Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Instituto de Nutrição

Elaine dos Ramos Soares

Atividade antioxidante do extrato do caroço do açaí: aspectos moleculares em células endoteliais humanas

Rio de Janeiro
2016

Elaine dos Ramos Soares

Atividade antioxidante do extrato do caroço do açaí: aspectos moleculares em células endoteliais humanas

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção de título de Mestre, ao Programa de Pós Graduação em Alimentação, Nutrição e Saúde, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Alimentação, Nutrição e Saúde.

Orientador: Profº Dr. Julio Beltrame Daleprane
Coorientadora: Profª Dra. Cristiane Aguiar da Costa

Rio de Janeiro
2016

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ / REDE SIRIUS / BIBLIOTECA CEH/A

S676 Soares, Elaine dos Ramos
Atividade antioxidante do extrato do caroço do açaí: aspectos moleculares em células endoteliais humanas / Elaine dos Ramos Soares. – 2016.
81 f.

Orientador: Julio Beltrame Daleprane.
Coorientadora: Cristiane Aguiar da Costa.
Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Nutrição.

1. Nutrição – Teses. 2. Açaí – Teses. 3. Compostos Fenólicos – Teses. I. Daleprane, Julio Beltrame. II. Costa, Cristiane Aguiar da. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Nutrição. IV. Título.

es CDU 613.2

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

_____ _____

Assinatura Data

Elaine dos Ramos Soares

Atividade antioxidante do extrato do caroço do açaí: aspectos moleculares em células endoteliais humanas

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção de título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Alimentação, Nutrição e Saúde, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Alimentação, Nutrição e Saúde.

Aprovada em: 29 de julho de 2016.

Banca examinadora:

_____

Prof. Dr. Julio Beltrame Daleprane (Orientador)
Instituto de Nutrição
Universidade do Estado do Rio de Janeiro

_____

Prof[a]. Dra. Manuella Lanzetti Daher de Deus
Instituto de Ciências Biológicas - ICB
Universidade Federal do Rio de Janeiro

_____

Prof[a]. Dra. Mariana Costa Monteiro
Instituto de Nutrição Josué de Castro - INJC
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2016

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Deus e a minha família, minha base, meu chão,
MEU TUDO.

AGRADECIMENTOS

À Deus que caminhou ao meu lado, fazendo prevalecer sempre a Sua vontade mesmo que por muitas vezes houvesse em meu interior diversos questionamentos. Obrigada Senhor por nunca me abandonar!!!!

Ao meu querido orientador prof. Dr. Julio Beltrame Daleprane, por ter confiado a mim este projeto e ter acreditado que eu pudesse realizá-lo. Obrigada por ter contribuído para o meu amadurecimento didático e científico, pela orientação e pela generosidade. Seu conhecimento e sua experiência foram e serão sempre importantes e essenciais para minha caminhada.

À minha querida coorientadora prof. Dra. Cristiane Aguiar da Costa, pelo apoio e colaboração que foram de extrema importância para o desenvolvimento deste trabalho. Obrigada por sempre estar disposta a me ouvir e dialogar não só sobre assuntos acadêmicos, como também pessoais.

Aos meus pais, Odete dos Ramos Soares e Marinho dos Santos Soares, que são meus maiores exemplos de vida e por sempre me incentivaram a crescer profissionalmente. Obrigada por toda a educação e por todos os valores que vocês me deram ao longo da minha vida. Vocês são minha base.

À minha irmã, Viviane dos Ramos Soares, que cumpre com maestria seu papel de irmã. Obrigada pelos conselhos e por ser esta mulher forte e determinada que me inspira.

Ao meu companheiro Rafael Maiocchi Alves Costa por toda a paciência, por compreender, por respeitar a minha vontade de crescer profissionalmente, por sempre me incentivar, e estar ao meu lado em todos os momentos.

À Thaisa de Mattos Teixeira por ter me mostrado nos primórdios do mestrado o que era cultura de células. Pela amizade, por todas as conversas e as risadas.

À Renata Cristina da Silva, ou simplesmente Rê (☺), por não ter hesitado de me ensinar todas as técnicas e pela paciência de repetir quantas vezes necessárias. Agradeço também pela amizade, risadas, companheirismo e conselhos nos momentos em que mais precisei. Amiga, você é uma guerreira.

À Elisa Bernardes Monteiro (amigaaaaaaa, migs e afins (rsrs)) por esta parceria de dois anos de intenso convívio muuuuuuuito prazeroso (que o Mário não leia, rsrs), pelas risadas, pelas reuniões nas redes sociais, pela paciência com meus textos, por ser o meu oposto (110v x 220v) por sempre me dar força e apoio nos momentos mais difíceis.

À Paula Normando dos Reis, Joana Pereira Novais, Patrícia Leticia Trindade, Victor Hugo Rosa pela amizade e por sempre me darem apoio e me incentivarem a lutar sempre.

Aos professores e alunos do Núcleo de Estudos de Nutrição e Fatores de Estresse por todos os seminários e conselhos que foram enriquecedores não só para o projeto, mas também para minha formação acadêmica.

Aos professores Roberto Soares de Moura e Ângela de Castro Resende, por terem me recebido de braços abertos no Laboratório de Farmacologia Cardiovascular e Plantas Medicinais.

À Graziele Freitas de Bem que enfrentou comigo duas árduas batalhas. Obrigada pela amizade, por ouvir meus desabafos, pelos conselhos, pelas risadas e por sempre estar disposta a me ajudar. Você é uma mulher batalhadora e que muito me inspirou ao longo destes dois anos. Seu futuro é muito auspicioso (rs)!!!!!!

À Izabelle Barcellos (ou simplesmente DIVA) pelo carinho, por se preocupar comigo, por sempre me ajudar, pelas longas conversas, por sempre me mostrar o outro lado das coisas, por sempre me mostrar que Deus está ao nosso lado em qualquer circunstância. Você é uma mulher que arrasa (rs).

À toda equipe do IBRAG pelos momentos inesquecíveis Viviane, Lenize, Ricardinho, Douglas, Lúcia, Professora Dayane, Ana Paula, Anicet, Giselle. Levo todos vocês em meu coração.

Aos professores Alexandre Guedes e Daniel Perrone, por terem sido tão gentis ao me receber e ao ceder a estrutura do Laboratório de Bioquímica Nutricional e de Alimentos. Agradeço também a todos os alunos de pós-graduação deste laboratório.

À professora Nathália Moura Nunes que contribuiu de forma intensa para a realização deste projeto, por todos os conselhos, pelas caronas, por todas as conversas e por sempre implantar a sementinha da curiosidade acadêmica em mim.

À todos vocês o meu MUITO OBRIGADA nunca será o suficiente!!!!

E ainda que haja pedra na estrada. Eu confio em Deus. Confio na força que Ele tem porque todas as vezes que eu achei que não suportaria, Ele sempre me fez levantar de novo. Por isso eu me mantenho em pé e com fé.

Taci Goes

RESUMO

SOARES, E. R. **Atividade antioxidante do extrato do caroço do açaí**: aspectos moleculares em células endoteliais humanas. 2016. 81 f. Dissertação (Mestrado em Alimentação, Nutrição e Saúde) – Instituto de Nutrição, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

O descarte do caroço do açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) representa grande impacto ambiental. Com isso, o desenvolvimento de subprodutos que viabilizem sua utilização é de grande interesse. O extrato hidroalcoólico do caroço do açaí (ASE) tem sido evidenciado como um possível extrato de planta medicinal com propriedades farmacológicas úteis para o uso terapêutico no tratamento de doenças cardiometabólicas. O endotélio é um importante componente na gênese de diversas doenças vasculares, sendo a disfunção endotelial o evento inicial de desenvolvimento da doença aterosclerótica. Ainda não há conhecimento cientifico suficiente em relação à atividade antioxidante, ao teor e ao perfil dos compostos fenólicos, bem como os aspectos moleculares envolvidos na atividade biológica do ASE em células endoteliais humanas, sendo estes os objetivos do presente estudo. Células endoteliais do cordão umbilical humano (HUVEC) foram utilizadas na presença de um insulto oxidativo induzido pelo peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em concomitância ou não com o ASE. A atividade antioxidante do extrato foi avaliada por folin-ciocalteu, *ferric reducing ability power* (FRAP), *trolox equivalent antioxidant capacity* (TEAC) e *oxygen radical absorbance capacity* (ORAC) e a quantificação, bem como o perfil de compostos fenólicos foram avaliados através de cromatografia líquido de alta eficiência (CLAE). Foram realizadas as análises de geração de espécies reativas de oxigênio e de carbonilação de proteína, além de atividade de enzimas antioxidante, potencial migratório das células e expressão de proteínas envolvidas na via do fator de transcrição Nrf2. Os desfechos demonstram que o ASE possui elevada capacidade antioxidante quando comparado a outros extratos. Foram quantificados sete compostos fenólicos oriundos da classe dos ácidos fenólicos, sendo eles o ácido siríngico (4,0 mg/100 g de extrato seco), o ácido 2-hidroxicinâmico (9,9 mg/100 g de extrato seco), o ácido gálico (19,0 mg /100 g de extrato seco), o ácido 3,4-dihidroxibenzóico (22,6 mg/100 g de extrato seco), o ácido benzóico (26,7 mg/100 g de extrato seco), o ácido 3,4-dihidroxifenilacético (65,7 mg/100 g de extrato seco) e o ácido 4-hidroxifenilacético (93,7 mg/100 g de extrato seco). As células que foram expostas ao H_2O_2 apresentaram menor potencial migratório, maior geração de EROs e aumento a carbonilação de proteínas, sendo o tratamento e o pré-tratamento com o ASE capaz de atenuar estes parâmetros. Observou-se uma tendência a maior expressão de Nrf2, nos grupos tratados com o ASE e redução desta expressão quando tratados com H_2O_2. Assim o ASE, que é rico em compostos fenólicos, foi capaz de reverter o quadro de estresse oxidativo induzido por H_2O_2 e há uma tendência que este efeito seja atribuído a modulação positiva da via de sinalização do Nrf2 em células endoteliais humanas.

Palavras-Chave: Açaí. Compostos Fenólicos. Atividade Antioxidante. Estresse Oxidativo. Nrf2.

ABSTRACT

SOARES, E. R. **Antioxidant activity of açai seed extract**: molecular aspects of human endothelial cells. 2016. 81 f. Dissertação (Mestrado em Alimentação, Nutrição e Saúde) – Instituto de Nutrição, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

The discard of açai seed (*Euterpe oleracea* Mart.) has a significant environmental impact. Thus the development of by-products that facilitate the use of them is extremely relevant. An hydro-alcoholic extract of acai seed has been shown as a possible medicinal plant extract with pharmacological properties useful for therapeutic use in the treatment of cardiometabolic diseases. The endothelium is an important component in the pathogenesis of various vascular diseases, and endothelial dysfunction is the initial event in the development of atherosclerotic disease. However, there is no enough knowledge about the antioxidant activity, the content and profile of phenolic compounds and molecular aspects involved in the biological activity of ASE in human endothelial cells, which are the objectives of this study. Endothelial cells from human umbilical cord (HUVEC) were used in the presence of an oxidative insult induced by hydrogen peroxide (H_2O_2) concomitantly or not with ASE. The antioxidant activity of the extract was measured by Folin-Ciocalteu, ferric reducing ability power (FRAP), trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) and oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and quantification, as well as the profile of phenolic compounds were assessed using high performance liquid chromatography (HPLC). Analyzes of generation of reactive species oxygen and protein carbonylation, and the activity of antioxidant enzymes, migratory potential of the cells and expression of proteins involved in the pathway of the transcription factor Nrf2 were performed. The outcomes show that ASE has high antioxidant capacity compared to other extracts. Seven phenolics compounds were quantified most of them belong to the class of phenolic acids: syringic acid (4.0 mg /100 g of dry extract), 2-hydroxy cinnamic acid (9.9 mg /100 g of dry extract), acid gallic (19.0 mg /100 g of dry extract), 3,4-dihydroxybenzoic acid (22.6 mg /100 g of dry extract), benzoic acid (26.7 mg /100 g extract dry), 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (65.7 mg /100 g of dry extract) and 4-hydroxyphenylacetic acid (93,7 mg phenol/100 g of dry extract). Groups that were exposed to H_2O_2 showed less migratory potential greater ROS and increased the protein carbonylation, with the treatment and pretreatment with ASE able to attenuate these parameters. There was a tendency to higher expression of Nrf2 in the groups treated with ASE, requiring more work compared signaling pathways and regulate this transcription factor. Thus, ASE, that is rich in phenolic compounds, was able to revert the above oxidative stress induced by H_2O_2 and there is a tendency that this effect is attributable to upregulation of Nrf2 signaling pathway in human endothelial cells.

Keywords: Acai. Phenolic Compounds. Antioxidant Activity. Oxidative Stress. Nrf2.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAPH	Dicloreto de 2,2’-azobis- (2 amidinopropano)
ABTS	2,2’-azinobis-3-etil-benzotiazolina-6-sulfonado
ACh	Acetilcolina
ARE	*Antioxidant response element*
ASE	*Açaí Seed Extract*
BTB	*Broad-complex, tramtrack e Bric à Brac*
Bzip	zíper leucina
CAT	Catalase
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CM-H_2 DCFDA	5,6-clorometil-2’,7’-diacetato de diclorodihidrofluoresceína
COX 2	Ciclooxgenase 2
Cu/Zn-SOD	Cobre/Zinco- Superóxido dismutase
DNA	Ácido desoxirobonucleico
EDRF	Fator de relaxamento derivado do endotélio
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
ERK	*Extracellular-signal-regulated Kinases*
FADH	*Flavin Adenine Dinucleotide*
Fe^{2+}-TPTZ	Ferroso-tripiridiltriazina
Fe^{3+}-TPTZ	Ferritripiridiltriazina
GPx	Glutationa peroxidase
GR	Glutationa redutase
GSH	Glutationa
GSH	Glutationa reduzida
HO-1	Heme oxigenase-1
HUVEC	*Human Umbilical Vein Endotelial Cells*
ICAM-1	*Intercellular Adhesion Molecule 1*
JNK	*kinases c-Jun N-terminal*
Keap 1	*Kelch-like ECH-associated protein 1*
$LOO^{\bullet}$	Peroxila
$LOOH^{\bullet}$	Hidorperóxido

MAPK	*Mitogen Activated Protein Kinases*
Mn-SOD	Manganês- Superóxido dismutase
NADH	*Nicotinamide Adenine Dinucleotide*
NADPH	*Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate*
NADPH Oxidase	*Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate-Oxidase*
NFkB	*Nuclear factor kappa B*
NQO-1	NADPH quinona oxidorredutase 1
Nrf2	*Nuclear factor-erythroid 2-related factor-2*
PCR	Proteína C reativa
RNAm	Ácido ribonucleico mensageiro
SOD	Superóxido Dismutase
TCA	Ácido tricloroacético
TEAC	*Trolox equivalent antioxidant capacity*
TNF-α	*Tumoral Nuclear Factor alpha*
VCAM-1	*Vascular cells adhesion molecules 1*
VEGRF	Receptor do fator de crescimento endotelial vascular

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Açaizeiros 18
Figura 2- Imagens ilustrativas do fruto do açaí 19
Figura 3- Estruturas químicas de compostos fenólicos 21
Figura 4 - Classes e subclasses dos compostos fenólicos 22
Figura 5- Fórmulas estruturais dos ácidos hidroxibenzóicos (a) e hidroxicinâmicos 23
Figura 6 - Fórmulas estruturais da classe dos flavonóides e suas subclasses 23
Figura 7- Fórmula estrutural do tanino hidrolisável 24
Figura 8- Fórmula estrutural do galotanino 24
Figura 9- Fórmula estrutural do elagitanino 25
Figura 10 - Fórmula estrutural do tanino condensado 25
Figura 11 - (a)- Fórmula estrutural do resveratrol; (b)- Estrutura química da molécula *trans*-resveratrol 26
Figura 12 - Radical livre formado pelo desemparelhamento de um elétron 28
Figura 13 - Geração do ânion superóxido pelo complexo enzimático NADPH oxidase 29
Figura 14 - Localização das NOX em diversos tecidos do corpo 30
Figura 15 - Reação de Fenton 31
Figura 16 - Reação de Harber – Weiss 31
Figura 17 - Mecanismo de geração de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio a partir da molécula de oxigênio e atuação de enzimas antioxidantes 32
Figura 18 - Estrutura molecular do Nrf2 34
Figura 19 - Estrutura molecular da Keap 1 34
Figura 20 - Mecanismo proposto para ativação da via do Nrf2 35
Figura 21 - Potenciais sítios de ação dos ácidos hidroxicinâmicos para proteção das células endoteliais 36
Figura 22 - Processo de obtenção do extrato hidroalcoólico do caroço de açaí 40
Figura 23 - Esquema de perfusão do leito arterial mesentérico 46
Figura 24 - Redução do composto resazurina a resorufina 47
Figura 25 - Efeito do extrato hidroalcoólico do caroço do açaí na reatividade vascular 56
Figura 26 - Efeito do extrato hidroalcoólico do caroço do açaí na viabilidade celular 57
Figura 27- Efeito do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) na viabilidade celular 58
Figura 28 - Efeito do ASE e do H_2O_2 na viabilidade celular 59

Figura 29- Efeito do ASE e do H_2O_2 na migração celular 60
Figura 30 - Efeito do ASE e do H_2O_2 na geração de EROs 61
Figura 31 - Efeito do ASE e do H_2O_2 na carbonilação de proteínas 62
Figura 32- Efeito do ASE e do H_2O_2 na atividade da enzima catalase 63
Figura 33- Efeito do ASE e do H_2O_2 na atividade da enzima glutationa peroxidase 64
Figura 34- Efeito do ASE e do H_2O_2 na expressão de proteínas envolvidas na via de sinalização do Nrf2 65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Sistema gradiente de eluição utilizado na análise de compostos fenólicos de extrato hidroalcoólico do caroço de açaí..... 45

Tabela 2- Atividade antioxidante *in vitro* do extrato hidroalcoólico do caroço de açaí (ASE)..... 54

Tabela 3- Teor e perfil de compostos fenólicos de extrato hidroalcoólico do caroço de açaí (ASE)..... 55

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	16
1	**REFERENCIAL TEÓRICO**	18
1.1	***Euterpe oleracea* Mart.**	18
1.2	**Compostos fenólicos**	21
1.3	**Endotélio e disfunção endotelial**	27
1.4	**Estresse oxidativo**	28
1.5	**Via do Nrf2**	33
2	**JUSTIFICATIVA**	37
3	**OBJETIVOS**	38
3.1	**Objetivo geral**	38
3.2	**Objetivos específicos**	38
4	**MATERIAIS E MÉTODOS**	39
4.1	**Obtenção do fruto do açaí e do extrato hidroalcoólico do caroço do açaí (ASE)**	39
4.2	**Capacidade antioxidante do ASE**	41
4.2.1	Preparo da amostra	41
4.2.2	Fenólicos Totais por Folin-Ciocalteu	41
4.2.3	Ferric Reducing Ability Power (FRAP)	42
4.2.4	Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC)	42
4.2.5	Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC)	43
4.3	**Determinação do perfil e do teor dos compostos fenólicos presentes no ASE**	44
4.3.1	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	44
4.4	**Medida da reatividade do leito arterial mesentérico ao ASE**	45
4.5	**Ensaio *in vitro***	47
4.5.1	Cultura de células	47
4.5.2	Viabilidade celular	47
4.5.3	Delineamento experimental	48
4.5.4	Migração celular	48
4.5.5	Geração de espécies reativas de oxigênio (EROs)	49
4.5.6	Carbonilação de proteínas	50
4.5.7	Atividade antioxidante enzimática	51

4.5.7.1 Atividade da catalase 51
4.5.7.2 Atividade da glutationa peroxidase (GPx) 51
4.5.8 Western blot 52
4.6 **Análise estatística** 53
5 **RESULTADOS** 54
5.1 **Atividade antioxidante do ASE** 54
5.2 **Teor e perfil dos compostos fenólicos do ASE** 54
5.3 **Efeito vasodilatador do ASE** 55
5.4 **Ensaios *in vitro*** 56
5.4.1 Viabilidade celular 56
5.4.1.1 Efeito do ASE e do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em células endoteliais 56
5.4.2 Efeito do ASE e do H_2O_2 na migração celular 59
5.4.3 Efeito do ASE e do H_2O_2 na geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) 60
5.4.4 Efeito do ASE e do H_2O_2 na carbonilação de proteínas 61
5.4.5 Efeito do ASE e do H_2O_2 na atividade enzimática antioxidante 62
5.4.5.1 Catalase 62
5.4.5.2 Glutationa peroxidase 63
5.4.6 Efeito do ASE e do H_2O_2 na expressão de proteínas envolvidas na via de sinalização do Nrf2 64
6 **DISCUSSÃO** 66
7 **CONCLUSÃO** 71
REFERÊNCIAS 72
APÊNDICE A – Publicação de artigo na Revista do Hospital Universitário Pedro Ernesto 81

INTRODUÇÃO

A alimentação consiste em um fator ambiental que vem despertando o interesse devido a potenciais atividades biológicas de nutrientes e de compostos bioativos (CBAs) presentes nos alimentos. Nesse sentido, pesquisas vêm sendo desenvolvidas com o objetivo de elucidar as informações acerca dos efeitos biológicos desses componentes alimentares e de seus respectivos mecanismos de ação (CARDOZO et al., 2013)

Os CBAs são substâncias ativas nos alimentos e seu consumo está relacionado à manutenção da homeostase corporal e ao menor risco de desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis (DCNTs). Os alimentos fontes desses compostos estão amplamente distribuídos no reino vegetal. Dentre os frutos, o presente trabalho utilizou o açaí (*Euterpe oleracea* Mart.), originário de uma palmeira nativa da Amazônia, comumente processado para o preparo do suco obtido da casca e da polpa, sendo o caroço desprezado, na maioria dos casos (LICHTENTHÄLER et al., 2005; RODRIGUES et al., 2006).

Dentre os CBAs encontrados no açaí, os compostos fenólicos merecem destaque por estarem presentes em quantidades expressivas e por apresentarem diversas propriedades biofarmacológicas, tais como antioxidante, anti-inflamatória, anti-hipertensiva, vasodilatadora, e melhora da sensibilidade à insulina (CIMINO et al., 2013; KANG et al., 2012; ZHENG et al., 2010).

As propriedades apresentadas pelos compostos fenólicos presentes nos alimentos e, em especial, no açaí, podem ser explicadas pela capacidade desses compostos interagirem com o genoma humano. A propriedade antioxidante destes compostos, por exemplo, se deve à modulação de fatores de transcrição envolvidos em vias de sinalização. Sendo assim, a compreensão desta modulação é extremamente importante para permitir o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas, vinculadas à Nutrição (CARDOZO et al., 2013; CIMINO et al., 2013; ZHENG et al., 2010).

A base para terapias antioxidantes está atrelada ao reequilíbrio do ambiente redox e ao reestabelecimento da alteração existente pelas vias de sinalização celular. Neste sentido, o papel do estresse oxidativo na regulação da transcrição gênica está se tornando cada vez mais importante, uma vez que não só fornece uma visão ampliada sobre o papel fisiológico do estresse oxidativo, mas também apresenta sistemas regulatórios que são fundamentais na manutenção da homeostasia (CARDOZO et al., 2013).

No que concerne à manutenção da homeostase vascular, o endotélio é o órgão designado para manter a regulação do tônus vascular e a sua funcionalidade (RAY et al., 2014). As células endoteliais são responsáveis por promover o equilíbrio constante entre agentes pró e antioxidantes, mediadores de vasodilatação e de vasoconstrição, moléculas pró e anti-inflamatórias e sinais pró e antitrombóticos, sendo todos estes fatores regulados por vias de sinalização que visam garantir um endotélio íntegro (POBER; MIN; BRADLEY, 2009). O desequilíbrio destes fatores pode culminar na disfunção endotelial, sendo esta referida como um preditor de distintas condições fisiopatológicas como as DCNTs (DONATO et al., 2015).

Assim, percebe-se que o tipo e a qualidade dos alimentos ingeridos são de extrema importância, não apenas pelo seu valor nutricional, mas também pela capacidade de seus nutrientes e CBAs interagirem com o genoma. A Nutrigenômica, portanto, representa uma vertente de pesquisa no âmbito nutricional, que tem como foco estudar a interação gene-nutriente. Essa interação ocorre de duas formas complementares: nutrientes e CBAs modulando o funcionamento do genoma e as características genômicas influenciando a resposta à alimentação, à necessidade de nutrientes e o risco para DCNTs (CHÁVEZ; MUÑOZ DE CHÁVEZ, 2003; MÜLLER; KERSTEN, 2003).

Com isso, a descrição de vias de sinalização envolvidas no processo de interação entre gene-nutriente é importante para a descrição dos efeitos moleculares e possíveis aplicações preventivo/terapêutica. Ademais fatores de transcrição, proteínas responsáveis por desencadear a transcrição e, consequentemente, a tradução de proteínas com propriedades anti-inflamatórias, antioxidante, dentre outras, são fundamentais, uma vez que auxiliam na manutenção ou no reequilíbrio do meio após um dano oxidativo. Estes fatores têm sido estudados em modelos *in vivo* e *in vitro*, associados, em sua maioria, a alguma condição fisiopatológica. No que diz respeito à atividade antioxidante, uma das principais vias envolvidas em ações contra os danos oxidativos é a do fator de transcrição *nuclear factor-erythroid 2-related factor-2* (Nrf2) (HEYNINCK et al., 2016).

Portanto levando-se em consideração a influência que os compostos fenólicos exercem sobre a saúde, graças aos benefícios descritos na literatura e promovendo a associação destes fatores ambientais com mecanismos regulatórios, envolvidos na resposta antioxidante, contra o dano oxidativo, se torna plausível a hipótese de que os compostos fenólicos consigam modular a via de sinalização do Nrf2.

1 **REFERENCIAL TEÓRICO**

1.1 ***Euterpe oleracea* Mart.**

O açaí é um fruto nativo da Amazônia brasileira que pertence ao gênero botânico de palmeiras *Euterpe*, oriundas da família *Arecaceae.* Dentre as espécies existentes nesta família, as mais descritas na literatura são a *Euterpe edulis* Mart. (juçara), a *Euterpe oleracea* Mart. (açaí) e a *Euterpe precatoria* Mart. (açaí) (SCHAUSS, 2010; YAMAGUCHI et al., 2015). Os frutos produzidos pelos açaizeiros se diferenciam pela forma a qual as palmeiras crescem. A *Euterpe precatória* possui caule único, podendo alcançar de 3 a 20 m de altura e de 4 a 23 cm de diâmetro (Figura 1(a)). Já a *Euterpe oleracea* se desenvolve a partir de um aglomerado de touceiras, contendo em média de 6 a 18 palmeiras que variam de acordo com a localização, a condição do solo, e a genética da planta. podendo atingir de 30 a 40m de altura (Figura 1(b)) (SCHAUSS, 2010).

Figura 1- Açaizeiros

(a) (b)

Legenda: (a) - *Euterpe precatoria* Mart; (b) - *Euterpe oleracea* Mart.
Fonte: (a) e (b) Palmbob, 2004 (http://davesgarden.com/guides/pf/showimage/44156/).

O açaí é produzido em inflorescência (cachos), podendo esta conter mais de mil frutos. Cada fruto possui em média de 1,5 a 2,0 cm de diâmetro de coloração roxa, quase negra quando maduro (Figura 2 (a)) (SCHAUSS, 2010). O fruto do açaí é dividido em pericarpo e semente, sendo que o pericarpo ainda é subdivido em: epicarpo, mesocarpo e endocarpo. Além disso, o açaí possui uma membrana fibrosa que separa o mesocarpo do endocarpo denominada membrana de fibras mesocárpicas (Figura 2 (b)). Ao se retirar esta membrana nota-se que a semente apresenta uma testa ruminada, ou seja, é possível observar projeções formando linhas radiais de células que se difundem por todo o tecido até os arredores do centro (próximas ao embrião), chegando a penetrar no endosperma com uma provável função de transporte de carboidratos e de outros nutrientes. Além disso, estas células contem taninos. (Figuras 2 (c) e (d)) (COSTA et al., 2008).

Figura 2- Imagens ilustrativas do fruto do açaí

(a)

(b)

(c)

(d)

Legenda: (a) - Inflorescência de um açaizeiro; (b) - Membrana fibrosa que reveste o caroço; (c) - testa ruminada do açaí; (d) - Caroço do açaí sem a membrana fibrosa macerado em pistilo.
Fonte: (a) e (b) - Top Tropicals, 2015; (c) e (d) - o autor, 2015.

De acordo com Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), o Brasil produziu um total de 202.216 toneladas de açaí, no ano de 2013. O estado do Pará foi responsável pela maior parte da produção neste mesmo ano, totalizando 54,9%. Entretanto, ele é produzido também em outros Estados como o Amazonas, o Amapá, o Maranhão, o Mato Grosso e o Tocantins (IBGE, 2013).

O consumo do fruto é mais expressivo no estado do Rio de Janeiro, que consome cerca de 500 toneladas de açaí por mês, e ocupa o primeiro lugar no Brasil nesse quesito. Em seguida, estão os estados do Pará (400 toneladas/mês) e de São Paulo (150 toneladas/mês) (HEINRICH; DHANJI; CASSELMAN, 2011). O primeiro propósito da colheita do fruto consiste no processamento do suco obtido de sua polpa e casca, sendo o caroço desprezado por ter propriedades nutricionais limitadas, utilizado, em menor proporção, para a produção de carvão vegetal, alimentação de suínos, dentre outras finalidades (RODRIGUES et al., 2006; SCHAUSS, 2010).

O açaí e, principalmente, a polpa da *Euterpe oleracea*, tem sido bastante estudada, nos últimos anos, quanto aos efeitos benéficos para a saúde promovidos pelo seu consumo. Esses efeitos foram atribuídos, na maioria das vezes, à sua composição química, especialmente à presença de CBAs, como os compostos fenólicos, cujos teores podem variar, na matriz do açaí, de acordo com o clima, solo, chuva, entre outros fatores (DEL POZO-INSFRAN; PERCIVAL; TALCOTT, 2006; SCHAUSS et al., 2006; YAMAGUCHI et al., 2015). Por outro lado, são escassos os estudos sobre o caroço do açaí, desde a composição química até os efeitos do seu consumo para a saúde humana. Essas investigações são relevantes sob o ponto de vista econômico, pelo maior aproveitamento do fruto, e ambiental, pela redução na produção de resíduos gerados no processamento do fruto que despreza o caroço do açaí. Paralelamente, a realização de estudos acerca desse tema pode auxiliar na melhor compreensão sobre a ação dos constituintes fitoquímicos do caroço do açaí, sobre as suas propriedades biofarmacológicas e seus mecanismos de ação (RODRIGUES et al., 2006).

O grupo de pesquisa do Laboratório de Farmacologia Cardiovascular e Plantas Medicinais da Universidade do Estado do Rio de Janeiro obteve um extrato hidroalcoólico do caroço do açaí (ASE), o qual o processo de obtenção e as indicações terapêuticas já se encontram depositadas no Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI), assim como, no *Patent Cooperative Treaty* (PCT). Estudos do grupo, realizados em distintos modelos murinos, demonstram que este extrato induz efeito vasodilatador dependente do endotélio (DA COSTA et al., 2012; DE BEM et al., 2014; DE OLIVEIRA et al., 2015; ROCHA et al., 2007) efeito anti-hipertensivo (DA COSTA et al., 2012; DE BEM et al., 2014; ROCHA et al., 2008), além de reduzir o dano oxidativo (DA COSTA et al., 2012; DE BEM et al., 2014; DE OLIVEIRA et al., 2015; MOURA et al., 2012; ROCHA et al., 2008), e possuir propriedades anti-inflamatórias (MOURA et al., 2012). Em outro estudo do grupo destacou-se que o tratamento preventivo com ASE reduziu o peso corporal, a gordura abdominal, os níveis

glicêmicos, a insulina e a resistência à insulina em camundongos C57BL/6J que consumiram dieta hiperlipídica (60% de lipídeos) (DE OLIVEIRA et al., 2015).

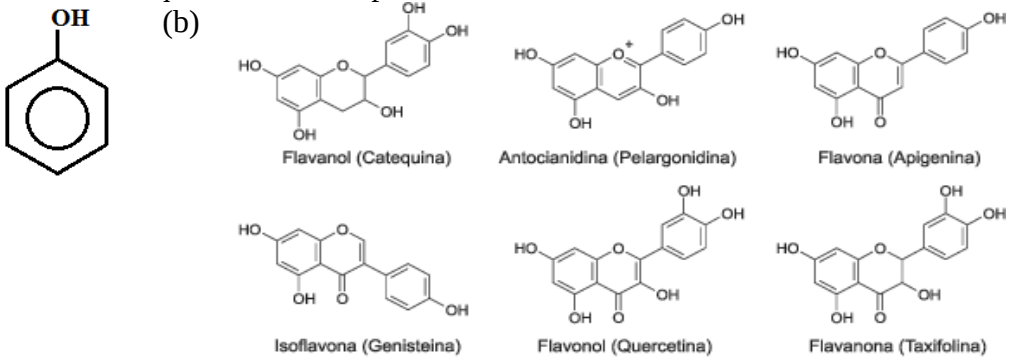
Estes achados, como um todo, sugerem um importante potencial do ASE como um extrato de planta medicinal com propriedades farmacológicas úteis para um possível uso terapêutico no tratamento de doenças cardiometabólicas, devido à presença de CBAs, mais especificamente de compostos fenólicos. Todavia, a composição química e os aspectos moleculares da ação do ASE ainda são escassos, necessitando de mais estudos que explorem as vias de sinalização responsáveis por conferir os efeitos biológicos deste extrato.

1.2 **Compostos fenólicos**

Os compostos fenólicos são metabólitos secundários de plantas, geralmente envolvidos na defesa contra organismos patogênicos ou raios ultravioletas. Sua presença nos alimentos está, geralmente, relacionada à sua cor e aos atributos sensoriais de adstringência e amargor. Quimicamente estes compostos são definidos como substâncias que possuem o grupamento fenol (Figura 3 (a)), podendo ser encontrados um ou mais anéis aromáticos com graus variáveis de hidroxilação (acréscimo ou substituição de hidroxila em uma molécula), metilação (ligação ou substituição de um grupamento metila em outros substratos) e glicosilação (adição de um ou mais carboidratos a outras moléculas) (Figura 3 (b)). Cerca de 10.000 compostos já foram identificados e, de acordo com sua estrutura química, são classificados em: ácidos fenólicos, flavonóides, taninos e estilbenos, porém estes grupos podem, ainda, ser divididos em subclasses, conforme ilustrado na Figura 4 (FRAGA et al., 2010; LI et al., 2014; MANGANARIS et al., 2014).

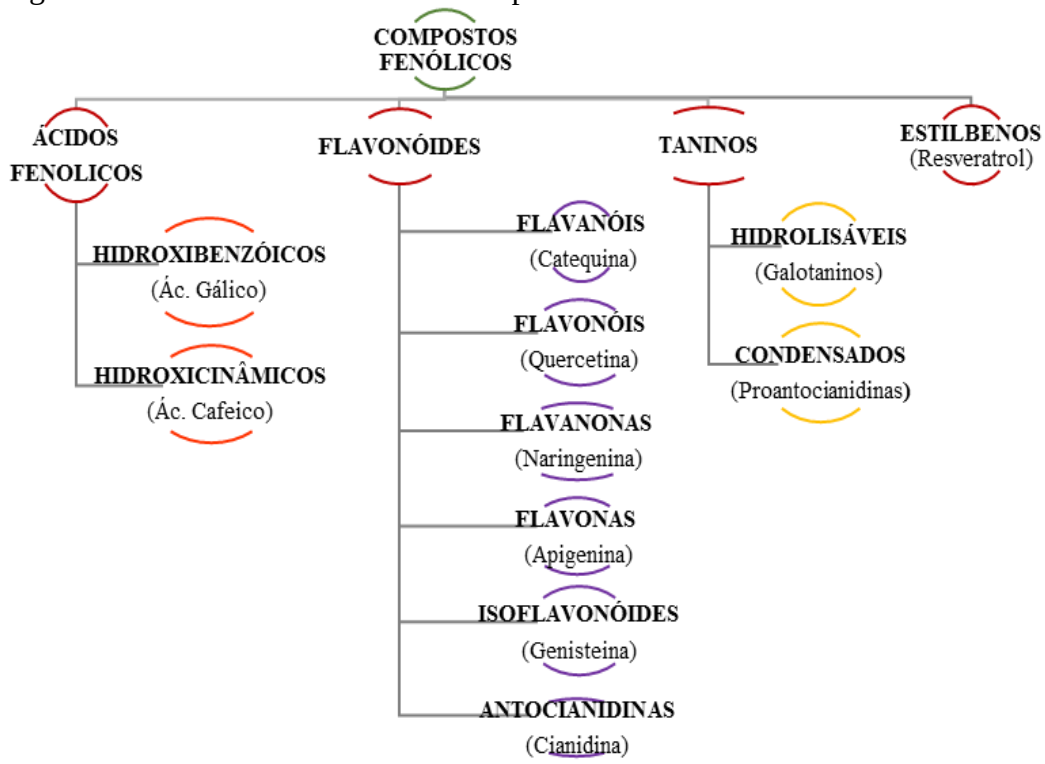
Figura 3- Estruturas químicas de compostos fenólicos

(a) (b)



Legenda: (a) - Estrutura química de uma molécula de fenol; (b) - Diferentes estruturas químicas, originando compostos fenólicos da classe dos flavonóides.
Fonte: (a) - o autor (2015); (b) - CERQUEIRA; DE MEDEIROS; AUGUSTO, (2007).

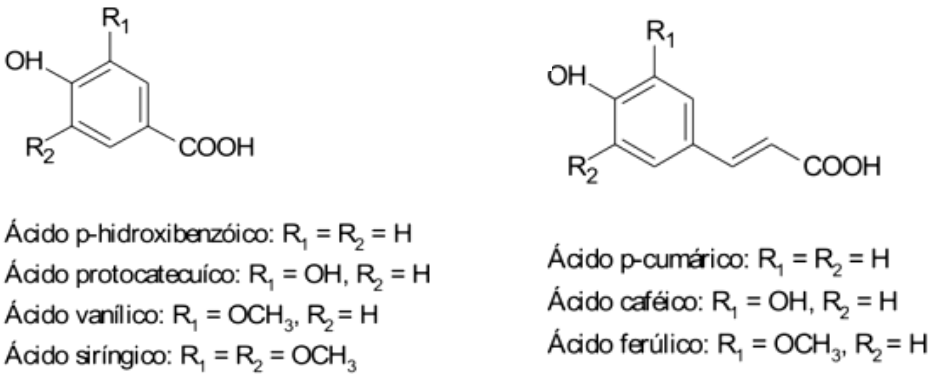
Figura 4 - Classes e subclasses dos compostos fenólicos



Fonte: Adaptado de MANGANARIS et al., 2014.

Os ácidos fenólicos são divididos em dois grupos principais, derivados dos ácidos hidroxibenzóicos e derivados dos ácidos hidroxicinâmicos. Os ácidos hidroxibenzóicos possuem sete átomos de carbono (C_6-C_1) e são os fenólicos que possuem estrutura química mais simples, conforme demonstrado pela Figura 5 (a). Podem ser encontrados em alimentos como cebola e frutas vermelhas. São exemplos desta subclasse de compostos fenólicos, o ácido gálico e o elágico. Os ácidos hidroxicinâmicos possuem nove átomos de carbono (C_6-C_3). São exemplos desta subclasse, os ácidos cafeico, *p*-cumárico, ferúlico e sinápico que, na maioria dos alimentos, se encontram esterificados ao ácido quínico, ao ácido tartárico ou aos carboidratos e seus derivados (Figura 5 (b)) (DE OLIVEIRA; BASTOS, 2011; SOARES, 2002). Os ácidos hidroxicinâmicos também podem ser encontrados na forma livre em alimentos, como tomate e cerveja (DE OLIVEIRA; BASTOS, 2011).

Figura 5- Fórmulas estruturais dos ácidos hidroxibenzóicos (a) e hidroxicinâmicos (b).

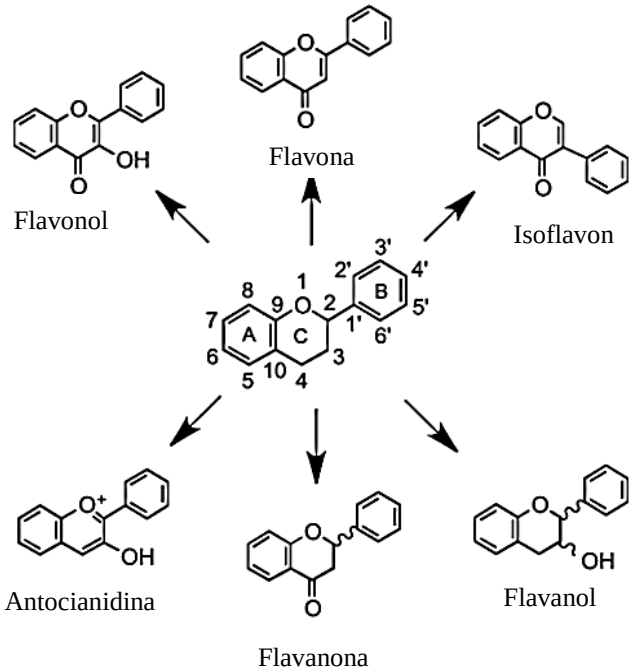


(a) (b)

Fonte: ANGELO; JORGE, 2007.

Os flavonóides possuem estrutura química C_6-C_3-C_6, sendo constituído por dois anéis aromáticos (A e B), ligados por uma cadeia de três carbonos, normalmente, organizados com um anel heterocíclico oxigenado (anel C). As subclasses dos grupos dos flavonóides são divididas de acordo com o grau de oxidação deste anel heterocíclico oxigenado, sendo os mais presentes na alimentação humana: os flavanóis, as flavanonas, as flavonas, os flavonóis (essencialmente 3-flavanóis), as isoflavonas, e as antocianidinas (Figura 6) (FRAGA et al., 2010).

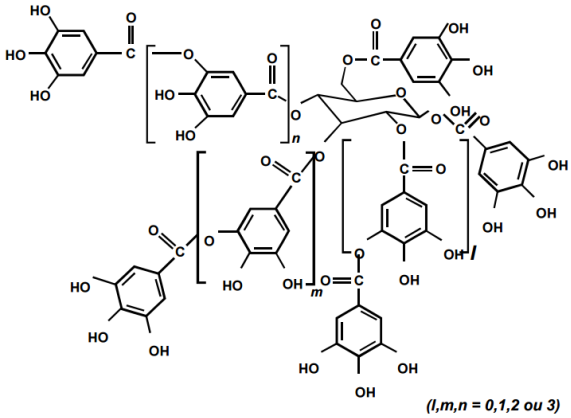
Figura 6- Fórmulas estruturais da classe dos flavonóides e suas subclasses



Fonte: Adaptado de: DEL RIO et al., 2013

A oligomerização e a polimerização dos flavonóides podem ocorrer em alguns casos e seus respectivos produtos, oligômeros e polímeros, são chamados de taninos. A observação de que muitos taninos podem ser fracionados por hidrólise, por tratamento com água quente ou com a enzima tanase (tanino acil hidrolase), por exemplo, levou este grupo de taninos a serem classificados como: taninos hidrolisáveis (Figura 7) (KHANBABAEE; REE, 2001).

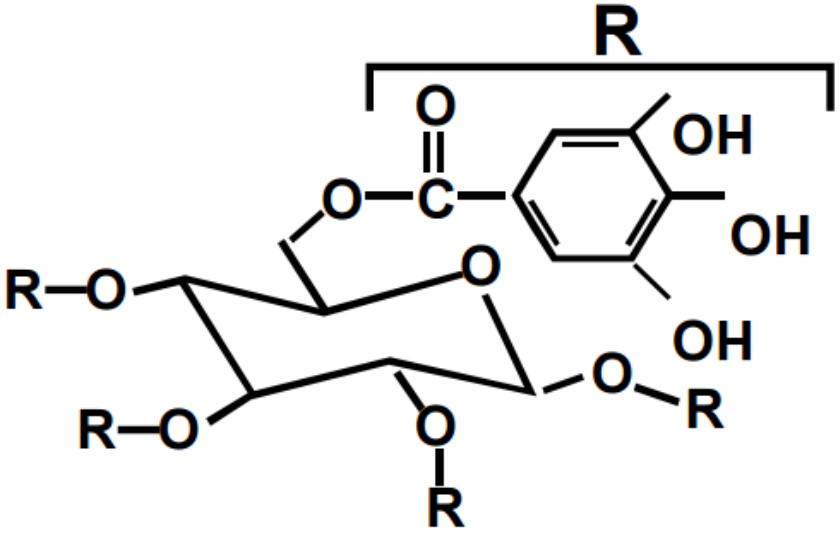
Figura 7- Fórmula estrutural do tanino hidrolisável



Fonte: BATTESTIN; MATSUDA; MACEDO, 2004.

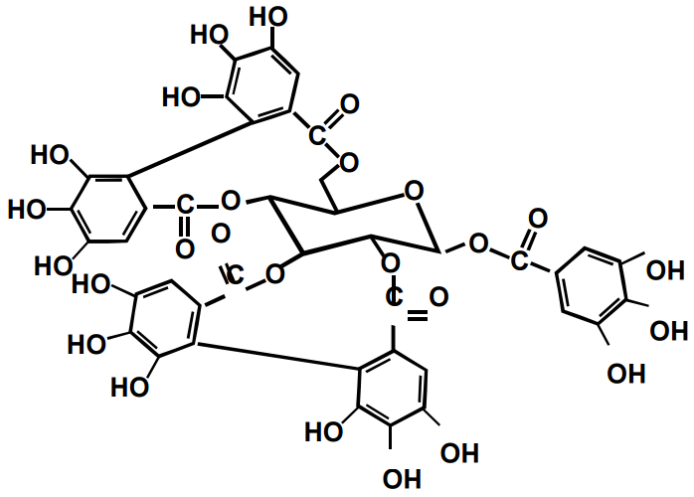
Taninos hidrolisáveis são polímeros que, ao sofrerem hidrólise, originam os seguintes componentes: um núcleo central constituído por um poliol (um açúcar, geralmente D-glicose, ou um flavonóide, como a catequina) e um ácido fenólico carboxílico que esterifica parcial ou totalmente a molécula nuclear. Estes taninos são classificados de acordo com os ácidos fenólicos carboxílicos presentes os quais podem ser o ácido gálico (galotaninos) (Figura 8) ou o ácido elágico (elagitaninos) (Figura 9) (FRAGA et al., 2010).

Figura 8- Fórmula estrutural do galotanino



Fonte: BATTESTIN; MATSUDA; MACEDO, 2004.

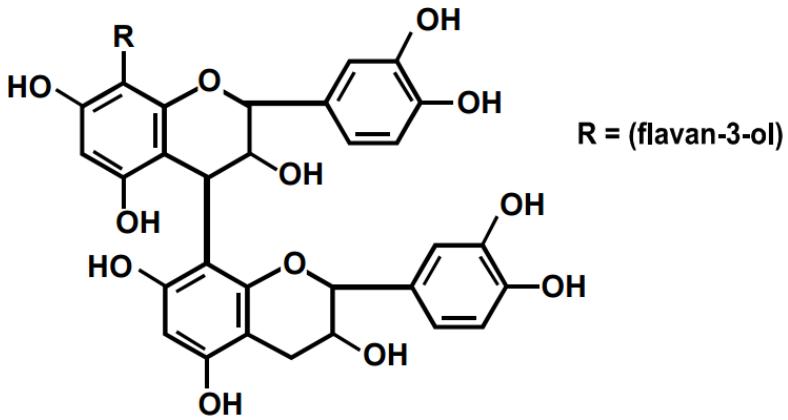
Figura 9- Fórmula estrutural do elagitanino



Fonte: BATTESTIN; MATSUDA; MACEDO, 2004.

Os taninos que resistem à hidrólise e apresentam solubilidade em solventes orgânicos, são chamados de proantocianidinas oligoméricas e poliméricas não hidrolisáveis e são classificados como taninos condensados (KHANBABAEE; REE, 2001). Taninos condensados são oligômeros de flavonóides cujas estruturas químicas são definidas não apenas pelo tipo de monômero, mas também pelo tipo de ligação entre eles. Existem vários padrões de oligomerização e algumas plantas apresentam modos característicos para realizar esse processo (Figura 10) (FRAGA et al., 2010).

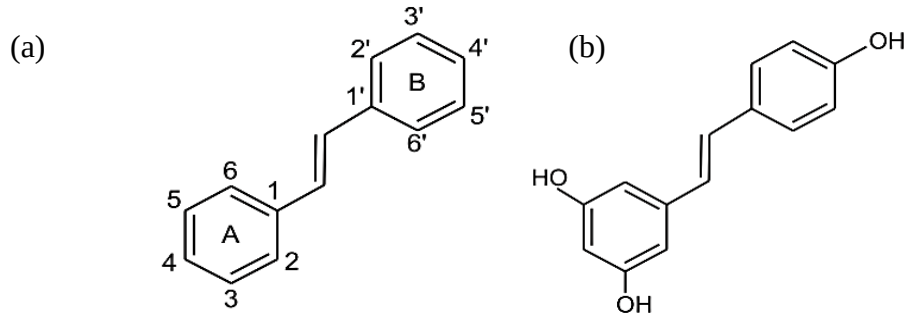
Figura 10- Fórmula estrutural do tanino condensado



Fonte: BATTESTIN; MATSUDA; MACEDO, 2004

Os estilbenos possuem uma estrutura comum C_6-C_2-C_6 (Figura 11(a)), que consiste em dois anéis aromáticos ligados através de uma ponte de dois átomos de carbono com uma ligação dupla. O composto majoritário dessa família é o resveratrol, que ocorre: i) em configurações *trans* (Figura 11 (b)) e *cis*; ii) como formas livres (agliconas) e glicosídeos; e iii) como monômeros, oligômeros e polímeros (viniferina) (FRAGA et al., 2010).

Figura 11- (a)- Fórmula estrutural do resveratrol; (b)- Estrutura química da molécula *trans*-resveratrol



Fonte: FRAGA et al., 2010.

Assim, a partir da breve descrição das estruturas químicas dos compostos fenólicos, compreende-se que, embora o grupo fenol seja à base da sua classificação, a sua relevância para reações químicas em animais é tão importante como a de outros grupos químicos que, também, são parte da molécula do composto fenólico (FRAGA et al., 2010). Sendo assim, a análise quantitativa dos compostos fenólicos em alimentos é extremamente relevante, pois permite a identificação dos mesmos e demonstra que não há a presença de uma única classe ou subclasse, mas sim uma combinação destas, podendo haver a predominância de alguma delas, em determinados casos (AMMERER et al., 2004; ISLAM et al., 2002; REGAZZONI et al., 2016; SCHIEBER; ULLRICH; CARLE, 2000).

Os principais compostos fenólicos já encontrados na matriz do açaí (*Euterpe oleracea* Mart.), em especial na polpa são: epicatequina, catequina e as antocianinas cianidina-3-glucosideo, cianidina-3- arabinosideo e cianidina-3-rutinosideo (BOBBIO et al., 2000; DEL POZO-INSFRAN; BRENES; TALCOTT, 2004; GALLORI et al., 2004; RODRIGUES et al., 2006). Chin et al. (2008), após secagem da polpa do açaí, identificaram 22 compostos fenólicos que contemplam lignanas, flavonóides, benzoquinonas, fenilpropanóides e derivados do ácido benzóico.

A capacidade antioxidante atribuída a estes fitoquímicos permite o desenvolvimento de pesquisas que associem o dano oxidativo à atividade antioxidante não enzimática, demonstrando que a utilização de compostos fenólicos contribui para o reestabelecimento da homeostasia do organismo em condições de desequilíbrio redox. Assim, há relação entre uma dieta rica em fenólicos e a proteção contra o desenvolvimento de comorbidades e patologias nas quais o desequilíbrio redox esteja envolvido, principalmente aquelas relacionadas ao acometimento da função endotelial, como diabetes mellitus, hipertensão, doença cardiovascular, entre outras (FRANKEL et al., 1993; STOCLET et al., 2004).

1.3 **Endotélio e disfunção endotelial**

A visão simplista do endotélio como apenas uma barreira mecânica entre o meio circulante e os demais componentes da parede vascular já não é mais aplicada, haja vista seu dinamismo, seu envolvimento em funções vitais e suas diversas atividades metabólicas. O endotélio é um importante mantenedor da vasculatura íntegra e é responsável pela produção de mediadores endoteliais, como por exemplo, o óxido nítrico envolvido na vasodilatação e na vasoconstrição (MONTEZANO; TOUYZ, 2012).

O endotélio consiste em uma camada única e contínua de células organizadas em forma de fuso que separa o sangue da parede vascular e do interstício (BAHIA et al., 2006). Esta camada vascular libera mediadores com ação autócrina e parácrina que atuam na regulação da função e manutenção do endotélio. Assim, cabe às células endoteliais desempenhar as funções da vasculatura, dentre as quais destaca-se: a regulação constante entre os agentes pró e antioxidantes, os mediadores de vasodilatação e vasoconstrição, as moléculas pró e anti-inflamatórias e os sinais pró e antitrombóticos, garantindo assim um endotélio íntegro. Contudo, quando há um desequilíbrio desta regulação a favor das propriedades pró-oxidante, vasoconstritora, pró-inflamatória e pró-trombótica, há a caracterização de um quadro de disfunção endotelial (DONATO et al., 2015; SIMPLICIO et al., 2015).

O efeito vasodilatador dependente do endotélio do ASE conforme apontam estudos prévios, bem como os demais desenlaces, mencionados anteriormente (ver item 1.1), demonstram a existência de uma atividade biológica do extrato, indicando uma possível ação terapêutica preventiva do mesmo em um processo que tenha como princípio a disfunção endotelial intimamente relacionada à progressão de comorbidades e patologias (DA COSTA et al., 2012; DE BEM et al., 2014; ROCHA et al., 2008).

Estes processos fisiopatológicos tem sido relacionados a insultos oxidativos que culminam no aumento na produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, promovendo alteração na homeostase, sendo, portanto o quadro de estresse oxidativo um dos principais fatores que contribuem para etiologia da disfunção endotelial (TOUYZ; BRIONES, 2011; WHEATCROFT et al., 2003). Assim compreende-se que a elucidação do desequilíbrio redox existente em um metabolismo, seja por aumento de EROs ou ERNs, seja por diminuição da defesa antioxidante enzimática ou não enzimática, exerce um papel central na compreensão da

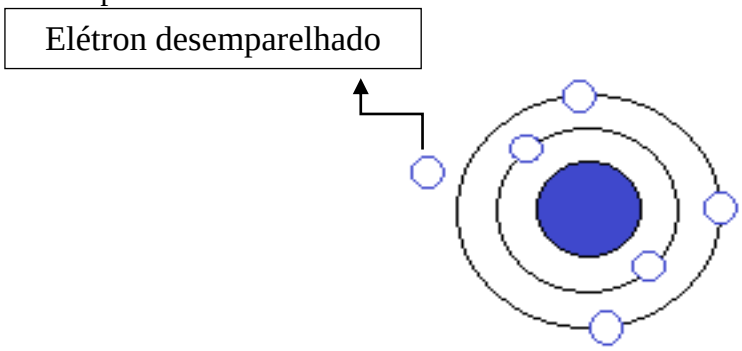
função endotelial, haja vista a associação positiva entre a geração de espécies reativas e a disfunção endotelial.

1.4 **Estresse oxidativo**

A geração de espécies reativas constitui um processo contínuo e fisiológico com funções biológicas relevantes, atuando como mediadores na sinalização extra e intracelular. Esta produção é regulada por diferentes processos e vias metabólicas. Entretanto, sua produção excessiva pode culminar em um estresse. O denominado estresse oxidativo ocorre nas células como consequência de um desequilíbrio do sistema redox devido ao excesso de espécies reativas ao oxigênio (EROs) e ao nitrogênio (ERNs), a diminuição da capacidade antioxidante (AOX) ou ambos os processos (PISOSCHI; POP, 2015)

Uma variedade de moléculas que atuam como radicais livres (espécies químicas com um elétron desemparelhado na última orbital) (Figura 12) derivadas do metabolismo do oxigênio têm sido descritas. Normalmente, estas possuem meia vida extremamente curta, são altamente reativas, produzidas em todos os sistemas biológicos e reagem facilmente com outras moléculas que se localizam em torno do seu sítio de formação. EROs incluem radicais livres como o ânion superóxido ($^{\bullet}O_2$-), o radical hidroxil (•OH) e os radicais lipídicos, como o hidroperóxido (LOOH$^{\bullet}$), bem como espécies oxidantes não radicalares como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o oxigênio singleto (CAMPOS; GOMES; FERREIRA, 2013; LEBRUN et al., 2014).

Figura 12- Radical livre formado pelo desemparelhamento de um elétron

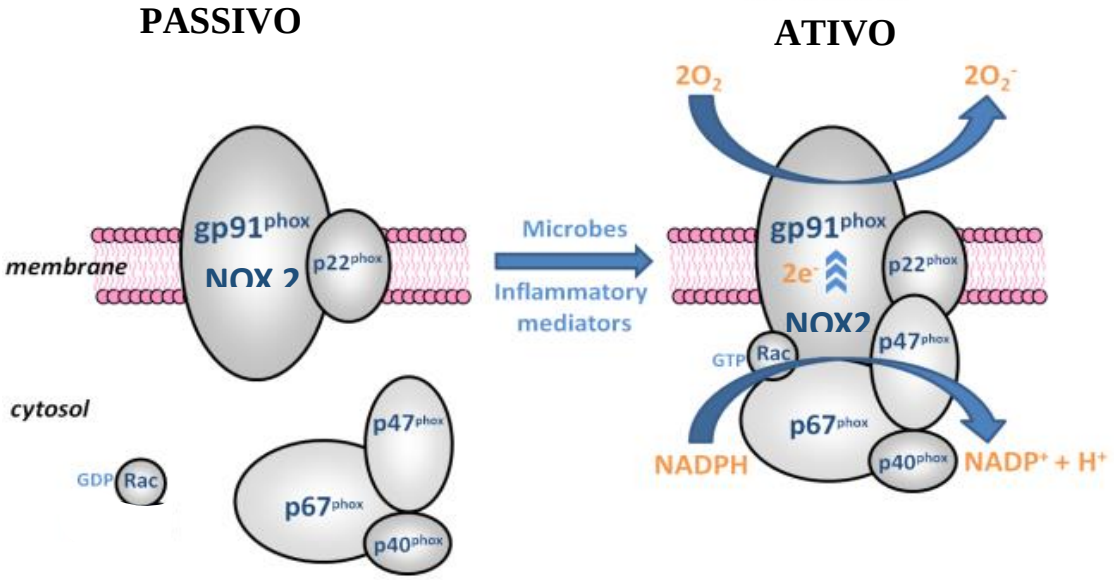


Fonte: O autor, 2015.

A formação de EROs pode ocorrer por diferentes vias. Entretanto, a cadeia respiratória mitocondrial é a principal fonte de geração destas espécies reativas, visto que possui vários

centros redox (complexos I ao III) capazes de transferir um elétron para a molécula de oxigênio com o objetivo de formar ânion superóxido ($^{\bullet}O_2^-$) (PISOSCHI; POP, 2015). Enzimas, como as oxidases de membrana, são também importantes fontes de EROs e ERNs que podem se combinar com outras moléculas e modificar a função mitocondrial. Dentre as enzimas destaca-se o complexo de membrana *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase* (NADPH oxidase). Esta enzima, na verdade é um complexo enzimático formado por unidades de membrana e subunidades citoplasmáticas que se unem a partir de um estímulo, o qual leva a fosforilação de GDP (guanosina difosfato) para GTP (guanosina trifosfato), promovendo ativação da proteína Rac (Rac 1 ou 2). Ocorre ainda a fosforilação da subunidade p47 phox (*phagocitic oxidase*) citosólica ocasionando alterações conformacionais que permitem sua interação com a p22. A translocação para perto da membrana de p47 permite a interação desta subunidade com outras duas subunidades (p67 e p40), para formar, então, o complexo enzimático ativo. Formado o complexo ativo haverá a transferência de elétron do NADPH do citosol para o oxigênio no espaço extracelular, produzindo o ânion superóxido (Figura 13) (BEDARD; KRAUSE, 2007).

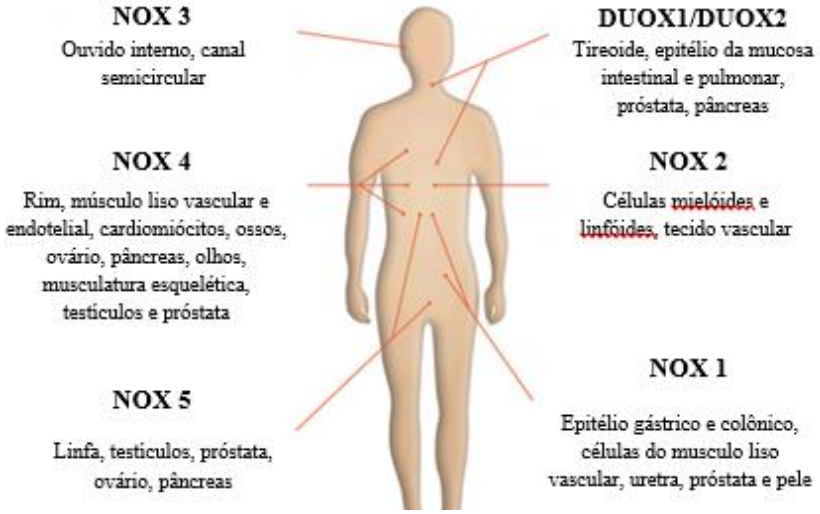
Figura 13- Geração do ânion superóxido pelo complexo enzimático NADPH oxidase



Legenda: O complexo enzimático da NADPH oxidase se encontra em estado pasivo e através de um estímulo, ocorre a fosforilação de GDP (guanosina difosfato) para GTP (guanosina trifosfato), promovendo ativação da proteína Rac (Rac 1 ou 2). Ainda há a fosforilação da subunidade p47 phox (*phagocitic oxidase*) citosólica ocasionando alterações conformacionais que permitem sua interação com a p22. A translocação para perto da membrana de p47 permite a interação desta subunidade com outras duas subunidades (p67 e p40), para formar complexo enzimático ativo. Formado o complexo ativo haverá a transferência de elétron do NADPH do citosol para o oxigênio no espaço extracelular, produzindo o ânion superóxido ($^{\bullet}O_2$-).
Fonte: Adaptado de Look for Diagnosis (http://www.mdpi.com/brainsci/brainsci-03 0561/article_deploy/html/images/brainsci-03-00561-g001-1024.png)

As unidades NOX e DUOX são proteínas análogas as subunidades que fazem parte do complexo enzimático que atuam na ativação da NADPH oxidase. Podem ser encontradas em diversas regiões do corpo e em relação a quadros como hipertensão e angiogênese as mais comumente encontradas são as NOX1, NOX2 e NOX4, que estão presentes no endotélio vascular (Figura 14) (QUINN; AMMONS; DELEO, 2006).

Figura 14- Localização das NOX em diversos tecidos do corpo

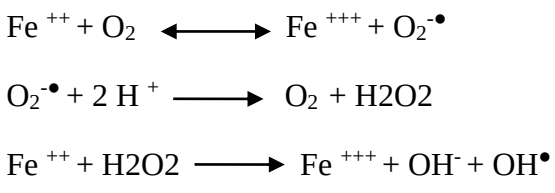


Legenda: Tecidos que expressam homólogos de NOX em alguns tecidos do corpo humano.
Fonte: Adaptado de: QUINN; AMMONS; DELEO, 2006.

Outras fontes de formação de EROs são: xantina oxidase, uma enzima expressa na parede vascular e também circulante no plasma, relacionada principalmente ao processo de isquemia e reperfusão; e a mieloperoxidase, uma hemeproteína expressa em neutrófilos e monócitos que é secretada durante ativação dessas células e óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), que sob condições fisiológicas produz NO que interage com EROs, gerando peroxinitritito ($ONOO^{\bullet}$) (CAMPOS; GOMES; FERREIRA, 2013).

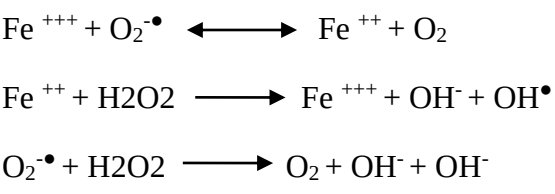
Dentre as espécies reativas de oxigênio, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é produzido principalmente pela dismutação do $^{\bullet}O_2^-$. Ao contrário desta espécie reativa radicalar, o H_2O_2 não é um radical livre, configura-se em uma molécula mais estável, sendo também lipossolúvel, atravessando membranas celulares e possuindo meia vida maior que o $^{\bullet}O_2^-$ (TOUYZ; SCHIFFRIN, 2004). Na presença de ferro, o H_2O_2 pode ser reduzido e gerar $OH^{\bullet}$ (reação de Fenton (Figura 15) ou Harber – Weiss (Figura 16)) (FRIDOVICH, 1997).

Figura 15- Reação de Fenton



Fonte: O autor, 2015.

Figura 16- Reação de Harber – Weiss

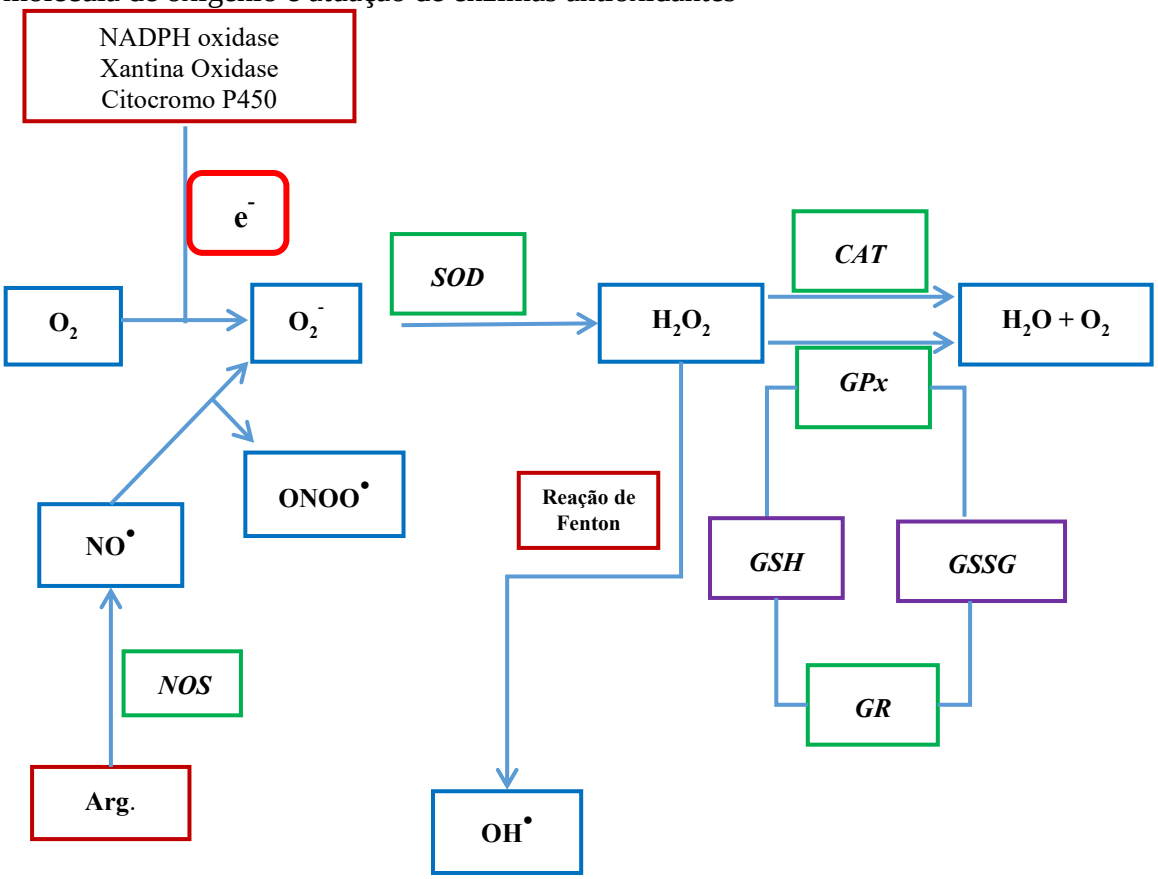


Fonte: O autor, 2015.

A fim de diminuir a reatividade destas espécies e, portanto, reestabelecer o desequilíbrio existente entre pró-oxidantes e antioxidantes, o organismo humano se contrapõe a este desequilíbrio através do sistema de defesa antioxidante. Este sistema consiste em uma série de compostos com capacidade antioxidante, sejam eles endógenos (enzimas) ou exógenos (fonte dietética), que reagem com as EROs neutralizando-as. O sistema de defesa antioxidante enzimático inclui superóxido dismutase (SOD), glutationa peroxidase (GPx), catalase (CAT), entre outras. As SOD constituem a primeira linha de defesa antioxidante e o maior sistema de defesa do organismo contra o ânion superóxido por catalisar a dismutação do ânion superóxido ($\bullet O_2^-$) em oxigênio (O_2) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Existem três isoformas de SOD: a Mn-SOD mitocondrial, a Cu/Zn-SOD citoplasmática e a SOD extracelular (TOUYZ; SCHIFFRIN, 2004).

O H_2O_2 formado pela dismutação do $\bullet O_2^-$ é convertido em água (H_2O) e O_2 pela catalase (CAT), uma enzima antioxidante localizada em peroxissomos celulares. Além da CAT, a glutationa peroxidase (GPx) também remove H_2O_2 por acoplar sua redução com a oxidação da glutationa reduzida (GSH). A GPx é uma enzima antioxidante que contém selênio e, além de reduzir efetivamente o H_2O_2, reduz também peróxidos lipídicos a lipídios alcoólicos (Figura 17). Essas enzimas estão presentes no citoplasma em concentrações milimolares e também estão presentes na matriz mitocondrial (EL ASSAR; ANGULO; RODRÍGUEZ-MAÑAS, 2013).

Figura 17- Mecanismo de geração de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio a partir da molécula de oxigênio e atuação de enzimas antioxidantes



Legenda: Redução do oxigênio, na presença de um elétron livre, gerando ânion superóxido ($^{\bullet}O_2^-$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila ($OH^{\bullet}$). Atuação de enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutationa peroxidase (GPx). Além da importância da óxido nítrico sintase (NOS) no processo de formação do peroxinitrito ($ONOO^{\bullet}$).
Fonte: O autor, 2015.

A forma exógena de defesa a um desequilíbrio redox se apresenta por fontes dietéticas, as quais vem sendo objeto de estudo de diversos grupos de pesquisa que, em suma, associam a capacidade antioxidante destes compostos aos seus mecanismos de ação principalmente aquelas que apresentam compostos fenólicos.

Para a compreensão deste mecanismo, pode-se ter a divisão, meramente didática, deste em diretos, em razão da habilidade em doar hidrogênio ou elétrons, e indiretos, uma vez que atuam em enzimas como a NADPH oxidase (CARNEVALE et al., 2012; LOFFREDO et al., 2014; ZUO et al., 2014), em fatores de transcrição, como o fator nuclear *kappa* B (NFkB) e o Nrf2 (DAS; VINAYAK, 2015; ZHOU; LIN; WU, 2011) e em receptores, como o de estrogênio, conforme sugerido pelo autor Silva et al., 2014. Cabe a ressalva de que, quando os compostos fenólicos atuam como agentes redutores, há formação de um radical que apresenta baixa reatividade, devido ao deslocamento do elétron desemparelhado em volta do anel

aromático e à ausência de locais capazes de se ligar ao oxigênio, garantindo assim a estabilização do radical formado a partir do composto fenólico (FRAGA et al., 2010).

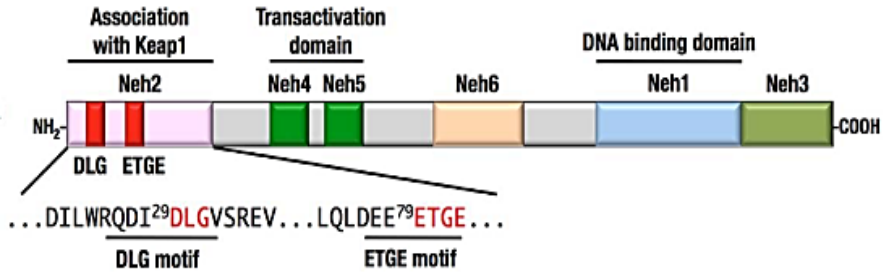
A literatura vem relacionando o desequilíbrio redox a diversos mecanismos fisiopatológicos e à progressão de distintas doenças, incluindo as neurodegenerativas, as cardiovasculares, o diabetes mellitus e a hipercolesterolemia. Com isso, a resposta antioxidante sendo está de origem endógena, conhecida como sistema de defesa enzimático ou de fatores ambientais, como a alimentação, mais especificamente os CBAs, como os compostos fenólicos é de fundamental importância no reestabelecimento da homeostasia do organismo. Inserido neste contexto, o Nrf2 é um fator de regulação positivo para o elemento de resposta antioxidante (ARE), regulando a expressão de enzimas antioxidantes (HYBERTSON et al., 2011).

1.5 **Via do Nrf2**

O Nrf2 consiste em uma proteína que contém 605 aminoácidos, sendo expresso em uma grande variedade de tecidos e de células, pertencente à família de fatores de transcrição do Cap "n" colar (CNC) (MITSUISHI; MOTOHASHI; YAMAMOTO, 2012).

A estrutura molecular de Nrf2 é composta por seis domínios (Neh1 ao Neh 6). Através do primeiro domínio, Neh1, ocorre a interação entre as *small MAFs* (proteínas que participam da fosforilação do Nrf2) e a ligação ao DNA formando, assim, um heterodímero. O Neh2 foi identificado como um regulador negativo de Nrf2 por interagir com Keap1. O Neh3, por sua vez, atua como um coativador promovendo a transcrição do elemento de resposta antioxidante (ARE). Neh4 e Neh5 agem tanto no nível individual, quanto na cooperação para a vinculação com proteína responsiva de ligação ao elemento cAMP (CREB). Por fim, o domínio Neh6 também controla a regulação negativa da Nrf2 (Figura 18) (CARDOZO et al., 2013).

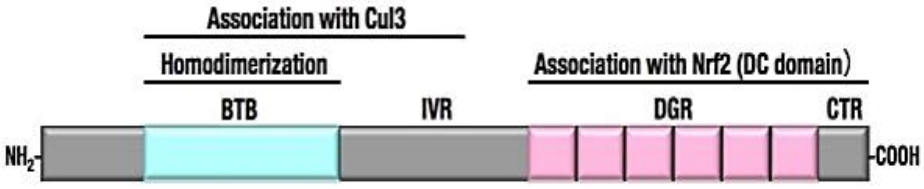
Figura 18- Estrutura molecular do Nrf2



Fonte: MITSUISHI; MOTOHASHI; YAMAMOTO (2012).

O Nrf2, é um fator de transcrição nuclear que se encontra inativo no citoplasma ligado a proteína *Kelch-like ECH-associated protein 1* (Keap1) a qual impede sua translocação para o núcleo. A Keap1 tem três domínios principais: um domínio de dimerização BTB (Broad-Complex, Tramtrack, e Bric à Brac), que contém o resíduo Cys151 agindo como um sensor de estresse, um domínio rico em cisteína IVR (região interveniente), responsável pela repressão da Nrf2, e um domínio constituído por 6 repetições através do qual se liga ao Nrf2. Os resíduos de cisteína (por exemplo, C272, C288), ligados na região entre os domínios BTB e Kelch, também são conhecidos como reguladores de Nrf2, servindo como sensor de estado redox intracelular. Keap1 está associada com a região n-terminal de culina 3 (Cul3) (Figura 19), uma subunidade do complexo de ligase E3, que promove a ubiquitinação de Nrf2 em cooperação com o complexo Cul3-Roc1 (proteína de dedo de anel), apresentando a proteína de substrato para o proteossomo, assim, atua também como uma proteína adaptadora entre Nrf2 e Cul3, e esta ligação promove a degradação contínua de Nrf2 pelo proteossomo em condições basais (KASPAR; NITURE; JAISWAL, 2009; PEDRUZZI et al., 2012; PETRI; KÖRNER; KIAEI, 2012).

Figura 19- Estrutura molecular da Keap 1



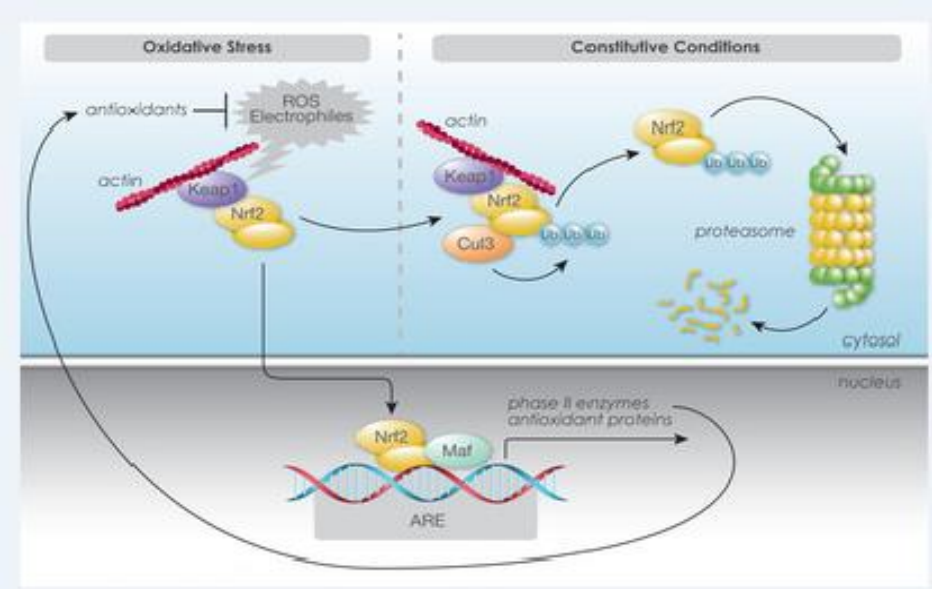
Fonte: MITSUISHI; MOTOHASHI; YAMAMOTO (2012).

Quando as células são expostas a tensão oxidativa ou eletrofílica, os resíduos de cisteína da Keap1 são modificados, e perdem a sua capacidade de ubiquitinizar o Nrf2 não havendo degradação deste fator de transcrição pelo proteossomo (BAI et al., 2013). Assim, o

desacoplamento do Nrf2 de sua proteína repressora é ativado por alterações do estado redox da célula, tais como o aumento das concentrações de EROs, os subprodutos de danos oxidativos, a reduzida capacidade antioxidante e os compostos bioativos que vêm sendo potenciais promotores de sua resposta transcricional no elemento de resposta antioxidante (ARE). O ARE é um componente vital das regiões promotoras dos genes que codificam enzimas detoxificantes e antioxidantes (CARDOZO et al., 2013).

A translocação nuclear do Nrf2 pode ser facilitada por proteínas quinases ativadas por mitógenos (do inglês MAPK), como a proteína ERK ½ (*Extracellular signal–regulated kinases*) e a JNK (*c-Jun N-terminal kinases*) que promovem a fosforilação em resíduos de serina e treonina. Este, então, se acumula no interior da célula e migra para núcleo onde induz a expressão dos seus genes-alvo (Figura 20). O sistema de regulação tem sido referido como sistema Keap1-Nrf2 ou Nrf2-ARE, que desempenha um papel central na proteção de células contra o estresse oxidativo (SURH, 2003).

Figura 20- Mecanismo proposto para ativação da via do Nrf2



Fonte: CAYMAN CHEMICAL, 2012.

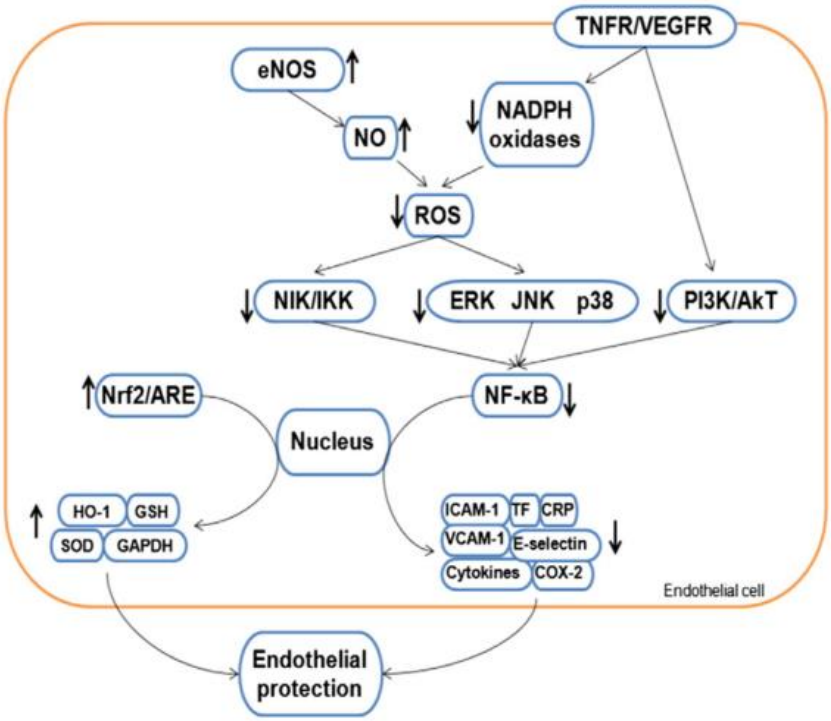
Desta forma, o Nrf2, então, migra ao núcleo celular e ativa os genes que codificam enzimas de fase II, detoxificantes e enzimas antioxidantes, que incluem, superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), heme oxigenase-1 (HO-1), glutationa peroxidase (GPx), e tioredoxina (Trx), dentre outras, as quais desempenham papéis fundamentais na defesa celular, atenuando os efeitos adversos de EROs (PEDRUZZI et al., 2012).

Muitos genes regulados pelo Nrf2/ARE desempenham papéis importantes envolvidos na modulação da via de sinalização redox (PEDRUZZI et al., 2012). Como um exemplo, em

cultura primária de cardiomiócitos humanos, o resveratrol ativou o Nrf2 e inibiu a geração de EROs induzida por lipopolissacarídeo (LPS), sendo uma forma eficaz de proteção celular contra a apoptose condicionada por LPS. O *knockout* do Nrf2 anulou a proteção mediada pelo resveratrol contra a morte celular anteriormente citada, o que sugere um papel essencial deste composto fenólico, junto ao Nrf2 na cardioproteção (HAO et al., 2013).

Diversas estratégias têm sido referidas na literatura como moduladoras da via do Nrf2, os fenólicos, são relacionados às vias de sinalização principalmente após a indução de um quadro de estresse seja no modelo *in vitro*, seja no *in vivo* (CARDOZO et al., 2013). Fuentes e Palomo (2014), em uma revisão sobre o mecanismo protetor dos ácidos hidroxicinâmicos em células endoteliais, concluíram que está subclasse dos ácidos fenólicos protege as células atenuando o estresse oxidativo, melhorando a biodisponibilidade de NO, inibindo a via de sinzalição do NFkB (diminuindo a expressão de E-selectina, ICAM-1 e VCAM-1) e modulando positivamente a via do Nfr2 (aumentando a expressão de enzimas antioxidantes) (Figura 21).

Figura 21- Potenciais sítios de ação dos ácidos hidroxicinâmicos para proteção das células endoteliais



Legenda: PCR = proteína C reativa; COX-2 = cyclooxygenase-2, eNOS = oxido nítrico sintase endotelial, GSH = glutationa; GAPDH = gliceraldeído3-fosfato desidrogenase; HO-1= hemeoxigenase-1, ICAM-1 = molécula de adesão intracelular-1; NO = oxido nítrico; NADPH = nicotinamida adenosina dinucleotídeo fosfato, NF-κB = fator nuclear kappa B; ROS = espécies reativas e oxigênio, SOD = superóxido dismutase, TNFR = receptor de fator de necrose tumoral alfa, TF = fatores teciduais, VEGFR = receptor do fator de crescimento endotelial vascular, VCAM-1 = molécula-1 de adesão da célula vascular.Fonte: FUENTES; PALOMO, 2014.

2 **JUSTIFICATIVA**

O extrato hidroalcoólico do caroço do açaí (ASE) vem demonstrando potencial atividade biológica em diferentes modelos experimentais, como ação antioxidante e vasodilatadora. Sabe-se que o caroço do açaí consiste em média 85% do peso total do fruto e é considerado um resíduo da indústria com grande impacto ambiental. Além disso, o desenvolvimento de subprodutos que viabilizem a utilização desses resíduos é de grande importância. Assim torna-se fundamental investigar os mecanismos de ação molecular desse extrato para compreensão de suas atividades biológicas.

3 **OBJETIVOS**

3.1 **Objetivo geral**

Avaliar o efeito do extrato do caroço do açaí sobre as vias de sinalização envolvidas no processo do estresse oxidativo em células endoteliais humanas.

3.2 **Objetivos específicos**

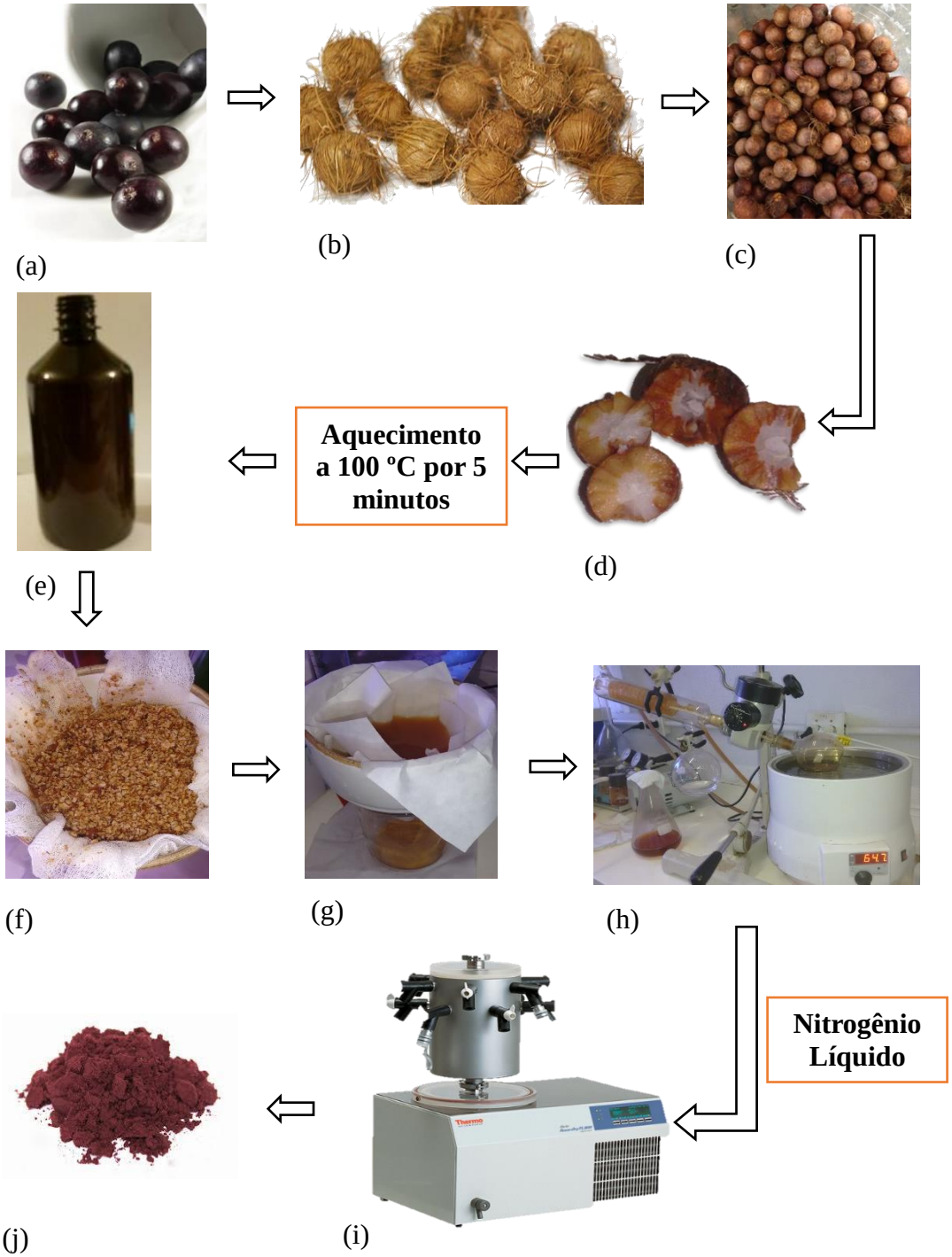
- Determinar o teor e o perfil de compostos fenólicos do extrato hidroalcoólico do caroço do açaí;
- Determinar a capacidade antioxidante do extrato hidroalcoólico do caroço do açaí através de diferentes métodos;
- Avaliar o efeito do extrato hidroalcoólico do caroço do açaí sobre marcadores de dano oxidativo em células endoteliais submetidas ao estresse;
- Avaliar o efeito do extrato hidroalcoólico do caroço do açaí na resposta molecular antioxidante em células endoteliais humanas.

4 **MATERIAIS E MÉTODOS**

4.1 **Obtenção do fruto do açaí e do extrato hidroalcoólico do caroço do açaí (ASE)**

Amostras de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) provenientes da cidade de Belém, (Pará, Brasil) foram fornecidas pela Universidade Federal do Pará. O extrato foi obtido conforme descrito por Rocha et al. (2007). Assim, aproximadamente 200 g do fruto foram pesados, ainda congelados, e despolpados com auxílio de um multiprocessador (Walita Mega Master). A membrana fibrosa dos caroços foi retirada manualmente e, em seguida, os mesmos foram triturados em pistilo e em liquidificador (Figura 22 (a-d)). Foram adicionados aos caroços triturados 400 mL de água destilada e a mistura foi submetida à decocção. Após 5 minutos de fervura, todo o decoto obtido foi resfriado naturalmente e acondicionado em garrafa de vidro âmbar com etanol P.A (400 mL) durante 10 dias, sob refrigeração, e agitação mecânica (Cientec CT-150) diária de 40 minutos em temperatura ambiente. Após este período o extrato hidroalcoólico foi filtrado em gaze e papel de filtro de 22μm, com o auxílio de uma bomba a vácuo (Prismatec 121). O filtrado foi rotaevaporado, sob baixa pressão, a 65ºC (Fisatom 801), congelado em nitrogênio líquido e, posteriormente, liofilizado (Heto PowerDry LL3000, Thermo Scientific) (Figura 22 (e-j)).

Figura 22 - Processo de obtenção do extrato hidroalcoólico do caroço de açaí



Legenda: (a)- Fruto do açaí; (b)- Membrana fibrosa do açaí após despolpamento; (c)- Caroço do açaí sem a membrana fibrosa; (d)- Caroço triturado; (e)- Extração em solução de etanol 50% *v/v* (10 dias); (f)- Filtração com gase ; (g)- Filtração com papel filtro; (h)- Rotaevaporação; (i)- Liofilização; (j)- *Açaí Seed Extract* (ASE)
Fonte: (a)- (b)- Top tropicals (2006); (c- h) - o autor (2015); (i)- labo sistema (2015) ; (j)- o autor (2015).

4.2 **Capacidade antioxidante do ASE**

4.2.1 Preparo da amostra

Após obtenção do extrato hidroalcoólico do caroço do açaí (ASE), foi realizada a caracterização de sua capacidade antioxidante. Para tal, contou-se com a colaboração do Laboratório de Bioquímica Nutricional e de Alimentos, localizado no Instituto de Química na Universidade Federal do Rio de Janeiro.

O extrato foi pesado em balança digital (CP2245, Sartorius) e foi preparada uma solução concentrada, com água Milli-Q, a fim de se atingir a concentração de 1 mg/mL. Desta solução se sucedeu uma diluição de 1:10 (*v*/*v*), sendo esta, então, utilizada para a determinação de compostos fenólicos totais, *Ferric Reducing Ability Power* (FRAP) e *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity* (TEAC). No ensaio de *Oxygen Radical Absorbance Capacity* (ORAC), a diluição utilizada foi de 1:100 (*v*/*v*) da solução concentrada. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

4.2.2 Fenólicos Totais por Folin-Ciocalteu

Os compostos fenólicos totais foram determinados de acordo com o método de Folin-ciocalteu, descrito por Singleton, Orthofer e Lamuela-Raventós (1999). Este método se baseia na transferência de elétrons em meio alcalino de compostos fenólicos para os ácidos fosfotúngsticos/fosfomolibidênicos para a formação de complexos azuis (SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELA-RAVENTÓS, 1999)

Uma alíquota de 200 µL da solução do extrato foi adicionada à 1.400 µL de água Milli-Q, seguidos de 100 µL do reagente de Folin-ciocalteu, sendo a mistura vortexada. Em seguida, adicionou-se 300 µL de bicarbonato de sódio à 20% e a mistura foi incubada, em banho-maria, a 40 ºC durante 30 minutos. Decorrido o tempo de incubação, foram pipetados 300 µL em cada poço de uma placa de 96 poços e a leitura de absorbância feita a 765 nm em leitor de microplacas (Vitor^3), com o auxílio do *software* Walac. Os resultados foram quantificados com base em uma curva padrão de ácido gálico e foram expressos em g de equivalente de ácido gálico (EAG) por 100 g de extrato seco.

4.2.3 *Ferric Reducing Ability Power* (FRAP)

O método *Ferric Reducing Ability Power* (FRAP) baseia-se na habilidade de um composto que ao produzir Fe^{2+} a partir de Fe^{3+} há a determinação de sua capacidade antioxidante. Nele ocorre a redução do complexo Fe^{3+}-TPTZ (ferritripiridiltriazina) a ferroso-tripiridiltriazina (Fe^{2+}-TPTZ) por redutores, no caso, os antioxidantes, em valor baixo de pH (BENZIE; STRAIN, 1996).

Esse ensaio foi realizado de acordo com o proposto por Benzie e Strain, 1996. O reagente de FRAP foi preparado com o tampão de acetato a 300 mM, o TPTZ a 10 mM e o cloreto de ferro a 20 mM, permanecendo, este, em banho-maria, a 37 ºC.

Em uma microplaca de 96 poços foram pipetados 20 µL das soluções padrões, amostras ou branco (água), adicionados 180 µL do reagente de FRAP e a leitura realizada em leitor de microplaca (Vitor^3) utilizando o *software* Wallac, no comprimento de onda de 585 nm. Os resultados foram quantificados com base em uma curva padrão de sulfato ferroso e foram expressos em mM de Fe^{2+} por 100 g de extrato seco.

4.2.4 Trolox *Equivalent Antioxidant Capacity (*TEAC*)*

Para determinação da atividade antioxidante pelo equivalente Trolox (ácido 6-hidroxi-2-5-7-8-tetrametilcromo 2-carboxílico), utilizou-se como referência Re et al. (1999). Em linhas gerais, a solução estoque de ABTS (2,2'-azinobis-3-etil-benzotiazolina-6-sulfonado) foi preparada a partir do persulfato de potássio (2,45mM) e de ABTS (7mM), em água Milli-Q, sendo armazenado, em frasco âmbar e mantido ao abrigo de luz durante 16 h. O método tem por objetivo monitorar o decaimento do cátion-radical $ABTS^{*+}$, produzido pela oxidação do ABTS, o qual é gerado pela adição de uma amostra contendo antioxidantes. Na ausência de fenóis, o radical $ABTS^{*+}$ é estável, mas reage na presença de um doador de átomos de hidrogênio, neste caso, os fenóis, sendo convertido em uma forma não colorimétrica do ABTS (RE et al., 1999).

Foram pipetados 10 µL de amostra, padrão ou branco, e 190 µL de ABTS por poço, em uma placa de 96 poços. A solução de trabalho foi preparada com uma solução estoque de ABTS e água Milli-Q na proporção 1:50 (*v*/*v*) que deve estar com a absorbância entre 0,68 e

0,72. Após a garantia de estabilização da solução de trabalho de ABTS, a leitura foi realizada no comprimento de onda de 720 nm. Os resultados foram quantificados com base em uma curva padrão de trolox e expressos em mM de trolox por 100 g de extrato seco.

4.2.5 Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC)

A análise pelo método ORAC foi realizada de acordo com o proposto por Zulueta, Esteve e Frígola (2009). Uma solução de AAPH (dicloreto de 2,2'-azobis- (2 amidinopropano)) 221 mM foi utilizada como gerador de radicais peroxila ($LOO^{\bullet}$) e uma solução de fluoresceína 78 nM como substrato oxidável, ambas preparadas em tampão fosfato 75mM (pH=7,4). Este mecanismo de oxirredução consiste na base do método, ou seja, a redução da concentração de um substrato oxidável (fluoresceína) no decorrer do tempo, na presença de um composto antioxidante, pela ação do radical $LOO^{\bullet}$, que é produzido pelo AAPH após sofrer decomposição térmica (ZULUETA; ESTEVE; FRÍGOLA, 2009).

Microplacas escuras contendo 96 poços foram utilizadas neste ensaio, sendo pipetados 100 µL da amostra e 100 µL da solução de fluoresceína em cada orifício da placa. Com auxílio da bomba injetora do leitor, Vitor^3, foram dispensados 50 µL de AAPH em cada poço. O leitor foi programado com filtros de fluorescência com comprimento de onda de excitação de 485 nm e de emissão de 535 nm, sendo controlado pelo *software* Wallac e todo ensaio ocorreu à temperatura de 37 ºC.

A leitura da fluorescência foi monitorada a cada minuto até ficar praticamente constante. A partir dos valores obtidos, foi calculada a área sob a curva de fluorescência vezes tempo. A mesma análise foi feita para soluções de Trolox em várias diluições, permitindo a construção de uma curva padrão. Assim, os resultados foram expressos em mmol de trolox por 100 g de extrato seco.

4.3 **Determinação do perfil e do teor dos compostos fenólicos presentes no ASE**

4.3.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A CLAE é uma técnica físico-química de separação de compostos em que a amostra é introduzida no equipamento através de um injetor. Os compostos da amostra são arrastados por uma fase móvel (solventes) e passam por uma fase chamada estacionária (colunas cromatográficas). A técnica permite que os compostos de interesse sejam separados na coluna cromatográfica e cheguem a um detector que mede o sinal fornecido por cada composto, após um tempo de retenção. Este sinal é registrado em um gráfico (cromatograma), em que as informações registradas permitem a identificação de classes e subclasses de compostos fenólicos encontrados na amostra. Para o ASE utilizou-se a solução de 1 mg/mL, sempre preparada no dia do uso e filtrada em um filtro de 0,22 µm (Millex GV).

As análises foram realizadas em um cromatógrafo líquido de alta eficiência da marca Shimadzu equipado com: bomba quaternária (LC-10AD), desgaseificador (DGU-14A), detector com arranjo de diodos (SPD-M10A), um forno mantido a 40 ºC. Os dados foram obtidos pelo *software* LC Solution. A fase estacionária foi composta por uma coluna de fase reversa C18, 100A, 5 µM 2,1 x 150 mm da marca Kromasil (AkzoNobel). O sistema gradiente de eluição composto por três fases: água acidificada com ácido fórmico 0,3% (*v*/*v*) (fase A), metanol (fase B) e acetonitrila (fase C). A análise foi realizada com fluxo de 0,3 mL por minuto, utilizando o gradiente de eluição demonstrado na tabela 1. O volume de injeção foi de 50 µL e a detecção foi realizada entre 190 e 550 nm.

Tabela 1 - Sistema gradiente de eluição utilizado na análise de compostos fenólicos do extrato do caroço do açaí.

Tempo (minutos)	Fase A: Água acidificada (ác. fórmico 0,3%)	Fase B: Metanol	Fase C: Acetonitrila
0.03	91	8	1
10	79	20	1
20	69	30	1
30	67	33	1
40	54	45	1
50	34	65	1
60	24	75	1
65	19	80	1
70	9	90	1
71	91	8	1
80	91	8	1

Fonte: O autor, 2016.

A identificação dos compostos fenólicos foi realizada a partir da comparação dos tempos de retenção obtidos nos cromatogramas das amostras, com os tempos de retenção dos padrões, juntamente com a comparação de seus respectivos espectros. Os resultados foram expressos em mg do composto por 100 g de extrato seco.

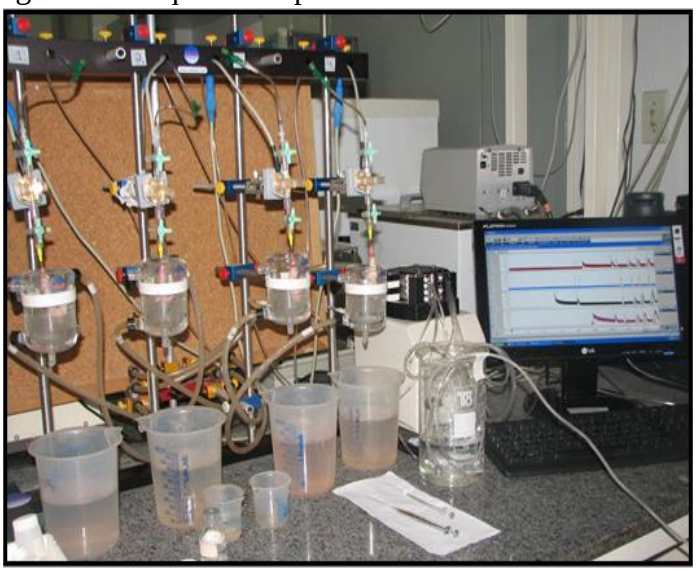
4.4 **Medida da reatividade do leito arterial mesentérico ao ASE**

Após o isolamento do leito arterial mesentérico, a preparação vascular foi colocada em uma cuba (volume de 10 mL) e constantemente perfundida por meio da cânula inserida na artéria mesentérica superior que permaneceu conectada a uma bomba peristáltica (Model MINIPULS 3, Gilson®). A solução de Krebs, mantida à 37°C e aerada com mistura carbogênica (95% O2 e 5% CO2) foi infundida à velocidade constante de 4 mL/min e a pressão de perfusão registrada continuamente em um computador através do programa (PowerLab 4/30) (Figura 23). Os experimentos foram precedidos de um período de trinta minutos de estabilização da preparação, durante o qual a pressão de perfusão basal foi

mantida entre 20 e 40 mmHg (RESENDE; BALLEJO, 1998) e então foram administradas injeções de 120 μM de cloreto de potássio (KCl) de dez em dez minutos até obter uma resposta consistente. Em seguida, se iniciou o período de sensibilização vascular, no qual a noradrenalina (NE) foi adicionada à solução de perfusão, de forma contínua e em concentração suficiente (30 μM) para que a pressão de perfusão se mantivesse estável em torno de 80-100 mmHg.

Sequencialmente foi averiguada a capacidade do endotélio vascular de liberar óxido nítrico (NO), com a injeção de acetilcolina (ACh) 10 pmol, a qual produz um efeito vasodilatador que é dependente da liberação de NO pelas células endoteliais. Foi avaliada também a capacidade dilatadora direta do músculo liso vascular, com a injeção de nitroglicerina (NG) 10 nmol, substância que atua diretamente no músculo liso vascular sendo seu efeito independente do endotélio. Depois deste procedimento, foram feitas injeções em doses crescentes de ASE (1 a 30 μg/mL) para ver o potencial efeito vasodilatador do extrato. As injeções *in bolus* do ASE foram realizadas por meio de um injetor acoplado ao sistema de perfusão, por meio de microseringas Hamilton de 100 μl. O intervalo entre as injeções foi de aproximadamente cinco minutos, para que fosse permitido o retorno e a estabilização da pressão de perfusão aos níveis anteriores. O resultado foi expresso em % de relaxamento, que remete ao potencial vasodilatador do extrato. O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética de Experimentação Animal-IBRAG-UERJ, de acordo com o protocolo CEUA/034/2015.

Figura 23- Esquema de perfusão do leito arterial mesentérico



Fonte: O autor, 2015.

4.5 **Ensaio *in vitro***

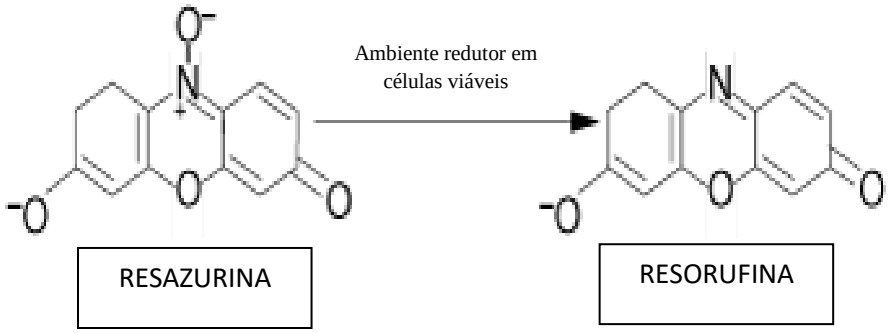
4.5.1 Cultura de células

Para realização do ensaio *in vitro*, foi utilizada a linhagem imortalizada de células endoteliais humanas *Human Umbilical Vein Endotelial Cells* (HUVEC; ATCC® CRL1730™), cultivadas em meio de cultura RPMI 1640 Glutamax® (Gibco, Life Technologies, EUA) suplementado com estreptomicina 100 μg/mL, penicilina 100 UI/mL e 10% de soro fetal bovino inativado (Cultilab, SP, Brasil). As células foram mantidas em atmosfera umidificada com 5% de CO_2 a 37 °C.

4.5.2 Viabilidade celular

O reagente utilizado neste experimento se baseia no mecanismo de oxirredução do seu ingrediente ativo (Resazurina*)* como indicativo de células viáveis. Desta forma, resazurina, é um composto permeável não tóxico de coloração azul e inicialmente não fluorescente. No interior da célula, na cadeia transportadora de elétrons, a resazurina é reduzida a resorufina (Figura 24) ao receber elétrons do NADPH, FADH, FMNH, NADH e citocromos, assim, um composto que é não fluorescente apresenta uma fluorescência relacionada ao número de células metabolicamente ativas (AL-NASIRY et al., 2007; BYTH et al., 2001; XU; MCCANNA; SIVAK, 2015).

Figura 24- Redução do composto resazurina a resorufina



Fonte: Datasheet, 2015.

Por este mecanismo de oxirredução, as formas oxidada e reduzida do reagente são levadas em consideração ao se analisar os dados obtidos na leitura. Além disso, é necessário se fazer o branco da leitura para que o valor obtido do mesmo possa ser descontado na tabulação dos dados.

Com o propósito de se determinar as concentrações de ASE e H_2O_2 a serem utilizadas nos demais experimentos, se realizou o ensaio de viabilidade celular. Para tal foram plaqueadas $1x10^4$ células/poço em placa de 96 poços a um volume inicial de 200 µL em meio RPMI 1640 com vermelho de fenol a 10% de SFB e a 1% de antibiótico (ATB). Após 16 h de incubação (*overnight*), foi realizada a retirada do meio, e realizado tratamentos em diferentes concentrações de ASE 0,1 a 100 µg/mL e de H_2O_2 100 a 1000 µM (30% P.A., ProQuimios) ambas preparadas em meio RPMI com vermelho de fenol, 2% SFB e com 1% de ATB. Decorridos 24 h do tratamento adicionou-se 20 µL/ poço do reagente alamarBlue®, e a placa foi incubada novamente em estufa por um período de 3 h. A densidade ótica de cada poço foi determinada em espectrofotômetro (Plate Chameleon Multilabel Detection Platform, Hidex) nos comprimentos de onda de 570 e 600 nm.

4.5.3 Delineamento experimental

Para os ensaios descritos abaixo, foram desenhados quatro grupos experimentais: o grupo controle, o grupo ASE na concentração ideal, o grupo H_2O_2 na concentração de 100 e 200 µM, ASE+ H_2O_2 (100 e 200 µM) pré-tratamento, o qual as células foram pré-tratadas por 4 h com o extrato e depois foram incubadas por 16 h ou 24 h com o agente indutor do estresse (H_2O_2) e o grupo ASE+ H_2O_2 (100 e 200 µM) tratamento, sendo colocadas, em concomitância, as duas soluções com período de incubação de 16 h ou 24 h.

4.5.4 Migração celular

O ensaio de migração celular de células endoteliais foi realizado de acordo com o modelo estabelecido por Bürk (1973) de cicatrização *in vitro*. As células foram plaqueadas em placas de 12 poços na concentração de 10^5 células/poço e incubadas a 37 °C em atmosfera

úmida de 5% de CO_2 num período *overnight*. Decorrido este período, foi realizado o pré-tratamento das células por um período de 4 h. Após este, foi realizada uma lesão na camada unicelular com o auxílio de uma ponteira e as imagens foram capturadas em microscópio invertido (Nikon Eclipse TS1000). As células foram então, tratadas de acordo com o delineamento experimental do presente estudo (item 4.5.3). Após períodos de incubação variados (6-24 h), imagens foram capturadas em campos microscópicos representativos de cada poço da placa. Posteriormente a área de cicatrização foi quantificada em cada um dos tempos e foi analisada através do programa ImageJ versão 1.49 (EUA), sendo o resultado expresso em percentual de área migrada.

4.5.5 Geração de espécies reativas de oxigênio (EROs)

Nesse ensaio, foi avaliado se o ASE é capaz de minimizar os efeitos deletérios promovidos pelo H_2O_2 no desequilíbrio oxidativo, culminando na diminuição de geração de espécies reativas ao oxigênio (EROs). Para tanto, foi utilizada a sonda 5,6-clorometil-2',7'-diacetato de diclorodihidrofluoresceína (CM-H_2DCFDA, Life Technologies, C6827), a qual apresenta melhor retenção nas células em comparação a outras sondas comumente utilizadas. O composto atravessa por difusão passiva a membrana celular e, no citoplasma da célula, tem seus grupos acetato clivados por enzimas esterases. Seus grupos clorometil reagem com a glutationa intracelular e outras moléculas com grupos tiol. A oxidação subsequente gera um composto fluorescente que é retido no interior da célula, passível de detecção em leitor de fluorescência (EGLON; MCGRATH; BRIEN, 2010).

A sonda utilizada foi ressuspendida com 20 µL de dimetilsulfóxido (DMSO), obtendo-se a concentração de 5 mM, sendo está armazenada a -20 ºC. Para utilização no experimento foi preparada uma solução de trabalho utilizando 4 µL para cada 10 mL de tampão *Hank's Balanced Salt Solution* (HBSS), obtendo-se uma concentração de 2 mM. Todas as soluções deste experimento foram preparadas em HBSS e o ensaio feito em triplicata.

As células foram plaqueadas em placa escura de 96 poços na concentração de $1x10^4$ células/poço e incubadas a 37 °C em atmosfera úmida de 5% de CO_2 por um período *overnight*. Posteriormente, foi feito o pré-tratamento com ASE, durante o período de 4 h. Decorrido este tempo 100 µL da sonda foram pipetadas em cada poço e a placa foi incubada a 37 °C em atmosfera úmida de 5% de CO_2 por 30 minutos. Decorrido este tempo, a sonda foi

retirada por inversão, realizado lavagem com tampão HBSS (100 μL por poço) e adicionado o tratamento de acordo com o delineamento experimental do presente estudo, sendo então a placa encaminhada para o leitor de fluorescência. A emissão de fluorescência foi detectada (*EnVision Multilabel Reader*, PerkinElmer, EUA), em comprimentos de onda de 495nm (excitação) e 530nm (emissão), a cada 10 minutos, durante 2 h.

4.5.6 Carbonilação de proteínas

O método de carbonilação de proteínas é utilizado para dosagem de oxidação de proteínas e se baseia no princípio de que vários radicais livres atacam resíduos de aminoácidos, como, histidina, arginina, lisina e prolina, gerando produtos como o grupo carbonil, o qual pode ser avaliado através da reação com 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPT). O conteúdo de carbonil foi determinado espectrofotometricamente em 380 nm usando um coeficiente 22.0000 molar-1 em nmol/mg de proteínas, como descrito por Levine et al., 1990.

Foram utilizados 100 μL de lisado celular em duplicata. Feito isto, foram realizadas lavagens com solução de ácido clorídrico (HCl) fumegante-acetona, ácido tricloroacético (TCA) 10%. Em cada lavagem, as amostras foram centrifugadas por 3 minutos a 2.000 rpm, sendo o sobrenadante descartado. Uma parte das amostras foi incubada com DNPT e outra parte incubada com HCl 2 M por 1 h. Em seguida, foram adicionados 500 μL de TCA 30%, sendo acondicionadas em freezer por 10 minutos e, então, centrifugadas novamente, sendo o sobrenadante descartado. Ainda foram feitas lavagens com TCA 20% e etanol-acetato de etila (1:1), sempre seguidas de centrifugação. Todas as amostras foram incubadas com guanidina 6 M a 60 ºC por 30 minutos. As amostras foram centrifugadas e a leitura da absorbância do sobrenadante foi realizada em espectrofotômetro (380nm; Ultrospec 2100 Pro Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK). As proteínas totais das amostras estudadas foram quantificadas através do kit da BioRad[110] em placa de 96 poços, utilizando uma curva padrão de albumina bovina (SIGMA®), conforme instruções do fabricante.

4.5.7 Atividade antioxidante enzimática

4.5.7.1 Atividade da catalase

A catalase é uma hemoproteína que catalisa a degradação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), formando oxigênio molecular e água. A atividade enzimática foi avaliada pelo consumo de peróxido hidrogênio feito pela a enzima obtida do lisado das células, por espectrofotometria no comprimento de onda de 240 nanômetros (Ultrospec 2100 Pro - Amersham Biosciences, Buckinghamshire, Uk). Foram utilizados 60 µl de amostra de cada grupo experimental em cubetas de quartzo separadas. As amostras foram incubadas com 2 mL de tampão fosfato (PBS) e H_2O_2 (0,16%). A concentração de H_2O_2 foi avaliada durante 60 segundos (GREENE et al., 1999).

4.5.7.2 Atividade da glutationa peroxidase (GPx)

A GPx é uma enzima selênio-dependente que catalisa a redução do H_2O_2 e hidroperoxidos orgânicos (ROOH) para H_2O e álcool, usando a glutationa (GSH) como doadora de elétrons (BURGOYNE et al., 2013). Está localizada tanto no citosol quanto na matriz mitocondrial. A atividade da GPx foi medida em função da taxa de decaimento da NADPH, por espectrofotometria no comprimento de onda de 340 nanômetros (FLOHÉ; GÜNZLER, 1984)

Foram utilizados 60 µl de grupo experimental em cubetas separadas. Em cada cubeta, foi adicionado 1590 µl de tampão fosfato (PBS), glutationa reduzida (GSH; 2 mM), glutationa redutase (GR; 0,11 mg/mL), azida sódica (0,065 mg/mL). Cada cubeta foi incubada por 10 minutos e em seguida, foram adicionados 200 µl de NADPH (10 nM) e novamente cada cubeta foi incubada por 3 minutos. Posterior a este tempo foram pipetados 200 µl de peróxido de hidrogênio H_2O_2 e cada cubeta lida por 5 minutos a 340nm (Ultrospec 2100 Pro - Amersham Biosciences, Buckinghamshire, Uk).

4.5.8 Western blot

Pela técnica de Western blot, foram avaliadas: o fator de transcrição Nrf2, sua proteína repressora (Keap 1) e proteínas quinases que podem estar envolvidas na ativação do Nrf2 (p-ERK ½ e p-JNK). Para tal, 10^7 células foram plaqueadas em placas de petri de 60 mm, e após atingirem confluência de 80-90%, as células foram tratadas sob diferentes condições experimentais. Após o período de tratamento, as placas foram lavadas com PBS gelado e lisadas com 100 µL de tampão RIPA (Tris 50 mM, EDTA 5 mM, NaCl 150 mM, Triton 1%, SDS 0,1%, NaF 50 mM, pirofosfato de sódio (30 mM) e água milli-Q) e 10 µL coquetel de inibidores de proteases (Sigma – Aldrich, Germany). O lisado foi recolhido em tubos eppendorf de 1.5mL e centrifugado (140000xg, 5 min, 4 °C). Utilizando o sobrenadante, a concentração de proteínas foi determinada através do kit BCA (Bio-Rad), conforme especificações do fabricante. Em seguida, o volume correspondente a 50 µg de proteína total foi adicionado ao tampão de amostra 4 vezes e aquecida a 95 ºC por 5 minutos.

As amostras foram aplicadas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 10%) e submetidas ao campo elétrico – 60 minutos a 150 V e amperagem igual a 50 mA. Após a corrida eletroforética, as proteínas do gel foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose utilizando um sistema de transferência semi-seco (Bio-Rad, Germany) – 60 minutos com voltagem igual a 20 V e amperagem equivalente a 328 mA. Sítios de ligação inespecíficos da membrana foram bloqueados com solução BSA 5% em TBS por 2h à temperatura ambiente. Os respectivos anticorpos das proteínas de interesse foram adicionados e incubados *overnight* a 4 °C sob agitação suave. Após este período, as membranas foram lavadas 3 vezes TBS-T por 10 minutos. Decorrido as lavagens, o anticorpo secundário não conjugado foi incubado por 40 minutos, e sequencialmente as membranas foram lavadas 3 vezes com TBS-T, incubadas com estreptavidina por 40 minutos e novamente lavadas 3 vezes com TBS-T, seguida de detecção realizada pelo método de quimiluminescência utilizando-se o kit Clarity Western ECL (Bio-Rad) conforme especificações sugeridas pelo fabricante. As membranas, então, foram observadas no equipamento ChemiDocTM XRS (Bio-Rad) com recurso ao *software* Imagelab V4.0 build 16 (Bio-Rad).

4.6 **Análise estatística**

Os resultados foram apresentados na forma de média ± desvio padrão. Para análise estatística dos resultados, foi utilizado one-way ANOVA com pós-teste de Tukey, com nível de significância de 5% ($p<0,05$) com o auxílio do *software* GraphPad Prisma versão 6.

5 **RESULTADOS**

5.1 **Atividade antioxidante do ASE**

As metodologias para a determinação da atividade antioxidante são diversas, haja vista que nenhum ensaio isolado consegue predizer com exatidão a atividade antioxidante de uma amostra. Por esta razão, e ainda, levando-se em consideração as limitações e a aplicabilidade de cada tipo de ensaio, preconiza-se a utilização de duas ou mais técnicas (SÁNCHEZ-MORENO; LARRAURI; SAURA-CALIXTO, 1998). A Tabela 2 apresenta os resultados de atividade antioxidante do ASE realizados pelas técnicas de Folin-Ciocalteu, FRAP, ORAC e TEAC. No ensaio de fenólicos totais, foram encontrados 62,1 g de equivalentes de ácido gálico (GAE) em 100g de extrato seco. Já no ensaio que se baseia no potencial redutor do ferro encontrou-se 637,4 mmol Fe^{2+} a cada 100g de extrato seco. No ensaio de ORAC, observou-se que a atividade antioxidante do ASE foi de 265,6 mmol Trolox em 100g de extrato seco. No ensaio de equivalência ao Trolox (TEAC), se obteve a concentração de 6.423,5 mmol de Trolox/100g de extrato seco.

Tabela 2- Atividade antioxidante *in vitro* do extrato hidroalcoólico do caroço do açaí (ASE)[1]

ASE	**Folin-Ciocalteu** (g GAE[2]/ 100g)	**FRAP** (mmol Fe^{2+}/ 100g)	**ORAC** (mmol Trolox/ 100g)	**TEAC** (mmol Trolox/ 100g)
ASE (média±DP)	62,1 ± 0,8	637, 4 ± 52,2	265,6 ± 33,2	6.423,5 ± 131,3

Legenda: [1] Resultados expressos em 100g de extrato seco; [2] Equivalentes de ácido gálico. Dados expressos como média ± desvio (n=3).

5.2 **Teor e perfil dos compostos fenólicos do ASE**

O teor e o perfil dos compostos fenólicos presentes no ASE estão expressos na Tabela 3. A técnica empregada para esta determinação permitiu a identificação e a quantificação de sete compostos fenólicos, sendo eles: o ácido siríngico (4,0 mg do composto/100 g de extrato seco), o ácido 2-hidroxicinâmico (9,9 mg do composto /100 g de extrato seco), o ácido gálico

(19,0 mg do composto /100 g de extrato seco), o ácido 3,4-dihidroxibenzóico (22,6 mg do composto /100 g de extrato seco), o ácido benzóico (26,7 mg do composto /100 g de extrato seco), o ácido 3,4-dihidroxifenilacético (65,7 mg do composto /100 g de extrato seco) e o ácido 4-hidroxifenilacético (93,7 mg do composto /100 g de extrato seco), totalizando 241,6 mg/100 g de extrato seco.

Tabela 3- Teor de compostos fenólicos (mg/100 g de extrato seco) do extrato hidroalcoólico do caroço do açaí (ASE)

Composto	**Teor[1]**
Ácido siríngico	4,0
Ácido 2-hidroxicinâmico	9,9
Ácido gálico	19,0
Ácido 3,4-dihidroxibenzóico	22,6
Ácido benzóico	26,7
Ácido 3,4-dihidroxifenilacético	65,7
Ácido 4-hidroxifenilacético	93,7
Total de compostos fenólicos	241,6

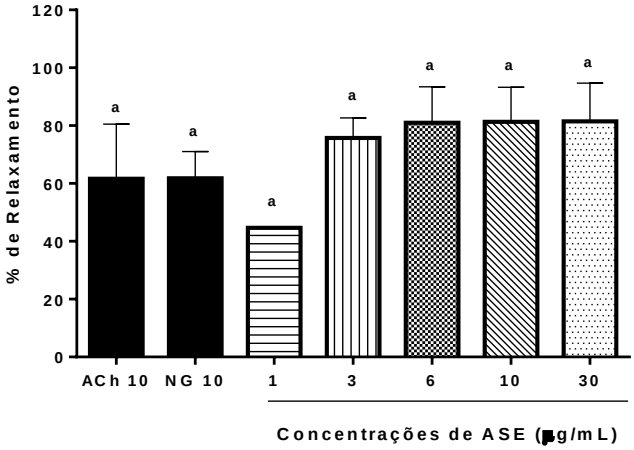
Legenda: [1] Resultados expressos em mg do composto fenólico por 100g de extrato seco.

5.3. **Efeito vasodilatador do ASE**

A fim de se investigar o efeito vasodilatador do ASE foi realizado o ensaio de reatividade vascular. Primeiramente observou-se que o endotélio estava responsivo à acetilcolina, demonstrando um efeito vasodilatador dependente do endotélio. Em seguida foi observada a capacidade dilatadora direta do músculo liso vascular através da exposição à nitroglicerina. Estas duas substâncias apresentaram um % de relaxamento do leito arterial mesentérico em torno de 60 %. O próximo passo foi avaliar o efeito vasodilatador através do estímulo com ASE. Foram testadas distintas concentrações de ASE e observou-se que a concentração de 1 µg/mL foi capaz de promover a vasodilatação em aproximadamente 40%, e

as concentrações de 3, 6, 10 e 30 µg/mL foram capazes de promover a vasodilatação em aproximadamente 80% (Figura 25).

Figura 25 - Efeito do extrato hidroalcoólico do caroço do açaí na reatividade vascular



Legenda: Efeito do ASE na reatividade vascular. ACh 10= acetilcolina na concentração de 10 picomol; NG 10= nitroglicerina na concentração de 10 nanomol; 1 a 30= concentrações em microgramas por mililitro de ASE. Os dados expressam média ± desvio padrão de 1 experimento independente (n=3) e foram submetidos a ANOVA com pós-teste de Tukey. Letras iguais denotam semelhança estatística, $p>0,05$.

5.4 **Ensaios *in vitro***

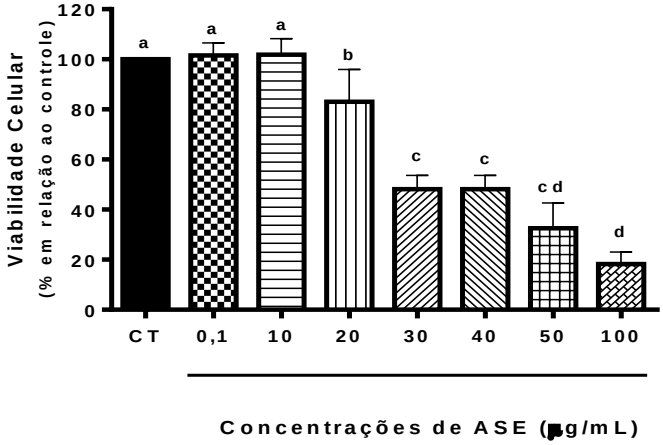
5.4.1 Viabilidade celular

5.4.1.1 Efeito do ASE e do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em células endoteliais

O efeito das diferentes concentrações do ASE sobre a viabilidade de células endoteliais está representado na Figura 26. As células endoteliais foram tratadas por 24 h com diferentes concentrações de ASE que foram de 0,1 a 100 µg/mL. Foi observado que, a partir da concentração de 20 µg/mL do extrato, houve redução de aproximadamente 20% da viabilidade celular, chegando essa redução a 74% na concentração de 100 µg/mL em relação ao controle, e aos demais grupos ($p<0,05$). Tendo em vista que concentrações inferiores a 20

µg/mL não alteraram a viabilidade celular em comparação ao controle, optou-se por utilizar a concentração de 10 µg/mL para a realização dos demais experimentos.

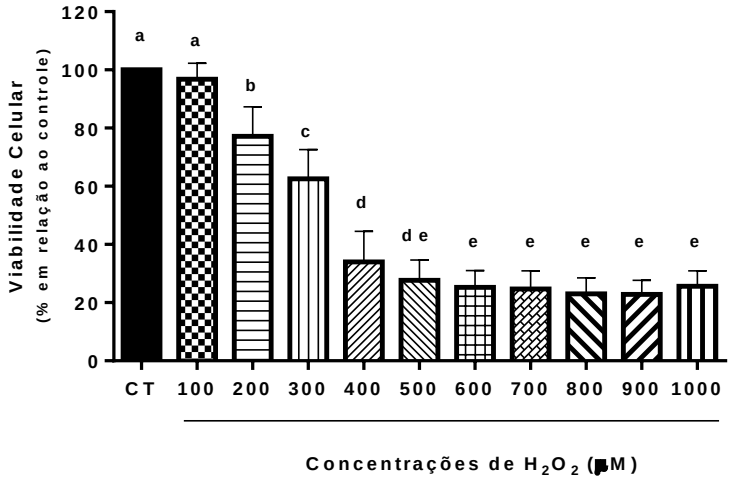
Figura 26 - Efeito do extrato hidroalcoólico do caroço do açaí na viabilidade celular



Legenda: Efeito do ASE na viabilidade celular. CT= grupo controle incubado somente com meio, 2% de SFB e 1% de ATB; 0,1 a 100 = concentrações em microgramas por mililitro de ASE por 24 h. Os dados expressam média ± desvio padrão de 3 experimentos independentes (n=8) e foram submetidos a ANOVA com pós-teste de Tukey. Letras distintas representam diferença estatística, $p<0,05$.

A fim de se avaliar o efeito do H_2O_2 no modelo em questão, as células foram incubadas com concentrações de 100 a 1000 µM de H_2O_2 por um período de 24 h. Conforme exposto na Figura 27, a concentração de 200 µM reduziu a viabilidade celular em 26%, chegando essa redução a 74% com a concentração de 1000 µM em relação ao controle ($p<0,05$). Observa-se, ainda, que a concentração de 100 µM manteve a viabilidade das células endoteliais quando comparadas ao grupo controle ($p>0,05$).

Figura 27- Efeito do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) na viabilidade celular

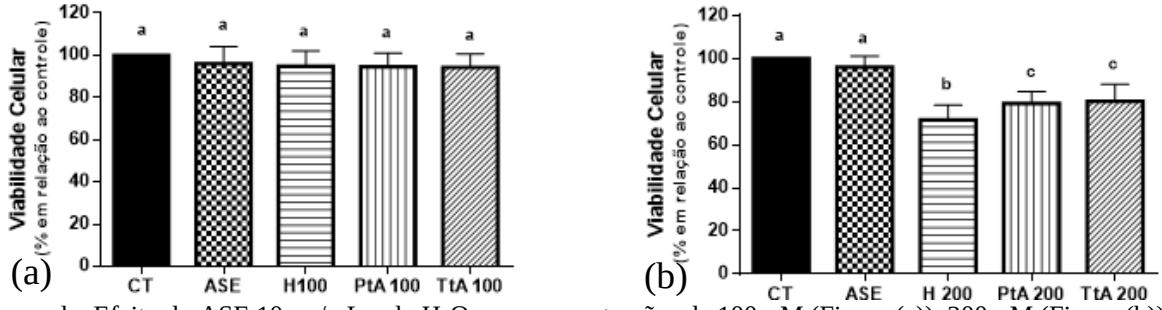


Legenda: Efeito do H_2O_2 na viabilidade celular. CT= grupo controle incubado somente com meio, 2% de SFB e 1% de ATB; 100 a 1000 = concentrações em micromolar de H_2O_2 por 24 h. Os dados expressam média ± desvio padrão de 3 experimentos independentes (n=8) e foram submetidos a ANOVA com pós-teste de Tukey. Letras distintas representam diferença estatística, p<0,05.

As concentrações de H_2O_2 escolhidas para os demais ensaios foram de 100 e 200 µM para que se pudesse avaliar o efeito do ASE em concentrações que acarretassem ou não na diminuição da atividade metabólica das células endoteliais.

Uma vez determinada a concentração do ASE que não altera a atividade metabólica da célula, e as concentrações de H_2O_2, realizou-se um novo ensaio para avaliar o efeito do pré-tratamento com ASE durante 4 h, seguido do acréscimo de uma solução de peróxido e posterior incubação das células por 24 h. Além disso, foi realizado o tratamento das células com o ASE e o peróxido em concomitância, igualmente incubadas por 24 h. Os resultados desta avaliação estão representados na Figura 28.

Figura 28- Efeito do ASE e do H_2O_2 na viabilidade celular



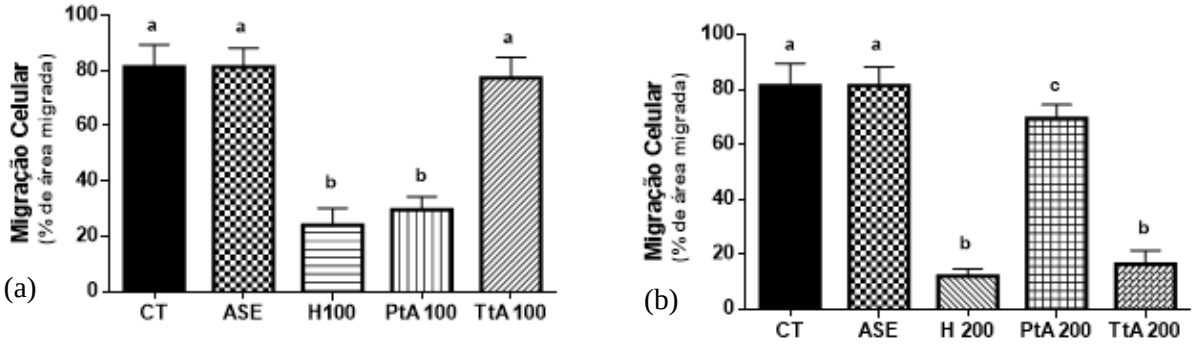
Legenda: Efeito do ASE 10 µg/mL e do H_2O_2 nas concentrações de 100 µM (Figura (a)), 200 µM (Figura (b)) na viabilidade celular. CT= grupo controle incubado somente com meio, 2% de SFB e 1% de ATB; ASE= grupo com extrato do açaí a 10 µg/mL; H 100= grupo com H_2O_2 de 100 µM; PtA 100 = pré-tratamento com o ASE durante 4 h seguidos de incubação com H_2O_2 à 100 µM por 24 h; TtA 100= tratamento com o ASE e H_2O_2 de 100 µM por 24 h; H 200= grupo com H_2O_2 de 100 µM; PtA 200 = pré-tratamento com o ASE durante 4 h seguidos de incubação com H_2O_2 à 200 µM por 24 h; TtA 200= tratamento com o ASE e H_2O_2 de 200 µM por 24 h. Os dados expressam média ± desvio padrão de 3 experimentos independentes (n=8), submetidos a ANOVA com pós-teste de Tukey. Letras distintas representam diferença estatística, $p<0,05$.

Conforme representado na Figura 28 o ASE na concentração de 10 µg/mL manteve a atividade metabólica da célula igual ao controle. Na Figura 28 (a), nota-se que o peróxido na concentração de 100 µM, o pré-tratamento e o tratamento com ASE não reduziram a atividade metabólica das células ($p>0,05$). Já no grupo 200 µM de H_2O_2 (Figura 28 (b)) houve redução de aproximadamente 26% da viabilidade quando comparado ao controle e ao grupo que foi incubado somente com o ASE ($p<0,05$). Os dois tipos de tratamentos empregados com o ASE foram capazes de aumentar a atividade metabólica da célula quando comparadas ao grupo tratado somente com o peróxido de hidrogênio 200 µM ($p<0,05$).

5.4.2 Efeito do ASE e do H_2O_2 na migração celular

A Figura 29 representa o resultado referente ao ensaio de migração celular. As células incubadas com ASE na concentração de 10 µg/mL não apresentaram diferença estatística quando comparado ao grupo controle ($p>0,05$). Na Figura 29 (a), o grupo H_2O_2 100 µM e o grupo pré-tratado com o ASE apresentaram menor percentual migratório de células quando comparados ao controle e ao ASE ($p>0,05$). As células tratadas com ASE se equipararam ao percentual de migração do grupo controle e do ASE ($p<0,05$). A incubação com H_2O_2 200 µM diminuiu a capacidade de migração celular quando comparado ao controle, ao ASE e ao pré-tratamento com ASE ($p<0,05$), sendo o tratamento incapaz de prevenir o dano causado pelo H_2O_2 200 µM (Figura 29 (b)).

Figura 29- Efeito do ASE e do H_2O_2 na migração celular

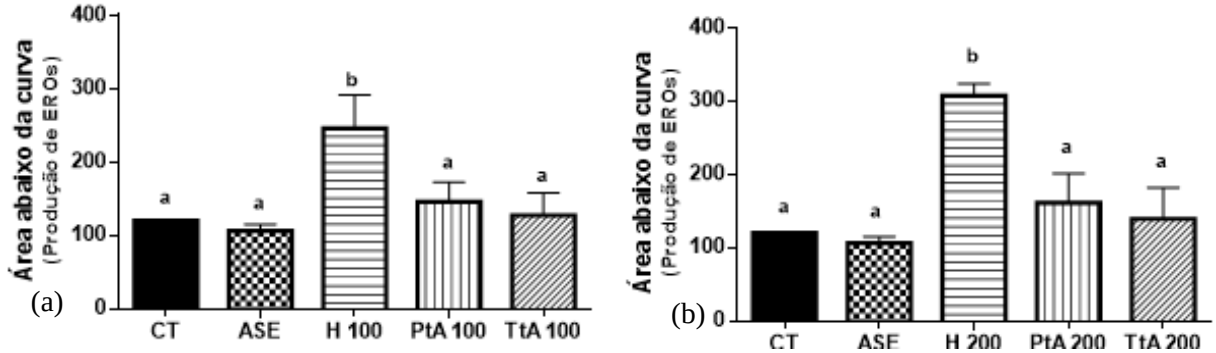


Legenda: Efeito do ASE 10 µg/mL e do H_2O_2 nas concentrações de 100 µM (Figura (a)), 200 µM (Figura (b)) na migração celular. CT= grupo controle incubado somente com meio, 2% de SFB e 1% de ATB; ASE= grupo com extrato do açaí a 10 µg/mL; H 100= grupo com H_2O_2 de 100 µM; PtA 100 = pré-tratamento com o ASE durante 4 h seguidos de incubação com H_2O_2 à 100 µM; TtA 100= tratamento com o ASE e H_2O_2 de 100 µM; H 200= grupo com H_2O_2 de 100 µM; PtA 200 = pré-tratamento com o ASE durante 4 h seguidos de incubação com H_2O_2 à 200 µM; TtA 200= tratamento com o ASE e H_2O_2 de 200 µM. Os dados expressam média ± desvio padrão de 2 experimento independente (n=3), submetidos a ANOVA com pós-teste de Tukey. Letras distintas representam diferença estatística, $p<0,05$.

5.4.3 Efeito do ASE e do H_2O_2 na geração de espécies reativas de oxigênio (EROs)

Conforme demonstrado, na Figura 30 (a) e (b), o ASE na concentração de 10 µg/mL não promoveu maior geração de EROs se equiparando estatisticamente ao controle ($p>0,05$). Já as concentrações de 100 µM (Figura 30 (a)) e de 200 µM (Figura 30 (b)) de peróxido de hidrogênio acarretaram na maior produção destas espécies ($p<0,05$). Os grupos experimentais que receberam o pré-tratamento ou o tratamento com ASE em ambas as concentrações de H_2O_2 foram capazes de reverter o aumento na produção de espécies reativas induzido por peróxido de hidrogênio ao nível do grupo controle ($p<0,05$), conferindo assim um efeito protetor em situações quando há o aumento destas espécies.

Figura 30 - Efeito do ASE e do H_2O_2 na geração de EROs

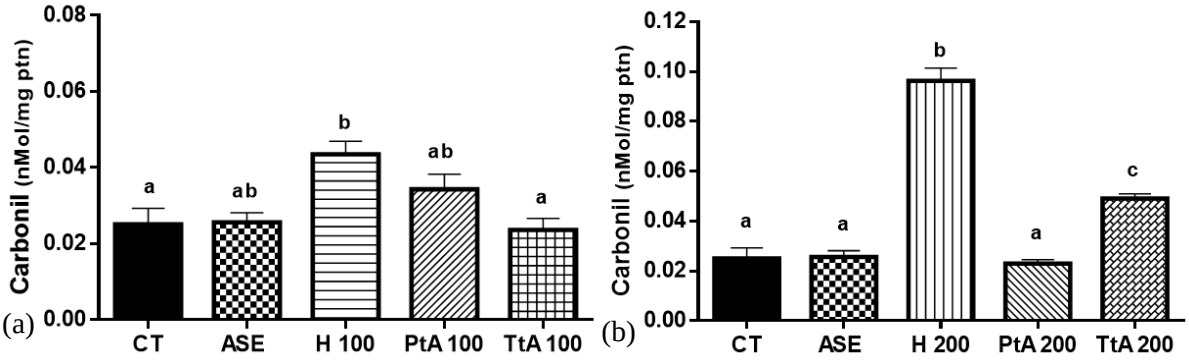


Legenda: Efeito do ASE 10 µg/mL e do H_2O_2 nas concentrações de 100 µM (Figura (a)), 200 µM (Figura (b)) na geração de EROs. CT= grupo controle incubado somente com meio, 2% de SFB e 1% de ATB; ASE= grupo com extrato do açaí a 10 µg/mL; H 100= grupo com H_2O_2 de 100 µM; PtA 100 = pré-tratamento com o ASE durante 4 h seguidos de incubação com H_2O_2 à 100 µM; TtA 100= tratamento com o ASE e H_2O_2 de 100 µM; H 200= grupo com H_2O_2 de 100 µM; PtA 200 = pré-tratamento com o ASE durante 4 h seguidos de incubação com H_2O_2 à 200 µM; TtA 200= tratamento com o ASE e H_2O_2 de 200 µM. Os dados expressam média ± desvio padrão de 4 experimentos independentes (n=8), submetidos a ANOVA com pós-teste de Tukey. Letras distintas representam diferença estatística, $p<0,05$.

5.4.4 Efeito do ASE e do H_2O_2 na carbonilação de proteínas

Conforme ilustrado pelas Figuras 31 (a) e (b) o ASE se equiparou estatisticamente ao controle na carbonilação de proteína ($p>0,05$) e que ambas as concentrações de peróxido de hidrogênio foram capazes de aumentar a geração deste marcador de dano oxidativo ($p<0,05$). Na Figura 31 (a) observa-se que somente o tratamento com ASE foi capaz de promover a diminuição dos grupamentos carbonil sendo equivalente ao grupo controle e ao ASE ($p>0,05$). Já na Figura 31 (b) tanto o pré-tratamento quanto o tratamento foram capazes de promover uma diminuição significativa ($p<0,05$) deste marcador de dano oxidativo, sendo que somente o grupo pré-tratado com o ASE se equiparou ao grupo controle e ao ASE ($p>0,05$). Sugere-se então que o ASE diminui a carbonilação de proteínas, diminuindo assim um dos marcadores de dano oxidativo, na presença do H_2O_2 em condições de pré-tratamento e tratamento.

Figura 31 - Efeito do ASE e do H_2O_2 na carbonilação de proteínas



Legenda: Efeito do ASE 10 µg/mL e do H_2O_2 nas concentrações de 100 µM (Figura (a)), 200 µM (Figura (b)) na carbonilação de proteínas. CT= grupo controle incubado somente com meio, 2% de SFB e 1% de ATB; ASE= grupo com extrato do açaí a 10 µg/mL; H 100= grupo com H_2O_2 de 100 µM; PtA 100 = pré-tratamento com o ASE durante 4 h seguidos de incubação com H_2O_2 à 100 µM por 16 h; TtA 100= tratamento com o ASE e H_2O_2 de 100 µM por 16 h; H 200= grupo com H_2O_2 de 100 µM; PtA 200 = pré-tratamento com o ASE durante 4 h seguidos de incubação com H_2O_2 à 200 µM por 16 h; TtA 200= tratamento com o ASE e H_2O_2 de 200 µM por 16 h. Os dados expressam média ± desvio padrão de 3 experimentos independentes (n=2), submetidos a ANOVA com pós-teste de Tukey. Letras distintas representam diferença estatística, p<0,05.

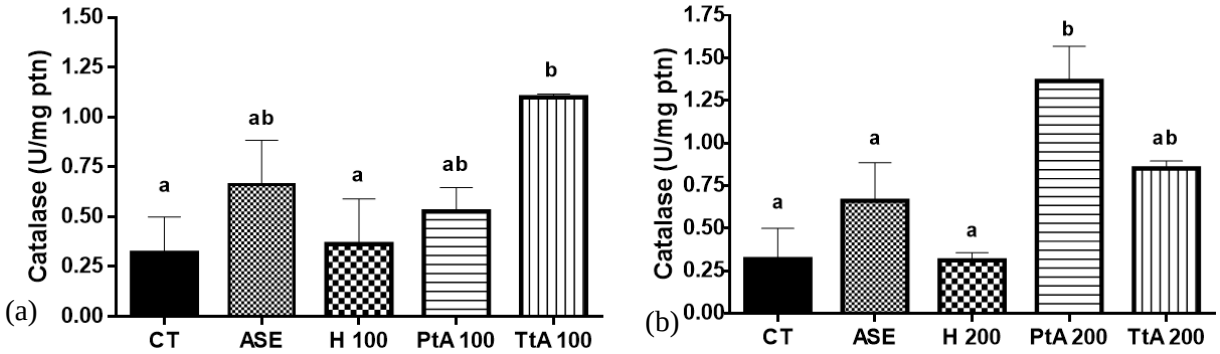
5.4.5. Efeito do ASE e do H_2O_2 na atividade enzimática antioxidante

5.4.5.1. Catalase

Na Figura 32, estão representados os resultados referentes ao ensaio de atividade enzimática da catalase. As células incubadas com ASE na concentração de 10 µg/mL durante 24 h não apresentaram diferença estatística quando comparado ao grupo controle. Na Figura 32 (a), o grupo H_2O_2 100 µM se equiparou ao grupo controle e ao grupo ASE (p>0,05). Esta diferença também não foi observada nas células que foram pré-tratadas com o ASE, se mantendo, assim, a igualdade entre os grupos pré-tratamento, H_2O_2 100 µM, ASE e controle do ponto de vista estatístico. O grupo tratamento, contudo, teve um aumento estatisticamente significativo (p<0,05) da atividade da catalase quando comparado ao controle e ao grupo peróxido 100 µM. A incubação com H_2O_2 200 µM não acarretou na diminuição da atividade da catalase quando comparado ao controle (p>0,05). O grupo pré-tratamento aumentou significativamente (p<0,05) a atividade desta enzima em relação ao controle e ao grupo H_2O_2 200 µM, mas sem diferença com o grupo tratamento com ASE. Este último grupo não apresentou diferença estatística em relação a nenhum outro grupo (Figura 32 (b)). Sugere-se

então que o ASE aumenta a atividade desta enzima na presença do H_2O_2 nas condições de pré-tratamento e tratamento.

Figura 32- Efeito do ASE e do H_2O_2 na atividade da enzima catalase

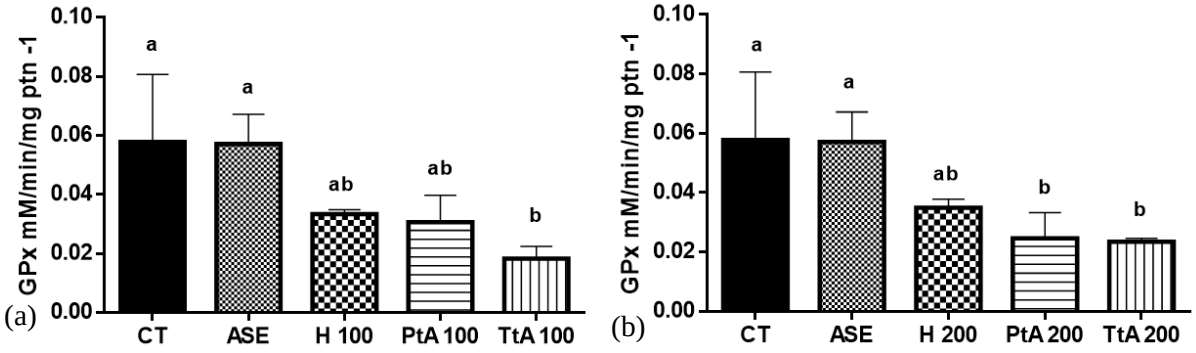


Legenda: Efeito do ASE 10 µg/mL e do H_2O_2 nas concentrações de 100 µM (Figura (a)), 200 µM (Figura (b)) na atividade enzimática da catalase. CT= grupo controle incubado somente com meio, 2% de SFB e 1% de ATB; ASE= grupo com extrato do açaí a 10 µg/mL; H 100= grupo com H_2O_2 de 100 µM; PtA 100 = pré-tratamento com o ASE durante 4 h seguidos de incubação com H_2O_2 à 100 µM por 24 h; TtA 100= tratamento com o ASE e H_2O_2 de 100 µM por 24 h; H 200= grupo com H_2O_2 de 100 µM; PtA 200 = pré-tratamento com o ASE durante 4 h seguidos de incubação com H_2O_2 à 200 µM por 24 h; TtA 200= tratamento com o ASE e H_2O_2 de 200 µM por 24 h. Os dados expressam média ± desvio padrão de 3 experimentos independentes (n=3), submetidos a ANOVA com pós-teste de Tukey. Letras distintas representam diferença estatística, p<0,05.

5.4.5.2 Glutationa peroxidase

A Figura 33 (a) evidencia que somente o grupo tratamento obteve diferença estatística em relação ao grupo controle e ao grupo ASE apresentando menor atividade da enzima glutationa peroxidase (p<0,05). Os demais grupos experimentais apresentaram semelhança estatística. Houve também diminuição da atividade enzimática nos grupos pré-tratamento e tratamento que receberam a concentração de H_2O_2 de 200 µM em relação ao grupo controle a o ASE (p>0,05) (Figura 33 (b)). Assim, sugere-se que o ASE não modula positivamente a atividade da enzima em questão.

Figura 33- Efeito do ASE e do H_2O_2 na atividade da enzima glutationa peroxidase

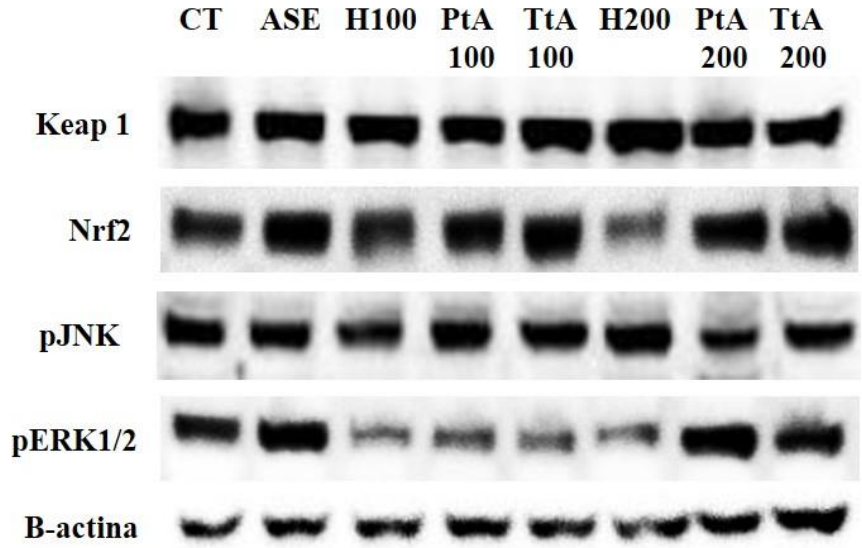


Legenda: Efeito do ASE 10 µg/mL e do H_2O_2 nas concentrações de 100 µM (Figura (a)), 200 µM (Figura (b)) na atividade enzimática da glutationa peroxidase. CT= grupo controle incubado somente com meio, 2% de SFB e 1% de ATB; ASE= grupo com extrato do açaí a 10 µg/mL; H 100= grupo com H_2O_2 de 100 µM; PtA 100 = pré-tratamento com o ASE durante 4 h seguidos de incubação com H_2O_2 à 100 µM por 24 h; TtA 100= tratamento com o ASE e H_2O_2 de 100 µM por 24 h; H 200= grupo com H_2O_2 de 100 µM; PtA 200 = pré-tratamento com o ASE durante 4 h seguidos de incubação com H_2O_2 à 200 µM por 24 h; TtA 200= tratamento com o ASE e H_2O_2 de 200 µM por 24 h. Os dados expressam média ± desvio padrão de 3 experimentos independentes (n=3), submetidos a ANOVA com pós-teste de Tukey. Letras distintas representam diferença estatística, $p<0,05$.

5.4.6 Efeito do ASE e do H_2O_2 na expressão de proteínas envolvidas na via de sinalização do Nrf2

A Figura 34 representa os resultados referentes ao ensaio de western blot, pelo qual avaliou-se a expressão proteica de Keap1, Nrf2, p-ERK ½ e p- JNK. A partir da observação qualitativa dos resultados, nota-se uma tendência à maior expressão de Keap 1 no grupo H_2O_2 200 µM, podendo não haver diferença nos demais grupos experimentais. Em contrapartida, o Nrf2 parece ser mais expresso no grupo que foi tratado somente com o ASE. Adicionalmente este fator de transcrição poder estar menos expresso na presença das duas concentrações de peróxido utilizadas, com um possível aumento na expressão nos tratamentos empregados com o ASE. Além disso, proteínas que participam da via de ativação do Nrf2, como a JNK fosforilada (pJNK) tendem a estar menos expressa no grupo H_2O_2 100 µM e no grupo pré-tratamento com ASE incubado com 200 µM de H_2O_2. Já a proteína fosforilada ERK ½ (pERK ½) parece estar mais expressa no grupo tratado só com ASE e menos expressa nos grupos H100, PtA 100, TtA 100 e H200, tendo maior expressão nos grupos tratados com ASE na presença do H_2O_2 200 µM.

Figura 34- Efeito do ASE e do H_2O_2 na expressão de proteínas envolvidas na via de sinalização do Nrf2.



Legenda: Efeito do ASE 10 µg/mL e do H_2O_2 nas concentrações de 100 µM, 200 µM na expressão de Keap 1, Nrf2, p-ERK1/2, p-JNK e β-actina. CT= grupo controle incubado somente com meio, 2% de SFB e 1% de ATB; ASE= grupo com extrato do açaí a 10 µg/mL; H 100= grupo com H_2O_2 de 100 µM; PtA 100 = pré-tratamento com o ASE durante 4 h seguidos de incubação com H_2O_2 à 100 µM por 16 h; TtA 100= tratamento com o ASE e H_2O_2 de 100 µM por 16 h; H 200= grupo com H_2O_2 de 100 µM; PtA 200 = pré-tratamento com o ASE durante 4 h seguidos de incubação com H_2O_2 à 200 µM por 16 h; TtA 200= tratamento com o ASE e H_2O_2 de 200 µM por 16 h.

6 **DISCUSSÃO**

No presente estudo, o extrato hidroalcoólico do caroço do açaí (ASE) foi obtido de acordo com estudos prévios que demonstraram atividade biológica deste extrato (DE BEM et al., 2014; DE OLIVEIRA et al., 2015; ROCHA et al., 2008), sendo o mesmo analisado quanto à sua atividade antioxidante e à sua composição. Utilizando as mesmas metodologias aplicadas no presente trabalho, Inada et al. (2015) avaliaram a atividade antioxidante de extratos obtidos da polpa, da casca e do caroço da jabuticaba, além da polpa e do caroço da juçara. Soong e Barlow (2004) também determinaram a atividade antioxidante de distintos caroços após obtenção de um extrato etanólico. O ASE utilizado no presente estudo, quando comparado a estes extratos, apresenta maior atividade antioxidante para as quatro análises aplicadas. Sugere-se que a superioridade desta atividade está relacionada não só ao tipo de solvente utilizado na extração, mas principalmente ao tempo de obtenção do extrato, pois, enquanto aqueles foram obtidos no mesmo dia da extração, o ASE permaneceu acondicionado por 10 dias.

A complexidade dos compostos fenólicos em matrizes alimentares pode favorecer a mudança no teor e no perfil destes compostos durante o próprio processo de maturação do fruto, graças à condensação de alguns destes, especialmente as proantocianidinas e as antocianinas. Além disso, alguns frutos são designados a passar por algum tipo de processamento e, desta forma, o tempo de maceração, a temperatura, o tempo de estocagem e o solvente são alguns dos fatores que influenciam na extração dos compostos fenólicos (LI; ZHAO; HUANG, 2014). No ASE foram encontrados quatro derivados do ácido hidroxibenzóico (ácido gálico, ácido 3,4-dihidroxibenzoico, ácido benzóico e ácido siríngico), um derivado do ácido hidroxicinâmico (ácido 2-hidroxicinâmico) e dois derivados do ácido hidroxifenilacético (ácido 3,4-dihidroxifenilacético e ácido 4-hidroxifenilacético), sendo todos eles oriundos da classe dos ácidos fenólicos. Acredita-se que a agitação mecânica em temperatura ambiente possa ter favorecido o processo de fermentação alcoólica do caroço do açaí, promovendo, assim, a clivagem de compostos fenólicos de estruturas complexas, como os taninos, mas especificamente as proantocianidinas, dando origem a distintos metabólitos. Assim, justifica-se, por exemplo, o maior teor do ácido 4-hidroxifenilacético, que é um metabólito do ácido 3,4-dihidroxifenilacético. De uma forma geral, estudos que avaliaram o extrato hidroalcoólico do açaí demonstraram a presença predominante de flavonóides como a catequina e a epicatequina, além de proantocianidinas (DE BEM et al., 2014; RODRIGUES et

al., 2006). Quando comparado ao caroço de juçara, o ASE apresentou maior teor de compostos fenólicos (INADA et al., 2015). Assim, demonstra-se a potencialidade deste extrato como um possível agente preventivo/terapêutico com propriedade antioxidante (DA COSTA et al., 2012; ROCHA et al., 2008) .

Sabe-se que o dano vascular é um marcador associado às complicações cardiovasculares de patologias e de comorbidades, como diabetes mellitus, hipertensão, obesidade e outros. Assim, inúmeros estudos vêm empregando distintos modelos celulares, a fim de investigar variadas substâncias e seus diversos efeitos na função vascular. As células HUVEC vêm sendo muito utilizadas em diferentes condições que permitem avaliar a angiogênese, diferentes vias de sinalização envolvidas na disfunção endotelial, entre outros aspectos (KARBACH et al., 2012). Estas células em repostas a estímulos mecânicos ou mediadores neuro-humorais liberam fatores que controlam o tônus vascular podendo, assim, exercer efeito vasodilatador ou vasoconstritor (DONATO et al., 2015; TABIT et al., 2010). No presente estudo observou-se que o ASE foi capaz de induzir a vasodilatação em leito arterial mesentérico pré-contraído com noradrenalina e, em acréscimo, estudos prévios comprovam que este efeito é endotélio-dependente, demonstrando que o extrato obtido neste trabalho apresenta potencial vasodilatador, principal função biológica descrita até o momento (DA COSTA et al., 2012; DE BEM et al., 2014; DE MOURA; RESENDE, 2015; ROCHA et al., 2007). Desta forma, demonstra-se a importância de investigar os efeitos moleculares do ASE em células endoteliais, uma vez que seus efeitos biológicos podem ser atribuídos, parcialmente, a este efeito vasodilatador dependente de endotélio (ROCHA et al., 2007)

A determinação da viabilidade celular é uma ferramenta imprescindível na triagem de novos compostos com possíveis atribuições farmacológicas, visto que a exposição celular a substâncias que promovam alteração em sua morfologia, diminuam sua capacidade proliferativa, induzam a morte celular ou desintegram a bicamada lipídica alteram esta viabilidade, predizendo, assim, a atividade metabólica da célula (BONCLER et al., 2014; XU; MCCANNA; SIVAK, 2015). Os resultados encontrados demonstram que o ASE reduziu a atividade metabólica das células endoteliais a partir da concentração de 20 µg/mL. Neste sentido, a observação de que a concentração de 10 µg/mL não diminuiu a viabilidade celular fez com que esta concentração fosse escolhida para a realização dos demais experimentos, a fim de garantir que não houvesse nenhum efeito toxicológico na célula.

Como agente indutor do estresse, o H_2O_2 foi escolhido pela sua relativa estabilidade permitindo, assim, um quadro de estresse oxidativo reprodutível sobre as células. Além disso, o H_2O_2 é uma espécie reativa, naturalmente formada por células endoteliais, capaz de

atravessar as membranas celulares com mais facilidade (MILLER; DICKINSON; CHANG, 2010). Quando as células foram expostas às variadas concentrações de H_2O_2, pôde-se perceber que a diminuição da viabilidade celular foi dose dependente, e que, a partir da concentração de 200 µM, houve diminuição na atividade metabólica das células. Corroborando com o presente estudo, Liu et al. (2009) e Wen et al. (2013) também observaram a redução gradual da viabilidade das células a partir da concentração de 200 µM, utilizando modelo de células endoteliais imortalizadas.

Neste estudo, as condições de pré-tratamento e de tratamento com ASE na presença do H_2O_2 evidenciaram não só que a incubação com a concentração de 200 µM de peróxido foi capaz de reduzir a atividade metabólica das células, como também que as células pré-tratadas com ASE e aquelas tratadas em concomitância com ASE e H_2O_2 à 200 µM aumentaram sua atividade metabólica após uma diminuição da mesma pelo peróxido 200 µM.

A manutenção da integridade física e metabólica do endotélio é imprescindível na prevenção ou no retardo da progressão da doença vascular e, no caso de injúria endotelial, é requerido um processo de reparo ativo. A habilidade de migração das células endoteliais atua de forma significativa na regeneração e no reparo desta injúria assim como no processo de angiogênese (DOU et al., 2004, 2007). Os desfechos do ensaio de migração celular do presente estudo demonstram que as células endoteliais possuíram um menor potencial migratório na presença do H_2O_2 nas concentrações de 100 e de 200 µM. Além disso, se observou que somente o tratamento com ASE na presença do H_2O_2 100 µM e o pré-tratamento com ASE na presença do H_2O_2 à 200 µM foram capazes de prevenir a perda deste potencial nas células endoteliais.

A geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) está envolvida em vários processos biológicos. Um desequilíbrio entre a geração destas e a proteção antioxidante resulta no aumento da biodisponibilidade destas espécies, originando um estado pró-oxidante (GROSSMAN, 2008). Este estado pode culminar no quadro de estresse oxidativo, o qual tem sido intimamente relacionado à disfunção endotelial (SCHULZ; GORI; MÜNZEL, 2011). Os resultados obtidos no presente estudo apontam que as concentrações de peróxido utilizadas instauram um quadro de estresse oxidativo. Este quadro foi caracterizado pelo aumento na geração de EROs e pelo aumento na carbonilação de proteínas, representando a ocorrência de um dano oxidativo. Neste sentido, verificou-se que o ASE conseguiu prevenir o aumento na geração de EROs nas duas concentrações de H_2O_2 utilizadas, corroborando com o estudo de Xiong et al. (2015). Além disso, os resultados confirmaram que não só a condição de tratamento com ASE na presença de 100 µM de H_2O_2 promoveu redução na oxidação de

proteínas, mas também que na presença de H_2O_2 à 200 µM, tanto o pré-tratamento quanto tratamento foram capazes de atenuar esta oxidação. Assim, apesar de não ter promovido diminuição da atividade metabólica, a concentração de 100 µM de H_2O_2 foi capaz de conferir uma inibição na propriedade migratória das células endoteliais, bem como aumentar a geração de EROs e a carbonilação de proteínas. Ruijters et al. (2013) sugerem que está concentração consegue induzir o quadro de estresse oxidativo sem necessariamente promover uma diminuição em sua atividade metabólica, o que pode estar relacionado à ausência de indícios de morte celular nesta concentração. Esses indícios podem ter levado à redução na viabilidade celular e a uma maior amplitude de parâmetros anteriormente citados na concentração de 200 µM de H_2O_2. Além disso, os resultados ratificam que o ASE foi capaz de atenuar estes parâmetros, conferindo benefícios que ora foram terapêuticos e ora foram preventivos.

Estudos recentes indicam uma associação entre a sinalização redox e o status de fosforilação de proteínas de diversas vias, comprovando que espécies reativas, principalmente o H_2O_2, podem modificar a fosforilação celular de modo a modular a atividade de enzimas antioxidantes (SADI; BOZAN; YILDIZ, 2014). No presente estudo, realizou-se a determinação da atividade antioxidante da catalase e da glutationa peroxidase. A catalase consiste em uma enzima catalítica que converte o H_2O_2 em H_2O e O_2 e sua deficiência tem sido associada ao maior risco cardiovascular (LEOPOLD; LOSCALZO, 2005; SENA; PEREIRA; SEIÇA, 2013). A glutationa-peroxidase reduz o H_2O_2 em H_2O e o hidroperóxido de lipídeo nos seus respectivos álcoois, desempenhando, assim, um papel importante na detoxificação do organismo . Observou-se, então, que os grupos expostos às concentrações de 100 µM e de 200 µM de H_2O_2 foram semelhantes ao grupo controle e ao ASE. No entanto, o tratamento com ASE no grupo exposto à 100 µM de H_2O_2 e o pré-tratamento com o ASE no grupo exposto à 200 µM de H_2O_2 conseguiram aumentar a atividade desta enzima antioxidante, o que indica um potencial efeito do ASE sob a regulação da atividade desta enzima. A atividade da enzima GPx foi semelhante nos grupos que receberam os tratamentos com o ASE na presença de ambas as concentrações de H_2O_2 utilizadas. Uma vez instituído o quadro de estresse oxidativo, esperava-se obter uma diminuição da atividade das enzimas em questão com as concentrações de H_2O_2 utilizadas, e um aumento desta atividade nas condições de pré-tratamento e de tratamento com ASE, indicando a tentativa de restaurar a homeostase diante de um estado pró-oxidante, conforme demonstram alguns autores (LIU et al., 2009; MA; GUO; CHEN, 2015). Contudo, os resultados encontrados sugerem que a maior geração de EROs e a maior oxidação de proteínas ocasionadas pela exposição ao H_2O_2 não implicam necessariamente em menor atividade das enzimas avaliadas em relação ao controle.

Sugere-se, assim, a ocorrência de uma modulação positiva para a atividade enzimática da catalase, induzida pelo ASE.

A ativação do fator de transcrição Nrf2 é regulada por uma série de fatores, sendo um destes a sua própria repressão pela proteína Keap 1. Algumas proteínas específicas como as MAP quinases, à expemplo da ERK ½ e a JNK, promovem a fosforilação em resíduos de aminoácidos, permitindo assim a translocação do Nrf2 para o núcleo (SURH, 2003). Já foi demonstrado que o fator de transcrição Nrf2 pode ser ativado não somente pelo seu ligante clássico, sulforafano, mas também por diversos compostos bioativos e medicamentos (CARMONA-RAMÍREZ et al., 2013; CHENG et al., 2012; KALAYARASAN et al., 2009). No presente estudo observou-se uma tendência à maior expressão de Keap 1 no grupo H_2O_2 200 µM associado à menor expressão do Nrf2, sugerindo uma inibição da translocação nuclear deste fator de transcrição, o que pode levar a menor tradução de enzimas de detoxificação de fase II e de enzimas antioxidantes. Ainda sob o ponto de vista, qualitativo, há uma possível modulação positiva da via de sinalização mediada somente pela presença do ASE. Adicionalmente o Nrf2 apresenta uma menor expressão na presença das duas concentrações de peróxido utilizadas, com aumento na expressão nos tratamentos empregados com o ASE. Já a proteína p-ERK ½ esta mais expressa no grupo tratado só com ASE e menos expressa em todos os grupos que expostos a H_2O_2 à 100 µM, inclusive os tratados com ASE. Esta proteína tende a maior expressão nos grupos tratados com ASE na presença do H_2O_2 200 µM. A proteína p-JNK tende a estar menos expressa no grupo H_2O_2 100 µM e no grupo pré-tratamento com ASE incubado com 200 µM de H_2O_2. Ainda que preliminares, o presente estudo apresenta potenciais resultados da atividade antioxidante do ASE sob as vias clássicas de sinalização do fator de transcrição Nrf2.

7 **CONCLUSÃO**

No presente estudo determinou-se a atividade antioxidante do ASE, o teor e o perfil dos compostos fenólicos presentes no ASE e avaliou-se sua atividade antioxidante em modelo de células endoteliais da veia do cordão umbilical humano.

Pode-se concluir que o ASE apresenta elevada atividade antioxidante e elevado teor de compostos fenólicos pertencentes à classe dos ácidos fenólicos. Demonstrou-se que o ASE foi capaz de atenuar parâmetros de estresse oxidativo no modelo de disfunção endotelial tanto de forma terapêutica como preventiva, sugerindo que, em concentrações mais baixas do agente pró-oxidante, o tratamento seria mais eficaz que o pré-tratamento, sendo este mais eficaz quando há exposição à maior concentração de peróxido de hidrogênio.

Além disso, o ASE parece modular positivamente a via de sinzalição do Nrf2, a qual está relacionada à resposta antioxidante, podendo ser um dos mecanismos de atuação envolvidos nos efeitos biológicos do ASE.

Assim sugere-se que o ASE pode ser uma ferramenta importante na prevenção e/ou tratamento de distintos agravos relacionados à disfunção endotelial. Adicionalmente, tendo o conhecimento de que são escassos os estudos acerca do mecanismo de atuação do ASE, mas vastos os efeitos biológicos descritos na literatura, o presente estudo abre uma possibilidade para que mais aspectos moleculares do ASE sejam avaliados na prevenção e/ou no tratamento associados ao estresse oxidativo, inflamação e morte celular.

REFERÊNCIAS

AL-NASIRY, S. et al. The use of Alamar Blue assay for quantitative analysis of viability, migration and invasion of choriocarcinoma cells. **Human Reproduction**, v. 22, n. 5, p. 1304–1309, 2007.

AMMERER, D. I. K. et al. Polyphenol Screening of Pomace from Red and White Grape Varieties (Vitis vinifera L .) by HPLC-DAD-MS / MS. **J. Agric. Food Chem.**, p. 27–30, 2004.

ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – uma breve revisão. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 1–9, 2007.

BAHIA, L. et al. O endotélio na síndrome metabólica. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 50, n. 2, p. 291–303, 2006.

BAI, Y. et al. Prevention by sulforaphane of diabetic cardiomyopathy is associated with up-regulation of Nrf2 expression and transcription activation. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 57, n. 1, p. 82–95, 2013.

BATTESTIN, V.; MATSUDA, L. K.; MACEDO, G. A. Fontes e aplicações de Taninos e Tanases em alimentos. **Alimentação Nutricional**, v. 15, n. 1, p. 63–72, 2004.

BEDARD, K.; KRAUSE, K.-H. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. **Physiological reviews**, v. 87, n. 1, p. 245–313, 2007.

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

BISHAK, Y. K. et al. Mechanisms of cadmium carcinogenicity in the gastrointestinal tract. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 16, n. 1, p. 9–21, 2015.

BOBBIO, F. O. et al. Identificação e quantificação das antocianinas do fruto do açaizeiro (Euterpe oleracea) Mart. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 20, n. 3, p. 388–390, dez. 2000.

BONCLER, M. et al. Comparison of PrestoBlue and MTT assays of cellular viability in the assessment of anti-proliferative effects of plant extracts on human endothelial cells. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 69, n. 1, p. 9–16, 2014.

BURGOYNE, J. R. et al. Hydrogen peroxide sensing and signaling by protein kinases in the cardiovascular system. **Antioxid Redox Signal**, v. 18, n. 9, p. 1042–1052, 2013.

BÜRK, R. R. A factor from a transformed cell line that affects cell migration. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 70, n. 2, p. 369–372, 1973.

BYTH, H. A. et al. Assessment of a simple, non-toxic Alamar Blue cell survival assay to monitor tomato cell viability. **Phytochemical Analysis**, v. 12, n. 5, p. 340–346, 2001.

CAMPOS, J. C.; GOMES, K. M. S.; FERREIRA, J. C. B. Impact of exercise training on redox signaling in cardiovascular diseases. **Food and chemical toxicology**, v. 62, n. 2, p. 107–19, 2013.

CARDOZO, L. F. M. F. et al. Nutritional strategies to modulate inflammation and oxidative stress pathways via activation of the master antioxidant switch Nrf2. **Biochimie**, v. 95, n. 8, p. 1525–1533, 2013.

CARMONA-RAMÍREZ, I. et al. Curcumin restores Nrf2 levels and prevents quinolinic acid-induced neurotoxicity. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 24, n. 1, p. 14–24, 2013.

CARNEVALE, R. et al. Dark chocolate inhibits platelet isoprostanes via NOX2 down-regulation in smokers. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 10, n. 1, p. 125–132, 2012.

CERQUEIRA, F. M.; DE MEDEIROS, M. H. G.; AUGUSTO, O. Antioxidantes dietéticos: Controvérsias e perspectivas. **Quimica Nova**, v. 30, n. 2, p. 441–449, 2007.

CHÁVEZ, A; MUÑOZ DE CHÁVEZ, M. Nutrigenomics in public health nutrition: short-term perspectives. **European journal of clinical nutrition**, v. 57 Suppl 1, p. S97–S100, 2003.

CHENG, A. S. et al. Resveratrol upregulates Nrf2 expression to attenuate methylglyoxal-induced insulin resistance in hep G2 cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 36, p. 9180–9187, 2012.

CHIN, Y. W. et al. Lignans and other constituents of the fruits of Euterpe oleracea (Açai) with antioxidant and cytoprotective activities. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 17, p. 7759–7764, 2008.

CIMINO, F. et al. Anthocyanins protect human endothelial cells from mild hyperoxia damage through modulation of Nrf2 pathway. **Genes and Nutrition**, v. 8, n. 4, p. 391–399, 2013.

COSTA, R. C. et al. Morphological studies of the Euterpe oleracea Mart. Seeds. **International Journal of Botany**, v. 4, n. 3, p. 303-308, 2008.

DA COSTA, C. A. et al. Euterpe oleracea Mart.-derived polyphenols prevent endothelial dysfunction and vascular structural changes in renovascular hypertensive rats: Role of oxidative stress. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 385, n. 12, p. 1199–1209, 2012.

DAS, L.; VINAYAK, M. Long term effect of curcumin in restoration of tumour suppressor p53 and phase-II antioxidant enzymes via activation of Nrf2 signalling and modulation of inflammation in prevention of cancer. **PLoS ONE**, v. 10, n. 4, p. 1–22, 2015.

DE BEM, G. F. et al. Protective effect of Euterpe oleracea Mart (açaí) extract on programmed changes in the adult rat offspring caused by maternal protein restriction during pregnancy. **The Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 66, n. 9, p. 1328–38, 2014.

DE MOURA, R. S.; RESENDE, A. C. Cardiovascular and metabolic effects of acai, an Amazon plant. **Journal of cardiovascular pharmacology**, 2015.

DE OLIVEIRA, D. M.; BASTOS, D. H. M. Biodisponibilidade de Ácidos fenólicos. **Quimica Nova**, v. 34, n. 6, p. 1051–1056, 2011.

DE OLIVEIRA, P. R. B. et al. Euterpe oleracea Mart.-Derived Polyphenols Protect Mice from Diet-Induced Obesity and Fatty Liver by Regulating Hepatic Lipogenesis and Cholesterol Excretion. **PloS one**, v. 10, n. 12, 2015.

DEL POZO-INSFRAN, D.; BRENES, C. H.; TALCOTT, S. T. Phytochemical Composition and Pigment Stability of Açai (Euterpe oleracea Mart.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 6, p. 1539–1545, 2004.

DEL POZO-INSFRAN, D.; PERCIVAL, S. S.; TALCOTT, S. T. Açai (Euterpe oleracea Mart.) polyphenolics in their glycoside and aglycone forms induce apoptosis of HL-60 leukemia cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 4, p. 1222–1229, 2006.

DEL RIO, D. et al. Dietary (poly)phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. **Antioxidants & redox signaling**, v. 18, n. 14, p. 1818–92, 2013.

DONATO, A. J. et al. Cellular and molecular biology of aging endothelial cells. **Journal of molecular and cellular cardiology**, p. 1–14, 2015.

DOU, L. et al. The uremic solutes p-cresol and indoxyl sulfate inhibit endothelial proliferation and wound repair. **Kidney International**, v. 65, n. 2, p. 442–451, 2004.

DOU, L. et al. The uremic solute indoxyl sulfate induces oxidative stress in endothelial cells. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 5, n. 6, p. 1302–1308, 2007.

EGLON, M.; MCGRATH, B.; BRIEN, T. O. Advanced Protocols in Oxidative Stress II. **Business**, v. 594, n. 25, p. 395–408, 2010.

EL ASSAR, M.; ANGULO, J.; RODRÍGUEZ-MAÑAS, L. Oxidative stress and vascular inflammation in aging. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 65, p. 380–401, 2013.

FLOHÉ, L.; GÜNZLER, W. A. Assays of glutathione peroxidase. **Methods in enzymology**, v. 105, n. July, p. 114–120, 1984.

FRAGA, C. G. et al. Molecular Aspects of Medicine Basic biochemical mechanisms behind the health benefits of polyphenols. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 31, n. 6, p. 435–445, 2010.

FRANKEL, E. . et al. Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. **The Lancet**, v. 341, n. 8843, p. 454–457, 20 fev. 1993.

FRIDOVICH, I. Superoxide anion radical (O2°), superoxide dismutases, and related matters. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 30, p. 18515–18517, 1997.

FUENTES, E.; PALOMO, I. Mechanisms of endothelial cell protection by hydroxycinnamic acids. **Vascular Pharmacology**, v. 63, n. 3, p. 155–161, 2014.

GALLORI, S. et al. Polyphenolic Constituents of Fruit Pulp of Euterpe oleracea Mart. (Açai palm). **Chromatographia**, v. 59, n. 11-12, p. 739–743, 2004.

GREENE, D. A. et al. Glucose-induced oxidative stress and programmed cell death in diabetic neuropathy. **European journal of pharmacology**, v. 375, n. 1-3, p. 217–23, 1999.

GROSSMAN, E. Does increased oxidative stress cause hypertension?. **Diabetes care**, 2008.

HAO, E. et al. Resveratrol Alleviates Endotoxin-Induced Myocardial Toxicity via the Nrf2 Transcription Factor. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, 2013.

HEINRICH, M.; DHANJI, T.; CASSELMAN, I. Aai (Euterpe oleracea Mart.) - A phytochemical and pharmacological assessment of the species' health claims. **Phytochemistry Letters**, v. 4, n. 1, p. 10–21, 2011.

HEYNINCK, K. et al. Withaferin A induces heme oxygenase (HO-1) expression in endothelial cells via activation of the Keap1/Nrf2 pathway. **Biochemical Pharmacology**, v. 109, p. 48–61, 2016.

HYBERTSON, B. M. et al. Oxidative stress in health and disease: The therapeutic potential of Nrf2 activation. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 32, n. 4-6, p. 234–246, 2011.

IBGE. Produção da Extração Vegetal e da Silvicultura. v. 28, 2013.

INADA, K. O. P. et al. Screening of the chemical composition and occurring antioxidants in jabuticaba (Myrciaria jaboticaba) and jussara (Euterpe edulis) fruits and their fractions. **Journal of Functional Foods**, v. 17, p. 422–433, 2015.

ISLAM, M. S. et al. Identification and characterization of foliar polyphenolic composition in sweetpotato (*Ipomoea batatas* L.) genotypes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**,

v. 50, n. 13, p. 3718–3722, 2002.

KALAYARASAN, S. et al. Diallyl sulfide enhances antioxidants and inhibits inflammation through the activation of Nrf2 against gentamicin-induced nephrotoxicity in Wistar rats. **European journal of pharmacology**, v. 606, n. 1-3, p. 162–71, 2009.

KANG, J. et al. Bioactivities of açaí (Euterpe precatoria Mart.) fruit pulp, superior antioxidant and anti-inflammatory properties to Euterpe oleracea Mart. **Food Chemistry**, v. 133, n. 3, p. 671–677, 2012.

KARBACH, S. et al. Hyperglycemia and oxidative stress in cultured endothelial cells – a comparison of primary endothelial cells with an immortalized endothelial cell line. **Journal of Diabetes and its Complications**, v. 26, n. 3, p. 155–162, 2012.

KASPAR, J. W.; NITURE, S. K.; JAISWAL, A. K. Nrf2:INrf2 (Keap1) signaling in oxidative stress. **Free Radical Biology and Medicine**, 2009.

KHANBABAEE, K.; REE, T. VAN. Tannins: Classification and Definition. **Natural Product Reports**, v. 18, n. 6, p. 641–649, 2001.

LEBRUN, V. et al. Efficient oxidation and destabilization of Zn(Cys)4 zinc fingers by singlet oxygen. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 53, n. 35, p. 9365–9368, 2014.

LEOPOLD, J. A.; LOSCALZO, J. Oxidative enzymopathies and vascular disease - ATVB in focus. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 25, n. 7, p. 1332–1340, 2005.

LEVINE, R. L. et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. **Methods in Enzymology**, v. 186, n. 1983, p. 464–478, 1990.

LI, A. N. et al. Resources and biological activities of natural polyphenols. **Nutrients**, 2014.

LI, J.; ZHAO, H.; HUANG, W. Mechanism of proanthocyanidins-induced alcoholic fermentation enhancement in Saccharomyces cerevisiae. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 41, n. 12, p. 1793–1802, 2014.

LICHTENTHÄLER, R. et al. Total oxidant scavenging capacities of Euterpe oleracea Mart. (Açaí) fruits. **International journal of food sciences and nutrition**, v. 56, n. February, p. 53–64, 2005.

LIU, H.-T. et al. Chitosan oligosaccharides attenuate hydrogen peroxide-induced stress injury in human umbilical vein endothelial cells. **Pharmacological research**, v. 59, p. 167–175, 2009.

LOFFREDO, L. et al. Dark chocolate acutely improves walking autonomy in patients with peripheral artery disease. **Journal of the American Heart Association**, v. 3, n. 4, p. 1–9,

2014.

MA, L.; GUO, X.; CHEN, W. Inhibitory effects of oleoylethanolamide (OEA) on H 2 O 2 - induced human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) injury and apolipoprotein E knockout (ApoE- / -) atherosclerotic mice. **Int J Clin Exp Pathol**, v. 8, n. 6, p. 6301–6311, 2015.

MANGANARIS, G. A. et al. Berry antioxidants: Small fruits providing large benefits. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 94, n. 5, p. 825–833, 2014.

MILLER, E. W.; DICKINSON, B. C.; CHANG, C. J. Aquaporin-3 mediates hydrogen peroxide uptake to regulate downstream intracellular signaling. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 36, p. 15681–6, 2010.

MITSUISHI, Y.; MOTOHASHI, H.; YAMAMOTO, M. The Keap1-Nrf2 system in cancers: stress response and anabolic metabolism. **Frontiers in oncology**, v. 2, n. December, p. 200, 2012.

MONTEZANO, A. C.; TOUYZ, R. M. Reactive oxygen species and endothelial function--role of nitric oxide synthase uncoupling and Nox family nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidases. **Basic & clinical pharmacology & toxicology**, v. 110, n. 1, p. 87–94, 2012.

MOURA, R. S. DE et al. Effects of Euterpe oleracea Mart. (AÇAÍ) extract in acute lung inflammation induced by cigarette smoke in the mouse. **Phytomedicine**, v. 19, n. 3-4, p. 262–9, 2012.

MÜLLER, M.; KERSTEN, S. Nutrigenomics: goals and strategies. **Nature reviews. Genetics**, v. 4, n. 4, p. 315–322, 2003.

PEDRUZZI, L. M. et al. Nrf2-keap1 system versus NF-kB: The good and the evil in chronic kidney disease?. **Biochimie**, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2012.07.015>

PETRI, S.; KÖRNER, S.; KIAEI, M. Nrf2/ARE signaling pathway: Key mediator in oxidative stress and potential therapeutic target in ALS. **Neurology Research International**, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2012.11.016>

PISOSCHI, A. M.; POP, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 97, 2015.

POBER, J. S.; MIN, W.; BRADLEY, J. R. Mechanisms of Endothelial Dysfunction, Injury, and Death. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 4, n. 1, p. 71–95, 2009.

QUINN, M. T.; AMMONS, M. C. B.; DELEO, F. R. The expanding role of NADPH oxidases in health and disease: no longer just agents of death and destruction. **Clinical science**

(London, England : 1979), v. 111, n. 1, p. 1–20, 2006.

RAY, S. et al. Assessment of vascular and endothelial dysfunction in nutritional studies. **Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases : NMCD**, v. 24, n. 9, p. 940–946, 2014.

RE, R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 9-10, p. 1231–1237, 1999.

REGAZZONI, L. et al. Coffee silver skin as a source of polyphenols: High resolution mass spectrometric profiling of components and antioxidant activity. **Journal of Functional Foods**, v. 20, p. 472–485, 2016.

RESENDE, A. C.; BALLEJO, G. Role of non-nitric oxide non- prostaglandin endothelium-derived relaxing factor (s) in bradykinin vasodilation. **Brazilian Journal Of Medical And Biological Research**, v. 31, p. 1229–1235, 1998.

ROCHA, A. P. M. et al. Endothelium-dependent vasodilator effect of Euterpe oleracea Mart. (Açaí) extracts in mesenteric vascular bed of the rat. **Vascular Pharmacology**, v. 46, n. 2, p. 97–104, 2007.

ROCHA, A. P. M. et al. Antihypertensive Effects and Antioxidant Action of a Hydro-Alcoholic Extract Obtained from Fruits of Euterpe oleracea Mart. (Açaí-). **Journal of Pharmacology and Toxicology**, 2008.

RODRIGUES, R. B. et al. Total oxidant scavenging capacity of Euterpe oleracea Mart. (Açaí) seeds and identification of their polyphenolic compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 12, p. 4162–4167, 2006.

ROSS, M. K.; MATTHEWS, A. T.; MANGUM, L. C. **Poisons in Disease Development**. v. 2, n. 1, p. 17–34, 2015.

RUIJTERS, E. J. B. et al. The flavanol (-)-epicatechin and its metabolites protect against oxidative stress in primary endothelial cells via a direct antioxidant effect. **European Journal of Pharmacology**, v. 715, n. 1-3, p. 147–153, 2013.

SADI, G.; BOZAN, D.; YILDIZ, H. B. Redox regulation of antioxidant enzymes: Post-translational modulation of catalase and glutathione peroxidase activity by resveratrol in diabetic rat liver. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 393, n. 1-2, p. 111–122, 2014.

SÁNCHEZ-MORENO, C.; LARRAURI, J. A.; SAURA-CALIXTO, F. A procedure to measure the antiradical efficienc y of polyphenols. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 270, p. 270–276, 1998.

SCHAUSS, A. G. et al. Phytochemical and nutrient composition of the freeze-dried amazonian palm berry, Euterpe oleraceae Mart. (Acai). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 22, p. 8598–8603, 2006.

SCHAUSS, A. G. Acai (Euterpe oleracea Mart.): A macro and nutrient rich palm fruit from the amazon rain forest with demonstrated bioactivities in vitro and in Vivo. **Bioactive Foods in Promoting Health**, p. 479–490, 2010.

SCHIEBER, A.; ULLRICH, W.; CARLE, R. Characterization of polyphenols in mango puree concentrate by HPLC with diode array and mass spectrometric detection. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 1, n. 2, p. 161–166, 2000.

SCHULZ, E.; GORI, T.; MÜNZEL, T. Oxidative stress and endothelial dysfunction in hypertension. **Hypertension research**, v. 34, n. 6, p. 665–73, 2011.

SENA, C. M.; PEREIRA, A. M.; SEIÇA, R. Endothelial dysfunction — A major mediator of diabetic vascular disease. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)**, v. 1832, n. 12, p. 2216–2231, 2013.

SILVA, D. F. et al. Cytotoxic effects of Euterpe oleracea Mart. in malignant cell lines. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 14, p. 175, 2014.

SIMPLICIO, J. A et al. Contribution of oxidative stress and prostanoids in endothelial dysfunction induced by chronic fluoxetine treatment. **Vascular pharmacology**, 2015.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. **Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent**, 1999.

SOARES, S. E. Ácidos Fenólicos Como Antioxidantes. **Revista de Nutricao**, v. 15, n. 1, p. 71–81, 2002.

SOONG, Y. Y.; BARLOW, P. J. Antioxidant activity and phenolic content of selected fruit seeds. **Food Chemistry**, v. 88, n. 3, p. 411–417, 2004.

STOCLET, J. C. et al. Vascular protection by dietary polyphenols. **European Journal of Pharmacology**, 2004.

SURH, Y.-J. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. **Nature reviews. Cancer**, v. 3, n. 10, p. 768–780, 2003.

TABIT, C. E. et al. Endothelial dysfunction in diabetes mellitus: Molecular mechanisms and clinical implications. **Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders**, 2010.

TOUYZ, R. M.; BRIONES, A. M. Reactive oxygen species and vascular biology: implications in human hypertension. **Hypertension research**, v. 34, n. 1, p. 5–14, 2011.

TOUYZ, R. M.; SCHIFFRIN, E. L. Reactive oxygen species in vascular biology: Implications in hypertension. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 122, n. 4, p. 339–352, 2004.

WEN, Y. D. et al. Hydrogen Sulfide Protects HUVECs against Hydrogen Peroxide Induced Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress. **PLoS ONE**, v. 8, n. 2, 2013.

WHEATCROFT, S. B. et al. Pathophysiological implications of insulin resistance on vascular endothelial function. **Diabet Med**, v. 20, n. 4, p. 255–268, 2003.

XIONG, L. et al. The Activation of Nrf2 and Its Downstream Regulated Genes Mediates the Antioxidative Activities of Xueshuan Xinmaining Tablet in Human Umbilical Vein Endothelial Cells. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, p. 1–7, 2015.

XU, M.; MCCANNA, D. J.; SIVAK, J. G. Use of the viability reagent PrestoBlue in comparison with alamarBlue and MTT to assess the viability of human corneal epithelial cells. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 71, p. 1–7, 2015.

YAMAGUCHI, K. K. D. L. et al. Amazon acai: Chemistry and biological activities: A review. **Food Chemistry**, v. 179, p. 137–151, 2015.

ZHENG, Y. et al. Resveratrol protects human lens epithelial cells against H2O2-induced oxidative stress by increasing catalase, SOD-1, and HO-1 expression. **Molecular vision**, v. 16, n. Julho, p. 1467–74, 2010.

ZHOU, R.; LIN, J.; WU, D. Sulforaphane Induces Nrf2 and Protects Against CYP2E1-dependent Binge Alcohol –induced Liver Steatosis. **Biochim Biophys Acta**, v. 72, n. 2, p. 181–204, 2011.

ZULUETA, A.; ESTEVE, M. J.; FRÍGOLA, A. ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. **Food Chemistry**, v. 114, n. 1, p. 310–316, 2009.

ZUO, X. et al. Tea polyphenols alleviate high fat and high glucose-induced endothelial hyperpermeability by attenuating ROS production via NADPH oxidase pathway. **BMC Research Notes**, v. 7, n. 1, p. 120, 2014.

APÊNDICE A – Publicação de artigo na Revista do Hospital Universitário Pedro Ernesto

HUPE
PEDRO ERNESTO

Artigo de revisão

Compostos bioativos em alimentos, estresse oxidativo e inflamação: uma visão molecular da nutrição

Elaine dos R. Soares,[1] Elisa B. Monteiro,[1] Renata C. da Silva,[1] Aline Batista,[1] Flavia Sobreira,[1] Thaísa Mattos,[1] Cristiane A. da Costa,[2] Julio B. Daleprane[2]*

Resumo

A indicação de uma alimentação diversificada em frutas, legumes e verduras nos dias atuais vai além dos micronutrientes essenciais como as vitaminas e minerais que são encontrados nestes alimentos. Os compostos bioativos presentes nestes ganham cada vez mais destaque na literatura, por meio de seus promissores efeitos benéficos à saúde. Junto a isso a crescente vertente de atuação destes compostos na regulação da expressão gênica exercendo, portanto, influência no genoma humano, torna-se fundamental para o desenvolvimento de novas terapias nutricionais. Além disso, a elucidação dos mecanismos intracelulares pelos quais estes compostos exercem seus efeitos terapêuticos ratifica a compreensão dos benefícios conferidos pelos alimentos, seja na forma preventiva ou terapêutica, na tentativa de reestabelecer o desequilíbrio redox existente em um organismo. Nota-se, então, a importância das vias de sinalização molecular tais como a via do Nrf2-Keap1, uma das principais contra agentes oxidantes, e a via do NFkB, responsável pelo desencadeamento da resposta inflamatória. Desta forma, a aquisição acerca deste conhecimento se faz de suma importância haja vista que este torna possível a geração de novas fontes preventivas e terapêuticas, principalmente as envolvidas com estresse oxidativo, como as cardiovasculares, o diabetes, a hipertensão, o câncer, entre outras.

Descritores: Nutrigenômica; Compostos bioativos; Estresse oxidativo; Vias de sinalização.

Abstract

Food bioactive compounds, oxidative stress and inflammation: a molecular view of nutrition

Nowadays the indication of a diet diversification including fruits and vegetables goes beyond the essential micronutrients such as vitamins and minerals found in these foods. The bioactive compounds present in these are increasingly highlighted in the literature, through its promising beneficial health effects. Moreover the increasing strand of action of these compounds in the regulation of gene expression exercising, therefore, influence in the human genome, is fundamental to the development of new nutritional therapies. In addition, the elucidation of intracellular mechanisms by which these compounds exert their therapeutic effects confirms the understanding of the benefits conferred by the food, as a preventive or therapeutic way in attempt to restore the redox imbalance existing in an organism. Note then the importance of the molecular signaling pathways such as the Nrf2-Keap 1, a major pathway against oxidizing agents and NFkB pathway, responsible for triggering the inflammatory response. Thus, the acquisition about this knowledge is of paramount importance given that this makes it possible to generate new preventive and therapeutic sources, mainly involved with oxidative stress, such as cardiovascular, diabetes, hypertension, cancer, among others.

Keywords: nutrigenomics, bioactives compounds, oxidative stress, signal transduction.

Resumen

Compuestos bioactivos de los alimentos, el estrés oxidativo y la inflamación: una visión molecular de la nutrición

La indicación de una dieta diversificada de frutas y verduras de hoy va más adelante de los micronutrientes esenciales, como vitaminas y minerales que se encuentran en estos alimentos. Los compuestos bioactivos presentes en estos se destacan cada vez más en la literatura, a través de sus prometedores efectos beneficiosos para la salud. Es necesario añadir que, la creciente línea de acción de estos compuestos en la regulación de la expresión génica influyendo, por lo tanto, en el genoma humano, es fundamental para el desarrollo de nuevas terapias nutricionales. Además, la elucidación de los mecanismos intracelulares por los cuales estos compuestos ejercen sus efectos terapéuticos confirma la comprensión de los beneficios brindados por los alimentos, sea en su forma preventiva o terapéutica, en un intento de restablecer el desequilibrio redox existente en un organismo. Entonces es nota-

1. Departamento de Nutrição Básica e Experimental. Instituto de Nutrição. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

2. Departamento de Farmacologia e Psicobiologia. Instituto de Biologia. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

*Endereço para correspondência:
Instituto de Nutrição, UERJ.
Rua São Francisco Xavier, 524, 12º andar
Rio de Janeiro, RJ, Brasil. CEP: 20550-900.
E-mail: juliobd@gmail.com

Revista HUPE, Rio de Janeiro, 2015;14(3):64-72
doi: 10.12957/rhupe.2015.19942
Recebido em 19/03/2015. Aprovado em 17/07/2015.