menor a capacidade do extrato.

Tabela 11. Determinação da atividade antioxidante *in vitro* pelo método *DPPH – IC$_{50}$* nos cinco extratos avaliados: Gabiroba, Guapeva (casca, semente e polpa) e Murici

	***DPPH* - IC$_{50}$ (µg/mL de fruta fresca)**	
	Extração etanólica	**Extração aquosa**
Gabiroba	11,10 ± 1,01 ^{aA}	15,12 ± 1,06 ^{aB}
Guapeva casca	41,57 ± 1,23 ^{bA}	797,00 ± 71,57 ^{bB}
Guapeva semente	1560,27 ± 12,59 ^{c}	n.d.
Guapeva polpa	72,31 ± 1,36 ^{d}	n.d.
Murici	155,42 ± 1,23 ^{e}	n.d.

Análise estatística pelo método Tukey, com p<0,05. Letras minúsculas foram usadas na comparação vertical entre as frutas de mesma extração e letras maiúsculas na comparação horizontal entre as duas extrações realizadas. n.d., não determinado.

O extrato etanólico da Gabiroba apresentou melhor potencial antioxidante dentre os extratos estudados, com IC$_{50}$ de 11,10 ± 1,01 µg/mL de fruta fresca, sendo seguida pelo extrato aquoso da Gabiroba com IC$_{50}$ e 15,12 ± 1,06 µg/mL de fruta fresca (Tabela 11).

Para os extratos aquosos de semente e polpa da Guapeva e Murici não foi realizado teste *DPPH* - IC$_{50}$ para determinação do potencial antioxidante. Tal fato se justifica pela necessidade de uma concentração muito alta de extrato (acima de 4500 µg/mL; 14000 µg/mL e 10000 µg/mL respectivamente) para que houvesse redução de no mínimo 50% do radical *DPPH*. Foram testadas diferentes concentrações, no entanto o potencial de redução não aumentou proporcionalmente com o incremento na concentração do extrato.

Para as frutas Gabiroba e casca da Guapeva foi observado, assim como nos ensaios de fenóis totais e *DPPH-Trolox*, que a extração aquosa não foi tão eficiente quanto a etanólica.

As frutas analisadas não apresentaram resultados semelhantes para os dois ensaios *DPPH* realizados (IC$_{50}$ e *Trolox*).

De acordo com Stratil et al. (2007), deve haver uma proporcionalidade entre os resultados de fenóis totais e *DPPH* (IC_{50}) e no presente estudo, ao comparar estes dois experimentos. Observou-se um R^2 de 0,8989.

Okonogi et al. (2007) apresentou em seu trabalho os resultados de *DPPH* (IC_{50}) para alguns extratos etanólicos de frutas, com destaque para a Romã, com IC_{50} de 3 ± 0,003 µg/mL e a Banana, 31 ± 0,004 µg/mL. A melhor fruta do Cerrado analisada apresentou resultado do potencial antioxidante medido pelo ensaio *DPPH* intermediário à estes dois, demonstrando um grande potencial desta fruta brasileira.

Para fins de comparação, foi calculado também o IC_{50} (µg/mL) para alguns padrões, que estão resumidos na Tabela 12.

Tabela 12. Determinação da atividade antioxidante *in vitro* pelo método *DPPH* – IC_{50} para padrões antioxidantes

PADRÃO	**IC_{50} (µg/mL)**
Ácido ascórbico	7,67 ± 0,28
Ácido cafeico	1,87 ± 0,11
Ácido ferrúlico	9,96 ± 0,18
Ácido gálico	1,64 ± 0,04
Quercetina	3,11 ± 0,01
Rutina	7,56 ± 0,07

5.1.4 Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC)

O método *TEAC* é um dos mais utilizados para a determinação da capacidade antioxidante total, pode ser usado em matrizes biológicas, como plasma, como também em componentes alimentares ou extratos de alimentos (VAN DEN BERG & HAENEN, 1999; ARTS et al., 2004).

O padrão *Trolox* é frequentemente usado para a calibração deste método. O ensaio é baseado na neutralização do radical cátion *ABTS*$^{\cdot+}$ formado pela oxidação deste radical (SCHLESIER et al., 2002).

Uma vantagem do teste *TEAC* sobre o *DPPH*, é que a cor não interfere na análise, logo amostras muito escuras podem apresentar uma atividade antioxidante menor que a verdadeira no ensaio *DPPH*. No *TEAC*, a absorbância é medida a 734 nm e o tempo de reação é menor quando comparado ao *DPPH* (*TEAC* leitura após 6 minutos e no *DPPH* após 30 minutos) (TEOW et al., 2007).

O ensaio *TEAC* foi realizado com amostras hidrofílicas (extraídas com água e etanol) e preparadas com o mesmo solvente da extração e amostras lipofílicas (extraídas com hexano) e preparadas com 7% *Randomly Methylated* β *- Cyclodextrin*, Cyclodex (*RMCD*). Para as amostras hidrofílicas, o radical *ABTS* foi dissolvido em água e para as lipofílicas, em etanol.

O método original realiza leituras após 6 minutos de reação, mas também foi realizada a leitura após 30 minutos com o objetivo de verificar se o potencial antioxidante aumentaria após a leitura inicial.

Foram construídas curvas do padrão *Trolox*, análogo da vitamina E, variando a concentração de 0 a 40 μM. Para cada tempo de reação e solvente do radical foi construída uma curva individual, apresentadas nas Figuras 20 a 23.

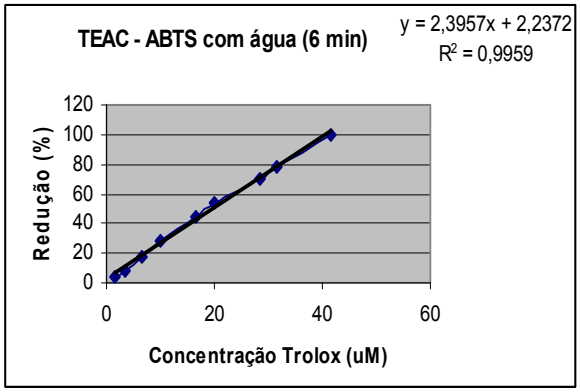

Figura 20. Gráfico *TEAC – ABTS* / água – 6 minutos

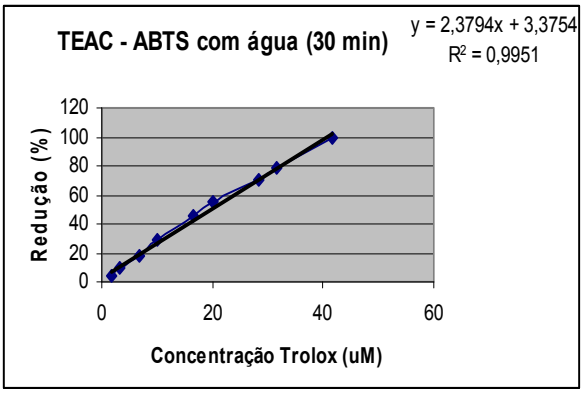

Figura 21. Gráfico *TEAC – ABTS* / água – 30 minutos

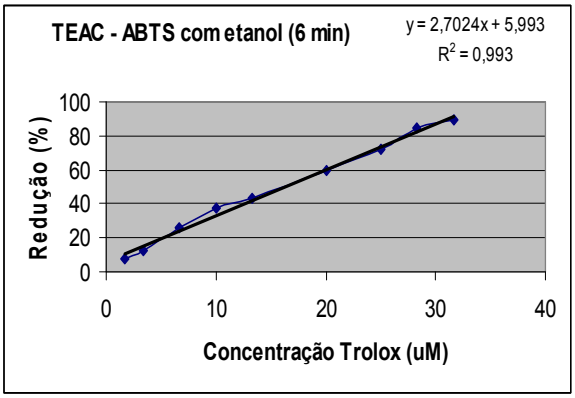

Figura 22. Gráfico *TEAC – ABTS* / etanol – 6 minutos

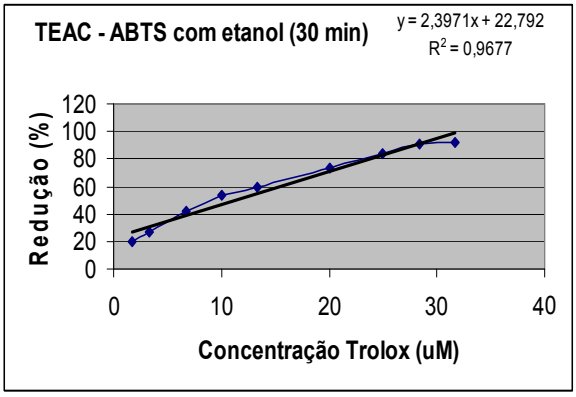

Figura 23. Gráfico *TEAC – ABTS* / etanol – 30 minutos

Na Tabela 13 estão resumidos os resultados do ensaio *TEAC*, nos dois tempos de reação, 6 e 30 minutos, para os diferentes extratos.

Tabela 13. Determinação da atividade antioxidante *in vitro* pelo método *TEAC* nos cinco extratos avaliados: Gabiroba, Guapeva (casca, semente e polpa) e Murici

		TEAC *(***µM *Trolox* equivalentes por 100 gramas de fruta fresca)**	
		6 minutos	**30 minutos**
Extração Aquosa	**Murici**	361,50 ± 0,20 ^{cA}	475,00 ± 2,41 ^{cA}
	Guapeva casca	778,79 ± 0,22 ^{dA}	992,80 ± 0,92 ^{dB}
	Guapeva semente	709,92 ± 0,19 ^{eA}	965,29 ± 0,33 ^{aB}
	Guapeva polpa	720,25 ± 0,16 ^{fA}	756,44 ± 0,07 ^{eB}
	Gabiroba	987,75 ± 0,01 ^{gA}	982,75 ± 0,02 ^{fB}
Extração Etanólica	**Murici**	717,00 ± 0,05 ^{bA}	857,50 ± 0,03 ^{gB}
	Guapeva casca	1543,56 ± 0,26 ^{aB}	1516,29 ± 0,26 ^{bB}
	Guapeva semente	652,07 ± 0,36 ^{hA}	934,71 ± 0,49 ^{aB}
	Guapeva polpa	765,44 ± 0,01 ^{uA}	822,09 ± 0,03 ^{bB}
	Gabiroba	1014,25 ± 0,03 ^{aA}	1009,75 ± 0,05 ^{bA}
Extração Hexânica	**Murici**	703,50 ± 0,10 ^{bA}	748,50 ± 0,03 ^{hB}
	Guapeva casca	n.d.	n.d.
	Guapeva semente	n.d.	n.d.
	Guapeva polpa	n.d.	n.d.
	Gabiroba	27,50 ± 0,03 ^{jA}	n.d.

Análise estatística pelo método Tukey, com $p<0,05$. Letras minúsculas foram usadas na comparação vertical entre as três extrações realizadas e letras maiúsculas na comparação horizontal entre os dois tempos de reação. n.d., não determinado.

Ao comparar os extratos hidrofílicos extraídos com água e etanol 95%, verificou-se com exceção apenas da Guapeva semente, que os extratos etanólicos apresentaram maior potencial antioxidante, quando comparados com os aquosos. Os extratos que mais se destacaram foram os extratos etanólicos da casca da Guapeva casca e Gabiroba, apresentando respectivamente, 1543,56 ± 0,26 e 1014,25 ± 0,03 μM *Trolox* equivalentes por 100 gramas de fruta fresca, sem diferença estatística entre os dois. O extrato hidrofílico que apresentou menor potencial antioxidante, medido pelo teste *TEAC* foi o Murici aquoso, com atividade de 361,50 ± 0,20 μM *Trolox* equivalentes por 100 gramas de fruta fresca.

Mesmo com a utilização da *RMCD*, com o objetivo de determinar o potencial antioxidante dos compostos lipofílicos, apenas o Murici e a Gabiroba apresentaram potencial mensurável.

Ao comparar os dois tempos de reação analisados, no tempo de 30 minutos o potencial antioxidante foi maior para a maioria dos extratos, com exceção do Murici extrato aquoso, casca da Guapeva extração etanólica, Gabiroba extração etanólica que apresentaram resultado sem diferença significativa nos dois tempos de reação (6 e 30 minutos). Por outro lado, a Gabiroba extração aquosa apresentou um potencial maior no tempo de 6 minutos do que no de 30 minutos.

Thaipong et al. (2006) analisaram extratos de goiaba, com reação com radical *ABTS* durante 2 horas. Pode-se então observar após os dados obtidos no presente trabalho, que o radical utilizado neste método é bastante instável, e que as comparações com demais trabalhos devem ocorrer levando-se em consideração o tempo de reação, já que de maneira geral, o valor da atividade antioxidante pode aumentar com o tempo.

De acordo com Stratil et al. (2007), os resultados do método *TEAC* podem ser correlacionados com o ensaio de Fenóis Totais, e no presente estudo os extratos com

maiores teores de fenóis totais foram os mais ativos na avaliação por *TEAC*. Pode não ter ocorrido uma boa correlação numérica, mas qualitativamente todos os dados apresentados apontam que os extratos com maior potencial antioxidante são a Gabiroba e casca da Guapeva.

Uma comparação mais objetiva dos resultados dos métodos *TEAC* e *DPPH* poderia ser possível pela utilização de um padrão em comum para os mesmos métodos. Isso foi feito, pois os dois métodos foram analisados de acordo com uma curva padrão de *Trolox*, mas os resultados obtidos não se correlacionam. Isso pode ser explicado pelo fato de se utilizar radicais diferentes, tempo de reação diferente, mesmo que o mecanismo de reação para estes dois ensaios seja o mesmo (SILVA et al., 2007).

5.1.5 Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC)

A complexidade experimental e as limitações de se monitorar a cinética da reação de auto-oxidação conduziram ao desenvolvimento de um método mais conveniente para se avaliar a capacidade antioxidante de uma amostra (OU et al., 2001).

A presença dos antioxidantes resulta na inibição dos danos causados pelos radicais livres ao composto fluorescente. O efeito protetor de um antioxidante é medido pela área de decaimento da fluorescência (*AUC*) da amostra comparada com a área do branco em que não há presença de antioxidantes (OU et al., 2002).

O ensaio *ORAC* foi utilizado para determinar o potencial antioxidante dos extratos hidrofílicos (água e etanol 95%) e lipofílicos. Foram construídas duas curvas do padrão *Trolox*, uma para o ensaio hidrofílico e outra para o lipofílico, apresentadas nas Figuras 24

e 26. Nas Figuras 25 e 27 estão representadas as curvas de decaimento da fluorecência na presença de diferentes concentrações do padrão *Trolox*.

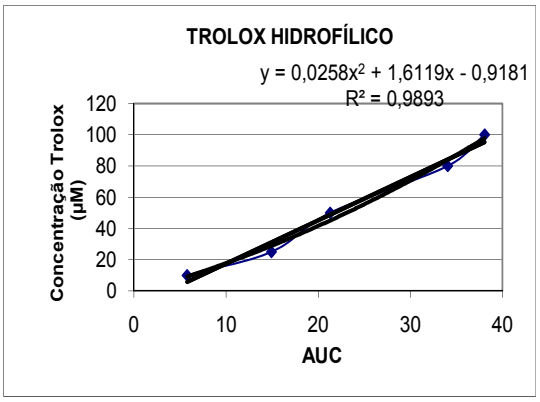

Figura 24. Gráfico com curva do padrão *Trolox* hidrofílico – Ensaio *ORAC*

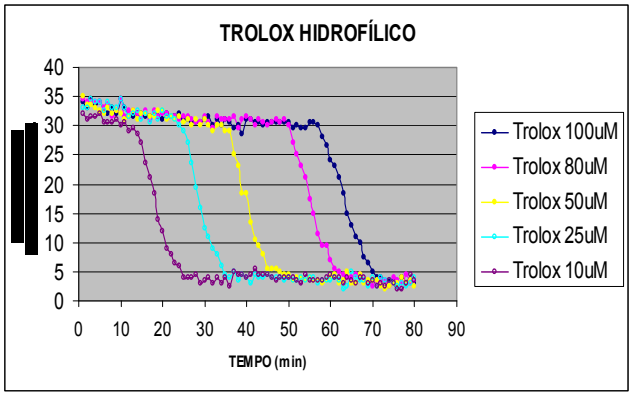

Figura 25. Gráfico com curvas de decaimento da fluorescência (*Trolox* hidrofílico) – Ensaio *ORAC*

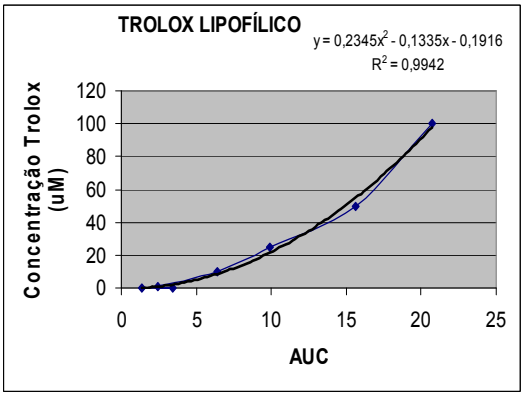

Figura 26. Gráfico com curva do padrão *Trolox* Lipofílico – Ensaio *ORAC*

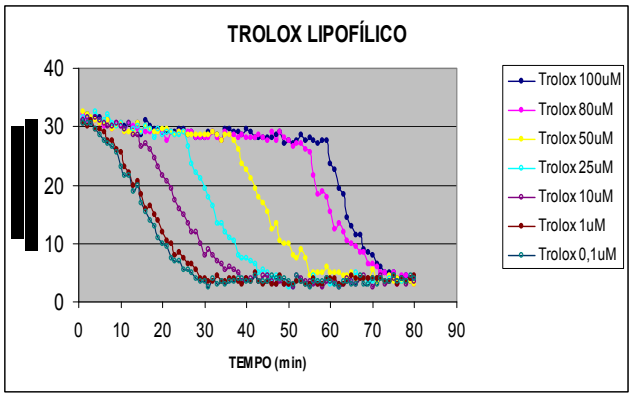

Figura 27. Gráfico com curvas de decaimento da fluorescência (*Trolox* lipofílico) – Ensaio *ORAC*

Na Tabela 14 encontram-se os resultados para o ensaio *ORAC* para as amostras hidrofílicas e lipofílicas.

Tabela 14. Determinação da atividade antioxidante *in vitro* pelo método *ORAC* nos cinco extratos avaliados: Gabiroba, Guapeva (casca, semente e polpa) e Murici

	ORAC **(µM *Trolox* equivalentes/ 100 gramas de fruta fresca)**		
	Extração etanólica	**Extração aquosa**	**Extração hexânica**
Gabiroba	43.780,00 ± 9,52 ^{bA}	2.649,58 ± 3,87 ^{aB}	42,50 ± 0,46 ^{aC}
Guapeva casca	3.781,06 ± 9,46 ^{aA}	2.739,01 ± 2,91 ^{aB}	8,33 ± 0,07 ^{bC}
Guapeva semente	8.695,87 ± 3,23 ^{cA}	4.852,89 ± 3,85 ^{bB}	33,06 ± 0,11 ^{cC}
Guapeva polpa	1.768,71 ± 5,52 ^{dA}	1.305,52 ± 3,89 ^{cB}	22,29 ± 0,52 ^{dC}
Murici	2.302,50 ± 2,61 ^{aA}	2.003,00 ± 4,18 ^{dB}	316,00 ± 0,10 ^{eC}

Análise estatística pelo método Tukey, com p<0,05. Letras minúsculas foram usadas na comparação vertical entre as frutas após cada extração e letras maiúsculas na comparação horizontal entre as frutas no mesmo tipo de extração.

Assim como no ensaio de Fenóis totais, *DPPH*, *TEAC*, no ensaio antioxidante *ORAC* a extração etanólica apresentou-se mais eficiente quando comparada com a aquosa. Todos os extratos etanólicos apresentaram resultados de *ORAC* maiores que os extratos aquosos, e houve diferença estatística entre eles.

O extrato etanólico que mais se destacou pelo potencial antioxidante medido pelo ensaio *ORAC* hidrofílico foi a Gabiroba etanólica apresentando resultado de 43780,00 ±

9,52 µM *Trolox* equivalentes por 100 gramas de fruta fresca, sendo seguida pela Guapeva semente. Não houve diferença estatística entre o Murici e a Guapeva casca. O menor valor de *ORAC* foi apresentado pela Guapeva polpa.

No *ORAC* hidrofílico o extrato aquoso que mais se destacou foi a Guapeva semente, que apresentou resultado de 4852,89 ± 3,85 µM *Trolox* equivalentes por 100 gramas de fruta fresca. O segundo melhor potencial foi apresentado pelos extratos Gabiroba e Guapeva casca, e os resultados para estas duas frutas não apresentaram diferença estatística.

Também foi analisado pelo ensaio *ORAC* a porção lipofílica, mesmo tendo conhecimento que a atividade antioxidante provem 85% dos compostos hidrofílicos, é interessante que se calcule o potencial dos compostos lipofílicos (PRIOR et al., 2003). Das frutas extraídas com hexano (extração lipofílica), a que apresentou melhor resultado foi o Murici com 316 ± 0,10 µM *Trolox* equivalentes por 100 gramas de fruta fresca como valor de *ORAC*.

No ensaio *ORAC* é comum que seja determinada a atividade antioxidante total (TAC), somando-se o resultado hidrofílico com o lipofílico. Como para todas as frutas do Cerrado analisadas no presente trabalho, a extração etanólica foi mais eficiente, como dito anteriormente, determinou-se que o valor do *ORAC* hidrofílico fosse assumido pelos resultados da extração etanólica. Logo, o valor de TAC para os extratos em ordem decrescente foi: Gabiroba, 43822,50; Guapeva semente, 8728,93; Guapeva casca, 3789,39; Murici, 2618,50 e Guapeva polpa, 1771,00 µM *Trolox* equivalentes por 100 gramas de fruta fresca.

Determinou-se também o potencial antioxidante no ensaio *ORAC* para alguns padrões antioxidantes. Os resultados estão descritos na Tabela 15.

Tabela 15. Resultados para padrões antioxidantes no ensaio antioxidante *in vitro ORAC*

***ORAC* – PADRÕES ANTIOXIDANTES (µM *Trolox* equivalentes / µM de padrão)**	
Catequina	16,83 ± 2,61
Ácido Clorogênico	5,42 ± 0,93
Quercetina	7,79 ± 2,02
Ácido Gálico	2,07 ± 0,85

Wu et al. (2004 b), realizaram o mesmo ensaio para diversas frutas comuns nos Estados Unidos. As que se destacaram, por possuírem altas concentrações de *Trolox* (TAC) foram: Blueberry (9260,00 µM TE/100g extrato), Cranberry (9456,00 µM TE/100g extrato) e Plums (ameixa) (7339,00 µM TE/100g extrato). Comparando estes valores de *ORAC* com as frutas do Cerrado analisadas, observou-se que as brasileiras apresentaram resultados bem maiores, logo, com maior potencial antioxidante.

O mesmo pode ser concluído após a comparação com as frutas analisadas por Wolfe & Liu (2008), descritas na Figura 28.

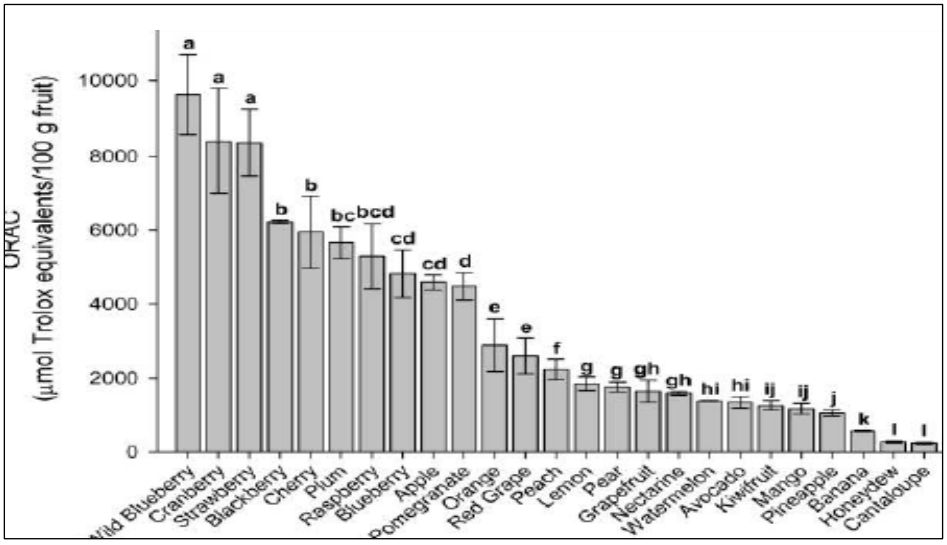

Figura 28. Resultado a partir do ensaio *in vitro ORAC* para frutas consumidas nos Estados Unidos (WOLFE & LIU, 2008)

5.1.6 Peroxyl Radical Scavenging Capacity (PSC)

O teste *PSC* é bastante sensível, rápido (tempo de reação de 40 minutos), de ampla abordagem (pois analisa amostras lipofílicas e hidrofílicas), além de ser um método simples (ADOM & LIU, 2005).

Para a determinação da atividade antioxidante *in vitro* foi realizada a análise *PSC* para os extratos etanólicos de frutas do Cerrado. Os resultados foram expressos em µM de Ácido ascórbico por 100 gramas de fruta fresca. Na Figura 29 está apresentada a curva do padrão catequina utilizada na quantificação do potencial antioxidante no método antioxidante *PSC*.

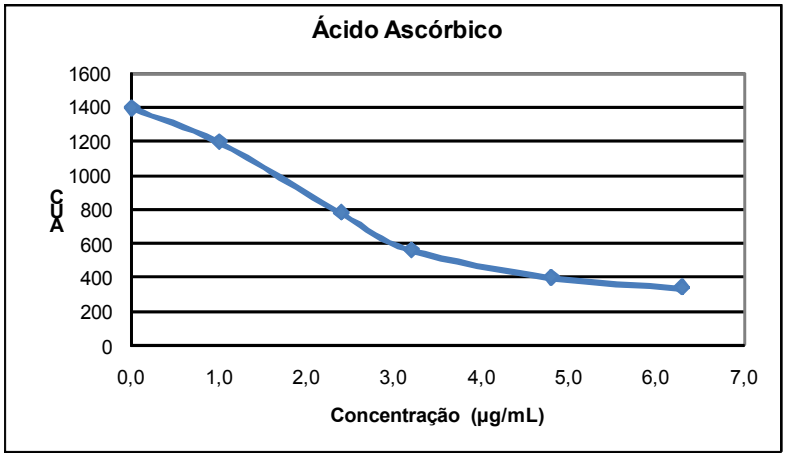

Figura 29. Curva Ácido ascórbico (*PSC*)

Já a Tabela 16 resume os resultados do ensaio antioxidante *in vitro PSC*.

Tabela 16. Resultados do ensaio *in vitro Peroxyl Radical Scavening Capacity* (*PSC*) para os extratos de frutas do Cerrado

	PSC ***(*µM Vitamina C / 100 gramas de fruta fresca)**
Murici	490,63 ± 86,36 [a]
Gabiroba	2342,52 ± 48,11 [b]
Guapeva semente	464,90 ± 43,44 [a]
Guapeva polpa	579,14 ± 109,36 [c]
Guapeva casca	920,82 ± 97,24 [d]

Neste ensaio a capacidade antioxidante da Gabiroba se destacou dentre os outros extratos analisados, esta fruta apresentou potencial de 2342,52 ± 48,11 µM de Vitamina C por 100 gramas de fruta fresca. O segundo melhor potencial foi da Guapeva polpa com valor de 579,14 ± 109,36 µM de Vitamina C por 100 gramas de fruta fresca. Não houve diferença significativa entre o Murici e a Guapeva semente.

Ao comparar os resultados das frutas do Cerrado analisadas com outras frutas descritas na literatura por Adom & Liu (2005) (Tabela 17), verifica-se que a fruta do Cerrado brasileiro analisada que apresentou melhor potencial antioxidante através do método PSC, a Gabiroba, possui capaciodade antioxidante *in vitro* similar ao observado para Uva (2108,9 ± 148,8 µM de Vitamina C por 100 gramas de fruta fresca). As demais frutas analisadas por Adom & Liu, 2005 apresentaram potencial abaixo da Gabiroba.

Tabela 17. Resultados para frutas analisadas através do ensaio *Peroxyl Radical Scavening Capacity -PSC* (ADOM & LIU, 2005)

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE HIDROFÍLICA				
AMOSTRAS	**FAIXA DE CONCENTRAÇÃO (mg/mL)**	**R^2**	**EC 50 (mg/mL) média ± desvio padrão**	**PSC (µmol Vitamina C/ 100 g fruta fresca)**
Maça	1,02 – 14,91	0,9995	3,03 ± 0,04	309,2 ± 3,63
Cranberry	0,38 – 5,58	0,9975	0,92 ± 0,10	1019,9 ± 104,4
Uva	0,12 – 1,81	0,9991	0,45 ± 0,03	2108,9 ± 148,8

5.1.7 Cromatografia Líquida de Alta eficiência (CLAE)

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência é uma ferramenta muito importante e eficiente na detecção e identificação de componentes presentes em extratos.

O processo de validação do método cromatográfico foi realizado nas mesmas condições da etapa de identificação e quantificação dos fenólicos presentes nos extratos de frutas do Cerrado.

A validação utilizada na pesquisa demonstrou que esse método é eficiente para a detecção e identificação de compostos fenólicos.

5.1.7.1 Linearidade

Para a determinação da linearidade foram utilizados os padrões Ácido Gálico, Catequina, Epicatequina, Etil Galato, Ácido Ferrúlico, Propil Galato, Resveratrol e Ácido Cinâmico. Cada um foi preparado em uma concentração diferente (Tabela 18) devido a intensidade de absorção.

Nas Figuras 30 a 37 estão apresentados os gráficos com as respectivas equações da reta e valores de R^2 para os padrões analisados durante a validação do método cromatográfico. Todos os padrões analisados no requisito linearidade apresentaram R^2 acima de 0,99.

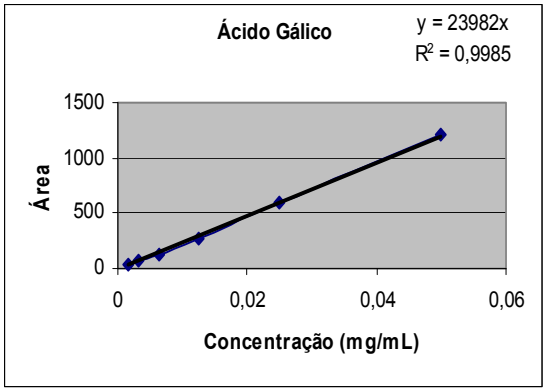

Figura 30. Gráfico de Linearidade para padrão Ácido Gálico (CLAE)

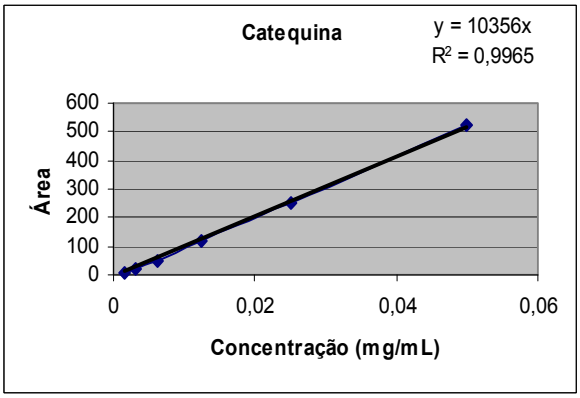

Figura 31. Gráfico de Linearidade para padrão Catequina (CLAE)

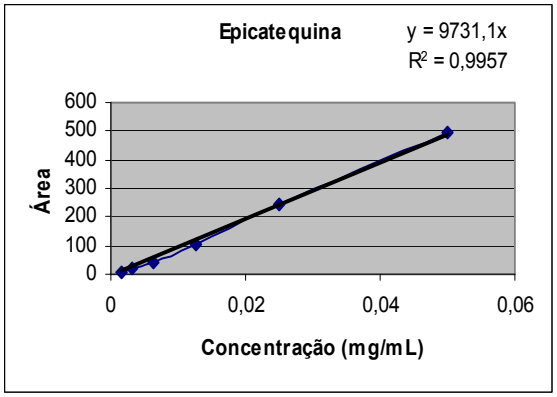

Figura 32. Gráfico de Linearidade para padrão Epicatequina (CLAE)

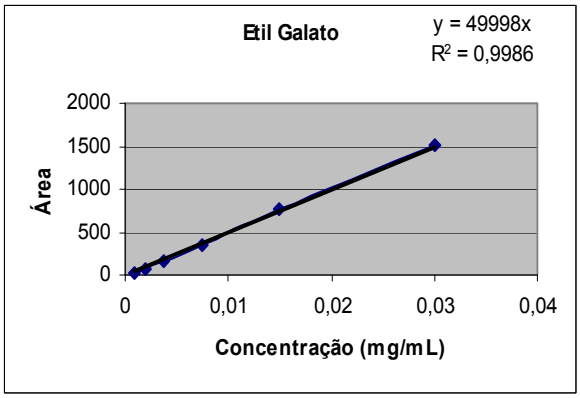

Figura 33. Gráfico de Linearidade para padrão Etil Galato (CLAE)

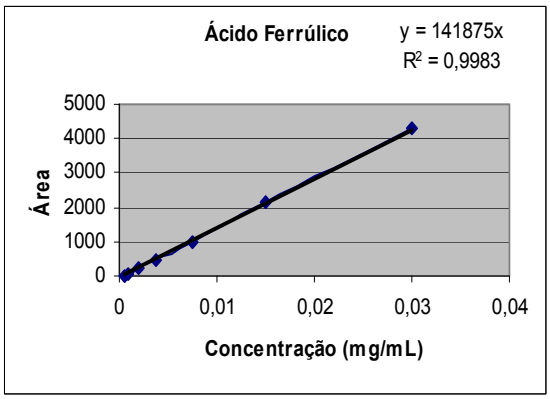

Figura 34. Gráfico de Linearidade para padrão Ácido Ferrúlico (CLAE)

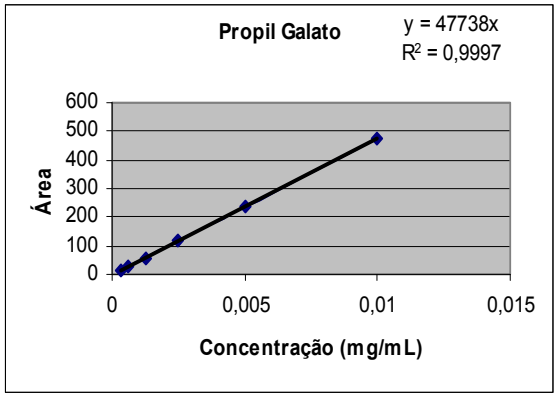

Figura 35. Gráfico de Linearidade para padrão Propil Galato – linearidade (CLAE)

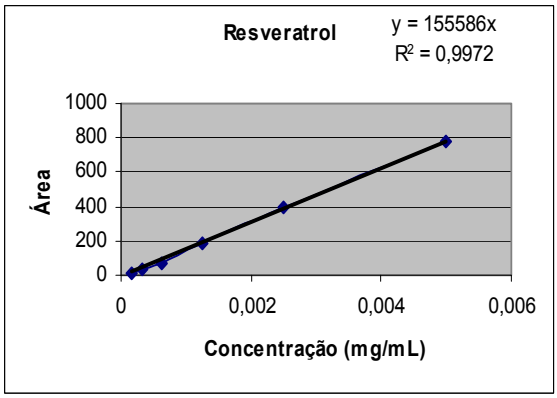

Figura 36. Gráfico de Linearidade para padrão Resveratrol (CLAE)

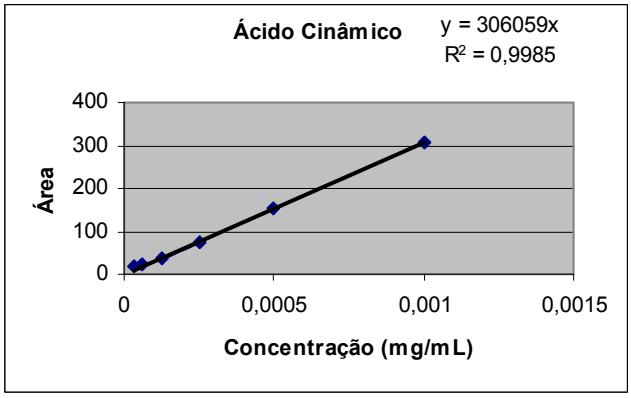

Figura 37. Gráfico de Linearidade para padrão Ácido Cinâmico (CLAE)

Tabela 18. Linearidade no ensaio de cromatografia líquida de alta eficiência (áreas e concentrações dos padrões utilizados)

		Conc. (mg/mL)	Área	Conc. (mg/mL)	Área	Conc. (mg/mL)	Área	Conc. (mg/mL)	Área	Conc. (mg/mL)	Área	Conc. (mg/mL)	Área	Conc. (mg/mL)	Área	Conc. (mg/mL)	Área
		GÁLICO		CATEQUINA		EPICATEQUINA		ETIL GALATO		FERRÚLICO		PROPIL GALATO		RESVERATROL		Cinâmico	
1	A		1202,3		534,5		499,3		1509,9		4295,4		490,7		831,2		309,4
1	B		1213,9		519,0		487,9		1506,3		4295,8		463,9		734,7		302,5
média		**0,05**	**1208,1**	**0,05**	**526,7**	**0,05**	**493,6**	**0,03**	**1508,1**	**0,03**	**4295,6**	**0,01**	**477,3**	**0,005**	**782,9**	**0,001**	**305,9**
2	A		625,6		257,1		233,6		781,1		2149,7		236,5		374,4		150,4
2	B		581,6		245,9		254,4		733,7		2109,6		242,4		409,4		155,7
média		**0,025**	**603,6**	**0,025**	**251,5**	**0,025**	**244,0**	**0,015**	**757,4**	**0,015**	**2129,6**	**0,005**	**239,4**	**0,0025**	**391,9**	**0,0005**	**153,1**
3	A		272,8		126,7		100,9		357,2		954,6		124,3		187,5		72,0
3	B		266,0		115,0		104,2		338,8		980,1		116,6		188,6		77,6
média		**0,0125**	**269,4**	**0,0125**	**120,8**	**0,0125**	**102,5**	**0,0075**	**348,0**	**0,0075**	**967,4**	**0,0025**	**120,4**	**0,00125**	**188,1**	**0,00025**	**74,8**
4	A		129,7		51,4		46,9		164,2		454,1		66,0		70,0		35,7
4	B		127,8		47,4		42,6		157,7		451,3		51,2		69,0		40,1
média		**0,00625**	**128,7**	**0,00625**	**49,4**	**0,00625**	**44,8**	**0,00375**	**160,9**	**0,00375**	**452,7**	**0,00125**	**58,6**	**0,000625**	**69,5**	**0,000125**	**37,9**
5	A		68,7		16,8		22,2		73,9		207,8		27,2		27,7		26,0
5	B		67,5		19,4		24,0		74,8		208,0		22,9		37,3		22,3
média		**0,003125**	**68,1**	**0,003125**	**18,1**	**0,003125**	**23,1**	**0,001875**	**74,3**	**0,001875**	**207,9**	**0,000625**	**25,0**	**0,0003125**	**32,5**	**0,0000625**	**24,1**
6	A		25,1		7,5		7,6		25,2		80,9		12,0		10,3		16,2
6	B		31,9		9,9		13,0		28,9		81,9		10,1		14,1		18,7
média		**0,0015625**	**28,5**	**0,001563**	**8,7**	**0,001563**	**10,3**	**0,000938**	**27,0**	**0,0009375**	**81,4**	**0,0003125**	**11,1**	**0,00015625**	**12,2**	**0,00003125**	**17,5**
7	A										19,2						
7	B										17,0						
média										**0,0004688**	**18,1**						

5.1.7.2 Repetitividade

Encontrou-se a área de cada padrão nas 10 injeções. Esta foi obtida levando-se em consideração o maior comprimento de onda no qual o padrão apresenta o máximo de absorção, 280 ou 320 nm. Foi feita a média e desvio padrão para calcular o Coeficiente de Variação (CV). O coeficiente de variação analisado para todos os padrões apresentou valores abaixo de 4%, o que significa que está dentro do valor esperado, ou seja, abaixo de 10% do valor da média. O valor das áreas, médias, desvios padrões e coeficientes de variação estão descritos na Tabela 19.

Tabela 19. Repetitividade no ensaio de cromatografia líquida de alta eficiência (áreas e concentrações dos padrões utilizados)

PADRÃO	nm*	T. R.**	ÁREA 1	ÁREA 2	ÁREA 3	ÁREA 4	ÁREA 5	ÁREA 6	ÁREA 7	ÁREA 8	ÁREA 9	ÁREA 10	MÉDIA	D.P.***	CV (%)
Ac. Gálico	280	5,383	216,3	212,7	203,9	207,4	205,9	202,4	215,2	201,0	201,2	203,0	206,9	5,80	2,81
Ácido protocatecuico	280	7,591	198,7	190,0	193,0	197,2	199,9	214,8	207,6	197,7	198,6	204,4	200,2	7,16	3,58
Catequina	280	8,751	244,0	235,0	234,6	223,7	241,5	239,0	239,1	238,2	237,7	236,5	236,9	5,44	2,30
Metil Galato	280	9,792	99,1	98,3	99,2	105,3	107,1	104,7	104,1	109,1	107,6	102,5	103,7	3,82	3,69
Ácido Vanílico	280	10,844	337,0	339,0	323,8	340,0	341,0	340,0	341,9	342,3	339,9	340,3	338,5	5,38	1,59
Etil Galato	280	11,715	211,0	195,0	201,0	197,5	205,5	213,0	208,8	212,0	212,9	198,9	205,6	6,93	3,37
Ácido Ferrúlico	320	13,537	221,0	211,2	212,5	219,1	219,3	213,5	218,6	216,8	217,3	218,2	216,8	3,25	1,50
Propil Galato	280	14,336	315,9	311,1	309,9	310,9	325,0	311,8	320,0	313,6	313,6	316,3	314,8	4,71	1,49
Rutina	320	15,237	339,1	344,2	334,9	338,9	342,3	349,9	343,1	344,2	345,9	343,8	342,6	4,17	1,22
Miricetina	320	16,547	382,7	380,4	371,0	381,3	382,6	381,9	379,9	382,5	381,9	390,0	381,4	4,60	1,21
Ácido Cinâmico	280	17,806	287,0	275,2	274,3	282,0	282,4	278,3	279,7	289,7	280,4	278,0	280,7	4,84	1,72
Quercetina	320	19,168	363,0	362,6	365,1	374,1	378,9	363,1	369,9	357,7	370,8	371,0	367,6	6,39	1,74
Luteolina	320	20,131	197,0	200,5	198,0	192,9	202,8	196,9	201,9	193,0	188,7	200,8	197,3	4,55	2,31
Kaempferol	320	21,933	321,0	322,9	303,5	314,4	319,8	317,0	307,6	319,2	318,7	321,8	316,6	6,37	2,01
Apigenina	320	22,453	770,0	779,0	775,0	771,5	782,1	798,0	789,0	790,0	787,8	780,0	782,2	8,93	1,14

nm* = Comprimento de onda, T.R.** = Tempo de retenção, D. P*** = Desvio Padrão

5.1.7.3 Limite de Detecção e Limite de Quantificação

Os limites de detecção e quantificação foram calculados para todos os padrões presentes nas amostras analisadas. Os resultados estão descritos na Tabela 20.

Tabela 20. Limite de Detecção e Limite de Quantificação no ensaio de cromatografia líquida de alta eficiência

PADRÕES	Concentração (mg/mL)	Amplitude do sinal ruído						Amplitude branco x 3	Limite Detecção (µg/mL)	Amplitude branco x 5	Limite Quantificação (µg/mL)
		na menor concentração do padrão			no branco						
		início	final	diferença	início	final	diferença				
Ácido Gálico	0,001563	0,2	1,2	1,0	4,80	5,00	0,20	0,6	0,94	1,0	1,56
Catequina	0,003125	4,1	5,7	1,6	8,60	9,00	0,40	1,2	2,34	2,0	3,91
Epicatequina	0,003125	6,8	8,5	1,7	10,80	11,10	0,30	0,9	1,65	1,5	2,76
Etil Galato	0,000938	7,6	9,2	1,6	11,40	12,00	0,60	1,8	1,06	3,0	1,76
Ferrúlico	0,000469	9,4	11,0	1,6	13,20	13,90	0,70	2,1	0,62	3,5	1,03
Propil Galato	0,000625	11,5	13,3	1,8	14,20	14,70	0,50	1,5	0,52	2,5	0,87
Resveratrol	0,000313	11,0	13,2	2,2	15,40	16,00	0,60	1,8	0,26	3,0	0,43
Cinâmico	0,000031	13,9	15,3	1,4	17,70	18,20	0,50	1,5	0,03	2,5	0,06

5.1.7.4 Idetificação e Quantificação dos padrões

Após a validação do método cromatográfico utilizado, as amostras foram preparadas e injetadas em duplicata para a identificação e quantificação dos padrões disponíveis.

Para a identificação utilizaram-se primeiramente dois requisitos, comparação do tempo de retenção e comparação do espectro de absorção da amostra com o padrão. Caso ainda restassem dúvidas, foi realizada a co-eluição. Este processo foi necessário apenas para duas amostras (um padrão em cada uma).

Fez-se o processo comparativo para todos os picos presentes nas amostras, com o objetivo de se identificar os padrões disponíveis. Nem todos os picos foram identificados, mesmo com um grande número de padrões disponíveis, isso pode ser explicado pelo fato de alguns componentes fenólicos presentes nas amostras estarem ligados com outras substâncias, como por exemplo, os açúcares, isso impede que a substância pura (padrão) seja identificada na amostra.

Os resultados da identificação e quantificação dos compostos fenólicos nas amostras de frutas estão descritos na Tabela 21. A quantificação foi expressa em mg padrão por grama de amostra.

Tabela 21. Quantificação e Identificação dos padrões nos extratos do Cerrado avaliados: Gabiroba, Murici e Guapeva (semente, casca e polpa) por cromatografia líquida de alta eficiência

FRUTAS	PADRÕES IDENTIFICADOS	CONCENTRAÇÃO (mg de padrão/ g de extrato)
Murici	Ácido Ferrúlico	1,699 ± 0,002
	Resveratrol	0,012 ± 0,001
Gabiroba	Etil Galato	0,125 ± 0,001
	Catequina	3,164 ± 0,036
	Propil Galato	0,038 ± 0,003
Guapeva Polpa	Epicatequina	0,825 ± 0,006
Guapeva Semente	n.i.	n.q.
Guapeva Casca	Catequina	0,277 ± 0,007

Resultados de concentração em mg de padrão por grama de extrato ± desvio padrão, n.i não identificado, n.q não quantificado

5.1.8 Atividade antioxidante em plasma de animais tratados com frutas

Ao chegar ao biotério, os ratos estavam com 21 dias de vida e aproximadamente 55 gramas de P.C., os animais foram alimentados com ração comercial (Purina Labina) e água. Ao atingirem o peso ideal, aproximadamente 180 g, os animais ficaram em jejum por um período de 24 horas antes da gavagem com extratos de frutas.

Na Tabela 22 estão os resultados do cálculo realizado para determinação da quantidade de extrato que cada grupo recebeu durante a gavagem. A partir dos dados obtidos no ensaio de fenóis totais (g ácido gálico / kg extrato), foi preparada uma solução na concentração de 50 mg de ácido gálico/kg de P.C. animal, esta massa encontrada foi dissolvida em 2,0 mL de água (volume para cada animal). Esta concentração de extrato foi previamente descrita por Bombardelli & Morazzoni (1995).

Tabela 22. Concentração de fenóis totais de extratos etanólicos de frutas do Cerrado e cálculo da massa de extrato utilizada no ensaio antioxidante *in vivo* em ratos Wistar machos

FRUTAS	CONCENTRAÇÃO (g ácido gálico / kg extrato)	MASSA EXTRATO (mg)
Gabiroba	184,42	29,82
Guapeva Casca	55,88	98,43
Guapeva Semente	14,58	377,23
Guapeva Polpa	25,59	214,97
Murici	31,61	173,98

Massa de extrato calculada para animais com 110 g de peso corpóreo.

Para o teste de extração dos compostos fenólicos, foi utilizado plasma retirado de três animais não tratados com extrato para avaliação das 5 metodologias pré selecionadas. Após o processo de extração, as amostras foram avaliadas pelo ensaio antioxidante *ORAC*. Na Tabela 23, seguem os resultados do teste de extração assim como algumas observações importantes visualizadas durante os processos de extração.

Tabela 23. Resultados da atividade antioxidante *ORAC* para amostras de plasma de animais tratados após teste de extração dos compostos fenólicos

	ORAC **(µM *Trolox* equivalentes/L plasma)**	**OBSERVAÇÕES**
Ghiselli et al. (1995)	8.992,20 ± 821,23a	Sobrenadante límpido sem formação de precipitado
Serafini et al. (1998)	9.235,51 ± 1381,99[a]	Sobrenadante límpido com formação de precipitado
Prior et al. (2003)	16.010,44 ± 1792,32[b]	Sobrenadante límpido com formação de precipitado
Gardana et al. (2007)	13.002,92 ± 992,78[c]	Formação de pouca quantidade de precipitado
Serafini et al. (2002)	5341,96 ± 431,25[d]	Sobrenadante límpido com formação de precipitado

A extração dos polifenóis é uma fase difícil por algumas razões. Primeiro, estes compostos estão na maioria das vezes conjugados ao ácido glucurônico e a sulfatos ou

presentes como polifenóis glicosilados, e segundo, eles são suceptíveis à oxidação, em altas temperaturas e condições de pH alcalino (ERLUND et al, 2002).

A necessidade da utilização de uma enzima capaz de liberar os compostos fenólicos que estão ligados a outros grupos, foi levada em consideração por apenas dois dos autores selecionados nos métodos de extração, Serafini et al. (2002) e Gardana et al. (2007). Nos dois trabalhos foi utilizada a mesma enzima, Sulfatase, mas com uma diferença nos tempos de ação. No trabalho de Serafini et al. (2002) a enzima reagiu com o plasma por apenas 45 minutos e no de Gardana et al. (2007), por 18 horas. O resultado no ensaio *ORAC* para o teste realizado mostra uma grande diferença para estes dois testes, e o tempo maior de ação da enzima pode ter contribuído para o aumento do potencial antioxidante no plasma. Lee et al. (2000) descreveram em seu trabalho que de todos os métodos já descritos na literatura para a etapa de hidrólise, a utilização da enzima β-D-Glucuronidase e sulfatase foi o método mais eficiente para hidrolisar os compostos conjugados.

Os mesmos autores também descreveram sobre a importância do uso de solventes como metanol, etanol, acetonitrila, acetona, e acetato de etila na extração dos polifenóis do plasma. Dos métodos testados no trabalho com frutas do Cerrado, apenas Ghiselli et al. (1995) não levaram em consideração a extração dos compostos fenólicos.

Um terceiro ponto que pode ser observado pelos resultados obtidos é a precipitação das proteínas presentes no plasma. Estas podem influenciar, aumentando a capacidade antioxidante, ou seja, o valor obtido não será real, pois não foi causado apenas pelos polifenóis das frutas. Dos métodos testados, o de Ghiselli et al. (1995), mesmo com a utilização de sulfato de amônio não foi observado a precipitação das proteínas durante o processo de extração. No método de Gardana et al. (2007), foi

observado a precipitação de pequena quantidade de proteína, quando comparada com a quantidade de outros métodos.

Algo que chamou atenção nos resultados é que o método descrito por Prior et al. (2003) não utilizou enzima e mesmo assim foi o que apresentou maior potencial antioxidante pelo método *ORAC*. E o método descrito por Gardana et al. (2007) também apresentou um valor de *ORAC* alto, quando comparado com os demais testes, mas teve pequeno problema com a precipitação de proteína, pois este processo não foi tão eficiente. Então com um último teste adicionou-se a etapa de hidrólise enzimática por 18 horas ao método de Prior et al. (2003). O resultado foi satisfatório, pois foi obtido *ORAC* de 19.302,88 ± 1882,35 μM *Trolox* equivalentes/litro plasma, apresentando diferença estatística do valor de *ORAC* do método de Prior et al. (2003).

Logo, a partir do resultado descrito acima, todas as amostras de plasma foram extraídas pelo método de Prior et al. (2003) modificado pela adição da etapa de hidrólise enzimática por 18 horas.

As amostras de plasma foram diluídas em tampão fosfato de potássio para que o valor da absorbância (métodos de fenóis totais e *TEAC*) e fluorescência (método *ORAC*) ficassem dentro da curva padrão de cada método. Para o ensaio de fenóis e *ORAC* as amostras de plasma foram diluídas até concentração final de 0,0084 μL plasma/μL de solução, e para o ensaio *TEAC*, a concentração foi de 0,0168 μL plasma/μL de solução.

Os resultados destes três métodos para avaliação do potencial antioxidante estão apresentados Tabelas 24 a 26.

Tabela 24. Dosagem de Fenóis totais em amostras de plasma de animais tratados com extratos de frutas do Cerrado

FENÓIS TOTAIS (g de ácido gálico/ litro de plasma)			
	30 minutos	**60 minutos**	**120 minutos**
Controle	114,09 ± 29,26^{aA}	164,18 ± 122,68^{aA}	103,53 ± 10,29^{bA}
Gabiroba	390,40 ± 90,73^{bA}	415,20 ± 97,06^{bA}	183,53 ± 91,94^{cB}
Guapeva casca	321,44 ± 44,78^{bA}	386,82 ± 82,70^{cC}	211,59 ± 106,25^{aB}
Guapeva semente	356,57 ± 106,36^{bA}	365,76 ± 134,23^{cA}	122,95 ± 23,26^{cB}
Guapeva polpa	340,55 ± 109,43^{bA}	312,34 ± 165,81^{cA}	144,91 ± 34,61^{cA}
Murici	284,36 ± 44,67^{bA}	174,83 ± 98,62^{aC}	149 ,46 ± 54,27^{cB}

Análise estatística pelo método Tukey, com p<0,05. Letras minúsculas foram usadas na comparação vertical entre os grupos avaliados dentro do mesmo tempo, e letras maiúsculas na comparação horizontal entre a mesma fruta em tempos diferentes.

Tabela 25. Potencial antioxidante pelo ensaio *TEAC* para amostras de plasma de animais tratados com extratos de frutas do Cerrado

TEAC (**µM *Trolox* equivalentes/ litro de plasma**)			
	30 minutos	**60 minutos**	**120 minutos**
Controle	65,95 ± 6,52^{aA}	56,53 ± 3,63^{aB}	57,66 ± 3,63^{aB}
Gabiroba	70,34 ± 1,08^{bA}	57,44 ± 3,63^{aB}	57,68 ± 5,52^{aB}
Guapeva casca	73,13 ± 1,58^{cA}	57 ,76 ± 3,59^{cB}	51,78 ± 2,86^{aC}
Guapeva semente	72,62 ± 1,90^{cA}	61,22 ± 2,71^{cB}	53,07 ± 5,81^{aC}
Guapeva polpa	73,64 ± 2,61^{cA}	60,54 ± 9,90^{cB}	59,29 ± 2,25^{aB}
Murici	73,20 ± 4,02^{cA}	67,36 ± 7,48^{bA}	54,41 ± 2,81^{aB}

Análise estatística pelo método Tukey, com p<0,05. Letras minúsculas foram usadas na comparação vertical entre os grupos avaliados dentro do mesmo tempo, e letras maiúsculas na comparação horizontal entre a mesma fruta em tempos diferentes.

Tabela 26. Potencial antioxidante pelo ensaio ORAC para amostras de plasma de animais tratados com extratos de frutas do Cerrado

ORAC (**µM *Trolox* equivalentes/ litro de plasma**)			
	30 minutos	**60 minutos**	**120 minutos**
Controle	30247,30 ± 4166,61^{aA}	22216,72 ± 17396,06^{bA}	18748,32 ± 2585,25^{aA}
Gabiroba	35457,69 ± 4358,49^{aA}	46935,95 ± 5262,81^{aC}	24394,92 ± 5338,67^{aB}
Guapeva casca	39060,90 ± 7895,32^{aA}	28889,73 ± 2234,47^{bB}	24610,89 ± 4636,11^{aB}
Guapeva semente	35307,06 ± 3645,24^{aA}	26563,56 ± 2890,14^{bB}	23861,96 ± 3544,91^{aB}
Guapeva polpa	34919,08 ± 4868,11^{aA}	29319,87 ± 3814,02^{bC}	24412,09 ± 6225,94^{aB}
Murici	33437,56 ± 5461,22^{aA}	23941,90 ± 3675,68^{bB}	25834,73 ± 1868,99^{aB}

Análise estatística pelo método Tukey, com p<0,05. Letras minúsculas foram usadas na comparação vertical entre os grupos avaliados dentro do mesmo tempo, e letras maiúsculas na comparação horizontal entre a mesma fruta em tempos diferentes.

Muitos pesquisadores têm investigado a cinética e absorção dos polifenóis pela medida da concentração dos mesmos no plasma e/ou urina em adultos após a ingestão de dose única de polifenóis, provindos de compostos puros, extrato de plantas, bebidas e alimentos (MANACH et al., 2005).

Era esperado que todos os grupos que receberam extratos apresentassem resultados iguais ou acima do controle, pois este não recebeu dieta antioxidante. Isso foi verificado nos três ensaios realizados e nos diferentes tempos de coleta de sangue.

No ensaio de fenóis totais, as maiores concentrações dos compostos fenólicos ocorreram nos períodos entre 30 minutos e 1 hora. Para os extratos de Gabiroba, Guapeva semente e Guapeva polpa não houve diferença estatística nos resultados referentes a estes dois períodos (30 e 60 minutos). A casca da fruta Guapeva apresentou melhor resultado no tempo de 30 minutos e o Murici em 60 minutos. O tempo de 2 horas foi que apresentou menores resultados para todos os extratos analisados, muito provavelmente devido à elimição.

No teste *TEAC* todos os extratos promoveram um aumento no potencial antioxidante nas amostras de plasma retiradas 30 minutos após a gavagem, quando comparados com os outros tempos de coleta de sangue e com o grupo controle. Mesmo assim, no tempo de 60 minutos apenas a Gabiroba e a Guapeva polpa não apresentaram diferença significativa quando comparada com os resultados no tempo de 120 minutos. Para os outros extratos foi no tempo de 60 minutos que observou-se um maior potencial antioxidante nas amostras de plasma em relação ao controle.

No ensaio *ORAC,* os extratos analisados também promoveram um maior potencial antioxidante no período entre 30 e 60 minutos. Apenas a Gabiroba apresentou maior valor de *ORAC* no tempo de 1 hora.

Era esperado que o maior potencial antioxidante e teor de fenóis totais para todos os grupos ocorressem entre 30 minutos e 1 hora. Este tempo de maior nível de polifenóis no sangue está descrito em diversos artigos que avaliam a absorção, metabolismo e atividade antioxidante em humanos e animais.

Goldberg et al. (2003) avaliou em seu estudo três polifenóis, Resveratrol, Quercetina e Catequina (livres e conjugados) presentes em soro de humanos após consumo oral de vinho e suco de uva. Neste estudo houve tratamento do sangue com as enzimas β-Glucuronidase e sulfatase. O maior nível de fenóis totais foi obtido em 30 minutos e após isso houve um rápido declínio. Já para os polifenóis livres, o nível máximo ocorreu em 30 minutos para o Resveratrol e Catequina, e entre 30 e 60 minutos para a Quercetina.

No estudo realizado por Talcott et al. (2006), com humanos tratados com 800 mg de extrato de *Punica granatum L.* contendo 330,4 mg de *ellagitannins pumicalagins* e 21,6 mg de ácido elágico, também foi verificado no tempo de 30 minutos pico máximo de atividade antioxidante no plasma através do método *ORAC*.

Em outro *in vivo*, em plasma de rato, a concentração máxima de Resveratrol ocorreu 60 minutos após a gavagem (BERTELLI et al., 1996).

Uma diminuição na capacidade antioxidante medida no soro ou plasma após certo período de ingestão de fenólicos não indica necessariamente um resultado indesejável, pois isso é conseqüência da absorção dos compostos responsáveis pelo potencial antioxidante. Mas um aumento na concentração de radicais livres indicaria sim um problema, pois não houve proteção pelos antioxidantes (PRIOR & CAO, 1999).

É importante saber que os polifenóis são os mais comuns na dieta humana, mas não são necessariamente os mais ativos dentro do corpo, ou porque têm uma baixa atividade intrínseca ou porque são pouco absorvidos pelo intestino, altamente

metabolizados, ou rapidamente eliminados. Além disso, os metabólitos, que são encontrados no sangue e nos órgãos alvo e que resultam da atividade digestiva ou hepática, podem ser diferentes da substância inicial em termos de atividade biológica. Um grande conhecimento sobre a biodisponibilidade dos polifenóis é essencial para que os efeitos dos mesmos para a saúde sejam entendidos (MANACH et al., 2004).

5.1.8.1 Espectrometria de Massas

No ensaio de Espectrometria de Massas foi feito um mix de todas as amostras de plasma do mesmo grupo utilizadas nos ensaios antioxidantes após o processo de extração dos compostos fenólicos, e a identificação dos polifenóis foi realizada para as amostras coletadas no tempo do tempo 30 minutos após a gavagem por ter sido as que apresentaram melhores resultados pelos testes antioxidantes. Os espectros de cada grupo estão descritos nas Figuras 38 a 42

.

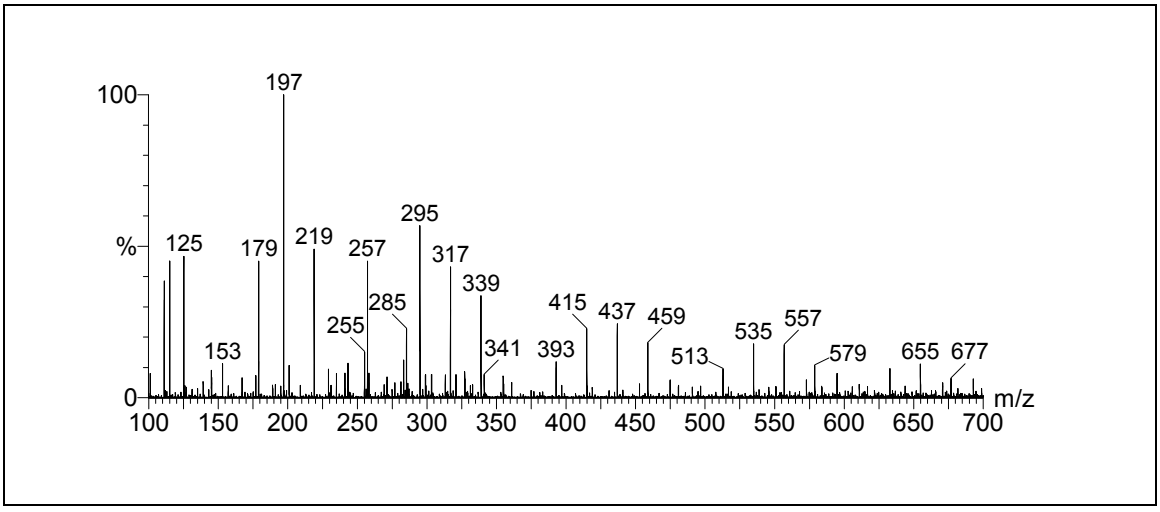

Figura 38. Espectro de Massas (Grupo 2 Gabiroba)

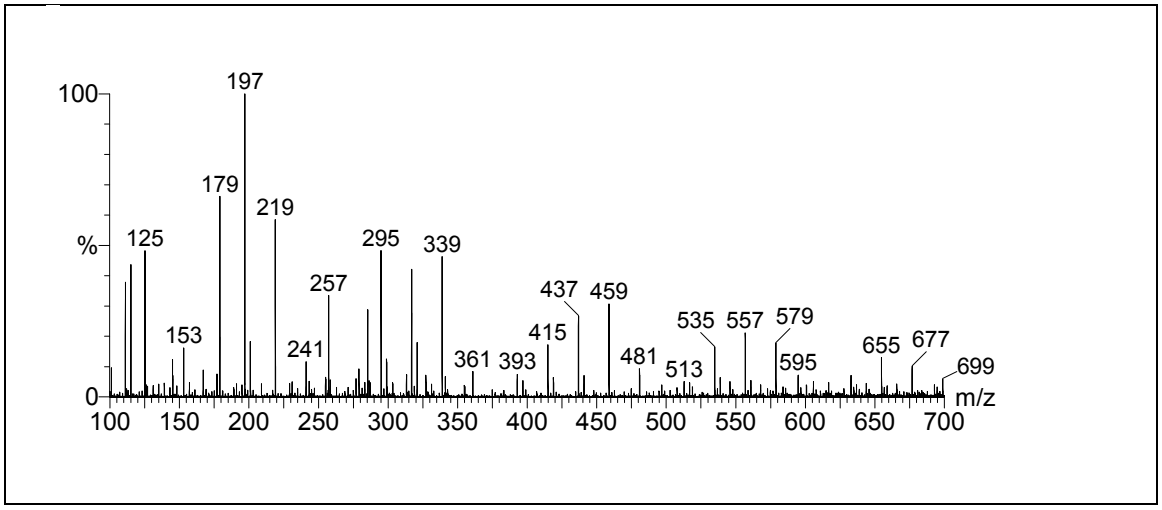

Figura 39. Espectro de Massas (Grupo 3 Guapeva casca)

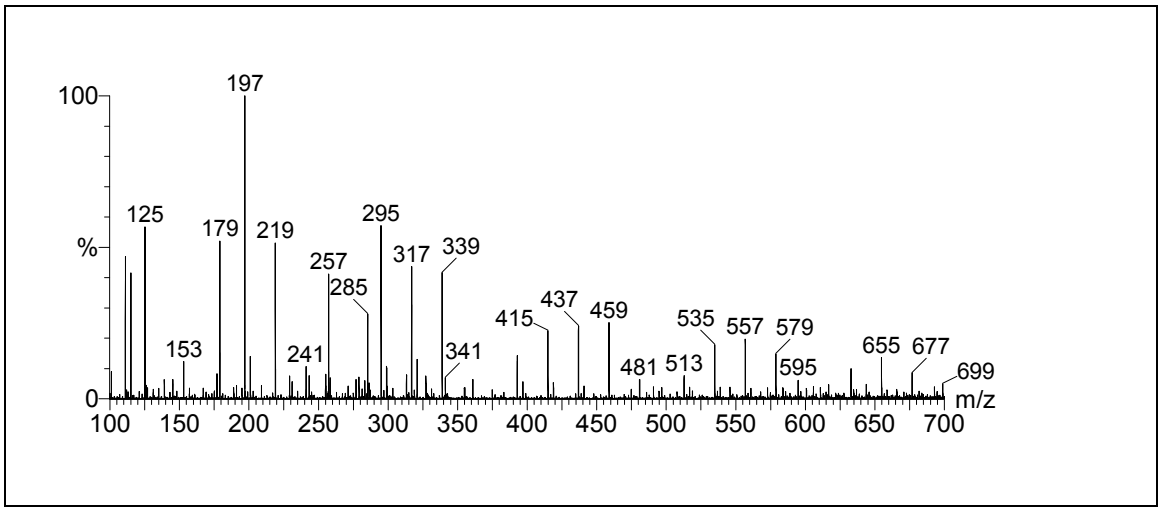

Figura 40. Espectro de Massas (Grupo 4 Guapeva semente)

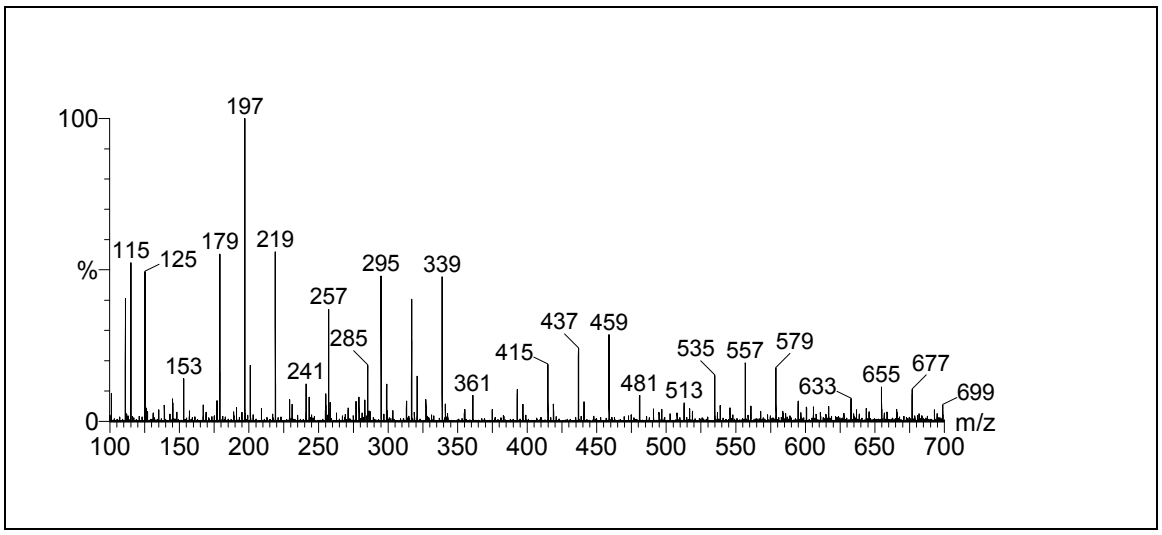

Figura 41. Espectro de Massas (Grupo 5 Guapeva polpa)

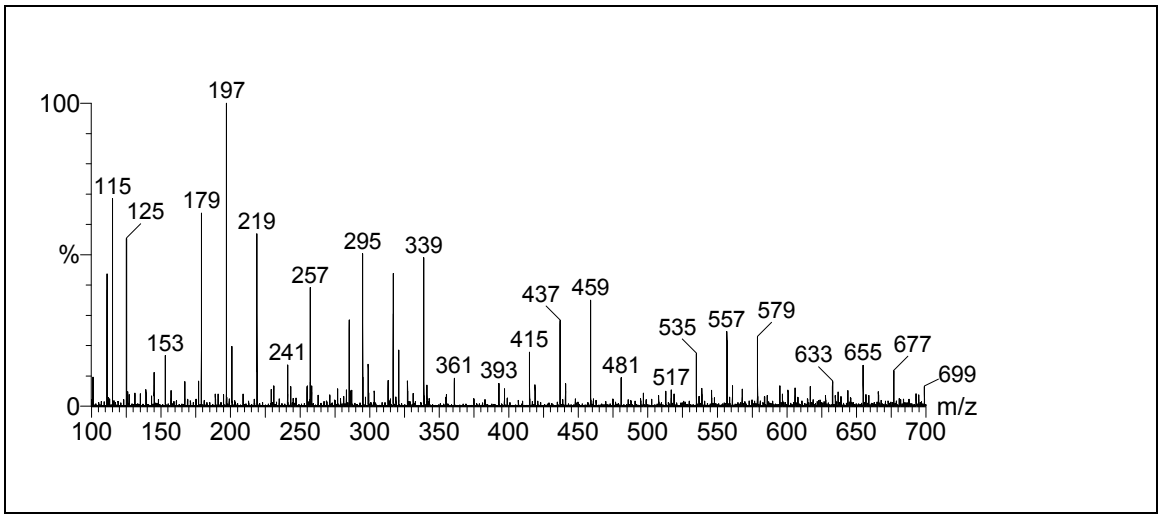

Figura 42. Espectro de Massas (Grupo 6 Murici)

Como descrito nos resultados do ensaio de CLAE para as frutas do Cerrado, a análise de quantificação mostrou que para a maioria dos compostos identificados a concentração encontrada foi bem pequena, logo era esperado que não fosse possível a identificação dos mesmos padrões nas amostras de plasma. Assim, apenas a catequina inicialmente identificada na amostra da fruta Gabiroba, pode ser visualizada pelo método de Espectrometria de Massas.

5.1.9 Ensaio de mutagenicidade (Teste Micronúcleos)

O teste do micronúcleo é o ensaio mais amplamente utilizado para a detecção de agentes clastogênicos (que quebram cromossomos) e aneugênicos (que induzem aneuploidia ou segregação cromossômica anormal), internacionalmente aceito como parte da bateria de testes recomendada para a avaliação do potencial mutagênico e para o registro de novos produtos químicos que entram anualmente no mercado mundial. O teste do micronúcelo tem sofrido várias modificações inovadoras em seu protocolo e este fato aponta para uma ampliação da sua aplicabilidade (SALVADORI et al.,2003).

A quantificação da freqüência de micronúcleos é extensivamente utilizada na epidemiologia molecular e citogenética para avaliar a presença e a extensão de danos cromossômicos em populações humanas expostas a agentes genotóxicos ou que apresentam um perfil genético susceptível (FENECH et al., 1999).

No ensaio de mutagenicidade foram testadas duas concentrações diferentes de cada extrato etanólico (200 e 400 mg de extrato/kg P.C. animal). Estas concentrações também foram utilizadas no ensaio descrito por Fagundes et al. (2005). Com estas duas concentrações nenhum animal morreu durante o experimento, e também não foi notada nenhuma alteração no comportamento dos animais.

Como descrito na metodologia, os animais assim como a ração eram pesados a cada 3 dias. Na Tabela 27 estão descritos a média dos pesos dos animais de cada grupo. É possível observar que a média final de todos os grupos foi bem próxima, mostrando que o ganho de peso foi constante, indiferente ao tipo de tratamento recebido.

Tabela 27. Peso dos animais utilizados no ensaio *in vivo* de Micronúcleo

EXTRATOS / CONCENTRAÇÃO*	DIAS						
	1	**4**	**7**	**10**	**13**	**15**	**MEDIA**
Murici (200)	15,84	20,33	22,95	23,78	23,97	27,25	22,35 ± 3,89
Murici (400)	16,42	19,56	22,58	23,81	26,00	27,63	22,67 ± 4,14
Gabiroba (200)	16,50	20,64	23,05	25,30	27,10	28,26	23,48 ± 4,39
Gabiroba (400)	17,80	22,01	22,75	24,32	26,89	27,33	23,52 ± 3,52
Guapeva semente (200)	16,72	20,13	20,31	22,89	23,77	25,15	21,49 ± 3,05
Guapeva semente (400)	15,43	18,47	20,24	21,99	22,93	24,80	20,64 ± 3,36
Guapeva casca (200)	16,12	20,74	24,15	26,62	28,27	29,81	24,28 ± 5,12
Guapeva casca (400)	17,71	21,58	23,05	25,18	26,95	28,61	23,85 ± 3,94
Guapeva polpa (200)	17,19	21,36	23,37	25,41	27,38	28,81	23,92 ± 4,25
Guapeva polpa (400)	18,40	22,00	24,11	26,03	27,54	27,66	24,29 ± 3,61
Controles	15,25	20,04	22,10	24,81	26,61	28,17	22,83 ± 4,75

*Concentração em mg extrato/ kg de peso corpóreo. Média ± desvio padrãodo peso dos animais.

Figura 43. Ensaio de Micronúcleos, aplicação da droga Ciclofosfamida

Os animais receberam os extratos de frutas por 2 semanas (DELMANTO et al., 2001). No 15° dia, os animais receberam injeção intraperitonial de CPA ou NaCl de acordo com o grupo ao qual pertenciam (Figura 43). A quantidade que cada animal recebeu da droga foi dependente do peso médio do grupo.

A CPA possui ação antineoplásica importante no tratamento de vários tumores como os de mama, pulmonares e leucemia. Por conta de seu potente efeito mutagênico, diversos autores utilizaram droga a CPA em estudos de mutagenicidade e antimutagenicidade (RABELLO-GAY, 1985; BAZO, 1997; SALVADORI, 1991; MUKHOPADHYA et al., 1998). A atividade antitumoral da CPA baseia-se na formação de ligações entre as fitas de DNA, alterando sua estrutura e funcionalidade (DONG et al., 1995)

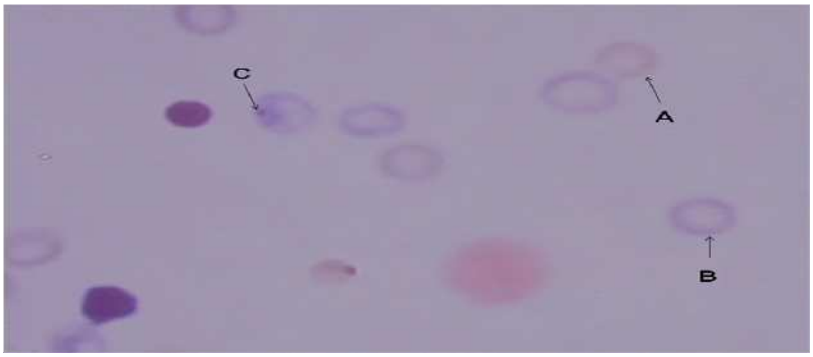

Figura 44. Visualização da lâmina fotografada no Ensaio de Micronúcleos in vivo. “A” (NCE, eritrócito maduro, corado de rosa), e “B” (PCE, eritrócito imaturo, corado de azul), “C” (MNPCE, micronúcleos, porção citoplasmática de cromatina de forma redonda ou ovalada que se localiza perto do núcleo)

A análise dos dados foi feita através do teste de x^2 (Qui-quadrado), indicado para casos em que um grande número de unidades amostrais deve ser considerado e a ocorrência das anomalias procuradas constituem um evento raro. O x^2 é um teste estatístico muito utilizado em trabalhos de Citogenética, pois possibilita a comparação da freqüência de dados que, neste trabalho, está relacionada com a freqüência de micronúcleos (NETO et al.; 2005).

Foram contados inicialmente os PCE´s e NCE´s até a somatória destas duas células chegar a 500 unidades. Depois continuou-se a contagem apenas dos PCE´s até

1000 unidades. Desde o início contaram-se os micronúcleos. Logo, ao final da contagem, foram anotados os seguintes valores para cada lâmina ainda codificada: NCE, PCE e MNPCE (Figura 44).

Os resultados para o ensaio de micronúcleos seguem nas Tabelas 28 e 29.

Tabela 28. Resultados no teste de Micronúcleos, apresentando % MNPCE e % Redução

EXTRATOS / CONCENTRAÇÃO*/ TRATAMENTO	Nº células analisadas	% MNPCE	% Redução
Controle + CPA**	8000	1,94 ± 0,61	0,00
Controle – NaCl	8000	0,30 ± 0,19	
Murici 400+ CPA	5000	0,52 ± 0,24	97,71 [b]
Murici 400+ NaCl	6000	0,18 ± 0,12	
Gabiroba 200+ CPA	6000	0,57 ± 0,43	92,37 [a]
Gabiroba 200+NaCl	6000	0,40 ± 0,21	
Gabiroba 400+ CPA	6000	0,53 ± 0,31	93,89 [a]
Gabiroba 400+ NaCl	6000	0,52 ± 0,29	
Guapeva Semente 200 + CPA	6000	0,57 ± 0,34	83,72 [c]
Guapeva Semente 200+ NaCl	6000	0,35 ± 0,45	
Guapeva Semente 400+ CPA	6000	0,55 ± 0,45	71,61 [d]
Guapeva Semente 400+ NaCl	6000	0,53 ± 0,42	
Guapeva Casca 200 + CPA	6000	0,52 ± 0,13	73,33 [d]
Guapeva Casca 200+ NaCl	6000	0,40 ± 0,13	
Guapeva Casca 400+ CPA	6000	1,10 ± 1,09	43,23 [e]
Guapeva Casca 400+ NaCl	6000	0,43 ± 0,14	
Guapeva Polpa 200 + CPA	6000	0,60 ± 0,28	69,03 [f]
Guapeva Polpa 200+ NaCl	6000	0,32 ± 0,29	
Guapeva Polpa 400+ CPA	6000	0,52 ± 0,21	73,33 [d]
Guapeva Polpa 400+ NaCl	6000	0,42 ± 0,31	

*Concentração em mg extrato/ kg de peso corpóreo. CPA** = Ciclofosfamida. Análise estatística pelo método Tukey, com $p<0,05$. Letras minúsculas iguais significam grupos com resultados sem diferença estatística.

Tabela 29. Resultados do teste de Micronúcleos apresentando resultados de número de células analisadas, número de micronúcles, número e micronúcleos esperados e análise estatística por Qui Quadrado

RESULTADOS TESTE DE MICRONUCLEOS				
Grupos comparados/ Concentração*	**n° células analisadas**	**MN**	**MN esperado**	**x^2**
Controle + CPA**	8000	155	77,5	
Controle - NaCl	8000	24	12,0	95,87
	16000	179	89,5	
Murici 200 + CPA	6000	33	18,0	
Murici 400+ CPA	5000	26	11,8	29,52
	11000	59	29,8	
Murici 200 + CPA	6000	33	14,1	
Controle + CPA	8000	155	88,6	74,96
	14000	188	102,7	
Murici 400+ CPA	5000	26	10,0	
Controle + CPA	8000	155	95,4	62,86
	13000	181	105,4	
Murici 200+ NaCl	6000	29	12,4	
Controle - NaCl	8000	24	13,7	29,81
	14000	53	26,1	
Murici 400+ NaCl	6000	11	4,7	
Controle - NaCl	8000	24	13,7	16,10
	14000	35	18,4	
Gabiroba 200+ CPA [a]	6000	34	17,0	
Gabiroba 400+ CPA [a]	6000	32	16,0	0,06
	12000	66	33,0	
Gabiroba 200+ CPA	6000	34	14,6	
Controle + CPA	8000	155	88,6	75,73
	14000	189	103,1	
Gabiroba 400+ CPA	6000	32	13,7	
Controle + CPA	8000	155	88,6	74,20
	14000	187	102,3	
Gabiroba 200+NaCl	6000	24	10,3	
Controle - NaCl	8000	24	13,7	26,00
	14000	48	24,0	
Gabiroba 400+ NaCl	6000	31	13,3	
Controle - NaCl	8000	24	13,7	31,33
	14000	55	27,0	

RESULTADOS TESTE DE MICRONUCLEOS				
Grupos comparados/ Concentração*	**n° células analisadas**	**MN**	**MN esperado**	**x^2**
Guapeva Semente 200 + CPA [b]	6000	34	17,0	
Guapeva Semente 400+ CPA [b]	6000	33	16,5	0,01
	12000	67	33,5	
Guapeva Semente 200 + CPA	6000	34	14,6	
Controle + CPA	8000	155	88,6	75,73
	14000	189	103,1	
Guapeva Semente 400+ CPA	6000	33	14,1	
Controle + CPA	8000	155	88,6	74,96
	14000	188	102,7	
Guapeva Semente 200+ NaCl	6000	21	9,0	
Controle - NaCl	8000	24	13,7	23,71
	14000	45	22,7	
Guapeva Semente 400+ NaCl	6000	32	13,7	
Controle - NaCl	8000	24	13,7	32,10
	14000	56	27,4	
Guapeva Casca 200 + CPA	6000	31	15,5	
Guapeva Casca 400+ CPA	6000	66	33,0	12,63
	12000	97	48,5	
Guapeva Casca 200 + CPA	6000	31	13,3	
Controle + CPA a	8000	24	13,7	31,33
	14000	55	27,0	
Guapeva Casca 400+ CPA	6000	66	28,3	
Controle + CPA	8000	155	88,6	100,11
	14000	221	116,9	
Guapeva Casca 200+ NaCl	6000	24	10,3	
Controle - NaCl	8000	24	13,7	26,00
	14000	48	24,0	
Guapeva Casca 400+ NaCl	6000	26	11,1	
Controle - NaCl	8000	24	13,7	27,52
	14000	50	24,9	
Guapeva Polpa 200 + CPA [c]	6000	36	18,0	
Guapeva Polpa 400+ CPA [c]	6000	31	15,5	0,37
	12000	67	33,5	
Guapeva Polpa 200 + CPA	6000	36	15,4	
Controle + CPA	8000	155	88,6	77,25
	14000	191	104,0	

RESULTADOS TESTE DE MICRONUCLEOS				
Grupos comparados/ Concentração*	**n° células analisadas**	**MN**	**MN esperado**	**x^2**
Guapeva Polpa 400+ CPA	6000	31	13,3	
Controle + CPA	8000	155	88,6	73,44
	14000	186	101,9	
Guapeva Polpa 200+ NaCl	6000	19	8,1	
Controle - NaCl	8000	24	13,7	22,19
	14000	43	21,9	
Guapeva Polpa 400+ NaCl	6000	25	10,7	
Controle - NaCl	8000	24	13,7	26,76
	14000	49	24,4	

*Concentração em mg extrato/ kg de peso corpóreo. CPA** = Ciclofosfamida. Análise estatística pelo método Tukey, com p<0,05. Letras minúsculas iguais significam grupos com resultado sem diferença estatística.

Para validar o método, foi feita uma comparação dos dois controles, positivo e negativo. Deve haver diferença significativa entre eles, ou seja, qui quadrado maior que 3,84 e o número de micronúcleos do grupo que recebeu CPA (controle positivo) deve ser maior que o grupo que recebeu NaCl (controle negativo). Isso aconteceu no teste com os frutos do Cerrado, logo o método foi validado. Logo, a concentração utilizada de CPA, no controle positivo, mostrou-se eficiente na indução de dano cromossômico em eritrócitos imaturos (PCEs).

O mesmo processo foi realizado para os demais grupos, sempre comparando os grupos de extratos que receberam NaCl no último dia, com o grupo controle negativo e a outra comparação realizada entre os grupos de extratos + CPA com o controle positivo. A comparação também foi avaliada pela análise estatística Qui quadrado com o objetivo de verificar se existia ou não diferença significativa a 5% entre os grupos comparados.

Todos os extratos analisados, tanto na concentração de 200 como na de 400 mg de extrato por kg de P.C., apresentaram diferença significativa a 5% quando comparados com o controle positivo. Isso significa que os extratos de frutas do Cerrado possuem

poder protetor contra a droga CPA, ou seja, os extratos são antimutagênicos, uma vez que todos os tratamentos promoveram uma redução no número de micronúcleos em relação ao esperado para o controle positivo.

Outra verificação também possível através do teste de micronúcleos é a resposta se o extrato testado é ou não mutagênico. Para isso, deve-se comparar os grupos de extratos que receberam NaCl no último dia com o controle negativo, e eles devem apresentar diferença significativa (5%). Todos os extratos do Cerrado analisados no presente trabalho, para as duas concentrações (200 e 400 mg extrato/kg P.C.) não são mutagênicos, ou seja, o número de MN esperado para os grupos de extrato + NaCl foi menor do que do controle negativo (Tabela 29).

Ao comparar as duas concentrações utilizadas para o mesmo extrato, conclui-se que a Gabiroba, Guapeva semente, Guapeva polpa são estatisticamente iguais (teste x^2, $p<0,05$) para as concentrações de 200 e 400 mg extrato/ kg de P.C., isso significa que se o efeito protetor é similar para as duas doses testadas, não é necessário utilizar a dosagem maior. O mesmo ocorre para o extrato Guapeva casca, os grupos com diferentes concentrações diferem-se estatisticamente, e o extrato com menor dosagem apresentou um efeito protetor contra a droga testada, CPA, maior que o extrato com maior dosagem.

De acordo com o valor de redução, o extrato que apresentou maior efeito protetor contra a droga CPA foi o Murici na concentração de 400 mg extrato/kg de P.C., com redução de 97,71 %. E o que menos protegeu foi a Guapeva casca 400 mg extrato/kg de P.C., com redução de 43,23%. Estes resultados indicam que a ação antimutagênica pode ser explicada apenas em parte pela ação antioxidante, uma vez que o melhor efeito antimutagênico foi observado com um extrato que sempre apresentou os menores efeitos antioxidantes. Porém, a ação antioxidante não pode ser totalmente descartada uma vez

que a segunda melhor fruta no quesito MN foi a Gabiroba, que sempre apresentou maior potencial antioxidante.

O ensaio de micronúcleos serve como um primeiro passo no estudo de compostos mutagênicos, tendo a vantagem de ser mais rápido que a análise de aberrações cromossômicas (FREITAS et al., 2007). Os resultados positivos obtidos neste teste fornecem fortes evidências de genotoxicidade sistêmica da substância química avaliada. Sob condições experimentais apropriadas (isto é, quando ocorre exposição da medula óssea), os resultados negativos suportam a conclusão de que a substância teste não é genotóxica *in vivo* (RIBEIRO, & MARQUES, 2003)

5.1.10 Teste Antiinflamatório (Edema de Pata)

O teste de edema de pata induzido por carragenina é o modelo experimental classicamente utilizado para o *screening* da atividade antiinflamatória de extratos e compostos isolados (NAKAMURA & SHIMIZU, 1974).

Os animais (ratos albinos machos) foram mantidos no Biotério Central da UNIFAL até atingirem peso de aproximadamente 200-300 g. Eles receberam ração comercial e água livres até o momento do experimento. Ao chegarem ao biotério do Laboratório de Nutrição, os animais foram pesados. As soluções de extrato de frutas assim como a indometacina foram preparadas levando em consideração a média do peso do grupo de animais. O peso médio está descrito na Tabela 30.

Tabela 30. Peso animais Teste Edema de Pata

	Peso animais (g)
Gabiroba (200)	225,59 ± 18,25
Gabiroba (400)	240,66 ± 7,97
Guapeva casca (200)	227,51 ± 16,37
Guapeva casca (400)	245,17 ± 14,90
Guapeva polpa (200)	217,84 ± 5,30
Guapeva polpa (400)	222,69 ± 7,03
Guapeva semente (200)	224,35 ± 14,28
Guapeva semente (400)	228,74 ± 13,33
Murici (200)	232,24 ± 14,57
Murici (400)	210,88 ± 11,10
Controle	240,85 ± 17,77
Controle (Indometacina)	228,94 ± 20,68

*Concentração em mg extrato/ kg de peso corpóreo. Média ± desvio padrão do peso de cada um dos grupos.

Os animais receberam por gavagem volume de 1 mL do extrato dissolvido em água (concentração referente ao grupo em que pertenciam, 200 ou 400 mg de extrato/ kg P.C.), o grupo do controle positivo recebeu indometacina (5mg/Kg de P.C.) e o negativo, recebeu apenas o veículo, água. Exatamente uma hora após a gavagem, foi administrada na região subplantar da pata traseira direita do rato 0,1 mL de Carragenina (1 mg/ pata).

A injeção subcutânea de carragenina na pata de ratos ou camundongos induz o aumento agudo e progressivo do volume da pata injetada. Este edema é proporcional à intensidade da resposta inflamatória, constituindo um parâmetro útil na avaliação da atividade antiinflamatória de novos compostos (MARTINS et al., 2000).

O deslocamento do volume provocado na pata direita dos animais nos tempos de 1h, 2h, 3h, 4h foi considerado como o edema resultante na pata do animal pela agressão do agente flogístico (Carragenina).

As Figuras 45 a 49 apresentam os gráficos da variação do volume da pata direita dos animais de cada grupo. O volume basal foi subtraído de todos os encontrados 1, 2, 3 e 4 horas após a injeção com carragenina.

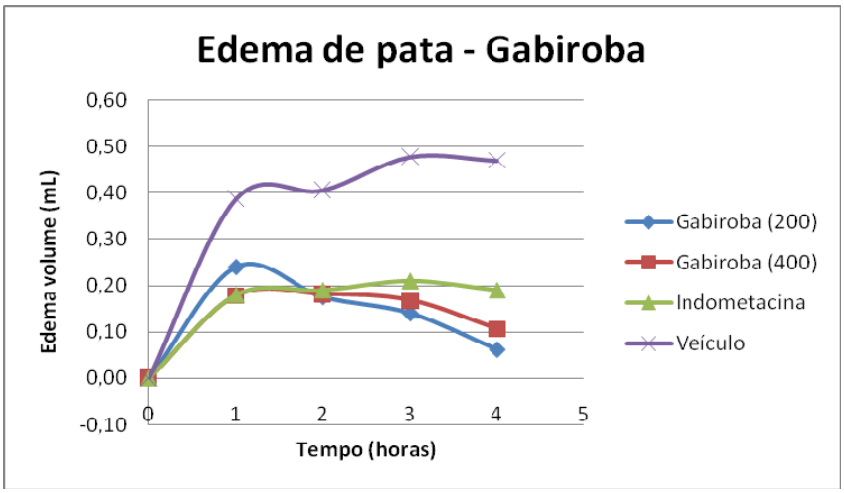

Figura 45. Gráfico com resultados para extrato da fruta Gabiroba no teste de Edema de pata

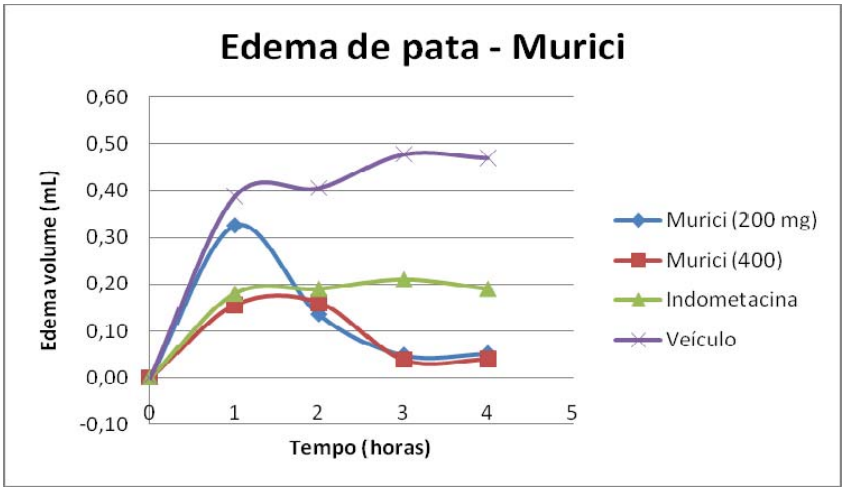

Figura 46. Gráfico com resultados para extrato da fruta Murici no teste de Edema de pata

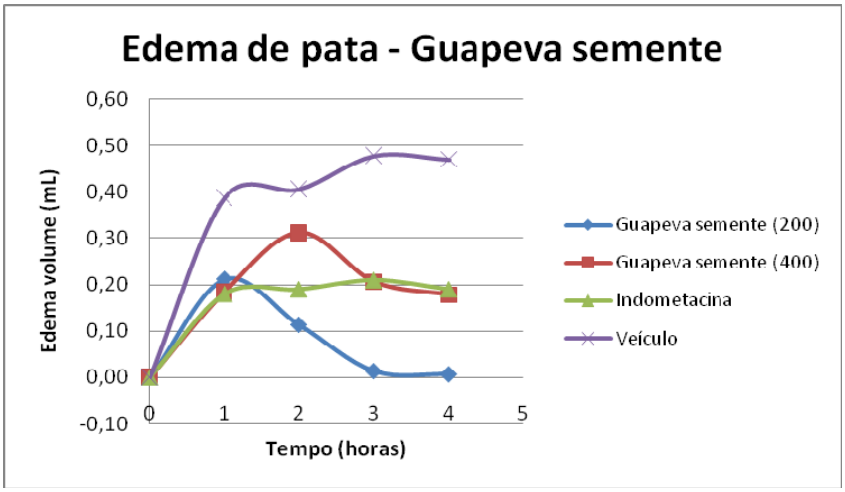

Figura 47. Gráfico com resultados para extrato da fruta Guapeva semente no teste de Edema de pata

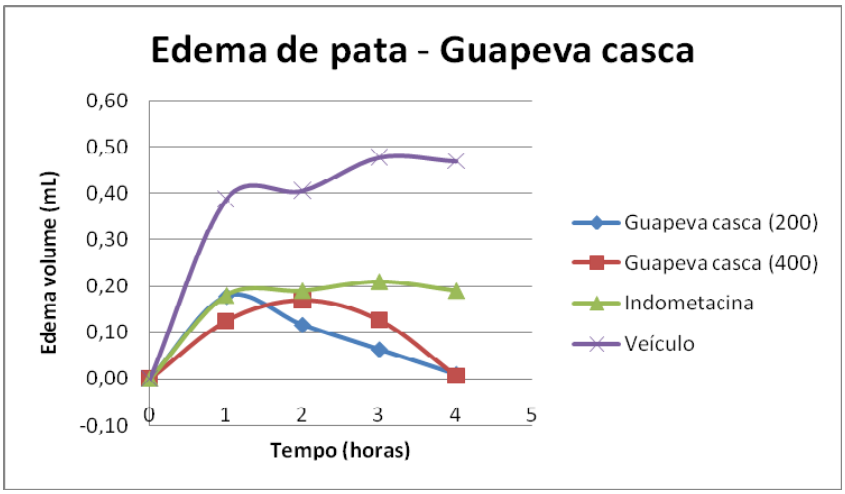

Figura 48. Gráfico com resultados para extrato da fruta Guapeva casca no teste de Edema de pata

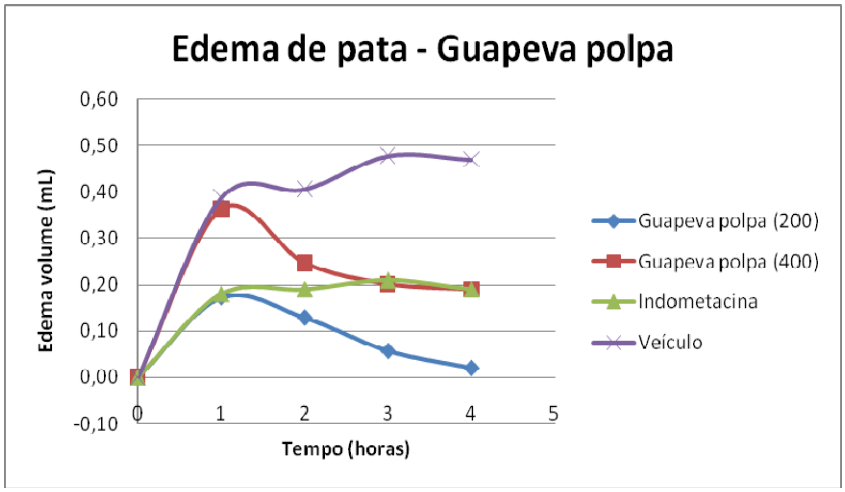

Figura 49. Gráfico com resultados para extrato da fruta Guapeva polpa no teste de Edema de pata

Pode-se observar que a pata dos animais que receberam apenas o veículo apresentou, como esperado, um aumento no volume durante o período de realização do experimento. Nenhum animal, tanto os que receberam extrato de frutas como também o controle positivo, que recebeu Indometacina, apresentou curva característica parecida com o grupo veículo, logo, todos os grupos apresentaram ação antiinflamatória. Isso pode ser registrado pelo fato do volume da pata de ratos tratados não ser maior que o volume da pata dos animais que receberam apenas o veículo. Com este dado também pode-se concluir que nenhum dos extratos apresentaram caracterísitica inflamatória.

Na inflamação experimental induzida por carragenina em patas de ratos, acredita-se que ocorra inicialmente uma primeira fase (em torno da primeira hora após o estímulo) com participação de histamina e serotonina oriundos da degranulação de mastócitos. Em uma segunda fase (2ª - 3ª hora após o estímulo), ocorreria liberação de cininas plasmáticas, e, finalmente, uma terceira fase (3ª – 4ª hora após o estímulo) onde as prostaglandinas seriam os principais mediadores presentes no sítio inflamado. Assim a carragenina representa um bom exemplo de substância usada experimentalmente capaz

de demonstrar que o processo inflamatório é multimediado e onde os mediadores possivelmente interagem entre si no sentido de favorecer o desenvolvimento do processo inflamatório (DI ROSA et al., 1971; NAKAMURA & FERREIRA, 1987).

A indometacina, considerada um inibidor da cicloxigenase, é capaz de impedir esse processo inflamatório. Portanto, sugere-se que o mecanismo de ação do extrato esteja relacionado à inibição da síntese de prostaglandina. O mesmo ocorre no mecanismo antiinflamatório da indometacina, durante o processo inflamatório induzido por carragenina (DI ROSA et al., 1971).

Observando-se os resultados obtidos para o efeito antiinflamatório (%), descrito na Tabela 31, os resultados de efeito protetor obtidos para o antiinflamatório Indometacina estão de acordo com os valores descritos na literatura por outros autores como Padilha et al., (2010) e Villalba et al. (2007). A indometacina apresentou resultados em média de 55,9% de proteção, sem diferença estatística no período de 4 horas.

Ao comparar as amostras com o controle positivo, no tempo de 1 hora após a injeção da Carragenina, apenas a Gabiroba 200, Guapeva semente 200, Guapeva polpa 400 e Murici 200 mg de extrato/kg de P.C. não apresentaram resultados estatisticamente iguais aos da Indometacina. Destes extratos descritos acima, nenhum apresentou efeito antiinflamatório maior que a Indometacina.

No tempo de 2 horas, os extratos Gabiroba 400, Guapeva casca 400 e Murici 400 mg de extrato/kg de P.C. apresentaram resultados estatisticamente iguais ao do controle positivo.

Foi observado um aumento no efeito antiinflamatório de todos os extratos das frutas em análise (nas duas concentrações) a partir da segunda hora de análise, ocasião em que vários extratos apresentaram potencial maior que o da Indometacina. A gabiroba nas concentrações de 200 e 400 mg de extrato/kg de P.C., como também o Murici na

concentração de 400, apresentaram pico de efeito protetor 4 horas após a indução com carragenina. Os demais extratos apresentaram pico máximo de proteção na terceira hora, e este efeito manteve-se sem alteração até a última hora de análise. De acordo com Sartori et al 2003, a carragenina desencadeia o processo inflamatório mediado por prostaglandinas, apresentando pico máximo entre 2 a 3 horas após a aplicação. Logo os extratos do Cerrado analisados, apresentaram proteção máxima contra o processo antiinflamatório exatamente no pico máximo de ação da droga utilizada.

Os extratos que apresentaram melhores resultados quanto ao efeito antiinflamatório no modelo de edema induzido por Carragenina, foram a Guapeva casca (200 e 400), Guapeva semente (200), Guapeva polpa (200) e Murici (200 e 400 mg de extrato/kg de P.C.), sem diferença estatística entre os resultados obtidos para estes extratos. O que chamou atenção foi que a Guapeva semente e Murici apresentaram efeito protetor equivalente para as duas concentrações testadas, e a Guapeva polpa se destacou na concentração de 200 mg de extrato/kg de P.C., logo, não é necessário utilizar uma concentração superior (400 mg de extrato/kg de P.C.) para se obter um efeito antiinflamatório.

Tabela 31. Porcentagem de efeito Antiinflamatório no ensaio in vivo de Edema de Pata para os extratos de frutos do Cerrado

EFEITO ANTIINFLAMATÓRIO (%) / EDEMA DE PATA				
	Hora 1	**Hora 2**	**Hora 3**	**Hora 4**
Gabiroba (200*)	$38,14 \pm 25,74^{aA}$	$68,39 \pm 28,41^{aB}$	$70,71 \pm 14,64^{aB}$	$87,41 \pm 16,48^{aC}$
Gabiroba (400*)	$62,20 \pm 34,76^{bA}$	$55,25 \pm 33,16^{bB}$	$64,78 \pm 20,40^{aB}$	$78,23 \pm 24,68^{aC}$
Guapeva casca (200)	$54,04 \pm 30,52^{bA}$	$71,26 \pm 14,68^{aB}$	$86,75 \pm 17,22^{bC}$	$90,68 \pm 14,02^{aC}$
Guapeva casca (400)	$67,78 \pm 27,92^{bA}$	$58,13 \pm 29,83^{bA}$	$90,93 \pm 15,41^{bB}$	$89,45 \pm 18,37^{aB}$
Guapeva semente (200)	$45,45 \pm 33,31^{cA}$	$72,09 \pm 32,03^{aB}$	$87,80 \pm 25,75^{bC}$	$90,68 \pm 29,36^{aC}$
Guapeva semente (400)	$52,58 \pm 28,39^{bA}$	$29,06 \pm 5,78^{cB}$	$56,90 \pm 21,86^{cC}$	$63,67 \pm 9,68^{bC}$
Guapeva polpa (200)	$55,76 \pm 18,80^{bA}$	$68,39 \pm 30,59^{aB}$	$88,15 \pm 15,86^{bC}$	$95,92 \pm 19,42^{aC}$
Guapeva polpa (400)	$24,83 \pm 19,33^{dA}$	$39,24 \pm 25,47^{dA}$	$57,81 \pm 31,91^{cB}$	$66,33 \pm 42,14^{bB}$
Murici (200)	$23,91 \pm 16,78^{dA}$	$66,75 \pm 15,50^{aB}$	$81,69 \pm 23,40^{bC}$	$82,07 \pm 12,56^{aC}$
Murici (400)	$60,05 \pm 28,78^{bA}$	$60,59 \pm 28,40^{bA}$	$77,68 \pm 26,58^{bB}$	$86,99 \pm 15,35^{aC}$
Indometacina	$53,09 \pm 35,48^{bA}$	$53,20 \pm 26,21^{bA}$	$56,90 \pm 14,98^{cA}$	$60,41 \pm 8,46^{bA}$

*Concentração em mg extrato/ kg de peso corpóreo .Análise estatística pelo método Tukey, com $p<0,05$. Letras minúsculas foram usadas na comparação vertical entre os extratos no mesmo intervalo de tempo e letras maiúsculas na comparação horizontal entre o mesmo extrato em diferentes momentos.

5.1.11 Teste de Genotoxicidade (Ensaio Cometa)

A mensuração dos níveis de estresse oxidativo ao DNA envolvia técnicas bioquímicas sofisticadas que necessitavam de considerável quantidade de tecido para a sua correta quantificação. Dessa forma, em virtude dos limites relacionados com a obtenção de material suficiente para análise, essas técnicas não podiam ser aplicadas em pequenas quantidades de tecidos, como aqueles obtidos durante procedimentos endoscópicos. O Ensaio Cometa vem sendo proposto para estudos de toxicogenética devido às suas peculiaridades e vantagens quando comparado a outros testes para detecção de substâncias genotóxicas.

O ensaio do cometa (*Single Cell Gel Electrophoresis*, EC) é uma técnica rápida e eficiente quando usada para quantificar as lesões e detectar os efeitos do reparo no DNA em células individualizadas de mamíferos. Não é teste utilizado para detectar mutações, mas sim lesões genômicas que, após serem processadas, podem resultar em mutação. Diferente das mutações, as lesões detectadas pelo Ensaio Cometa são passíveis de correção. Assim sendo, esse ensaio pode ser também utilizado para estudos de reparo do DNA, trazendo informações importantes sobre a cinética e o tipo de lesão reparada, embora não possibilite inferir a fidedignidade do processo de reparo (ALBERTINI et al., 2000).

Os animais foram tratados com os extratos de frutas do Cerrado, Gabiroba, Guapeva (semente, casca e polpa) e Murici, nas concentrações de 200 e 400 mg de extrato/kg de P.C. por 1 semana (HORVATHOVA et al., 2009). O sacrifício ocorria sempre no oitavo dia.

Foi realizado o teste de viabilidade celular com os hepatócitos de um animal de cada grupo. Foi aceita viabilidade celular mínima de 70% (SASAKI et al., 2007). Nenhum dos grupos testados apresentou viabilidade menor que 85%.

Seguem fotos (Figuras 50 a 52) tiradas durante o experimento com Frutas do Cerrado no ensaio Cometa, mostrando diferentes níveis visualizados em hepatócitos.

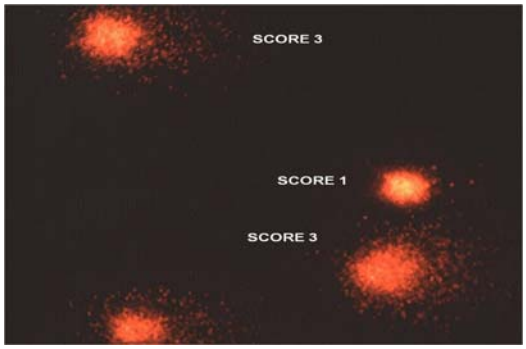

Figura 50. Níveis 1 e 3 de danos no DNA no Ensaio Cometa

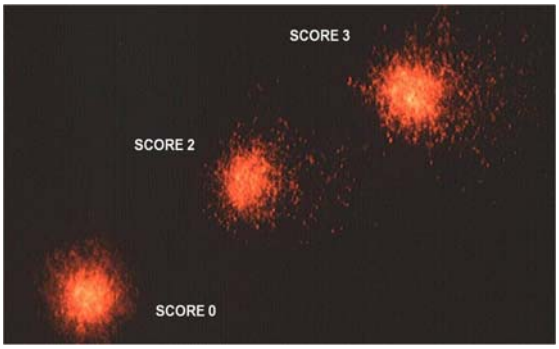

Figura 51. Níveis 3, 2 e 0 de danos no DNA no Ensaio Cometa

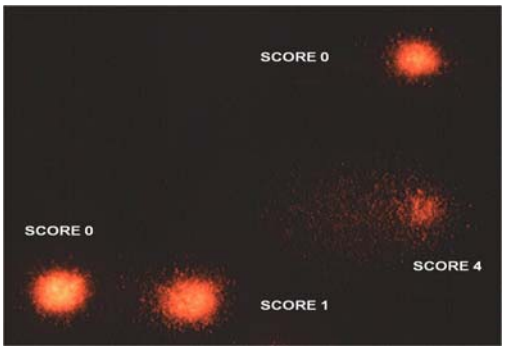

Figura 52. Níveis 4, 0 e 1 de danos no DNA no Ensaio Cometa

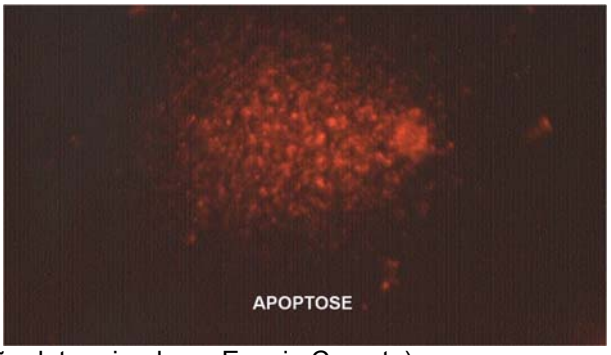

Figura 53. Apoptose (não determinado no Ensaio Cometa)

É importante ressaltar que a apoptose (Figura 53) não foi considerada como nível 4, uma vez que apoptose significa morte celular e não dano. A apoptose não é medida através ensaio cometa.

A leitura das lâminas foi feita no Microscópio de Fluorescência NIKON - Modelo Eclipse E600. Os resultados para o Dano no DNA (%) e Células danificadas (%) seguem na Tabela 32.

Tabela 32. Resultados para porcentagem de dano no DNA e células danificadas a partir do tratamento de animais com extratos de frutas do Cerrado, avaliados no Ensaio Cometa

TRATAMENTO/ CONCENTRAÇÃO	DANO NO DNA (%)	CÉLULAS DANIFICADAS (%)
Controle positivo (+ H_2O_2)	275,80 ± 11,76	97,40 ± 1,34
Controle negativo	182,20 ± 7,16[a]	83,00 ± 1,58[A]
Guapeva semente (200)+ H_2O_2	179,60 ± 39,44[a]	79,00 ± 17,01[A]
Guapeva semente (200)	82,60 ± 12,52	47,20 ± 7,53[C]
Guapeva semente (400) + H_2O_2	133,20 ± 29,82[b]	62,60 ± 8,47[B]
Guapeva semente (400)	105,60 ± 20,45	61,40 ± 19,01[B]
Guapeva Casca (200) + H_2O_2	171,60 ± 54,96	78,40 ± 11,80[A]
Guapeva Casca (200)	141,20 ± 7,01[b]	79,40 ± 11,06[A]
Guapeva Casca (400) + H_2O_2	153,40 ± 31,17	78,80 ± 16,47[A]
Guapeva Casca (400)	80,00 ± 12,81	46,00 ± 7,97[C]
Guapeva polpa (200) + H_2O_2	170,40 ± 49,76	78,80 ± 10,85[A]
Guapeva polpa (200)	134,80 ± 24,84[b]	76,00 ± 7,78[A]
Guapeva polpa (400) + H_2O_2	204,20 ± 53,63[a]	86,40 ± 11,95
Guapeva polpa (400)	99,00 ± 25,33	58,20 ± 12,74
Gabiroba (200) + H_2O_2	216,60 ± 41,65	88,80 ± 10,26
Gabiroba (200)	147,80 ± 23,04	85,00 ± 8,00[C]
Gabiroba (400) + H_2O_2	214,20 ± 30,24	89,80 ± 13,08
Gabiroba (400)	142,80 ± 17,84	73,00 ± 5,15
Murici (200) + H_2O_2	192,80 ± 62,24	81,80 ± 10,57
Murici (200)	98,40 ± 60,04	57,80 ± 32,51
Murici (400) + H_2O_2	129,60 ± 35,27	64,20 ± 16,10
Murici (400)	106,00 ± 12,23	50,80 ± 9,73

Resultado da concentração em mg extrato por Kg de peso corpóreo. Letras minúsculas foram utilizadas na comparação dos resultados do dano Oxidativo, e letras maiúsculas na comparação das células danificadas.

Para a avaliação do índice de dano no DNA que pondera os níveis de degradação de DNA na amostra, diferenciando quando tem muitos danos tipo níveis 4 e 1, por exemplo, os dois controles foram comparados e houve diferença significativa com $p<0,05$ pelo teste de Tukey.

Os grupos tratados com extrato e que receberam peróxido de hidrogênio foram comparados com o controle positivo (que também recebeu peróxido de hidrogênio). Houve diferença significativa entre eles e o controle apresentou maior dano no DNA que

todos os grupos de extratos, tanto na concentração de 200 como na de 400 mg extrato/kg P.C. Este resultado demonstra que as frutas do Cerrado estudadas, Guapeva semente, casca e polpa, Murici e Gabiroba protegeram o DNA contra dano/lesão causado pela droga peróxido de hidrogênio na concentração de 100mM.

Ao comparar os grupos de extratos que não receberam peróxido de hidrogênio com o controle negativo (que também não foi exposto ao H_2O_2), todos apresentaram diferença significativa e o dano no controle negativo foi maior do que o apresentado pelos grupos de extratos nas duas concentrações. Isso demonstra que as frutas estudadas não causaram danos ao DNA.

Os grupos de extratos que receberam peróxido de hidrogênio deveriam ser significativamente diferentes dos que não receberam a droga, além de apresentar dano maior quando comparados com os grupos de extratos sem peróxido de hidrogênio. Isso só não foi verificado para o extrato Guapeva casca 200 mg extrato/kg P.C., demonstrando que a concentração de droga não foi suficiente para causar dano ao DNA dos animais tratados com o extrato em questão, pois a fruta demonstrou ser mais eficiente contra o peróxido.

Não houve diferença entre as duas concentrações de extratos avaliadas (200 e 400 mg extrato/ kg P.C.), logo, pode-se afirmar que não é necessário utilizar a concentração de 400, gastando assim uma maior quantidade de extrato já que com a metade desta concentração obtem-se a mesma redução contra danos no DNA.

Ao comparar todos os grupos de extratos que receberam peróxido de hidrogênio, verificou-se que Murici 400, Semente da Guapeva 200, Casca da Guapeva 200 e Polpa da Guapeva 200 mg de extrato/kg de P.C. foram os extratos que mais protegeram contra danos no DNA causados pela droga utilizada. Um ponto relevante é que todas as partes (semente, casca e polpa) da fruta Guapeva protegeram mais o DNA na menor

concentração estudada, ou seja, 200 mg extrato/ Kg P.C. Logo será necessária uma menor concentração de extrato para uma maior redução das lesões no DNA.

Como dito acima, nenhum dos extratos causou danos do DNA, pois apresentaram uma porcentagem de danos menor que o controle negativo. Mas dois dos extratos se destacaram bastante dos demais por apresentarem as menores porcentagens de danos causados no DNA, que foram a Guapeva casca na concentração de 400 mg extrato/Kg P.C. e a Guapeva semente na concentração de 200 mg extrato/kg P.C.

Ao avaliar o índice de células danificadas que é um parâmetro geral do número de células que foram afetadas pelo agente genotóxico, causando assim fragmentação no DNA, conclui-se que os grupos que receberam Gabiroba nas duas concentrações analisadas + H_2O_2 foram os que mais danos causaram às células, apresentando em média 89,3% de células danificadas. Não houve diferença estatística entre as duas concentrações para este extrato. Mesmo assim o número de células danificadas pelo controle positivo foi maior que o apresentado por este extrato.

Ao comparar os dois índices medidos no ensaio Cometa, pode-se concluir que no geral os melhores extratos foram a Guapeva casca 400 e Guapeva semente 200 mg extrato/kg P.C. (H_2O_2), pois apresentaram baixos índices tanto para o dano no DNA quanto para o número de células danificadas. Ao mesmo tempo o pior extrato foi a Gabiroba 200 e 400 mg de extrato/kg P.C., por apresentar altos níveis para os dois índices.

Os resultados apresentados pela Guapeva casca na concentração de 400 mg de extrato/kg de P.C. assim como pelo Murici na concentração de 400 mg de extrato/kg de P.C. podem ser associadas, ainda que parcialmente, à capacidade antioxidante *in vitro*, uma vez que estes 2 extratos apresentaram alto potencial antioxidante quando avaliados pelos ensaios *in vitro*.

5.1.12 Atividade antiproliferativa

O câncer é um problema de saúde pública no Brasil e no mundo. A triagem de princípios ativos que apresentam a capacidade de inibir a proliferação de células tumorais (atividade antiproliferativa) *in vitro* é a etapa inicial na descoberta e desenvolvimento de novas drogas contra o câncer. A utilização de culturas de células tumorais humanas com esta finalidade foi amplamente adotada.

O efeito citostático (GI_{50}) é a concentração necessária para que ocorra 50% de crescimento celular. Já o efeito citostático total ou *Total Growth Inhibition* (TGI) é a concentração necessária para que ocorra 0% de crescimento celular.

Os extratos avaliados foram considerados ativos, ou seja, com potencial antiproliferativo, quando apresentarem inibição de crescimento maior que 50% e ainda de forma dose dependente, preferencialmente apresentando seletividade para os tipos celulares. Isso pode ser verificado na Figura 54, com os resultados da Doxorrubicina. Houve inibição de crescimento maior que 50% para todas as linhagens estudadas. Esta inibição ocorreu de forma dose dependente, ou seja, houve o decaimento de todas as linhagens e de forma seletiva, pois cada uma apresentou uma inibição para diferentes concentrações da amostra. Logo a Doxorrubicina apresentou efeito citostático e citocida.

Os extratos das frutas do Cerrado, Gabiroba, Murici, Guapeva (semente, casca e polpa) foram inicialmente avaliados quanto ao potencial anticâncer em culturas de células tumorais humanas, nas concentrações de 0,25; 2,5; 25 e 250 μg/mL. A doxorrubicina foi utilizada como controle positivo.

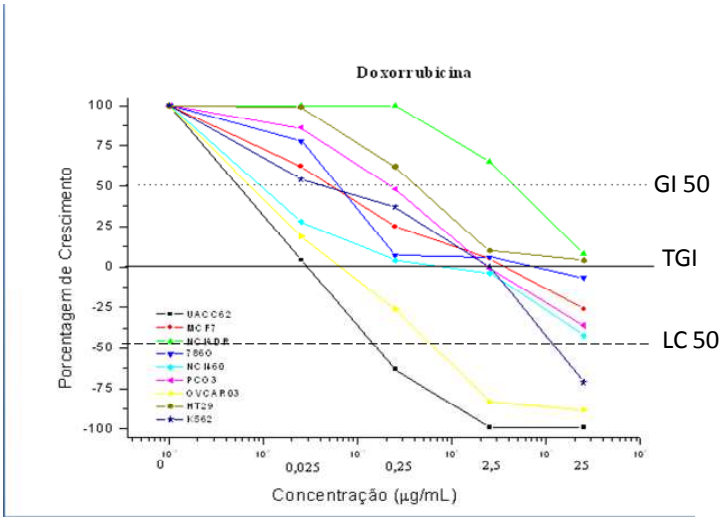

Figura 54. Resultado para Doxorrubina no Teste Antiproliferativao. Pulmão (NCI-H460), Mama (MCF-7), Mama com fenótipo resistência multidroga (NCI-ADR/RE), Cólon (HT-29), Próstata (PC-3), Melanoma (UACC-62), Ovário (OVCAR-3), Renal (786-O)

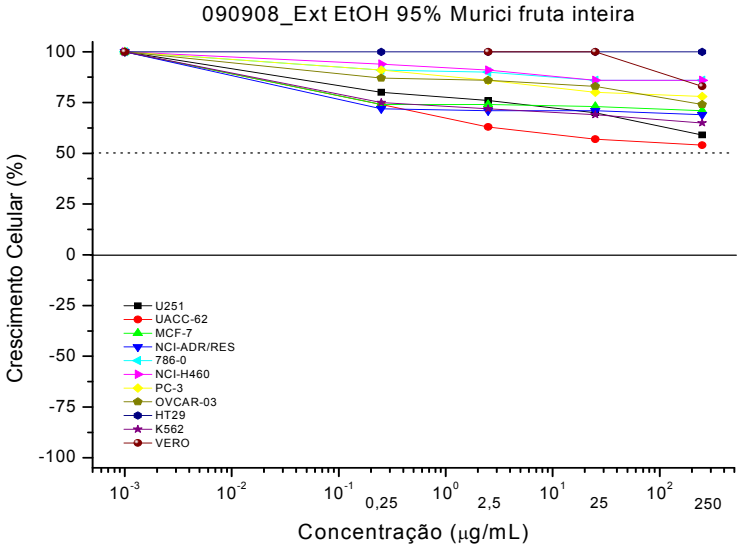

Figura 55. Resultado para extrato da fruta Murici no Teste Antiproliferativao. Pulmão (NCI-H460), Mama (MCF-7), Mama com fenótipo resistência multidroga (NCI-ADR/RE), Cólon (HT-29), Próstata (PC-3), Melanoma (UACC-62), Ovário (OVCAR-3), Renal (786-O)

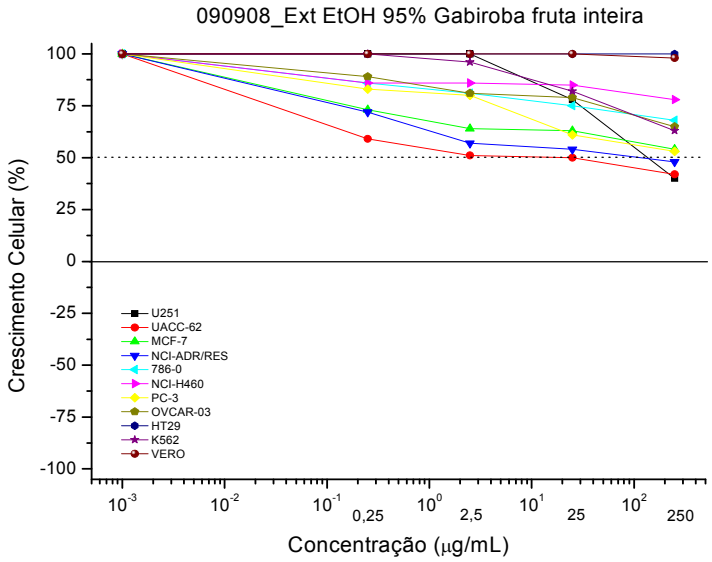

Figura 56. Resultado para extrato da fruta Gabiroba no Teste Antiproliferativao. Pulmão (NCI-H460), Mama (MCF-7), Mama com fenótipo resistência multidroga (NCI-ADR/RE), Cólon (HT-29), Próstata (PC-3), Melanoma (UACC-62), Ovário (OVCAR-3), Renal (786-O)

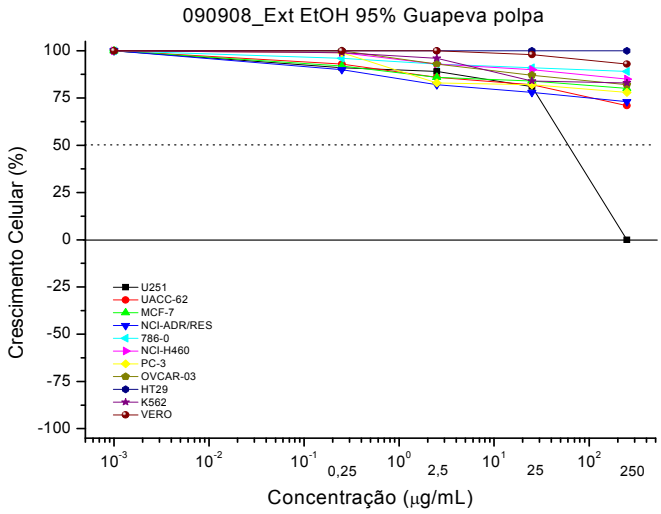

Figura 57. Resultado para extrato da fruta Guapeva polpa no Teste Antiproliferativao. Pulmão (NCI-H460), Mama (MCF-7), Mama com fenótipo resistência multidroga (NCI-ADR/RE), Cólon (HT-29), Próstata (PC-3), Melanoma (UACC-62), Ovário (OVCAR-3), Renal (786-O)

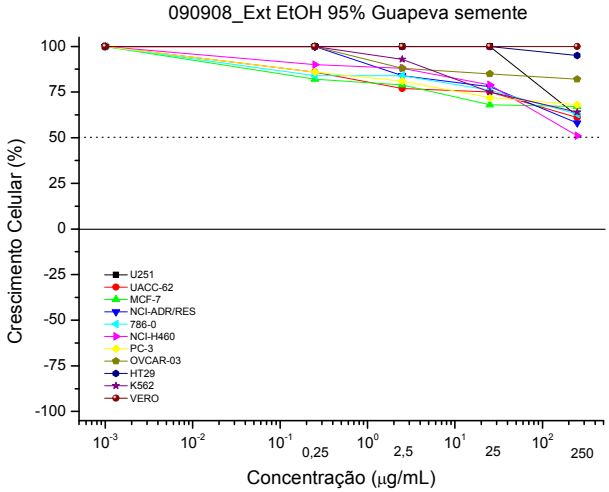

Figura 58. Resultado para extrato da fruta Guapeva semente no Teste Antiproliferativao. Pulmão (NCI-H460), Mama (MCF-7), Mama com fenótipo resistência multidroga (NCI-ADR/RE), Cólon (HT-29), Próstata (PC-3), Melanoma (UACC-62), Ovário (OVCAR-3), Renal (786-O)

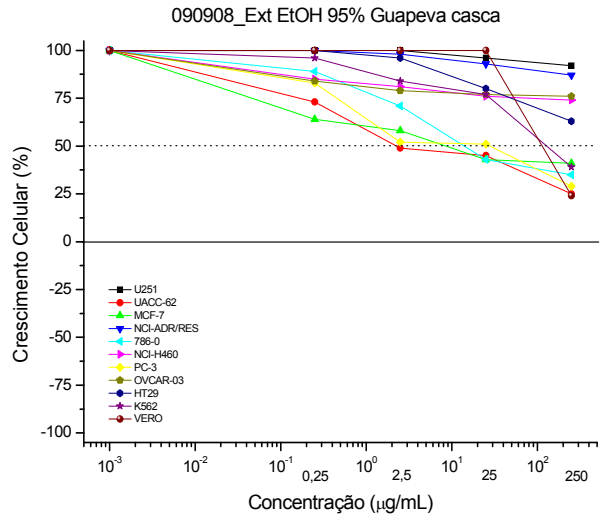

Figura 59. Resultado para extrato da fruta Guapeva casca no Teste Antiproliferativao. Pulmão (NCI-H460), Mama (MCF-7), Mama com fenótipo resistência multidroga (NCI-ADR/RE), Cólon (HT-29), Próstata (PC-3), Melanoma (UACC-62), Ovário (OVCAR-3), Renal (786-O).

Tabela 33. Resultados de GI_{50} no Ensaio antiproliferativo para os extratos de frutas do Cerrado analisados

	GI_{50} (µg/mL)										
	2	**u**	**m**	**a**	**7**	**4**	**p**	**o**	**h**	**k**	**V**
Doxorrubicina	0,031	0,060	0,056	1,49	0,025	<0,025	<0,025	0,27	0,25	0,052	0,19
Murici	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250
Gabiroba	144,33	13,26	>250	55,11	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250
Guapeva polpa	41,63	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250
Guapeva semente	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250
Guapeva casca	>250	6,13	13,33	>250	24,99	>250	13,70	>250	>250	132,72	217,96

Células tumorais humanas: 2= U251 (glioma); u = UACC-62 (melanoma); m = MCF-7 (mama); a = NCI-ADR/RES (ovário resistente a múltiplos fármacos); 7 = 786-0 (rim); 4 = NCI-H460 (pulmão, tipo não pequenas células); p = PC-3 (próstata); o = OVCAR-03 (ovário); h = HT-29 (cólon); k = K562 (leucemia); Célula normal: V = VERO (célula epitelial de rim de macaco verde)

Dos extratos analisados nestas concentrações, os extratos da casca e polpa da Guapeva e a Gabiroba apresentaram efeito citostático para algumas linhagens testadas, destacando-se o extrato da casca da Guapeva, com valores de GI_{50} (µg/mL) de 6,13 (Melanoma), 13,33 (Mama), 24,99 (Rim) e 13,70 (Próstata) (Tabela 33). Os demais extratos estudados não apresentaram efeito citostático. No caso da Guapeva polpa, houve efeito citostático para uma das linhagens, mas isso não é interessante para o estudo uma vez que é importante que as linhagens comportem-se de forma dose dependente. Nenhum extrato nestas concentrações apresentou efeito citocida uma vez que todos apresentaram TGI acima de 250 µg/mL, ou seja, a maior concentração utilizada no experimento.

A realização de um fracionamento poderia ter como consequência um maior efeito antiproliferativo, principalmente para os extratos da Gabiroba e Guapeva (casca e polpa). O aumento na concentração dos extratos não seria uma boa opção uma vez que existe um valor máximo aceitável de concentração para que extratos sejam utilizados no desenvolvimento de quimioterápicos. Mas o fato dos extratos etanólicos das frutas do Cerrado não terem apresentado resultados tão promissores como quimioterápicos não impede que eles sejam aproveitados para outros fins, uma vez que elas apresentaram interessante efeito antiinflamatório e antioxidante. Assim, seria possível postular o uso desses extratos em terapias adjuvantes como no tratamento do câncer.

5.1.13 Ensaios de citotoxicidade / antiproliferativo ($HepG_2$)

Os extratos etanólicos das frutas do Cerrado foram testados quanto à capacidade antiproliferativa e antioxidante celular frente às células de hepatócitos humanos ($HepG_2$).

O primeiro passo realizado foi o teste de citotoxicidade para diferentes concentrações dos extratos (0,06 até 25 mg/mL). A partir destes, realizou-se o ensaio antiproliferativo, para as concentrações não citotóxicas.

Nestas condições, o extrato da semente da Guapeva se mostrou citotóxico para concentrações acima de 630 µg/mL, ou seja, o extrato em questão diminuiu a absorbância acima de 10% quando comparado com o controle. Logo foi feito teste proliferativo para a Guapeva semente tendo como concentração máxima o valor de 630 µg/mL. Nestas condições, não houve nenhuma.

Ao testar a capacidade antiproliferativa dos demais extratos (Guapeva casca e polpa, Murici e Gabiroba), não foram observados efeitos citotóxicos para a concentração máxima de 250 µg/mL. Então foram preparados novos extratos com concentração de 500.000 µg/mL.

Novamente realizou-se o teste citotóxico e os quatro extratos não apresentaram citotoxicidade para esta nova concentração. É possível observar nas Figuras 60 a 63, que o valor máximo de citotoxicidade para todos os extratos nunca é maior que 90%. Também pode-se observar, pelos mesmas figuras, que a atividade antiproliferativa dos extratos foi medida exatamente com as mesmas concentrações que não tiveram caráter citotóxico.

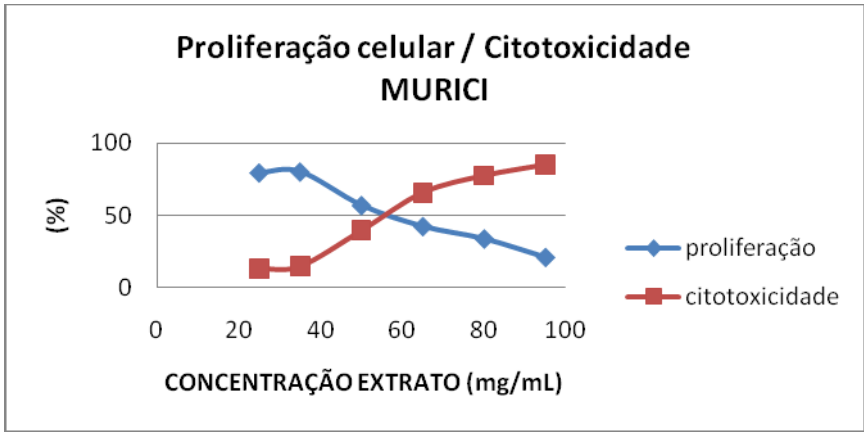

Figura 60. Resultado dos ensaios de citotoxicidade e proliferação celular ($HepG_2$) para extrato Murici. Tempo de exposição T_{24} horas para citotoxicidade e T_4 horas para proliferação celular

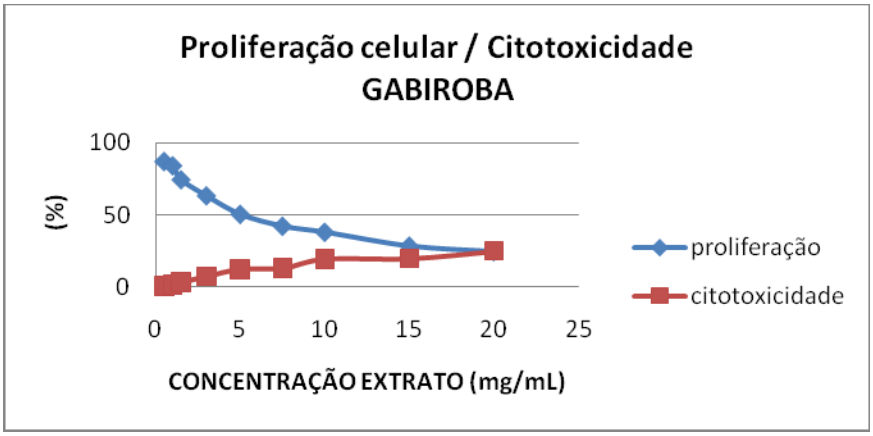

Figura 61. Resultado dos ensaios de citotoxicidade e proliferação celular ($HepG_2$) para extrato Gabiroba. Tempo de exposição T_{24} horas para citotoxicidade e T_4 horas para proliferação celular

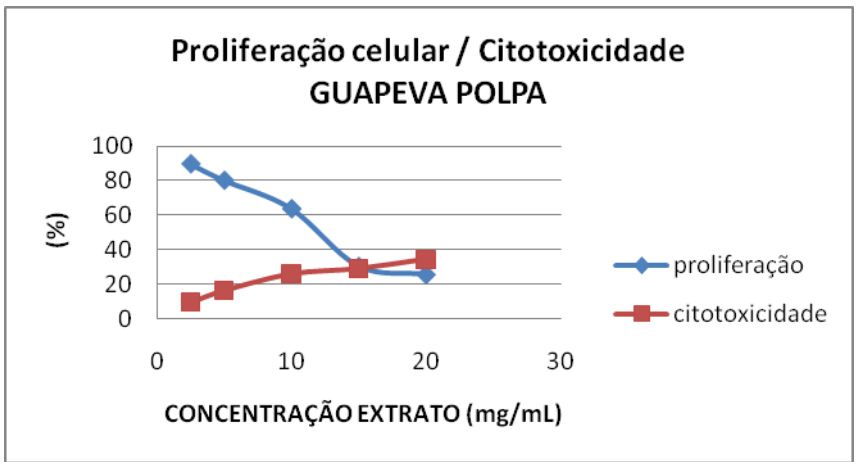

Figura 62. Resultado dos ensaios de citotoxicidade e proliferação celular ($HepG_2$) para extrato Guapeva polpa. Tempo de exposição T_{24} horas para citotoxicidade e T_4 horas para proliferação celular

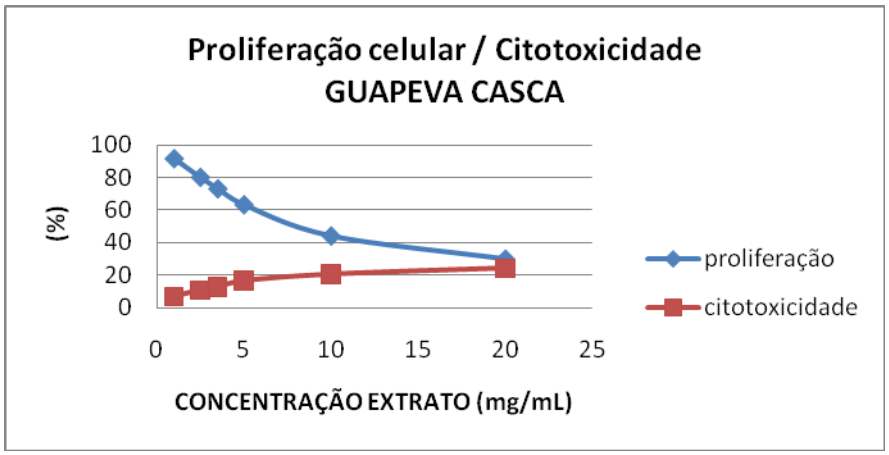

Figura 63. Resultado dos ensaios de citotoxicidade e proliferação celular ($HepG_2$) para extrato Guapeva casca. Tempo de exposição T_{24} horas para citotoxicidade e T_4 horas para proliferação celular

A partir das curvas de concentração de extrato / potencial antiproliferativo foram calculados os valores de IC_{50} (mg/mL) para cada extrato. Os resultados para a atividade antiproliferativa dos frutos do Cerrado estão descritas na Tabela 34.

Tabela 34. Resultado de IC_{50} para os extratos de frutas do Cerrado avaliados no Ensaio Antiproliferativo ($HepG_2$)

ENSAIO ANTIPROLIFERATIVO ($HepG_2$)	
EXTRATOS	**IC_{50} (mg/mL)**
Murici	61,08 ± 4,16 [a]
Gabiroba	8,35 ± 2,74 [b]
Guapeva casca	11,75 ± 2,41 [b]
Guapeva semente	n.d.
Guapeva polpa	12,57 ± 0,68 [b]

n.d. não determinado

Os extratos de Gabiroba, Guapeva polpa e Guapeva casca apresentaram resultados relevantes, com IC_{50} (mg/mL) médio de 10,89 mg/mL, sem diferença estatística entre eles.

Ao comparar os extratos do Cerrado com a fruta raspberry analisada por Liu et al., (2002), foi verificado que é necessário uma concentração maior da fruta rapberry do que das frutas do Cerrado para ter atividade antiproliferativa em células $HepG_2$. A Figura 64 mostra os resultados de IC_{50} descritos para Raspberry.

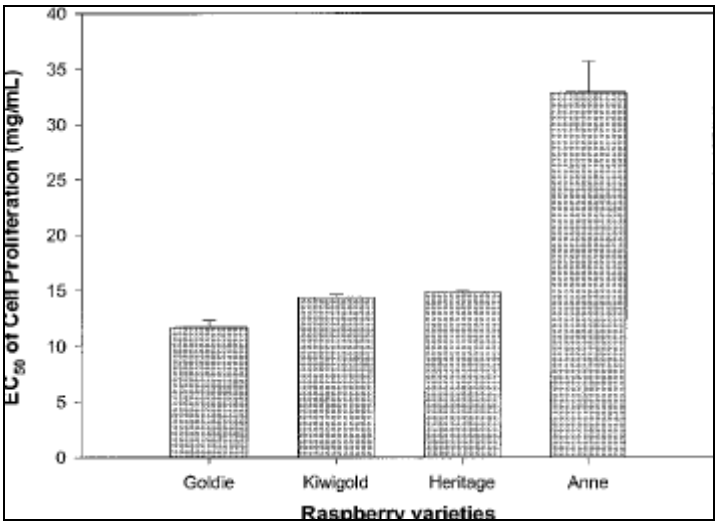

Figura 64. Resultado de EC_{50} (mg/mL) para o teste de proliferação celular realizado para frutas Raspberries (LIU et al., 2002)

5.1.14 Atividade antioxidante celular ($HepG_2$)

Apesar da ampla utilização dos métodos para determinação da atividade antioxidante *in vitro*, o método de ação destes é questionado por uma série de razões. Alguns são feitos em pH e temperatura não fisiológicos, e nenhum deles leva em consideração a biodisponibilidade de absorção, metabolismo dos compostos antioxidantes (WOLFE & LIU, 2007).

Os modelos animais e em humanos são, obviamente, os melhores métodos para determinar a real eficácia de antioxidantes no organismo, mas são métodos caros e demorados, além de não serem adequados para a triagem inicial dos antioxidantes em alimentos (MERMELSTEIN, 2010).

O método de cultura celular chamado Atividade Antioxidante Celular (*CAA*) é biologicamente mais relevante que os ensaios químicos (*in vitro*), pois leva em conta alguns aspectos de captação celular e distribuição dos compostos antioxidantes (MERMELSTEIN, 2010). Este seria então um método mais adequado para medir a atividade antioxidante, devido a maior complexidade no sistema biológico em relação às reações químicas, sendo então uma importante ferramenta para seleção de alimentos, fitoquímicos, e suplementos dietéticos para a atividade biológica em potencial (WOLFE & LIU, 2007).

Para os cálculos da fluorescência no ensaio *CAA,* primeiro foi construído relacionando o decaimento da fluorescência em função do tempo para cada concentração do padrão Quercetina (Figura 66). Depois calculou-se a *AUC* (área abaixo da curva) e obteve-se um gráfico de *CAA* em função da concentração de Quercetina, que foi utilizado

para a quantificação do potencial antioxidante celular dos extratos (Figura 65). Os resultados do ensaio *CAA* dos extratos foram expressos em µmol de Quercetina/100g de amostra.

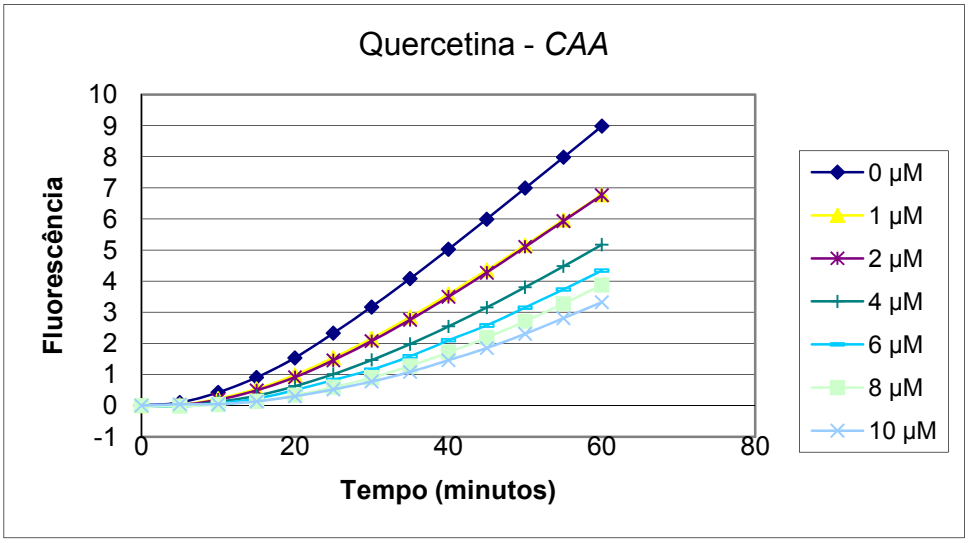

Figura 65. Curvas de diferentes concentrações do padrão Quercetina no ensaio antioxidante celular

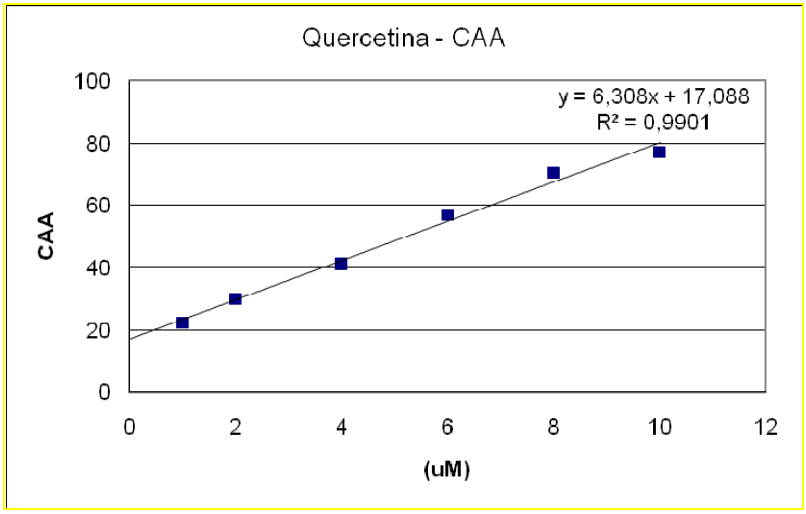

Figura 66. Curva padrão da Quercetina no ensaio antioxidante celular

O ensaio *CAA* foi realizado para concentrações de extratos que não apresentaram citotoxicidade, como descrito no ítem anterior. Assim, para o extrato da Guapeva semente, que apresentou características citotóxicas para concentrações acima de 600µg/mL, o ensaio *CAA* foi realizado para concentrações menores que 600µg/mL e nessas condições, não houve atividade antioxidante celular para este extrato. O que está coerente com as avaliações de capacidade antioxidante através de reações químicas.

Pode-se observar nas Figuras 67 que não houve decaimento da fluorescência com o aumento da concentração, logo não foi capaz de se realizar os cálculos do potencial antioxidante celular.

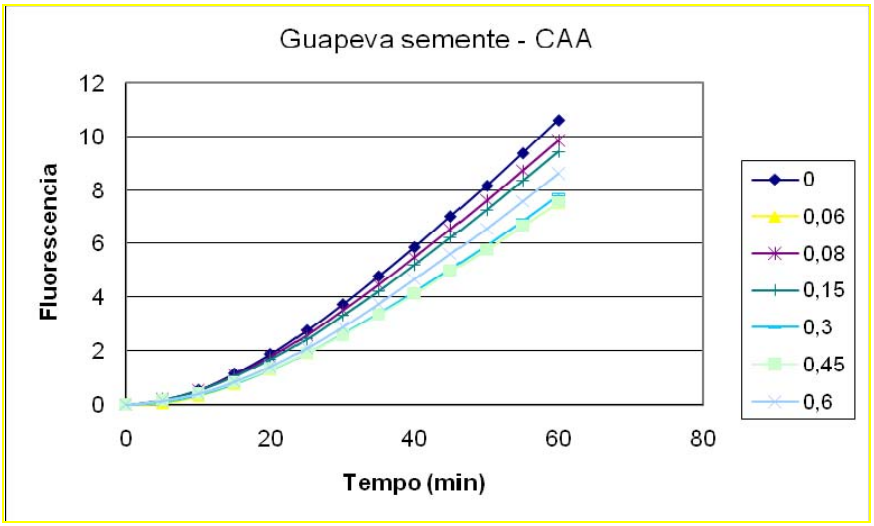

Figura 67. Curvas de concentração (mg/mL) no ensaio antioxidante celular para extrato da Guapeva semente

Com a concentração de 25 mg/mL, os extatos Guapeva casca e polpa, Murici e Gabiroba não apresentaram atividade antioxidante celular, logo foi necessário um aumento no valor da concentração, que passou para 500 mg/mL.

Como resultado do ensaio *CAA*, a Guapeva casca se destacou dos demais extratos quanto ao potencial antioxidante celular, apresentando *CAA* de 99,91 µmol Quercetina/100 g de fruta fresca. Os resultados para os extratos de frutas do Cerrado analisados no ensaio *CAA* estão descritos na Tabela 35.

Tabela 35. Resultados para ensaio *CAA*

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE CELULAR	
Extrato	**Concentração (µmol Quercetina/100g fruta fresca)**
Murici	41,36 ± 17,89 [a]
Gabiroba	33,90 ± 18,87 [a]
Guapeva polpa	23,38 ± 4,26 [a]
Guapeva casca	99,91 ± 24,61 [b]
Guapeva semente	n.d.*

n.d.* não determinado

Os resultados obtidos pelo ensaio *CAA* concordam em parte com os obtidos através das reações químicas, onde o extrato Guapeva casca sempre foi o segundo melhor extrato.

Ao comparar os resultados obtidos no ensaio *CAA* com as frutas do Cerrado com as descritas pelo autor Wolfe & Liu (2008) (Figura 68), pode-se concluir as frutas brasileiras possuem potencial antioxidante celular melhor que a maçã, ameixa, uva, cereja, manga, entre outras frutas. Além disso, a Guapeva casca apresentou potencial inferior apenas a blackberry e romã.

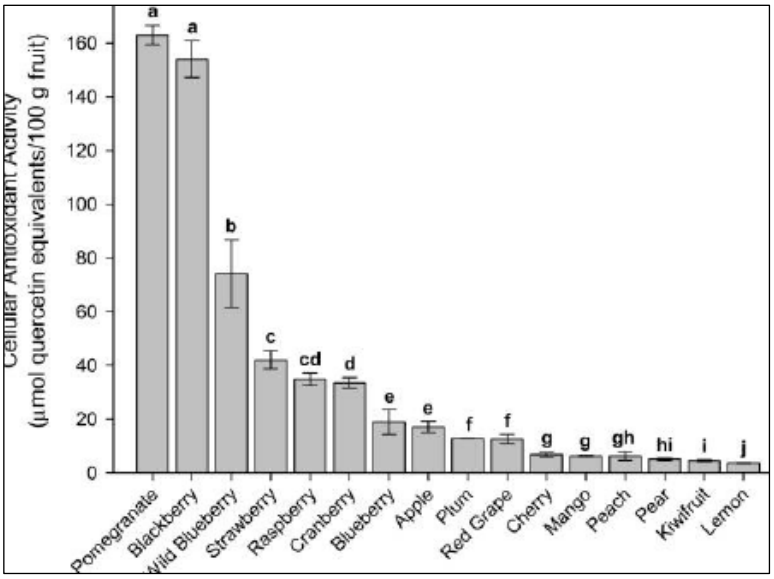

Figura 68. Resultado do potencial antioxidante celular através do método *CAA* para frutas consumidas nos Estados Unidos (WOLFE & LIU, 2008)

6 CONCLUSÕES

Três frutas do bioma Cerrado brasileiro, Guapeva (*Pouteria cf. guardneriana* Radlk.), Murici (*Byrsonima verbascifolia* Rich.) e Gabiroba (*Compomanesia cambessedeana O*. Berg.) foram avaliadas quanto aos potenciais antioxidante, antiinflamatório, antimutagênico, antigenotóxico, antiproliferativo e citotoxicidade.

Foram avaliadas duas formas de extração hidrofílica, uma com água e outra com etanol 95%. A diferença nos resultados entre as duas extrações pode ser visualizada no ensaio de quantificação de fenóis totais que foi realizada pelo método de Folin Ciocalteau. Os resultados para os cinco extratos etanólicos testados (Guapeva semente, Guapeva casca, Guapeva polpa, Murici e Gabiroba) foram maiores do que aqueles obtidos para os aquosos. A fruta que apresentou maior concentração de fenóis totais foi a Gabiroba, tanto para a extração aquosa como para a etanólica.

Foi realizada a quantificação de flavonóides totais para as amostras etanólicas e o extrato que mais se destacou foi a Guapeva semente.

A determinação da capacidade antioxidante dos cinco extratos foi determinada por quatro métodos *in vitro*, a saber, *DPPH, TEAC, ORAC e PSC.*

Foram realizadas duas medidas diferentes no teste *DPPH*, a primeira pela curva do padrão *Trolox* e a outra onde expressa pela concentração necessária para reduzir em 50% a concentração de DPPH (IC_{50}, µg/mL). No *DPPH Trolox* foram realizadas leituras em três períodos distintos, após 30, 60 e 90 minutos de reação. O extrato etanólico da casca de Guapeva apresentou melhor potencial antioxidante, sem diferença estatística

para os três tempos avaliados. No *DPPH* (IC_{50}), o extrato etanólico de Gabiroba apresentou maior atividade.

No ensaio *TEAC,* os extratos que mais se destacaram foram a Guapeva casca etanólica e a Gabiroba etanólica.

No método antioxidante *ORAC,* a Gabiroba etanólica foi a que apresentou maior potencial. Na porção lipofílica, o extrato com maior potencial foi o Murici.

No ensaio *PSC*, Gabiroba destacou-se pelo alto potencial antioxidante.

Foi realizada análise por CLAE afim de identificação e quantificar alguns padrões de compostos fenólicos nos cinco extratos estudados. Foram identificados os compostos: Ácido ferrúlico, Resveratrol, Etil galato, Catequina, Propil galato e Epicatequina. O padrão encontrado em maior concentração foi a Catequina no extrato da Gabiroba.

Animais foram tratados com extratos de frutas do Cerrado e o sangue foi retirado após a gavagem nos tempos de 30, 60 e 120 minutos. Foram feitos testes de extração dos compostos fenólicos no plasma e o teste que apresentou melhor resultado foi aquele utilizando etanol para extração dos fenólicos e enzima sulfatase para a hidrólise enzimática, com tempo de reação de 18 horas entre a enzima e as amostras. No ensaio de fenóis totais, a maior concentração de fenólicos ocorreu no período entre 30 e 60 minutos após a ingestão dos extratos. Neste ensaio a Guapeva casca apresentou maior concentração de fenóis e no tempo de 1 hora, o Murici. No ensaio *TEAC* todos os extratos apresentaram maior potencial antioxidante 30 minutos após a gavagem e neste tempo as três partes da Guapeva e o Murici se destacaram quanto à atividade antioxidante. No ensaio *ORAC* todos os extratos apresentaram maior potencial antioxidante no período de 30 e 60 minutos. Para este método não houve diferença significativa entre o potencial dos extratos em 30 minutos e a Gabiroba se destacou no tempo de 60 minutos após a gavagem. Além da quantificação da capacidade antioxidante, a identificação dos

compostos fenólicos foi realizada por espectrometria de massas. Apenas a Catequina no grupo de animais tratados com extrato de Gabiroba foi identificada em concordância com a análise por CLAE.

Duas concentrações dos extratos do Cerrado (200 e 400 mg extrato/Kg de P. C.) foram testadas quanto ao potencial mutagênico e antimutagênico através do teste *in vivo* de Micronúcleos. Todos os extratos mostraram característica de como também caráter não mutagênico. O extrato que apresentou maior efeito protetor contra a droga testada foi o Murici, na concentração de 400 mg extrato/ Kg P.C.

Os extratos de frutas do Cerrado nas concentrações de 200 e 400 mg extrato/Kg de P. C. foram testados quanto ao efeito antiinflamatório através do teste de Edema de pata induzido por Carragenina. Os extratos testados não apresentaram características inflamatórias e os que apresentaram melhor resposta antiinflamatória foram a Guapeva casca (200 e 400 mg extrato/Kg de P. C.), Guapeva semente (200 mg extrato/Kg de P. C.), Guapeva polpa (200 mg extrato/Kg de P. C.) e Murici (200 e 400 mg extrato/Kg de P. C.), sem diferença estatística entre os resultados obtidos.

O potencial antigenotóxico foi determinado através do Ensaio *in vivo* Cometa. Nenhum dos extratos testados causou danos ao DNA. A Guapeva casca 400 mg extrato/Kg de P. C. e Guapeva semente 200 mg extrato/Kg de P. C. (+H_2O_2) foram os dois extratos que mais se destacaram, pois apresentaram baixos índices de dano ao DNA como também baixo número de células danificadas.

Quatro concentrações (0,25; 2,5; 25 e 250 μg/mL) dos extratos de frutas foram analisadas quanto ao potencial antiproliferativo em 8 linhagens de diferentes origens histológicas e embrionárias humanas, sendo elas: UACC-62, MCF-7, NCI-H460, OVCAR-3, PC-3, HT-29, 786-0 e NCI-ADR/RES. O extrato etanólico da casca e polpa da

Guapeva, assim como a Gabiroba apresentaram efeito citostático fraco para as linhagens de Melanoma, Mama, Rim e Próstata.

Ensaios de citotoxicidade e antiproliferativo também foram realizados em células $HepG_2$. O extrato de Guapeva semente não teve seu potencial antiproliferativo avaliado. Os demais extratos, em concentrações não citotóxicas, apresentaram baixos índices de IC_{50}, mas altos para indicar um potencial uso como anticâncer para o ensaio antiproliferativo, principalmente a Gabiroba, Guapeva casca e Guapeva polpa.

Por último, os extratos de frutas do Cerrado foram avaliados quanto à atividade antioxidante celular, realizada em células $HepG_2$. O extrato de Guapeva casca apresentou maior atividade antioxidante celular, destacando-se dos demais extratos avaliados.

Ao relacionar os resultados obtidos através dos métodos *in vivo* e *in vitro* realizados para a determinação de diferentes atividades biológicas, pode-se concluir que os extratos Guapeva casca e Gabiroba foram os que apresentaram melhores resultados. A casca da fruta Guapeva destacou-se mais para os potenciais *in vivo*, enquanto a Gabiroba para os *in vitro*. Algo em comum para estes dois extrato foi a identificação da Catequina em ambos, sendo que na Gabiroba a concentração foi superior à encontrada na Guapeva casca.

Um estudo mais aprofundado quanto ao potencial biológico de frutas do Cerrado seria uma forma de alerta para a perda de tamanha riqueza. Os resultados obtidos através dos diversos ensaios realizados demonstram que as três frutas do Cerrado selecionadas para o estudo possuem grande potencial biológico, em especial a Guapeva casca e Gabiroba e podem ser estudadas mais profundamente com o objetivo da utilização dos mesmos nos setores alimentício, cosmético e farmacêutico.

7 REFERÊNCIAS

Adom, K. & Liu, R. Cellular rapid peroxyl radical scavenging capacity (PSC) assay for assessing both hydrophilic and lipophilic antioxidants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 6572-6580. 2005.

Agnez- Lima, L.; Menck, C.; Batistuzzo- Medeiros, S.; Marques, R.; Pinheiro, M. Processos de reparo de DNA: garantindo a estabilidade do material genético. In: Ribeiro, L.; Salvadori, D.; Marques, E. **Mutagênese Ambiental**. Canoas: ULBRA, 2003. Cap. 3, p. 49-75.

Aguilar-Garcia, C.; Gavino, G.; Baragano-Mosqueda, M.; Hevia, P.; Gavino, V., C. Correlation of tocopherol, tocotrienol, γ-oryzanol and total polyphenol content in rice bran with different antioxidant capacity assays. **Food Chemistry**, v. 102, p. 1228-1232. 2007.

Albertini, R.; Anderson, D.; Douglas, G.; Hagmar, L.; Hemminki, K.; Merlo, F.; Natarajan, A.; Norppa, H.; Shuker, D.; Tice, R.; Waters, M.; Aitio, A. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. **Mutation Research**, v. 463, p. 111-172. 2000.

Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. **Molecular Biology of the Cell**. New York: Garland Science, 2002, 1775 p.

Almeida, S. **Cerrado: aproveitamento alimentar.** Planaltina – Embrapa, 1998, 188 p.

Almeida, S. P.; Proença, C.; Sano, S.; Ribeiro, J. **Cerrado: Espécies vegetais úteis.** 1.ed. Planaltina-DF: Embrapa, 1998, 154 p.

Ames, B. DNA damage from micronutrient deficiencies is likely to be a major cause of cancer. **Mutation Research**, v. 475, p. 7-20. 2001.

Anderson, D.; Basaran, N.; Blowers, S.; Edwards, A. The effect of antioxidants on bleomycin treatment in in vitro and in vivo genotoxic assays. **Mutation Research – Fundamental Molecular Mechanismis of Mutagenesis**, v. 329, n. 1, p. 37-47. 1995.

Andrade, M.; Reis, S.; Robinson, W.; Micronúcleo: um importante marcador biológico intermediário na prevenção do câncer bucal. **Revista Odonto Ciência**, v. 20, n. 48, p. 137-141. 2005.

Angelis, R. Novos conceitos em nutrição. Reflexões a respeito do elo dieta e saúde. **Arquivos Gastroenterologia**, São Paulo, v. 38, n.4, p. 269-271, 2001.

Antolovich, M. Methods for testing antioxidant activity. **The Analyst**, v. 127, p. 183-198. 2002.

Antunes, L. & Araújo, M. Mutagenicidade e antimutagenicidade dos principais corantes para alimentos. **Revista Nutrição**, v. 13, n. 2, p. 81-88. 2000.

Arts, M.; Haenen, G.; Voss, H.; Bast, A. Antioxidant capacity of reaction products limits the applicability of the *Trolox* Equivalent Antioxidante Capacity (*TEAC*) assay. **Food and Chemical Toxicology**, v. 42, p. 45-49. 2004.

Ashby, J. Druckrey's definition of genotoxic. **Mutation Research**, v. 329, p. 225. 1995.

Azzi, A. & Davies, K. Free radical biology – terminology and critical thinking. **FEBS Letters**, v. 558, p. 3-6. 2004.

Bacchiocca, M.; Biagiotti, E.; Ninfali, P. Nutritional and Technological reasons for evaluating the antioxidant capacity of vegetable products. **Italian Journal of Food Science**, v. 18, n. 2, p. 209-217. 2006.

Balmain, A. & Harris, C. Carcinogenesis in mouse and human cell: parallels and paradoxes. **Carcinogenesis**, v. 21, n. 3, p. 371-377. 2000.

Barreiro, E. Biodiversidade: Fonte potencial para descoberta de fármacos. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 679-688. 2009.

Bazo, A. **Avaliação do potencial clastogênico da cocaína em medula óssea de camundongo**. Botucatu: UNESP, 1997. 38f. Monografia (Conclusão de curso Ciências Biológicas - Modalidade Médica)- Universidade Estadual de São Paulo.

Behling, E.; Sendão, M.; Francescato, H.; Antunes, L.; Bianchi, M. Flavonóide quercetina: aspectos gerais e ações biológicas. **Alimentação e Nutrição, Araraquara**, v. 15, n. 3, p. 285-292, 2004.

Berra, C. & Menck, C. Estresse oxidativo, lesões no genoma e processos de sinalização no controle do ciclo celular. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1340- 1344. 2006.

Bertelli, A.A.E; Giovannini, L.; Stradi, R.; Tillement, J.P. Plasma, urine and tissue levels of trans- and cis- resveratrol (3,4´,5-trihydroxystilbene) after short-term or prolonged administration of red wine to rats. **International Journal Tissue Research**, v. 18, p. 67-71. 1996.

Bianchi, M. & Antunes, L. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Nutrition**, v. 112, p. 123-30. 1999.

Biri, A.; Civelek, E.; Karahalil, B.; Sarda, S. Assessment of DNA damage in women using oral contraceptives. **Mutation Research**, v. 521, p. 113-119. 2002.

Bombardelli, E. & Morazzoni, P. Vitis vinifera L**. Fitoterapia**, v. 65, p. 291-317. 1995.

Borges, H. & Shepherd, G. Flora e estrutura do estrato lenhoso numa comunidade de cerrado em Santo Antônio do Leverger, MT, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 28, n. 1, 61-74. 2005.

Brandão, M. Plantas produtoras de tanino nos cerrados mineiros. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 15, n. 168, p. 38-46. 1991.

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

Campos, F.; Martino, H.; Sabarense, C.; Sant´ana, H. Estabilidade de compostoso antioxidantes em hortaliças processadas: uma revisão. **Alimentação e Nutrição, Araraquara**, v.19, n. 4, p. 481-490. 2008.

Carvalho, J.; Barbosa, M.; Sertie, J. Antiinflammatory activity of de crude extract from the fuits of pterodon emarginatus vog. **Journal Ethnopharmacology**, v. 64, p. 127-133. 1999.

Castardo, J.; Prudente, A.; Ferreira, J.; Guimarães, C.; Monache, F.; Filho, V.; Otuki, M.; Cabrini, D. Anti-inflammatory effects of hydroalcoholic extract and two biflavonoids from Garcinia gardneriana leaves in mouse paw oedema. **Journal of Ethnopharmocology**, n. 118, p. 405-411. 2008.

Castro, D.; Santos, D.; Ferreira, H.; Santos, S.; Chen-Chen, L. Atividades mutagência e citotóxica do extrato de Cochlospermum regium Mart. (Algodãozinho-do-campo) em camundongos. **Revista Brasileira Medicina**, v. 6, n. 3, p. 15-19. 2004.

Castro, V.; Lorenzi, H. **Botânica sistemática**: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2005. p. 260-261.

Chen, C. & Kong, A. Dietary chemopreventive compounds and ARE/EpRE signaling. **Free Radical Biology Medicine**, v. 36, p. 1505-1516. 2004.

Chu, Y. and Liu, R. Cranberries inhibit LDL oxidation and induce LDL receptor expression in hepatocytes . **Life Sciences**, v. 77, p. 1892-1901. 2005.

Colli, C.; Sardinha, F.; Filisetti, T. **Alimentos funcionais**. In: SCHOR, N.; CUPPARI, L. Guia de nutrição – Nutrição clínica no adulto. São Paulo: Manole, 2002. P. 55-70.

Collins, A. Antioxidant intervention as a route to cancer prevention. **European Journal of Cancer**, v. 41, p. 1923-1930. 2005.

Collins, A.; Fleming, I.; Gedik, C. In vitro repair of oxidative and ultraviolet-induced DNA damage in supercoiled nucleoid DNA by human cell extract. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression**, v. 1219, n. 3, p. 724-727. 1994.

Colotta, F.; Allavena, P.; Sica, A.; Garlanda, C.; Mantovani, A. Cancer-Related inflammation, the seventh hallmark of câncer: links to genetic instability. **Carcinogenesis**, v. 30, n. 7, p. 1073-1081. 2009.

Cone, J. Inflammation. **American Journal Surgery**, v. 182, p. 558-562. 2001.

Costa, N. & Rosa, C. Alimentos funcionais. 1. Ed. Rio de Janeiro: Rubio, 2010. 536p.

Costa, T.; Vieira, S.; Andrade, S.; Maistro, E. Absence of mutagenicity effects of Psidium cattleyanun Sabine (Myrtaceae) extract on peripheral blood and boné marrow cells of mice. **Genetics and Molecular Research**, v. 7, n. 3, p. 679-686. 2008.

Coutinho, L. O bioma do Cerrado. In: **Eugen Warming e o cerrado brasileiro – um século depois.** São Paulo, 2002. Editora Unesp. 156 p.

Dávalos, A.; Gómez, C.; Bartolomé, B. Extending applicability of the Oxygen Radical Absorbance Capacity (*ORAC*-Fluorescein) Assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 48-54. 2004.

De Flora, S. Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. **Mutation Research**, v. 402, p. 151-158. 1998.

Delmanto, R.; Lima, P.; Sugui, M.; Eira, A.; Salvadori, D.; Speit, G.; Ribeiro, L. Antimutagenic effect of Agaricus blazei Murrill mushroom on the genotoxicity induced by cyclophosphamide. **Mutatatio Research**, v. 496, p. 15-21, 2001.

Dewanto, V.; Wu, X.; Adom, K.; Liu, R. Thermal Processing Enhances the Nutritional Value of Tomatoes by Increasing Total Antioxidant Activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 3010-3014. 2002.

Di Rosa, M.; Giroud, J.; Willoughby, D. Studies of the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenin and turpentine. **Britsh Journal Pharmacology**, v. 104, p. 15-28. 1971.

Dong, Q.; Barksy, D.; Colvin, M.; Melius, C.; Ludernan, S.; Moravek, J.; Colvin, O.; Bigner, D.; Modrich, P.; Friedman, H. A structural basis for a phosphoramide mustard-induced DNA interstrand cross-link at 5'd(GAC). **Proceedings National Academy Sciences United States America**, v. 92, p. 12170-12174. 1995.

Erlund, I., Silaste, M. L.; Alfthan, G.; Rantala, M.; Kesaniemi, Y. A.; Aro, A. Plasma concentrations of the flavonóides hesperetin, naringenin and quercetin in human subjects following their habitual diets, and diets high or low in fruit and vegetables. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 56, p. 891-898. 2002.

Fagundes, F.; Oliveira, L.; Cunha, L.; Aladares, M. Annona Coriacea induz efeito genotóxico em camundongos. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 2, n. 1, p. 24-29. 2005.

Fenech, M. In vitro micronucleus technique to predict chemosensitivity. **Methods Molecular Medicine**, v. 111, p. 3-32. 2005.

Fenech, M.; Holland, N.; Chang, W.; Zeiger, E.; Bonassi, S. The HUman MicroNucleus Project—An international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 428, n. 1-2, p. 271-283. 1999.

Ferrari, C. & Torres, E. Novos compostos dietéticos com propriedades anticarcinogênicas. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 48, n. 3, p. 375-382. 2002.

Ferreira, M. Frutos comestíveis nativos do D.F.: gabirobas, pitangas e araçás. **Cerrado**, Brasília, v. 4 n. 18, p. 11-16, 1972.

Figueiredo, I.; Santos, L.; Costa, W.; Carvalho, J.; Silva, C.; Sacoman, J.; Kohn, L.; Sarragiotto, M. Synthesis and Antiproliferative Activity of Novel Limonene Derivatives with a Substituted Thiourea Moiety. **Journal of Brazilian Chemistry Society**, v. 17, n. 5, p. 954-960. 2006.

Freitas, T.; Coelho, M.; Moraes e Luz, E. **Avaliação genotóxica em sangue periférico de camundongos machos e fêmeas, submetidos à atividade física e aeróbica.** II Congresso de Pesquisa e Inovação da Rede Norte Nordeste de Educação Tecnológica João Pessoa - PB – 2007.

Funari, C. & Ferro, V. Uso ético da biodiversidade brasileira: necessidade e oportunidade. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 2, p. 178-182. 2005.

Furtado, M.; Almeida, L.; Furtado, R.; Cunha, W.; Tavares, D. Antimutagenicity of rosmarinic acid in Swiss mice evaluated by the micronucleus assay. **Mutation Research**, v. 657, p. 150-154. 2008.

Gardana, C.; Simonetti, P.; Berti, C.; Pietta, P. Evaluation of propolis polyphenols absorption in humans by liquid chromatography / tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 21, p. 3849-3854. 2007.

Gardner, E**. Principles of genetics**. 5.ed. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1977. 740 p.

Germano, M.; D´angelo, V.; Biasini, T.; Sanogo, R. Evaluation of the antioxidant properties and bioavalability of free and boun phenolic acids from Trichilia emetica Vahl. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 23, p. 121-127. 2006.

Ghiraldini, F.; Mello, M. Micronucleus formation, proliferative status, cell death and DNAdamage in ethosuximide-treated human lymphocytes. **Cell Biology International Reports**, v. 17, n. 1, p. 27-31. 2010.

Ghiselli, A.; Serafini, M.; Maiani, G.; Azzini, E.; Ferro-Luzzi, A. A fluorescence-based method for measuring total plasma antioxidant capability**. Free Radical Biology & Medicine**, v. 18, n. 1, p. 29-36. 1995.

Goedert, W. Região dos Cerrados: potencial agrícola e política para o seu desenvolvimento. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 24, n. 1, p. 1- 17. 1989.

Goldberg, D.; Yan, H.; Soleas, G. Absorption of three wine-related polyphenols in three different matrices by healthy subjects. **Clinical Biochemistry**, v. 36, p. 79-87. 2003.

Gomes, B.; Martins, F.; Tamashiro, J. Estrutura do cerradão e da transição entre cerradão e floresta paludícola num fragmento da International Paper do Brasil Ltda., em Brotas, SP. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 27, n. 2, p. 249- 262. 2004.

Gomes, P. **Fruticultura Brasileira**. 3. ed. São Paulo: Editora Nobel S.A, 1977. 446 p.

Halliwell, B. Lipid peroxidation, antioxidant and cardiovascular diseade: how should we move forward? **Cardiovascular Research**, v. 47, n. 3, p. 410-418. 2000.

Halliwell, B., Gutteridge, J. **Free Radicals in Biology and Medicine**. Oxford University Press, New York, USA. 1999. 936 p.

Hassimotto, M.; Genovese, I.; Lajolo, M. Antioxidant Activity of Dietary Fruits, Vegetables, and Commercial Frozen Fruit Pulps. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 2928-2935. 2005.

Haystsu, H.; Arimoto, S.; Negishi, T. Dietary inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. **Mutation Research**, v. 202, p. 429 – 446. 1988.

He, X. and Liu, R. Cranberry Phytochemicals: Isolation, Structure Elucidation, and Their Antiproliferative and Antioxidant Activities. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 7069-7074. 2006.

Heber, D. Vegetables, fruits and phytoestrogens in the prevention of diseases. **Journal of Postgraduate Medicine**, v. 50, p. 145-149. 2004.

Heddle, J. A. A rapid in vivo test for chromosomal damage. **Mutation Research**, v. 18, p. 187-190. 1973.

Higdon, J. & Frei, B. Tea catechins and polyphenols: health effects, metabolism, and antioxidant function. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 43, n. 1, p. 89-143. 2003.

Horvathova, E., Slamenova, D.; Marsalkova, L.; Wsolova, L. Effects of borneol on the level of DNA damage induced in primary rat hepatocytes and testicular cells by hydrogen peroxide. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, p. 1318–1323. 2009.

Inserra, F.; Ardestani, K.; Watson, R. Antioxidants and Immune Function. In: Garewal, S. **Antioxidants and Disease Prevention**. New York, 1997. p 19-29.

Jadhav, S.J.; Nimbalkar S.S.; Kulkarni, A.D.; Madahavi, D.L. **Lipid oxidation in biological and food systems.** In: Madahavi, D.L.; Deshpande, S.S.; Salunkle, D.K. Food Antioxidants – Technological, Toxicological and Health perspectives. New York, 1995. p. 385-406.

Kaliora, A.; Dedoussis, G.; Schmidt, H. Dietary antioxidants in preventing atherogenesis. **Atherosclerosis**, v. 187, p. 1-17. 2006.

Kampa, M.; Nistikaki, A.; Tsaousis, V.; Maliaraki, N.; Notas, G.; Castanas, E. A new automated method for the determination of the Total Antioxidant Capacity (TAC) of human

plasma, based on the crocin bleaching assay. **BMC Clinical Pathology**, v. 2, p. 1-16. 2002.

Kinsella, J. E.; Frankel, E.; German, B.; Kanner, J. Possible mechanisms for the protective role of antioxidants in wine and plant foods. **Food Technology**, v. 47, p. 85-89. 1993.

Klink, C. & Machado, R. A conservação do Cerrado brasileiro. **Megadiversidade**, v. 1, p. 147-155. 2005.

Koleva, I.; Beek, T; Linssen, J.; Groot, A.; Evstatieva, L. Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. **Phytochemistry Analytical**, v. 13, p. 8-17. 2002.

Le, K.; Chiu, F.; Ng, K. Identification and quantification of antioxidantes in Fructus lycii. **Food Chemistry**, v. 105, n. 1, p. 353-363. 2007.

Lee, M.; Prabhu, S.; Meng, X.; Li, C.; Yang, C. An improved method for the determination of Green and Black Tea Polyphenols in Biomatrices bye high-performance liquid chromatography with coulometric array detection. **Analytical Biochemistry**, v. 279, p. 164-169. 2000.

Legrand, C.; KLEIN. R. **Flora ilustrada catararinense**: Mirtáceas. Itajaí, SC: MIRT, 1977. p. 219-330.

Lehninger, A.; Nelson, D.; COX, M. **Princípios de bioquímica**. Porto Alegre: ArtMed, 1995. 1232 p.

Leite, A.; Malta, L.; Riccio, M.; Eberlin, M.; Pastore, G.; Junior, M. Antioxidant Potential of Rat Plasma by Administration of Freeze-Dried Jaboticaba Peel (Myrciaria jaboticaba Vell Berg). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 6, p. 2277–2283. 2011.

Lewin, B. **Genes VII.** Porto Alegre: Artmed, 2001. 956 p.

Ley, K. Integratiom of inflammatory signals by rooling neutrophils. **Immunological Reviews**, v. 186, p. 8-18. 2002.

Lima, R.; Costa, M.; Leite, R.; Targino, D.; Filizola, R. Efeito do consumo de frutas e vegetais no estresse oxidativo e nos níveis de marcadores inflamatórios. **Revista Brasileira de nutrição Clínica**, v. 22, n. 4, p. 322-327. 2007.

Liu, F. Antioxidant activity of garlic acid from rose flowers in senescence accelerated mice. **Life Sciences**, v. 77, p. 230-240. 2005.

Liu, L. DNA topoisomerase poisons as antitumor drugs. **Annual Review of Biochemistry**, v. 58, p. 351-375. 1989.

Liu, Ming; Li, Xin Qi; Weber, Courtney; Lee, Chang Youg; Brown, Janice; Liu, Rui Hai. Antioxidant an antiproliferative activities of raspberries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 2926-2930. 2002.

Liu, R. H. Potencial synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. **The Journal of Nutrition**, v. 134, p. 3479-3485. 2004.

Liu, R. Whole grain phytochemicals and health. **Journal of Cereal Science**, v. 46, p. 207-219. 2007.

Lopaczynski, W. & Zeisel, S.; Antioxidants, programmed cell death, and câncer. **Nutrition Research**, v. 21, p. 295-307. 2001.

Loureiro, A.; Mascio, P.; Medeiros, M. Formação de adutos exocíclicos com bases de DNA: implicações em mutagênese e carcinogênese. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 777-793. 2002.

Lyss, G.; Schmidt, T.; Merfort, I. & Pahl, H. Helenalin, an anti-inflammatory sesquiterpene lactone from Arnica, selectively inhibits transcription factor NF- B. **Biological Chemistry**, v. 378, p. 951-961. 1997.

Maciel, M.; Pinto, A.; Veiga Júnior, V. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438. 2002.

Maddox, L.; Schwartz, D. The patophysiology of asthma. **Annual Review of Medicine**, v. 53, p. 477-498. 2002.

Manach, C.; Scalbert, A; Morand, C.; Rémésy, C.; Jiménez, L. Polyphenols: food sources and biovailability. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, p. 727-747. 2004.

Manach, C.; Williamson, G.; Morand, C.; Scalbert, A.; Remesy, C. Biovailability and bioefficacy of polyphenols in humsn. I. Review of 97 bioavailability studies. **American Journal Clinical Nutrition**, v. 81, p. 230-242. 2005.

Mariano, F. Fruticultura [online] Disponível na Internet via WWW. URL: http://www.portalsaofrancisco.com.br/alfa/murici/murici.php. Acesso em 14 de maio de 2011.

Marinho, F.; Rodrigues, F.H.G.; Juarez, K.M. The Cerrado mammals: diversity, ecology, and natural history. In: Oliveira, P.S.; Marquis, R.J. **The Cerrados of Brazil: Ecology and Natural History of a Neotropical Savanna.** Columbia University Press, New York, EUA. 2002.

Maron, D. & Ames, B. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. **Mutagenese Research**, v. 113, p. 173-215. 1983.

Martins, B. **Avaliação físico química de frutos do Cerrado in natura e processados para a elaboração de multimisturas**. Goiânia, 2006. 85 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Produção Sustentável) - Universidade Católica de Goiás.

Martins, M.; Moraes, F.; Moraes, J.; Malheiros, E. Falha na resposta do cortisol ao estresse por captura e por carragenina em Piaractus mesopotamicus Holmberg, 1887 (Osteichthyes: Characidae). **Acta Scientiarum**, v. 22, n. 2, p. 545-552. 2000.

McGregor, J.; Heddle, J.; Hite, M.; Margolin, B.; Ramel, C.; Salamone, M.; Tice, R.; Wild, D. Guidelines for the conduct of micronucleus assay in mammalian bone marrow erythrocytes. **Mutation Research**, v. 189, p. 103-312. 1987.

Melo, E.; Maciel, M.; Lima, V.; Leal, F.; Caetano, A.; Nascimento, R. Capacidade Antioxidante de Hortaliças usualmente consumidas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 3, p. 639-644. 2006.

Mermelstein, N. Determining Antioxidant Activity. [online] Disponível na Internet via WWW. URL: http://www.ift.org. Acesso em 20 de novembro de 2010.

Miranda-Vilela, A.; Resck, I.; Grisolia, C. Antigenotoxic activity and antioxidant properties of organic and aqueous extracts of pequi fruit (Caryocar brasiliense Camb.) pulp. **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, n. 4, p. 956-963. 2008.

Moffat, A. S. South American landscapes: Ancient and modern. **Science**, v. 296, p. 1959-1960. 2002.

Moreira, R. Fruticultura [online] Disponível na Internet via WWW. URL: http://fruticultura-rodrigo.blogspot.com/2010/12/frutas-nativas-do-cerrado-gabiroba.html. Acesso em 14 de maio de 2011.

Mori, L. Mutação e Câncer. **Ciência hoje**, v. 180, n. 30, p. 34-37. 2002.

Mukhopadhya, Y.; Saha, A.; Mukherjee, A. Studies on the anticlastogenic effect ofturmeric and curcumin on cyclophophamide and mitomycin C in vivo. **Food and Chemical Toxicology**, v. 36, p. 73-76. 1998.

Myers, N.; Mittermeier, R.; Mittermeier, C.; Fonseca, G.; Kent. J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, p. 853-858. 2000.

Naczk, M. & Shahidi, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography**, v. 1054, n. 1-2, p. 95-111. 2004.

Nakamura, H.; Shimizu, M. Early and delayed phases of hind paw edema in rats. **Jounal of Pharmacology**, v. 24, n. 3, p. 393-405. 1974.

Nakamura, M. & Ferreira, S. A pheripheral sympathetic component in inflammatory hyperalgesia. **European Journal Pharmacology**, n. 135, p. 145-153. 1987.

Neto, J.; Medeiros, F.; Melo, A.; Silva, J.; Dantas, J. Avaliação do efeito mutagênico da palma forrageira (Opuntia fícus-indica Mill) através do Teste de Micronúcleos em medula

óssea de ratos (Rattus novergicus, linhagem Wistar) *in vivo*. **Revista de biologia e ciências da terra.** v. 5, n. 2, p. 1-10. 2005.

Nishina, P.; Schneeman, B. O. Effects of dietary fibers on nonfasting plasma lipoprotein and apoliprotein in rats. **Journal of Nutrition**, v. 121, n. 4, p. 431-437. 1991.

Offord, E. A. Guillot, F., Aeschbach, R. Loliger, J. Pfeifer a. M. A. **Antioxidant and Biological Properties of Rosemary Componentes: Implication for Food and and health**. In: Natural Antioxidants: Chemistry, Health Effects, and Application, F. Shahidi, ed., AOCS Press, Champaign, IL, p. 88-96, 1997.

Okonogi S, Duangrat C, Anuchpreeda S, tachakittirungrod S, Chowwanapoonpohn S. Comparison of antioxidant capacities and cytotoxicities of certain fruit peels. **Food Chemistry**, v. 103, p. 839 – 846. 2007.

Olive, P. & Banáth, J. The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. **Nature Protocols**, v.1, n.1, 2006.

Oliveira, D. & Bastos, D. Biodisponibilidade de ácidos fenólicos. **Química Nova** (on line), 2011.

Ou, B.; Hampsch, W.; Prior, R. Development and validation of a improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 4619-4626. 2001.

Ou, B.; Huang, D.; Woodill, M., F.; Judith, D., E. Analysis of antioxidante activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (*ORAC*) and Ferric Reducing Antioxidante Power (FRAP) assays: A comparative Study. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 3122-3128. 2002.

Padilha, M.; Vilela, F.; Rocha, C.; Dias, R.; Soncini, R.; Santos, M.; Silva, G.; Giusti-Paiva, A. Antiinfl ammatory Properties of Morus nigra Leaves. **Phytotherapy Research**, v. 24, n. 10, p. 1496-500. 2010.

Pellegrini, N.; Riso. P.; Porrini, M. Tomato consumption does not affect the total antioxidant capacity of plasma. **Nutrition**, n. 16, p. 268-270. 2000.

Pereira-Silva, E.; Santos, J.; Kageyama, P.; Hardt, E. Florística e fitossociologia dos estratos arbustivo e arbóreo de um remanescente de cerradão em uma unidade de conservação do estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 27, n. 3, p. 533-544. 2004.

Pitot, H. The molecular biology of carcinogenesis. **Cancer**, v. 72, p. 962-970. 1993.

Pitot, H.; Dragan, Y. Facts and theories concerning the mechanisms of carcinogenesis. **FASEB Journal**, v. 5, p. 2280-2286. 1991.

Poça, K.; Oliveira, A.; Santos, M.; Paumgartten, F. Malaria infection modulates effects of genotoxic chemicals in the mouse bone-marrow micronucleus test. **Mutatation Research**, v. 649, p. 28-33. 2008.

Powell, S & Bindra, R. Targeting the DNA damage response for cancer therapy. **DNA Repair**, v. 8, n. 9, 1153- 1165. 2009.

Princen, H.; Poppel, G.; Vogelezang, C.; Buytenhek, R.; Kok, F.. Effects of vitamin E, β-Carotene, and smoking on LDL oxidation. **Arteriosclerosis and Thrombosis**, v. 12, n.5, p. 554-562. 1992.

Prior, R., L. & Cao, G. In vivo total antioxidant capacity: Comparison of different analytical methods. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 27. n. 11-12, p. 1173-1181. 1999.

Prior, R.; Hoang, H.; Gu, L.; Wu, X.; Bacchiocca, M.; Howard, L.; Hampsch-Woodill, M.; Huang, D.; Ou, B.; Jacob, R. Assays for hydrophilic and liphophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (*ORAC*FL)) of plasma and other biological and food samples. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 3273-3279. 2003.

Proença, C; Oliveira, R. S.; Silva A. P. **Flores e Frutos do Cerrado**. Editora Universidade Brasília; São Paulo – Imprensa Oficial, Brasil, 2000. 226 p.

Rabello-Gay, M.; The effects of age, Sex and iet on the clastogenic actino of cyclophosphamide in lousebone marrow. **Mutation Research/Genetic Toxicology**, v. 158, n. 3, 181-188. 1985.

Rangkadilok, N.; Sitthimonchai, S.; Worasuttayangkurn, L.; Mahidol, C.; Ruchirawat, M.; Satayavivad, J. Evaluation of free radical scavenging and antityrosinase activities of

standardized longan fruit extract. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, p. 328-336. 2007.

Rao, A. & Rao, L. G. Carotenoids and human health. **Pharmacological Research**, v. 55, p. 207-216. 2007.

Ratnam, V.; Ankola, D.; Bhardwaj, V.; Sahana, D.; Kumar, R. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. **Journal of controlled release**, v. 113, p. 189-207. 2006.

Ratter, J. A .; Ribeiro, J. F.; Bridgewater, S. **The Brazilian cerrado vegetation and threats to its biodiversity. Annals of Botany.** v. 80, p. 223-230. 1997.

Ratter, J.; Dargie, T. An analysis of the fl oristics composition of 36 cerrado areas in Brazil. **Edinburgh Journal of Botany**, v. 49, p. 235-250, 1992.

Ribeiro, J.; Walter, B. Fisionomias do bioma Cerrado. In: Sano S.; Almeida, S. **Cerrado: ambiente e flora.** Planaltina, 1998, p. 89-166.

Ribeiro, L. & Marques, E. A importância da mutagênese ambiental na carcinogênese humana. In: Ribeiro, L.; Salvadori, D.; Marques, E. **Mutagênese Ambiental**. Canoas: ULBRA, 2003, p. 21-27.

Rice-Evans, C.; Miller, N.; Papanga, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonóides and phenolics acids. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 20, p. 933-956. 1996.

Rodrigues, S.; Jabor, I.; Marques-Silvam G.; Rocha, C. Avaliação do potencial antimutagênico do Cogumelo do Sol (Agaricus blazei) no sistema methG1 em Aspergillus (=Emericella) Nidulans. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 25, n. 2, p. 513-517. 2003.

Rodriguez, A. Buscando raízes. **Horinzontes antropológicos**, v.7, n. 16, p. 131-144. 2001.

Roesler, R.; Malta, L., G.; Carrasco, L., C.; Pastore, G. Evaluation of antioxidant properties of the Brazilian Cerrado Fruit Annona crassiflora (Araticum). **Food Chemistry and Toxicology**, v. 71, n. 2, p. 102-107. 2006.

Roesler, R.; Malta, L., G.; Carrasco, L., C.; Pastore, G.; Holanda, R., B.; Sousa, C., A. Atividade antioxidante de Frutas do Cerrado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 1, p. 53-60. 2007.

Romay, C.; Ledon, N. & González, R. Further studies on anti-inflammatory activity of phycocyanin in some animal models of inflammation. **Inflammatory Research**, v. 47, p. 334-338. 1998.

Romero, A.; Fontana, A. & Silva, C. Atividade antiproliferativa de Sloanea garckeana K. Schum. **Química Nova**, v. 31, n. 6, p. 1359-1361. 2008.

Rover Júnior, L.; Hoehr, N.; Kubota, A. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutationa associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativos. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 112-119. 2001.

Rubin, E. & Farber, J. **Patologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 1648 p.

Russowsky, D.; Canto, R.; Sanches, S.; D'Oca, M.; Fátima, A.; Pilli, R.; Kohn, L.; Antônio, M.; Carvalho, J. Synthesis and differential antiproliferative activity of Biginelli compounds against cancer cell lines: Monastrol, oxo-monastrol and oxygenated analogues. **Bioorganic chemistry**, v. 34, n. 4, p. 173-182. 2006.

Salvadori, D. ; Ribeiro, L.; Fenech, M. Teste do micronúcleo em células humanas in vitro. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Ulbra, 2003, cap. 8, p. 201-219.

Salvadori, D. **Avaliação do potencial anticlastogênico do β-caroteno em mamíferos**. São Paulo: Instituto de Biociências/USP, 1991. 117p. (Doutorado em Ciências – Área de Biologia) – Universidade de São Paulo, 1991.

Sartori, L.; Ferreira, M.; Perazzo, F.; Mandalho, L.; Carvalho, J. Atividade antiinflamatória do granulado de Calendula officinalis L. e Matricaria recutita L. **Revista Brasileira de Farmacognosia,** v. 13, p. 17-19. 2003.

Sasaki, Yu.; Nakamura, Takanori and Kawaguchi, Satomi. **What is better experimental design for in vitro comet assay to detect chemical genotoxicity?** Proc. 6th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences. AATEX 14, Special Issue, 499-504. August 21-25, 2007.

Scherer, R.; Godoy, H. T. Antioxidant activity and related phenolic compounds of Xanthium strumarium extracts. **Food Chemistry**, 2007, submetido.

Schlesier, K.; Harwat, M.; Bohm, V.; Bitsch, R. Assessment of antioxidante activity by using different in vitro methods. **Free Radical Research**, v. 36, n. 2, p.177-187. 2002**.**

Seo, K.; Jelinsky, S.; Loechler, E. Factors that influence the mutagenic patterns of DNA adducts from chemical carcinogens. **Mutation Research** 463: 215–246, 2000.

Serafini, M.; Bugianesi, R.; Salucci, M.; Azzini, E.; Raguzzini, A.; Maiani, G. Effect of acute ingestion of fresh and stored lettuce (Lactuca sativa) on plasma total antioxidant capacity and antioxidant levels in human subjects. **British Journal of Nutrition**, v. 88, p. 615-623. 2002.

Serafini, M.; Maiani, G.; Ferro-Luzzi, A. Alcohol-Free Red wine enhances plasma antioxidant capacity in humans. **Journal of Nutrition**, v. 128, n. 6, p. 1003-1007. 1998

Shi, H.; Noguchi, N.; Niki, E. **Galvinoxyl method for standardizing electron and proton donation activity.** In: Method Enzymol, 335: 169-171, 2001.

Sieggelman, M; Stanescu, L.; Estess, P. The CD-44 initiades pathway of T-cell extravasation uses VLA-4 but not LFA-1 form firm adhesion. **Journal Clinical Investigation**, v. 105, p. 683-691. 2000.

SILVA JÚNIOR, M.**100 árvores do Cerrado**: guia de campo. Brasília, DF: Ed. Rede de Sementes do Cerrado, 2005. 278 p.

Silva, C.; Simeoni, L.; Silveira, D. **Genus *Pouteria*: Chemistry and biological activity.** Revista Brasileira de Farmacognosia.19(2A): 501-509, 2009

Silva, E. M.; Souza, J. N. S.; Rogez, H.; Rees, J. F.; Larondelle, Y. Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazônia region. **Food Chemistry**, v. 101, p. 1012-1018. 2007.

Silva, J. A.; Silva, D. B.; Junqueira, N. J.; Andrade, L. R. M. **Frutas Nativas dos Cerrados**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária do Brasil (EMBRAPA), Brasil, 1994. 166 p.

Silva, J.; Silva, D.; Junqueira, N.; Andrade, L. **Frutas do Cerrado.** 1. ed. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2001. 179p.

Singh, B.; Singh, B.; Singh, R.; Prakash, D.; Dhakarey, R.; Upadhyay, G.; Singh, H. Oxidative DNA damage protective activity, antioxidant and anti-quorum sensing potentials of Moringa oleifera. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, p. 1109–1116. 2009.

Singla, A.; Chawla, M.; Singh, A. Review Nimesulide: Some pharmaceutical and pharmacological aspects. **Journal Pharmacy Pharmacology**, v. 52, p. 467-486. 2000.

Skehan, P.; Storeng, R.; Scudeiro, D.; Monks, A.; McMahon, J.; Vistica,D.; Warren, J.; Bokesch, H.; Kenney, S.; Boyd, M. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer drug screening. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 82, p. 1107–1112. 1990.

Soares, S. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista Nutrição**, n. 15, v.1, p. 71-81. 2002.

Souza, F.; Silva, J.; Silva, F. Manejo de neossolo quartzarênico e seu potencial de cultivo com murici (*Byrsonima crassifolia*) em assentamentos de reforma agrária do litoral do Ceará. **Magistra**, v. 15, n. 2, p. 15-27, 2003.

Spigno, Giorgia; Tramelli, Lorenza; De Faveri, Dane, Marco. Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. **Journal of Food Engineering**, v. 81, p. 200-208, 2007.

Stratil, P.; Borivoj, K.; Kubán, V. Determination of phenolic compounds and their antioxidant activity in fruits and cereals. **Talanta**, v. 71, p. 1741-1751. 2007.

Sun, Y.; Hayakawa, S.; Ogawa, M.; Izumori, K.Antioxidante properties of custard pudding dessert containing rare hexose, D- psicose. **Food Control**, v.18, p. 220-227. 2007.

Talcott, S.; Stohlawetz, P.; Rios, J.; Hingorani, L.; Derendorf, H. Absorption, Metabolism and antioxidant effects of Pomegranate (Punica granatum L.) polyphenols after ingestion of a standardized extract in healthy human volunteers. **Journal Agricultural of Food Chemistry**, v. 54, p. 8956-8961. 2006.

Teow, C., C; Truong, V.; McFeeters, R., F; Thompson, R., L; Pecota, K., V.; Yencho, G. C. Antioxidant activities, phenolic and B-carotene contents of sweet potato genotypes with varying flesh colours. **Food Chemistry**, v. 103, p. 829-838. 2007.

Thaipong, K.; Boonprakob, U.; Crosby, K; Cisnerozevallos, 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.

Toda, S. & Shirataki, Y. Inhibitory effects of isoflavones in roots of Astragalus membranaceus Bunge (Astragali radix) on lipid peroxidation by reactive oxygene species. **Phytotherapy Research**, v. 12, p. 59-61. 1998.

Van Den Berg, R.; Haenen, G. Applicability of an improved *Trolox* equivalent antioxidant capacity (*TEAC*) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures. **Food Chemistry**, v. 66, p. 511-517. 1999.

Varanda, E. Atividade mutagênica de plantas medicinais. **Revista Ciências Farmacêuticas Básica Aplicada**, v. 27, n. 1, p. 1-7. 2006.

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.

Vechia, L.; Gnoatto, S.; Gosmann, G. Derivados oleananos e ursanos e sua importância na descoberta de novos fármacos com atividade antitumoral, antiinflamatória e antioxidante. **Química Nova**, v. 32, n. 5, p. 1245-1252. 2009.

Velioglu, Y. S.; Mazza, G.; Cao, L.; Oomah, B. D. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 4113-4117. 1998.

Vilar, J.; Ferreira, F.; Ferri.; Guillo, A.; Chen Chen, L. Assessment of the mutagenic, antimutagenic and cytotoxic activities of ethanolic extract of araticum (Annona crassiflora Mart. 1841) by micronucleus test in mice. **Brazilian Journal of Biology**, v. 68, n. 1, p. 141-147. 2008.

Villalba, M., Carmo, M., Leite, M., Sousa, O. Atividades farmacológicas dos extratos de Zanthoxylum chiloperone (Rutaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 2, p. 236-241. 2007.

Waters, M., Brady, A.; Stack, H.; Brockman, H. Antimutagenicity profiles for some model compounds. **Mutation Research**, v. 238, p. 57-85. 1990.

Weisburger, J. Eat to live, not live to eat. **Nutrition**, v. 16, p. 767-773. 2000.

Welch, K.; Davis, T.; Van, E.; Aust, S.Deleterious iron-mediated oxidation of biomolecules. **Free Radical Biology Medicine**, v. 32, p. 577-583. 2002.

Winter, C.; Risley, E.; Nuss, G. Carrageenin- induced edema in hind paw of the rat as in assay for antiinflamatory drugs. **Society Experimental Biology Medicine**, v. 111, p, 547-544. 1962.

Wolfe, K. & Liu, R. Structure-Activity Relationships of Flavonoids in the Cellular Antioxidant Activity Assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 8404-8411. 2008.

Wolfe, K.; Liu, R. Cellular antioxidant activity (CAA) assay for assessing antioxidants, foods, and dietary supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** v. 55, p. 8896–8907. 2007.

Wu, X.; Gu, L.; Holden, J.; Haytowitz, D.; Gebhardt, S.; Beecher, G.; Prior, R. Development of a database for total antioxidant capacity in foods: a preliminary study. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 17, p. 407-422. 2004a.

Wu, X., Beecher, G. R., Holden, J. M., Haytowitz, D. V., Gebhardt, S. E., & Prior, R. L. Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 12, p. 4026–4037. 2004b.

Yang, J.; Martinson, T.; Liu, R. Phytochemical profiles and antioxidant activities of wine grapes. **Food Chemistry**, v. 116, p. 332-339. 2009.

8 ANEXOS

ANEXO 1: PROTOCOLO COMITÊ DE ÉTICA NÚMERO 1053-1

UNICAMP

Universidade Estadual de Campinas
Instituto de Biologia

CEEA-IB-UNICAMP

Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA-IB-UNICAMP

C E R T I F I C A D O

Certificamos que o Protocolo nº **1053-1**, sobre **"CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E BIOLÓGICA DOS FRUTOS DO CERRADO"**, sob a responsabilidade de **Profa. Dra. Glaucia Maria Pastore / Luciana Gomes Malta**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em reunião de 31 de julho de 2006.

C E R T I F I C A T E

We certify that the protocol nº **1053-1**, entitled **"BIOLOGICAL AND BIOCHEMIST CHARACTERIZATION OF CERRADO FRUITS"**, is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - UNICAMP) on July 31, 2006.

Campinas, 31 de julho de 2006.

Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEEA/IB – Unicamp
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3788-6359
Telefax: (19) 3788-6356
E-mail: ceea@cemib.unicamp.br
http://www.ib.unicamp.br/institucional/ceea/index.htm

ANEXO 2: PROTOCOLO COMITÊ DE ÉTICA NÚMERO 226/2009

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Alfenas . UNIFAL-MG
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 714 . Alfenas/MG . CEP 37130-000
Fone: (35) 3299-1000 . Fax: (35) 3299-1063

Alfenas, 24 de abril de 2009.

Profa. Dra. Glaucia Maria Pastore

Prezada Professora;

O projeto sob sua coordenação, registrado sob o nº 226/2009, intitulado "Avaliação do potencial antioxidante, antiinflamatório e antimutagênico dos frutos do cerrado", sob sua coordenação, está em conformidade com os princípios éticos exigidos na experimentação animal, tendo sido, portanto, apreciado e aprovado por este Comitê.

Por ser verdade, firmo o presente.

Prof Dr Luciano Bruno de Carvalho Silva
Presidente do CEUA – Unifal-MG

ANEXO 3: PROTOCOLO COMITÊ DE ÉTICA NÚMERO 2112-1

UNICAMP

CEUA/Unicamp

Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº **2112-1**, sobre **"Caracterização bioquímica e biológica dos Frutos do Cerrado"**, sob a responsabilidade de **Profa. Dra. Gláucia Maria Pastore / Luciana Gomes Malta**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/Unicamp em **05 de abril de 2010**.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº **2112-1**, entitled **" Biological and biochemistry characterization of Cerrado Fruits"**, is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on **April 5, 2010**.

Campinas, 05 de abril de 2010.

Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEUA/UNICAMP
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
E-mail: comisib@unicamp.br
http://www.ib.unicamp.br/ceea/