

ALINNE MARTINS FERREIRA MARIN

**POTENCIAL ANTIOXIDANTE DO BARU (*Dipteryx alata* Vog.) - UM ESTUDO
IN VITRO E *IN VIVO***

BRASÍLIA – DF, 2012

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

ALINNE MARTINS FERREIRA MARIN

**POTENCIAL ANTIOXIDANTE DO BARU (*Dipteryx alata* Vog.) - UM ESTUDO
IN VITRO E *IN VIVO***

Tese apresentada para a obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Orientadora: Profa. Dra. Egle Machado de Almeida Siqueira

BRASÍLIA – DF, 2012

ALINNE MARTINS FERREIRA MARIN

**POTENCIAL ANTIOXIDANTE DO BARU (*Dipteryx alata* Vog.) - UM ESTUDO
*IN VITRO E IN VIVO***

Tese apresentada para a obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Aprovado em 12 de abril de 2012

BANCA EXAMINADORA

**Dra. Egle Machado de Almeida Siqueira - (presidente)
Universidade de Brasília**

**Dra. Wilma Maria Coelho Araújo
Universidade de Brasília**

**Dra. Nathalia Marcolini Pelucio Pizato Valério
Universidade de Brasília**

**Dr. Luiz Antônio Borgo
Universidade de Brasília**

**Dr. Celso Luiz Moretti
Embrapa**

**Dra. Sandra Fernandes Arruda
Universidade de Brasília**

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus.

À minha família, pela dedicação e apoio em todas as horas; ao meu marido, pelo companheirismo e paciência; ao meu filho Bernardo, pelo tempo que não pude me dedicar a ele nesses últimos 3 anos; e a minha filha Marianna, pela chegada tão aguardada. Aos amigos Chiquinho, Adriana, Fernanda, Lorena, Azadeh, Giovanna, Anderson, Lorena, Marcela, Gutto, Lívia, Juliana, Miriam e Janini pela ajuda prestada para a execução deste projeto. E, em especial à Profa. Sandra Fernandes Arruda pelo incentivo e à minha orientadora Profa. Egle Machado de Almeida Siqueira, pela confiança depositada em mim e pela sua excelente competência na orientação do meu trabalho.

“O valor das coisas não está no tempo que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso, existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis” (Fernando Pessoa).

SUMÁRIO

1-	INTRODUÇÃO.....	1
2-	JUSTIFICATIVA.....	4
3-	OBJETIVOS	5
3.1-	OBJETIVO GERAL.....	5
3.2-	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	5
4-	REVISÃO DA LITERATURA	6
4.1-	DOENÇAS CRÔNICAS NÃO TRANSMISSÍVEIS (DCNT)	6
4.2-	ESTRESSE OXIDATIVO	7
4.3-	RADICAIS LIVRES	8
4.3.1-	<i>RADICAL HIDROXIL</i>	<i>10</i>
4.3.2-	<i>RADICAL SUPERÓXIDO</i>	<i>10</i>
4.3.3-	<i>PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO</i>	<i>11</i>
4.3.4-	<i>OXIGÊNIO SINGLETO.....</i>	<i>11</i>
4.3.5-	<i>FERRO NA PRODUÇÃO DE RADICAIS LIVRES.....</i>	<i>11</i>
4.4-	ANTIOXIDANTES.....	13
4.4.1-	<i>ENZIMÁTICOS.....</i>	<i>15</i>
4.4.1.1-	Superóxido dismutase.....	16
4.4.1.1-	Catalase	16
4.4.1.2-	Glutaciona peroxidase	16
4.4.1.3-	Glutaciona redutase.....	16
4.4.2-	<i>NÃO – ENZIMÁTICOS.....</i>	<i>17</i>
4.4.2.1-	Ácido fítico.....	18
4.5-	FRUTAS DO CERRADO COM POTENCIAL ANTIOXIDANTE	22
4.5.1.1-	Baru.....	24
4.5.2-	<i>DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE FRUTAS DO CERRADO</i>	<i>28</i>
5-	METODOLOGIA	31
5.1-	MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
5.1.1-	<i>MATERIAIS</i>	<i>31</i>
5.1.2-	<i>AMOSTRAGEM E PREPARO DAS AMOSTRAS.....</i>	<i>31</i>
5.1.3-	<i>ESTUDO IN VITRO</i>	<i>32</i>
5.1.3.1-	Extratos do fruto.....	32
5.1.3.1-	Determinação de fenólicos totais.....	32
5.1.3.2-	Potencial antioxidante do fruto in vitro	32
5.1.3.2.1-	<i>Sistema β-caroteno/ácido linoleico</i>	<i>33</i>
5.1.3.2.2-	<i>Ensaio para avaliar capacidade de sequestrar radicais (DPPH).....</i>	<i>33</i>
5.1.3.2.3-	<i>Poder antioxidante de redução do ferro (FRAP).....</i>	<i>34</i>
5.1.4-	<i>ESTUDO IN VIVO.....</i>	<i>35</i>
5.1.4.1-	Dietas e ratos.....	35
5.1.4.1.1-	Preparação da solução de sulfato ferroso para gavagem.	36
5.1.4.1.2-	Adição de ácido fítico na dieta.....	37
5.1.4.2-	Testes laboratoriais	37
5.1.4.2.1-	<i>Determinação de hemoglobina.....</i>	<i>37</i>
5.1.4.2.2-	<i>Determinação de ferro nos órgãos.....</i>	<i>37</i>
5.1.4.2.3-	<i>Preparação do homogeneizado para testes enzimáticos</i>	<i>38</i>
5.1.4.2.4-	<i>Catalase.....</i>	<i>39</i>
5.1.4.2.5-	<i>Glutaciona redutase</i>	<i>39</i>
5.1.4.2.6-	<i>Glutaciona peroxidase</i>	<i>40</i>
5.1.4.2.7-	<i>Glutaciona – S – transferase</i>	<i>40</i>
5.1.4.2.8-	<i>Peroxidação protéica</i>	<i>41</i>
5.1.4.2.9-	<i>Peroxidação lipídica</i>	<i>42</i>
5.1.4.2.10-	<i>Análise estatística.....</i>	<i>43</i>

6- RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
7- CONCLUSÃO.....	56
8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57
9- ANEXOS.....	71
ANEXO 1: LISTA DE REAGENTES	72
ANEXO 2: APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA	74
ANEXO 3: SULFATO FERROSO	76
ANEXO 4: ARTIGO.....	79

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Amêndoa de Baru	24
Figura 2: Barueiro	25
Figura 3: Estrutura do DPPH	29
Figura 4: Reação de redução do complexo Fe ³⁺ -TPTZ	30
Figura 5: Concentração de ferro no fígado, coração e baço de ratos tratados com dieta controle, Fe, Ba, Ba/Fe e AF/Fe durante 17 dias de tratamento.	48
Figura 6: Concentração de MDA no fígado, coração e baço de ratos tratados com dieta controle, Fe, Ba, Ba/Fe e AF/Fe durante 17 dias de tratamento.	51
Figura 7: Concentração de proteínas carboniladas no fígado, coração e baço de ratos tratados com dieta controle, Fe, Ba, Ba/Fe e AF/Fe durante 17 dias de tratamento*.	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Enzimas antioxidantes e reações catalisadas	15
Tabela 2: Efeito Antitumoral do ácido fítico <i>in vitro</i>	21
Tabela 3: Efeito Antitumoral do ácido fítico <i>in vivo</i>	21
Tabela 4: Composição da amêndoa de baru em macro, microelementos e compostos bioativos	27
Tabela 5: Formulação das dietas oferecidas aos ratos.	36
Tabela 6: Concentração de fenólicos totais e atividade antioxidante (AA) dos extratos aquoso e de acetato de etila determinada pelos métodos: de captura do radical livre (DPPH), de redução de ferro (FRAP) e sistema β -caroteno/ácido linoleico	44
Tabela 7: Consumo de dieta, de ferro, ferro por gavagem e ganho de peso dos ratos tratados com dieta controle, dieta controle + ferro (Fe); dieta Baru (Baru) e dieta Baru + ferro (Baru/Fe) e dieta ácido fítico + ferro (AF/Fe)	46
Tabela 8: Tabela 8: Massa do coração, fígado e baço dos ratos tratados com dieta controle, dieta controle + ferro (Fe); dieta Baru (Baru) e dieta Baru + ferro (Baru/Fe) e dieta ácido fítico + ferro (AF/Fe)	49
Tabela 9: Atividade específica da catalase (CAT), glutaciona peroxidase (GPX), glutaciona-s-transferase (GST) e glutaciona redutase (GR) no fígado, coração e baço de ratos tratados com dieta controle, dieta controle + ferro (Fe); dieta Baru (Baru) e dieta Baru + ferro (Baru/Fe) e dieta ácido fítico + ferro (AF/Fe)	50

LISTA DE REAÇÕES

Reação 1: Peroxidação lipídica	7
Reação 2: Evasão de elétrons da cadeia respiratória	9
Reação 3: Reciclagem de metais de transição por $O_2^{\bullet -}$	10
Reação 4: Reação de Haber – Weiss	10
Reação 5: Reação de Fenton	11
Reação 6: Estrutura do ácido fólico interagindo com minerais e proteínas	19
Reação 7: Redução do DPPH	29

LISTA DE ABREVIÇÕES

$^1\text{O}_2$	Oxigênio singleto
$^3\text{O}_2$	Oxigênio tripleto
AA	Atividade antioxidante
AX	Antioxidante
AcOEt	Acetato de etila
AF / IP6	Ácido fítico (mio-inositol hexafosfato)
BHA	Hidroxi-anilose butilado
CAT	Catalase
CEASA	Central de Abastecimento do Distrito Federal
CDNB	1-cloro-2,4-dinitrobenzeno
DCNT	Doenças crônicas não transmissíveis
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazil
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético sódico
EROS	Espécies reativas de oxigênio
Fe	Ferro
FRAP	Ensaio antioxidante redutor de Ferro
GB	Grupo Baru
GBN	Grupo Baru negativo
GC	Grupo controle
GCN	Grupo controle negativo
GPX	Glutathione Peroxidase
GR	Glutathione Redutase
GSH	Glutathione reduzida
GSSG	Glutathione oxidada
GST	Glutathione S transferase
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
Hb	Hemoglobina
$\text{HO}\cdot$	Radical hidroxil
IDR	Ingestão diária recomendável
MDA	Malondialdeído
MS	Ministério da Saúde
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
NaN_3	Azida de sódio
NTB1- FNLT	Espécies de transferrina não ligadas a ferro
$\text{O}_2^{\cdot-}$	Radical superóxido
OMS	Organização Mundial de Saúde
ONOO-	Peroxinitrito
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonil
RL	Radical livre
R°	Espécie radicalar
$\text{RO}\cdot$	Radical alcoxi
$\text{ROO}\cdot$	Radical Peróxido
SOD	Superóxido dismutase
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
TPTZ	2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina

POTENCIAL ANTIOXIDANTE DO BARU (*Dipteryx alata* Vog.) - UM ESTUDO *IN VITRO* E *IN VIVO*

Marin, A.M.F.; Siqueira, E.M.A

RESUMO

O efeito protetor de alimentos de origem vegetal tem sido atribuído a presença de compostos bioativos encontrados em todas as partes da estrutura das plantas. Estudos anteriores retrataram uma alta concentração de sais minerais, taninos e ácido fítico na amêndoa de baru (*Dipteryx alata* Vog.), fruta típica do Cerrado brasileiro. O presente estudo investigou a atividade antioxidante (AA) dos extratos aquoso e acetato de etila da amêndoa do baru *in vitro* bem como os efeitos do consumo desta amêndoa sobre o estresse oxidativo, induzido pela suplementação oral com ferro em ratos. A AA nos dois extratos foi avaliada por meio de três métodos: utilizou-se a reação de captura do radical livre (DPPH), o sistema β -caroteno/ácido linoleico e a reação de redução de ferro com o reagente 2,4,6-tripiridil-s-triazina (FRAP). A concentração de polifenóis totais foi determinada por espectrofotometria utilizando o reagente Folin-Ciocalteu. O estudo *in vivo* foi realizado em ratos machos Wistar, alimentados com a dieta AIN-93G, adicionada ou não de 10% de amêndoa de baru ou 1% de ácido fítico; e suplementados diariamente com ferro ou solução salina, por gavagem, durante 17 dias. As concentrações de malondialdeído (MDA), proteínas carboniladas (carbonil) e de ferro foram determinadas no fígado, coração e baço dos animais. A atividade específica das enzimas antioxidantes (catalase, glutathione peroxidase, glutathione reductase e glutathione-S-transferase) também foi determinada nesses tecidos. O teste T foi utilizado para comparar os resultados entre os grupos de ratos e entre os dois extratos da amêndoa de baru, utilizando-se $p < 0,05$ como grau de diferença. O extrato aquoso da amêndoa de baru apresentou o maior teor de compostos fenólicos e a mais alta atividade antioxidante nos ensaios com FRAP e no sistema β -caroteno/linoleico. A suplementação de ferro reduziu o ganho de peso corporal, aumentou os níveis de ferro e MDA no fígado e no baço e aumentou o nível de proteínas carboniladas em todos os três tecidos analisados. O consumo da amêndoa de baru reduziu o nível de proteínas carboniladas no fígado, coração e baço dos animais suplementados com ferro ($p = 0,002$, $0,012$ e $0,036$, respectivamente) e reduziu marginalmente a oxidação lipídica induzida pelo ferro no fígado ($p = 0,117$) e no baço ($p = 0,074$) dos animais. O ácido fítico reduziu o nível de proteínas carboniladas no baço ($p = 0,020$) e marginalmente no fígado ($p = 0,098$) dos ratos suplementados com ferro. O tratamento com amêndoa do baru ou a suplementação com ferro não alteraram de forma significativa a atividade específica das enzimas antioxidantes. Os resultados indicam que a suplementação oral de ferro aumentou os níveis de dano oxidativo a lipídios e proteínas, além de retratar um efeito protetor do baru e do ácido fítico contra o dano oxidativo causado pela suplementação com ferro. O ácido fítico da amêndoa de baru pode ser responsável por este efeito protetor; no entanto, outros compostos, podem estar envolvidos. Assim, o consumo da amêndoa do baru parece proteger o coração e os demais tecidos contra o estresse oxidativo induzido por dietas ricas ou suplementadas com ferro.

Palavras-chave: Amêndoa de Baru, estresse oxidativo, potencial antioxidante, malondialdeído, proteína carbonilada, Cerrado.

ANTIOXIDANT POTENTIAL OF BARU (*Dipteryx alata* Vog.) – STUDY IN VITRO AND IN VIVO

Marin, A.M.F.; Siqueira, E.M.A.

ABSTRACT

The protective effect of plant-based foods in human health has been attributed to the presence of bioactive compounds in all parts of the plants. A previous study found a high level of minerals, tannins and phytic acid in the baru nut (*Dipteryx alata* Vog.), which is a native fruit of the Brazilian savanna. This study investigated the antioxidant activity (AA) of the aqueous and ethyl acetate extracts of the baru nut and the effect of the consumption of this nut on the oxidative status of rats supplemented orally with iron. The AA was evaluated in vitro using the ferric reducing antioxidant power (FRAP), β -carotene/linoleic acid system and freeradical scavenging (DPPH) assays. The total polyphenol concentration was determined spectrophotometrically using the Folin–Ciocalteu reagent. The in vivo study was conducted in male Wistar rats that were fed an AIN-93M diet with or without 10% baru nut or 1% phytic acid and supplemented daily with iron or saline by gavages for 17 days. The liver, heart and spleen were collected for the determination of the malondialdehyde (MDA), carbonyl protein and iron concentrations. The specific activities of catalase, glutathione reductase, glutathione peroxidase and glutathione S-transferase were also determined in these tissues. A T test was used to compare the results among the rats groups and between the different baru nut extracts (pb0.05). The aqueous extract of the baru nut contained a higher level of phenolic compounds and a higher antioxidant activity, as measured by FRAP and the β -carotene/linoleic system, relative to the EtOAc extract. The iron supplementation reduced the body weight gain, increased the levels of iron and MDA in the liver and the spleen and increased the carbonyl levels in all three tissues. Consumption of the baru nut reduced the carbonyl levels in the liver, heart and spleen of the iron-supplemented rats ($p=0.002$, 0.012 and 0.036 , respectively) relative to the heart carbonyl level of rats that were fed the control diet ($p=0.000$); it also marginally reduced the iron-induced lipid oxidation in the liver ($p=0.117$) and the spleen ($p=0.074$). Phytic acid reduced the carbonyl level in the spleen ($p=0.020$) and marginally reduced the carbonyl level in the liver ($p=0.098$) of iron-supplemented rats. These results demonstrated that the consumption of the baru nut protects tissues against iron-induced oxidative stress, and the phytic acid from the baru nut may be partially responsible for this protective effect; however, other compounds such as phenols may also be involved.

Keywords: baru nut, antioxidant potential, malonaldehyde, carbonil, cerrado.