

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

VALÉRIA MARIA WEILER



AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS DE *Butia* sp. E ESTUDO *in silico* DE COMPONENTES DA VIA METABÓLICA ANTIOXIDATIVA

PALOTINA

2022

VALÉRIA MARIA WEILER

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS DE *Butia* sp. E  
ESTUDO *in silico* DE COMPONENTES DA VIA METABÓLICA ANTIOXIDATIVA

Dissertação de mestrado apresentado ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, da Universidade Federal do Paraná setor de Palotina, como requisito para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Paula Carneiro Brandalize

Coorientadora: Profa. Dra. Kádima Nayara Teixeira

PALOTINA

2022

## FICHA CATALOGRÁFICA

Universidade Federal do Paraná. Sistemas de Bibliotecas.  
Biblioteca UFPR Palotina.

W422

Weiler, Valéria Maria

Avaliação do potencial antioxidante de extratos de *butia sp.* e estudo *in silico* de componentes da via metabólica antioxidativa / Valéria Maria Weiler. – Palotina, PR, 2022.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina, PR, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.  
Orientadora: Prof.a Dra. Ana Paula Carneiro Brandalize.  
Coorientadora: Prof.a Dra. Kádima Nayara Teixeira.

1. Ácido ascórbico. 2. Butiá. 3. GalLDH. 4. NADH desidrogenase.  
I. Brandalize, Ana Paula Carneiro. II. Teixeira, Kádima Nayara.  
III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDU 606

Bibliotecária: Aparecida Pereira dos Santos – CRB 9/1653



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR PALOTINA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO BIOTECNOLOGIA -  
40001016083P6

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação BIOTECNOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **VALÉRIA MARIA WEILER** intitulada: **Avaliação do potencial antioxidante de extratos de *Butia sp* e estudo *in silico* de componentes da via metabólica antioxidativa**, sob orientação da Profa. Dra. ANA PAULA CARNEIRO BRANDALIZE, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestra está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

PALOTINA, 29 de Agosto de 2022.

Assinatura Eletrônica

30/08/2022 13:21:49.0

ANA PAULA CARNEIRO BRANDALIZE

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

01/09/2022 16:34:00.0

ANA CARLA ZARPELON SCHUTZ

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

30/08/2022 13:41:58.0

JULIANO ANDRÉ BOQUETT

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE DO RIO GRANDE DO SUL)

---

RUA PIONEIRO, 2153 - PALOTINA - Paraná - Brasil

CEP 85950-000 - Tel: (44) 3211-8500 - E-mail: [mestradiototecufpr@gmail.com](mailto:mestradiototecufpr@gmail.com)

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 218911

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://www.prppg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp>  
e insira o código 218911

## RESUMO

O Butiá é um fruto nativo e de fácil acesso no Brasil, fonte potencial compostos bioativos, entre eles, os antioxidantes. A atividade antioxidante dos compostos naturais é cada vez mais estudada afim de identificar substâncias ainda não descritas que possam auxiliar na produção de novos fármacos. O ácido ascórbico (AA ou vitamina C) é uma molécula produzida em plantas, que participa de diversas reações metabólicas. Sua última etapa de produção envolve a enzima GalLDH, que está ligada a enzima transportadora de elétrons NADH desidrogenase. A elucidação da estrutura tridimensional desta última enzima pode auxiliar no estudo de sua relação com a regulação da GalLDH e na produção de AA. O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial antioxidante *in vitro* do extrato de *Butia capitata* (BC) e *Butia eriospatha* (BE), seu conteúdo de AA, bem como determinar a estrutura tridimensional da enzima relacionada à via metabólica antioxidativa, NADH desidrogenase. Os extratos das espécies de Butiá foram avaliados quanto à atividade antioxidante pelos ensaios de DPPH e ABTS e seu conteúdo de compostos fenólicos totais e de ácido ascórbico (AA) foram determinados. Os modelos tridimensionais da enzima NADH desidrogenase foram feitos por modelagem molecular por homologia pelo Swiss-model. Foi notado a coloração mais escura para o menor fruto, o BE. A capacidade antioxidante do extrato de BE foi superior ao do BC, bem como para o conteúdo fenólico total. A quantidade de AA foi alta para ambos os frutos, e comparável ao valor da laranja, com maiores valores para BE. Os modelos tridimensionais construídos foram representativos e de qualidade, e mostraram-se muito semelhantes para ambas espécies, porém não 100% idênticas, podendo ser essa uma das explicações das diferentes atividades dos frutos. Os extratos aqui apresentados são excelentes fontes naturais e de fácil acesso de compostos fenólicos e AA, antioxidantes que podem auxiliar na busca de novos medicamentos.

Palavras-chave: Butiá, ácido ascórbico, NADH desidrogenase, GalLDH.

## ABSTRACT

Butiá is a native and easily accessible fruit in Brazil, a potential source of bioactive compounds, including antioxidants. The antioxidant activity of natural compounds is increasingly studied in order to identify substances not yet described that can help in the production of new drugs. Ascorbic acid (AA or vitamin C) is a molecule produced in plants, which participates in several metabolic reactions. Its last production step involves the enzyme GalLDH, which is linked to the electron transport enzyme NADH dehydrogenase. The elucidation of the three-dimensional structure of the latter enzyme may help in the study of its relationship with the regulation of GalLDH and the production of AA. The objective of this work was to evaluate the in vitro antioxidant potential of *Butia capitata* (BC) and *Butia eriospatha* (BE) extracts, its AA content, as well as to determine the three-dimensional structure of the enzyme related to the antioxidant metabolic pathway, NADH dehydrogenase. Extracts of Butiá species were evaluated for antioxidant activity by DPPH and ABTS assays and their content of total phenolic compounds and ascorbic acid (AA) were determined. Three-dimensional models of the enzyme NADH dehydrogenase were made by molecular homology modeling using the Swiss-model. The darkest color was noticed for the smallest fruit, BE. The antioxidant capacity of BE extract was superior to that of BC, as well as for the total phenolic content. The amount of AA was high for both fruits, and comparable to the value of orange, with higher values for BE. The three-dimensional models built were representative and of good quality, and were very similar for both species, but not 100% identical, which could be one of the explanations for the different activities of the fruits. The extracts presented here are excellent natural and easily accessible sources of phenolic compounds and AA, antioxidants that can help in the search for new drugs.

Keywords: Butiá, ascorbic acid, NADH dehydrogenase, GalLDH.

## LISTA DE FIGURAS DA DISSERTAÇÃO

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 01:</b> Palmeira <i>Butia</i> sp., localizada no município de Mal. Cândido Rondon, Paraná.....   | 17 |
| <b>Figura 02:</b> Distribuição geográfica de Butiá: <b>A:</b> <i>B. archeri</i> (azul), <i>B. eriospatha</i> (laranja), <i>B. lepidotispatha</i> (rosa), <i>B. odorata</i> (amarelo) e <i>B. witeckii</i> (vermelho); <b>B:</b> <i>B. exospadix</i> (amarelo), <i>B. leptospatha</i> (rosa), <i>B. matogrossensis</i> (laranja), <i>B. pubispatha</i> (vermelho) e <i>B. yatay</i> (azul). <b>C:</b> <i>B. campicola</i> (rosa), <i>B. capitata</i> (roxo), <i>B. catarinensis</i> (amarelo), <i>B. exilata</i> (laranja), <i>B. lallemantii</i> (cinza), <i>B. marmorii</i> (vermelho) e <i>B. purpurascens</i> (azul). <b>D:</b> <i>B. arenicola</i> (vermelho), <i>B. microspadix</i> (laranja), <i>B. paraguayensis</i> (amarelo)..... | 18 |
| <b>Figura 03:</b> <b>A:</b> Fruto do Butiá coletado em Marechal Cândido Rondon e Santa Helena - Paraná, respectivamente. <b>B:</b> Butiá na palmeira.....  | 19 |
| <b>Figura 04:</b> Compostos formados no metabolismo primário pelo metabolismo do carbono e sua transformação em metabólitos secundários: compostos nitrogenados, fenólicos e terpenóides.....  | 23 |

## LISTA DE FIGURAS DO ARTIGO

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 01:</b> Tamanho dos diferentes Butiás coletados em Marechal Candido Rondon ( <i>Butia capitata</i> ) e Santa Helena ( <i>Butia eriospatha</i> ), respectivamente.....  | 39 |
| <b>Figura 02:</b> Alinhamento global da sequência de aminoácidos da enzima NADH desidrogenase do <i>Butia capitata</i> e <i>B. eriospatha</i> feito pelo programa ClustalX. Resíduos com características químicas semelhantes estão identificados com a mesma cor. * indica resíduos conservados.....  | 44 |
| <b>Figura 03:</b> <b>A:</b> Visão panorâmica do modelo tridimensional da subunidade F da enzima NADH desidrogenase do <i>Butia capitata</i> . <b>B:</b> Visão panorâmica do modelo tridimensional da subunidade F da enzima NADH desidrogenase do <i>Butia eriospatha</i> . Vermelho: $\alpha$ -hélices. Azul: folhas- $\beta$ . Branco: <i>loops</i> . Imagem feita pelo programa Verify3D..... | 46 |

## LISTA DE TABELAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabela 1:</b> Composição fitoquímica do extrato da polpa de BC e BE e resultados da análise estatística t-student. Valores de $p < 0,05$ indicam diferença estatisticamente significativa entre os extratos obtidos de diferentes espécies..... | 40 |
|--|----|

## LISTA DE ABREVIATURAS

**BC:** *Butia capitata*

**BE:** *Butia eriospatha*

**GaILDH** - Enzima L-galactona-1,4-lactona desidrogenase

**NADH** - Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina

**ERO** – espécies reativas de oxigênio

**O<sub>2</sub><sup>•-</sup>** - Radical superóxido

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** - Peróxido de hidrogênio

**HO** - Radical hidroxil

**O<sub>2</sub>** - Oxigênio singleto

**GSH** - Glutaciona

**SOD** - Superóxido Dismutase

**CAT** - Catalase

**GPx** - Glutaciona Peroxidase

**ATP** - Adenina tri-fosfato

**GAL** - Galactono-1,4-lactona ( )

**GSSG** - Glutaciona oxidada

**GSH** - Glutaciona reduzida

**AA** - Ácido ascórbico

**DPPH** - 2,2-difenil-1- picril-hidrazil

**GMQE** - *Global Model Quality Estimation*

**QMEAN** - *Qualitative Model Energy Analysis*

**ABTS** - 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)

**NCBI** - *National Center for Biotechnology Information*

**BLAST** - *Basic Local Alignment Search Tool*

**PDB** - *Protein data bank*

## SUMÁRIO

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1 INTRODUÇÃO.....</b>                                    | <b>12</b> |
| 2 JUSTIFICATIVA.....  | 14        |
| 3 OBJETIVOS.....  | 15        |
| <b>4 REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>                           | <b>16</b> |
| 4.1 BUTIÁ .....   | 16        |
| 4.2 METABOLISMO CELULAR E DANOS OXIDATIVOS.....             | 20        |
| 4.3 COMPOSTOS ANTIOXIDANTES E CLASSIFICAÇÃO.....            | 21        |
| 4.3.1 ANTIOXIDANTES EXÓGENOS.....                           | 22        |
| 4.3.2 ANTIOXIDANTES ENDÓGENOS.....                          | 24        |
| 4.4 ANTIOXIDANTES ALIMENTARES NO COMBATE A DOENÇAS.....     | 25        |
| 4.5 VIA METABÓLICA ANTIOXIDATIVA DA NADH DESIDROGENASE..... | 26        |
| 4.6 ESTUDO IN SILICO.....                                   | 27        |
| <b>5 ARTIGO CIENTÍFICO.....</b>                             | <b>30</b> |
| <b>6 CONCLUSÕES.....</b>                                    | <b>52</b> |
| <b>7 REFERÊNCIAS.....</b>                                   | <b>54</b> |

## 1. INTRODUÇÃO

No cenário atual há uma busca intensa por diferentes compostos que possam servir de substrato para o desenvolvimento de novos medicamentos. Popularmente, o tratamento e cura para várias enfermidades é realizado utilizando partes de vegetais em diferentes tipos de preparo, um conhecimento que passa de geração em geração (JUSTINO, 2021).

A utilização de compostos oriundos de plantas é comum em vários setores produtivos, seja na indústria farmacêutica, química ou alimentícia. As plantas medicinais possuem um enorme potencial para fins terapêuticos, podendo ser utilizadas como tratamento principal, alívio de sintomas, diagnósticos ou como auxílio para outras intervenções (JUSTINO, 2021; MAIA, 2017; PADILHA; PINHEIRO, 2004; TRAMONTIN *et al.*, 2019).

Dentre os compostos importantes descritos em plantas e frutos estão aqueles com atividade antioxidante. Antioxidantes são substâncias que inibem ou bloqueiam a ação maléfica causada pelos radicais livres, podendo ser de origem endógena (produzidos pelo corpo) ou exógena (adquiridos através da alimentação) (PEREIRA, 2011; SILVA *et al.*, 2022).

Os antioxidantes são moléculas estáveis, capazes de doar um elétron para o radical livre, que se torna estável, reduzindo seus efeitos danosos ao organismo. Vários estudos já demonstraram seus efeitos na prevenção de doenças, entre elas, câncer (LIU, 2004), Alzheimer e Parkinson (SILVA *et al.*, 2022) diabetes (ABDILLE *et al.*, 2005), doenças cardiovasculares e circulatórias (STOCLET *et al.*, 2004).

Um fruto com grandes quantidades de compostos antioxidantes, porém ainda pouco estudado, é o fruto do Butiazeiro - Butiá ou coquinho-azedo. O Butiá é um fruto endêmico do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Possui um conteúdo significativo de ácido ascórbico (em torno de 53mg/100g) e outros compostos bioativos, porém seu potencial antioxidante ainda é pouco explorado (FUJITA, 2012).

Estudos indicam que seus compostos apresentam ações anti-inflamatórias, antimicrobianas e antitumorais. Seu fruto é rico em vitaminas e minerais, sugerindo que seu uso pode agir de forma a melhorar a saúde de quem o ingere ( FERRÃO, 2012; PADILHA; PINHEIRO, 2004; PEREIRA, 2011; ROCKETT *et al.*, 2020; TOSS, 2010)

Na produção de AA, a enzima a L-galactona-1,4-lactona desidrogenase (GalLDH) é responsável pela última etapa. Em estudos recentes, apontou-se que a GalLDH tem sua estrutura ligada com o complexo 1 da cadeia transportadora de elétrons (também chamada de NADH ubiquinona redutase ou NADH desidrogenase). O AA é um composto antioxidante que atua em diversas rotas metabólicas dos vegetais, e uma alteração ou regulação nessas enzimas pode afetar a composição dessa substância nos frutos (BATIASTA, 2015).

Desta forma, é possível inferir que existe uma ligação entre a formação de AA, a enzima GalLDH, e o complexo I da cadeia respiratória, denominada NADH desidrogenase, cuja estrutura tridimensional ainda não foi completamente elucidada (MATOS, 2021). O estudo aqui desenvolvido buscou avaliar a atividade antioxidante de extratos de *Butia* sp. e apresentar um modelo tridimensional da enzima NADH desidrogenase.

## 2. JUSTIFICATIVA

Por muitos séculos estuda-se as propriedades medicinais de substâncias naturais, as quais são utilizados para diversas finalidades. Muitos produtos naturais ainda são pouco conhecidos quanto à composição e ação no organismo, porém sabe-se que possuem importante papel no desenvolvimento de novos fármacos, principalmente pelos seus compostos com poderem antitumorais, antioxidantes e antibacterianos (VEERESHAM, 2012).

Produtos naturais ricos em compostos bioativos como antioxidantes são cada vez mais procurados. Os antioxidantes naturais podem substituir os sintéticos afim de evitar os efeitos maléficos estes podem causar para o ser humano, como degeneração celular e envelhecimento precoce (SHARMA et al, 2015; SWAMI et al, 2012).

Dentro do escopo da busca por produtos naturais com possível efeito antioxidante, existe o Butiá. O Butiá é um fruto endêmico e de fácil acesso no Oeste do Paraná, cujo potencial de compostos bioativos ainda é pouco explorado em comparação a outros frutos nativos do Brasil. No entanto, já se sabe que é um fruto rico em compostos bioativos, principalmente antioxidantes (FUJITA, 2012). A partir deste estudo será possível identificar o potencial antioxidante de diferentes espécies de Butiá.

Muitas patologias são desencadeadas pelo excesso de radicais livres no organismo, e são nessas rotas que agem os compostos antioxidantes. Além disso, sabe-se que a presença das enzimas como GalLDH e NADH desidrogenase em frutos ricos em compostos bioativos é essencial para a produção de AA.

Alterações na regulação dessas enzimas pode afetar essas rotas metabólicas como produção de antioxidantes e de energia pela planta. Por isso, a construção de um modelo tridimensional da enzima NADH desidrogenase poderá proporcionar uma valiosa informação, visto que sua atividade e função está diretamente associada à sua configuração espacial. A partir daí, pode-se identificar seus alvos moleculares e interações dentro de um organismo (BATISTA, 2015; LESK, 2019).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial antioxidante dos extratos obtidos a partir da polpa do fruto de *Butia* sp. e propor modelos de estrutura *in silico* para componentes enzimáticos de seu metabolismo antioxidativo.

#### 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 3.2.1. Verificar a atividade antioxidante *in vitro* de dois diferentes extratos de *Butia* sp.;
- 3.2.2. Determinar o conteúdo de ácido ascórbico de dois extratos de *Butia* sp.;
- 3.2.3. Comparar os resultados de atividade antioxidante e do conteúdo de ácido ascórbico encontrados nos diferentes extratos de *Butia* sp.;
- 3.2.4. Construir um modelo tridimensional de um componente enzimáticos que participa da via metabólica antioxidativa de *Butia* sp. por meio de análises *in silico*.

## 4. REFERENCIAL TEÓRICO

### 4.1. O BUTIÁ

Butiá é um fruto que leva o nome original de sua palmeira, que pertence à família *Arecaceae*. A palmeira cresce em regiões de clima subtropical, em áreas abertas e em florestas de araucárias de forma natural. Seu tamanho pode variar de um a quatro metros de altura, alcançando a idade reprodutiva em oito a dez anos (FERRÃO, 2012; FARIA *et al.*, 2008; FUJITA, 2012).

Por ser de crescimento e desenvolvimento lento e sofrer exploração extrativista, pode ser considerada uma espécie da flora brasileira ameaçada de extinção. O período de germinação das sementes é em torno de 24 semanas, enquanto que a primeira frutificação pode demorar até 10 anos (FERRÃO, 2012; FARIA *et al.*, 2008; FUJITA, 2012).

O Butiá possui alto valor comercial agregado. Seus produtos à base de frutos e folhas são amplamente comercializados pela população local. Sua palmeira é resistente a baixas temperaturas e possui uma bela arquitetura, fazendo com que seja utilizada no paisagismo e ornamentação (ESLABÃO, M. P., PEREIRA, P. E. E., BARBIERI, R. L., & HEIDEN, 2016).

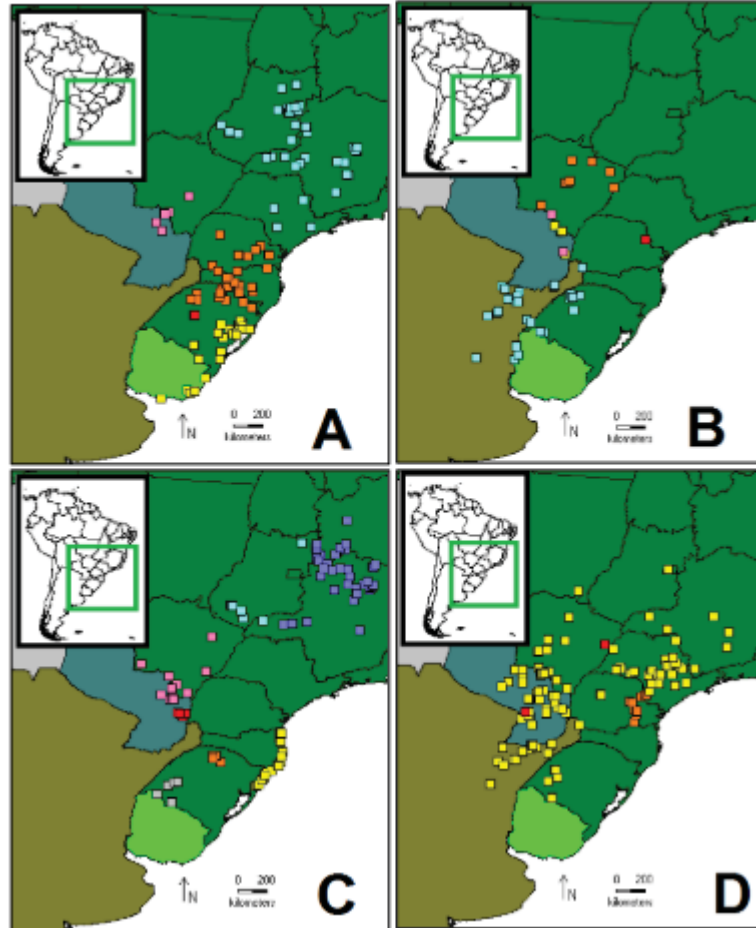


**Figura 01:** Palmeira *Butiá* sp., localizada no município de Marechal Cândido Rondon, Paraná.

São registradas aproximadamente 20 diferentes espécies de Butiá na América do Sul. Estes geralmente distribuem-se em grupos chamados Butiazais. No Brasil, são descritas 19 espécies que se encontram espalhadas pelas regiões Sul, Sudeste, Centro-Oeste e Nordeste. Uruguai, Paraguai e Argentina também possuem diferentes espécies da palmeira (ESLABÃO, M. P., PEREIRA, P. E. E., BARBIERI, R. L., & HEIDEN, 2016).

Na região Leste do Paraguai e no estado do Mato Grosso do Sul, encontram-se a maior diversidade de espécies, ocorrendo nove tipos de Butiá, cuja distribuição pode ser visualizada na Figura 2. A grande diversidade da planta encontra em diferentes na regiões, ocasiona uma relativa dificuldade na classificação taxonômica e diferenciação entre espécies (ESLABÃO, M. P., PEREIRA, P. E. E., BARBIERI, R. L., & HEIDEN, 2016; PEREIRA, 2011). Na região Oeste do Paraná, são mais comuns as espécies *B. marmorii*, *B. paraguayensis*, também podendo ocorrer *B. exospadix*,

*B. leptospatha* e *B. eriospatha* (ESLABÃO, M. P., PEREIRA, P. E. E., BARBIERI, R. L., & HEIDEN, 2016).



**Figura 02:** Distribuição geográfica de Butiá: **A:** *B. archeri* (azul), *B. eriospatha* (laranja), *B. lepidotispata* (rosa), *B. odorata* (amarelo) e *B. witeckii* (vermelho); **B:** *B. exospadix* (amarelo), *B. leptospatha* (rosa), *B. matogrossensis* (laranja), *B. pubispata* (vermelho) e *B. yatay* (azul). **C:** *B. campicola* (rosa), *B. capitata* (roxo), *B. catarinensis* (amarelo), *B. exilata* (laranja), *B. lallemantii* (cinza), *B. marmorii* (vermelho) e *B. purpurascens* (azul). **D:** *B. arenicola* (vermelho), *B. microspadix* (laranja), *B. paraguayensis* (amarelo). FONTE: (ESLABÃO, M. P., PEREIRA, P. E. E., BARBIERI, R. L., & HEIDEN, 2016).

Os frutos desta palmeira são muito apreciados pela população pela facilidade de obtenção e sabor intenso e singular, dando ao Butiá o nome popular de coquinho-azedo. O fruto, apresentado na Figura 3, é ovoide, de cor variando entre amarelo, laranja e vermelho. Apresentam cerca de 26mm de comprimento e 11mm de diâmetro.

Estes usualmente são consumidos em forma de sucos, licores, geleias ou *in natura* (FARIA *et al.*, 2008; FUJITA, 2012; MAIA, 2017; PERALTA *et al.*, 2017).



**Figura 03:** **A:** Fruto do Butiá coletado em Marechal Cândido Rondon (inferior) e Santa Helena (superior). **B:** Butiá na palmeira.

O fruto Butiá é colhido entre os meses de dezembro e março, tendo seu pico de produção em fevereiro. A fruta é altamente perecível, sua alta acidez e baixo teor de açúcar desencorajam a população de seu consumo *in natura*, por isso é comum seu armazenamento em forma de polpa congelada (HOFFMANN *et al.*, 2017).

O Butiá é rico em compostos fenólicos, ácidos graxos, carotenoides e minerais. As substâncias bioativas presentes nesse fruto possuem eficácia na prevenção e tratamento de tumores, por suas propriedades anti-inflamatórias, imunomoduladoras e antioxidantes (FARIA *et al.*, 2008; HOFFMANN *et al.*, 2017)

Em relação aos compostos bioativos presentes nesse fruto, existem diferenças entre as espécies e variedades, bem como entre a mesma variedade com diferenças de cultivo e ambiente. Em sua composição, encontra-se cerca de 80% de umidade, 2% de lipídeos, 6% de fibras e 10% de carboidratos (FUJITA, 2012). Além disso, em uma avaliação realizada com cinco amostras diferentes de Butiá, foi constatado

valores médios de compostos fenólicos de 337,7 a 446,88mg do equivalente ácido clorogênico/100g da amostra (MISTURA *et al.*, 2018).

Quanto aos compostos fenólicos, os principais encontrados no Butiá são: ácido gálico, cafeico, hidroxibenzóico, protocatecuico, clorogênico, ferúlico e cumárico. Já os principais flavonoides descritos são: epicatequina, rutina, catequina, quercetina e kaempferol (DENARDIN *et al.*, 2015; BESKOW *et al.*, 2015).

O teor de potássio do fruto também é surpreendente, pois apresentou-se maior na polpa do Butiá do que no abacate e banana, frutas essas consideradas melhores fontes para este mineral (FARIA *et al.*, 2008; HOFFMANN *et al.*, 2017). Estudos já demonstraram a atividade do Butiá contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, atribuindo essa atividade ao alto teor de fitosteróis encontrado no extrato (FUJITA, 2012; HOFFMANN *et al.*, 2017; MAIA, 2017).

O conteúdo de AA encontra-se comparável ao teor da laranja. Quanto à pró-vitamina A, os valores relatados são semelhantes ao relatados nas frutas ditas ricas nessa vitamina, como acerola e manga (FARIA *et al.*, 2008; HOFFMANN *et al.*, 2017).

#### 4.2. METABOLISMO CELULAR E DANOS OXIDATIVOS

Para permanecermos vivos, nossas células estão em constante atividade e metabolização, processo no qual existe a produção de moléculas oxidativas. Respiração celular, crescimento, fagocitose e sinalização celular são alguns processos envolvidos na produção de espécies reativas (LIMA, 2008; SILVA *et al.*, 2022)

Devido à alta eletronegatividade do oxigênio, este oxida-se facilmente. Nesta reação, formam-se as espécies reativas de oxigênio (EROs), como o radical superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), radical hidroxil (OH) e oxigênio singleto ( $O_2$ ). O primeiro é formado a partir da redução do oxigênio molecular, obtendo uma carga negativa. Este, não possui capacidade de atravessar membranas (ALVARENGA, 2016; SILVA *et al.*, 2022). Já o  $H_2O_2$  não é demasiadamente reativo, porém, por apresentar característica química apolar, atravessa facilmente as membranas celulares. Este, gera o radical hidroxil, que é o mais reativo dos EROs. O oxigênio singleto é formado diferentemente dos demais, por reação de fotossensibilização (ALVARENGA, 2016).

Ao serem produzidos, esses compostos permanecem altamente reativos e instáveis, dispostos a reagirem com outras moléculas para estabilizarem. Isto gera uma cascata de reações chamada de estresse oxidativo, causando a peroxidação lipídica da membrana, agressão ao DNA e aos tecidos. Os danos relacionados ao estresse oxidativo já foram associados a diversas doenças, entre elas artrite, doenças cardiovasculares, tumores, disfunções cognitivas entre outros (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; LIMA, 2008; PARDINHO *et al.*, 2020; ROCKETT *et al.*, 2020; VENTUROSO *et al.*, 2011).

Entre os radicais livres e espécies reativas, podemos citar o radical hidroxil como a mais reativa. Forma-se no organismo principalmente pelas reações do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> com metais, ou pelas radiações ionizantes. O ataque constante e exagerado desses radicais livres ao organismo pode ser o pontapé para desencadear doenças como o câncer (BAGANHA; PEREIRA, 2018; BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; PARDINHO *et al.*, 2020).

Danos oxidativos também geram deformação na conformação de proteínas cerebrais pela alta demanda de oxigênio, processo que também gera muitas EROs. O estresse oxidativo nessa região pode levar a danos neuronais, como lesão mitocondrial e lesão no DNA, problemas que aceleram o envelhecimento e o aparecimento de doenças neurodegenerativas como Alzheimer e Parkinson (SILVA *et al.*, 2022).

No sangue, a oxidação lipídica pode provocar alterações nas paredes dos vasos sanguíneos, danos estes relacionados a doenças como trombose e acidente vascular cerebral. No DNA, quando estes reagem quebrando a cadeia, podem ocorrer alterações na ordem das bases nitrogenadas, aumentando a probabilidade de ocorrência de mutações (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; LIMA, 2008).

#### 4.3. COMPOSTOS ANTIOXIDANTES E SUA CLASSIFICAÇÃO

Os radicais livres e EROs são estabilizados por substâncias chamadas antioxidantes, também presentes em condições normais do organismo. Ao reagirem, antioxidantes doam um elétron ao radical, porém permanecem estáveis, pausando a reação em cadeia (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; FERREIRA, 2020; HAMINIUK *et al.*, 2012; QUILES *et al.*, 2020).

Como antioxidante denomina-se toda substância com poder de oxidar-se, doando um elétron para estabilizar um radical livre. Eles podem ser classificados em endógenos (produzidos internamente no organismo humano) ou exógeno (deve ser adquirido através da alimentação) (LIMA, 2008).

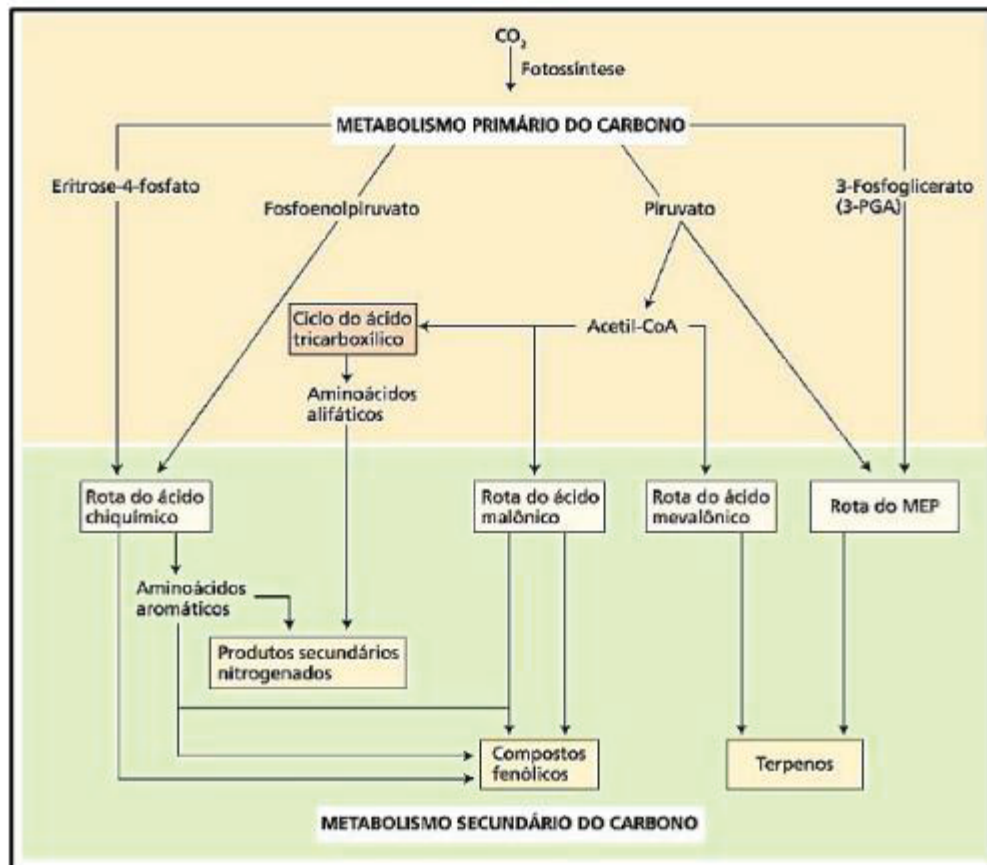
Os antioxidantes de origem endógena, podem agir diretamente nos radicais livres, como as proteínas ligadas ao ferro, peptídeos de histidina e Glutathione (GSH), ou enzimaticamente, como as enzimas Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Glutathione Peroxidase (GPx). Já os exógenos, são consumidos a partir de alimentos ricos em vitaminas, minerais e compostos fenólicos, como frutas e verduras (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; LIMA, 2008; SILVA *et al.*, 2016).

#### 4.3.1 ANTIOXIDANTES EXÓGENOS

Os compostos classificados como antioxidantes exógenos são produzidos pelas plantas, no chamado metabolismo secundário, em resposta a algumas situações, como luz solar, estresse e predadores. Os metabólitos secundários não são essenciais para a vida da planta, diferente dos metabólitos primários, porém, auxiliam-na em seu processo de desenvolvimento (HAMINIUK *et al.*, 2012; LUZ, 2018).

No metabolismo primário, são formados compostos com função estrutural e de armazenamento de energia, como proteínas, carboidratos, lipídeos e ácidos nucleicos. Estes, são produzidos por todos os organismos do reino vegetal, enquanto que os metabólitos secundários são produzidos apenas em algumas classes vegetais (LUZ, 2018).

Os metabólitos secundários são classificados de acordo com sua origem como compostos fenólicos, nitrogenados e terpenóides (HAMINIUK *et al.*, 2012; LUZ, 2018). Tanto metabolismo primário como secundário, relacionados a origem dos compostos fenólicos, nitrogenados e terpenóides estão apresentados na Figura 4.



**Figura 4:** Compostos formados no metabolismo primário pelo metabolismo do carbono e sua transformação em metabólitos secundários: compostos nitrogenados, fenólicos e terpenóides. FONTE: TAIZ, ZEIGUER, 2009.

Os compostos fenólicos ou fenóis são encontrados em sua maioria em frutos, cereais, vegetais e bebidas. Normalmente estão relacionados com a defesa contra radiação ultravioleta ou agressão por patógenos. Essas substâncias, possuem em sua estrutura um anel aromático com uma ou mais hidroxilas funcionais, e representam cerca de 10.000 compostos (PANDEY; RIZVI, 2009; LUZ, 2018).

Estes compostos podem ser divididos em classes: fenóis simples, ácidos fenólicos/benzoicos, ácidos cinâmicos e cumarinas, flavonoides e isoflavonoides, e taninos. Os ácidos fenólicos são divididos em hidroxibenzoicos (componentes dos taninos hidrolisáveis e menos abundantes nos vegetais consumidos pelos humanos) e hidroxicinâmicos (presentes no tomate, cerveja café, erva mate, maçã, ameixa e outras frutas, crucíferas, cereais, entre outros). Os taninos, possuem habilidade de ligar-se a proteínas e metais, inibindo enzimas. Também são responsáveis pela

adstringência de frutos e outros vegetais. Ácido gálico e ácido elágico são exemplos de precursores dos taninos hidrolisáveis (LUZ, 2018).

Os ácidos cinâmicos mais conhecidos incluem seus derivados mais famosos como: ácido p-cumárico, ácido cafeico, ácido ferúlico e ácido sinápico. Já as cumarinas, apresentam diversas atividades nas plantas e suas atividades biológicas incluem: regulador hormonal, vasodilatador, broncodilatador, analgésico entre outros (LUZ, 2018).

Os flavonoides estão amplamente presentes no reino vegetal, e são responsáveis por diversas funções como: proteção contra patógenos e raios ultravioletas, controle da ação de hormônios vegetais, atração de polinizadores, ação antioxidantes, entre outros. Sua atividade biológica inclui: Atividade antitumoral, agregação plaquetária, atividade antiinflamatória, antioxidante, entre outras (LUZ, 2018).

#### 4.3.2 ANTIOXIDANTES ENDÓGENOS

Os antioxidantes endógenos são produzidos pelo próprio organismo como forma de proteção contra os radicais livres. Os antioxidantes endógenos primários são substâncias que quelam com os radicais livres impedindo sua formação, como por exemplo o ferro, ferritina e albumina (LIMA, 2008; LUZ, 2018).

As enzimas antioxidantes como a Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT), Glutaciona Peroxidase (Gpx) e Glutaciona Redutase (GR) fazem parte dos antioxidantes endógenos secundários. A Superóxido Dismutase (SOD) age inibindo o oxigênio singlete e o radical superóxido, prevenindo a formação do radical hidroxil. É uma enzima antioxidante essencial contra os efeitos maléficos das EROs (LIMA, 2008).

A CAT é uma enzima abundante na natureza e se encontra em vários tecidos. Ela atua na eliminação do  $H_2O_2$ , gerando água e oxigênio. A Gpx tem grande importância na proteção contra a peroxidação lipídica. Causa a peroxidação da glutaciona (GSSG), visando a redução do  $H_2O_2$  (LIMA, 2008). Já a GR transforma a GSSG em glutaciona tiol (GSH), substância utilizada pelas células para reduzir o peróxido de hidrogênio (LIMA, 2008).

As enzimas antioxidantes atuam de forma ordenada para manter o organismo em homeostase. Nas plantas, diferentemente dos animais, também é possível notar

a presença das enzimas APXs e GPXs. A APX é uma peroxidase que atua na remoção intracelular de  $H_2O_2$ , utilizando o ascorbato como substrato. Ela catalisa a primeira etapa da rota Ascorbato-Glutationa, a mais importante rota antioxidante das plantas, que inibe o  $H_2O_2$ , principalmente no cloroplasto. A GPX utiliza a glutathione reduzida como substrato. Também nesta rota atuam monodehidroascorbato redutase (MDHAR), a dehidroascorbato redutase (DHAR), e a glutathione redutase (GR) (ALVARENGA, 2016).

#### 4.4 ANTIOXIDANTES ALIMENTARES NO COMBATE A DOENÇAS

As EROs e os radicais livres são substâncias potencialmente patogênicas produzidas pelo organismo. Desta maneira, uma desregulação na homeostase redox pode acarretar em graves consequências. Com a oxidação excessiva das proteínas celulares, ácidos nucleicos e lipídeos, um pontapé é gerado para patologias como Doenças neurodegenerativas (SILVA et al., 2022) e doenças cardiovasculares. Dessa forma, a importância de antioxidantes de origem natural se prova cada vez maior em estudos de tratamento e prevenção de diferentes enfermidades (ALVES; ABREU, 2021).

Algumas vitaminas obtidas pela alimentação atuam neutralizando diretamente radicais livres, e conseqüentemente diminuindo os danos por eles causados. A espécie *Butia capitata* (Becc. 1916), apresenta considerável atividade antioxidante, sendo que o fruto possui altos valores de AA e grande quantidade de compostos fenólicos. A quantidade destes compostos varia entre espécies, conforme o genótipo da planta, composição do solo e condições climáticas (MAGALHÃES et al., 2017).

Estudos com polifenóis demonstram que suas ações benéficas ao organismo podem prevenir ou até tratar doenças. O consumo a longo prazo de alimentos ricos nessas substâncias pode proteger o organismo de diversas patologias como por exemplo doenças cardiovasculares e neurodegenerativas (JUSTINO, 2021; QUILES et al., 2020; MAJUNDER et al., 2019; GOLDBERG et al., 2017).

O AA é um antioxidante que previne de forma eficiente a ação de radicais livres tóxicos e outras EROs formadas no metabolismo celular. Ele também atua como cofator de enzimas do metabolismo vegetal, no ciclo celular, na proteção contra patógenos e na atividade fotossintética (MATOS, 2021).

O AA é absorvido por todo trato gastrointestinal e participa da regeneração da vitamina E. Alguns estudos mostraram sua importância ao organismo, revelando que altas concentrações de AA relacionam-se com menor risco de desenvolvimento de Diabetes Mellitus tipo 2 (CATANIA; BARROS; FERREIRA, 2009; ESPINDOLA, 2019). Além disso, o AA é essencial para a biossíntese de compostos como colágeno, carnitina e neurotransmissores (PRAKASH e BASKARAN, 2018).

Outros estudos ainda mostram que a suplementação de AA está associada com a diminuição dos níveis de Proteína C reativa e F2-isoprostano, ambos marcadores inflamatórios e de estresse oxidativo. Apesar dos benefícios comprovados, o uso de AA em alguns casos permanece controverso, por isso há necessidade de novos trabalhos demonstrando seu efeito protetor no organismo (CATANIA; BARROS; FERREIRA, 2009; ESPINDOLA, 2019).

Em vista a relação entre o potencial antioxidante do AA e a importância dessa atividade para o sistema biológico, estudos de base heteróloga podem fornecer subsídios para estudos sobre danos teciduais e sobre o processo de envelhecimento humano (MATOS, 2021).

#### 4.5 VIA METABÓLICA ANTIOXIDATIVA DA NADH DESIDROGENASE

Diferente dos demais organismos, os vegetais possuem a enzima L-galactono-1,4-lactona desidrogenase (GalLDH) que possui um papel importante na produção de AA. A GalLDH tem sido alvo de recentes pesquisas, que demonstraram que sua estrutura está ligada ao complexo I da cadeia transportadora de elétrons, a NADH desidrogenase. Em vegetais, a GalLDH é necessária para a formação e funcionamento adequado do complexo I, além da doação de elétrons para a cadeia respiratória quando está catalisando a síntese de AA (MATOS, 2021).

A enzima GalLDH é uma aldonolactona oxirredutase cujo papel é transformar uma molécula aldonolactona em AA (MATOS, 2021). A GalLDH, ao oxidar o GalL em AA - com a liberação de dois elétrons para o citocromo C - é a enzima responsável pela última etapa de formação de AA. Desta forma, tanto a superexpressão como o silenciamento do gene da GalLDH podem impactar no nível de AA das plantas (YU *et al.*, 2020; MATOS, 2021).

A enzima NADH desidrogenase, também chamado de Complexo I, ou NADH: uniuquinona-oxidoreductase, é um complexo de proteínas transmembrana de

bombeamento de prótons. Nas mitocôndrias, o Complexo I é o principal ponto de entrada de elétrons para a cadeia respiratória e possui uma estrutura em formato de “L”. Ela apresenta um braço localizado na membrana interna, relacionado ao transporte de prótons e o outro braço se estendendo para a matriz mitocondrial, relacionado à oxidação do NADH (MATOS, 2021)

A partir dessas informações, é possível inferir que existe uma ligação entre NADH desidrogenase, a regulação da GalLDH, e a formação de AA. Acredita-se que outras subunidades do complexo I sejam importantes para a regulação de GalLDH por controlarem a velocidade do fluxo de elétrons através deste complexo, a partir da oxidação do NADH (MILLAR *et al.*, 2003).

Para o melhor entendimento da produção de um composto antioxidante essencial para as plantas, como o AA, e sua relação com as enzimas NADH desidrogenase e GalLDH, é desejável conhecer melhor suas estruturas tridimensionais. A enzima NADH desidrogenase ainda não possui sua estrutura completamente elucidada, e com isso, outras funções podem permanecer desconhecidas.

Portanto, o estudo de genes, proteínas e rotas metabólicas são necessários, para melhor entendimento do funcionamento dos organismos, dessa forma facilitando a busca por novos fármacos, bem como para melhoramentos genético destas plantas (ALVARENGA, 2016).

#### 4.6 ESTUDOS *IN SILICO*

Estudos computacionais, ou *in silico*, buscam elucidar as reações entre proteínas e ligantes e catalogar interações e vias de sinalização celular ainda não vistas. Os benefícios desses estudos podem ser visualizados na otimização da produção de novas moléculas e fármacos (BATISTA, 2015; LESK, 2019), ou ainda para manipulação de conteúdo de substâncias de interesse dentro de alimentos, seja para aumentar sua importância medicinal, melhorar o sabor ou aumentar a resistência, na chamada engenharia genética (LESK, 2019; LUZ, 2018).

Conhecer a estrutura tridimensional de uma proteína, é uma poderosa via de desenvolvimento de fármacos ou terapias para determinada enfermidade. A partir do conhecimento da sequência de aminoácidos que compõe uma proteína, diversos

programas computacionais podem prever sua estrutura tridimensional, e resolver esse grande problema da ciência atual (LESK, 2019; LUZ, 2018).

Uma proteína é formada por inúmeros aminoácidos. Estes enovelam-se de diversas maneiras para formar estruturas tridimensionais que configuram sua função no meio biológico. Por existirem diferentes formas de uma proteína moldar-se, fica difícil a previsão de sua estrutura (BATISTA, 2015; SILVA; BASTOS; SANTOS, 2021).

Com o avanço tecnológico, alguns softwares foram programados para sugerir a estrutura de proteínas desconhecidas, com base em diversas interações moleculares ou em moldes já existentes. Desta forma, podemos ter uma melhor compreensão de seu funcionamento, também sendo possível entender como controlá-la ou modificá-la, afim de criar um ligante, afetar um microrganismo, ou até inibir ou aumentar a produção de uma determinada molécula (BATISTA, 2015; SILVA; BASTOS; SANTOS, 2021).

As técnicas padrão utilizadas para prever a estrutura proteica são: cristalografia de raios X e Ressonância Magnética Nuclear (NMR). Essas técnicas são muito efetivas, porém demandam tempo e muitos recursos, além de que, em alguns casos, podem não funcionar corretamente. Sendo assim, os métodos de modelagem computacional exercem um papel fundamental para a predição de estruturas de uma forma rápida, simples e econômica (BATISTA, 2015; SILVA; BASTOS; SANTOS, 2021).

São duas as principais formas de moldar uma proteína computacionalmente, de acordo com sua sequência de aminoácidos: baseando-se em moldes (por homologia e *threading*) ou independentes de molde (*ab initio*), cada uma delas abrangendo diferentes abordagens computacionais (SILVA; BASTOS; SANTOS, 2021).

A modelagem por homologia, considera o princípio de que proteínas com sequências semelhantes de aminoácidos enovelam-se em estruturas semelhantes. Por isso, uma proteína com estrutura conhecida, cuja a sequência de aminoácidos tiver identidade maior de 30% com a proteína de interesse, pode ser utilizada como molde. Para uma construção adequada da estrutura da proteína, ocorre o alinhamento das sequências, e é interessante a busca por moldes com identidade acima de 70%, além disso, com similaridade e cobertura entre elas (BATISTA, 2015; LESK, 2019; SILVA; BASTOS; SANTOS, 2021).

Na modelagem por *Threading*, ocorre a busca por homólogos estruturais de fragmentos da sequência. Ela é mais utilizada em casos de baixo grau de similaridade

com a proteína molde. Quando falamos em modelagem independente de molde, a estrutura é formada a partir de métodos matemáticos, aplicados por softwares, em que ocorre a previsão do modelo a partir de leis da física. Esse método é mais demorado e limitado para proteínas menores, de até 200 aminoácidos (SILVA; BASTOS; SANTOS, 2021).

Após a construção de um modelo, este deve ser analisado quanto á qualidade. Nessa etapa pode ocorrer o refinamento do modelo, em que há correções e reestruturações, feitos a partir de softwares. Em seguida, pontua-se o modelo, analisando cada parâmetro, afim de determinar o melhor representante (BATISTA, 2015; SILVA; BASTOS; SANTOS, 2021).

Existem diversas pontuações para determinar a qualidade, uma delas é o QMEAN, que descreve os principais aspectos geométricos das estruturas de proteínas. Existe também o chamado gráfico de Ramachandran, que mostra a porcentagem de aminoácidos em regiões permitidas (melhores modelos) ou proibidas (modelos ruins), e também a posição destes em relação aos ângulos de torção *phi* e *psi* (BATISTA, 2015; SILVA; BASTOS; SANTOS, 2021).

Outra pontuação importante é o Clashscore, que avalia o número de sobreposições estéricas graves por 1000 átomos. Quanto menor este valor, maior o percentual, melhor é o modelo. Já o Molprobability score une vários critérios como clashscore, rotâmero e Ramachandran em um único valor, para sugerir qualidade. Ela pode variar de 0 a 100%. Valores próximos de 100, indicam melhores estruturas (BATISTA, 2015; LESK, 2019; SILVA; BASTOS; SANTOS, 2021).

Em vista a importância da GalLDH e do complexo 1 (NADH desidrogenase) na produção de ácido ascórbico no Butiá, buscas por sequenciar e moldar esta proteína se tornam maiores. A partir da modelagem molecular do complexo 1 da CTE<sub>m</sub>, é possível estudar e modelar sua atividade da produção de ácido ascórbico e outras substâncias antioxidantes de extrema importância para vários seres vivos, inclusive seres humanos.

**5. ARTIGO**

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS DE *Butia* sp. E ESTUDO *in silico* DE COMPONENTES DA VIA METABÓLICA ANTIOXIDATIVA

ARTIGO A SER SUBMETIDO Á REVISTA BMC COMPLEMENTARY

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS DE *Butia* sp. E ESTUDO *in silico* DE COMPONENTES DA VIA METABÓLICA ANTIOXIDATIVA

Valéria Maria Weiler<sup>1</sup>, Mauricio Bedim<sup>2</sup>, Kadima Nayara Teixeira<sup>2,3</sup>, Ana Paula Carneiro Brandalize<sup>1,2</sup>, Cinthia Façanha Wendel<sup>4</sup>.

1 - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Paraná, Campus Palotina.

2 – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Paraná, Campus Toledo.

3 - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná, Campus Palotina.

4 - Universidade Federal do Paraná, Campus Toledo.

## AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS DE *Butia* sp. E ESTUDO *in silico* DE COMPONENTES DA VIA METABÓLICA ANTIOXIDATIVA

Valéria Maria Weiler<sup>1</sup>, Mauricio Bedim<sup>2</sup>, Kadima Nayara Teixeira<sup>2,3</sup>, Ana Paula Carneiro Brandalize<sup>1,2</sup>, Cinthia Façanha Wendel<sup>4</sup>.

### RESUMO

O Butiá é um fruto nativo e de fácil acesso no Brasil, fonte potencial compostos bioativos, entre eles, os antioxidantes. A atividade antioxidante dos compostos naturais é cada vez mais estudada afim de identificar substâncias ainda não descritas que possam auxiliar na produção de novos fármacos. O ácido ascórbico (AA ou vitamina C) é uma molécula produzida em plantas, que participa de diversas reações metabólicas. Sua última etapa de produção envolve a enzima GalLDH, que está ligada a enzima transportadora de elétrons NADH desidrogenase. A elucidação da estrutura tridimensional desta última enzima pode auxiliar no estudo de sua relação com a regulação da GalLDH e na produção de AA. O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial antioxidante *in vitro* do extrato de *Butia capitata* (BC) e *Butia eriospatha* (BE), seu conteúdo de AA, bem como determinar a estrutura tridimensional da enzima relacionada à via metabólica antioxidativa, NADH desidrogenase. Os extratos das espécies de Butiá foram avaliados quanto à atividade antioxidante pelos ensaios de DPPH e ABTS e seu conteúdo de compostos fenólicos totais e de ácido ascórbico (AA) foram determinados. Os modelos tridimensionais da enzima NADH desidrogenase foram feitos por modelagem molecular por homologia pelo Swiss-model. Foi notado a coloração mais escura para o menor fruto, o BE. A capacidade antioxidante do extrato de BE foi superior ao do BC, bem como para o conteúdo fenólico total. A quantidade de AA foi alta para ambos os frutos, e comparável ao valor da laranja, com maiores valores para BE. Os modelos tridimensionais construídos foram representativos e de qualidade, e mostraram-se muito semelhantes para ambas espécies, porém não 100% idênticas, podendo ser essa uma das explicações das diferentes atividades dos frutos. Os extratos aqui apresentados são excelentes fontes naturais e de fácil acesso de compostos fenólicos e AA, antioxidantes que podem auxiliar na busca de novos medicamentos.

Palavras-chave: Butiá, ácido ascórbico, NADH desidrogenase, GalLDH.

## INTRODUÇÃO

No cenário atual, há uma busca por compostos que possam servir de substrato para o desenvolvimento de novos fármacos. Popularmente, o tratamento e cura para várias enfermidades é realizado utilizando partes de vegetais em diferentes tipos de preparo, um conhecimento que passa de geração em geração (JUSTINO, 2021).

Dentre os diferentes compostos descritos em plantas e frutos estão os antioxidantes. Antioxidantes são moléculas estáveis que inibem ou bloqueiam a ação maléfica causada pelos radicais livres. Eles são capazes de doar um elétron para o radical livre, que se torna estável, reduzindo seus efeitos danosos ao organismo. Vários estudos já demonstraram seus efeitos na prevenção de doenças, entre elas, câncer (LIU, 2005), Alzheimer e Parkinson (SILVA *et al.*, 2022) diabetes (ABDILLE *et al.*, 2005), doenças cardiovasculares e circulatórias (STOCLET *et al.*, 2004).

Antioxidantes podem ser de origem endógena (produzidos pelo corpo) ou exógena (adquiridos através da alimentação) (PEREIRA, 2011; SILVA *et al.*, 2022). Os antioxidantes exógenos são produzidos pelas plantas através de seu metabolismo secundário, em resposta a algumas situações, como luz solar, estresse e predadores (HAMINIUK *et al.*, 2012; LUZ, 2018). Eles são consumidos pelo ser humano a partir de alimentos ricos em vitaminas, minerais e compostos fenólicos, como frutas e verduras (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; LIMA, 2008; SILVA *et al.*, 2016).

O Butiá é um fruto de uma palmeira nativa do Sul do Brasil. Ela está amplamente distribuída nos estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Conhecido por seu potencial antioxidante, o fruto pode ser consumido *in natura* ou utilizado para fazer sucos e licores, porém poucos estudos que detalham seus compostos bioativos (MAGALHÃES *et al.*, 2017).

O ácido ascórbico (AA), ou vitamina C, é um antioxidante que previne de forma eficiente a ação de radicais livres tóxicos e outras espécies reativas de oxigênio (EROs) formadas no metabolismo celular. O AA também atua como cofator de enzimas do metabolismo vegetal, no ciclo celular, na proteção contra patógenos e na atividade fotossintética (MATOS, 2021).

Devido à sua grande contribuição para o organismo, o AA tem sido estudado quanto a seu metabolismo e produção em vegetais. Sabe-se que sua formação se dá em duas grandes etapas: a primeira no citosol e a segunda nas mitocôndrias. A enzima L-galactona-1,4-lactona desidrogenase (GalLDH), localizada na mitocôndria,

possui uma função intransferível na última etapa desse sistema, transformando galactono-1,4-lactona (GAL) em AA (MATOS, 2021).

A GalLDH tem sido alvo de recentes pesquisas, que demonstram sua estrutura ligada ao complexo I da cadeia transportadora de elétrons. Foi descoberta que sua função nos vegetais está relacionada a formação adequada do complexo I, além da doação de elétrons para a cadeia respiratória quando está catalisando a síntese de AA (MATOS, 2021).

Desta forma, é possível inferir que existe uma ligação entre a formação de AA, a enzima GalLDH e o complexo I da cadeia respiratória, denominada NADH desidrogenase. Diversos estudos buscam conhecer e regular a produção de vitamina C nos vegetais. Acredita-se que outras subunidades do complexo I sejam importantes para a regulação de GalLDH por controlarem a velocidade do fluxo de elétrons através deste complexo, a partir da oxidação do NADH (MILLAR *et al.*, 2003).

A GalLDH, ao oxidar o GalL em AA liberação de dois elétrons para o citocromo c. Esta é a enzima responsável pela última etapa de formação de AA e por isso, tanto a superexpressão como o silenciamento do gene da GalLDH podem impactar no nível de AA das plantas (YU *et al.*, 2020; MATOS, 2021).

O objetivo deste estudo foi determinar o potencial antioxidante e determinação de vitamina C de dois extratos diferentes de *Butiá* sp., bem como ilustrar uma estrutura tridimensional para a enzima NADH desidrogenase. Estudos *in silico*, sobre as reações entre proteínas e ligantes, buscam elucidar e catalogar interações e vias de sinalização celular ainda não vistas. Os benefícios desses estudos podem ser visualizados na otimização da produção de novas moléculas e fármacos, diminuindo tempo e recursos necessários (BATISTA, 2015; LESK, 2019).

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **ANÁLISES IN VITRO**

#### **Coleta e armazenamento do material**

Dois tipos de frutos de Butiá foram utilizados neste trabalho. O primeiro, *Butia capitata* (BC), foi colhido da safra de 2022, no município de Marechal Candido Rondon, Oeste do paraná, de latitude -24.557 e longitude -54.0571. O Segundo fruto, *Butia eriospatha* (BE), colhido também da safra de 2022, no município de Santa Helena, região oeste do Paraná, de latitude: -24.8585 e longitude: -54.336

Os frutos foram colhidos e separados manualmente. Os frutos sadios, sem manchas aparentes e deformações, foram lavados em água corrente e armazenados em sacos plásticos em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$  para posterior extração e análise de seus compostos.

### **Análise visual dos frutos**

Após descongelamento dos frutos, estes foram visualmente avaliados quanto à coloração e tamanho, este sendo medido em cm, comparando os dois butiás colhidos com os resultados já descritos na literatura.

### **Processamento do material e preparo do extrato**

Todas as técnicas foram realizadas separadamente para BC e BE, afim de evitar a contaminação cruzada. Antes dos procedimentos, os frutos foram descongelados à temperatura ambiente. Logo após foram higienizados com uma solução de hipoclorito 0,1% (v/v) durante 5 minutos para descontaminação. Em seguida, os frutos foram enxaguados em água corrente abundante e, posteriormente, em água destilada e então secos utilizando papel toalha.

Para evitar a degradação dos compostos antioxidantes devido a exposição à luz, todas as etapas a seguir foram realizadas sem luz incidente. A polpa dos frutos foi separada manualmente e colocada em estufa de circulação de ar, em cima de placas de tela, separando-se os tipos de Butiá, sem sobreposição, a uma temperatura de  $50^{\circ}\text{C}$ , por 5 dias. Após a secagem completa da polpa dos Butiás, estes foram recolhidos separadamente em potes herméticos abrigados da luz e umidade, e triturados em moinho de facas.

A metodologia utilizada foi adaptada de ZHOU *et al.*, 2015 e Rockett *et al.*, 2020. Para obtenção do extrato, 2,5g do material seco e triturado foi acondicionado em béquer de vidro com 100mL de solução extratora, composta de água destilada e álcool etílico 1:1 (v/v). Essa mistura foi sonicada em banho ultrassônico por 2 minutos. Posteriormente, a mistura foi centrifugada a 8000rpm por 10 min a  $4^{\circ}\text{C}$ .

O sobrenadante foi coletado em béquer e armazenado em refrigerador. Este processo foi repetido até a obtenção total de 200mL de extrato para cada Butiá. O sobrenadante foi filtrado em voal e separado em béqueres cobertos com papel alumínio. Estes foram acondicionados sobre uma placa de aquecimento a  $40^{\circ}\text{C}$  dentro de uma capela de exaustão para evaporação total da solução extratora.

Após a secagem, foram embrulhados com papel alumínio e acondicionados em lugar seco e protegido da luz. Para futuras análises, o conteúdo dos béqueres foi ressuspensionado em DMSO 10%. Este líquido foi previamente escolhido por apresentar melhor dissolução, entre os solventes metanol, etanol e DMSO 10%.

### **Determinação do conteúdo fenólico**

O conteúdo fenólico foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu, de acordo com Singleton *et al.* (1999) com modificações. Os testes foram realizados em triplicata, utilizando ácido gálico como padrão. Este é um ensaio colorimétrico, que se baseia na troca de coloração do reagente de Folin-Ciocalteu de amarelo para azul, quando reage com substâncias fenólicas, em meio alcalino (PIRES *et al.*, 2017b). A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro Multiskan Sky da Thermo Scientific a 765nm, e o resultado expresso em miligrama equivalente de ácido gálico (mg EAG) por 100 gramas de extrato.

### **Ensaio de captura de radicais livres DPPH**

Para avaliar a atividade antioxidante, utilizou-se o ensaio de eliminação de radicais livres pelo método DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) descrito por PIRES *et al.*, 2017a. Preparou-se a solução de DPPH utilizando metanol, com concentração de 32µg/mL. O padrão utilizado foi o ácido gálico.

Nesse método, a redução do DPPH pelo antioxidante da amostra, transforma sua coloração de amarelo para roxo, provocando um decréscimo na absorbância (PIRES *et al.*, 2017a). O teste foi realizado em triplicata, e as absorbâncias foram medidas em espectrofotômetro Multiskan Sky da Thermo Scientific a 517nm. Os resultados foram expressos em porcentagem de atividade antioxidante (AA%) e mg EAG por grama de extrato.

### **Ensaio de captura de radicais livres ABTS**

O segundo teste utilizado para avaliar a atividade antioxidante foi o teste de captura de radicais livres ABTS (2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolona-6-ácido sulfônico), conforme LI *et al.*, 2021. TROLOX foi utilizado como padrão antioxidante. O radical ABTS é formado a partir da reação do ABTS em água com persulfato de potássio. É um radical estável, e solúvel em água, que pode ser utilizado para amostras lipó ou hidrossolúveis. Ao reagir com um antioxidante, sua coloração muda de azul

esverdeado para incolor (LIMA, 2008). A absorbância da reação foi medida em espectrofotômetro Multiskan Sky da Thermo Scientific a 734nm. Os resultados foram expressos em inibição  $\mu\text{M}$  equivalente ao TROLOX por grama de extrato.

### **Quantificação de Ácido Ascórbico**

Foi realizado teste iodimétrico para quantificar o conteúdo de AA de ambos os extratos de Butiá, conforme AOAC, 1992. Uma solução de AA a 1% (v/v) com 50 $\mu\text{L}$  de amido 1% (m/v) foi titulada com solução tintura de iodo a 1% (m/v).

### **ANÁLISES *IN SILICO***

Para obtenção do modelo tridimensional da enzima NADH desidrogenase, foram realizadas buscas pela sequência de aminoácidos da subunidade F da enzima NADH desidrogenase, pertencente as espécies de Butiá nos bancos de dados hospedados no NCBI (*National Center for Biotechnology Information*).

### **Modelagem por homologia**

Para realizar a modelagem molecular da enzima pela técnica de modelagem comparativa ou por homologia, foram selecionados moldes (*templates*) com sequência primária de tamanho compatível à proteína alvo (cobertura de sequência), valor significativo de identidade de sequência primária (>30%), alta resolução de estrutura por meio da técnica de difração de raios-X, bem como organismo de gênero filogeneticamente próximo ao gênero alvo.

Essas análises foram realizadas por meio de alimento global de sequência utilizando o programa ClustalX2. Esse programa também foi utilizado para verificar a identidade de sequência entre da proteína de duas espécies de Butiá analisadas. A plataforma Swiss-Model (GUEx; PEITSCH, 1997) foi utilizada para realizar a modelagem molecular comparativa, de acordo com os moldes escolhidos.

### **Análise e refinamento do modelo**

A qualidade do modelo foi analisada pelos valores de GMQE (*Global Model Quality Estimation*) e QMEAN Z-score (*Qualitative Model Energy Analysis*) (BENKERT *et al.*, 2009). O modelo foi validado pelos programas da plataforma MolProbity (DAVIS *et al.*, 2007) e a compatibilidade entre a estrutura tridimensional e sua sequência primária foi analisada utilizando o programa Verify3D (EISENBERG; LÜTHY; BOWIE,

1997). Os índices analisados para classificar o definir o melhor modelo serão: MoIProbity score e Ramachandran outliers.

### **Análises Estatísticas**

Os resultados obtidos de ambos extratos foram analisados quanto á diferença significativa entre as duas espécies, BC e BE. Para as análises entre as médias de BC e BE de conteúdo fenólico, atividade antioxidante por DPPH e ABTS, e conteúdo de AA foi utilizado o teste t-Student, que realiza a comparação entre dois grupos. Os resultados foram expressos pela média, desvio padrão obtidos a partir das triplicatas, e valor de p, no qual a significância foi adotada a 5%.

## **RESULTADOS E DISCUSSÕES**

### **Caracterização física dos frutos**

Os frutos coletados em diferentes localizações geográficas e utilizadas neste estudo apresentaram diferenças visuais quanto ao seu tamanho e coloração, apresentadas na Figura 1. O fruto BC apresentou tamanho médio de 3,2 cm, compatível com o tamanho do *Butia capitata* descrito na literatura, que pode variar entre 2,5 a 4cm (LORENZI et al, 2010). O fruto BE apresentou um tamanho menor, em torno de 2,0 cm, também compatível com o descrito na literatura para o *Butia eriospatha*, com frutos que variam entre 1,4 a 2,2cm (LORENZI et al, 2010). Notou-se também em BC uma polpa mais pastosa e aguada em relação a polpa do BE.



**Figura 01:** Tamanho e coloração dos diferentes Butiás coletados em Marechal Candido Rondon (*Butia capitata*) e Santa Helena (*Butia eriospatha*), respectivamente.

As discrepâncias observadas em características biométricas dos frutos do Butiá já é descrita na literatura e demonstram que seus conteúdos, cores e tamanhos dependem do clima, região e forma de cultivo (FERRÃO, 2012; SGANZERLA, 2010).

### **Conteúdo fenólico total**

Os compostos fenólicos são amplamente distribuídos em plantas, e têm recebido atenção devido ao seu amplo potencial de ação biológica, como o antioxidante (PRUDÊNCIO *et al.*, 2012). Os compostos fenólicos são produtos secundários do metabolismo de plantas. Essas moléculas são essenciais para o crescimento e reprodução de plantas. Eles são parcialmente responsáveis pela cor, aroma e estabilidade oxidativa em alimentos (MANACH *et al.*, 2004).

Poucos são os estudos que identificaram os compostos fenólicos de extratos de Butiá, no entanto, o ácido gálico e derivados de quercetina estão presentes em grandes quantidades nos extratos de Butiá (CARNIEL *et al.*, 2017; DENARDIN *et al.*, 2015; ROCKETT *et al.*, 2020). De acordo com SGANZERLA (2010), foi possível identificar por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) que nas espécies de

*Butia capitata* e *Butia eriospatha*, o ácido gálico foi o principal componente, com 56,67% e 57,98% em cada espécie, respectivamente.

No presente estudo, o conteúdo fenólico total para o extrato de BC foi 167,72mg Equivalente Ácido Gálico (EAG) por 100g de polpa seca. Já o BE apresentou 536,20mg EAG.100g<sup>-1</sup>, como demonstrado na Tabela 1. É interessante observar que a amostra do BE que apresentou coloração mais avermelhada e escura também é a que possui maior quantidade de conteúdo fenólico total.

Em 2010, um estudo avaliou os compostos fenólicos das espécies de *Butia capitata* e *Butia eriospatha*, e encontrou um valor de conteúdo fenólico para o BE de 278,38mg.100g<sup>-1</sup> EAG, minimamente maior que o BC, que foi de 260,41mg.100g<sup>-1</sup> EAG, porém sem diferença estatisticamente significativa (SGANZERLA, 2010).

| Variáveis   | BC     |      | BE     |      | Valor de P |
|---|--------|------|--------|------|------------|
|   | Média  | DP   | Média  | DP   |            |
| <b>Cont. Fen Total</b><br>(mgEAG.100g <sup>-1</sup> ) | 167,72 | 6,36 | 536,20 | 8,73 | 0,000      |
| <b>DPPH</b><br>(mgEAG.100g <sup>-1</sup> )            | 0,00   | 0,00 | 16,30  | 0,93 | *          |
| <b>ABTS</b><br>(µM eqT.g <sup>-1</sup> )              | 25,76  | 0,87 | 47,91  | 1,04 | 0,000      |
| <b>Conteúdo AA</b><br>(mg.100g <sup>-1</sup> )        | 55,36  | 0,81 | 166,03 | 1,81 | 0,000      |

**Tabela 1:** Atividade antioxidante e conteúdo de vitamina C do extrato da polpa de BC e BE, e resultados da análise estatística t-student. Valores de p<0,05 indicam diferença estatisticamente significativa entre os extratos obtidos de diferentes espécies. \* Para DPPH, não foi possível comparação entre as médias, pois o extrato BC não apresentou valores quantificáveis para essa análise.

Este resultado está de acordo a descrição do conteúdo fenólico total de outros extratos de Butiá de diferentes espécies. Para compostos fenólicos no Butiá já foram relatadas quantidades similares, como 260,41 e 278,38mg EAG/100g (SGANZERLA, 2010), 636,95 mg equivalente de ácido clorogênico/100g de amostra fresca (PEREIRA *et al.*, 2013) e 1250 a 1192mg EAG/100g (HOFFMANN *et al.*, 2017).

O conteúdo fenólico de um fruto é produzido durante seu desenvolvimento sob condições de estresse como calor, infecções, lesões e estresse hídrico. Portanto, diferentes cultivos acarretam em diferentes quantidades desse metabólito (DENARDIN *et al.*, 2015).

Ao mesmo tempo, a capacidade antioxidante dos compostos fenólicos depende de sua estrutura química, que possui anéis aromáticos hidroxilados, capazes de doar átomos de hidrogênio e extinguir o oxigênio singlete (ADEFAGHA, 2018). O conteúdo fenólico total identificado *in vitro* nos extratos de Butiá deste estudo nos fornece uma ideia do que acontece em situações *in vivo*, indicando que ele possui um potencial antioxidante a ser explorado.

### **Conteúdo de Ácido Ascórbico**

O AA é o produto mais comum e amplamente distribuído em produtos de origem vegetal. O Butiá é conhecido por possuir altos níveis de AA em seu fruto (MARTINS *et al.*, 2019). Na determinação de ácido ascórbico, para 100 gramas de polpa desidratada, o extrato BC apresentou 55,33mg de AA e BE 166,03mg de AA. Os dois extratos apresentaram valores de AA elevados, porém o BE possui um conteúdo maior que o BC (Tabela 1).

Os valores de AA dos extratos BC e BE encontrados por Sganzerla e colaboradores (2010), foi de 23,86 e 21,34 mg.100g<sup>-1</sup> respectivamente, porém não foram considerados diferentes estatisticamente. Estes valores foram quantificados por HPLC, técnica esta que permite a quantificação a partir de uma curva padrão com um reagente puro, portanto, não quantifica as formas oxidadas.

Os resultados da literatura são 23,86 e 21,34mg AA.100g<sup>-1</sup> por SGANZERLA (2010); 503,4mg AA.100g<sup>-1</sup> por HOFFMANN *et al.* (2017); e 63,1mg AA.100g<sup>-1</sup> de amostra íntegra de FUJITA (2012). Já foi descrito na literatura valores de AA maiores na espécie *Butia eriospatha* proveniente do Paraná do que os frutos colhidos em Santa Catarina. O valor de AA para o butiá do Paraná foi quatro vezes maior que o valor encontrado para o fruto do outro estado (MAGRO *et al.*, 2006). Diferenças nos valores de AA podem estar relacionados à vários fatores como plantio, colheita, processamento, estocagem, espécie diferente, dentre outros (FUJITA, 2012).

O AA é um potente antioxidante, capaz de doar elétrons reduzindo EROs rapidamente, antes mesmo do metabolismo ativar rotas antioxidantes endógenas, como produção de enzimas. Além do seu papel de proteção de membranas e

diminuição de peroxidação lipídica na planta, o AA também participa da rota fotossintética. Ele ainda possui atividade como cofator de enzimas, no retardo da senescência foliar, na proteção contra herbívoros, entre outras diferentes atividades celulares (MATOS, 2021). Por isso, um alto conteúdo desse composto bioativo é desejado em frutos.

### **Determinação do potencial antioxidante dos extratos**

Por causa das diferentes características e mecanismos relacionados a produção de biomoléculas, os ensaios para identificar o potencial antioxidante de extratos não irão refletir com acurácia seus valores dentro de um sistema complexo (DENARDIN *et al.*, 2015). Desta maneira, a utilização de diferentes metodologias auxiliam a identificar variações na resposta a produção destes compostos em plantas (TABART *et al.*, 2009). O potencial antioxidante dos diferentes extratos foi quantificado pelos métodos DPPH e ABTS.

A avaliação da atividade antioxidante utilizando o ensaio de DPPH demonstrou uma variação no perfil fenólico dos extratos, sendo que a atividade antioxidante foi identificada apenas para o extrato BE. Isso pode ser resultado da difícil ressuspensão do extrato BC no líquido solvente, o DMSO 10% (v/v).

O extrato BC apresentou 3,03% de atividade antioxidante contra o DPPH, enquanto que seu resultado foi zero para quantidade EAG. Já para o BE, a atividade antioxidante foi 17,33%, e 16,3mg EAG por 100 gramas de polpa seca. Para atividade antioxidante, no ensaio de DPPH, resultados de 211,92 e 237,22mg EAG/100g de amostra foram encontrados por SGANZERLA (2010); e 5,64 $\mu$ M Trolox. mg.g<sup>-1</sup> de amostra seca foi relatado por FUJITA (2012). As diferenças entre métodos, padrões e analistas acarretam em discrepâncias entre os resultados (FUJITA, 2012).

O teste ABTS é um dos mais utilizados para medir a capacidade antioxidante de compostos hidrofílicos e lipofílicos de extratos de plantas (RUFINO *et al.*, 2007). O extrato BC apresentou 36,27% de inibição sobre radical ABTS e um resultado de 29,016 $\mu$ M equivalente ao Trolox/g de polpa seca. Já o extrato BE apresentou 64,06% de atividade e 48,0 $\mu$ M equivalente ao Trolox/g de polpa seca.

Estes resultados mostram-se superiores ao resultado de 25,96 $\mu$ M Trolox equivalente/g amostra fresca encontrados para o Butiá por PEREIRA (2011) e 6,37 $\mu$ M Trolox.mg.g<sup>-1</sup> de amostra seca por FUJITA (2012). O Trolox é o antioxidante biológico que tem alta capacidade para capturar EROs. Entre os dois extratos avaliados, BE

apresentou uma maior capacidade de sequestro de radicais livres que BC ( $p < 0,00001$ ).

Um estudo que avaliou a capacidade antioxidativa de extratos de *Butia eriospatha*, observou o menor valor de compostos antioxidantes quando comparado a extratos de outros frutos nativos do Brasil como pitanga e araçá (DENARDIN *et al.*, 2015). As discrepâncias entre os resultados da literatura e também em relação aos resultados deste trabalho, são explicados pelas diferentes metodologias de análises, a grande variabilidade de espécies de Butiá, localidades em que são colhidos e tipos de cultivos (FUJITA, 2012).

Quando comparados o total de compostos presentes nos extratos das duas espécies diferentes (Tabela 1), pode-se observar que o extrato de BC possui resultados estatisticamente diferentes do BE. Desta maneira, é possível concluir que BE possui maior poder antioxidante e maiores quantidades de compostos bioativos que BC em sua poupa.

## **ANÁLISES IN SILICO**

### **Análise da sequência de aminoácidos e seleção do molde de NADH desidrogenase**

A sequência primária da subunidade F da enzima NADH desidrogenase encontrada para a espécie *Butia capitata* possui 671 aminoácidos, enquanto que da espécie *Butia eriospatha* possui 696 aminoácidos. A identidade das sequências foi analisada por alinhamento global, e está apresentada na Figura 2.

CLUSTAL 2.1 MULTIPLE SEQUENCE ALIGNMENT

File: C:/Users/va\_we/OneDrive/rea de Trabalho/MESTRADO/bioinform/sequencia de dados Data Api May 06 15:02:03 2022  
Page 1 of 2

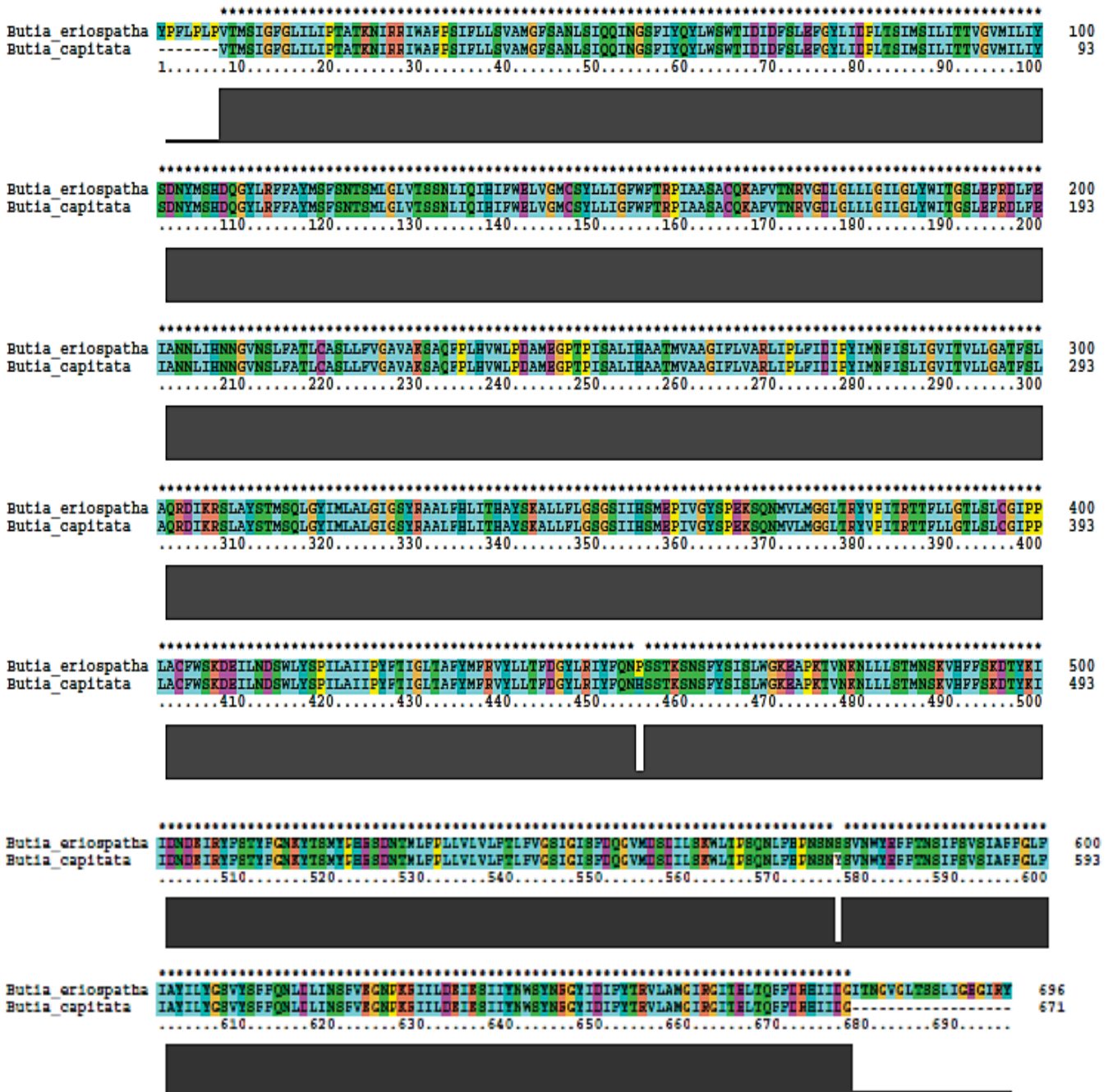


Figura 02: Alinhamento global da sequência de aminoácidos da enzima NADH desidrogenase do *Butia capitata* e *Butia eriospatha* feito pelo programa ClustalX. Resíduos com características químicas semelhantes estão identificados com a mesma cor. \* indica resíduos conservados.

A partir da imagem obtida do alinhamento das enzimas, percebe-se a semelhança entre as sequências das proteínas, que apresentam 99,7% de identidade. Foi possível observar que o *Butia eriospatha* possui uma sequência amino-terminal maior, possuindo 7 aminoácidos a mais do que o *Butia capitata*. Também no carboxi-terminal existem 18 aminoácidos a mais que o *Butia capitata*. Ao realizar o alinhamento, percebe-se a semelhança entre as sequências, e infere-se a partir daí, que as sequências de outras espécies também serão semelhantes.

### **Construção do modelo tridimensional, análise e refinamento**

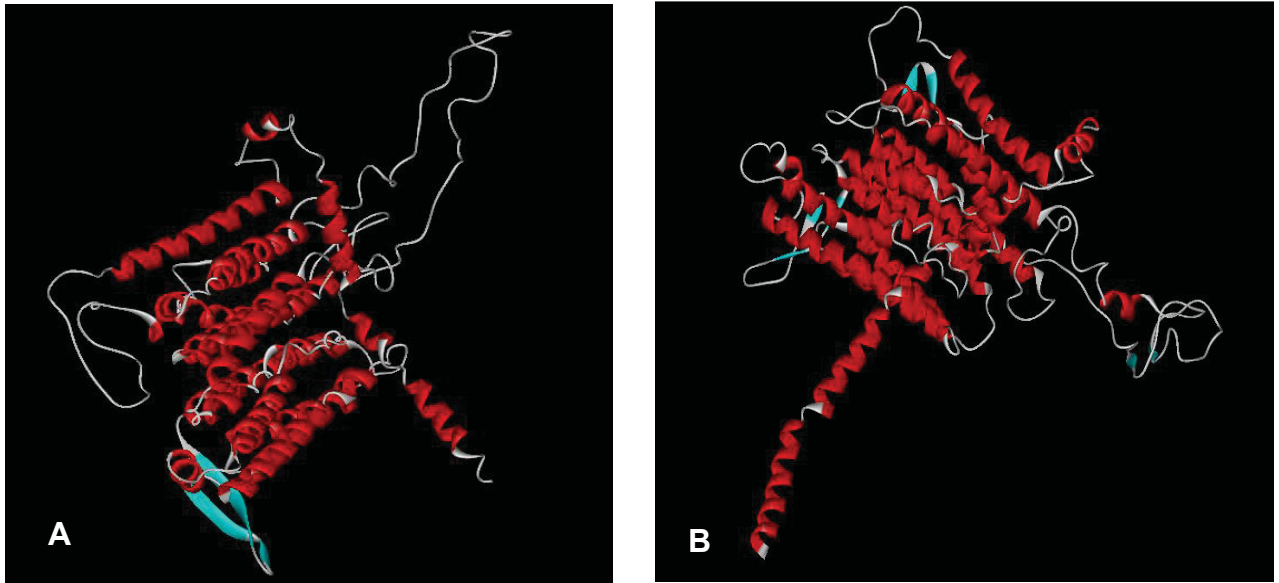
Foram construídos três diferentes modelos de estrutura a partir da seleção dos melhores moldes para ambas as espécies de Butiá.

Para o *Butia capitata*, o modelo tridimensional validado foi construído utilizando como *template* a estrutura de código 7EU3.1. Esse refere-se à subunidade F da enzima NAD(P)H quinona oxidoreductase do complexo cloroplástico. Essa enzima possui 78,23% de identidade com a sequência de aminoácidos da enzima em questão. O valor de QMEAN foi de -5,63.

Sobre a validação modelo da subunidade F da enzima NADH desidrogenase do *Butia capitata*, o valor do MolProbity score foi 1,65 (91%). A número de Ramachandran outliers foi 10 (1,62%). O valor de Clash Score foi 3,01 (98%). A figura 3A mostra a estrutura tridimensional validada da subunidade F da enzima NADH desidrogenase do *Butia capitata*.

Para o *Butia eriospatha*, o modelo validado foi construído utilizando como *template* a estrutura 7WFF.1.F, que se refere à subunidade 5 da enzima NAD(P)H quinona oxidoreductase do complexo cloroplástico, subcomplexos B, M e L no supercomplexo de transferência eletrônica de elétrons NDH-PSI de *Arabidopsis*. Essa enzima possui 73,20% de identidade com a sequência de aminoácidos da enzima em questão. O valor de QMEAN foi de -5,55.

Sobre a validação do modelo da subunidade F da enzima NADH desidrogenase do *Butia eriospatha*, o valor do MolProbity score foi de 1,58 (93%). O valor de Ramachandran outliers foi 9 (1,42%). O valor de Clash Score foi 3,04 (98%). A figura 3B mostra o modelo de estrutura tridimensional da subunidade F da enzima NADH desidrogenase do *Butia eriospatha*.



**Figura 03: A:** Visão panorâmica do modelo tridimensional da subunidade F da enzima NADH desidrogenase do *Butia capitata*. **B:** Visão panorâmica do modelo tridimensional da subunidade F da enzima NADH desidrogenase do *Butia eriospatha*. Vermelho:  $\alpha$ -hélices. Azul: folhas- $\beta$ . Branco: *loops*. Imagem feita pelo programa Verify3D. FONTE: O autor.

É possível perceber que os modelos tridimensionais obtidos para BC e BE são semelhantes, porém não possuem 100% de identidade. Isso se deve ao fato de que as sequências primárias das proteínas também têm semelhança, mas não são idênticas. Essa distinção na forma espacial das enzimas acarreta em funções e ligantes diferentes. Essa pode ser uma explicação das atividades antioxidantes distintas observadas entre os dois extratos neste estudo.

Os frutos de Butiá nativos do Sul do Brasil podem ser considerados boas fontes de antioxidantes. Seus extratos apresentam uma quantidade expressiva de compostos bioativos, como fenóis e AA. Seu fácil cultivo e consumo por seres humanos pode prevenir problemas relacionados ao stress oxidativo das células. Neste trabalho, foram observadas diferenças significativas entre os parâmetros das duas espécies, no qual BE foi considerado mais nutritivo que BC.

Uma limitação do presente estudo relaciona-se com a dificuldade de ressuspensão dos extratos, inclusive no DMSO 10%. Após a secagem das extrações e ressuspensão para análises, notou-se uma maior dificuldade em solubilizar o extrato do BC, que se apresentou mais claro e com grumos insolúveis, característicos de

fibras. Acredita-se ser essa uma das explicações relacionadas aos resultados inferiores observados em BC em relação ao BE.

Como já descrito na literatura e visualizado neste trabalho, o Butiá é um fruto altamente nutritivo. Por isso, novas pesquisas devem manter o foco em determinar os principais compostos presentes nesse fruto para determinar sua atividade biológica com estudos *in vitro* e *in vivo*. Com os dois modelos tridimensionais construídos para as duas espécies de Butiás considerados representativos e estáveis, estes podem ser utilizados para futuros estudos de função em rotas metabólicas antioxidativas. Novos estudos *in silico*, que determinem as possíveis interações com ligantes, e que busquem elucidar e catalogar interações e vias de sinalização celular ainda não vistas são necessários.

## REFERÊNCIAS

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 18th ed. Washington, D.C.: AOAC, 2002.

ADEFEGHA, S. A. **Functional foods and nutraceuticals as dietary intervention in chronic diseases; novel perspectives for health promotion and disease prevention**. *Journal of Dietary Supplements*, 15(6), 977–1009, 2018.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Oxidative stress: Relations between the formation of reactive species and the organism's defense. **Quimica Nova**, v. 29, n. 1, p. 113–123, 2006.

BATISTA, G. B. **Análise estrutural e funcional *in silico* de uma pr-5 do tipo osmotina de *Physalis angulata* com potencial atividade farmacológica**. 2015. 58 p. Trabalho de conclusão de curso (monografia) em bacharelado em farmácia, Universidade Federal de Campina Grande. Cuité, 2015.

BENKERT, P.; KÜNZLI, M.; SCHWEDE, T. QMEAN server for protein model quality estimation. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n. SUPPL. 2, p. 510–514, 2009.

CARNIEL, N. et al. Recovery of Total Polyphenols from Pomegranate and Butia : A Study of Ultrasound-assisted Extraction and Antioxidant Activity. **Indian Journal of Advances in Chemical Science**, n. i, p. 112–117, 2017.

DAVIS, I. W.; LEAVER-FAY, A.; CHEN, V. B.; *et al.* MolProbity: All-atom contacts and structure validation for proteins and nucleic acids. **Nucleic Acids Research**, v. 35, n. SUPPL.2, p. 375–383, 2007.

DENARDIN, C. C. *et al.* Antioxidant capacity and bioactive compounds of four Brazilian native fruits. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 23, n. 3, p. 387–398, 2015.

EISENBERG D., LUTHY R., BOWIE J. U. VERIFY3D: assessment of protein models with three-dimensional profiles. **Methods Enzymol.** 1997;277:396-404. doi: 10.1016/s0076-6879(97)77022-8.

FERRÃO, T. S. **Compostos voláteis e parâmetros de qualidade de diferentes genótipos de frutos de Butia odorata**. 2012. 90p. Dissertação de mestrado de Ciência e Tecnologia dos Alimentos. Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria. 2012.

FUJITA, L. F. F. **Caracterização química, microbiológica e farmacognóstica da polpa de coquinho-azedo (butia capitata (mart.) Becc.) Produzida em arinos - mg**. 2012. 44p. Dissertação (mestrado em alimentos e nutrição). Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2012.

GUEx, N.; PEITSCH, M.C. **Swiss-Model and the Swiss-PdbViewer: An Environment for Comparative Protein Modeling**. Electrophoresis, 18, 2714-2723, 1997. <https://doi.org/10.1002/elps.1150181505>.

HAMINIUK, C. W. I. *et al.* Phenolic compounds in fruits - an overview. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 47, n. 10, p. 2023–2044, 2012.

HOFFMANN, J. F. *et al.* Stability of bioactive compounds in butiá (Butia odorata) fruit

pulp and nectar. **Food Chemistry**, v. 237, p. 638–644, 2017.

JUSTINO, A. B. **Compostos fenólicos da casca dos frutos de *Annona crassiflora* com propriedades antinociceptivas, anti-inflamatórias e antioxidantes em modelos in vitro e in vivo**. 2021. 118p. Tese (Doutorado em Genética e Bioquímica). Universidade Federal De Uberlândia, Uberlândia, 2021.

LESK, A. M. **Introduction to Bioinformatics**. 1st ed. New York, Oxford University Press Inc., 2002, 1-15p.

LI, Z. *et al.* Phytochemicals, antioxidant capacity and cytoprotective effects of jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* Lam.) axis extracts on HepG2 cells. **Food Bioscience**, v. 41, n. February, p. 100933, 2021.

LIMA, A. **Caracterização química, avaliação da atividade antioxidante in vitro e in vivo, e identificação dos compostos fenólicos presentes no Pequi (*Caryocar brasiliense*, Camb.)**. 2008. 182p. Tese (doutorado em bromatologia). Universidade De São Paulo, São Paulo, 2008.

LIU, F. Antioxidant activity of garlic acid from rose flowers in senescence accelerated mice. *Life Sciences*, v.77, p.230-240, 2005.

LUZ, A. C. **Diversidade genética de populações de *bidens pilosa* e *tithonia diversifolia* no espírito santo e respostas do metabolismo primário e secundário sob diferentes condições de fertilização e irrigação**. 2018. 154p. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal). Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2018.

MAGRO, N. G. D. *et al.* Comparação físico-química de frutos congelados de *Butia eriospatha* (Mart.) Becc. do Paraná e Santa Catarina – Brasil. **Revista Varia Scientia**, Cascavel, v. 6, n. 11, p.33-42, 2006.

MANACH, C. *et al.* Polyphenols: Food sources and bioavailability. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, n. 5, p. 727–747, 2004.

MATOS, I. F. **Metabolismo do ácido ascórbico e sua inter-relação com a cadeia transportadora de elétrons mitocondriais em plantas**. 2021. 86p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal). Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, 2021.

PEREIRA, M. C. **Avaliação de compostos bioativos em frutos nativos do rio grande do sul**. 2011. 131p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul, Porto Alegre 2011.

PEREIRA, M. C. *et al.* Characterization, bioactive compounds and antioxidant potential of three Brazilian fruits. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 29, n. 1, p. 19–24, 2013.

PIRES, J. *et al.* Ensaio em microplaca do potencial antioxidante através do método de sequestro do radical livre DPPH para extratos de algas. **Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo**, n. April 2018, p. 2–6, 2017a.

PIRES, J. S. *et al.* Ensaio em microplaca de substâncias redutoras pelo método do Folin-Ciocalteu para extratos de algas. **Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo**, n. April 2018, p. 1–5, 2017b.

PRUDÊNCIO, A. P. A., *et al.* Phenolic composition and antioxidant activity of the aqueous extract of bark from residues from mate tree (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) bark harvesting concentrated by nanofiltration. **Food and Bioproducts Processing**, v. 90, n. 3, p. 399-405, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2011.12.003>.

ROCKETT, F. C. *et al.* Phenolic compounds and antioxidant activity in vitro and in vivo of *Butia* and *Opuntia* fruits. **Food Research International**, v. 137, n. September, 2020.

RUFINO, M. *et al.* **Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS<sup>o+</sup>**. Embrapa Agroindústria Tropical. Comunicado Técnico, 2007.

SGANZERLA, M. **Caracterização físico-química e capacidade antioxidante do butiá**. 2010. 104p. Dissertação (mestrado em ciências). Universidade Federal De Pelotas. Pelotas, 2010.

SILVA, A. O. *et al.* Antioxidant power of carotenoids, flavonoids and vitamin. **Facema**, v. 2, n. 4, p. 320–4, 2016.

SILVA, L. E. Q. *et al.* Uma revisão narrativa :Uso de antioxidantes em doenças Neurodegenerativas / A Narrative Review :Antioxidant Use in Neurodegenerative Diseases. **Brazilian Journal of Development**, v. 8, n. 2, p. 10661–10669, 2022.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. Use of LED light for Brussels sprouts postharvest conservation. **METHODS IN ENZYMOLOGY**, v. 299, p. 281–286, 1999.

STOCLET, J.C.; CHATAIGNEAU, T.; NDIAYE, M.; OAK, M.H.; BEDOUI, J.E.; CHATAIGNEAU, M.; SCHINI-KERTH, V.B. Vascular protection by dietary polyphenols. *Eur. J. Pharm.*, v.500, p.299-313, 2004.

TABART, J. *et al.* Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests. **Food Chemistry**, v. 113, n. 4, p. 1226–1233, 2009.

YU, Y. BIN; KANG, J. C. Effects of dietary ascorbic acid on growth performance, hematological parameters, antioxidant and non-specific immune responses in starry flounder, *Platichthys stellatus*. **Aquaculture Reports**, v. 18, n. June, p. 100419, 2020.

ZHOU, Y.; XIN, H.; RAHMAN, K.; WANG, S.; PENG, C.; ZHANG, H. *Portulaca oleracea*L.: a review of phytochemistry and pharmacological effects. **Biomed Research International**, [S.L.], v. 2015, p. 1-11, 2015. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/925631>.

## 6. CONCLUSÕES

Os produtos naturais estão cada vez mais elucidados como componentes insubstituíveis na alimentação humana e animal. Seus compostos bioativos são muito estudados e utilizados como conservantes, fontes de vitaminas e minerais e para a produção de novos medicamentos nos dias atuais.

De acordo com os resultados obtidos, e comparando aos resultados da literatura, pode-se afirmar que o Butiá é um fruto altamente nutritivo, fonte de diversos antioxidantes. Aqui ressaltamos a grande quantidade de AA presentes nos extratos desses frutos. O AA é um importante composto bioativo presente em diversas vias metabólicas do organismo, como na redução de radicais livres, aumento da atividade imunológica e na produção de colágeno.

Comparando os extratos obtidos a partir das duas diferentes espécies de Butiás, conclui-se que o BE é um fruto menor, de coloração mais escura, e polpa mais nutritiva, pois teve resultados estatisticamente maiores em todas as análises. Já o BC, um fruto maior, de coloração mais amarelada, teve sua composição de bioativos mais baixa em relação ao BE.

Já é descrito na literatura a relação entre o tamanho dos frutos e sua composição de substâncias bioativas, principalmente metabólitos secundários. Estes, são inversamente proporcionais, visto que a planta utiliza suas energias para crescimento, e não para produção de metabólitos secundários. Também é possível que os frutos apresentem espécies diferentes, visto suas discrepâncias nos resultados.

Para o estudo dos componentes antioxidativos do Butiá, realizou-se o estudo das enzimas que participam da produção de AA: GaLDH e NADH desidrogenase, afim de construir um modelo tridimensional da NADH desidrogenase. Este estudo *in silico*, elucida sua estrutura espacial, auxiliando na descrição de sua função em diversas vias metabólicas.

O modelo obtido para cada espécie de Butiá apresentou uma semelhança na estrutura, porém sem apresentar 100% de identidade. Essa pequena diferença entre as duas estruturas pode ser a explicação dos dois frutos possuírem diferentes atividades antioxidantes. Os modelos criados para ambas as espécies (*Butia capitata* e *eriospatha*) foram considerados adequados. Estes, servem para futuros estudos de

interação com diversos ativadores e inibidores, afim de entender sua função na produção de vitamina C nos frutos ou na criação de novos fármacos.

## 7. REFERÊNCIAS

ABDILLE, M. H.; SINGH, R. P.; JAYAPRAKASHA, G. K.; JENA, B. S. Antioxidant activity of the extracts from *Dillenia indica* fruits. *Food Chem.*, v.90, p.891-896, 2005.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 18th ed. Washington, D.C.: AOAC, 2002.

ADEFEGHA, S. A. **Functional foods and nutraceuticals as dietary intervention in chronic diseases; novel perspectives for health promotion and disease prevention**. *Journal of Dietary Supplements*, 15(6), 977–1009, 2018.

ALVARENGA, D. J. M. **Caracterização de mecanismos envolvidos com a homeostase de espécies reativas de oxigênio na resposta de plantas a diferentes estresses**. 2016. 207p. Tese (doutorado em Genética e Biologia Molecular). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre 2016.

ALVES, G. G.; ABREU, T. P. Estresse oxidativo e sua influência na patogênese da Doença de Alzheimer. **Revista Ibero-Americana de Humanidades, Ciências e Educação**, v. 7, n. 9, p. 915–928, 2021.

AMINI, L., *et al.* The Effect of Combined Vitamin C and Vitamin E Supplementation on Oxidative Stress Markers in Women with Endometriosis: a randomized, triple-blind placebo-controlled clinical trial. **Pain Research and Management**, v. 2021, p. 1-6, 26, 2021.

BAGANHA, S. C.; PEREIRA, É. A. A. Avaliação nutricional e o consumo de antioxidantes durante tratamento quimioterápico. **Revista da Associação Brasileira de Nutrição**, p. 1–7, 2018.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Oxidative stress: Relations between the formation of reactive species and the organism's defense. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113–123, 2006.

BATISTA, G. B. **Análise estrutural e funcional *in silico* de uma pr-5 do tipo osmotina de *physalis angulata* com potencial atividade farmacológica.** 2015. 58 p. Monografia (bacharelado em farmácia). Universidade Federal de Campina Grande. Cuité, 2015.

BENKERT, P.; KÜNZLI, M.; SCHWEDE, T. QMEAN server for protein model quality estimation. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n. SUPPL. 2, p. 510–514, 2009.

BESKOW, GT, Hoffmann, JF, Teixeira, AM, Fachinello, JC, Chaves, FC & Rombaldi, CV. **Química de Alimentos**, 172, p. 699-704, 2015.

CARNIEL, N. et al. Recovery of Total Polyphenols from Pomegranate and Butia : A Study of Ultrasound-assisted Extraction and Antioxidant Activity. **Indian Journal of Advances in Chemical Science**, n. i, p. 112–117, 2017.

CATANIA, A. S.; BARROS, C. R. DE; FERREIRA, S. R. G. Vitaminas e minerais com propriedades antioxidantes e risco cardiometabólico: controvérsias e perspectivas. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 53, n. 5, p. 550–559, 2009.

DAVIS, I. W.; LEAVER-FAY, A.; CHEN, V. B.; *et al.* MolProbity: All-atom contacts and structure validation for proteins and nucleic acids. **Nucleic Acids Research**, v. 35, n. SUPPL.2, p. 375–383, 2007.

DENARDIN, C. C. *et al.* Antioxidant capacity and bioactive compounds of four Brazilian native fruits. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 23, n. 3, p. 387–398, 2015.

EISENBERG D., LUTHY R., BOWIE J. U. VERIFY3D: assessment of protein models with three-dimensional profiles. **Methods Enzymol.** 1997;277:396-404. doi: 10.1016/s0076-6879(97)77022-8.

ESLABÃO, M. P., PEREIRA, P. E. E., BARBIERI, R. L., & HEIDEN, G. Mapeamento

da distribuição geográfica de *Butia* (Arecaceae). **XVIII Encontro de Pós-graduação, 2 Semana integrada de Ensino, Pesquisa e Extensão UFPEL**, p. 4, 2016.

ESPINDOLA, E. D. P. **Consumo de nutrientes antioxidantes e risco de doenças cardiovasculares em pessoas com maior e menor risco cardiovascular**. 2019. 40p. Trabalho de conclusão de curso (monografia) bacharel em nutrição. Universidade Federal de Mato Grosso. Cuiabá, 2019.

FARIA, J. P. *et al.* **CARACTERIZAÇÃO DA POLPA DO COQUINHO-AZEDO (*Butia capitata* var *capitata*)**. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, n. 3, p. 827–829, set. 2008.

FERRÃO, T. S. **Compostos voláteis e parâmetros de qualidade de diferentes genótipos de frutos de *Butia odorata***. 2012. 90p. Dissertação de mestrado de Ciência e Tecnologia dos Alimentos. Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria. 2012.

FERREIRA, A. L. **Avaliação da capacidade antioxidante , proliferativa e / ou anti-tumoral dos extratos de acerola**. 2020. 39p. Trabalho de conclusão de curso de Engenharia de Alimentos. Universidade Federal De Santa Catarina, Florianópolis, 2020.

FUJITA, L. F. F. **Caracterização química, microbiológica e farmacognóstica da polpa de coquinho-azedo (*butia capitata* (mart.) Becc.) Produzida em arinos - mg**. 2012. 44p. Dissertação (mestrado em alimentos e nutrição). Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2012.

GUEx, N.; PEITSCH, M.C. **Swiss-Model and the Swiss-PdbViewer: An Environment for Comparative Protein Modeling**. *Electrophoresis*, 18, 2714-2723, 1997. <https://doi.org/10.1002/elps.1150181505>.

GOLDBERG, K. H. *et al.* Components in aqueous *Hibiscus rosa-sinensis* flower extract inhibit in vitro melanoma cell growth. **Journal Of Traditional And Complementary Medicine**, v. 7, n. 1, p. 45-49, 2017.

HAMINIUK, C. W. I. *et al.* Phenolic compounds in fruits - an overview. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 47, n. 10, p. 2023–2044, 2012.

HOFFMANN, J. F. *et al.* Stability of bioactive compounds in butiá (*Butia odorata*) fruit pulp and nectar. **Food Chemistry**, v. 237, p. 638–644, 2017.

JUSTINO, A. B. **Compostos fenólicos da casca dos frutos de *Annona crassiflora* com propriedades antinociceptivas, anti-inflamatórias e antioxidantes em modelos in vitro e in vivo**. 2021. 118p. Tese (Doutorado em Genética e Bioquímica). Universidade Federal De Uberlândia, Uberlândia, 2021.

KNIGHT, J. *et al.* Ascorbic Acid Intake and Oxalate Synthesis. **Urolithiasis**. 2016; 44(4): 289-97. doi: 10.1007/s00240-016-0868-7.

LESK, A. M. **Introduction to Bioinformatics**. 1st ed. New York, Oxford University Press Inc., 2002, 1-15p.

LI, Z. *et al.* Phytochemicals, antioxidant capacity and cytoprotective effects of jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* Lam.) axis extracts on HepG2 cells. **Food Bioscience**, v. 41, n. February, p. 100933, 2021.

LIMA, A. **Caracterização química, avaliação da atividade antioxidante in vitro e in vivo, e identificação dos compostos fenólicos presentes no Pequi (*Caryocar brasiliense*, Camb.)**. 2008. 182p. Tese (doutorado em bromatologia). Universidade De São Paulo, São Paulo, 2008.

LIU, F. Antioxidant activity of garlic acid from rose flowers in senescence accelerated mice. *Life Sciences*, v.77, p.230-240, 2005.

LUZ, A. C. **Diversidade genética de populações de *bidens pilosa* e *tithonia diversifolia* no espírito santo e respostas do metabolismo primário e secundário sob diferentes condições de fertilização e irrigação**. 2018. 154p. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal). Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2018.

MAGALHÃES, H. M. *et al.* Evaluating chemical composition of *Butia capitata* pulp among various populations and locations using multivariate analysis. **African Journal of biotechnology** 16(38):1902-1910, 2017. DOI:[10.5897/AJB2017.16107](https://doi.org/10.5897/AJB2017.16107).

MAGRO, N. G. D. *et al.* Comparação físico-química de frutos congelados de *Butia eriospatha* (Mart.) Becc. do Paraná e Santa Catarina – Brasil. **Revista Varia Scientia**, Cascavel, v. 6, n. 11, p.33-42, 2006.

MAJUMDER, D. *et al.* Metabolic profiling and investigations on crude extract of *Olea europaea* L. leaves as a potential therapeutic agent against skin cancer. **Journal Of Functional Foods**, [S.L.], v. 58, p. 266-274, jul. 2019. Elsevier BV.

MAIA, D. S. V. **Atividade antibacteriana de extrato de butiá (*Butia odorata*) contra bactérias patogênicas**. 2017. 51p. Dissertação (mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal De Pelotas, Pelotas, 2017.

MANACH, C. *et al.* Polyphenols: Food sources and bioavailability. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, n. 5, p. 727–747, 2004.

MATOS, I. F. **Metabolismo do ácido ascórbico e sua inter-relação com a cadeia transportadora de elétrons mitocondriais em plantas**. 2021. 86p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal). Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, 2021.

MILLAR, A. H. *et al.* Control of ascorbate synthesis by respiration and its implications for stress responses. **Plant Physiology**, 133: 443-447, 2003.

MISTURA, C. C. *et al.* Compostos Bioativos e Atividade Antioxidante em Butiás (*Butia odorata*, Arecaceae). **Rg News**, Fortaleza, v. 4, n. 3, p. 265-265, nov. 2018.

PADILHA, P. C.; PINHEIRO, R. L. The Role of the Functional Foods on Prevention and Control of the Breast Cancer. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 50, n. 3, p. 251–260, 2004.

PANDEY, K.B.; RIZVI, S.I. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2, n. 5, p. 270-278, 2009.

PARDINHO, G. J. R. *et al.* Impactos da utilização de compostos antioxidantes como parte da terapia nutricional do paciente oncológico em tratamento. **Advances in Nutritional Sciences**, v. 1, n. 1, p. 62–72, 2020.

PERALTA, S. L. *et al.* Cytotoxicity, genotoxicity and antibiofilm activity on *Streptococcus mutans* of an experimental self-etching adhesive system containing natural *Butia capitata* oil. **International Journal of Adhesion and Adhesives**, v. 78, n. May, p. 95–101, 2017.

PEREIRA, M. C. **Avaliação de compostos bioativos em frutos nativos do rio grande do sul**. 2011. 131p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul, Porto Alegre 2011.

PEREIRA, M. C. *et al.* Characterization, bioactive compounds and antioxidant potential of three Brazilian fruits. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 29, n. 1, p. 19–24, 2013.

PIRES, J. *et al.* Ensaio em microplaca do potencial antioxidante através do método de sequestro do radical livre DPPH para extratos de algas. **Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo**, n. April 2018, p. 2–6, 2017a.

PIRES, J. S. *et al.* Ensaio em microplaca de substâncias redutoras pelo método do Folin-Ciocalteu para extratos de algas. **Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo**, n. April 2018, p. 1–5, 2017b.

PRAKASH, A., BASKARAN, R. Acerola, an untapped functional superfruit: a review on latest frontiers. **Journal Of Food Science And Technology**, [S.L.], v. 55, n. 9, p. 3373-3384, 11 jul. 2018. Springer Science and Business Media LLC.

PRUDÊNCIO, A. P. A., *et al.* Phenolic composition and antioxidant activity of the aqueous extract of bark from residues from mate tree (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) bark harvesting concentrated by nanofiltration. **Food and Bioproducts Processing**, v. 90, n. 3, p. 399-405, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2011.12.003>.

QUILES, J. L. *et al.* Reductive Stress, Bioactive Compounds, Redox-Active Metals, and Dormant Tumor Cell Biology to Develop Redox-Based Tools for the Treatment of Cancer. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 33, n. 12, p. 860–881, 2020.

ROCKETT, F. C. *et al.* Phenolic compounds and antioxidant activity in vitro and in vivo of *Butia* and *Opuntia* fruits. **Food Research International**, v. 137, n. September, 2020.

RUFINO, M. *et al.* **Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS<sup>o+</sup>**. Embrapa Agroindústria Tropical. Comunicado Técnico, 2007.

SGANZERLA, M. **Caracterização físico-química e capacidade antioxidante do butiá**. 2010. 104p. Dissertação (mestrado em ciências). Universidade Federal De Pelotas. Pelotas, 2010.

SILVA, A. O. *et al.* Antioxidant power of carotenoids, flavonoids and vitamin. **Facema**, v. 2, n. 4, p. 320–4, 2016.

SILVA, L. E. Q. *et al.* Uma revisão narrativa :Uso de antioxidantes em doenças Neurodegenerativas / A Narrative Review :Antioxidant Use in Neurodegenerative Diseases. **Brazilian Journal of Development**, v. 8, n. 2, p. 10661–10669, 2022.

SILVA, L. X.; BASTOS, L. L.; SANTOS, L. H. Modelagem computacional de proteínas. **Revista Brasileira de Bioinformática e Biologia Computacional**. S.L. 1 ed. Julho, 2021.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. Use of LED light for Brussels sprouts postharvest conservation. **METHODS IN ENZYMOLOGY**, v. 299,

p. 281–286, 1999.

SHARMA, Anubhuti *et al.* Preliminary nutritional and biological potential of *Artocarpus heterophyllus* L. shell powder. **Journal Of Food Science And Technology**, [S.L.], v. 52, n. 3, p. 1339-1349, 15 ago. 2013. Springer Science and Business Media LLC.

STOCLET, J.C.; CHATAIGNEAU, T.; NDIAYE, M.; OAK, M.H.; BEDOUI, J.E.; CHATAIGNEAU, M.; SCHINI-KERTH, V.B. Vascular protection by dietary polyphenols. *Eur. J. Pharm.*, v.500, p.299-313, 2004.

SWAMI, S. B. *et al.* Jackfruit and Its Many Functional Components as Related to Human Health: a review. **Comprehensive Reviews In Food Science And Food Safety**, [S.L.], v. 11, n. 6, p. 565-576, 16 out. 2012.

TABART, J. *et al.* Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests. **Food Chemistry**, v. 113, n. 4, p. 1226–1233, 2009.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant Physiology**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009.

TOSS, D. **Extração de Compostos Fenólicos de *Butia capitata* utilizando dióxido de carbono supercrítico**. 2010. 90 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul. Porto Alegre, 2010.

TRAMONTIN, D. P. *et al.* Biological activity and chemical profile of Brazilian jackfruit seed extracts obtained by supercritical CO<sub>2</sub> and low pressure techniques. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 152, p. 104551, 2019.

VENTUROSOSO, L. DOS R. *et al.* Atividade antifúngica de extratos vegetais sobre o desenvolvimento de fitopatógenos. **Summa Phytopathologica**, v. 37, n. 1, p. 18–23, 2011.

VEERESHAM, Ciddi *et al.* Natural products derived from plants as a source of drugs. **Journal Of Advanced Pharmaceutical Technology & Research**, v. 3, n. 4, p. 200, 2012.

YU, Y. BIN; KANG, J. C. Effects of dietary ascorbic acid on growth performance, hematological parameters, antioxidant and non-specific immune responses in starry flounder, *Platichthys stellatus*. **Aquaculture Reports**, v. 18, n. June, p. 100419, 2020.

ZHOU, Y.; XIN, H.; RAHMAN, K.; WANG, S.; PENG, C.; ZHANG, H.. *Portulaca oleracea*L.: a review of phytochemistry and pharmacological effects. **Biomed Research International**, [S.L.], v. 2015, p. 1-11, 2015. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/925631>