UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) como importante fonte de alguns elementos químicos essenciais potencialmente biodisponíveis e efeito neuroprotetor de seu extrato frente à neurotoxicidade do Manganês em astrócitos

Vívian da Silva Santos

Ribeirão Preto
2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) como importante fonte de alguns elementos químicos essenciais potencialmente biodisponíveis e efeito neuroprotetor de seu extrato frente à neurotoxicidade do Manganês em astrócitos

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Toxicologia.

Orientado(a): Vívian da Silva Santos

Orientador(a): Fernando Barbosa Junior

Ribeirão Preto
2014

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Santos, Vivian da Silva

Açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) como importante fonte de alguns elementos químicos essenciais potencialmente biodisponíveis e efeito neuroprotetor de seu extrato frente à neurotoxicidade do Manganês em astrócitos.

114 p. : il. ; 30cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Toxicologia.

Orientador: Barbosa Junior, Fernando.

1. Açaí. 2. Elementos químicos essenciais. 3. Fracionamento químico. 4. Estresse oxidativo. 5. Neurotoxicidade. 6. Antioxidante. 7. Astrócito.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Vívian da Silva Santos

Açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) como importante fonte de alguns elementos químicos essenciais potencialmente biodisponíveis e efeito neuroprotetor de seu extrato frente à neurotoxicidade do Manganês em astrócitos

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Toxicologia.

Orientador(a): Fernando Babosa Junior

Aprovada em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr._____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr._____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr._____

Instituição: _____ Assinatura:_____

“ Dedico este trabalho e a minha vida à Deus, a força maior que rege este Universo, pelo socorro presente nos momentos de angústia que nunca me deixou duvidar de seus propósitos em minha vida...”

AGRADECIMENTOS

À Deus, dedico minha vida e esta tese e agradeço por todas suas bençãos e pelos pequenos sinais que sempre enviara me iluminando e me demonstrando quais os caminhos certos a seguir,

À minha família, pelo alicerce seguro e pelo exemplo de amor e simplicidade que sempre me incentivaram e me motivaram a seguir em frente sem perder minhas origens. Pelos momentos, aconchegos e convívio agradabilíssimos com os animais, meus irmãos de 4 patas, na fazenda que sempre recarregam minhas forças para a luta diária,

Ao Luciano Maciel, pessoa que Deus caprichosamente colocou em minha vida para que juntos pudéssemos partilhar amor e sonhos. Agradeço por todo amor, carinho e compreensão que me devotara desde que nos conhecemos e pelo apoio incondicional ao longo de todo o meu doutorado, mesmo em minhas longas ausências forçadas pelo trabalho,

Ao meu orientador, professor Fernando Barbosa Júnior, pela oportunidade que me confiou de trabalhar em seu grupo de pesquisa em 2010 e por todas as oportunidades que se abriram desde então e que me fizeram amadurecer como pessoa e profissionalmente,

Ao meu orientador na Universidade de Vanderbilt, professor Michael Aschner, pelo incentivo constante e conselhos acadêmicos e de vida, pela disponibilidade em sempre me ajudar no meu aprimoramento acadêmico e por aguçar meu amor pela pesquisa científica em cada conversa, discussão de resultados e, principalmente, pelo seu exemplo de vida,

À técnica do nosso laboratório e colega de pós graduação, Vanessa, pela amizade sincera, auxílio em experimentos, sugestões e cuidado durante toda a execução do meu doutorado e minha permanência em Ribeirão Preto,

À todos meus colegas e amigos do Laboratório de Toxicologia e Essencialidade de Metais, Airton, Bruno, Denise, Eloisa, Gustavo, Jairo, Juliana Maria, Juliana Valentini, Kátia, Letícia, Márcia, Maria Fernanda, Renan, Rodolfo, Samuel, Taísa, Vinicius, e a todos os integrantes do grupo (passado e presente) por todas sugestões, momentos de descontração, e pelo convívio diário, compartilhando alegrias e angústias da vida de pós graduando,

Aos meus amigos de laboratório em Vanderbilt, Ebany, Julia, Pam, Patrícia, Priscila, Sam, Sudipta, Thuy e em especial Emily, Megan e Yingchum (minhas parceiras na cultura celular) por me receberem de braços abertos em minha estadia em Nashville, contribuindo grandemente para tornar este período positivamente inesquecível em minha vida,

Aos brasileiros em Nashville, sempre tão unidos e dispostos a ajudar, agradeço a hospitalidade, os momentos de descontração e apoio que foram cruciais principalmente nos meus primeiros dias em um país desconhecido,

Ao professor Gustavo Henrique de Almeida Teixeira, pela amizade, confiança e preciosas sugestões durante toda a execução deste trabalho,

Às secretárias da FCFRP, Ana, Rosana e Rosemary, pelo cuidado despendido a cada aluno de pós graduação durante todos esses anos,

Aos demais professores e funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, pelo agradável convívio e colaboração,

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos de doutorado direto que me manteve na cidade de Ribeirão Preto por 4 anos,

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos de doutorado sanduíche que me proporcionou a oportunidade de aprimorar meus conhecimentos toxicológicos nos Estados Unidos,

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro dado às pesquisas desenvolvidas no laboratório,

E a todos que não estão presentes nestas linhas, mas que de forma direta ou indireta contribuíram para o meu encantamento pela vida acadêmica, que já se iniciou na minha fase de graduação em Farmácia da Universidade Federal de Alfenas e que me deram uma base sólida para que hoje, na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto eu pudesse defender esta tese de doutorado.

À todos vocês meus mais sinceros agradecimentos!

“What is there that is not poison? All things are poison and nothing (is) without poison. Solely the dose determines that a thing is not a poison”

PARACELSUS (1493-1541)

RESUMO

SANTOS, V.S. **Açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) como importante fonte de alguns elementos químicos essenciais potencialmente biodisponíveis e efeito neuroprotetor de seu extrato frente à neurotoxicidade do Manganês em astrócitos**. 2014. 135 f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

O açaí é uma fruta da amazônia brasileira de consumo emergente no Brasil e outras regiões do mundo. Primordialmente consumida na sua forma de polpa e estabelecida como uma "superfruta" graças ao seu potencial antioxidante e anti-inflamatório. No entanto, pouco se sabe sobre sua composição em relação aos elementos químicos essenciais. No presente estudo, a análise sistemática de 12 polpas produzidas com frutos de diferentes localidades demonstrou que a polpa de açaí é naturalmente rica nos elementos Ca, Cu, Fe, Mg, Zn, com destaque para as concentrações encontradas de Mn que foram notoriamente maiores do que as comumente observadas em alimentos considerados como fonte principal deste elemento químico essencial na dieta. Cabe destacar que em valores médios, todos os elementos químicos estudados no açaí apresentaram-se em concentrações que contribuem significativamente para as suas necessidades diárias preconizadas. Entretanto, a análise do fracionamento químico da polpa de açaí demonstrou que o ferro está em uma forma potencialmente indisponível; enquanto que cerca de 40% dos elementos cálcio, magnésio, manganês e zinco estão quelados a um composto não fenólico de alta solubilidade em água e que pode aumentar suas biodisponibilidades. Diferentemente dos demais, o cobre interagiu significativamente com a fração fenólica solúvel em água do alimento. A fração fenólica eluída com metanol por SPE demonstrou ter considerável atividade antioxidante direta no ensaio de sequestro de DPPH com EC_{50} de 19,1 µg/L e foi eficaz na atenuação da citotoxicidade, estresse oxidativo e alteração funcional induzidos por 500 µM de $MnCl_2$ em cultura primária de astrócitos, avaliados pelos ensaios de LDH e MTT, GSH/GSSG, F_2-IsoPs, captação de glutamato e expressão de Nrf2. Este extrato de açaí em uma concentração ótima de 0,1 µg/mL preveniu o estresse oxidativo induzido por Mn restaurando a razão GSH/GSSG, protegendo as membranas astrocitárias da lipoperoxidação e diminuindo a expressão de Nrf2. Uma concentração mais elevada de extrato de açaí exacerbou os efeitos do Mn nestes mesmos parâmetros, exceto na lipoperoxidação medida pela formação de F_2-IsoPs. Assim, o pré-tratamento dos astrócitos com concentrações mais elevadas destas antocianinas com exposição ao Mn em sequência, pode predispor os astrócitos fazendo com que um efeito pró-oxidante prevaleça. Estes achados devem ser considerados em estudos futuros que explorem a potencialidade das antocianinas do açaí em formulações nutracêuticas para obtenção de efeitos antioxidantes e neuroprotetores ideais. Assim, conclui-se que o próprio açaí possui uma fração de compostos fenólicos capaz de atenuar os efeitos oxidativos do Mn e que portanto, pode indicar uma segurança alimentar do consumo do fruto em quantidades moderadas.

Palavras-chave: açaí; elementos químicos essenciais; fracionamento químico; neurotoxicidade do manganês; estresse oxidativo; antioxidante; astrócitos.

ABSTRACT

SANTOS, V.S. **Açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) as an important source of potentially bioavailable essential chemical elements and neuroprotective effect of its extract on Manganese induced neurotoxicity in astrocytes.** 2014. 135 f. Thesis (Ph.D., Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

Açaí is a fruit from Brazilian Amazon with an exotic flavor possessing high antioxidant and anti-inflammatory properties. Based on these properties, the fruit is classified as one of the new “super fruits”. However, few is known about its essential chemical elements content. In this study, the systematic analysis of 12 freeze-dried pulps processed with açaí of different locations showed that açaí pulp is naturally rich in Ca, Cu, Fe, Mg, Zn, and especially amounts of Mn, which was significantly greater than in foods considered Mn dietary source, were found. In average values, all determined essential chemical elements contribute significantly to their recommended daily intake requirements. However, fractionation analysis of açai showed that iron is potentially not bioavailable. While about 40% of calcium, magnesium, manganese, and zinc are binding to a non-phenolic compound high soluble in water, which may increase their bioavailabilities. Copper is significantly bound to water-soluble phenolic fraction in açaí. This phenolic fraction eluted with methanol by SPE provided considerable direct antioxidant activity on the DPPH scavenging assay with EC_{50} of 19.1 µg/L and was effective attenuating cytotoxicity, oxidative stress, and functional alterations induced by 500 µM of $MnCl_2$ in primary cultured astrocytes, which was assessed by MTT and LDH assay, GSH/GSSG ratio, F_2-IsoPs formation, glutamate uptake, and Nrf2 levels. This anthocyanin-rich açaí extract in an optimal concentration of 0.1 µg/mL prevented oxidative stress induced by Mn restoring the GSH/GSSG ratio, protecting the astrocytic membrane from lipid peroxidation and decreasing levels of Nrf2. A higher concentration of the same açaí extract exacerbated the effects of Mn in these same parameters, except on lipid peroxidation assessed by F_2-IsoPs. In constrast, pre-treating with high concentrations of açaí’s anthocyanins followed by Mn exposure, pro-oxidant effects likely prevails. These findings should be considered in future studies regarding the potential of anthocyanins in açaí on nutraceutical formulations to obtain optimal antioxidant and neuroprotective effects. Thus, we conclude that the own açaí has a phenolic fraction capable of attenuates the oxidative effects of Mn. So, may indicates that moderate açaí consumption is dietary safe regarding Mn neurotoxicity.

Keywords: açaí fruit; essencial elements; fractionation analysis; manganese neurotoxicity; oxidative stress; antioxidant; astrocyte

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1. Esquema do procedimento de despolpamento dos frutos do açaizeiro para obtenção da polpa de açaí - da colheita ao armazenamento para comercialização. (Adaptada de MORAES, 2013)..... 5

Figura 2. Distribuição dos elementos essenciais determinados nas 12 polpas de açaí preparadas com os frutos de açaizeiro colhidos…..... 21

Figura 3. Perfil cromatográfico e distribuição de elementos essenciais no extrato aquoso obtido por extração em fase sólida com coluna Sep-pak C_{18}. A) Condições cromatográficas: coluna Phin-Pack PREP-005(H); fase móvel MeOH 10%; vazão de 10 mL/min. B) Valores plotados foram obtidos pela determinação dos elementos Ca, Cu, Fe, Mg, Mn e Zn nas respectivas frações coletadas. 33

Figura 4. Fracionamento dos elementos químicos Ca, Cu, Fe, Mg, Mn e Zn na polpa de açaí liofilizada..... 35

CAPÍTULO 2

Figura 5. Regulação e ativação de Nrf2 sob condições basais e estresse. Em condições basais, Keap1 impede a translocação de Nrf2 para o núcleo e facilita a degradação de Nrf2 mediada por ubiquitina. Em condições de estresse, Sens2 induz a degradação de Keap1, liberando Nrf2. Nrf2 é fosforilado e ativado sob a proteção de DJ1 seguido de sua translocação nuclear. No núcleo, Nrf2 ativo interage com o elemento de resposta antioxidante (ARE) e em coordenação com diversos co-fatores (Maf) induz a expressão de genes antioxidantes. Esquema extraído de GUPTE e colaboradores (2013) e adaptado para o português.....41

Figura 6. Representação simplificada do sistema GSH e ciclo do glutamato-glutamina. Extraído e adaptado para o português de BELANGER e MAGISTRETTI, 2009. *Ciclo glutamato-glutamina (em rosa)*: Transportadores astrocítários de aminoácidos excitatórios (EAATs) são responsáveis pela captação de uma fração significativa do glutamato da fenda sináptica. Glutamato é convertido em glutamina pela glutamina sintetase (GS) e devolvida para os neurônios para nova síntese de glutamato. *Ciclo do Lactato (em azul):* Captação de glutamato pelos astrócitos é acompanhada pela entrada de Na^+ pela ação da Na^+/K^+ ATPase. O aumento da razão ADP/ATP desencadeia a utilização anaeróbica de glicose. *Tampão de K^+ (em laranja):* astrócitos tamponam o excesso de K^+ liberado para o meio extracelular como resultado da atividade neuronal. *Sistema GSH (em verde):* Astrócitos liberam GSH para o meio extracelular onde é clivada pela enzima γ-glutamil transpeptidase (γGT) resultando em CysGly e glutamato.....47

Figura 7. Esquematização da etapa de purificação dos F_2-isoprostanos por extração em fase reversa (C_{18}) seguida de extração em fase normal.....64

Figura 8. Efeito da proteção celular exercida pelo extrato de açaí medido por ensaio de MTT (A) e LDH (B). Ambos resultados demonstram aumento da viabilidade celular significativo a partir de 0,1 µg/mL (valor de $p < 0,05$). Valores estão expressos como média ± EPM de três experimentos independentes e normalizados em relação ao controle.....72

Figura 9. Efeito da proteção celular exercida por duas concentrações de extrato de açaí contra a citotoxicidade causada por 500 µM de $MnCl_2$ após tratamento simultaneo por 24 horas em cultura de astrócitos medido por ensaio de MTT (A) e LDH (B). Ambas concentrações revelaram proteção celular estatisticamente significante (valor de $p < 0,001$). Valores estão expressos como média ± EPM de três experimentos independentes e normalizados em relação ao controle.....74

Figura 10. Efeito citoprotetor exercido pelo pré-tratamento dos astrócitos com extrato de açaí (18 horas) contra a citotoxicidade causada por 500 µM de $MnCl_2$ (6 horas) analisado por ensaio de MTT (A) e LDH (B). Ambas concentrações de extrato de açaí 0,1 µg/mL e 1,0 µg/mL revelaram proteção celular estatisticamente

significante, com valor de p <0,01 e p <0,05, respectivamente. Valores estão expressos como média ± EPM de três experimentos independentes e normalizados em relação ao controle.....77

Figura 11. Efeitos do extrato de açaí na concentração de GSH total obtido pelo "método de reciclagem" (TIETZE, 1969; LEFFERS, et al., 2013) (A) e na Razão GSH/GSSG obtido pelo mesmo método(B). A Razão GSH/GSSG foi normalizada em relação ao controle. Valores estão expressos como média ± EPM de três experimentos independentes. Valores foram considerados estatisticamente diferentes a partir de valores de p <0,01.....78

Figura 12. Efeito lipoprotetor do extrato de açaí frente a formação aumentada de F_2-IsoP causada pela exposição a 500 µM de Mn. Valores estão expressos como média ± EPM de dois experimentos independentes. Valores foram considerados estatisticamente diferentes a partir de valores de p <0,001.....80

Figura 13. Efeito na captação de glutamato por astrócitos expostos a 500 µM de Mn pré tratados com extrato de açaí. Os dados foram normalizados em relação ao controle. Valores estão expressos como média ± EPM de três experimentos independentes. Valores foram considerados estatisticamente diferentes a partir de valores de p <0,01.....82

Figura 14. Efeito do pré-tratamento com extrato de açaí no acúmulo de Nrf2 induzido por Mn. Quantidades iguais de proteína (30 µg) de cada amostra foram analisadas por SDS-PAGE e immunoblot com anticorpo policlonal anti-Nrf2. Quantificação densitrométrica de Nrf2. Razão entre o valor de densidade da expressão de Nrf2 e o valor de densidade para a expressão de β-actina. Valores estão expressos como média ± EPM de três experimentos independentes. Valores foram considerados estatisticamente diferentes a partir de valores de p <0,05.....84

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1. Composição centesimal da polpa de açaí liofilizada. (Extraído e adaptado de ROGEZ, 2000, SILVA, et al., 2004 e MENEZES, et al., 2008).....8

Tabela 2. Tabela simplificada das necessidades de ingestão diária para Ca, Cu, Fe, Mg, Mn e Zn, segundo (IOM, 2011). Valores estão demonstrados em mg/dia.....10

Tabela 3. Programa de aquecimento utilizado na digestão das amostras assistida por microondas segundo proposto por NARDI e colaboradores (2009) com modificações..... 18

Tabela 4. Análise do Material de Referência Certificado NIST8415 (pó de ovo) expresso como média ± desvio padrão (n=6) comparado com os valores certificados 19

Tabela 5. Tabela comparativa entre os valores de alguns elementos essenciais obtidos em polpa de açaí liofilizada e o reportado na literatura….....23

Tabela 6. Contribuição do consumo de açaí para as necessidades diárias de Ca, Cu, Fe, Mg, Mn e Zn para calculado para a média de consumo nacional. Valores expressos como porcentagem da Ingestão Diária Adequada Recomendada/Ingestão Adequada.....25

Tabela 7. Comparação da concentração média de Mn em açaí com outros alimentos considerados sua fonte alimentar (valores em mg/100 g m.s.).....27

Tabela 8. Quantidade média estipulada de elementos essenciais (mg/dia) fornecidos pela ingestão de açaí para a ingestão média nacional e seus respectivos limites máximos toleráveis preconizados pela IOM, 2001.....29

Tabela 9. Concentração e porcentagem de elementos essenciais recuperados no açaí filtrado e após extração em fase sólida com coluna Sep-pak® C_{18}.....31

Tabela 10. Concentração de Ca, Cu, Fe, Mg, Mn e Zn nas frações cromatográficas atribuídas á área de sinal analítico do cromatograma.....34

CAPÍTULO 2

Tabela 11. Distribuição e funções majoritárias das enzimas metabolizadoras de drogas/xenobióticos segundo ZHANG (2013).....39

Tabela 12. Concentração de fenólicos, flavonóis e antocianinas totais no extrato de açaí……..68

Tabela 13. Atividade antioxidante do extrato de açaí em comparação com os controles positivos quercetina, ácido ascórbico e BHT……..….70

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

BCA	ácido bicinconínico
CE_{50}	concentração eficaz para o sequestro de 50% dos radicais
DL_{50}	dose letal para 50% da população testada
DPPH	1,1-difenil-2-picril-hidrazila
DTNB	5-5-ditio-bis-2-ácido nitrobenzóico
EAAT	transportadores astrocitários de aminoácidos excitatórios
EMD	enzimas metabolizadoras de drogas
EPM	erro padrão da média
EROs	espécies reativas de oxigênio
F_2-IsoPs	F_2-isoprostanos
GSH	glutationa reduzida
GSSG	glutationa oxidada
HBSS	*Hank's balanced salts solution*
ICP-MS	espectrômetro de massas com plasma indutivamente acoplado
IDA	ingestão diária adequada
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada
Keap-1	proteína de citoesquelo análoga a Kelp associada a ECH
LDH	lactato dehidrogenase
LOAEL	*Lowest observed adverse effect level*
m.s.	massa seca
MTT	brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido
Nrf2	fator de transcrição nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2
SNC	sistema nervoso central
SPE	extração em fase sólida
SOD	superóxido dismutase
TACO	Tabela Brasileira de Composição de Alimentos

LISTA DE SÍMBOLOS

±	mais ou menos
%	porcentagem
®	marca registrada
<	menor que
°C	graus Celsius

SUMÁRIO

Resumo i
Abstract ii
Lista de Figuras iii
Lista de Tabelas vi
Lista de Abreviaturas e Siglas viii
Lista de Símbolos ix

INTRODUÇÃO GERAL..... 1

CAPÍTULO 1..... 5
1. Revisão da Literatura..... 5
1.1. A polpa de açaí..... 5
1.2. O consumo da polpa de açaí..... 7
1.3. Valor nutricional da polpa de açaí e seus compostos bioativos..... 8
1.4. Cálculos de ingestão diária adequada para elementos químicos..... 9
1.5. Biodisponibilidade de elementos químicos em alimentos..... 11
1.6. Fracionamento e especiação química de elementos químicos e suas influências nas suas biodisponibilidades e promoção de efeitos nutricionais e toxicológicos..... 13
2. Objetivo do Capítulo 1..... 15
2.1. Objetivo Geral..... 15
2.2. Objetivos Específicos..... 15
3. Materiais e Métodos utilizados no Capítulo 1..... 16
3.1. Instrumentação..... 16
3.2. Reagentes e soluções..... 16
3.3. Preparo das polpas dos frutos de açaizeiro..... 17
3.4. Determinação dos elementos essenciais totais (Ca, Cu, Fe, Mg, Mn e Zn)..... 18
3.5. Extração em fase sólida (SPE) off-line seguida de separação cromatográfica preparativa e coleta das frações 19
3.6. Condições Instrumentais do ICP-MS..... 20
4. Resultados e Discussão do Capítulo 1..... 21
4.1. Determinação de elementos essenciais totais nas polpas de açaí……..... 21

4.2. Contribuição estimada da polpa de açaí para as necessidades de ingestão diária de Ca, Cu, Fe, Mg, Mn e Zn..... 25
4.3. Polpa de açaí como excepcional fonte alimentar de Mn X Risco toxicológico.. 26
4.4. Fracionamento dos elementos essenciais Ca, Cu, Fe, Mg, Mn e Zn em polpa de açaí..... 30
5. Considerações Parciais do Capítulo 1 36
6. Perspectivas Futuras do Capítulo 1..... 37

CAPÍTULO 2..... 38
1. Revisão da Literatura..... 38
1.1. Enzimas metabolizadoras de drogas/xenobióticos (EMD) e sua regulação transcricional..... 38
1.2. Ativação do fator de transcrição Nrf2 no estresse oxidativo..... 40
1.3. Nrf2 na neurodegeneração e neurotoxicidade..... 42
1.4. O papel dos astrócitos na neurodegeneraçao/neurotoxicidade..... 43
1.5. Sistema glutationa (GSH)..... 44
1.6. Ciclo do glutamato-glutamina..... 45
1.7. Implicações do estresse oxidativo no sistema glutationa e ciclo glutamato-glutamina..... 46
1.8. Mecanismos de neurotoxicidade do Mn induzido via estresse oxidativo..... 48
1.9. Polifenóis como estratégia nutricional e nutracêutica contra o estresse oxidativo e modulação de Nrf2..... 50
1.10. Hipótese do efeito neuroprotetor do extrato metanólico da polpa de açaí contra o estresse oxidativo via Nrf2..... 53
2. Objetivo do Capítulo 2..... 55
2.1. Objetivo Geral..... 55
2.2. Objetivos Específicos..... 55
3. Materiais e Métodos utilizados no Capítulo 2..... 56
3.1. Materiais……..... 56
3.2. Preparo do extrato metanólico de polpa de açaí..... 56
3.3. Determinação de fenólicos totais..... 57
3.4. Determinação de flavonóis totais..... 57
3.5. Determinação de antocianinas totais..... 58
3.6. Atividade antioxidante do extrato de açaí (Sequestro de radical

livre DPPH)..... 58
3.7. Cultura primária de astrócitos..... 59
3.8. Tratamento dos astrócitos 60
3.9. Ensaio de LDH e MTT..... 61
3.10. Análise da captação de ^{3}H-glutamato em cultura de astrócitos..... 62
3.11. Determinação da concentração de total de glutationa celular e razão GSH/GSSG..... 63
3.12. Quantificação de F_2-isoprostanos (F_2-IsoPs)..... 64
3.13. Análise da expressão de Nrf2 por western blot..... 66
3.14. Análise Estatística..... 68
4. Resultados e Discussão do Capítulo 2..... 69
4.1. Caracterização e atividade antioxidante do extrato de açaí……..... 69
4.2. Efeito citoprotetor do extrato de açaí em cultura de astrócitos..... 72
4.3. Efeito citoprotetor do extrato de açaí contra a citotoxicidade de 500 µM $MnCl_2$ quando administrados simultaneamente em cultura primária de astrócitos……..... 74
4.4. Efeito antioxidante de 0,1 µg/mL de extrato de açaí atenua o estresse oxidativo induzido por 500 µM de $MnCl_2$ em cultura primária de astrócitos..... 77
4.5. Efeito do pré-tratamento do extrato de açaí no estado funcional dos astrócitos expostos a 500 µM de $MnCl_2$ …….... 82
4.6. Efeito modulador da concentração de Nrf2 do extrato de açaí..... 84
4.7. Efeito antioxidante direto do extrato de açaí foi mais significativo na atenuação do estresse oxidativo do que a modificação celular adaptativa.... 86
5. Considerações Parciais do Capítulo 2 89
6. Perspectivas Futuras do Capítulo 2..... 90

CONSIDERAÇÕES FINAIS..... 91

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 91
ANEXOS..... 112
Certificado de Treinamento AALAS Learning Library..... 112
Aprovação no Comitê de Ética no Uso de Animais.....113
Artigos publicados relacionados à esta tese.....114

INTRODUÇÃO GERAL

O açaizeiro (*Euterpe oleracea* Mart.) é uma planta nativa da Amazônia que além de ser uma das três principais palmeiras fornecedoras de palmito, produz frutos de alto valor nutritivo e econômico consumidos na forma de “polpa de açaí” como parte dos hábitos alimentares diários de brasileiros de diversos sub-grupos populacionais, quer por razões culturais e regionais, quer por sua popularidade entre frequentadores de academias de esportes diversos. A polpa de açaí é também exportada para países como Japão, Estados Unidos, China e o Continente Europeu (EMBRAPA, 2006) como fruta exótica de alto valor nutricional (ROGEZ, 2000; MENEZES, et al., 2008).

Um dos aspectos mais relevantes para o crescimento da popularidade do fruto do açaizeiro se deve à identificação de diversos compostos com efeitos antioxidantes conhecidos em sua composição, tais como: carotenóides, flavonóides, e diversos outros polifenóis (DARNET, et al., 2011; DEL POZO-INSFRAN, et al., 2004; KANG, et al., 2011; ROSSO; MERCADANTE, 2007; RUFINO, et al., 2011; SUN, et al., 2002) que, aliado ao seu alto valor nutricional (rico em proteínas, ácidos graxos poliinsaturados e açúcares) fez esta fruta ser classificada com uma das novas afamadas “superfrutas” (SCHAUSS, et al., 2006a; SCHAUSS, et al., 2006b).

As antocianinas, que são compostos fenólicos de alto poder antioxidante (SUN, et al., 2002) e presentes no açaí em larga quantidade e variedade, ganharam destaque mundial após discussões sobre o chamado “Paradoxo Francês”, uma vez que mesmo com uma alta ingestão de alimentos ricos em gorduras, os franceses possuem índices de doenças coronarianas muito baixos, sendo este fato atribuído ao efeito protetor do elevado e frequente consumo de vinho tinto, rico em antocianinas e outros compostos fenólicos (RENAUD; LORGERIL, 1992; RAY, et al., 1999). Hoje, existem estudos sobre os benefícios das antocianinas de diversos frutos contra diversas enfermidades e estes efeitos são creditados a suas potentes capacidades antioxidantes e antiinflamatórias.

Já no que tange a concentração de elementos essenciais nos frutos do açaizeiro e suas polpas, as informações na literatura são escassas e possuem viéses metodológicos.

Em um estudo preliminar guiado pelo grupo do prof. Fernando Barbosa Jr, acerca da concentração de diversos elementos essenciais e tóxicos em algumas

polpas de açaí consumidas por ribeirinhos no estado do Pará, mostrou uma elevada concentração de Manganês (Mn) e que com o consumo de uma pequena porção destas polpas (< 200 g), a ingestão máxima tolerada para este elemento químico poderia ser facilmente ultrapassada (BARBOSA Jr, Comunicação Pessoal, 2010). A preocupação é fundamentada pois o elemento químico Mn, apesar de sua comprovada essencialidade, é capaz de desencadear inúmeros efeitos neurotóxicos em concentrações excessivas.

Embora a biodisponibilidade e forma química do Mn nos alimentos e suas influências na absorção pelo trato gastrointestinal sejam pontos contraditórios e bastante discutidos na atualidade, estas informações são cruciais para afirmar que um alimento é fonte alimentar importante de um dado elemento químico essencial. Além disso, informações ou estudos sobre a biodisponibilidade e forma química de elementos químicos em açaí inexistem na literatura até o momento.

Neste ponto, partindo das informações preexistentes sobre nutrientes e compostos bioativos presentes no açaí, foi especulado se tais compostos, principalmente a fração fenólica do açaí, poderiam neutralizar e/ou prevenir possíveis efeitos neurotóxicos causados pelo excesso de Mn via estresse oxidativo. Uma vez que, a elevada e incomum concentração de Mn presente na matriz do próprio fruto pode conter metabólitos secundários que estejam envolvidos em mecanismos de auto-defesa da planta contra um potencial estresse oxidativo causado pelo Mn (MANACH, et al., 2004).

A hipótese de que a expressiva concentração de polifenóis no açaí possa trazer um contraponto e proteger contra potenciais danos causados pelo Mn é suportada pela literatura que tem demonstrado que os polifenóis são neuroprotetores em uma variedade de ensaios *in vitro* e em modelos *in vivo* na prevenção de doenças neurodegenerativas e que, os efeitos são principalmente devido às suas propriedades antioxidantes (BUTTERFIELD, et al., 2002; MANDEL;YOUDIM, 2004; POULOSE, et al., 2012).

Estes estudos são relevantes tanto na investigação da segurança alimentar da polpa de açaí, quanto para verificar o potencial efeito terapêutico em casos de intoxicações por Mn provenientes de outras fontes de exposição.

Neste contexto, primeiramente o presente trabalho atuou avaliando se a elevada concentração de Mn é de fato originária do fruto ou se seriam elementos químicos adquiridos como contaminantes no processo de fabricação das polpas.

Para tanto, o processo de fabricação da polpa de açaí foi feito no laboratório com materiais descontaminados e água deionizada. A amostragem (n=12) foi feita em locais diferentes a fim de se obter um conjunto de dados mais confiável sobre a concentração de alguns elementos essenciais e iniciar estudos de fracionamento químico para predições preliminares da biodisponibilidade dos mesmos.

Posteriormente, foi verificado se uma fração da polpa de açaí extraída com auxílio de metanol e coluna funcionalizada com cadeias alifáticas contendo 18 átimos de carbono (coluna C_{18}), rica em compostos fenólicos, exerceria efeitos protetores contra o estresse oxidativo induzido por $MnCl_2$ em astrócitos, que são células determinantes na indução de danos neurotóxicos e neurodegenerativos e cujos efeitos do $MnCl_2$ são bem estabelecidos.

Assim, a presente tese é apresentada em 2 capítulos:

O **Capítulo 1** se ocupou em descrever o perfil dos elementos químicos essenciais Cálcio (Ca), Cobre (Cu), Ferro (Fe), Magnésio (Mg), Manganês (Mn) e Zinco (Zn) em polpas de açaí, bem como avaliar o perfil de fracionamento químico com considerações prováveis sobre a biodisponibilidade e as implicações destes achados para a ingestão diária adequada recomendada para estes elementos químicos essenciais.

O **Capítulo 2** trabalha em uma abordagem *in vitro*, utilizando cultura primária de astrócitos realizada na Universidade de Vanderbilt - Medical Center (Nashville, TN, EUA) durante o estágio sanduíche sob a orientação do prof. Dr. Michael Aschner afim de verificar o efeito do extrato metanólico de açaí na atenuação da citotoxicidade, estresse oxidativo e alterações funcionais induzidos por 500 µM de $MnCl_2$.

Portanto, cada capítulo se ocupou em responder às seguintes perguntas:

Capítulo 1 – A concentração de Mn é de fato naturalmente elevada na parte comestível dos frutos do açaizeiro? Além do Mn, qual a contribuição nutricional da polpa de açaí para as necessidades diárias de elementos essenciais como Ca, Cu, Fe, Mg e Zn? O açaí pode ser considerado uma potencial fonte alimentar destes elementos essenciais da dieta?

Capítulo 2 – Qual o efeito das antocianinas do açaí contra os danos conhecidamente induzidos por 500 µM de $MnCl_2$ em culturas primárias de astrócitos?

Assim o propósito primordial desta tese foi iniciar a discussão sobre os potenciais riscos e/ou benefícios que o consumo diário ou elevado de polpa de açaí poderia levar a saúde do ponto de vista de elementos químicos essenciais e incentivar mais estudos relacionados a este tema.

Capítulo 1

Avaliação da polpa de açaí como um possível alimento fonte dos elementos químicos essenciais Ca, Cu, Fe, Mg, Mn e Zn na dieta

1. Revisão da Literatura

1.1. A polpa de açaí

O açaí - fruto do açaizeiro – não é consumido como fruto *in natura*, mas sim após um pré-processamento dos frutos com adição de água para seu despolpamento e posterior filtração, produzindo uma bebida espessa, roxa, com textura cremosa, aparência oleosa e sabor característico e chamada popularmente de açaí, suco de açaí ou vinho de açaí (FIEAM, 2013; EMBRAPA, 2006).

A polpa do açaí pode ser obtida por extração mecânica ou manual e, geralmente, é obtida conforme apresenta a Figura 1 abaixo:

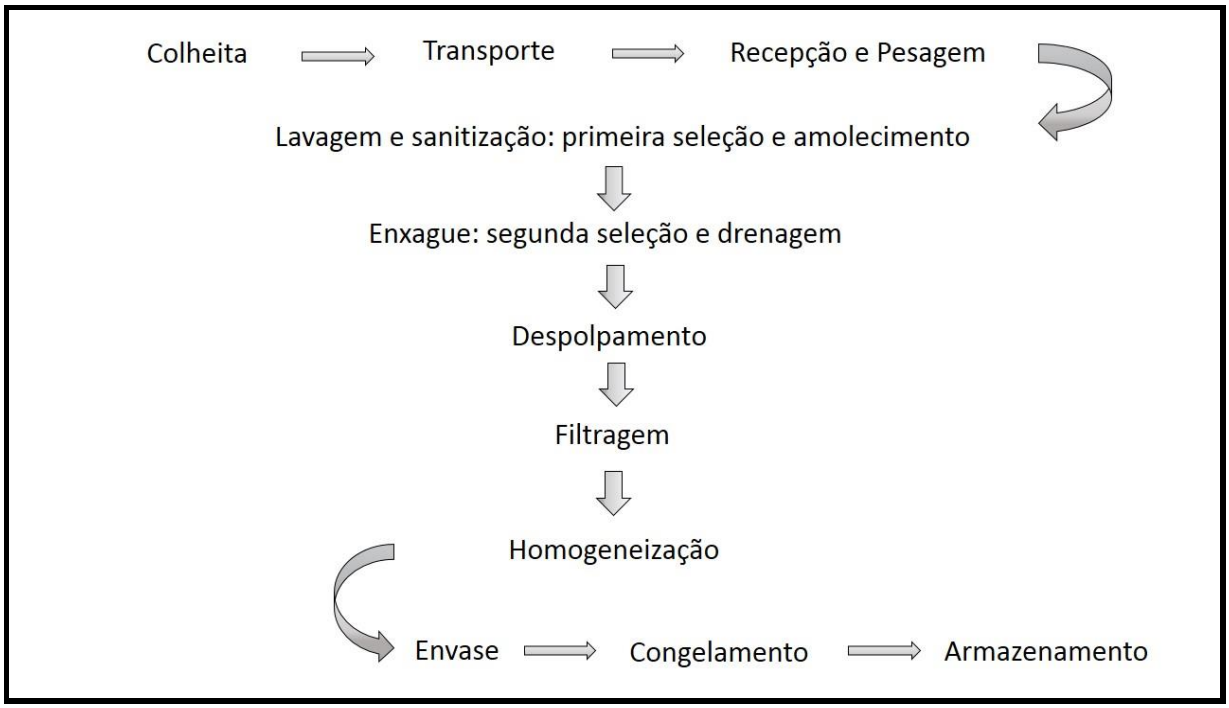


Figura 1. Esquema do procedimento de despolpamento dos frutos do açaizeiro para obtenção da polpa de açaí - da colheita ao armazenamento para comercialização. (Adaptada de MORAES, 2013).

O método de despolpamento manual é normalmente feito nas residências ribeirinhas na região norte do Brasil. O processo é muito lento e trabalhoso, onde os frutos são imersos em água à temperatura ambiente por uma hora ou durante vinte minutos em água morna. Alternativamente ao método manual, a extração da polpa pode ser feita com o auxílio de um despolpador, movido por motor elétrico, que visa auxiliar o atrito fruto/fruto (MORAES, 2013).

A polpa de açaí deve ser obtida através de frutos frescos, sãos e maduros. Estes frutos devem estar desprovidos de terra, parasitas e microorganismos (BRASIL, 2000). Estes últimos, se presentes, podem diminuir a vida de prateleira da polpa, e ainda, podem trazer enfermidades a quem ingere a polpa, como no recente caso da Doença de Chagas transmitida pela polpa de açaí processada com barbeiros (vetor da doença) (PEREIRA, et al., 2010) e ainda expor indivíduos a quantidades elevadas de elementos químicos proveniente de solo contaminado.

O açaí comercializado pode ser classificado de acordo com a quantidade adicionada de água, uma vez que, quanto maior a adição de água, maior é a facilidade e extração da polpa, bem como seu rendimento, uma classificação para controlar sua comercialização foi proposta (BRASIL, 2000):

1) Grosso ou Especial (Açaí Tipo A): possui aparência muito densa e sólidos totais acima de 14%;

2) Médio ou Regular (Açaí Tipo B): possui aparência densa e sólidos totais variam de 11 a 14%;

3) Fino ou Popular (Açaí Tipo C): apresenta aparência pouco densa e sólidos totais variam de 8 a 11%;

Deste modo, fica evidente que a qualidade da água utilizada no processo também precisa ser avaliada e pode trazer contaminantes e, uma vez que a fabricação de polpa de açaí ainda é em grande parte artesanal, o controle deste processo ainda é um grande desafio no controle de qualidade da polpa de açaí comercializada.

A partir de meados da década de 90, o suco de açaí foi, gradativamente conquistando novas fronteiras, sendo apreciado em todo o Brasil e no mercado internacional em países como Estados Unidos, membros da Comunidade Européia, Japão e América Sul (SANTANA, et al., 2006; SILVA, et al., 2006). Neste sentido, a preocupação com a qualidade do produto a ser exportado aumentou exponencialmente e a produção que até então era exclusivamente de base agrícola

extrativista, não conseguiu atender a demanda e as exigências do mercado internacional, de forma que o plantio foi induzido e aos poucos migrando para uma base produtiva de cultivo (HOMMA, et al., 2006).

Consequentemente, um melhor controle do processamento do açaí tem sido gradativamente aplicado e aprimorado como exigência deste novo mercado a fim de melhorar a higiene do processso como um todo e a qualidade do produto, reduzindo os riscos de contaminação (SILVA, et al., 2006).

1.2. O consumo da polpa de açaí

Atualmente, só conhecem o gosto do açaí *in natura* os moradores do Estado do Pará, maior produtor de açaí, e os moradores dos estados vizinhos, nos quais também há açaizeiros nativos, sendo um dos produtos mais importantes da vida alimentar e cultural da população do norte do Brasil (PADILHA, et al., 2005; TINOCO, 2005). Nesta região, o açaí é consumido nas refeições principais na forma de bebida pura ou misturado com farinha de mandioca e peixe (SANTANA, et al., 2006) com uma estimativa média de consumo por pessoa de 500 mL por dia e, relata-se que, em algumas áreas, o consumo individual possa chegar a 2 litros por dia (KAHYAT, 2005).

Já nas demais regiões do Brasil, o açaí é consumido principalmente na forma de polpa, geralmente batido com xarope de guaraná e misturado a outras frutas nos intervalos das principais refeições. Por não fazer parte da cultura dos estados brasileiros que não são da Região Norte, o açaí só passou a ganhar destaque a partir de meados dos anos 90, quando as academias de ginástica descobriram o seu elevado valor energético e suas excelentes propriedades nutricionais, tornando o chamado “açaí na tigela” muito popular entre os adeptos da “cultura saúde” (ALEXANDRE, et al., 2004).

Ademais, a sua composição fitoquímica e propriedades antiinflamatórias e antioxidantes começaram a ser divulgados na mídia e o açaí rapidamente ganhou o famigerado status de “superfruta” (PACHECO-PALENCIA, et al., 2007; SCHAUSS, et al., 2006a; SCHAUSS, et al., 2006b) o que contribuiu ainda mais para a popularização do fruto em todo o Brasil e aumentou consideravelmente a exportação da polpa de açaí para diversos países ao redor do mundo.

1.3. Valor nutricional da polpa de açaí e seus compostos bioativos

Quanto ao seu valor nutricional, acima de tudo, o açaí é considerado um alimento extremamente energético contendo altos teores de proteínas, lipídios, carboidratos e tiamina, fornecendo um alto valor calórico (CÓRDOVA-FRAGA, et al., 2004; ROGEZ, 2000). A Tabela 1 abaixo compara os valores nutricionais médios encontrados na matéria seca de polpa de açaí reportados por ROGEZ, SILVA e MENEZES.

A Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO) organizada pela Unicamp (TACO, 2011) é a única tabela de alimentos até 2013 a reportar informações nutricionais sobre o açaí, todavia na forma de polpa congelada e será discutida posteriormente.

Tabela 1. Composição centesimal da polpa de açaí liofilizada. (Extraído e adaptado de ROGEZ, 2000, SILVA, et al., 2004 e MENEZES, et al., 2008)

Determinações	**(g/100g de matéria seca)**		
	(ROGEZ, 2000)	**(SILVA, et al. 2004)**	**(MENEZES, et al., 2008)**
Lipídeos	45,9 – 50,7	13,9	40,75
Fibras	32,3 – 34,0	-	-
Proteínas	8,3 – 18,2	7,7	8,13
Carboidratos Totais	1,5 – 6,7	-	-
Glicose	0 – 1,5	1,02	-
Carboidratos Totais/Fibras	-	-	42,53
Minerais	2,0 – 3,5	-	-
Cinzas	-	-	3.68

Entre os fitoquímicos encontrados no açaí, destacam-se as antocianinas, as proantocianidinas e outros flavonóides (SCHAUSS, et al., 2006a; BOBBIO, et al., 2000; MENEZES, et al., 2011). No entanto, uma gama de outros compostos bioativos da classe das antocianinas e outros polifenóis (DARNET, et al., 2011; DEL POZO-INSFRAN, et al., 2004; KANG, et al., 2011; OLIVEIRA, et al., 2012; ROSSO;MERCADANTE, 2007; RUFINO, et al., 2011) têm sido recentemente identificados na matriz do açaí com tendência a aumentar ainda mais estudos sobre

o fruto. Isto demonstra que, as propriedades antioxidantes (a serem discutidas ao longo desta tese), antiinflamatórias e outras atríbuidas ao açaí são resultantes de uma mistura complexa de compostos bioativos encontrados no alimento.

No que tange a presença de elementos químicos essenciais (também chamado pelos nutricionistas por minerais, sais minerais ou micronutrientes) no açaí as informações são escassas e incompletas. Nos resultados demonstrados por SILVA (2004), as informações sobre o número de amostras analisadas foram omitidas, bem como a técnica analítica utilizada para as determinações. MENEZES e colaboradores (2008) reportou os resultados de uma única amostra, coletada no Estado do Pará. Desta forma, uma avaliação mais ampla, com um número maior de amostras é motivada a fim de se conhecer o valor nutricional real do açaí com relação aos elementos químicos essenciais, que são em sua maior parte obtidos pela dieta e suas deficiências ou excessos podem desencadear enfermidades e danos graves, em alguns casos irreversíveis.

1.4. Cálculos de ingestão diária adequada para elementos essenciais

Devido à essencialidade de alguns elementos químicos para a manutenção de funções vitais e a homeostasia do organismo humano, existem recomendações em termos de ingestão nutricional para os mesmos de acordo com o gênero e a idade (IOM, 2001). A Tabela 2 traz ingestóes diárias preconizadas pela IOM (sigla do inglês – *Institute of Medicine*) para os elementos Ca, Cu, Fe, Mg, Mn e Zn. Para países em que não há tabelas próprias de valores de ingestão diária adequada para elementos essenciais (como é o caso do Brasil), usualmente utiliza-se estes valores preconizados pela IOM.

Tabela 2. Tabela simplificada das necessidades de ingestão diária para Ca, Cu, Fe, Mg, Mn e Zn, segundo (IOM, 2001). Valores estão demonstrados em mg/dia.

	Criança 1-3	**Criança 4-8**	**Homem 19-70**	**Mulher 19-70**	**Gestante**	**Lactante**
Cálcio*	700	1000	1000	1200	1300	1300
Cobre	0,34	0,44	0,9	0,9	1,0	1,3
Ferro	7	10	8	18	27	10
Magnésio	80	130	420	320	400	360
Manganês*	1,2	1,5	2,3	1,8	2,0	2,6
Zinco	3	5	11	8	12	13

*Apenas a Ingestão Adequada foi estabelecida

Estas recomendações se baseiam na premissa de que a ingestão diminuída destes elementos pode levar a distúrbios em funções específicas do corpo humano (MEEK, et al., 2010) e são utilizadas em programas nutricionais e para propósitos regulatórios como, por exemplo, rotulagem de alimentos processados e industrializados. Estas estimativas foram tradicionalmente concebidas para cobrir as necessidades de praticamente todos os indivíduos de qualquer grupo populacional levando em conta a variação individual nas necessidades fisiológicas.

A estimativa de requerimento médio (EAR - sigla do inglês – *Estimated Average Requirement*) é uma etapa crítica para o estabelecimento de valores de referência para ingestão diária adequada (IDA) e esta derivação deve ser feita da forma mais transparente possível e com o maior número de evidências possíveis sobre em que os cálculos estão baseados (YATES, 2007). Desta forma, concebe-se um valor de IDA que é a média de ingestão dietética de um dado elemento químico suficiente para atender as necessidades do mesmo para quase todos (97-98 %) indivíduos saudáveis em uma fase particular da vida e do grupo de gênero. Para os elementos Cu, Fe, Mg e Zn abordados neste trabalho, os valores de IDA foram estabelecidos.

Quando este cálculo não é possível se estabelece um valor de ingestão adequada (AI - sigla do inglês – *Adequate Intake*) e este valor é obtido com base em aproximações observadas ou determinados experimentalmente ou ainda, estimados pela ingestão de um dado nutriente por um grupo de pessoas aparentemente saudáveis. Portanto, é um cálculo nada preciso. Mesmo assim é largamente utilizado

quando uma IDA não pode ser determinada. Este é o caso dos elementos químicos essenciais Ca e Mn, que até hoje não possuem evidências suficientes para estimar um valor de IDA formal.

Para estimar estas exigências médias, um biomarcador de deficiência apropriado deve ser selecionado, como por exemplo, a anemia ferropriva para a deficiência de Fe, que descreve a relação entre a ingestão dietética e a saúde. No entanto, para alguns elementos, como Cu e Zn, não existem bons biomarcadores até o momento (HARVEY, et. al., 2009; LOWE, et al., 2009), e para outros, tais como o próprio Fe, a relação entre ingestão e estoques de Fe no organismo é confundida por variações na absorção e estados fisiológicos individuais.

As necessidades médias para esses elementos são então, derivados usando uma abordagem fatorial em que as necessidades fisiológicas de crescimento e manutenção dos tecidos, fatores endógenos e as perdas são estimadas e, o total é convertido para uma exigência dietética (YATES, 2007).

Por fim, leva-se em conta um fator de biodisponibilidade do elemento químico nos alimentos e eis que neste exato ponto, a falta de informações precisas e confiáveis fazem com que tais valores de IDA sejam incompletos (FAIRWEATHER-TAIT; COLLINGS, 2010).

Não obstante, os valores de ingestão diária adequada ainda são os melhores norteadores existentes para saber se um alimento pode ser considerado uma fonte alimentar de elementos químicos essenciais.

1.5. Biodisponibilidade de elementos químicos em alimentos

A fim de converter as necessidades fisiológicas em necessidades alimentares, é necessário um ajuste que leve em consideração as variáveis relacionadas ao alimento e ao indivíduo e que afetam a absorção e a utilização destes elementos químicos pelo organismo, ou seja, a sua biodisponibilidade global.

Entretanto, a definição de biodisponibilidade de elementos químicos difere de autor para autor. FAIRWEATHER-TAIT define biodisponibilidade simplificadamente como a proporção de um elemento essencial de um dado alimento que é utilizado para as funções biológicas após a ingestão (FAIRWEATHER-TAIT, 1992; FAIRWEATHER-TAIT, 1996). Outros, consideram um elemento químico

biodisponível quando este está numa forma metabolicamente ativa e que provavelmente será absorvido pelo organismo (AMMERMAN, et al., 1995; WELCH; HOUSE, 1984; HOUSE, 1999).

No que tange os fatores estritamente relacionados ao alimento da dieta, um elemento químico essencial “potencialmente biodisponível” seria aquele que possui fatores intrínsicos favoráveis a sua absorção (HOUSE, 1999), tais como: 1)- interações positivas (elemento-elemento e/ou elemento-compostos orgânicos da matriz; 2)- o elemento está em forma química absorvível; 3)- presença de substâncias potencializadoras como açúcares, alguns aminoácidos, ascorbato, citrato, vitamina D e outros; 4)- fraca interação de substâncias inibidoras como fitatos, oxalatos, fibras, polifenóis, excesso de ascorbato ou folato, 5)- dentre outros.

Substâncias potencializadoras são aquelas que aumentam a biodisponibilidade do elemento essencial. Geralmente são compostos moleculares que formam complexos solúveis com os elementos essenciais; este complexo molécula+elemento para ser considerado um potencializador deve: 1)- ou ser absorvido na forma intacta; 2)- ou ser clivado e liberar o elemento químico na forma solúvel e absorvível; 3)- ou transferir o elemento para a mucosa intestinal ou a um aceptor da serosa intestinal (CLYDESDALE, et al., 1991).

Por outro lado, substâncias inibidoras devem formar complexos insolúveis com os elementos químicos que: ou não podem ser absorvidos na forma intacta, ou não podem ser clivados, ou ainda prevenir que o elemento atinga o seu sítio aceptor na mucosa intestinal (CLYDESDALE, et al., 1991).

No entanto, a biodisponibilidade real é também fortemente influenciada por fatores fisiológicos de cada indivíduo que está ingerindo um dado alimento, ou seja, mesmo o elemento químico estando na forma potencialmente biodisponível, este pode ser “mais” ou “menos” absorvido devido a fatores como: idade, sexo, etnia, quantidade de alimento ingerido ao mesmo tempo, status fisiológico (gravidez, lactação e atividade física), doenças pré-existentes (incluindo parasitismo) e diversos outros fatores (HOUSE, 1999; MILLS, 1985). De modo que, a biodisponibilidade real e exata de um elemento químico varia de pessoa para pessoa e cada caso deve ser avaliado individualmente, por um profissional especializado.

1.6. Fracionamento e especiação química de elementos químicos e suas influências nas suas biodisponibilidades e promoção de efeitos nutricionais e toxicológicos

Segundo a IUPAC, fracionamento químico é definido como um processo de classificação de um analito ou um grupo de analitos em uma amostra de acordo com suas propriedades físicas ou químicas, já a especiação química é a determinação do elemento químico na sua forma química exata (TEMPLETON, et al., 2000).

Informações sobre fracionamento e especiação química dos elementos químicos são de suma importância para o entendimento da atividade biológica dos mesmos. Infelizmente, apenas os elementos selênio (Se), arsênio (As) e mercúrio (Hg) são consistentemente estudados. E graças ao avanço na especiação química destes elementos, trabalhos de revisão têm discutido com profundidade e consolidado o tema de como a forma química destes modificam e/ou modulam suas biodisponibilidades bem como a toxicidade e potenciais efeitos benéficos à saude, como por exemplo: a diferença do Se natural dos alimentos *versus* o Se de suplementos alimentares (PEDRERO; MADRID, 2009; THIRY, et al., 2012), formas de As no arroz (ALAVA, et al., 2013; SUN, et al., 2012), formas de Hg na água ou no peixe (CLARKSON; MAGOS, 2006; GOCHFELD, 2003; MOREDA-PIÑEIRO, et al. 2011), entre outros.

O Mn juntamente aos elementos Co, Fe, Zn e Cu têm recebido atenção apenas nos últimos anos e são classificados como elementos de especiação química desafiadora ou elementos de segunda classe na especiação (RUZIK, 2012). Uma vez que pouco se sabe sobre as espécies químicas destes elementos nas mais diversas matrizes, o desenvolvimento metodológico para a especiação química destes acaba por ser um campo de trabalho extremamente árduo, com inúmeros problemas e limitações.

No caso específico do Mn, alguns trabalhos recentes têm identificado espécies químicas em matrizes biológicas, como é discutido na recente revisão publicada por MICHALKE e FERNSEBNER (2013). Estes pesquisadores defendem que o estado de oxidação do Mn e sua forma química livre ou complexada são essenciais para o desencadeamento e modulação de seus efeitos tóxicos nos sistemas biológicos, em especial mamíferos. Todavia, as informações sobre

especiação química de Mn em alimentos são escassas e desencontradas (RUZIK, 2012).

Desta forma, o estudo das formas químicas de Mn nos alimentos está hoje concentrado em técnicas de fracionamento, que são bastante encorajadas, pois são o ponto de partida para a elucidação estrutural das espécies químicas de qualquer elemento que pode futuramente levar a uma análise de especiação de fato.

Diversas são as técnicas utilizadas para este fim como: separações cromatográficas (KOPLIK, et al., 2002), extrações em fase sólida (POHL; PRUSISZ, 2006), fracionamento por solubilidade em solventes (SZPUNAR, J. et al., 1999) e métodos de biodisponibilidade/bioacessibilidade *in vitro* e *in vivo*. Estas ferramentas mesmo não trazendo informações completas sobre as formas químicas do Mn, já auxiliam na determinação das frações “absorvíveis” do Mn nos alimentos, servindo como direcionamento e triagem nos estudos presentes e futuros neste campo de pesquisa.

É reconhecido na literatura que a identificação e a quantificação das formas físico-químicas dos elementos químicos são determinantes na avaliação de sua real biodisponibilidade ou toxicidade para humanos, não obstante, a maior parte dos trabalhos publicados sobre a biodisponibilidade e fracionamento químico de elementos essenciais têm se limitado basicamente ao estudo de chás em geral, a fim de se avaliar e compreender o papel dos polifenóis na formação de complexos de diferentes estabilidades com íons metálicos (CAIRNS, et al., 1996; FLATEN, 2002; POHL; PRUSISZ, 2007; KARAK e BHAGAT, 2010) e na busca de uma melhor compreensão de como esta interação pode influenciar na absorção dos elementos químicos essenciais ao longo do trato gastrointestinal (POHL; PRUSISZ, 2007).

Até o momento, para o melhor de nosso conhecimento, nenhuma informação existe na literatura sobre o fracionamento do Mn e de quaisquer outros elementos no açaí, bem como informações sobre as potenciais biodisponibilidades neste alimento.

2. Objetivo do Capítulo 1

2.1. Objetivo Geral

Avaliar se a polpa de açaí pode ser considerada um alimento fonte dos elementos químicos essenciais Ca, Cu, Fe, Mg, Mn e Zn e avaliar se os mesmos estão em suas formas “potencialmente biodisponíveis” para absorção.

2.2. Objetivos Específicos:

- Determinar a concentração dos elementos químicos essenciais Ca, Cu, Fe, Mg, Mn e Zn em 12 amostras distintas de frutos de açaizeiro despolpados em laboratório segundo método convencional.

- Estimar a contribuição média do consumo de polpa de açaí para as necessidades de ingestão diária destes elementos químicos essenciais.

- Fracionar estes elementos químicos essenciais na polpa de açaí a fim de obter informações sobre sua distribuição e interação com os demais componentes da matriz da polpa de açaí.

3. Materiais e Métodos utilizados no Capítulo 1

3.1. Instrumentação

Na etapa de preparo das polpas de açaí foi utilizado um homogeinizador do tipo ultra-turrax equipado com uma hélice propulsora adaptada de material livre de metais e um liofilizador Liotop L101 (Liobras®, São Carlos, SP, BRA).

Na digestão das amostras para a determinação dos elementos essenciais totais foi utilizado forno de microondas equipado com PTFE, modelo Milestone Start D (Sorisole, Bergamo, ITA).

Para a separação cromatográfica no fracionamento dos elementos essenciais foi utilizado um cromatógrafo analítico e semi-preparativo (Shimadzu, Kyoto, JA).

Para a determinação dos elementos essenciais utilizou-se um espectrômetro de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) modelo ELAN DRC II (Perkin Elmer®, Norwalk, CT, EUA) que está instalado em sala limpa classe 1000 no Laboratório de Toxicologia e Essencialidade de Metais da FCFRP-USP. O argônio utilizado pelo equipamento foi de alta pureza (99,999%) adquirido da White Martins (Sertãozinho, SP, Brasil). Todos os parâmetros instrumentais foram diariamente otimizados.

3.2. Reagentes e soluções

Água deionizada de alta pureza (resistividade 18,2 M Ω.cm) obtida pelo sistema Milli-Q (Millipore®) foi utilizada em todo o trabalho. Ácido nítrico (HNO_3) e demais solventes foram bidestilados semanalmente, empregando-se destilador de quartzo da Kurner Analysentechnik® para eliminação de impurezas. Todos os outros reagentes necessários para o fracionamento dos elementos essenciais foram de grau analítico e adquiridos da Sigma Aldrich® (Saint Louis, MO, EUA).

Todas as soluções e amostras foram armazenadas em frascos de polietileno ou tubos de propileno do tipo Falcon® livres de contaminação por metais (BD® - Becton, Dickinson and Company). Frascos de plástico e materiais de vidro foram mergulhados em solução contendo 20% v/v HNO_3 por 24 h, lavados com água Milli-

Q e secos em capela de fluxo laminar classe 100 para garantir a descontaminação antes de cada uso. Todas as operações para preparo das soluções foram realizadas em sala limpa classe 1000.

Soluções estoque multielementar padrão ICP-MS (Perkin-Elmer®, Inc.) de concentração de 10 mg L^{-1} foram utilizadas para a construção das curvas analíticas.

3.3. Preparo das polpas dos frutos de açaizeiro

Foram colhidos frutos de açaizeiro de plantio em terra firme de diferentes localidades no período de safra destes frutos na Região Centro-Sul do Brasil e apenas uma amostra foi obtida da Região Norte do Brasil (amostra nº 6) devido a dificuldade de deslocamento para a obtenção dos frutos. No total foram reunidas 14 amostras contendo em média 400 g de frutos em cada amostragem que foram imediatamente armazenadas em freezer -20° C até o despolpamento.

No momento do despolpamento, 2 amostras foram descartadas pois os frutos iniciavam um processo de fermentação, assim o “n” de amostras final considerado foi igual a 12.

O despolpamento dos frutos de açaizeiro foi baseado na metodologia convencional utilizada para fabricação de polpas de açaí comerciais (EMBRAPA, 2006) com alguns cuidados adicionais: 1)- a água utilizada foi deionizada (Sistema Milli-Q); 2)- todos os materiais utilizados foram descontaminados com HNO_3 20% por 24 horas. Estes cuidados foram tomados a fim de assegurar que as concentrações de elementos essenciais fossem estritamente provenientes da parte comestível dos frutos e não do processo de fabricação das mesmas.

O procedimento em si consistiu da embebição dos frutos em água a 40° C por 1 hora na proporção 3:2 (massa de fruto/volume de água). Em seguida, os frutos foram despolpados por atrito fruto/fruto com auxílio de agitação mecânica por cerca de 5 minutos, sendo então coados e congelados a -80° C para posterior liofilização. As polpas de açaí liofilizadas foram utilizadas nos experimentos:

1) Determinação dos elementos essenciais totais (Ca, Cu, Fe, Mg, Mn e Zn);

2) Fracionamento por extração em fase sólida (SPE) *off-line*, seguida de separação cromatográfica.

3.4. Determinação dos elementos essenciais totais (Ca, Cu, Fe, Mg, Mn e Zn)

Antes da determinação dos elementos essenciais totais, as polpas de açaí liofilizadas foram submetidas à digestão ácida assistida por microondas para eliminação da matriz orgânica segundo o método proposto por NARDI e colaboradores (2009) com algumas modificações. O peróxido de hidrogênio foi retirado do método e a etapa 4 do programa de aquecimento foi estendida em 10 minutos. O programa de aquecimento utilizado está descrito na Tabela 3 abaixo:

Tabela 3. Programa de aquecimento utilizado na digestão das amostras assistida por micro-ondas segundo proposto por NARDI e colaboradores (2009) com modificação.

Etapa	Temperatura (°C)	Potência (W)	Tempo (minutos)
1	160	1000	4,5
2	160	0	0,5
3	230	1000	5,0
4	230	1000	25,0
5	0	0	20,0

Os elementos essenciais determinados e os respectivos isótopos analisados foram: cálcio (^{43}Ca), cobre (^{65}Cu), ferro (^{57}Fe), magnésio (^{26}Mg), manganês (^{55}Mn) e zinco (^{66}Zn). As amostras foram digeridas em duplicata e a leitura no ICP-MS de cada replicata foi realizada duas vezes.

Para verificar a exatidão e precisão dos resultados do método analítico proposto foi utilizado o Material de Referência Certificado NIST8415 (Whole Egg Powder), produzido e comercializado pela *National Institute of Standards and Technology* (NIST) nos Estados Unidos. Como não há material de referência certificado para validação dos dados que seja composto de açaí, procurou-se utilizar um material cujos componentes da matriz se aproximassem ao máximo possível das amostras. O material NIST8415 foi selecionado por ser, dentre os materiais de referência disponíveis, de matriz mais próxima ao açaí, rico em gorduras e proteínas e foi preparado, junto e da mesma forma, que as amostras analisadas. Todos os valores encontrados estavam de acordo com os valores certificados como mostra a Tabela 4 abaixo:

Tabela 4. Análise do Material de Referência Certificado NIST8415 (pó de ovo) expresso como média ± desvio padrão (n=6) comparado com os valores certificados

Elemento (µg/g)	Valor Certificado	Valor Encontrado
Cálcio	2480 ± 190	2452 ± 39
Cobre	2,7 ± 0,36	2,5 ± 0,6
Ferro	112 ± 16	93 ± 14
Magnésio	305 ± 27	296 ± 1
Manganês	1,78 ± 0,38	1,6 ± 0,2
Zinco	67,5 ± 7,6	55 ± 10

O valor de concentração para cada elemento obtido na análise das amostras (n=12) foram agrupados e expressos como média ± desvio padrão e analisados descritivamente e utilizados nos cálculos de estimativa de ingestão diária.

3.5. Extração em fase sólida (SPE) off-line seguida de separação cromatográfica preparativa e coleta das frações

A 10 g de açaí liofilizado e desengordurado foi acrescentado 100 mL de água, homogeneizado por 10 minutos e filtrado em papel de filtro comum. O filtrado obtido foi eluído em sistema de extração *off-line* com um cartucho Sep-pak® C_{18} (Waters Corp) previamente ativado com metanol e água.

Este procedimento é usado para extração de antocianinas e compostos fenólicos que se aderem fortemente à fase reversa do cartucho. Assim, nesta etapa, toda a coloração no açaí ficou retida no cartucho e foi utilizada posteriormente no Capitulo 2 desta tese. O eluato aquoso incolor obtido foi dividido em 2 alíquotas: uma para a determinação de elemento essenciais e outra alíquota foi separada para liofilização a fim de concentrar os compostos para a cromatografia preparativa.

Do eluato liofilizado, 500 mg foi ressolubilizado em 0,5 mL de água e injetado em um cromatógrafo preparativo com detecção UV. A coluna cromatográfica preparativa utilizada foi a Phin-Pack PREP-005(H) da Shimadzu e a fase móvel consistiu de uma solução aquosa de metanol 10% na vazão de 10 mL/min. Foi

coletada um fração a cada 30 segundos, totalizando 11 frações (5:30 minutos de corrida cromatográfica). Não foram observados outros picos cromatográficos até 50 minutos de corrida. As 11 frações foram analisadas por ICP-MS para a determinação de elementos essenciais.

Para a análise das frações obtidas por ICP-MS, alíquotas foram diluídas para uma concentração final de 0,2% de MeOH em HNO_3 0,5% e Triton X-100 0,01% e as curvas analíticas equalizadas com a adição de MeOh na mesma concentração que as das frações.

3.6. Condições Instrumentais do ICP-MS

As condições instrumentais do ICP-MS foram ajustadas diariamente (daily performance) otimizando-se: vazão do gás de nebulização e voltagem das lentes a fim de se obter uma máxima sensibilidade para íons M^+ e míninos sinais para M^{2+} (íons de dupla carga) e MO^+ (formação de óxidos).

4. Resultados e Discussão

4.1. Determinação de elementos essenciais totais nas polpas de açaí

A motivação inicial deste Capítulo 1 foi averiguar a concentração de elementos essenciais no açaí, de forma mais sistemática do que realizado previamente por outros estudos, provenientes de bioacumulação na parte comestível do fruto, bem como, confirmar estudos preliminares feitos no Laboratório de Toxicologia e Essencialidade de Metais em que foram encontradas concentrações excessivas de Mn em polpas coletadas no Estado do Pará.

O despolpamento foi realizado conforme o convencional, entretanto a massa liofilizada obtida foi cerca de 3% do volume de polpa total, portanto o rendimento foi baixo. Possivelmente, para se chegar a faixa de 10 a 15% de sólidos totais que normalmente são encontrados nas polpas comerciais, uma etapa de concentração e/ou desidratação, ou ainda a adição de menor quantidade de água deveriam ser adotados. Ademais, o baixo rendimento não compromete o trabalho uma vez que os experimentos foram realizados com a matéria seca (polpa liofilizada).

Foram encontradas concentrações expressivas de todos os elementos essenciais determinados (com destaque para o Mn). A distribuição dos elementos essenciais em mg/Kg de m.s. nas respectivas polpas de açaí são apresentados na Figura 2 abaixo:

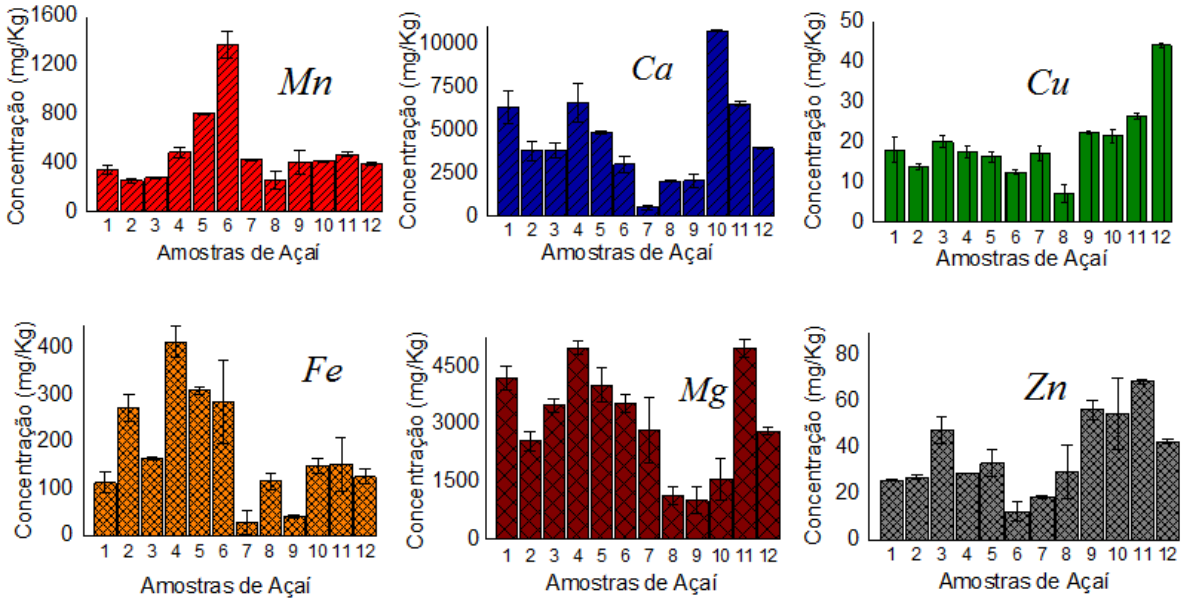


Figura 2. Distribuição dos elementos essenciais determinados nas 12 polpas de açaí preparadas com os frutos de açaizeiro colhidos.

Mesmo sendo controladas as possíveis fontes de contaminação durante o processamento das polpas no laboratório, as concentrações dos elementos determinados apresentaram uma elevada variabilidade entre as amostras. Uma explicação plausível, seria que a qualidade do solo de plantio dos açaizeiros esteja influenciando na qualidade nutricional dos seus frutos, tendo em vista que estes elementos se encontram naturalmente presentes neles e que a contaminação externa foi descartada. No entanto, para a confirmação desta hipótese seria necessário a determinação dos elementos essenciais não apenas nos frutos, mas também no solo de plantio dos mesmos a fim de se verificar se alguma real correlação existe.

Para o melhor do nosso conhecimento, existem apenas três trabalhos prévios que reportam as concentrações dos elementos essenciais em polpa de açaí liofilizada, que são: ROGEZ, 2000, SILVA, et al., 2004 e MENEZES, et al., 2008 cujos dados se encontram expressos comparativamente aos obtidos aqui na Tabela 5.

Os trabalhos de SILVA e colaboradores (2004) e MENEZES e colaboradores (2008) possuem limitações metodológicas que dificultam a extrapolação destes dados. A principal limitação destes trabalhos para a comparação com os dados obtidos nesta tese foi a apresentação do resultado que não trouxe consigo um desvio padrão das determinações (uma tendência obervada em tabelas de composição nutricional), impossibilitando assim a aplicação de testes estatísticos comparativos.

Os resultados elaborados nesta tese são um conjunto de dados obtidos com 12 amostras distintas de polpas de açaí preparadas de forma idêntica, com condições controladas, diferindo apenas na origem dos frutos. MENEZES e colaboradores (2008), como já citado, reportaram os dados obtidos com uma única amostra e SILVA e colaboradores (2004), por sua vez, apresentaram estes dados em forma de comunicação em congresso e, portanto, informações sobre as metodologias utilizadas, bem como sobre a amostragem foram omitidas. Este ponto, além da variabilidade observada entre as polpas analisadas, pode explicar a discordância entre alguns dos resultados em comparação com estes trabalhos prévios.

Para uma melhor visualização e comparação dos resultados, a concentração dos elementos que foi reportado na Figura 2 na unidade de mg/Kg de polpa

liofilizada foi convertido para a unidade de mg/100 g de matéria seca que foi a unidade de concentração adotada pelos demais autores.

Tabela 5. Tabela comparativa entre os valores de alguns elementos essenciais obtidos em polpa de açaí liofilizada e o reportado na literatura.

Determinações	**(mg/100g de matéria seca)**			
	Presente Trabalho	**(ROGEZ, 2000)**	**(SILVA, et al., 2004)**	**(MENEZES, et al., 2008)**
Cálcio	462 ± 280	286	480	330
Cobre	2,11 ± 0,91	1,7	2,04	2,15
Ferro	17,8 ± 12,8	**1,5***	32,8	ND
Magnésio	317 ± 168	174	**140***	124,4
Manganês	45 ± 30	32,3	**3,43***	**10,7***
Zinco	3,7 ± 1,7	7,00*	**1,01***	2,8

* Valores de concentração fora da faixa encontrada neste trabalho.

ND= concentração não determinada

Nota-se que os valores de concentração para Ca e Cu obtidos no presente trabalho parecem estar consistentes com os três trabalhos prévios.

Em contraste, os valores encontrados em nosso estudo para Fe parecem estar em desacordo com ROGEZ (2000). No entanto, como demonstrado pela Figura 2, a variabilidade do Fe nas amostras analisadas foi significativa, o que pode explicar os resultados divergentes na literatura acerca de o açaí ser ou não uma fonte de aquisição de Fe da alimentação (ROGEZ, 2000; SILVA, et al., 2004). MENEZES e colaboradores (2008) não reportaram o valor de Fe.

Com relação ao elevado teor de Mn, os resultados obtidos parecem corroborar com os dados preliminares obtidos no laboratório, anterior a esta tese (resultados não demonstrados) e de ROGEZ (2000). Este dado pode ter implicações na ingestão diária adequada deste alimento, bem como implicações toxicológicas que serão discutidas mais adiante neste capítulo de tese.

A amostra 6 (Figura 2) que foi obtida de plantio do Estado do Pará, região em que o fruto é nativo, merece um destaque para a concentração de Mn que foi significativamente ($p<0,001$) diferente das concentrações de Mn determinada nas demais amostras, bem como da média geral (cerca de 3 vezes maior). Corroborando

com a hipótese de que o solo possa influenciar na qualidade nutricional dos frutos. Pode-se supor que o solo da Região Norte do Brasil possui elevada concentração de Mn, o que é corroborado pelo episódio histórico do município de Serra do Navio, que fica no Estado do Amapá, onde foram encontrados grandes depósitos naturais de Mn no solo (CHISONGA, et al., 2012). Além do Projeto Grande Carajás, no próprio Estado do Pará, realizado pela empresa brasileira mineradora VALE S.A. que até hoje explora diversos minérios na região, incluindo o Mn (IBASE, 1983). Possivelmente, uma significativa parte do solo da Região Norte tenha uma elevada concentração de Mn, que pode chegar aos alimentos em geral e não apenas ao fruto do açaizeiro, embora nenhum estudo sistemático nos solos e alimentos desta região tenha sido publicado para o nosso conhecimento até a presente data.

Adicionalmente, as elevadas concentrações de Mn nas demais polpas fabricadas com frutos de outras localidades não pertencentes ao Norte do Brasil podem indicar que a incorporação e bioacumulção de Mn seja mais uma caracteristica inerente da planta e não apenas devido a oferta do solo.

Já os elementos essenciais Mg e Zn parecem estar de acordo com pelo menos um dos trabalhos previamente publicados.

Alguns outros estudos na literatura também reportam dados para alguns elementos essenciais no açaí, mas estes dados são obtidos de sucos de açaí industrializados (LLORENT, et al., 2013) e até mesmo polpas (TACO, 2011). Todavia, tais resultados não foram apresentados em matéria seca, e a comparação fica quase impossível, uma vez que a quantidade de sólidos totais em preparados a base de açaí variam enormemente devido a diversos fatores, tais como: época do ano de colheita do fruto, temperatura e método de processamento. Além disso, elementos químicos podem ser adicionados ou perdidos durante as etapas de industrialização destes preparados. Portanto, dados reportados em matéria seca são mais indicados para a comparação entre resultados.

4.2. Contribuição estimada da polpa de açaí para as necessidades de ingestão diária de Ca, Cu,Fe, Mg, Mn e Zn

No que tange o valor nutricional das polpas de açaí para elementos químicos essenciais, a Tabela 6 mostra que as concentrações são significativas no suprimento

das necessidades diárias preconizadas de acordo com o gênero e a idade (MEEK, et al., 2010; IOM, 2001) considerando que o consumo médio nacional de açaí na forma de polpa esteja ao redor de 300 mL/dia (POF, 2011) e assumindo um teor médio de sólidos totais de 12,5%.

Tabela 6. Contribuição do consumo de açaí para as necessidades diárias de Ca, Cu, Fe, Mg, Mn e Zn para calculado para a média de consumo nacional. Valores expressos como porcentagem da Ingestão Diária Adequada Recomendada/Ingestão Adequada.

	Criança 1-3	**Criança 4-8**	**Homem 19-70**	**Mulher 19-70**	**Gestante**	**Lactante**
Cálcio	25%	17%	17%	14%	13%	13%
Cobre	200%	154%	75%	75%	68%	52%
Ferro	82%	58%	73%	32%	21%	58%
Magnésio	129%	79%	24%	32%	26%	29%
Manganês	1216%	973%	635%	811%	730%	561%
Zinco	40%	24%	11%	15%	10%	9%

Mesmo considerando a média de consumo nacional, que é menor do que a da Região Norte, o açaí mostrou ser uma fonte de aquisição bastante importante de elementos essenciais. Ressaltando a importância do açaí para o estado nutricional da população do Norte do Brasil. A integração de alimentos de alto valor nutricional têm sido fortemente encorajados para amenizar o grave problema de saúde pública mundial conhecido como “fome oculta” ou “desnutrição mineral” (KHAN; BHUTTA, 2010).

Uma dieta rica nestes elementos essenciais além dos benefícios nutricionais, pode proteger o organismo de efeitos tóxicos ambientais, o que é especialmente importante para a Região Norte do Brasil que é conhecidamente exposta à espécie química MeHg (GROTTO, et al., 2009; YAMANE, et al., 1990) pelo consumo de peixes contaminados.

Em termos nutricionais, destaque deve ser dado ao elemento cálcio, cuja necessidade de ingestão diária é uma das maiores entre os elementos químicos essenciais devido ao seu papel estrutural no organismo como principal constituinte

da massa óssea e outras atividades metabólicas (EMKEY; EMKEY, 2013). Uma porção de 300 mL de polpa de açaí é capaz de suprir de 13 a 25% das necessidades diárias humanas, o que chega a ser uma contribuição maior que a do leite e alguns derivados (TACO, 2011).

Outra discussão importante é sobre o açaí ser ou não um alimento fonte de ferro. Considerando apenas o valor de concentração total média de Fe, é visto que a contribuição do açaí para a ingestão diária (5,8 mg de Fe/300 g de polpa) varia de 21 a 82%, o que é bastante siginificativo se for levado em conta que a mesma quantidade de carne bovina fornece em média 9 mg de Fe (TACO, 2011).

Entretanto, a elevada concentração de Mn pode levar a uma baixa biodisponibilidade de Fe, uma vez que a similaridade química entre ambos faz com que compitam pelos mesmos transportadores sistêmicos. Além disso, segundo FITSANAKIS e colaboradores, quando a concentração de Mn ofertada é elevada, a homeostasia e deposição de ferro e outros metais de transição no organismo ficam desequilibrados (FITSANAKIS, et al., 2010).

4.3. Polpa de açaí como excepcional fonte alimentar de Mn X Risco toxicológico

Neste ponto já se pode dizer que o açaí mesmo sendo uma importante fonte de elementos essenciais em termos de necessidades diárias recomendadas, estudos sobre a biodisponibilidade dos elementos essenciais devem ser realizados, já que hipoteticamente a elevada concentração de Mn pode modificar a absorção do Fe e até mesmo de outros elementos essenciais. Para o melhor de nosso conhecimento, não há descrito na literatura um alimento que seja consumido em porções significativas (o que exclui os condimentos culinários) e que possua concentrações de Mn tão elevadas quanto a polpa de açaí.

Outras fontes importantes de aquisição de Mn na dieta são as nozes, cereais, vegetais verdes folhosos e chás e comparados aos açaí, todos estes alimentos possuem concentrações de Mn inferiores (Tabela 7) (PENNINGTON; SHOENM, 1996). Esta afirmaão é valida, mesmo considerando o coeficiente de variação de 68% e os valores mínimos e máximos de Mn encontrados nas polpas analisadas.

Tabela 7. Comparação da concentração média de Mn em açaí com outros alimentos considerados sua fonte alimentar (valores em mg/100 g m.s.)

Grupo Alimentar ou Produto	Média	Mínimo	Máximo	Referência
Açai	44,3	26,7	136	Presente Trabalho
Aveia	3,25	2,92	3,66	FDA, 2010
Abacaxi	1,15	0,74	1,63	FDA, 2010
Arroz Cozido	0,46	0,40	0,53	FDA, 2010
Chá Descafeinado	0,45	0,31	0,68	FDA, 2010
Chocolate	0,88	0,25	1,45	Noël, 2012
Feijão	0,48	0,18	0,72	FDA, 2010
Pães de Trigo Integral	2,15	1,71	2,62	FDA, 2010
Tofu	0,88	0,85	0,92	Noël, 2012
Vegetais Secos	0,44	0,38	0,55	Noël, 2012

Assim, ou a polpa de açaí pode ser considerada um suplemento natural de Mn, ou ter implicações neurotoxicológicas.

No que tange a essencialidade do Mn, a sua deficiência no organismo pode levar a déficits de crescimento, anormalidades ósseas e disordens reprodutivas, pois é necessário para o crescimento, desenvolvimento e manutenção da saúde (SANTAMARIA; SULSKY, 2010; ZLOTKIN, et al., 1995). Este elemento químico é largamente encontrados em todos os tecidos do corpo humano, todavia o fígado e o cérebro possuem particularmente mais altas concentrações, devido ao elevado número de mitocôndrias, organelas necessárias para a elevada demanda energética destes orgãos. A elevada concentração de Mn na mitocôndria se justifica pois, a enzima antioxidante SOD mitocondrial é dependente de Mn (ASCHNER; ASCHNER, 2005; PROHASKA, 1987).

No entanto, o consumo regular do açaí juntamente a outras fontes ricas em Mn, como os alimentos expostos na Tabela 7 e outros, pode aumentar a ingestão de Mn para níveis tão elevados que podem ser preocupantes. Mesmo sendo o Mn um elemento essencial para o organismo, a sua suplementação de forma inadequada é uma grande preocupação, uma vez que elevadas exposições podem promover efeitos neurotóxicos (ASCHNER; ASCHNER, 2005; BARBEAU, 1984; KONDAKIS, et al., 1989).

Ou seja, em contraste aos danos da deficiência de Mn, uma elevada ingestão deste elemento pode levar a danos à estrutura cerebral, causando um conjunto de sintomas similares a Doença de Parkinson conhecido como manganismo (BARBEAU, 1984). Esses efeitos são bem descritos tanto em pessoas com pré-

parkinsonismo assintomático (WITHOLT, et al., 2000) ou em trabalhadores expostos cronicamente (MERGLER, et al., 1994). Outros efeitos discutidos na atualidade, são a perda da função intelectual e disordens de comportamento em crianças expostas ao Mn pela água de beber (WASSERMAN, et al., 2006; WASSERMAN, et al., 2011). Ainda, ASCHNER e ASCHNER publicaram um estudo demonstrando uma perda significativa de neurônios dopaminérgicos em bebês expostos a altas concentrações de Mn em “papinhas” e fórmulas infantis (ASCHNER; ASCHNER, 2005). Então, por este enfoque, é possivel estabelecer que a ingestão da polpa de açaí por crianças deveria ser cuidadosamente avaliada.

Não obstante, efeitos tóxicos causados pelo Mn da dieta são controversos. Até os anos 90, acreditava-se que os efeitos tóxicos do Mn eram mais pronunciados na exposição via inalatória, que conhecidamente levam ao manganismo devido a alta biodisponibilidade do Mn por esta via (MERGLER, et al., 1994) e, ao mesmo tempo, acreditava-se que a exposição ao Mn via oral fosse segura, embasado na teoria de que a concentração de Mn no organismo é muito bem regulada por mecanismos homeostásicos (BRITTON; COTZIAS, 1966; MALECKI, et al., 1996).

Pesquisas apontam que quando a oferta dietética de Mn é muito elevada, mudanças adaptativas incluem a diminuição de sua absorção gastrointestinal e sua excreção hepática é proporcionalmente aumentada para a manutenção dos níveis séricos de Mn (DAVIS, et al., 1993, DORMAN, et al., 2002). Entretanto, não se sabe ao certo o quão eficientes estas mudanças adaptativas são em humanos. FINLEY (1999), conduziram um estudo com mulheres jovens que receberam doses diárias de Mn de 0,8 a 20 mg por 8 semanas e demonstraram que nenhum efeito neurotóxico foi observado, embora uma absorção dose-dependente de Mn tenha sido verificada. Por outro lado, as já citadas evidências epidemiológicas de perda cognitiva correlacionada a intoxicação por Mn na água de beber (WASSERMAN, et al., 2006; WASSERMAN, et al., 2011) colocam em prova a eficiência destas mudanças adaptativas.

Ora, sendo o fígado o principal órgão excretor de Mn e fator de risco comprovado de acumulação aumentada deste elemento no SNC, tanto em modelos animais, quanto em humanos (HERYNEK, et al., 2001; MALECKI, et al., 1999; MONTES, et al., 2001) e a exposição ao Mn podendo exacerbar disfunções hepáticas preexistentes (WITZLEBEN, et al., 1987) certamente pessoas portadoras

de disordens hepáticas deveriam se abster do consumo de açaí como medida preventiva de intoxicação.

Até hoje, o menor valor de concentração em que efeitos adversos do Mn foram observados, conhecido como LOAEL (sigla do inglês – *lowest observed adverse effect level*) é de 4,2 mg/dia para um indivíduo de 70 Kg (GREGER, 1998). A ingestão de uma porção média de polpa de açaí (300 mL) excede o LOAEL diversas vezes. Além de exceder o Limite Máximo Tolerável para todas as faixas etáriaspreocnizado pela IOM como demonstra a Tabela 8. No Brasil, assim como nos EUA, Japão e Europa, porções de açaí como esta ou maiores são comumente consumidas por pessoas adeptas de academia como fonte de energia e suplementação (SABBE, et al., 2009).

Tabela 8. Quantidade média estipulada de elementos essenciais (mg/dia) fornecidos pela ingestão de açaí para a ingestão média nacional e da Região Norte e seus respectivos limites máximos toleráveis preconizados pela IOM, 2001.

		Limite Máximo Tolerável (mg/dia) (IOM, 2001)		
	Ingestão Média Nacional (300 g) (mg/dia)	**Criança 1-3 anos**	**Criança 4-8 anos**	**Adulto 19-50 anos**
Cálcio	173 (19,5 – 248)	**2500**	**2500**	**3000**
Cobre	0,68 (0,2 – 1,43*****)	**1**	**3**	**10**
Ferro	5,8 (1,3 – 13,4)	**40**	**40**	**45**
Magnésio	103***** (37 – 162******)	**65**	**110**	**350**
Manganês	14,6******* (9****** – 44*******)	**2**	**3**	**11**
Zinco	1,2 (0,6 – 2,2)	**7**	**12**	**40**

***** Acima do tolerável para crianças de 1-3 anos
****** Acima do tolerável para crianças de 4-8 anos
******* Acima do tolerável para adultos

No entanto, não há descrito na literatura nenhum malefício a saúde creditado ao consumo ou suplementação da dieta com açaí. Em contraste, efeitos benéficos de uma ingestão diária balanceada de açaí foram descritos pelo seu potencial efeito antioxidante na redução do dano promovido por uma dieta hipercolesterolêmica em ratos. Conforme os dados defendidos em dissertação de mestrado por SOUZA

(2009), o açaí foi eficiente na redução da atividade da enzima superóxido dismutase (MnSOD) em ratos hipercolesterolêmicos, indicando um importante efeito antioxidante. A autora acredita que a elevada concentração de polifenóis na polpa de açaí expliquem tais resultados, no entanto, considerou a possibilidade de que outras frações de nutrientes possam ser responsáveis por tal efeito.

Como o Mn da dieta, em concentrações apropriadas, pode regular a atividade da MnSOD (DERODA, et al., 1980), outra hipótese para este trabalho é de que a concentração de Mn do açaí pode regular a atividade da MnSOD e detoxificar EROS. Portanto, estes dados são inconsistentes com a hipótese de que o Mn em excesso possa causar efeitos tóxicos, uma vez que o desencadeamento dos seus efeitos tóxicos são primordialmente via estresse oxidativo. Mas, para concluir sobre a segurança do Mn do açaí, estudos como o de SOUZA (2009) com suplementação com açaí na dieta de animais, mas focados em estudos do SNC devem ser fortemente encorajados.

Se a ingestão diária de polpa de açaí for segura do ponto de vista de exposição ao Mn, isso demonstrará que os valores preconizados como tóxicos via dieta para este elemento devem ser questionados e re-estabelecidos, principalmente para se adequar a realidade brasileira.

4.4. Fracionamento dos elementos essenciais Ca, Cu, Fe, Mg, Mn e Zn em polpa de açaí

Trabalhos recentes têm discutido que a determinação de elementos essenciais totais em alimentos, principalmente nos de origem vegetal, apesar de bastante utilizados, trazem informações incompletas sobre o valor nutricional destes alimentos e até mesmo sobre seu risco toxicológico (ALBERTI, et al., 2004; RUZIK, 2012). Assim, a determinação total de elementos essenciais seria importante como uma triagem inicial no estudo de um dado alimento e identificação de potenciais valores nutricionais e/ou riscos toxicológicos como foi discutido sobre a expressiva concentração de Mn nas polpas de açaí analisadas.

Para o estudo de fracionamento, foi selecionada uma das amostras de polpa de açaí preparadas no laboratório cuja concentrações de elementos essenciais mais se aproximassem das médias encontradas para as 12 polpas analisadas.

A Tabela 9 mostra a concentração de elementos essenciais totais na polpa selecionada para o estudo e expõe que já na primeira etapa de preparo da amostra para o fracionamento químico, em que a polpa de açaí liofilizada é ressuspendida em água e filtrada para a remoção de partículas insolúveis, informações importantes foram obtidas.

Cerca de 80% do Fe ficou retido na porção insolúvel, uma vez que apenas 21% permaneceu no açaí filtrado, enquanto que os demais elementos permaneceram entre 70-81% nesta fração solúvel em água.

Ainda na Tabela 9 é demonstrada a porcentagem dos elementos essenciais que não foram retidos na extração em fase sólida com coluna Sep-pak® C_{18}. Este dado indica que estes elementos têm alta polaridade.

Tabela 9. Concentração e porcentagem de elementos essenciais recuperados no açaí filtrado e após extração em fase sólida com coluna Sep-pak® C_{18}.

	Açaí Total	**Açaí Filtrado**		**Fração eluída**	
	µg/g	**µg/g**	**(% do Total)**	**µg/g**	**(% do Total)**
Ca	**3071 ± 392**	2360 ± 30	77%	1180 ± 10	40%
Cu	**21 ± 1**	15 ± 2	71%	2,0 ± 0,1	10%
Fe	**75 ± 3**	16 ± 1	21%	11 ± 1	15%
Mg	**1502 ± 113**	1210 ± 20	81%	725 ± 7	50%
Mn	**434 ± 29**	305 ± 10	70%	195 ± 3	45%
Zn	**38 ± 3**	29 ± 1	77%	21 ± 1	50%

A solubilidade destes elementos em água indica que estes interagem fracamente a compostos insolúveis como, a exemplo, as fibras insolúveis e polifenóis não absorvíveis, que não são susceptíveis a digestão gastrointestinal e pode ser um indicativo de elevada biodisponibilidade. Estes achados são de grande importância visto que, a literatura mostra que o açaí é um alimento rico em fibras contendo cerca de 14 g por 100 g de fruto (m.s.) (ROGEZ, 2000; TOAIARI, et al., 2005).

Existindo uma forte interação elemento químico/fibras insolúveis, o elemento pode não ser absorvível mesmo estando em altas concentrações, e é o que pode estar ocorrendo com o Fe (REINHOLD, et al., 1981; HARLAND, 1989; HOUSE,

1999; TOAIARI, et al., 2005). Outra hipótese plausível, seria a que corrobora com a explicação de POWELL e colaboradores (1998) em um estudo de biodisponibilidade *in vitro* e fracionamento de elementos essenciais em chá preto sobre a baixa biodisponibilidade de Fe em chás. Os autores, neste caso, acreditam que a baixa solubilidade do Fe em alimentos ricos em polifenóis esteja envolvida com a predominância do Fe na sua forma trivalente (Fe^{3+}) e que desta forma, possui alta afinidade a polifenóis não absorvíveis da fração insolúvel que interagem avidamente a espécies M^{3+} (BRUNE, et al., 1989). Ademais, a presença de cerca de 80% do Fe no açaí na fração insolúvel é consistente com a discussão feita por SILVA e colaboradores onde foi apontado que o **Fe** no açaí forma compostos insolúveis e indisponíveis para absorção (SILVA, et al., 2004). Estes últimos resultados explicam os achados obtidos por TOAIARI e colaboradores (2005), em que uma dieta suplementada com açaí rico em Fe não foi capaz de reverter um quadro anêmico em ratos. Assim, o açaí não deve ser considerado um alimento a ser utilizado como suplemento de Fe.

Interessantemente, após a extração em fase sólida com a coluna Sep-pak® C_{18}, utilizada para a remoção de compostos fenólicos e antocianinas (GIUSTI, et al., 1999; HE; GIUSTI, 2011), cerca de 60% do Cu ficou retido na coluna, uma vez que apenas 10% permaneceu na fração eluída (Tabela 9). Estes resultados indicam que, sua forma majoritariamente solúvel em água pode ser atribuída a uma forte interação aos compostos fenólicos e antocianinas solúveis em água, além de permitir concluir que, a maior parte do Cu presente no açaí não está na forma livre e sim, interagindo fortemente com a fração fenólica, o que provavelmente terá implicações na biodisponibilidade do **Cu** de forma diferenciada dos demais elementos químicos analisados. Estudos utilizando modelos *in vivo* com a fração fenólica poderiam trazer informações adicionais sobre a potencial biodisponibilidade do Cu proveniente do açaí.

O extrato aquoso (límpido e incolor) obtido da coluna Sep-pak® C_{18} foi liofilizado e submetido à cromatografia preparativa a fim de obtermos o perfil cromatográfico deste extrato e a concentração de elementos essenciais nas frações coletadas, conforme apresentado na Figura 3 abaixo:

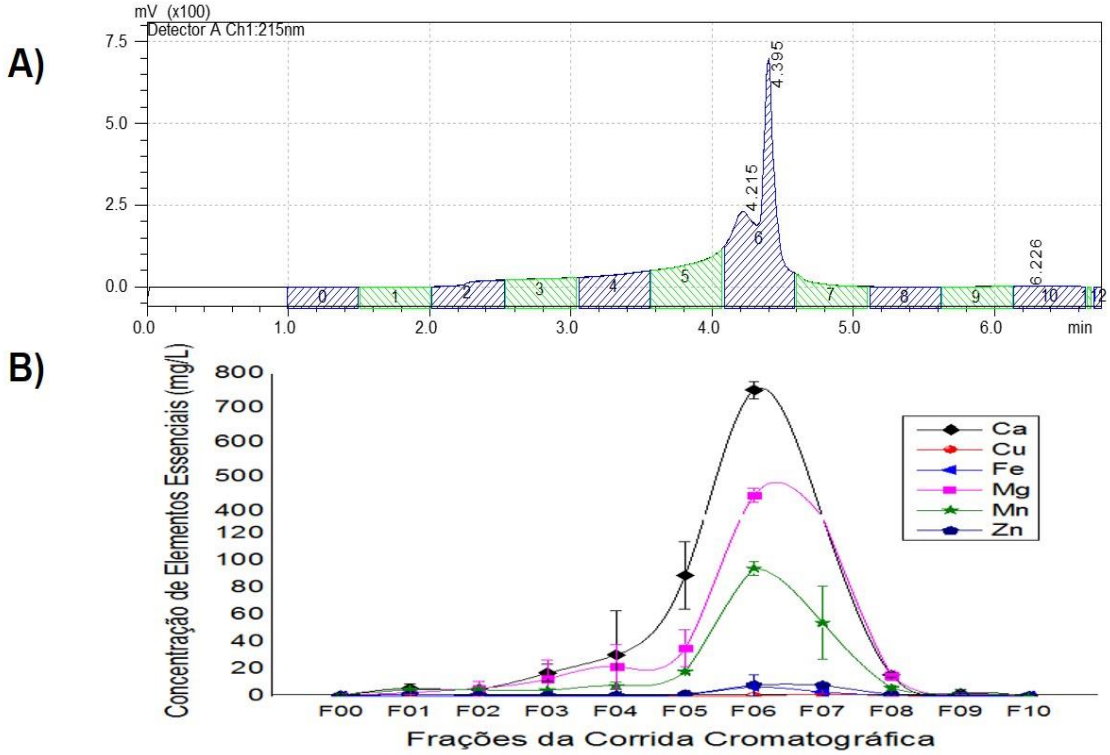


Figura 3. Perfil cromatográfico e distribuição de elementos essenciais no extrato aquoso obtido por extração em fase sólida com coluna Sep-pak C_{18}. A) Condições cromatográficas: coluna Phin-Pack PREP-005(H); fase móvel MeOH 10%; vazão de 10 mL/min. B) Valores plotados foram obtidos pela determinação dos elementos Ca, Cu, Fe, Mg, Mn e Zn nas respectivas frações coletadas.

A corrida cromatográfica foi monitorada por 50 minutos, no entanto foram observados sinais cromatográficos apenas na região de tempo de retenção (t_r) de 4 minutos (Figura 3A) e demostra que o extrato aquoso eluído da coluna Sep-pak® C_{18}, não é uma amostra complexa e que seja provavelmente formada por 1 ou 2 compostos ou grupo de compostos isolados.

Interessantemente, observa-se que a maior parte dos elementos essenciais foram detectados nas frações que formam a área de pico no cromatograma (Tabela 10). Em torno de 40% dos elementos **Ca**, **Mg**, **Mn** e **Zn** foram detectados na área de pico, indicando que o composto detectado tem uma elevada afinidade a elementos químicos essenciais e que uma fração significativa destes elementos não estão na forma de íons livres.

Tabela 10. Concentração de Ca, Cu, Fe, Mg, Mn e Zn nas frações cromatográficas atribuidas á área de sinal analítico do cromatograma.

Elemento	F05-F07	Porcentagem do Total
Ca	1101 ± 114	36%
Cu	1,5 ± 0,1	7%
Fe	10 ± 2	13%
Mg	665 ± 69	44%
Mn	175 ± 27	40%
Zn	17 ± 2	44%

A complexação de elementos essenciais com compostos solúveis em água pode indicar uma elevada biodisponibilidade e ainda, a ausência ou baixa concentração de compostos inibidores ou até mesmo que o pH do fruto seja desfavorável para a interação destes elementos com fatores antinutricionais. De acordo com CLYDESDALE e colaboradores, apenas o fato da existência de compostos moleculares capazes de formar complexos solúveis em água de alta afinidade com elementos químicos, já facilitam a absorção destes pela mucosa gastrointestinal, pois impedem a interação destes elementos com fatores antinutricionais da dieta, independentemente de outros fatores (CLYDESDALE, et al., 1991).

Assim, tudo indica que os elementos **Ca**, **Mg**, **Mn** e **Zn** estejam em formas potencialmente biodisponíveis na polpa de açaí. Entretanto uma afirmação mais precisa só poderá ser feita após a caracterização do composto ou do grupo de compostos detectados no cromatograma da Figura 3A.

Outra estratégia bastante empregada nos últimos anos e que poderia trazer informações adicionais importantes, seria a bioacessibilidade *in vitro* em condições que simulam as do trato gastorintestinal (HUR, et al., 2011). Uma sugestão seria verificar se há modificação no perfil cromatográfico desta fração antes e após o ensaio de bioacessibilidade e deste modo, poderia ser avaliado se este composto, nas condições digestórias, é capaz de liberar os elementos para absorção ou de ser absorvido juntamente com os elementos essenciais na sua estrutura, em sua forma intacta.

Finalizando o Capítulo 1, a Figura 4 esquematiza o fracionamento químico geral proposto e que é a maior contribuição deste capítulo de tese para o estudo do

açaí, uma vez que não há na literatura quaisquer informações sobre as espécies químicas de elementos essenciais neste fruto.

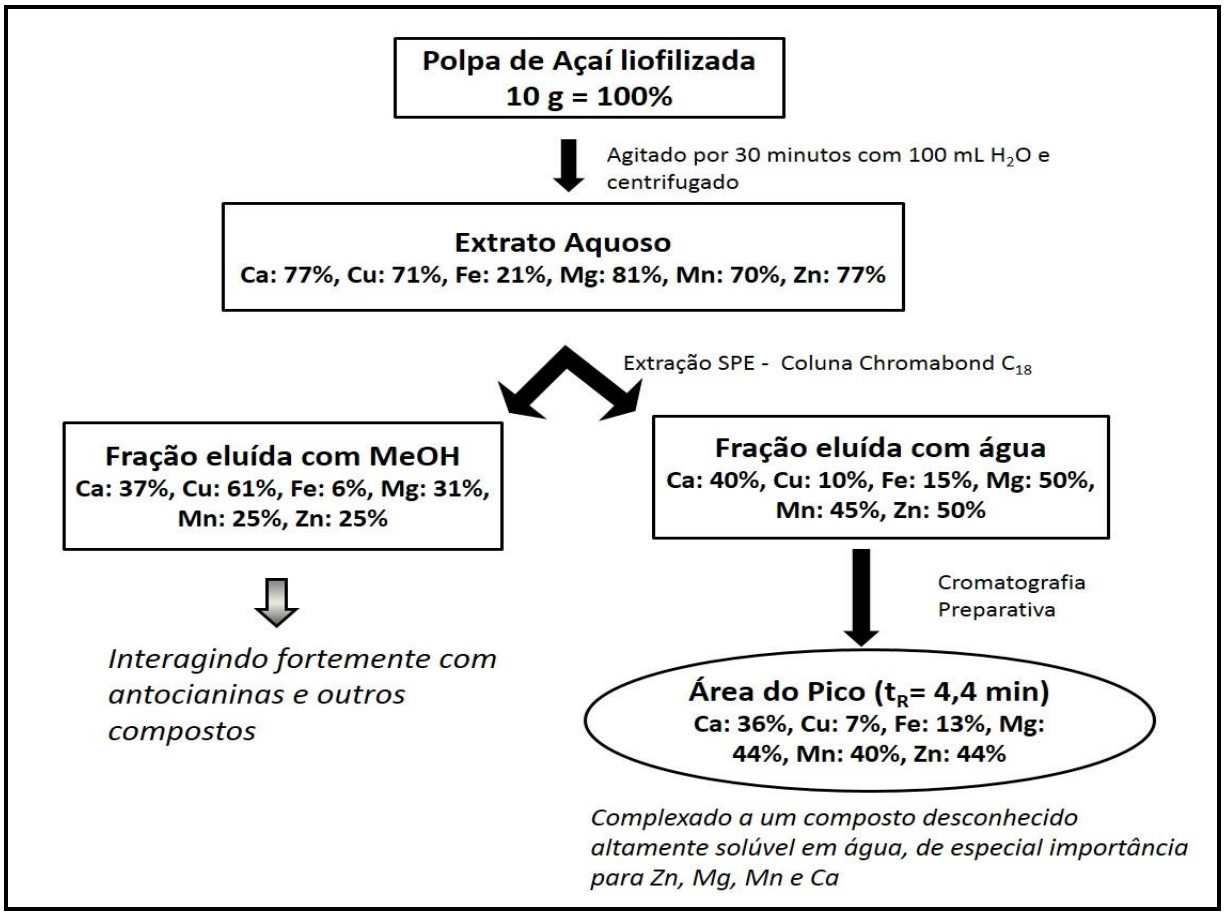


Figura 4. Fracionamento dos elementos químicos Ca, Cu, Fe, Mg, Mn e Zn na polpa de açaí liofilizada.

Do ponto de vista do risco toxicológico, ainda há a necessidade de avaliação inerente à elevada concentração de Mn na polpa de açaí, uma vez que entre os elementos Ca, Mg, Mn e Zn, apenas o Mn presente no açaí ultrapassa os limites máximos toleráveis preconizados (Tabela 8).

Contudo, mais estudos devem ser conduzidos para verificar se o consumo frequente do açaí pode causar algum efeito indesejado pelo alto teor de Mn, uma vez que, por outro lado, vários efeitos positivos para a saúde têm sido observados e creditados a ingestão de açaí. Vários fatores, tais como a forma química do Mn na matriz do açaí, sua interação com outros elementos químicos e outros componentes devem contribuir para a biodisponibilidade do Mn que no açaí, que pode estar potencialmente elevada, mas a biodisponilidade real ainda é de fato, desconhecida.

5. Considerações Parciais do Capítulo 1

Os resultados obtidos neste capítulo permitem informar que a parte comestível do fruto do açaizeiro, utilizada para o preparo das polpas de açaí é rica não apenas em antioxidantes, bioativos, proteínas e lipídeos, mas também é em Ca, Cu, Fe, Mg, Mn e Zn, mesmo existindo uma significativa variação destes dependente da origem dos frutos coletados. Assim, acredita-se que os frutos do açaizeiro tenham elevada capacidade de bioacumular estes elementos e possivelmente as concentrações sejam também influenciadas pelo solo de plantio.

Em se tratando de valores absolutos, a polpa de açaí contribui significativamente para as necessidades diárias recomendadas de Ca, Cu, Fe, Mg, Mn e Zn. Não obstante, o estudo do fracionamento químico destes elementos químicos demonstrou que:

- O Ferro (Fe) está potencialmente indisponível;

- O Cobre (Cu) interage fortemente a fração fenólica solúvel da polpa do açaí e que possivelmente terá implicações na sua biodisponibilidade de forma diferenciada dos demais elementos essenciais analisados;

- Cerca de 40% dos elementos Ca, Mg, Mn e Zn estão complexados a um composto ou classe de compostos de alta solubilidade em água e que potencialmente aumentam suas biodisponibilidades;

- Portanto, a polpa de açaí seria um potencial alimento a ser usado como suplemento natural de Ca, Mg, Mn e em menor expressividade para Zn;

A concentração de Mn na polpa de açaí processada com frutos da Região Norte do Brasil foi significativamente maior do que a concentração das demais polpas. Embora, o teor de Mn de todas as amostras tenham expressivas concentrações deste elemento, destacando a importância de estudos de avaliação de risco toxicológico do consumo de polpa de açaí para indivíduos com fatores predisponentes para a intoxicação por Mn, tais como: crianças e pessoas com doenças hepáticas.

6. Perspectivas Futuras do Capítulo 1

Infelizmente, limitações de execução e tempo fizeram com que os dados do Capítulo 1 desta tese de doutorado não fossem tão conclusivos quanto se desejaria. Entretanto, o fato de serem dados inéditos e de questionamentos diversos, abrem novas discussões importantes do ponto de vista de saúde pública brasileira e abrem caminho para linhas de pesquisas futuras.

O fruto açaí é um alimento especialmente interessante para obtenção de informações sobre a biodisponibilidade de elementos químicos que vão além de sua própria matriz, pois possui elevadas concentrações de mais de um elemento essencial importante, permitindo estudos sobre a interação existente entre eles.

Assim o estudo do açaí pode contribuir para a predição da biodisponibilidade de elementos químicos nos alimentos que foi identificada como uma das principais prioridades de pesquisa em um recente workshop de especialistas na área de alimentos e estimativa de ingestões diárias (CASGRAIN, et al., 2010).

Para o fechamento destes estudos e conclusões finais pertinentes a biodisponibilidade, aconselhamos: 1) experimentos de bioacessibilidade *in vitro*, utilizando condições gastrointestinais simuladas e cultura de células intestinais tanto com a polpa de açaí, quanto com as frações obtidas; 2) elucidação estrutural do complexo contendo Ca, Mg, Mn e Zn, caminhando para uma análise de especiação química efetiva destes elementos, bem como o uso deste complexo em estudos *in vitro* e *in vivo* para a verificação de seu comportamento toxicológico; 3) suplementação de açaí na dieta de animais em diversos modelos experimentais tais como: animais sadios, animais anêmicos e animais jovens a fim de verificar o estado nutricional geral, bioacumulação dos elementos químicos e risco toxicológico para o SNC.

Capítulo 2

Efeito do extrato metanólico da polpa de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) contra a citotoxicidade, estresse oxidativo e alterações funcionais induzidos por $MnCl_2$ em culturas primárias de astrócitos

1. Revisão da Literatura

1.1. Enzimas metabolizadoras de drogas/xenobióticos (EMD) e sua regulação transcricional

Fármacos, drogas ou quaisquer xenobióticos quando são introduzidos nas células e tecidos de organismos vivos, induzem uma série de reações celulares compensatórias. O motivo destas reações endógenas é a biotransformação e excreção destes compostos para reduzir a potencial injúria que estes podem causar.

Estas reações são mediadas por enzimas metabolizadoras de drogas (EMD) que segundo ZHANG e colaboradores (2013), são categorizadas em 3 grupos baseado em sua sequência natural de catálise:

- Enzimas de Fase I: responsáveis por oxidar xenobióticos;
- Enzimas de Fase II: responsáveis por conjugar os produtos de reação de Fase I;
- Enzimas de Fase III: incluem os transportadores responsáveis pela retirada destes produtos de biotransformação de dentro das células;

A expressão de genes de Fase I é regulada por diversos receptores nucleares, também conhecidos como “xenosensores” (CASARETT; DOULL’S, 2013) que apesar do nome dado, também desempenham um papel importante na homeostase endobiótica. Dentre esses xenosensores estão: os receptores de hidrocarbonetos aromáticos (AhR); receptores nucleares órfãos, como os receptores androstanos constitutivos (CAR) e pregnanos X (PXR). Sendo que, cada um destes receptores interage com uma sequência particular nos genes-alvo das enzimas de Fase I para efetuar seus efeitos (XU, et al., 2005).

O maior regulador de genes de Fase II é o fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2 (Nrf2) que interage com o elemento de resposta antioxidante (ARE) (ITOH, et al., 1997). Já a regulação transcricional dos genes de Fase III não é completamente entendida. Todavia, sabe-se que há alguma interação entre os mecanismos de regulação das enzimas de Fase I, II e III (RUSHMORE; KONG, 2002; ZHANG, 2013).

A distribuição e função das EMD de Fase I, II e III estão resumidas na Tabela 11 extraída e adaptada para o português de ZHANG e colaboradores (2013):

Tabela 11. Distribuição e funções majoritárias das enzimas metabolizadoras de drogas/xenobióticos segundo ZHANG (2013).

Categorias	Enzimas	Localização	Funções
Fase I	Aldo-ceto redutase (AKR) Carboxilesterases (CES) Citocromo P450 monooxigenases (CYP) Epóxido hidrolase	Fígado, pulmões, TGI e rins	Oxida, reduz e hidrolisa xenobióticos
Fase II	γ-glutamilcisteina sintetase (GCL) Glutationa peroxidase (GPx) Glutationa S-transferase (GST) Heme oxigenase (HO-1) N-acetiltransferase (NAT) NADPH quinina oxiredutase 1 (NQO-1) Peroxiredoxina (PRX) Sulfiredoxina (SRXN) Sulfotransferase (SULT) Tioredoxina redutase (TrxR) UDP-glucoronosiltransferase (UGT)	Várias dependem de genes específicos e suas subfamílias	Conjuga xenobióticos ou endobióticos via acetilação, glucuronidação, glutationilação, metilação, sulfação, tornando-os mais hidrofílicos; ou degradação de heme ou quinona
Fase III	Proteina associada a resistencia multidroga (MRP) Anion orgânico transportador de polipeptideo (OATP2) Glicoproteína-P (P-gp) Transportadores	Cérebro, fígado, Intestino e Rins	Transporta ou excreta metabólitos para fora das células

1.2. Ativação do fator de transcrição Nrf2 no estresse oxidativo

A proteína de citoesqueleto análoga a Kelp associada à ECH (Keap-1) e o fator de transcrição Nrf2 funcionam como xenosensores com a primordial função de induzir enzimas antioxidantes em resposta ao estresse oxidativo, que são frequentemente associadas à biotransformação de xenobióticos. A interação do fator de transcrição Nrf2 com a região do DNA conhecida como elemento de resposta antioxidante (ARE) ou ainda como elemento de resposta eletrofílica, induz enzimas que detoxificam eletrófilos e metabólitos que geram espécies reativas de oxigênio (EROS). Dentre estas enzimas se pode citar: glutationa transferase (GST1), hidrolase epóxido microssomal, aldo-ceto redutase (AKR7A), NAD(P)H-quinona oxiredutase (NQO1) e glutamato-cisteína ligase (GCL) uma enzima responsável por uma etapa limitante de velocidade na síntese da glutationa (CASARETT; DOULL, 2013).

Em condições basais, Keap1 age como um supressor dos efeitos de Nrf2, ligando-se a Nrf2 no citoplasma e promovendo sua ubiquitinação e degradação. Na presença de EROS, Keap1 é inativado e libera Nrf2 resultando em sua translocação nuclear onde interage com ARE para a síntese das enzimas já citadas (DINKOVA-KOSTOVA, et al., 2002; ITOH, et al., 1999). No entanto, além de Keap1, a atividade de Nrf2 também é regulada pela interação com a proteína redox-sensitiva PARK7/DJ-1, que pode inibir a interação Nrf2-Keap1 atenuando a proteólise de Nrf2 (CLEMENTS, et al., 2006). Mutações na proteína PARK/DJ-1, são associadas com a Doença de Parkinson (LEV, et al., 2006), no qual o estresse oxidativo também desempenha um importante papel na neurodegeneração. Estas ativações/inibições de Nrf2 estão esquematizadas na Figura 5:

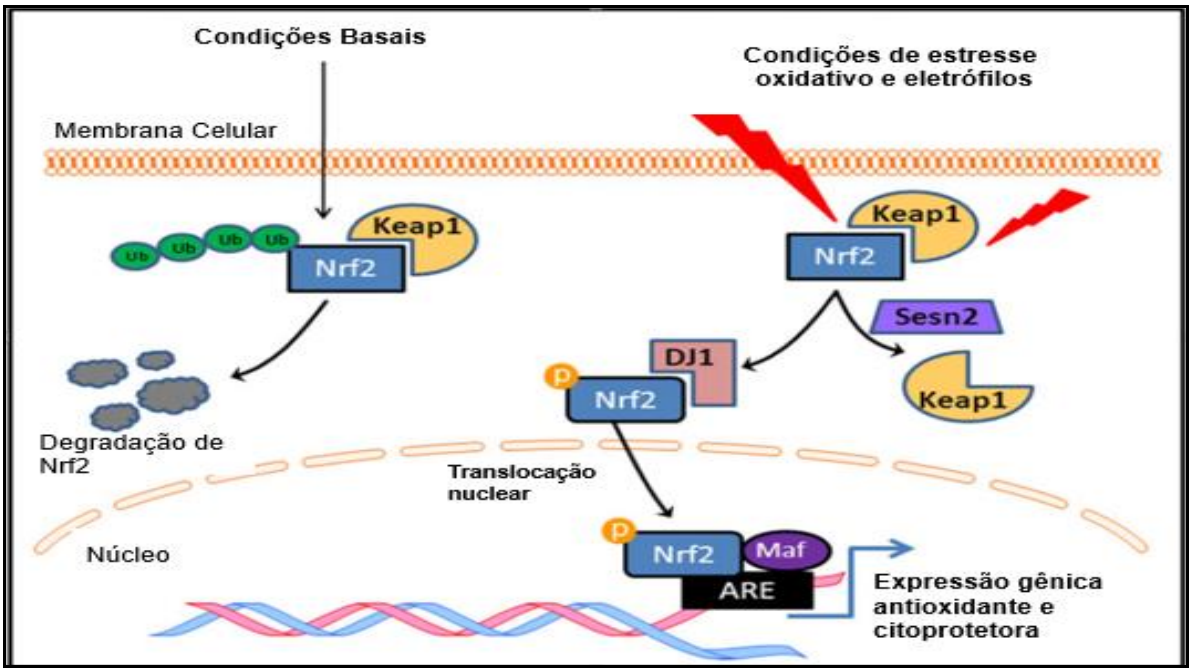


Figura 5. Regulação e ativação de Nrf2 sob condições basais e estresse. Em condições basais, Keap1 impede a translocação de Nrf2 para o núcleo e facilita a degradação de Nrf2 mediada por ubiquitina. Em condições de estresse, Sens2 induz a degradação de Keap1, liberando Nrf2. Nrf2 é fosforilado e ativado sob a proteção de DJ1 seguido de sua translocação nuclear. No núcleo, Nrf2 ativo interage com o elemento de resposta antioxidante (ARE) e em coordenação com diversos co-fatores (Maf) induz a expressão de genes antioxidantes. Esquema extraído de GUPTE e colaboradores (2013) e adaptado para o português.

Assim, a ativação de Nrf2 se dá por vias pós-traducionais (TONG, et al., 2006), quer seja via Keap1 (a mais comum) ou por vias independentes de Keap1 que embora pouco entendidas já há evidências a cerca de suas existências (RADA, et al., 2012; ROJO, et al., 2012). Ademais, a cascata de sinalização promovida pelo Nrf2 tem sido chamada na literatura como "*antioxidant master switch*" pelo seu papel crucial na resposta antioxidante.

Por isso, revisões recentes na literatura têm comentado o potencial da cascata de ativação de Nrf2 como um novo alvo terapêutico no desenvolvimento de fármacos para diversas patologias em que o estresse oxidativo está envolvido (GUPTE, et al., 2013; VOMHOF-DEKREY; PICKLO, 2012; YANG, et al., 2013).

1.3. Nrf2 na neurodegeneração e neurotoxicidade

Uma série de trabalhos recentes tem reportado a alteração da expressão de enzimas metabolizadoras de Fase II nos tecidos *post-mortem* de pacientes com várias doenças neurológicas (LINKER, et al., 2011; RAMSEY, et al., 2007; SARLETTE, et al., 2008; VAN-HORSSEN, et al., 2010). E, a aplicação de indutores de Nrf2 têm sido especulada como potenciais fármacos para o tratamento de distúrbios neurológicos, tanto de natureza aguda, a exemplo: danos por traumatismo craniano (YAN, et al., 2008; YAN, et al., 2009) e acidente vascular cerebral (AVC) (TANAKA, et al., 2011); quanto crônicas, incluindo as exposições a elementos neurotóxicos e doenças neurodegenerativas (KUMAGAI, et al., 2013; NOUHI, et al., 2011; ZHANG, et al., 2013).

No que tange ao Mn, elemento de conhecida neurotoxicidade e foco desta tese, o aumento da expressão de Nrf2 tem sido apontada como um importante mecanismo adaptativo em cultura de células em resposta ao estresse oxidativo causados por EROS provenientes de danos mitocondriais causados pelo Mn (LEE, et al., 2012; LI, et al., 2011).

Com o modelo *C.elegans*, muito utilizado em estudos de neurodegeneração, BENEDETTO e colaboradores (2010) demonstraram que a perda da proteína SKN-1 (proteína homóloga a Nrf2 de mamíferos) aumenta a sensibilidade do modelo aos danos oxidativos causados por Mn que no estudo incluíram: oxidação de dopamina, geração de EROS e peroxidação lipídica. Ainda neste estudo, o próprio Mn foi capaz de induzir SKN-1 e a produção de proteínas antioxidantes como mecanismo de defesa (BENEDETTO, et al., 2010; CHAKRABORTY; ASCHNER, 2012).

Um estudo em ratos, também demonstra que a intoxicação aguda por Mn aumenta a concentração de Nrf2 hepático e sua translocação do citoplasma para o núcleo (CASALINO, et al., 2007). Outro estudo em camundongos *Knockout* de genótipo Nrf2-/Nrf2-, demonstrou que este genótipo aumenta a susceptibilidade aos efeitos pró-oxidantes causados pelo fungicida a base de Mn, Maneb, no hipocampo. A toxicidade foi creditada em parte aos danos oxidativos diretos do Mn (KURZATKOWSKI; TROMBETTA, 2013).

1.4. O papel dos astrócitos na neurodegeneração/neurotoxicidade

O tecido cerebral de mamíferos é basicamente formado de neurônios e células da glia. Dentre os tipos celulares formadores da glia estão os astrócitos, oligodendrócitos e microglia, sendo os astrócitos o tipo celular mais abundante dentre eles. O cérebro humano possui em torno de 10^{12} células em que aproximadamente $9x10^{11}$ são células da glia (KIMELBERG; NEDERGAARD, 2010) tendo os astrócitos como formadores de aproximadamente 50% do volume encefálico humano (CHEN, et al., 2006).

Conhecimentos recentes indicam que os astrócitos são críticos para processos como o desenvolvimento e/ou manutenção das características da barreira hematoencefálica, promoção do acoplamento neurovascular, atração de células através da liberação de quimiocinas, manutenção do metabolismo geral do SNC, controle do pH cerebral, captação de glutamato e GABA através de transportadores específicos e produção de antioxidantes (KIMELBERG; NEDERGAARD, 2010; PARPURA, et al., 2011; VOLTERRA; MELDOLESI, 2005).

Neurônios são mais susceptíveis ao dano do que os astrócitos por possuírem limitada capacidade antioxidante e por dependerem fortemente de seu acoplamento metabólico aos astrócitos para suas sobrevivências (HAMBY; SOFRONIEW, 2010). Tanto em circunstâncias normais, quanto após injúria cerebral, astrócitos apoiam a função neuronal provendo proteção antioxidante, substratos para o metabolismo neuronal e remoção de glutamato da fenda sináptica (BARRETO, et al., 2011; GREVE; ZINK, 2009).

Apesar da maior resistência ao dano dos astrócitos em detrimento dos neurônios, astrócitos demoram mais tempo para retomar suas funções normais após estados de injúria e, danos severos que resultem em disfunção dos astrócitos, pode levar indiretamente ao aumento da morte neuronal (GREVE; ZINK, 2009). Quando há a quebra da condição homeostásica cerebral e/ou indução de dano (como no estresse oxidativo/nitrosativo) as funções de suporte desempenhadas pelos astrócitos podem ficar de forma temporária ou permanente prejudicada e assim, subsequentemente, afetar as células neuronais desencadeando condições patológicas e doenças neurodegenerativas.

É bem estabelecido que os astrócitos e microglia são responsáveis por manter a homeostasia redox nos neurônios. Astrócitos fornecem glutationa (GSH)

para os neurônios (ANDERSON, et al., 2003; DRINGER, et al., 2000) além de precursores para a síntese de GSH, como Cys-Gly e γGlu-Cys da hidrólise de GSH (DRINGER, et al., 1999; QIN, et al., 2006).

Outra função importante e intimamente ligada ao estresse oxidativo é a remoção de glutamato da fenda sináptica que, além de manter o ciclo glutamato-glutamina ativo (uma das funções de maior demanda energética nos astrócitos) protegem os neurônios da excitotoxicidade do glutamato que é relacionado a morte neuronal e processos neurodegenerativos (GILLESSEN, et al., 2002).

Além disso, acredita-se que elevada concentração de Nrf2 nuclear nos astrócitos faça com que mais GSH seja liberado para os neurônios, protegendo-os da toxicidade do glutamato em culturas de neurônios e glia (SHIH, et al., 2003).

1.5. Sistema glutationa

A molécula de glutationa é composta pelos aminoácidos ácido glutâmico, cisteína e glicina e sua função antioxidante é crucial para a homeostase do SNC, assim como de outros tipos celulares no organismo e na sua forma reduzida (GSH) detoxifica diversas espécies reativas como superóxido, NO, radical hidroxil e peroxinitrito (AOYAMA, et al., 2008) e ainda, possui a função de reservatório de cisteína protegendo contra a toxicidade promovida por excesso de cisteína livre (JANAKI, et al., 2000). A enzima catalase também é responsável por detoxificar o peróxido de hidrogênio, todavia sua localização está restringida ao peroxissomo, o que torna o sistema glutationa particularmente importante para as mitocôndrias, a organela fisiologicamente e patologicamente responsável pela geração de EROS (FERNANDEZ-CHECA, et al., 1997; GARCIA-RUIZ; FERNANDEZ-CHECA, 2006).

No sistema glutationa existem basicamente três grupos de enzimas subdivididos em: 1)- enzimas que catalisam sua biosíntese; 2)- enzimas que transferem GSH para seus substratos; 3)- enzimas que catalisam a redução de GSSG. O fator Nrf2 governa a expressão de todas estas enzimas, com participação de outras vias de sinalização sensível ao ambiente redox como a AP-1 (ILES, et al., 2005; ZHANG, et al., 2007) e NF-κB (YANG, et al., 2001).

A síntese de GSH requer a ação sequencial de duas enzimas. A primeira enzima é a γ-glutamilcisteína-sintetase (GCL) responsável por ligar um glutamato a

uma cisteína sendo esta, a etapa de maior controle na velocidade da produção de GSH. A indução da GCL aumenta a velocidade da síntese de GSH sob condições de estresse oxidativo e também na diminuição da concentração de GSH intracelular (LEE; JOHNSON, 2004). A segunda enzima é a glutationa sintetase que adiciona uma glicina ao dipeptídeo previamente formado. A indução de GSH sintetase via aumento de expressão de Nrf2 foi demonstrado por SHIH e colaboradores (2003). Além disso, Nrf2 controla a expressão de alguns transportadores de membrana que mediam a entrada destes aminoácidos como, por exemplo, o transportador EAAC1 nos neurônios. Esta regulação é feita a fim de limitar ou aumentar a disposição destes animoácidos para a síntese *de novo* de GSH dependendo das condições intracelulares (ESCARTIN, et al., 2011).

A transferência da GSH para seus substratos é mediada por diversas enzimas. Duas enzimas específicas e muito estudadas que catalisam este processo são a glutationa peroxidase (GPx) (CHO, et al., 2005; SINGH, et al., 2006) e a glutationa S-transferase (GST) (SHIH, et al., 2003). Existem oito isoenzimas de GPx descritas, conhecidas como GPx1 a GPx8 e sua função é diminuir a concentração de peróxido de hidrogênio intracelular e lipídios oxidados. A GST, por sua vez, tem como função conjugar a GSH a eletrófilos e xenobióticos (RAZA, 2011).

A glutationa redutase (GR) é responsável por reciclar a GSSG, convertendo-a novamente a GSH em um processo dependente de NADPH. No entanto, o papel neuroprotetor da expressão de GR ainda não é bem compreendido.

1.6. Ciclo do glutamato-glutamina

Uma das funções mais bem caracterizadas dos astrócitos é a rápida remoção de neurotransmissores da fenda sináptica, essencial para o término do estímulo nervoso e manutenção da excitabilidade neuronal. Este papel é especialmente crítico para o glutamato, o neurotransmissor excitatório primário do cérebro e também precursor imediato para síntese do ácido γ-aminobutírico (GABA), neurotransmissor inibitório. Uma super-estimulação de receptores glutamatérgicos pode ser altamente tóxica para os neurônios e este fenômeno é conhecido como excitotoxicidade (BELANGER, et al., 2011).

A captação do glutamato é primariamente feita por transportadores astrocitários de alta afinidade e Na^+ dependentes (GLT-1) e transportadores glutamato-aspartato (GLAST). Em humanos, estes transportadores correspondem respectivamente a EAAT2 e EAAT1 (BAK, et al., 2006). Esta remoção do glutamato da fenda sináptica acontece contra o gradiente de concentração, uma vez que a concentração de glutamato extracelular normalmente é em torno de 10 micromolar e muito menor que o glutamato intracelular que, nos astrócitos, está na escala de milimolares (ERECINSKA; SILVER, 1990). Para a entrada de cada íon glutamato pelos transportadores citados são movimentados 3 íons de Na^+ + 1 íon H^+ para dentro da célula e 1 íon K^+ para fora da célula. O que torna a captação de glutamato um dos processos de maior demanda energética no cérebro com grande gasto de ATP nos astrócitos (SIBSON, et al., 1998). Sendo, portanto, um dos primeiros processos a ser prejudicado em condições homeostásicas desfavoráveis.

Após a remoção do glutamato via transportadores, os astrócitos o converte em glutamina que é prontamente liberada para os neurônios como substrato para a síntese de glutamato, fechando o ciclo. Este é um mecanismo importante para a manutenção das concentrações ideais de glutamato nos neurônios e no ambiente extracelular, uma vez que em condições normais, apenas os astrócitos possuem a enzima glutamina sintetase (GS) responsável pela conversão de glutamato em glutamina pela adição de uma anima a sua estrutura. Este processo de remoção de glutamato e liberação de glutamina pelos astrócitos é conhecido como ciclo do glutamato-glutamina (BAK, et al., 2006; MCKENNA, 2007).

1.7. Implicações do estresse oxidativo no sistema glutationa e ciclo glutamato-glutamina

Ambos sistema glutationa e ciclo do glutamato-glutamina entre astrócitos e neurônios (esquematizados na Figura 6) são afetados por modificações bruscas no ambiente redox, com implicações negativas para a neurotransmissão e o desencadeamento de mecanismos moleculares compensatórios de elevado refino e complexidade no SNC. Isso ocorre como uma auto-proteção do SNC pois a exposição a toxicantes e algumas patologias podem aumentar muito a geração de

EROS a ponto do sistema glutationa não ser capaz de detoxifica-los eficientemente, podendo levar a neurotoxicidade e até mesmo à neurodegeneração.

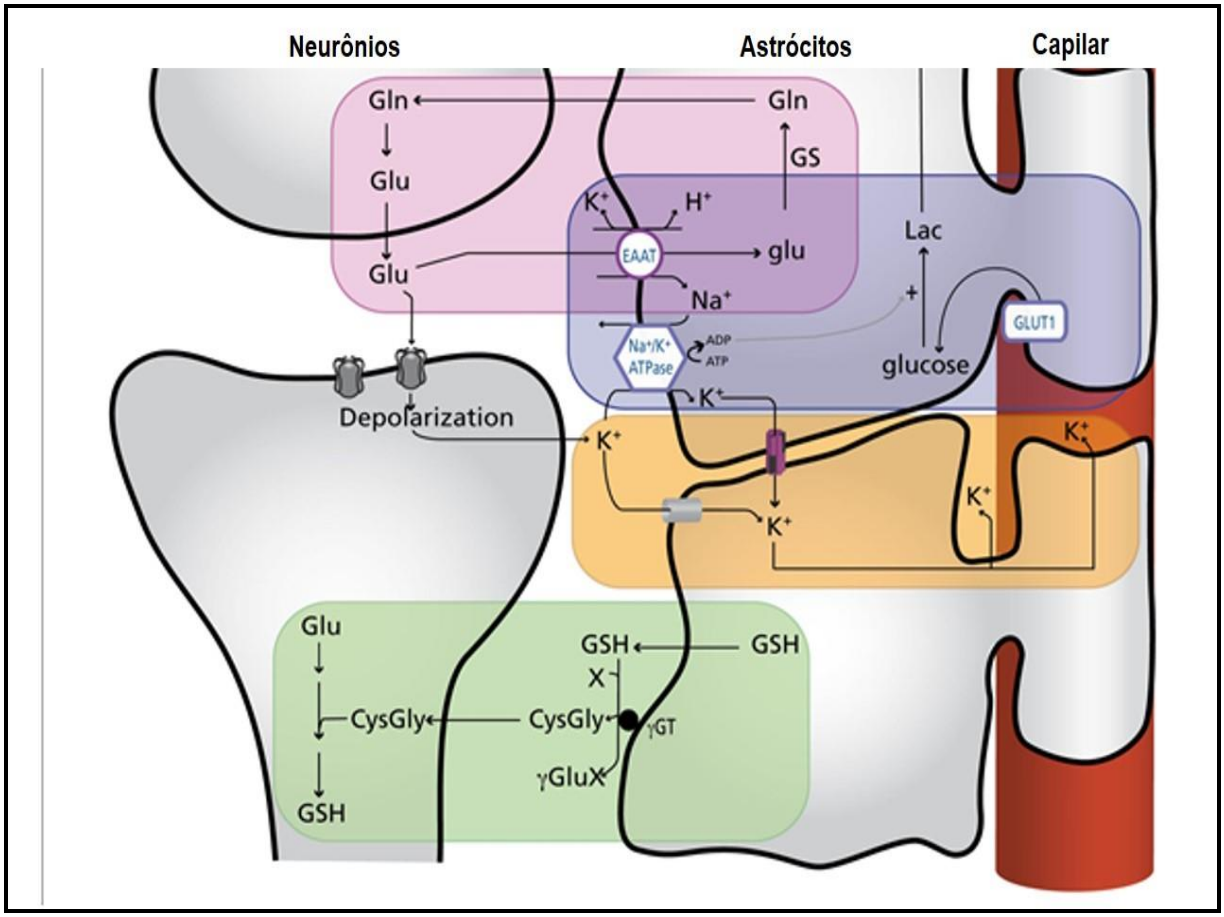


Figura 6. Representação simplificada do sistema GSH e ciclo do glutamato-glutamina. (Extraído e adaptado para o português de BELANGER e MAGISTRETTI, 2009). *Ciclo glutamato-glutamina (em rosa)*: Transportadores astrocítários de aminoácidos excitatórios (EAATs)são responsáveis pela captação de uma fração significativa do glutamato da fenda sináptica. Glutamato é convertido em glutamina pela glutamina sintetase (GS) e devolvida para os neurônios para nova sintese de glutamato. *Ciclo do Lactato (em azul):* Captação de glutamato pelos astrócitos é acompanhada pela entrada de Na^+ pela ação da Na^+/K^+ ATPase. O aumento da razão ADP/ATP desencadeia a utilização anaeróbica de glicose. *Tampão de K^+ (em laranja):* astrócitos tamponam o excesso de K^+ liberado para o meio extracelular como resultado da atividade neuronal. *Sistema GSH (em verde):* Astrócitos liberam GSH para o meio extracelular onde é clivada pela enzima γ-glutamil transpeptidase (γGT) resultando em CysGly e glutamato.

1.8. Mecanismos de neurotoxicidade do Mn induzido via estresse oxidativo

Apesar de sua comprovada essencialidade para a manutenção das funções vitais em mamíferos, o Mn pode induzir efeitos tóxicos em altas concentrações com efeitos toxicológicos para as estruturas cerebrais, caracterizado por um conjunto de sinais clínicos e lesões morfológicas similares ao Parkinsonismo (RACETTE, et al., 2001). O quadro clínico de intoxicação por Mn têm sido denominado de manganismo (BARBEAU, 1984) ou ainda *locura manganica* devido aos efeitos neuropsiquiatricos (FINKELSTEIN, et al., 2007). O manganismo ainda partilha com o Parkinsonismo, múltiplos mecanismos comuns a nível celular que levam à neurodegeneração dopaminérgica, tais como: disfunção mitocondrial, transdução de sinal aberrante, estresse oxidativo, agregação protéica, e ativação de morte celular (DOBSON, et al., 2004; HAMAI; BONDY, 2010; KITAZAWA, et al., 2005; BOWMAN, et al., 2011).

Um dos mecanismos propostos para a indução da neurotoxicidade do Mn é uma cascata de danos oxidativos que é potencializada pelo sinergismo entre excesso de Mn, altas concentrações de Fe naturalmente presentes no SNC e dopamina que são encontrados nos núcleos da base, região cerebral mais afetada pelo Mn (ASCHNER, 1997). O cérebro, em geral, é altamente susceptível ao dano oxidativo devido sua alta taxa de metabolismo, alta concentração de ácidos graxos poliinsaturados e relativamente baixa concentração de enzimas antioxidantes em comparação com os demais órgãos.

Pesquisadores têm postulado que a elevada concentração de Mn pode acelerar significativamente a oxidação da dopamina e outras catecolaminas e paralelamente amplificar a formação de EROS (SLOOT, et al., 1996). DONALDSON e colaboradores demonstraram evidências de que o Mn divalente (Mn^{2+}) cataliza reações do tipo Fenton que geram radicais hidroxil, desencadeando degradação proteolítica e diminuição de reservas de GSH (DONALDSON, et al., 1980; WEDLER, 1993).

ARCHIBALD e TYREE postularam que o real neurotoxicante problema seja o Mn na forma trivalente (Mn^{+3}). Mesmo após a exposição ao Mn em outros estados de oxidação, tais como +2, +3, ou +4, estes irão, *in vivo*, através de oxidação espontanêa ou dismutação, atividade peroxidativa, ou ainda oxidação mediada por EROS, dar origem ao Mn trivalente, quer na forma de complexos simples, quer talvez ligado a catecolaminas destruindo oxidativamente dopamina, epinefrina,

norepinefrina e seus precursores de maneira bastante eficiente (ARCHIBALD; TYREE, 1987). Seguindo esta hipótese de interconversão *in vivo*, o estudo da toxicidade do Mn se torna válido independente do estado de oxidação empregado para expor células e animais.

Em nível celular, o Mn preferencialmente se acumula na mitocôndria prejudicando a fosforilação oxidativa e aumentando a geração de EROS (GUNTER, et al., 2006). A excessiva formação de EROS induz a oxidação das membranas lipídicas (formada por ácidos graxos poliinsaturados), produzindo uma gama de produtos de lipoperoxidação. Uma família destes produtos são os F_2-isoprostanos (F_2-IsoPs), que são moléculas prostaglandina-similares produzidas pela peroxidação do ácido aracdônico mediada por radicais livres (MORROW; ROBERTS, 1999). Este biomarcador de estresse oxidativo têm sido investigado em vários modelos *in vivo* e *in vitro* associado a dano causado por radicais livres. E, estudo prévio aponta que culturas primárias de astrócitos expostas a concentração de 500 µM de $MnCl_2$ por 2 a 6 horas demonstram uma elevada concentração de F_2-IsoPs quando comparado às células controle (MILATOVIC, et al., 2007).

O transportador astrocitário GLAST, um dos responsáveis pela remoção de glutamato da fenda sináptica, por sua vez, tem sua expressão reduzida na exposição ao Mn (ERIKSON, et al., 2002; ERIKSON; ASCHNER, 2002) e que pode ser novamente normalizada com o uso de antioxidantes, demontrando que o estresse oxidativo está relacionado a expressão diminuída e/ou inibição destes transportadores (LEE, et al., 2009). A disfunção deste transportador pode elevar a concentração de glutamato na fenda sináptica e desencadear um processo de excitotoxicidade que causa apoptose neuronal. Assim, distúrbios na captação de glutamato modificam o ciclo glutamato-glutamina entre neurônios e astrócitos e este tem sido postulado como um dos maiores executores da neurotoxicidade do Mn (BROUILLET, et al., 1993; LEE, et al., 2009; SIDORIK-WEGRZYNOWICZ, et al., 2010).

Estudos prévios demonstram que a própria exposição ao Mn é capaz de aumentar a expressão de Nrf2 em astrócitos, mas não parece ser suficiente para reverter o estresse oxidativo desencadeado (LEE, et al., 2012; LI, et al., 2011).

Neste ponto, mesmo não sendo conhecido o mecanismo completo da indução de danos neurológicos por Mn, o estresse oxidativo gerado e a desregulação do ciclo glutamato-glutamina em astrócitos devido a elevadas concentrações de Mn,

mais a sua específica habilidade em acumular Mn, são indícios de que os astrócitos sejam importantes sítios de indução ao dano pelo Mn e de que o fator de transcrição Nrf2 esteja intimidamente envolvido nestes eventos.

1.9. Polifenóis como estratégia nutricional e nutracêutica contra o estresse oxidativo e modulação de Nrf2

Nas últimas décadas, a tendência em se discutir o impacto da nutrição sobre a saúde veio aumentando gradativamente. Mas, apenas nos últimos anos que este conhecimento se solidificou no meio científico por meio de um crescente número de publicações e descobertas mecanísticas.

Hoje é claro que várias frutas e vegetais contêm fitoquímicos que podem prevenir doenças (CRAIG, 1997; DEWEERDT, 2011; SPENCER, 2010) mesmo sem se relacionar qualquer efeito farmacológico ou síndromes de deficiência. Este saber, foi primeiramente e, acima de tudo, sugerido por tradições culturais a cerca de dietas saudáveis e medicinas não-convencionais. E que, apenas ganhou atenção científica após os frequentes e inúmeros estudos epidemiológicos e estatísticos evidenciando a diminuição do risco relativo a doenças dependente de dietas ricas em antioxidantes.

A maior parte dos estudos com diversos modelos de dietas ricas em antioxidantes contra diferentes doenças crônicas e o câncer têm atribuído os efeitos benéficos à habilidade destas substâncias em agir diretamente contra a formação ou propagação das EROS (AMES, et al., 1993). Outros trabalhos recentes reconhecem um efeito binário, afirmando que os compostos antioxidantes podem agir tanto diretamente contra os EROS, quanto indiretamente regulando as defesas antioxidantes endógenas principalmente via Nrf2/ARE, mas também por outras vias de sinalização celular (KANG, et al., 2012; KELSEY, et al., 2010).

Para outros pesquisadores, a vertente do efeito indireto dos antioxidantes da dieta faz mais sentido e defendem que esta é a única forma de proteção dos compostos antioxidantes cineticamente possível em modelo *in vivo*. FORMAN e colaboradores (2013) exemplificando estudos com polifenóis, discutiram que os efeitos antioxidantes diretos relatados na literatura não se encaixam a quaisquer dados cinéticos e afirmam a existência de um erro epistemológico, pois o efeito

antioxidante direto destas substâncias sequestrando EROS na verdade não existe. Para estes autores, a única substância da dieta com efeito antioxidante direto comprovado seria a vitamina E.

Assim, por estarmos no auge das descobertas mecanísticas da ativação de Nrf2 nas doenças crônicas e discussões sobre seu potencial como alvo terapêutico, os polifenóis emergem como uma classe de compostos a ser melhor estudada na triagem de possíveis fármacos e antídotos contra intoxicações, cujo estresse oxidativo esteja associado.

Estes polifenóis são um grupo de substâncias químicas encontradas em plantas e caracterizadas pela presença de anéis aromáticos contendo uma ou mais hidroxilas. Trabalhos sobre a regulação de Nrf2 se concentram em grande parte à este grupo de compostos, a exemplo, estudos com o resveratrol, catechinas e antocianinas têm sido publicados (CHENG, et al., 2012; RODRIGUEZ-RAMIRO, et al., 2012), graças às suas elevadas capacidades antiinflamatórias e antioxidantes (MANACH, et al., 2004) e já com evidências de efeitos reguladores em astrócitos (ERLANK, et al., 2011).

Estes compostos têm demonstrado um alto poder de ativação de Nrf2 provavelmente por inibir a ubiquitinação do mesmo. Não obstante, o consenso atual é de a degradação de Nrf2 mediado por Keap1 ocorre exclusivamente no citoplasma (DINKOVA-KOSTOVA, et al., 2005; WATAI, et al., 2007). Mas, um estudo recente de LI e colaboradores (2012) demonstrou que a inibição de Nrf2, ubiquitinação e degradação também podem ocorrer no núcleo. O que evidencia que os mecanismos de ativação de Nrf2 ainda dependem de estudos para ser completamente elucidado.

O resveratrol é um polifenol comumente encontrado em vinhos e frutas vermelhas (RIMANDO, et al., 2004) e pesquisas recentes têm demonstrado sua habilidade em regular a expressão de Nrf2 protegendo queratinócitos do estresse oxidativo causado por raios ultravioleta (LIU, et al., 2011). Outro trabalho demonstrou que o resveratrol normalizou a expressão renal de Nrf2/Keap1 em ratos diabéticos e aumentou a expressão das enzimas SOD, CAT, GPx e outras (PALSAMY; SUBRAMANIAN, 2011).

As catequinas que são monômeros de flavonóides que se reunem para formar diversos polifenois conhecidos como a catechina, epicatechina, epigalocatechinas e muitas outras estruturas. Estão largamente presentes em chás e frutas e suas capacidades antioxidante, antiinflamatória e antitumorigênica são conhecidas e é

sabido que agem em vários caminhos de sinalização celular, incluindo NF-κB e Nrf2 (JIANG, et al., 2012; NA; SURH, 2008; SAHIN, et al., 2010).

No caso específico da epigalocatechina-3-galato (EGCG) estudada por NA e SURH (2008), os autores acreditam que o aumento da regulação das enzimas de Fase II via Nrf2 na presença de EGCG possa ocorrer por três caminhos. Primeiro, EGCG na forma oxidada ou reativa possa ser conjugada a GSH, o que diminuiria a concentração de GSH celular, levando a disordens redox e desencadeando a fosforilação de Nrf2. Segundo, alguma forma reativa de EGCG pode estar interagindo diretamente com os resíduos de cisteína de Keap1, dissociando Nrf2. Em uma terceira hipótese, a geração de EROS pela auto-oxidação de EGCG pode estimular a fosforilação de Nrf2 pela ativação de quinases e oxidar os tióis de Keap1, facilitando a translocação de Nrf2.

Um grande grupo de compostos fenólicos são os flavonóides e ainda, dentro deste o subgrupo das antocianinas. Estas estão amplamente distribuídas em frutas, chás e vinhos e são famosos pelo seu alto poder antioxidante (SUN, et al., 2002). Não obstante, estudos envolvendo Nrf2 e a classe das antocianinas ainda são escassos (CIMINO, et al., 2013; KROPAT, et al., 2013; SHIH, et al., 2010; THOPPIL, et al., 2012), mas seu potencial uso contra doenças neurodegenerativas é comentado em ensaios *in vitro* e em modelos *in vivo* (BUTTERFIELD, et al., 2002; MANDEL; YOUDIM, 2004; SHIH, et al., 2010).

Ademais, as antocianinas glicosídicas possuem elevada capacidade de penetrar a barreira hematoencefálica (BAUR; SINCLAIR, 2006), tornando-as atraentes na investigação de suas propriedades neuroprotetoras tanto frente a doenças neurodegenerativas, quanto nas exposições a elementos altamente neurotóxicos, tais como o Mn, que para nosso conhecimento ainda não foram investigadas.

1.10. Hipótese do efeito neuroprotetor do extrato metanólico da polpa de açaí contra o estresse oxidativo via Nrf2

Neste ponto, é claro o efeito benéfico dos compostos fenólicos contra doenças crônicas. Muitas evidências recentes demonstram que este efeito dos polifenóis da dieta aconteça via modulação do fator de transcrição Nrf2.

STINTZING e colaboradores (2002) demonstraram que misturas de antocianinas apresentam efeitos antioxidantes sinérgicos, ou seja, tendem a ser mais antioxidantes do que seus compostos isolados. A polpa de açaí é extremamente rica em antocianinas e diversos outros polifenóis (SCHAUSS, et al., 2006a). E, até o presente momento da escrita desta tese, não há trabalho realizado com os frutos do açaizeiro na literatura relacionando seu efeito neuroprotetor contra o estresse oxidativo induzido por elementos químicos e seu efeito na concentração de Nrf2 celular.

POULOSE e colaboradores (2012) demonstraram que o extrato metanólico e etanólico de polpa de açaí foram capazes de reduzir a concentração de alguns fatores de transcrição relacionados à inflamação como NF-κB e TNFα em cultura de microglia de camundongos. Entretanto, Nrf2 não foi analisado neste estudo.

O Capítulo 1 desta tese demonstrou e discutiu a presença de concentrações de Mn extremamente elevadas em polpas de açaí, cujo efeito toxicológico tanto para quem ingere as polpas, quanto para o próprio fruto, não é conhecido ou reportado pela literatura.

Assim a hipótese gerada e trabalhada neste Capítulo 2 foi de que, devido a elevada e incomum concentração de Mn presente no açaí, a matriz do próprio fruto pode conter metabólitos secundários que estejam envolvidos em mecanismos de auto-defesa da planta contra um potencial estresse oxidativo causado pelo Mn (MANACH, et al., 2004). Estes metabólitos poderiam não apenas proteger o próprio fruto do estresse oxidativo, como também proteger quem ingere o fruto, que explicaria porque nenhum efeito tóxico da ingestão do açaí tenha sido relatado até hoje.

Assim foram delineados experimentos de neuroproteção *in vitro* na Universidade de Vanderbilt (Nashville, TN, EUA) na Laboratório do Professor Michael Aschner, que é especialista em neurotoxicidade do Mn.

Para tanto, foi utilizado como <u>componente potencialmente neuroprotetor</u> o extrato metanólico obtido no Capítulo 1 (Vide Figura 4 do Capítulo 1) que devido as etapas de fracionamento anteriores, possui relativamente baixa concentração de Mn (cerca de 25% do total) e cujo alguns efeitos biológicos já foram demonstrados (POULOSE, et al., 2012). E como <u>componente neurotóxico</u>, foi utilizado o Mn na forma de $MnCl_2$ na concentração de 500 µM, cuja neurotoxicidade já é bem estabelecida.

2. Objetivo do Capítulo 2

Caracterizar o potencial antioxidante do extrato metanólico de polpa de açaí e avaliar sua capacidade de atenuar o estresse oxidativo induzido por 500 µM $MnCl_2$ em culturas primárias de astrócitos.

2.1. Objetivos Específicos

- Determinar a concentração de compostos fenólicos totais, flavonóis e antocianinas totais no extrato metanólico de açaí, bem como comparar sua capacidade de detoxificar EROS (EC_{50}) a outros antioxidantes conhecidos via ensaio DPPH.

- Avaliar o efeito citoprotetor do extrato metanólico de açaí pelos ensaios de LDH e MTT contra a citotoxicidade do Mn em astrócitos.

- Avaliar a proteção antioxidante exercida pelo extrato metanólico de açaí contra o estresse oxidativo causado por $MnCl_2$ nos astrócitos pela análise do estado redox geral dos astrócitos através da 1) avaliação da concentração de glutationa total, e suas formas reduzida e oxidadas; 2) avaliação da lipoperoxidação pela quantificação de F_2-Isoprostanos.

- Avaliar se o extrato metanólico de açaí é capaz de manter o estado funcional dos astrócitos pela capacidade de remoção de glutamato do meio extracelular frente a exposição ao $MnCl_2$.

- Investigar o efeito do extrato metanólico de açaí no processo celular adaptativo no combate do estresse oxidativo pela quantificação da proteína Nrf2.

3. Materiais e Métodos utilizados no Capítulo 2

3.1. Materiais

Para a cultura celular primária de astrócitos, o meio de cultura essencial mínimo com sais de Erle (MEM), o soro de cavalo inativado pelo calor, penicilina e estreptomicina foram adquiridos da Invitrogen (Carlsbad, Ca, EUA). Os materiais descartáveis e cirúrgicos foram disponibilizados pela Universidade de Vanderbilt (Nashville, TN, EUA). Todos os demais reagentes e soluções foram adquiridos da Fisher Scientific (Pittsburg, PA, EUA), exceto quando especificado.

Para o tratamento dos astrócitos foi utilizado cloreto de manganês ($MnCl_2$) adquirido da Sigma-Aldrich (St.Louis, MO, EUA). A polpa de açaí liofilizada, utilizada para o preparo do extrato, foi preparada em laboratório conforme descrito no Item 3.3 do Capítulo 1 desta tese. Todos os procedimentos envolvendo células vivas foram realizados sob capela de fluxo laminar.

Para autorização do trabalho com ratos neonatos foi solicitado um treinamento introdutório na *AALAS Learning Library* cujo certificado encontra-se nos Anexos desta tese.

3.2. Preparo do extrato metanólico de polpa de açaí

O extrato metanólico de polpa de açaí foi obtido na mesma etapa que compreende o ínicio do item 3.6 do Capítulo 1 parte referente a extração em fase sólida (Vide fração eluída com metanol na Figura 4 do Capítulo 1). Esta extração com coluna Sep-pak® C_{18} reteve no seu cartucho a fração fenólica da polpa de açaí. Esta metodologia foi anteriormente utilizada por HOGAN e colaboradores (2010) para o isolamento de antocianinas e compostos fenólicos, embora aqui tenha sofrido diversas modificações. Diferentemente do protocolo original, foi utilizado agitação prévia da polpa de açaí com água e não uma mistura de água:acetona (1:1), pois foi objetivo no Capitulo 1 fracionar os elementos químicos solúveis em água, o cartucho de extração Oasis HLB foi trocado pelo Sep-pak C_{18} e a fração de antocianinas

retida no cartucho foi eluída com metanol puro ao invés de metanol 60% em água acidificada.

O eluato de cor intensamente roxa foi correspondente às antocianinas. O extrato foi então acrescido de água e congelado em freezer -80 ºC para seguida liofilização.

O pó fino e roxo obtido, apesar de extraído em metanol, foi mais solúvel em água o que dispensou o uso de solventes organicos para a dissolução do extrato no meio de cultura celular. O extrato de açaí foi então caracterizado pelo seu teor de compostos fenólicos e flavonóis, antocianinas totais e atividade antioxidante, bem como utilizado no tratamento dos astrócitos como descrito a seguir.

3.3. Determinação de fenólicos totais

A concentração de fenólicos totais no extrato de açaí foi determinado pelo método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteau (SINGLETON, et al., 1999). Para a determinação, 500 µL de uma solução aquosa do extrato na concentração de 0,1 mg/mL foi misturada a 2,5 mL de reagente de Folin-Ciocalteau (1:10) e 2 mL de Na_2CO_3 4%. A absorbância foi medida em 740 nm após 2 horas de incubação em temperatura ambiente na ausência de luz. A determinação foi feita em triplicada e a concentração de fenólicos totais foi expressa como média ± desvio padrão como mg de ácido gálico equivalente por g de extrato de açaí (mg de A.G./g).

3.4. Determinação de flavonóis totais

A concentração de flavonóis totais no extrato de açaí foi determinada pelo método descrito por PARK e colaboradores (1995), com pequenas modificações. Para a determinação, 500 µL de uma solução aquosa do extrato de açaí 0,5 mg/mLforam adcionados a 4,3 mL de etanol 80% + 100 µL de $Al(NO_3)_3$ 10% + 100 µL acetato de potássio 1M. Após ao tempo de incubação de 40 minutos a temperatura ambiente, a absorbância foi medida em 415 nm. A determinação foi feita em triplicata e concentração de flavonóis totais calculada a partir da curva da

curva analítica plotada com padrões de quercetina e os resultados expressos como média ± desvio padrão de mg de quercetina por g de extrato de açaí (mg de Q./g).

3.5. Determinação de antocianinas totais

Para a determinação de antocianinas totais na polpa de açaí e extrato metanólico foi utilizado o método pH diferencial (GIUSTI; WROSLTAD, 2001). Resumidamente, cada amostra e padrão (cianidina-3-glicosideo) foram diluidas primeiramente em tampão KCl 0,025M (pH 1,0) e a absorbância medida em 520 nm e 700 nm em espectrofotômetro Lambda 20 (Perkin Elmer®, Norwalk, CT, EUA) contra o branco reagente (água destilada). Uma segunda alíquota das amostras e padrão foram diluídas (em mesmo fator de diluição que o anterior) em tampão acetato de sódio 0,4 M (pH 4,5) e medidas em 520 e 700 nm. A absorbância (A) foi calculada usando a seguinte equação:

$$A = (A_{520nm,pH1,0} - A_{700nm,pH1.0}) - (A_{520nm,pH4,5} - A_{700nm,pH4,5})$$

As antocianinas totais foram calculadas e expressas como mg de cianidina 3-glicosideo equivalente por grama de extrato (mg de C3G/g).

3.6. Atividade antioxidante do extrato de açaí (Sequestro de radical livre DPPH)

A propriedade do extrato de açaí de sequestrar radicais livres 1,1-difenil-2-picril-hidrazila (DPPH) foi avaliada de acordo com o método descrito por YEN e colaboradores (2005). Este método se baseia na transferência de elétrons de uma substância antioxidante para um radical livre, o DPPH, que ao se reduzir perde a sua coloração púrpura, tornando-se amarelo. Diferentes concentrações do extrato de açaí entre 400 e 1,56 µg/mL, em diluição seriada de razão 2 em uma solução metanólica (2 mL) foram misturados com 0,5 mL de DPPH (0,5 mM, diluído em metanol). Depois da incubação por 30 min, ao abrigo da luz, em temperatura

ambiente, a absorbância foi medida em 517 nm. O branco foi composto por todos os reagentes, exceto o extrato.

Ácido ascórbico, quercetina e di-terc-butil metil fenol (BHT sigla do inglês – *butylated hydroxytoluene*) de grau analítico foram utilizados como controles positivos. A propriedade de sequestro foi calculada em porcentagem de radicais DPPH sequestrados, usando a seguinte equação:

Sequestro de radical DPPH (%) = [(absorbância do branco – absorbância da amostra)/ (absorbância branco)] x 100.

Os valores foram expressos como média ± desvio padrão das determinações em triplicata.

O valor de concentração efetiva CE_{50} que é a concentração do extrato capaz de sequestrar 50% dos radicais DPPH da solução foi determinada a partir de uma curva logarítmica obtida plotando-se na abscissa as concentrações dos padrões ou extrato (µg/mL) e na ordenada a porcentagem de DPPH sequestrado. O CE_{50} foi utilizado para a comparação da atividade antioxidante do extrato de açaí em relação aos controles positivos.

3.7. Cultura primária de astrócitos

A metodologia para isolamento e cultura de astrócitos corticais utilizada foi descrita por ASCHNER e colaboradores (1992). O protocolo para o isolamento de astrócitos de ratos foi previamente aprovado pelo Comitê de Uso de Animais de Vanderbilt (IACUC - *Vanderbilt University Medical Center Institutional Animal Care and Use Committee*) sob protocolo M/07/326 de agosto de 2010 e renovado até agosto de 2013. Resumidamente, em média 10 neonatos de ratos Sprague-Dawley de 1 dia de idade eram decapitados e o cérebros removidos. Os cérebros obtidos foram posicionados um a um sob uma lupa imersos em meio de cultura para separação dos córtices e remoção das meninges.

Os córtices resultantes foram agitados por 30 minutos em meio de dissociação que consiste de meio de cultura MEM + 3 U/mL de protease neutra bacteriana (Dispase, Invitrogen), sendo que após os 10 primeiros minutos de

agitação 1 mL de DNAse-I 8000 U/mL foi adicionado. Em seguida, houve uma centrifugação por 5 minutos a 1000 RPM para recuperação do pellet celular e eliminação da Dispase. O pellet foi ressuspendido em meio de cultura para cescimento dos astrócitos (meio de cultura MEM contendo 10% de soro de cavalo inativado + 100U/mL de penicilina + 100 µg/mL de estreptomicina) previamente aquecido em banho-maria a 37 ºC por 1 hora. Vinte e quatro horas após o plaqueamento inicial, o meio de cultura foi trocado para a preservação dos astrócitos e remoção de neurônios e oligodendrócitos.. Posteriormente, o meio de cultura continuou sendo trocado três vezes por semana até atingirem a confluência. A microglia não se adere fortemente a placa de cultura e era facilmente removida pela leve agitação do placas de cultura antes das trocas de meio de cultura até sua total remoção. As culturas foram mantidas a 37 °C em incubadora a 95% de ar/ 5% de CO_2 durante 3-4 semanas

A confluência dos astrócitos era checada pela visualização em microscóprio de fluorescencia e era nomalmente atingida na 3ª semana e as células não utilizadas nos experimentos eram descartadas após 5 semanas do isolamento. Todo o procedimento era repetido a cada 2 semanas para garantir o fluxo de células confluentes para os experimentos.

Para todos os experimentos foi utilizado plaqueamento em placa de 6 poços. Para os experimentos de viabilidade celular com MTT e LDH os astrocitos foram replaqueados em placas de 96 poços após o total isolamento dos astrócitos em placas tratadas com poli-L-lisina para facilita a readerência dos astrócitos.

3.8. Tratamento dos astrócitos

Astrócitos confluentes (~3ª semana após a cultura) foram tratados por 24 horas com 7 concentrações de extrato de açaí na faixa de 0,01 a 2500 µg/mL para a verificação da citotoxicidade do extrato de açaí pelos ensaios de LDH e MTT.

Posteriormente, os astrócitos foram tratados por 24 horas com 500 µM de $MnCl_2$ na presença e ausência de extrato de açaí nas concentrações previamente selecionadas de 0,1 e 1,0 µg/mL e a citotoxicidade avaliada pelos ensaios de LDH e MTT.

Em seguida, um novo experimento foi delineado consistindo de prévio tratamento dos astrócitos com extrato de açaí antes da exposição ao $MnCl_2$. Neste momento, os astrócitos foram pré-tratados por 18 horas na presença e ausência de extrato de açaí nas mesmas concentrações anteriores (0,1 e 1,0 µg/mL). Após 18 horas, o meio de cultura foi aspirado e os astrócitos expostos a concentração final de 500 µM de $MnCl_2$ em um novo meio de cultura. Neste esquema de tratamento foram avaliados a citotoxicidade pelos ensaios de LDH e MTT; o estresse oxidativo pela avaliação de glutationa total, razão GSH/GSSG e formação de F_2-IsoPs; estado funcional dos astrócitos pela captação de glutamato; e expressão do fator de transcrição Nrf2.

A proposta do tempo de exposição ao $MnCl_2$ é baseado em estudo prévio de estresse oxidativo induzido por Mn em cultura de astrócitos (MILATOVIC, et al., 2007). Ainda, é conhecido que a concentração fisiológica de Mn para astrócitos está na faixa de 75-100 µM e que sinais de toxicidade aumentam gradativamente acima desta concentração (SUZUKI, et al., 1975).

3.9. Ensaio de LDH e MTT

Os efeitos dos tratamentos dos astrócitos com extrato de açaí contra 500 µM de $MnCl_2$ foram avaliados com os ensaios de Lactato Dehidrogenase (LDH) (*In vitro* Toxicology Assay kit, LDH based, Sigma, St Louis, MO, EUA) e Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT) (*In vitro* Toxicology Assay, MTT based; Sigma, St Louis, MO, EUA) conforme as recomendações dos kits.

A solução estoque de MTT (10X) foi preparada pela reconstituição de 15 mg do MTT estoque em 3 mL de HBSS 1X (Hank's balanced salts solution) livre de vermelho de fenol imediatamente antes dos experimentos. O cofator e substrato de LDH foram ressuspendidos e aliquotados em microtubos de 1 mL para armazenamento em freezer -20 ºC e descongelados em temperatura ambiente 1 hora antes dos experimentos, conforme especificado no próprio kit. A solução do fluoróforo foi armazenado a 4 ºC e mantido na incubadora a 95% de ar/ 5% de CO_2 a 37 ºC por 1 hora antes dos experimentos.

A cultura primária de astrócitos foi replaqueada em placas de 96 poços contendo poli-L-lisina na densidade de 20000 células por poço dois dias antes do

experimento. Os astrócitos foram tratados conforme o item 3.5. deste capitulo e um grupo de tratamento tratamento com 100 µM de H_2O_2 foi utilizado como controle positivo de morte celular em cada placa.

Após o tempo de tratamento, 0,5 mL do meio de cultura de cada poço da placa de 96 poços foi pipetado para outra placa de 96 poços para a medida da integridade da membrana celular pelo ensaio de LDH. A mistura reagente para o ensaio LDH contendo o substrato, cofator e fluoróforo, foi sempre recentemente preparada antes de cada análise. Foram adicionados 100 µL da mistura reagente em cada poço da placa e incubado a temperatura ambiente e na ausência de luz. A reação foi finalizada pela adição de volume 1/10 de HCl 1 M. A absorbância foi medida por espectrofotometro de leitor de placas (Molecular Devices, VMax Kinetic Microplate Reader, Sunnyvale, CA) no comprimento de onda de 490 nm. A absorbância de fundo foi medida a 690 nm e subtraída das medidas em 490 nm. Sendo a absorbância do ensaio inversamente proporcional à integridade da membrana celular.

A cada 0,5 mL remanescentes nos poços das placas de tratamento foram adicionados 5 µL da solução estoque de MTT para a obtenção da concentração final de 0,5 mg/mL de MTT e incubados por 3 horas em incubadora a 95% de ar/ 5% de CO_2 a 37 ºC. Posteriormente, os cristais de formazan formados na reação do reagente MTT com as células viáveis foram dissolvidos pela adição de volume igual de solução de solubilização de MTT contido no kit (Sigma, M-8910) e levemente agitados por 20 minutos. A absorbância foi medida por espectrofotometria (Molecular Devices, VMax Kinetic Microplate Reader, Sunnyvale, CA) no comprimento de onda de 570 nm. A absorbância de fundo foi medida a 690 nm e subtraída das medidas de 570 nm. Sendo a absorbância do ensaio diretamente proporcional à viabilidade celular.

Ambos os ensaios de LDH e MTT foram realizados com três culturas primárias de astrócitos independentes.

3.10. Análise da captação de ^{3}H-glutamato em cultura de astrócitos

O ensaio de captação de ^{3}H-glutamina foi realizado como previamente descrito por (SIDORIK-WERGRZYNOWICZ, et al., 2012) e o tempo de 10 minutos

de incubação para a captação do glutamato foi selecionado baseado nos resultados previamente reportados (MUTKUS, et al., 2005; LEE, et al., 2009).

Os astrócitos tratados em placas de 6 poços foram lavados três vezes com 1 mL de tampão Na-HEPES fresco e aquecido, consistindo de: 122 mM NaCl, 3,3 mM KCl, 0,4 mM de $MgSO_4$, 1,3 mN de $CaCl_2$, 1,2 mM de KH_2PO_4, 10 mM de glicose e 25 mM de HEPES ajustado para pH 7,4 com NaOH 10M.

E seguidamente expostos a 1 mL de tampão Na-HEPES pré-aquecido adicionado de 0,25 µCi/mL do isótopo L-[^{3}H]-glutamato (atividade específica: 49,0 Ci/mmol, Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, EUA) e 100 nM de glutamato não marcado por 10 minutos em incubadora a 95% de ar/ 5% de CO_2 a 37 ºC.

A captação foi finalizada por aspiração do tampão do poço seguido de 3 lavagens com 2 mL de tampão Na-HEPES gelado. No final do experimento, as células foram lisadas em 500 µL de NaOH 1M sob agitação por 30 minutos. Uma alíquota de 400 µL foi transferida para o um frasco de cintilação contendo 5 mL de coquetel LSC (Fisher Scientific) e a radioatividade foi medida em um contator de radioatividade LS 6500 (Beckham, Fullerton, CA, EUA). Outra aliquota de 50 µL foi usada para determinação de proteínas com o método de BCA (Pierce, Rockford, IL, EUA). O número de contagens de radioatividade por minuto (com) foi corrigido pela concentração de proteína e calculado como captação de glutamato em nmol/mg de proteína. Todos os resultados foram normalizados em relação ao controle. A captação de glutamato para cada tratamento foi realizada em triplicata e repetida com três culturas primárias de astrócitos distintas para obtenção do resultado médio.

Todas as etapas foram realizadas com paramentação apropriada para ensaios radioativos e o manuseio da solução estoque de L-[^{3}H]-glutamato foi feito com a proteção de blocos de chumbo como barreira protetora de radioatividade.

3.11. Determinação da concentração total de glutationa celular e razão GSH/GSSG

Para a determinação de glutationa total e GSSG foi utilizada a metodologia “de reciclagem” (TIETZE, 1969; LEFFERS, et al., 2013).

Após o tempo de tratamento, os astrócitos foram coletados por tripsinização e lavados com PBS duas vezes seguida de centrifugação entre cada lavagem. O sedimento celular foi recolhido e sonicado com ponteira ultra-sônica em 0,3 mL de tampão de extração gelado (0,1% de Triton X-100, 0,6% de acido sulfosalicilico em tampão fosfato (tampão fosfato de potassio 0,1 M, 5mM de EDTA, pH 7,5) e centrifugado novamente. O sobrenadante foi recolhido e mantido em gelo.

Para a determinação da glutationa total, 20 µL do sobrenadante de cada amostra foi colocado em placa de 96 poços. Para a determinação de GSSG, 100 µL de cada amostra foi tratado com 2 µL de solução de 2-vinilpiridina 10% em etanol/tampão fosfato 1:1 por 1 hora em temperatura ambiente. Após este tempo, 20 µL de cada amostra foi utilizado para a determinação de GSSG. A solução de 2-vinilpiridina é utilizada uma vez que este composto reage com a glutationa reduzida formando um complexo estável, deixando apenas a GSSG para ser determinada.

A partir deste ponto, as determinaçóes de GSH total e GSSG são identicas. Em cada poço é adicionado DTNB (1,68 mM em tampão fosfato, 60 µL por poço) + GSH redutase (3,33 U/mL em tampão fosfato, 60 µL por poço) e exatamente 30 segundos ates da leitura é adicionado NADPH (0,9 mM m tampão fosfato, 60 µL por poço). A variação de absorbância por minuto foi medida em leitor de microplaca (Molecular Devices, VMax Kinetic Microplate Reader, Sunnyvale, CA) no comprimento de onda de 412 nm em 5 leituras em sequência. A concentração de GSH e GSSG foi corrigida em cada amostra pela concentração de proteína determinada pelo método de BCA (Pierce, Rockford, IL, EUA) e o resultado expresso como média ± erro padrão relativo (µM/mg de proteína).

A razão entre GSH e GSSG foi normalizada em relação ao controle. As determinações foram feitas em triplicata com três culturas de astrócitos independentes.

3.12. Quantificação de F_2-isoprostanos (F_2-IsoPs)

A lipoperoxidação foi avaliada pela determinação de F_2-IsoPs nas culturas de astrócitos usando cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM) com monitoramento íon seletivo (MORROW; ROBERTS, 1999) e o preparo de amostra envolve diversas etapas, sendo necessários 4 dias para a finalização de

20 amostras. A metodologia é aplicada em rotina no Laboratório do prof. Michael Aschner na Universidade de Vanderbilt e foi publicada na íntegra em 2009 (MILATOVIC; ASCHNER, 2009).

Resumidamente, após o tratamento dos astrócitos em placa de 6 poços, o meio de cultura é aspirado e os astrócitos coletados por raspagem de cada poço com 300 µL de água deionizada em banho de gelo e transferidos para microtubos imediatamente imersos em nitrogênio líquido. As amostras foram mantidas em freezer -80 ºC até o início da determinação.

Para a determinação, os microtubos foram descongelados em banho de gelo por 1 hora e sonicados com ponteira ultrassônica para a promoção da lise celular. Em seguida, 200 µL do lisado foram adicionados a 300 µL de metanol contendo 0,005% de hidroxitolueno butilado (BHT) e submetido à saponificação química em banho-maria a 37 ºC usando 15% de KOH para hidrólise dos F_2-IsoPs ligados por 30 minutos.

Em seguida o pH de cada amostra foi ajustado para pH 3 e 0,1 ng de $^4H_2$-marcado 15-$F_{2\alpha}$-IsoP foi adicionado como padrão interno.

F_2-IsoPs foram purificados por extração em fase sólida com coluna de fase reversa C_{18} seguida de extração em fase sólida com coluna de fase normal sílica Sep-Pak, com sequência de ativação/extração/limpeza/eluição conforme esquematiza a Figura 7 abaixo:

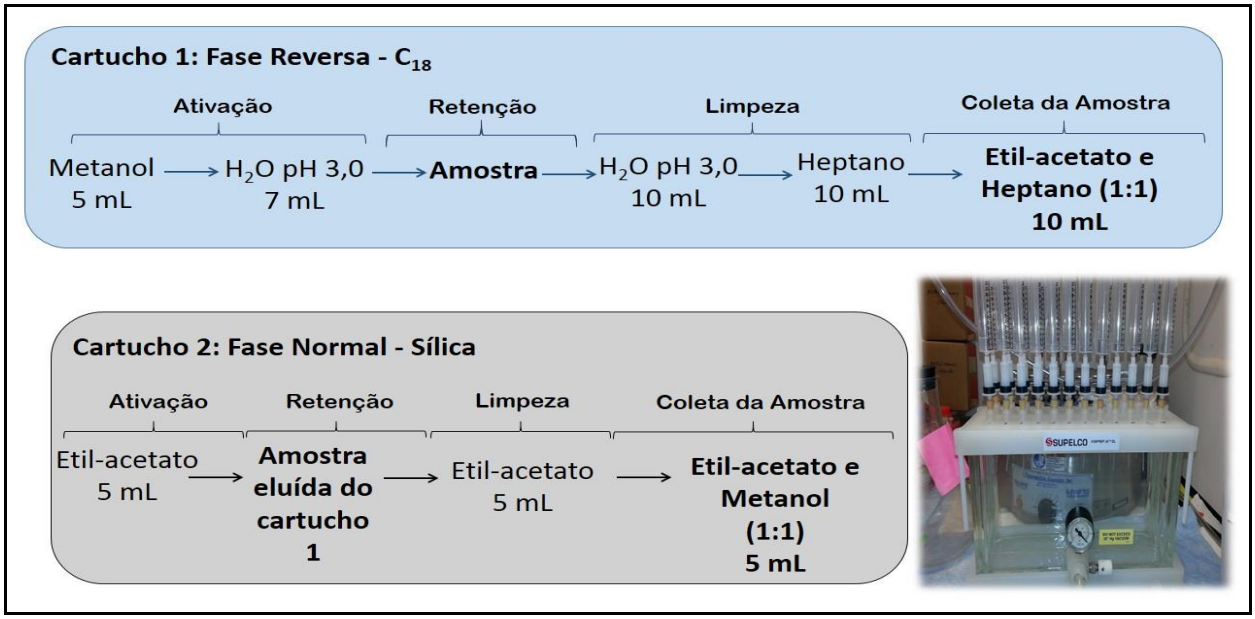


Figura 7. Esquematização da etapa de purificação dos F_2-isoprostanos por extração em fase reversa (C_{18}) seguida de extração em fase normal.

Após a etapa de purificação, os F_2-isoprostanos foram levados à secura e derivatizados a ésteres de pentafluorobenzila (PFB) pela adição de 40 µL de brometo de pentafluorobenzila: acetonitrila anidra (1:9 v/v) e 20 µL de diisopropriletilamina: acetonitrila anidra (1:9 v/v). A reação durou 20 minutos em banho-maria a 37 ºC. Em seguida os ésteres formados foram levados a secura sob atmosfera de N_2 e posteriormente redissolvidos em clorofórmio:metanol (2:3 v/v).

Os ésteres de pentafluorobenzila foram então isolados por cromatografia em camada delgada, com placas de sílica Partisil LK6D® (Whatman, Maidstone, EN) lavadas com etil acetato: metanol (90:10 v/v) e ativadas pelo calor (95 ºC por 20 minutos) e a corrida cromatografica utilizou clorofórmio:etanol (90:10 v/v) recem preparado como fase móvel. Após a corrida, as amostras foram raspadas da sílica, extraidas com etil-acetato e levadas a secura em atmosfera de N_2.

A próxima etapa consistiu da formação do trimetilsilil-éter-derivado pela adição de 8 µL de dimetilformamida (DMF, Sigma-Aldrich) e 20 µL de bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA, Supelco). A reação dourou 5 minutos em banho-maria a 37 ºC e mais uma vez, as amostras foram levadas a secura em atmosfera de N_2.

Finalmente, as amostras foram redissolvidas em undecano anidro a analisadas por cromatografia gasosa acoplada ao espectrometro de massas, com ionização química no modo negativo. O pico de razão massa/carga (*m/z*) = 569 corresponde ao ion tris-trimetilsilil eter derivado e o pico de *m/z*= 573 corresponde ao padrão interno 15-$F_{2\alpha}$-IsoP. Para a quantificação a altura do pico contendo os F_2-IsoPs derivatizados (*m/z* 569) são comparados com o padrão interno deuterado (*m/z* 573) e coeficiente de variação é menor que 8%.

Ao se obter a quantificação dos F_2-IsoPs o valor é normalizado pela concentração de proteína de cada amostra determinada pelo método de BCA (Pierce, Rockford, IL, EUA). Os experimentos foram feitos em triplicata com três culturas de astrócitos independentes.

3.13. Análise da expressão de Nrf2 por western blot

Após o tratamento, os astrócitos foram lavados com HBSS e lisados com tampão para ensaio de radioimunoprecipitação (RIPA) contendo coquetel inibidor de

proteases (Sigma-Aldrich). O lisado celular foi sonicado e centrifugado a 4°C a 10000 *g* por 5 minutos e o sobrenadante coletado para a quantificação de proteinas totais usando o kit de ensaio do ácido bicinconínico (BCA) (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA).

Iguais quantidades de proteína (30 µg) de cada amostra foram adicionadas ao tampão de amostra recém-preparado, contendo tampão de amostra Laemli, 2-mercaptoetanol. As amostras foram aquecidas até a fervura por 7 minutos para desnaturação proteíca, centrigufados por 30 segundos e submetidas à eletroforese em géis de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 10%.

Os geis foram submetidos a uma pré-corrida para limpeza a 70 V por 2 minutos e então as amostras e o marcador de peso molecular Kaleidoscope® foram carregados nos géis. A corrida de separação das proteinas dura cerca de 1 hora a 108 V. O tampão de corrida 1X foi diluido a partir do tampão TRIS/Glicina/SDS 10X e acuba de eletroforese vertical (Mini PROTEAN®System, BIO RAD, EUA) Todos os reagentes e soluções uitlizados na sepração por SDS-PAGE foram adquiridos da BIO-RAD®.

Posteriormente as proteínas foram transferidas dos géis para membranas de nitrocelulose Hybond-ECLTM (Amershan Biosciences, EUA) em “western boxes” a 4 ºC, 36 V, overnight e o tampão de corrida consistiu de TRIS-glicina 1X e metanol 0,2%. Após a transferencia, o excesso de membrana foi recortado e lavado com TBST 1X e bloqueado com leite 5% preparado em TBST.

A análise do immunoblot foi realizada com anticorpo primário anti-Nrf2 de coelho (1:200 em leite 5%) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA) e agitado a baixa rotação (42 rpm) overnight. Em seguida, a membrana foi novamente lavada com TBST e o anticorpo secundário anti-IgG de coelho extraído de cabra (1:5000 em leite 5%) (KPL, Gaitherburg, MD, EUA) foi adicionado e mantido por 1 hora de agitação em baixa rotação. Após a incubação com os anticorpos foram confecicionados os filmes fotograficos com a membrana e revelados em sala escura apropriada para a detecção das bandas de Nrf2.

Após a revelação, as membranas foram novamente lavadas com TBST e agitadas com “stripping buffer” por 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente foram novamente bloqueadas com leite 5% para a incubação com os anticorpos para normalização dos dados obtidos com Nrf2 por β-actina. A incubação com o anticorpo primário anti-β-actina de camundongo (1:100000) (A5316; Sigma,

St. Louis, MO, USA) foi realizada *overnight* e a incubação com o anticorpo secundário utilizados foram e anticorpo anti-IgG de camundongo extraído de cabra (1:5000) foi feita por 1 hora. Em seguida, procedeu-se novamente as etapas de revelação dos filmes em sala escura.

Os filmes foram escaneados e a aquisição d densitometria das bandas foi realizado com software apropriado. Os dados de Nrf2 foram ajustados pelo conteúdo de β-actina e então normalizados em relação ao controle. Os experimentos foram realizados em triplicata com três culturas de astrócitos independentes.

3.14. Análise Estatística

Os resultados de caracterização e atividade antioxidante do extrato de açaíforam expressos como média ± desvio padrão. Já os demais resultados obtidos no tratamento dos astrócitos foram expressos como média ± erro padrão da média. O teste estatístico aplicado foi ANOVA com pos hoc Tukey para verificar diferenças no que se refere aos efeitos apresentados nas culturas de astrócitos tratadas em relação aos controles. Valores de $p<0,05$ foram considerados significantes.

Os resultados foram analisados com o auxílio do programa Statistica® 10.0 e os gráficos foram feitos com auxílio do programa OriginPro® 9.0.

4. Resultados e Discussão

4.1. Caracterização e atividade antioxidante do extrato de açaí

A atividade antioxidante de diversas frutas e extratos de frutas resultam de uma ação sinérgica combinada de uma mistura de compostos que incluem, fenólicos, carotenoides, vitaminas C e E, entre outros. Entretanto, no açaí, estas vitaminas estão presentes em relativamente baixas concentrações e, os polifenóis e antocianinas são os principais contribuintes para sua capacidade antioxidante (POULOSE, et al., 2012; RUFINO, et al., 2010). HOGAN e colaboradores (2010), ao utilizar uma metodologia de extração de antocianinas do açaí que serviu de ponto de partida para a metodologia utilizada neste trabalho, demonstraram efeitos antiproliferativos de um extrato hidroalcoolico de açaí contra células de glioma de ratos C-6.

O método de purificação das antocianinas e compostos fenólicos uitilizado por estes autores foi a extração em fase sólida (SPE). A SPE com colunas apolares permitiu a concentração destes compostos e a remoção de diversas outras substâncias polares, tais como, açúcares, ácidos orgânicos, além de elementos químicos que, por interagir fracamente ao material da coluna são eluídos com a água.

A Tabela 12 mostra os valores de concentração de fenólicos totais, flavonóis totais e antocianinas totais obtidos no extrato de açaí liofilizado.

Tabela 12. Concentração de fenólicos, flavonóis e antocianinas totais no extrato de açaí

	Extrato de Açaí Liofilizado
Fenólicos Totais	241 ± 2,8 mg de ácido gálico equivalente/g de extrato
Flavonóis Totais	12,7 ± 1,5 mg de quercetina equivalente/g de extrato
Antocianinas totais	231 ± 1,6 mg de cianidina-3-glicosideo/g de extrato

A metodologia utilizada para a determinação de fenólicos totais foi a mesma utilizada no trabalho de HOGAN e colaboradores (2010) e a concentração obtida no nosso extrato foi inferior a concentração reportada por eles que foi de 312 ± 5,6 mg de ácido gálico equivalente/g de extrato. Estes achados indicam que, no nosso caso, a eluição da fração retida no cartucho apenas com metanol não tenha sido 100% eficiente.

Por outro lado, a concentração de antocianinas totais foii superior a reportada pelos mesmos autores (100 ± 2,4 mg de cianidina-3-glicosideo equivalente/g de extrato). Isto demonstra que quase a totalidade da fração fenólica obtida é formada por antocianinas e que as modificações adotadas, permitiram uma extração mais seletiva para esta subclasse de compostos do que a proposta por HOGAN e colaboradores (2010), além de tornar o procedimento mais limpo, simples e econômico, por utilizar menos solventes orgânicos.

A troca do cartucho Oasis® HLB pelo cartucho Sep-pak® C_{18}, ambos do mesmo fabricante Waters®, pode ter sido responsável pelo aumento da eficiência da extração de antocianinas. O cartucho Oasis® HLB é uma matriz polímerica que possui simultaneamente um caráter lipofílico e hidrofílico que pode ter desfavorecido a retenção das antocianinas presentes no filtrado aquoso de açaíno trabalho de HOGAN e colaboradores (2010), já a coluna Sep-pak® C_{18} é uma matriz sólida constituída de sílica funcionalizada com cadeias alifáticas de C_{18}.

As vantagens e desvantagens dos cartuchos Oasis® HLB e Sep-Pak® C_{18} são intimamente ligadas a finalidade da extração. A matriz do cartucho Oasis HLB possivelmente seria mais conveniente em detrimento da matriz Sep-pak® C_{18} para separação de subgrupos de antocianinas em detecção acoplada a um cromatógrafo líquido em linha (VERGARA, et al., 2010).

No entanto, o propósito deste trabalho foi apenas purificar as antocianinas de forma simples e econômica e neste ponto a maior lipofilicidade (VILLIERS, et al., 2011) da matriz do cartucho Sep-pak® C_{18} foi vantajosa para a retenção eficiente das antocianinas do filtrado aquoso de açaí, uma vez que toda a coloração arroxeada do açaí era retida no cartucho e, de fato, a concentração final de antocianinas totais foi maior.

Antocianinas previamente identificadas no açaí incluem cianidina, delfinidina, malvidina, pelargonidina e peonidina, além de suas formas glicosídicas, indicando

que as antocianinas isoladas no extrato provavelmente ainda se tratam de uma mistura complexa (SCHAUSS, et al., 2006a).

No que tange aos flavonóis totais, o método selecionado utiliza o cloreto de alumínio que forma um complexo estável com os flavonóides em geral, entretanto, o comprimento de onda utilizado nas medições (425 nm) permite selecionar os flavonóis e assim, outros subgrupos dos flavonóides como, as flavonas e os ácidos fenólicos (entre outros) não são detectados (WOISKY, et al., 1998).

A escolha deste método e deste comprimento de onda para detecção permitiu excluir as antocianinas da determinação que fazem parte do grande grupo dos flavonóides e são estruturalmente relacionados com a flavona. A quercetina, que foi utilizada como padrão é um flavonol. E, a concentração de flavonóis encontrada é muito menor do que a de antocianinas, demonstrando que as antocianinas são os fenólicos predominantes no extrato obtido. Flavonóis que já foram previamente identificados do açaí são a própria quercetina, vitexina e di-hidrokaempferol e portanto podem contribuir para a concentração de flavonóis quantificada (KANG, et al., 2010; SCHAUSS, et al., 2006a).

A atividade antioxidante direta do extrato de açaí foi avaliada pela habilidade em sequestrar radicais livres DPPH e seu valor de CE_{50} é comparado aos dos padrões puros de grau analítico quercetina, ácido ascórbico e BHT, na Tabela 13.

Tabela 13. Atividade antioxidante do extrato de açaí em comparação com os controles positivos quercetina, ácido ascórbico e BHT

	CE_{50} (µg/L)
Extrato de açaí	19,1
Quercetina	4,6
Ácido ascórbico	6,5
BHT	70,1

Pela análise da Tabela 13, podemos ver que a atividade antioxidante do extrato de açaí é maior do que a atividade do BHT que é um composto orgânico lipossolúvel e antioxidante muito utilizado como aditivo pela indústria alimentícia para aumentar a vida de prateleira dos alimentos processados e industrializados e em metodologias analíticas como antioxidante, a exemplo o método de quantificação de F_2-IsoPs utilizado adiante neste trabalho. Por outro lado, a atividade antioxidante do extrato

de açaí também foi inferior à atividade antioxidante do flavonol purificado quercetina e do ácido ascórbico.

HOGAN e colaboradores (2010) demonstraram que a concentração de 50 µg/mL de seu extrato hidroalcoolico de açaí foi capaz de sequestrar 39,6% dos radicais DPPH. Já aqui, a mesma concentração de 50 µg/mL de extrato metanólico de açaí foi capaz de sequestrar 81,5% dos radicais DPPH, o que evidencia, mais uma vez, que as modificações no método de extração proporcionaram um extrato de açaí mais concentrado em antocianinas totais, mas principalmente, com maior atividade antioxidante direta, pela habilidade em sequestrar radicais livres.

4.2. Efeito citoprotetor do extrato de açaí em cultura de astrócitos

A primeira etapa do trabalho foi testar diferentes concentrações do extrato de açaí a fim de observar se apenas este poderia causar citotoxicidade aos astrócitos.

Para isso, avaliou-se a concentração da enzima lactato dehidrogenase (LDH) liberada para o meio de cultura pelas células injuriadas, bem como a função mitocondrial das células sadias, usando brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5difenil tetrazolio (MTT) após o tratamento das células. O experimento foi realizado com 7 concentrações diferentes em escala logarítmica e o tempo de tratamento foi de 24 horas.

A absorbância no ensaio MTT (comprimento de onda de 570 nm) é positivamente correlacionada com a viabilidade celular. No ensaio de LDH (comprimento de onda de 490 nm), por sua vez, a absorbância é inversamente correlacionada com a viabilidade celular.

Os dados apresentados na Figura 8 demonstram que o extrato de açaí não foi capaz de causar morte celular significativa dos astrócitos de cultura primária até a concentração máxima testada que foi de 2500 µg/mL, corroborando com o reportado por POULOSE e colaboradores (2012) em microglia de camundongos BV-2. Ainda, um aumento significativo da viabilidade celular em relação às celulas não tratadas foi observado a partir da concentração de extrato de açaí 0,1 µg/mL ($p < 0,05$).

Alguns pesquisadores defendem que compostos fenólicos, em algumas situações, podem exercer efeitos antioxidantes em baixas concentrações e efeitos pró-oxidantes em concentrações excessivas (GALATI; O’BRIEN, 2004; BOUAYED;

BOHN, 2010). SKIBOLA e SMITH (2004) revisaram o assunto a cerca dos efeitos tóxicos provenientes da ingestão excessiva de flavonóides, e afirmam que tais efeitos têm sido negligenciados no meio científico. Dentre os efeitos relatados estão, atividades mutagênicas, inibição de enzimas envolvidas no metabolismo hormonal além de efeitos pró-oxidantes. Quando o nível pró-oxidativo celular excede a capacidade de defesa, este pode causar danos oxidativos a macromoléculas, e em condições drásticas pode inclusive levar a morte celular por apoptose.

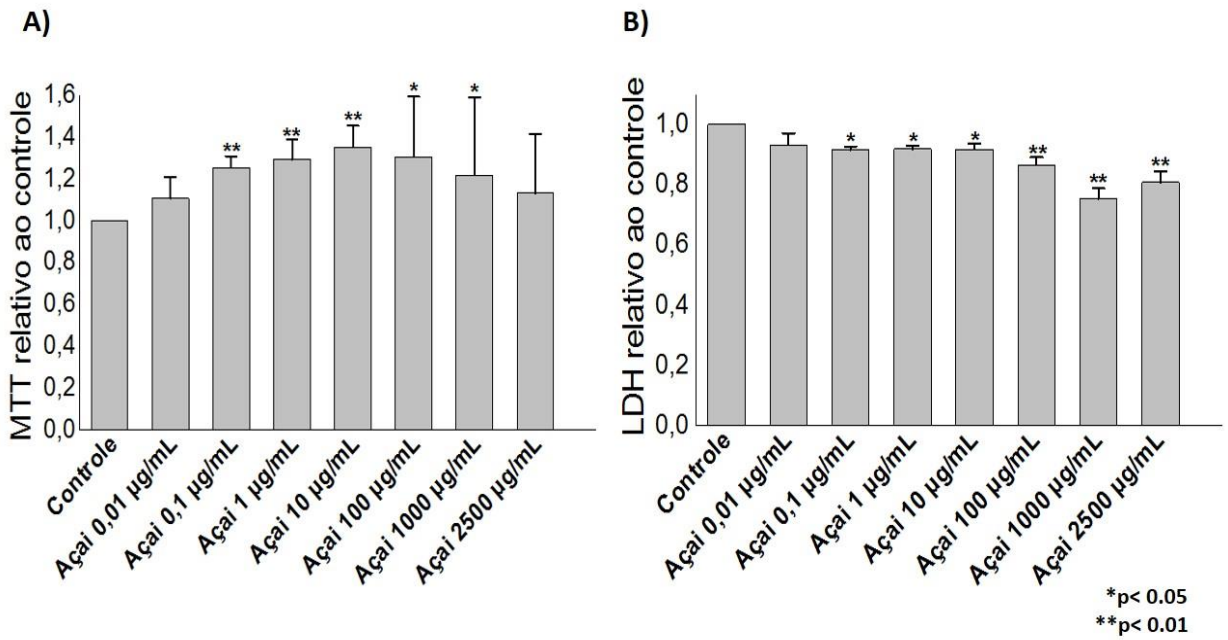


Figura 8. Efeito da proteção celular exercida pelo extrato de açaí medido por ensaio de MTT (A) e LDH (B). Ambos resultados demonstram aumento da viabilidade celular significativo a partir de 0,1 µg/mL (valor de p <0,05). Valores estão expressos como média ± EPM de três experimentos independentes e normalizados em relação ao controle.

O parâmetro de DL_{50} que seria a dose de extrato de açaí letal para 50% das células expostas não pôde ser calculado, pois até a concentração testada de 2500 µg/mL não houve morte celular significativa. Concentrações de extrato de açaí superiores não foram testadas pois a coloração púrpura do extrato poderia interferir na detecção espectrofotométrica tanto do complexo de formazan no ensaio de MTT quanto do produto de reação da LDH.

De qualquer forma, no que tange a citotoxicidade o extrato de açaí isoladamente parece ser seguro e de DL_{50} bastante elevada. Há de se considerar

que dificilmente concentrações iguais ou superiores a 2500 µg/mL possam ser encontradas nos fluidos biológicos e principalmente com acesso aos astrócitos no SNC advindos de ingestão de alimentos ou nutracêuticos com antocianinas.

Apesar dos diversos dados publicados na literatura comprovando os efeitos biológicos das antocianinas em diversos modelos experimentais e estudos clínicos, bem como sua capacidade de atravessar a barreira hematoencefalica, acredita-se que, em geral, a biodisponibilidade das antocianinas é baixa e de excreção rápida, mas variável conforme a estrutura específica de cada antocianina (AGAWA, et al., 2011).

Levando em consideração que quanto menor a concentração de uma dada substância de efeitos terapêuticos no organismo, menor é a probabilidade de aparecimento de efeitos indesejados, foram selecionadas as concentrações de 0,1 µg/mL e 1,0 µg/mL de extrato de açaí para prosseguir com os experimentos de neuroproteção por serem as menores concentrações em que já foram observados aumentos de viabilidade celular.

O extrato utilizado nestes experimentos possui, como discutido anteriormente, cerca de 23% de antocianinas totais. Assim, os astrócitos nos experimentos seguintes que foram pré-tratados com 0,1 µg/mL e 1,0 µg/mL de extrato de açaí foram expostos a 0,023 µg/mL e 0,23 µg/mL de antocianinas totais, respectivamente.

4.3. Efeito citoprotetor do extrato de açaí contra a citotoxicidade de 500 µM $MnCl_2$ quando administrados simultaneamente em cultura primária de astrócitos

O primeiro experimento de citoproteção do extrato de açaí contra a citotoxicidade do Mn em astrócitos foi também avaliado pelos ensaios de MTT (Figura 9A) e LDH (Figura 9B) tendo como controle negativo os astrócitos em seu meio de cultura habitual e como controle positivo astrócitos tratados com 100 µM de H_2O_2. O tempo de tratamento foi de 24 horas e as combinações testadas foram:

- 500 µM de $MnCl_2$
- 0,1 µg/mL de extrato de açaí + 500 µM de $MnCl_2$
- 1,0 µg/mL de extrato de açaí + 500 µM de $MnCl_2$

Conforme monstrado na Figura 9, apenas os grupos que foram expostos a 500 µM de $MnCl_2$ e o controle positivo apresentaram valores significativamente diferentes do controle ($p < 0,001$), evidenciando citotoxicidade. Portanto, ambas concentrações de extrato de açaí testadas foram capazes de evitar o dano celular causado pelo $MnCl_2$ nos astrócitos.

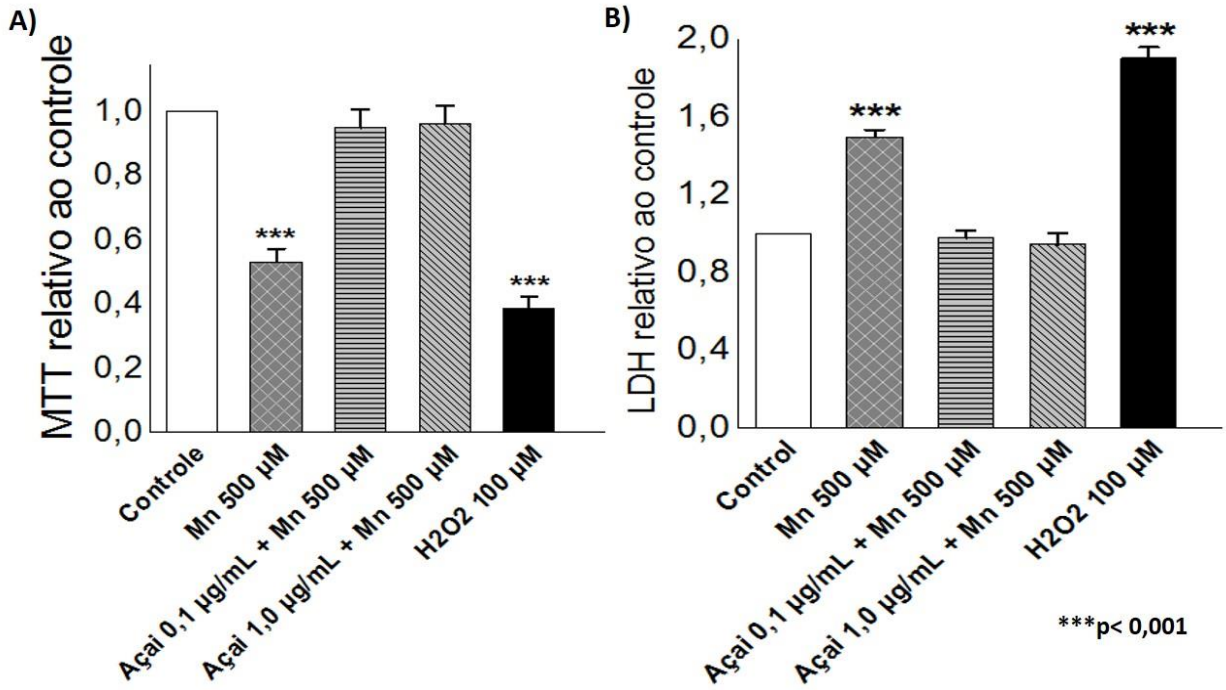


Figura 9. Efeito da proteção celular exercida por duas concentrações de extrato de açaí contra a citotoxicidade causada por 500 µM de $MnCl_2$ após tratamento simultaneo por 24 horas em cultura de astrócitos medido por ensaio de MTT (A) e LDH (B). Ambas concentrações revelaram proteção celular estatisticamente significante (valor de $p < 0,001$). Valores estão expressos como média ± EPM de três experimentos independentes e normalizados em relação ao controle.

O ensaio de MTT é especialmente interessante na determinação de danos celulares causados pelo Mn, pois analisa a viabilidade celular através da função mitocondrial. As mitocôndrias desempenham um papel crucial na indução de toxicidade por Mn em astrócitos, que são organelas abundantes neste tipo celular devido a intensa demanda energética.

Esta organela concentra Mn mesmo em condições homeostásicas, uma vez que a SOD2 isoenzima predominantemente encontrada nas mitocôndrias utiliza o

Mn como seu co-fator enzimático. Mesmo assim, o excesso de Mn pode levar ao colapso do potencial de membrana mitocondrial resultando em déficit bioenergético e aumento na geração de EROS (GAVIN, et al., 1992), ocasionando o estresse oxidativo.

LEE e colaboradores (2009), também testaram a atividade neuroprotetora dos antioxidantes estrógeno e tamoxifeno contra a citotoxicidade de 500 µM de $MnCl_2$ em cultura de astrócitos com tratamento de 24 horas. Os autores identificaram uma relação dose-dependente nos efeitos citoprotetores. No caso do extrato de açaí, aqui testado, a citoproteção foi estatisticamente igual ($p<0,001$) para as duas concentrações utilizadas e, portanto, sem a presença de efeito dose-dependente.

Este resultado pode ser um indicativo de que mesmo a polpa de açaí tendo concentrações naturalmente elevadas de Mn (como discutido no Capítulo 1), os demais compostos presentes no fruto açaí podem ser capazes de proteger ou atenuar prováveis danos celulares, em nível de SNC, que a elevada concentração de Mn naturalmente presente no fruto possa exercer. Isso tornaria o consumo da polpa de açaí seguro do ponto de vista dos danos oxidativos do Mn. Embora estudos mais aprofundados sejam necessários para afirmar isso de forma conclusiva.

Estudos como, por exemplo, tratar os astrócitos com Mn isolado do próprio fruto, uma vez que a forma química do elemento pode influenciar em sua toxicidade podem trazer informações preciosas. Poucos dados existem na literatura sobre a toxicidade do Mn na forma de quelatos e complexos, e até o momento, é desconhecida a forma química do Mn no açaí. A única informação sobre a forma química do Mn no açaí, para o melhor do nosso conhecimento, é de que cerca de 45% do Mn presente interage fracamente com a fração fenólica e com a fração insolúvel do açaí que pode também conter polifenóis não absorvíveis além de fibras, e que foram discutidos no Capitulo 1 desta tese.

O mecanismo de citoproteção promovido pelo extrato de açaí pode ser: 1) via quelação do excesso de Mn; 2) via efeitos antioxidantes diretos; 3) via regulação de enzimas antioxidantes por efeitos adaptativos.

Acredita-se que compostos fenólicos possuem elevada afinidade por elementos químicos na forma catiônica, quelando-os e assim diminuindo suas biodisponibilidades (RICE-EVANS, et al., 1997; POWELL, et al., 1998; MICHALAK, 2006). Sabendo-se que o $MnCl_2$ utilizado, no meio de cultura, se dissocia formando

íons Mn^{2+}, pelo tratamento delineado com administração simultânea, não é possível distinguir qual o mecanismo envolvido.

Neste ponto, foi proposto se apenas um tratamento prévio com o extrato de açaí seria capaz de proteger os astrócitos da exposição ao Mn após retirado este extrato do meio de cultura.

4.4. Efeito antioxidante de 0,1 µg/mL de extrato de açaí atenua o estresse oxidativo induzido por 500 µM de $MnCl_2$ em cultura primária de astrócitos

O novo delineamento experimental proposto consistiu de um pré-tratamento da cultura de astrócitos por 18 horas com a concentração final de 0,1 µg/mL e 1,0 µg/mL de extrato de açaí no meio de cultura seguido imediatamente pela retirada deste extrato através da remoção do meio de cultura e adição de um novo meio contendo a concentração final de 500 µM de $MnCl_2$.

Os primeiros testes realizados foram novamente os ensaios de LDH e MTT com o intuito de comparação dos resultados obtidos com as duas formas distintas de tratamento, apesar de que, neste caso foi adotado um tempo de exposição ao $MnCl_2$ menor (6 horas).

Os dados estão apresentados na Figura 10 revelaram um perfil diferenciado do constatado na Figura 9. Ambas as concentrações exerceram citoproteção na forma de tratamento prévio à exposição dos astrócitos a 500 µM de $MnCl_2$ por 6 horas. Não obstante, a concentração mais alta (1,0 µg/mL) apenas protegeu parcialmente no que tange a citotoxicidade, a viabilidade celular dos astrócitos que receberam 1,0 µg/mL de extrato de açaí + 500 µM de $MnCl_2$ foi significativamente diferente do controle ($p < 0,05$), dos astrócitos apenas tratados com 500 µM de $MnCl_2$ ($p < 0,05$) e ainda dos astrócitos que receberam 0,1 µg/mL de extrato de açaí + 500 µM de $MnCl_2$ ($p < 0,05$) (Figura 10).

Já a concentração de 0,1 µg/mL de extrato de açaí foi mais eficiente, pois sua citoproteção foi completa tornando a viabilidade celular indistinguivel do controle mesmo após a exposição das células a 500 µM de $MnCl_2$ por 6 horas (Figura 6).

Estes dados são interessantes pois indicam que o mecanismo de proteção do extrato de açaí contra a citotoxicidade do $MnCl_2$ envolve, 1) efeitos antioxidantes

diretos do extrato ou 2) processos adaptativos reforçando a proteção antioxidante intrínseca da célula.

A permanência dos efeitos citoprotetores do extrato de açaí mesmo após a retirada do mesmo do meio de cultura, demonstra que a provável quelação dos íons Mn^{2+} pelos compostos fenólicos do extrato e consequente diminuição da biodisponibilidade do Mn não explica os efeitos. Reiterando a possibilidade de efeitos antioxidantes diretos e desencadeamento de processos celulares adaptativos.

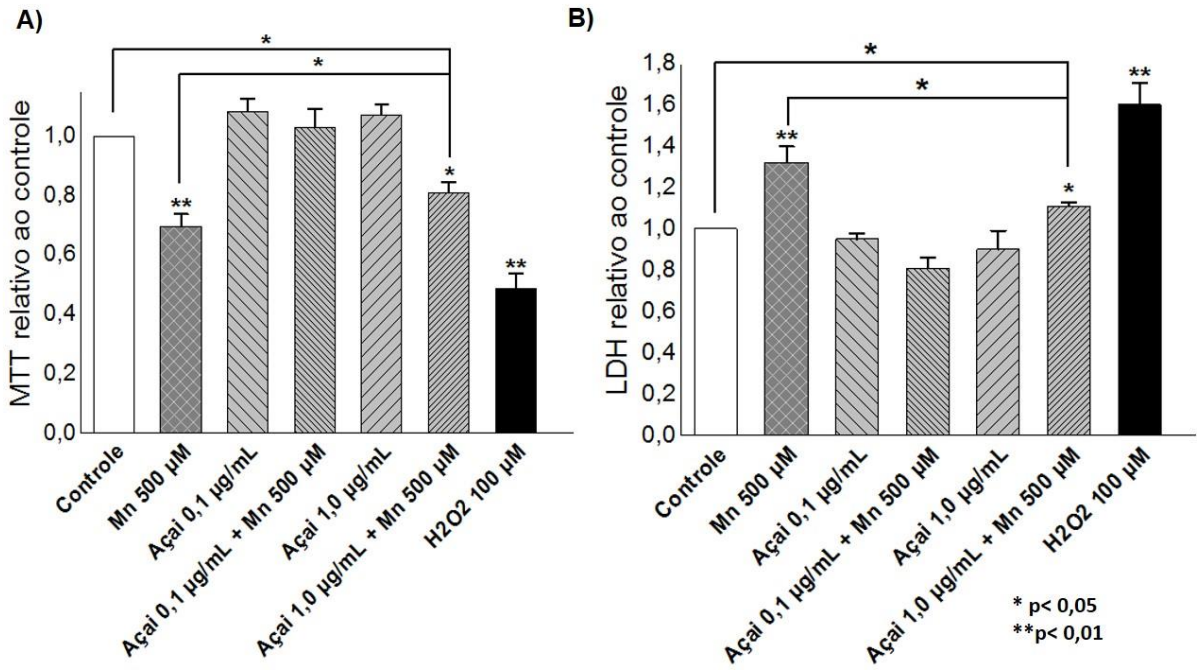


Figura 10. Efeito citoprotetor exercido pelo pré-tratamento dos astrócitos com extrato de açaí (18 horas) contra a citotoxicidade causada por 500 µM de $MnCl_2$ (6 horas) analisado por ensaio de MTT (A) e LDH (B). Ambas concentrações de extrato de açaí 0,1 µg/mL e 1,0 µg/mL revelaram proteção celular estatisticamente significante, com valor de p <0,01 e p <0,05, respectivamente. Valores estão expressos como média ± EPM de três experimentos independentes e normalizados em relação ao controle.

No que tange ao estado redox dos astrócitos, a concentração de 0,1 µg/mL foi considerada mais eficiente do que a concentração de 1,0 µg/mL de extrato de açaí na atenuação do estresse oxidativo induzido pelo excesso de $MnCl_2$, pois a concentração menor de extrato foi capaz de restaurar a razão GSH/GSSG (Figura

11). Entretanto, ambas as concentrações protegeram as membranas astrocitárias da lipoperoxidação causada pelo Mn, medida pela formação de F_2-IsoPs (Figura 12).

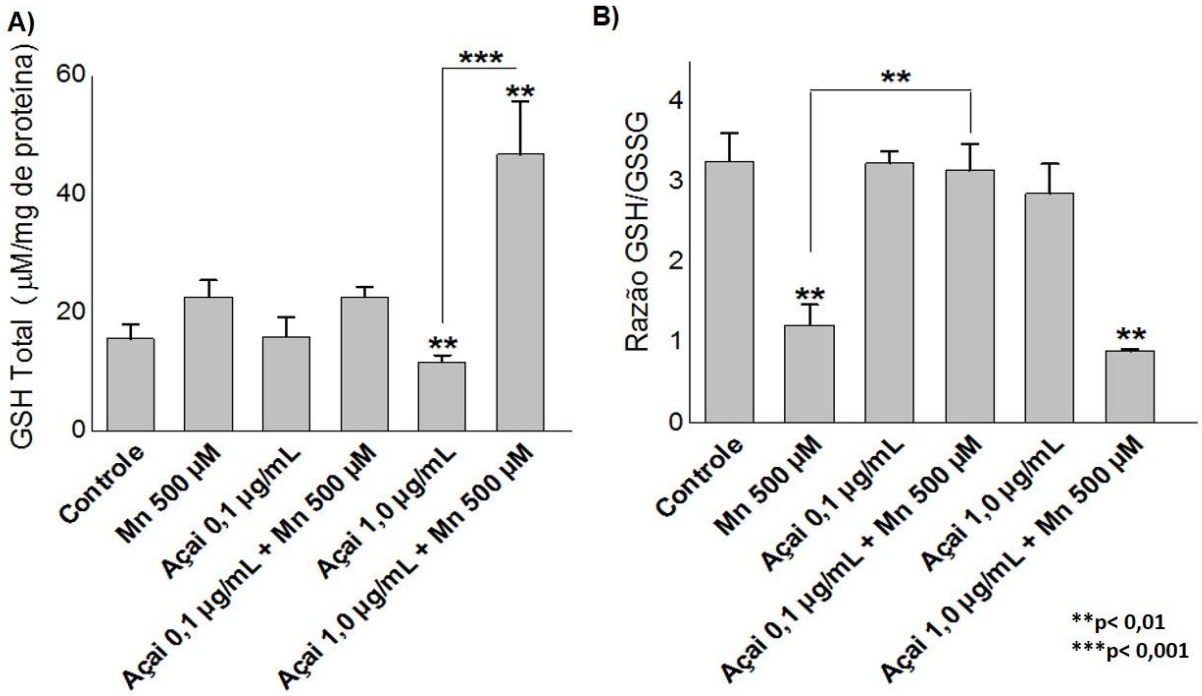


Figura 11. Efeitos do extrato de açaí na concentração de GSH total obtido pelo "método de reciclagem" (TIETZE, 1969; LEFFERS, et al., 2013) (A) e na Razão GSH/GSSG obtido pelo mesmo método(B). A Razão GSH/GSSG foi normalizada em relação ao controle. Valores estão expressos como média ± EPM de três experimentos independentes. Valores foram considerados estatisticamente diferentes a partir de valores de p <0,01.

Pela análise da Figura 11A, nota-se uma tendência de aumento da concentração de glutationa (p=0,083) nos astrócitos tratados com 500 µM de $MnCl_2$. Nestes mesmos astrócitos, na Figura 11B observa-se que a razão GSH/GSSG diminuiu significativamente (p<0,01), demonstrando que uma porção maior da GSH foi utilizada para manter o estado redox celular que pode ser indicativo de estresse oxidativo.

A menor concentração de extrato de açaí (0,1 µg/mL) não afetou a concentração de glutationa total (Figura 11A). Ainda, um efeito significativo de resgate (p<0,01) foi observado na razão GSH/GSSG nos astrócitos pré-tratados com 0,1 µg/mL de extrato de açaí e então expostos a 500 µM de $MnCl_2$. Este efeito de

resgate tornou a razão GSH/GSSG indistinguível do controle negativo, indicando um estado redox favorável mesmo após a exposição ao Mn (Figura 11B).

Por sua vez, os astrócitos pré-tratados com 1,0 µg/mL e não expostos a Mn, a concentração de glutationa diminuiu significativamente ($p<0,01$) (Figura 11A). Interessantemente, no grupo que foi exposto ao Mn após as 18 horas de pré-tratamento com extrato de açaí, a concentração de glutationa aumentou significativamente ($p<0,001$), apresentando concentração cerca de 3 vezes maior que o controle (Figura 11A). Entretanto, mesmo com o aumento da concentração de glutationa total, 1,0 µg/mL de extrato de açaí não conseguiu restaurar a razão GSH/GSSG, indicando estresse oxidativo ($p<0,01$) (Figura 11B).

Uma explicação plausível para tais efeitos seria de que o pré-tratamento com extrato de açaí seguido de exposição ao Mn tenha predisposto a célula aos efeitos pró-oxidantes do Mn, inclinando o balanço oxidativo da célula para o sentido prejudicial. Embora o efeito de exposição isolada ao Mn prevaleça em na razão GSH/GSSG (Figura 11B), quando os astrócitos são pré-tratados com 1,0 µg/mL de extrato de açaí, o teor de glutationa celular também aumenta de forma significativa, o que indica que, nestas condições, Mn e altas concentrações de açaí tem efeitos deletérios sinérgicos.

Assim, o aumento acentuado na concentração de glutationa em resposta ao tratamento com 500 µM de $MnCl_2$ ($p<0,001$) pode refletir uma tentativa da célula em restaurar seu estado redox prévio induzindo a síntese *de novo* do tripeptídeo.

Este aumento da concentração de glutationa total frente a um insulto celular inesperado já foi constatado em intoxicações por Hg, outro elemento neurotóxico, em que o aumento na atividade das enzimas e na concentração do tripeptídeo antioxidante glutationa poderia ser uma resposta compensatória indireta das células ao estresse oxidativo, como mecanismo de autoproteção (CHEN, et al., 2005).

No que tange a lipoperoxidação, verificada pelo biomarcador direto e específico F_2-IsoPs, o extrato de açaí foi capaz de reverter significativamente o dano causado pelo Mn com ambas concentrações ($p<0,001$) como demonstra a Figura 12. Ainda, nos astrócitos que foram apenas pré-tratados com 1,0 µg/mL de extrato de açaí e não foram expostos ao $MnCl_2$ uma tendência de diminuição na formação de F_2-IsoPs em comparação ao controle ($p= 0,056$) foi verificada.

Portanto, o extrato de açaí demonstrou proteger as membranas plasmáticas dos astrócitos mesmo que a concentração de 1,0 µg/mL de extrato de açaí não

tenha sido eficiente para manter o estado redox celular favorável, indicado pela razão GSH/GSSG diminuida como previamente discutido.

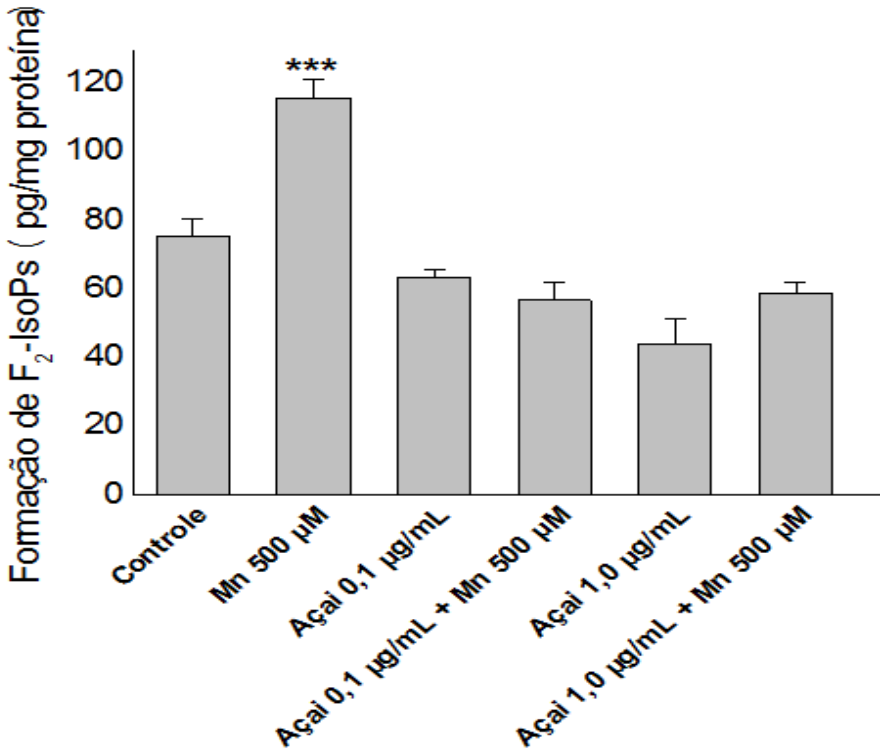


Figura 12. Efeito lipoprotetor do extrato de açaí frente a formação aumentada de F_2-IsoP causada pela exposição a 500 µM de Mn. Valores estão expressos como média ± EPM de dois experimentos independentes. Valores foram considerados estatisticamente diferentes a partir de valores de p <0,001.

Alguns mecanismos de lipoperoxidação em sistemas biológicos na presença de metais de transição (tais como o Mn) foram descritos (HOCHSTEIN; ERNSTER, 1963; URSINI, et al., 1989; MAIORINO, et al., 1989). Dentre eles, o mais provável mecanismo de iniciação deste evento é a decomposição de um lipídio hidroperóxido na presença de um metal de transição na sua forma reduzida, formando um alcóxi-radical que é extremamente efetivo na extração de átomos de hidrogênio de ácidos graxos poliinsaturados (MAIORINO, et al., 1989), formando assim os F_2-IsoPs, dentre outros radicais. A partir daí, a lipoperoxidação continua em reações em cadeia e não difere de outros processos de lipoperoxidação que tenham sido iniciados por outros mecanimos envolvendo outras substâncias.

Assim a liperoxidação é um evento cíclico, mas pode ser cessado por alguns compostos descritos. Dentre os mais eficientes estão os compostos fenólicos que podem agir sequestrando os radicais lipídicos, tais como os F_2-IsoPs originados da oxidação do ácido aracdônico, que são responsáveis por esta propagação em cadeia. O que explicaria um efeito protetor direto do extrato de açaí, sequestrando estes radicais que tem sua formação aumentada na presença de Mn em excesso.

Concluindo o raciciocínio, os experimentos indicam que o extrato de açaí teve um efeito direto na diminuição das espécies reativas que são formadas a partir das membranas lipídicas, que está elencado entre os maiores danos causados pelo estresse oxidativo.

Para os astrócitos pré-tratados com 1,0 µg/mL de extrato de açaí, mesmo sendo verificado proteção a nível de membranas celulares, as alterações na concentração de glutationa total (Figura 11A) e a diminuição da razão GSH/GSSG para o grupo pré-tratado com 1,0 µg/mL de extrato de açaí seguido de exposição ao Mn (Figura 11B), indicam a presença de um estresse oxidativo. Estes dados podem indicar que a formação patológica de EROS desencadeada pelo Mn sejam de origem mitocondrial e de outras fontes, mas não formadas a partir de lipoperoxidação.

4.5. Efeito do pré-tratamento do extrato de açaí no estado funcional dos astrócitos expostos a 500 µM de $MnCl_2$

Conforme expõe a Figura 13, seis horas de tratamento com 500 µM de $MnCl_2$ inibe significativamente a capacidade dos astrócitos em remover o glutamato do meio extracelular ($p= 0,0019$). O pré-tratamento com 0,1 µg/mL de extrato de açaí seguido de tratamento com 500 µM de $MnCl_2$ foi capaz de restaurar a captação do glutamato para níveis indistinguíveis do controle.

Já para os astrócitos pré-tratados com 1,0 µg/mL de extrato de açaí seguido de tratamento com 500 µM de $MnCl_2$, a captação de glutamato se mostrou tão inibida quanto para os astrócitos que não tiveram o pré-tratamento com extrato de açaí (Figura 13).

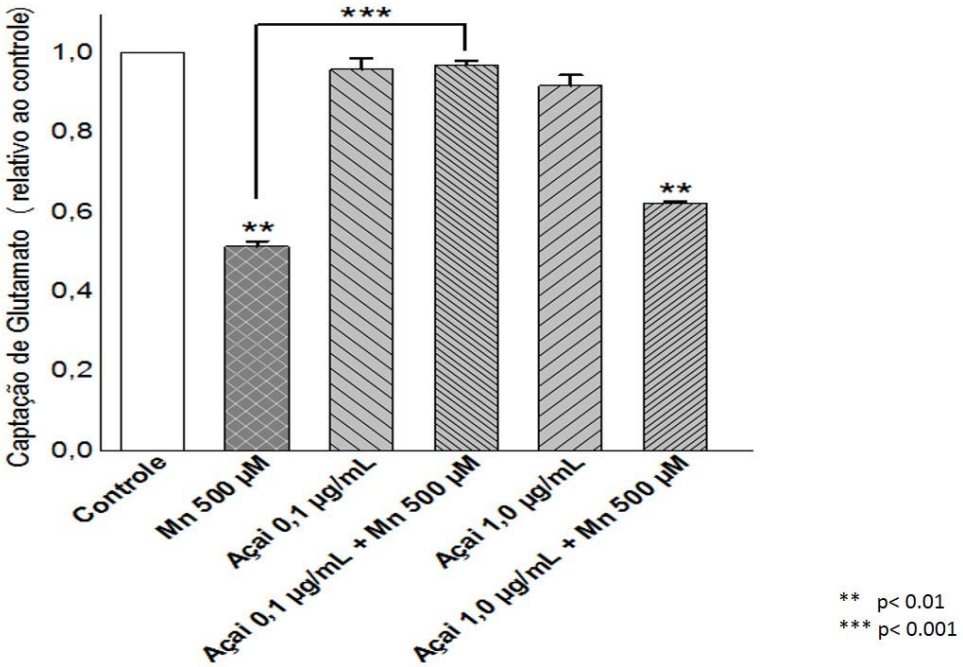


Figura 13. Efeito na captação de glutamato por astrócitos expostos a 500 µM de Mn pré tratados com extrato de açaí. Os dados foram normalizados em relação ao controle. Valores estão expressos como média ± EPM de três experimentos independentes. Valores foram considerados estatisticamente diferentes a partir de valores de p <0,01.

TROTTI e colaboradores (1997) descreveram que a captação de glutamato pelos astrócitos é regulada pelo estado redox de grupamentos sulfidrilas reativos presentes nos transportadores de glutamato e que são influenciados pelo balanço entre espécies GSH e GSSG e que mudanças no equilíbrio redox produzem efeitos moduladores transientes ou permanentes no transporte do glutamato. Modificações persistentes nos transportadores de glutamato foram relacionadas a patologias cerebrais como, esclerose amiotrófica lateral, traumas, doença de Alzheimer, entre outras (LI, et al., 1996; ROTHSTEIN, et al., 1992; SILVERSTEIN, et al., 1986)

Relacionando os dados de estado redox dos astrócitos com a captação de glutamato que reflete o estado funcional dos astrócitos, podemos dizer que a concentração de 1,0 µg/mL de extrato de açaí em si não é prejudicial, mas quando há uma posterior exposição a um agente oxidante, no caso o $MnCl_2$, o estado funcional do astrócito é alterado.

Discutindo especificamente os tratamentos com 1,0 µg/mL de extrato de açaí e tratamento com 500 µM de $MnCl_2$, podemos ver que mesmo com uma menor

lipoperoxidação a função mitocondrial está prejudicada, verificado pelo ensaio de MTT (Figura 10). Assim, a captação de glutamato pode estar sendo inibida pela formação de EROS proveniente de desacoplamento mitocondrial, mesmo não havendo quantidade elevada de espécies reativas oriundas de lipoperoxidação.

Ainda, uma hipótese que pode ser lançada é de que como a captação de glutamato é um processo de elevado gasto energético e o primeiro processo a se alterar em condições desfavoráveis (SIBSON, et al., 1998), o esforço celular para recompor o estado redox com a necessidade de um grande aumento na síntese de glutationa precisou mobilizar a reserva energética celular afetando assim a captação de glutamato. Uma vez que, a captação de glutamato pode ser inibida em estados de privação energética (ERIKSON; ASCHNER, 2003).

4.6. Efeito modulador da concentração de Nrf2 do extrato de açaí

O fator de transcrição Nrf2, responsável pela adaptação celular frente ao estresse oxidativo foi quantificada nos astrócitos tratados.

Como mostra a Figura 14, o tratamento com 500 µM de $MnCl_2$ por 6 horas aumentou significativamente a concentração de Nrf2 nos astrócitos ($p< 0,05$) corroborando com LEE e colaboradores (2012). Astrócitos apenas pré-tratados com 0,1 µg/mL de extrato de açaí apresentaram uma redução na concentração de Nrf2 ($p< 0,05$) comparado ao controle. Já nos astrócitos que receberam o pré-tratamento com 0,1 µg/mL de extrato de açaí seguido de exposição ao Mn, tiveram a expressão de Nrf2 ainda mais reduzida ($p< 0,01$).

Com relação ao pré-tratamento com a concentração maior do extrato de açaí (1,0 µg/mL) não houve alteração na proteína Nrf2 em comparação com o controle. Entretanto, após a exposição a 500 µM de $MnCl_2$, a concentração de Nrf2 se elevou de forma semelhante a dos astrócitos que foram expostos ao Mn, mas sem o pré-tratamento com o extrato de açaí.

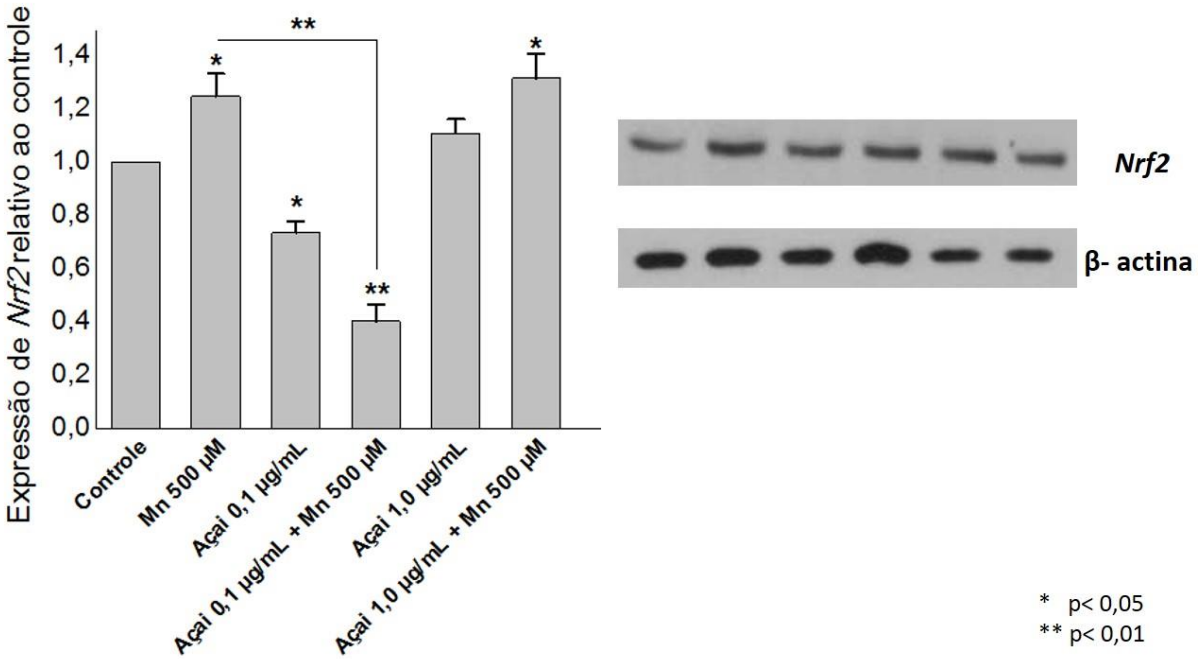


Figura 14. Efeito do pré-tratamento com extrato de açaí no acúmulo de Nrf2 induzido por Mn. Quantidades iguais de proteína (30 µg) de cada amostra foram analisadas por SDS-PAGE e immunoblot com anticorpo policlonal anti-Nrf2. Quantificação densitrométrica de Nrf2. Razão entre o valor de densidade da expressão de Nrf2 e o valor de densidade para a expressão de β-actina. Valores estão expressos como média ± EPM de três experimentos independentes. Valores foram considerados estatisticamente diferentes a partir de valores de p <0,05.

Estes dados corroboram com ROJO e colaboradores (2012) em seus estudos mecanísticos sobre a ativação da cascata Nrf2 utilizando um outro polifenol extraido da planta medicinal *Larrea tridentata* em que também tem sido descrita uma atividade antioxidante bifuncional, ou seja, possui tanto atividade antioxidante direta quanto pela indução da expressão de genes antioxidantes (DINKOVA-KOSTOVA; TALALAY, 2008). ROJO e colaboradores (2012) observaram um efeito bifásico do polifenol na ativação do Nrf2 de células renais, com uma ligeira diminuição nos níveis de Nrf2 nas 3 primeiras horas de tratamento seguidas de um acentuado aumento na expressão de Nrf2 após 6 horas de exposição. E sugeriram que, tais efeitos sobre Nrf2 causados pelo polifenol, são Keap1 independentes.

Assim os experimentos indicam que, de fato o pré-tratamento dos astrócitos com extrato de açaí pode desencadear processos adaptativos celulares tanto para o grupo que não recebeu o $MnCl_2$ quanto para as células que receberam.

4.7. Efeito antioxidante direto do extrato de açaí foi mais significativo na atenuação do estresse oxidativo do que a modificação celular adaptativa

A concentração de 0,1 µg/mL de extrato de açaí foi capaz de proteger todos os parâmetros celulares analisados da intoxicação com Mn. Podendo indicar que seu efeito antioxidante direto possa ter mais efetividade na proteção contra danos oxidativos do que a indução de mudanças adaptativas, atuando como um adjuvante exógeno da proteção antioxidante celular.

O efeito antioxidante direto do extrato de açaí contra o estresse oxidativo induzido por Mn pode ser fundamentado pela literatura. O mecanismo indutor do estresse oxidativo causado pelo Mn parece estar diretamente relacionado ao aumento da concentração do radical superóxido ($O_2^{\cdot -}$), pois sua produção exacerbada pela mitocondria pode oxidar M^{2+} para Mn^{3+}, (GUNTER, et al., 2006) que por sua vez, reage com H_2O_2 gerando o letal $OH^{\cdot}$ ou reagir com $NO^{\cdot}$ para gerar o deletério peroxinitrito (TURRENS, 2003). Neste ponto, SCHAUSS e colaboradores (2006) descreveram que o açaí possui uma inigualável capacidade de detoxificar anions superóxido de forma análoga a enzima SOD, mas com mecanismo ainda não compreendido. Assim, se o extrato de açaí for capaz de diretamente detoxificar o anion superoxido, a cascata de efeitos oxidativos é cessada já no seu radical precursor.

É reportado que polifenóis podem proteger as células neurais de danos pró-oxidante através de diversos mecanismos, incluindo a diminuição da excitotoxicidade do glutamato e geração de EROS, assim como através da modulação de influxo de Ca^{2+} para o meio intracelular (ISHIGE, et al., 2001). Em relação ao caso específico do açaí como um antioxidante, SCHAUSS e colaboradores (2006b) mostraram a sua alta capacidade de sequestrar o radical superóxido proporcionadas pelo seu elevado teor de polifenóis e mistura complexa de compostos fenólicos .

O pré-tratamento dos astrócitos com açaí, além de demonstrar uma atenuação do estresse oxidativo induzido por 500 µM de $MnCl_2$ com a concentração de 0,1 µg/mL, trouxe importantes informações sobre o mecanismo de neurotoxicidade do Mn.

A diminuição da viabilidade celular e integridade de membrana dos astrócitos, não foi associada à lipoperoxidação. Possivelmente, o Mn em concentrações neurotóxicas, origina um ambiente pró-oxidante que oxida os transportadores de glutamato, que foi reportado não ter relação com a lipoperoxidação por VOLTERRA e colaboradores (1994).

Esta hipótese é corroborada com as informações obtidas com a concentração maior de extrato de açaí em que houve uma proteção parcial contra o dano das membranas plasmáticas (liberação de LDH para o meio de cultura) e proteção total contra a formação patológica de F_2-IsoPs, entretanto quase não foram observados efeitos protetores na captação de glutamato.

No que tange modificações adaptativas contra o estresse oxidativo, a maior parte é regulada pelo fator de transcrição Nrf2 quando este tem sua concentração e translocação nuclear aumentadas. Para os astrócitos pré-tratados com 0,1 µg/mL de extrato de açaí o estresse oxidativo e alteração funcional induzidos pelo Mn foram atenuados, entretanto a concentração de Nrf2 para este grupo não se alterou significativamente. Evidenciando, mais uma vez que o efeito antioxidante direto e independente de Nrf2 possa estar prevalecendo nos efeitos protetores do açaí.

Já com a maior concentração de açaí o pre-tratamento foi incapaz de reverter o estresse oxidativo e estado funcional prejudicado pelo Mn.

A grosso modo, já entende-se que os antioxidantes exógenos, como os compostos fenólicos que mamíferos são incapazes de sintetizar e exclusivamente adquiridos pela dieta, são necessários para a manutenção do balanço oxidativo celular, principalmente na presença de oxidantes (GALATI; O'BRIEN, 2004; MARTIN; BARRETT, 2002). No entanto, estes contrapontos entre atividade antioxidante direta e indução de respostas adaptativas, demonstra que muito há o que se estudar sobre os efeitos dos antioxidantes da dieta a nível celular.

Em síntese, nossos experimentos demonstram que, no que tange aos fenólicos do açaí a nível de SNC, é ideal ter moderadas concentrações, ou seja, enquanto baixas concentrações proveêm reforço antioxidantes, elevadas concentrações podem apresentar efeitos pró-oxidantes sinérgicos com alguns

toxicantes. O que contribui para a literatura existente demonstrando que a ingestão de antioxidantes pode ser uma “faca de dois gumes” no estado redox celular como foi revisado por BOUAYED e BOHN (2010).

5. Considerações parciais do capítulo 2

No que tange ao extrato de açaí:

- O método de extração empregado para obter um extrato de açaí rico em antocianinas foi mais eficiente do que o previamente publicado por outros autores, apresentando maior capacidade antioxidante direta, medida pela habilidade de sequestrar radicais DPPH.

- O pré-tratamento com 0,1 µg/mL do extrato de açaí foi efetivo na prevenção da neurotoxicidade induzida por Mn.

- O pré-tratamento com 1,0 µg/mL do extrato de açaí apesar de seguro para os astrócitos quando administrado isoladamente, quando administrado imediatamente antes da exposição ao Mn predispos as células aos efeitos deletérios do Mn.

No que tange aos mecanismos de indução de neurotoxicidade do Mn em astrócitos:

- A alteração do estado funcional dos astrócitos induzido pelo Mn não é consequência da lipoperoxidação.

6. Perspectivas futuras do Capítulo 2

Mesmo que o efeito protetor do extrato de açaí esteja aparentemente relacionado aos efeitos antioxidantes diretos. As modificações na concentração de Nrf2 merecem estudos mais aprofundados.

Experimentos adicionais envolvendo outros fatores de transcrição responsáveis por cascatas de sinalização celular, como as que envolvem a inflamação e resposta imune (NF-κB, TNFα e citocinas), também são importantes, uma vez que a regulação do Nrf2 é influenciada por sinalizações cruzadas destes fatores e de outros.

Tendo em vista, a evidencia de que uma concentração ótima de extrato de açaí auxilia na maximização de seus efeitos neuroprotetores, experimentos com outras concentrações no intervalo entre 0,01 a 1,0 µg/mL deste extrato, e com tempos diferentes de exposição das células auxiliariam a traçar o seu potencial terapêutico.

Já no que tange a conexão entre Capítulo 1 e Capítulo 2, experimentos semelhantes aos realizados no Capítulo 2 com a fração rica em Mn obtida no Capítulo 1 na etapa de fracionamento podem trazer informações conclusivas sobre a segurança alimentar das polpas de açaí em relação a exposição ao Mn.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A terapia nutricional cresce a cada dia como uma importante estratégia na prevenção e tratamento de diversas doenças contribuindo para o bem-estar das pessoas e promoção de qualidade de vida. A mídia insiste em incentivar que, quanto maior a quantidade de antioxidantes na alimentação diária, melhor. Isso que cria uma corrida extraordinária da população na procura das dietas “detox” e a incorporação de alimentos exóticos na alimentação diária sem o acompanhamento de profissionais especializados.

Esta tese demonstrou e discutiu que mesmo com as infinitas possibilidades terapêuticas da fruta exótica e popular açaí, este fruto também possui potenciais riscos que devem ser aprofundadamente estudados com relação ao Mn, não é uma fonte apreciável de Fe como já foi dito anteriormente na mídia, e que a exposição exacerbada ao açaí, como por exemplo, pelo consumo frequente em grandes porções, pode inclusive aumentar a susceptibilidade de um estresse oxidativo celular, quer seja pela extraordinária concentração de compostos fenólicos presentes no fruto, quer seja pela elevada concentração de elementos químicos, em especial Mn, naturalmente presentes no fruto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGAWA, S. et al. Anthocyanins in mesocarp/epicarp and endocarp of fresh acai (Euterpe oleracea Mart.) and their antioxidant activities and bioavailability. **Food Science and Technology Research**, Oxford, v. 17, p. 327-334, 2011.

ALAVA, P. et al. Arsenic undergoes significant speciation changes upon incubation of contaminated rice with human colon micro biota. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, *in press*, 2013.

ALBERTI, G. et al. Speciation of Mn(II), Zn(II), and Cu(II) in tea infusion. Livro de Resumos do **XVIII National Congress of Analytical Chemistry**, 19-23 de Setembro, Parma, Itália, 2004.

ALEXANDRE, D.; CUNHA, R.L.; HUBINGER, M.D. Conservação do açaí pela tecnologia de obstáculos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 24, n. 1, p. 114-119, 2004.

AMES, B.N. et al. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. **Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 90, p. 7915-7922, 1993.

AMMERMAN, C.B. et al. **Bioavailability of Nutrients for Animals**. Academic Press, Nova Iorque, p. 441, 1995.

ANDERSON, M.F. et al. Astrocytes and stroke: networking for survival? **Neurochemical Research**, Nova Iorque, v. 28, p. 293-305, 2003.

AOYAMA, K. et al. Regulation of neuronal glutathione synthesis. **Journal of Pharmacological Sciences**, Tókio, v. 108, p. 227-238, 2008.

ARCHIBALD, F.S.; TYREE, C. Manganese poisoning and the attack of trivalent manganese upon catecholamines. **Arquives of Biochemistry and Biophysics**, Nova Iorque, v. 256, p. 638-650, 1987.

ASCHNER, M. Manganese neurotoxicity and oxidative damage. *In:* CONNOR, J.R. (Ed.). **Metals and Oxidative Damage**, **Neurological Disorders**. Nova Iorque, Plenum Press, p. 77-93, 1997.

ASCHNER, M. et al. Manganese uptake and efflux in cultured rat astrocytes. **Journal of Neurochemistry**, Oxford, v. 58, p. 730-735, 1992.

ASCHNER, J.L.; ASCHNER, M. Nutritional aspects of manganese homeostasis. **Molecular Aspects of Medicine**, Elmsford, v. 26, p. 353-362, 2005.

BAK, L.K. et al. The glutamate/GABA-glutamine cycle: aspects of transport, neurotransmitter homeostasis and ammonia transfer. **Journal of Neurochemistry**, Oxford, v. 98, p. 641-653, 2006.

BARBEAU, A. Manganese and extrapyramidal isorders (a critical review and tribute to Dr. George C. Cotzias). **Neurotoxicology**, Little Rock, v. 5, n. 1, p. 13-35, 1984.

BARRETO, G.E. et al. Astrocytic-neuronal crosstalk: implications for neuroprotection from brain injury. **Neuroscience Research**, Shannon, v. 71, p. 107-113, 2011.

BAUR, J.A.; SINCLAIR, D.A. Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. **Nature Reviews on Drug Discovery**, Londres, v. 5, p. 493-506, 2006.

BELANGER, M. et al. Brain energy metabolism: focus on astrocyte-neuron metabolic cooperation. **Cell Metabolism**, Oxford, v. 14, p. 724-738, 2011.

BELANGER, M.; MAGISTRETTI, P.J. The role of astroglia in neuroprotection. **Dialogues on Clinical Neurosciences**, Nova Iorque, v. 11, p. 281-295, 2009.

BENEDETTO, A. et al. Extracellular dopamine potentiates Mn-induced oxidative stress, lifespan reduction, and dopaminergic neurodegeneration in a BLI-3-dependent manner in *Caenorhabditis elegans*. **PLoS Genetic**, Stanford, v. 6, p. 34-39, 2010.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Instrução nº 1 de 1 de Janeiro de 2000. Aprova a regulação técnica e padrões gerais de identidade e qualidade para polpas de frutas. **Diário Oficial da União**, Brasília, n. 1, p. 54-58, 2000.

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

BOUAYED, A.B.; BOHN, T. Exogenous antioxidants – Double-edged swords in cellular redox state. **Oxidative medicine and cellular longetivity**, Oxford, v. 3, n. 4, p. 228-237, 2010.

BOWMAN, A.B. et al. Role of manganese in neurodegenerative diseases. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology,** Stuttgard, v. 25, p. 191-203, 2011.

BRITTON, A.A; COTZIAS, G.C. Dependence of manganese turnover on intake. **American Journal of Physiology**, Baltimore, v. 211, p. 203-206, 1966.

BROUILLET, E.P. et al. Manganese injection into the rat striatum produces excitotoxic lesions by impairing energy metabolism. **Experimental Neurology**, San Diego, v. 120, p. 89-94, 1993.

BRUNE, et al. Iron absorption and phenolic compounds: importance of different phenolic structures. **European Journal of Clinical Nutrition**, Londres, v. 43, n. 8, p. 547-557, 1989.

BUTTERFIELD, D. et al. Nutritional approaches to combat oxidative stress in Alzheimer's disease. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, Stoneham, v. 13, p. 444-461, 2002.

CAIRNS, W.R.L. et al. Directly coupled high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma-mass spectrometry for the determination of organometallic species in tea. **Microchemical Journal**, Nova Iorque, v. 54, p. 88-110, 1996.

CASALINO, E. et al. The Nrf2 transcription factor contributes to the induction of alpha-class GST isoenzymes in liver of acute cadmium or manganese intoxicated rats: Comparison with the toxic effect on NAD(P)H: quinone reductase. **Toxicology**, Little Rock, v. 237, p. 24-34, 2007.

CASARETT & DOULL'S. **Toxicology: the basic science of poisons.** 8th Ed. Curtis D. Klaassen, Editor. New York, McGraw-Hill Companies, 2013.

CASGRAIN, A. et al. Micronutrient bioavailability research priorities. **American Journal of Clinical Nutrition**, Nova Iorque, v. 91, p. 1S-9S, 2010.

CHAKRABORTY, S.; ASCHNER, M. Altered manganese homeostasis: Implications for BLI-3-dependent dopaminergic neurodegeneration and SKN-1 protection in C. elegans. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology,** Stuttgart, v. 26, p. 183-187, 2012.

CHEN, C. et al. Increased oxidative DNA damage, as assessed by urinary 8-hydroxy-2-deoxyguanosine concentrations and serum redox status in persons exposed to mercury. **Clinical Chemistry**, Baltimore, v. 51, p. 759-767, 2005.

CHEN, M.K. et al. Acute manganese administration alters dopamine transporter levels in non-human primate striatum. **Neurotoxicology**, Little Rock, v. 27, p. 229-236, 2006.

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

CHISONGA, et al. Nature and origin of the protolith succession to the Paleoproterozoic Serra do Navio manganese deposit, Amapa Province, Brazil. **Ore Geology Reviews**, Amsterdam, v. 47, p. 59-76, 2012.

CHO, H.Y. et al. Gene expression profiling of Nrf2-mediated protection against oxidative injury. **Free Radical Biology and Medicine,** Nova Iorque, v. 38, p. 325-343, 2005.

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

CLARKSON, T.W.; MAGOS, L. The toxicology of mercury and its chemical compounds. **Critical Reviews in Toxicology**, Boca Raton, v. 36, p. 609-662, 2006.

CLEMENTS, C.M. et al. DJ-1, a cancer- and Parkinson's disease-associated protein, stabilizes the antioxidant transcriptional master regulator Nrf2. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 103, p. 15091-15096, 2006.

CLYDESDALE, F.M. et al. The effects of postharvest treatment and chemical interactions on the bioavailability of ascorbic acid, thiamin, vitamin A, carotenoids, and minerals. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 30, p. 599-638, 1991.

CÓRDOVA-FRAGA, T. et al*. Euterpe oleracea* (Açaí) as an alternative oral contrast agent in MRI of the gastrointestinal system: preliminary results. **Magnetic Resonance Imaging**, Nova Iorque, v. 22, p. 389-393, 2004.

CRAIG, W.J. Phytochemicals: guardians of our health. **Journal of American Dietetic Association**, Chicago, v. 97, p. S199-S204, 1997.

DARNET, S. et al. A high-performance liquid chromatography method to measure tocopherols in assai pulp (Euterpe oleracea). **Food Research International**, Barking, v.44, p. 2107-2111, 2011.

DAVIS, C.D. et al. Manganese metabolism in rats: an improved methodology for assessing gut endogenous losses. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, Nova Iorque, v. 202, n. 1, p. 103-108, 1993.

DEL POZO-INSFRAN, D.; BRENES, C.H.; TALCOTT, S.T. Phytochemical composition and pigment stability of açaí (Euterpe oleracea Mart.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.52, p.1539-1545, 2004.

DERODA, G., et al. Regulation of superoxide dismutase activity by dietary manganese. **Journal of Nutrition,** Philadelphia, v. 110, p. 795-804, 1980.

DEWEERDT, S. Food the omnivore's labyrinth. **Nature**, Londres, v. 471, p. S22-S24, 2011.

DINKOVA-KOSTOVA, A.T. et al. Direct evidence that sulfhydryl groups of Keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against

carcinogens and oxidants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States**, Washington, v. 99, p. 11908-11913, 2002.

DINKOVA-KOSTOVA, A.T. The role of Keap1 in cellular protective responses. **Chemical Research in Toxicology,** Washington, v. 18, p. 1779-1791, 2005.

DINKOVA-KOSTOVA, A.T.; TALALAY, P. Direct and indirect antioxidant properties of inducers of cytoprotective proteins. **Molecular Nutrition and Food Research**, Weinheim, v. 52, n. S1, p. S128-S138, 2008.

DOBSON, A.W. et al. Manganese neurotoxicity. **Annals of the New York Academy of Sciences**, Nova Iorque, v. 1012, p. 115-128, 2004.

DONALDSON, J. et al. Enhanced autoxidation of dopamine as a possible basis of manganese neurotoxicity. **Neurotoxicology**, Little Rock, v. 2, p. 53-64, 1980.

DORMAN, D.C. et al. Brain manganese concentrations in rats following manganese tetroxide inhalation are unaffected by dietary manganese intake. **Neurotoxicoloy**, Little Rock, v. 23, n. 2, p. 185-195, 2002.

DRINGER, R. et al. Syntesis of the antioxidant glutathione in neurons: supply by astrocytes of CysGly as precursos for neuronal glutathione. **Journal of Neuroscience**, Baltimore, v. 19, p. 562-569, 1999.

DRINGER, R. et al. Glutathione metabolism in brain metabolic interaction between astrocytes and neurons in the defense against reactive oxygen species. **European Journal of Biochemistry,** Berlim, v. 267, p. 4912-4916, 2000.

EMBRAPA INFORMÁTICA AGROPECUÁRIA – Sistemas de Produção – AÇAÍ. Disponível em http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/acai, acesso em 10 de junho de 2012, 2006.

EMKEY, R.D.; EMKEY, G.R. Calcium metabolism and correcting calcium deficiences. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, Philadelphia, *in press*, 2013.

ERECINSKA, M.; SILVER, I.A. Metabolism and role of glutamate in mammalian brain. **Progress in Neurobiology**, Oxford, v. 35, p. 245-296, 1990.

ERIKSON, K. et al. Glutamate/aspartate transporter (GLAST), taurine transporter and metallothionein mRNA levels are differentially altered in astrocytes exposed to manganese chloride, manganese phosphate or manganese sulfate. **Neurotoxicology**, Little Rock, v. 23, p. 281-288, 2002.

ERIKSON, K.; ASCHNER, M. Manganese causes differential regulation of glutamate transporter (GLAST) taurine transporter and metallothionein in cultured rat astrocytes. **Neurotoxicology**, Little Rock, v. 23, p. 595-602, 2002.

ERIKSON, K.; ASCHNER, M. Manganese neurotoxicity and glutamate-GABA interaction. **Neurochemistry International**, Nova Iorque, v. 43, p. 475-480, 2003.

ERLANK, H. et al. Polyphenols activate Nrf2 in astrocytes via H_2O_2, semiquinones, and quinones. **Free Radical Biology and Medicine**, Nova Iorque, v. 51, p. 2319-2327, 2011.

ESCARTIN, C. et al. Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 facilitates neuronal glutathione synthesis by upregulating neuronal excitatory amino acid transporter 3 expression. **Journal of Neuroscience**, Baltimore, v. 31, p. 7392-7401, 2011.

FAIRWEATHER-TAIT, S.J. Bioavailability of minerals and trace elements. **Food Chemistry**, Londres, v. 43, p. 213-217, 1992.

FAIRWEATHER-TAIT, S.J. Bioavailability of minerals and trace elements. **Nutritional Research Reviews**, Londres, v. 9, p. 295-324, 1996.

FAIRWEATHER-TAIT, S.J.; COLLINGS, R. Estimating the bioavailability factors needed for setting dietary reference values. **International Journal for Vitamins and Nutrition Research**, Amsterdam, v. 80, n. 4-5, p. 249-256, 2010.

FDA, Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition (2010). **Total diet study statistics on element results**, College Park.

FERNANDEZ-CHECA, J. et al. GSH transport in mitochondria: defense against TNF-induced oxidative stress and alcohol-induced defect. **American Journal of Physiology,** Baltimore, v. 273, p. G7-G17, 1997.

FIEAM. **Informações gerais sobre o açaí**. Federação das Industrias do Estado do Amazonas, 2013.

FINKELSTEIN, Y. et al. Modulation of cholinergic systems by manganese. **Neurotoxicology**, Little Rock, v. 28, p. 1003-1014, 2007.

FINLEY, J.W. Manganese absorption and retention by young women is associated with serum ferritin concentration. **American Journal of Clinical Nutrition**, Nova Iorque, v. 70, p. 37-43, 1999.

FITSANAKIS, V.A. et al. Manganese (Mn) and Iron (Fe): Interdependency of transport and regulation. **Neurotoxicology Research**, Oxford, v. 18, p. 124-131, 2010.

FLATEN, T.P. Aluminium in tea – concentrations, speciation and bioavailability. **Coordination Chemistry Reviews**, Amsterdam, v. 228, p. 385-395, 2002.

FORMAN, H.J. How do nutritional antioxidants really work: Nucleophilic tone and para-hormesis versus free radical scavenging *in vivo*. **Free Radical Biology and Medicine**, Nova Iorque, *in press*, 2013.

GALATI, G.; O'BRIEN, P. Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: significance for their chemopreventive and anticancer properties. **Free Radical Biology and Medicine**, Nova Iorque, v. 37, n. 3, p. 287-303, 2004.

GARCIA-RUIZ, C.; FERNANDEZ-CHECA, J.C. Mitochondrial glutathione: hepatocellular survival-death switch. **Journal of Gastroenterology and Hepatology,** Carlton, v. 21, p. S3-S6, 2006.

GAVIN, C.E. et al. Mn 2+ sequestration by mitochondria and inhibition of oxidative phosphorylation. **Toxicology and Applied Pharmacology**, Oxford, v. 115, p. 1-5, 1992.

GILLESSEN, T. et al. Excitatory amino acid neurotoxicity. **Advances in Experimental Medicine and Biology,** Nova Iorque, v. 513, p. 3-40, 2002.

GIUSTI, M.M. et al. Electrospray and tandem mass spectrometry as tools for anthocyanins characterization. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 47, p. 4657-4664, 1999.

GIUSTI, M.M.; WROSLTAD, R.E. Anthocyanins: characterization and measurement with UV-visible spectroscopy. In: WROSLTAD, R.E. **Current protocols in food analytical chemistry**. Nova Iorque, John Wiley & Sons, 2001.

GOCHFELD, M. Cases of mercury exposure, bioavailability, and absorption. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Nova Iorque, v. 56, p. 174-179, 2003.

GREGER, J.L. Dietary standards for manganese: Overlap between nutritional and toxicological studies. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 128, n. 2, p. 368S-371S, 1998.

GREVE, M.W.; ZINK, B.J. Pathophysiology of traumatic brain injury. **Mount Sinai Journal of Medicine**, Nova Iorque, v. 76, p. 97-104, 2009.

GROTTO, D. et al. Low levels of methylmercury induce DNA damage in rats: protective effects of selenium. **Archives of Toxicology**, Nova Iorque, v. 83, p. 249-254, 2009.

GUNTER, T.E. et al. Speciation of manganese in cells and mitochondria: A search for the proximal cause of manganese neurotoxicity. **Neurotoxicity,** Little Rock, v. 27, p. 767-776, 2006.

GUPTE, A.A. et al. Nuclear Factor (Erythroid-Derived 2)-like-2 Factor (Nrf2), a key regulator of the antioxidant response to protect against atherosclerosis and

nonalcoholic steatohepatitis. **Current Diabetes Reports**, São Paulo, v. 13, p. 362-371, 2013.

HAMAI, D.; BONDY, S.C. Oxidative basis of manganese neurotoxicity. **Annals of the New York Academy of Sciences**, Nova Iorque, v. 87, p. 448-460, 2010.

HAMBY, M.E.; SOFRONIEW, M.V. Reactive astrocytes as therapeutic targets for CNS disorders. **Journal of Neurochemistry**, Oxford, v. 87, p. 448-460, 2010.

HARLAND, B.F. Dietary fibre and mineral bioavailability. **Nutrition Research Reviews**, Cambridge, v. 2, p. 133-147, 1989.

HARVEY, L.J. et al. Methods of assessment of copper status in humans: a systematic review. **American Journal of Clinical Nutrition**, Nova Iorque, v. 89, n. 6S, p. 2009S-2024S, 2009.

HE, J.; GIUSTI, M.M. High-purity isolation of anthocyanins mixtures from fruits and vegetables – A novel solid-phase extraction method using mixed mode cation-exchange chromatography. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1218, p. 7914-7922, 2011.

HERYNEK, V. et al. Chronic liver disease: Relaxometry in the brain after liver transplantation. **Magma**, São Paulo, v. 12, n. 1, p. 10-15, 2001.

HOCHSTEIN, P.; ERNSTER, L. ADP-activated lipid peroxidation coupled to the TPNH oxidase system of microsomes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Orlando, v.12, p. 388-394, 1963.

HOGAN, S. et al. Antiproliferative and antioxidant properties of anthocyanin-rich extract from açaí. **Food Chemistry**, Londres, v. 118, p. 208-214, 2010.

HOMMA, A.K. et al. Açaí: novos desafios e tendências. **Amazônia: Ciência & Desenvolvimento**. Manaus, v. 1, n. 2, 2006.

HOUSE, W.A. Trace element bioavailability as exemplified by iron and zinc. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 60, p. 115-141, 1999.

HUR, S.J. et al. In vitro human digestion models for food applications. **Food Chemistry**, Londres, v. 125, p. 1-12, 2011.

IBASE – Instituto Brasileiro de Análises Sociais e Econômicas. **Carajás: Brasil Hipoteca seu Futuro**, Rio de Janeiro, 1983.

ILES. K.E. et al. Mechanisms of glutamate cysteine ligase (GCL) induction by 4-hydroxynonenal. **Free Radical Biology and Medicine**, Nova Iorque, v. 38, n. 5, p. 547-556, 2005.

IOM – Institute of Medicine, Food and Nutrition Board. Dietary reference intakes for vitamin A, vitamin K, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium and zinc. **National Academy Press**, Washington, p. 394-419, 2001.

ISHIGE, K. et al. Flavonoids protect neuronal cells from oxidative stress by three distinct mechanisms. **Free Radical and Biology Medicine**, Nova Iorque, v. 30, p. 433-446, 2001.

ITOH, K. et al. An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzymes genes through antioxidant response elements. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Orlando, v. 236, p. 313-322, 1997.

ITOH, K. et al. Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding the amino-terminal Neh2 domain. **Genes and Development**, Cold Spring and Harbor, v. 13, p. 76-86, 1999.

JANAKI, R. et al. Mechanisms of L-cysteine neurotoxicity. **Neurochemical Research**, Nova Iorque, v. 25, p. 1397-1405, 2000.

JIANG, J. et al. Epigallocatechin-3-gallate prevents TNF-alpha-induced NF-kappaB activation thereby upregulating ABCA1 via the Nrf2/Keap1 pathway in macrophages foam cells. **International Journal of Molecular Medicine**, Berlim, v. 29, p. 946-956, 2012.

KAHYAT, T. Comportamento de risco para doença aterosclerótica coronariana na população de Inhangapí cuja base alimentar é o fruto do açaí (Euterpe oleracea). 2005 [trabalho de conclusão de curso], 69 p. Belém do Pará: Universidade Federal do Pará. Curso de Medicina, Departamento de Clínica Médica, 2005.

KANG, J. et al. Antioxidant capacities of sevem flavonoids compounds isolated from açai berry (Euterpe oleracea). **Food Chemistry**, Londres, v. 122, p. 610-617, 2010.

KANG, J. et al. Flavonoids from acai (Euterpe oleracea Mart.) pulp and their antioxidant and anti-inflammatory activities. **Food Chemistry,** Barking, v. 128, p. 152-157, 2011.

KANG, J. et al. Bioactive food components prevent carcinogenic stress via Nrf2 activation in BRCA1 deficient breast epithelial cells. **Toxicology Letters**, Amsterdam, v. 209, p. 154-160, 2012.

KARAK, T.; BHAGAT, R.M. Trace elements in tea leaves, made tea and tea infusions: A review. **Food Research International**, Barking, v. 43, p. 2234-2252, 2010.

KELSEY, N.A. et al. Nutraceutical antioxidants as novel neuroprotective agents. **Molecules**, Oxford, v. 15, p. 7792-7814, 2010.

KHAN, Y.; BHUTTA, Z.A. Nutritional deficiencies in developing world: current status and opportunities for intervention. **Pediatric Clinics of North America**, Philadelphia, v. 57, n. 6, p. 1409-1441, 2010.

KIMELBERG, H.K.; NEDERGAARD, M. Functions of astrocytes and their potential as therapeutics targets. **Neurotherapeutics**, Oxford, v. 7, p. 338-353, 2010.

KITAZAWA, M. et al. Activation of protein kinase C delta by proteolytic cleavage contributes to manganese-induced apoptosis in dopaminergic cells: Protective role of Bcl-2. **Biochemical Pharmacology**, Nova Iorque, v. 69, p. 133-146, 2005.

KONDAKIS, X. et al. Possible health effects of high manganese concentration in drinking water. **Archives of Environmental Health**, Washington, v. 44, n. 3, p. 175-178, 1989.

KOPLIK, R. et al. Fractionation of phosphorus and trace elements species in soybean flour and common white bean seeds by size exclusion chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 770, p. 261-273, 2002.

KROPAT, C. et al. Modulation of Nrf2-dependent gene transcription by bilberry anthocyanins in vivo. **Molecular Nutrition Food Research,** Nova Iorque, v. 57, p. 545-550, 2013.

KUMAGAI, Y. et al. The role of the Keap1/Nrf2 pathway in the cellular response to methylmercury. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, Nova Iorque, v. 2013, p. 1-8, 2013.

KURZATKOWSKI, D.M.; TROMBETTA, L.D. Maneb causes pro-oxidant effects in hippocampus of Nrf2 knockout mice. **Environmental Toxicology and**

LEE, E. et al. Estrogen and tamoxifen reverse manganese-induced glutamate transporter impairment in astrocytes. **Journal of Neurochemistry**, Oxford, v. 110, p. 530-544, 2009.

LEE, E. et al. 15-Deoxy-Δ12,14-prostaglandin J_2 modulates manganese-induced activation of the NF-κB, Nrf2, and P13K pathways in astrocytes. **Free Radical Biology & Medicine**, Nova Iorque, v. 52, p. 1067-1074, 2012.

LEE, J.M.; JOHNSON, J.A. An important role of Nrf2-ARE pathways in the cellular defense mechanism. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, Boca Raton, v. 37, p. 139-143, 2004.

LEFFERS, L. et al. In vitro toxicological characterization of the S-containing arsenic metabolites thio-dimethylarsinic acid and dimethylarsinic glutathione. **Toxicology**, Oxford, v. 305, p. 109-119, 2013.

LEV, N. et al. Role of DJ-1 in Parkinson's disease. **Journal of Molecular Neuroscience**, Totowa, v. 29, p. 215-225, 2006.

LI, H. et al. Nrf2/HO-1 pathway activation by manganese is associated with reactive oxygen species and ubiquitin-proteasome pathway, not MAPKs signaling. **Journal of Applied Toxicology**, Chichester, v. 31, p. 690-697, 2011.

LI, S. et al. Glutamate transport deficiency is associated with synaptic pathology in Alzheimer's disease. **Society of Neurosciences Abstracts**, Nova Iorque, v. 22, p. 202-203, 1996.

LI, Y. et al. Mechanism of chemical activation of Nrf2. **PLoS One**, Nova Iorque, v. 7, p. 1-7, 2012.

LINKER, R.A. et al. Fumaric acid esters exert neuroprotective effects in neuroinflammation via activation of the Nrf2 antioxidant pathway. **Brain**, Oxford, v. 134, p. 678-692. 2011.

LIU, Y. et al. Resveratrol protects human keratinocytes HaCaT cells from UVA-induced oxidative stress damage by downregulating Keap1 expression. **European Journal of Pharmacology**, Amsterdam, v. 650, p. 130-137, 2011.

LLORENT, E.J. et al. Characterization and comparison of the chemical composition of exotic superfoods. **Microchemical Journal**, Nova Iorque, v. 110, p. 444-451, 2013.

LOWE, N.M. et al. Methods of assessment of zinc status in humans: a systematic review. **American Journal of Clinical Nutrition,** Nova Iorque, v. 89, n. 6S, p. 2040S-2051S, 2009.

LUTZ, T.A. et al. Effects of calcium and sugars on intestinal manganese absorption. **Biological Trace Element Research**, Clifton, v. 39, p. 221-227, 1993.

MAIORINO, M. et al. Microsomal lipid peroxidation: effect of vitamin E and its functional interaction with phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. **Lipids**, Champaign, v. 24, p. 721-726, 1989.

MALECKI, E.A., et al. Biliary manganese excretion in conscious rats is affected by acute and chronic manganese intake but not by dietary fat. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 126, p. 589-598, 1996.

MALECKI, E.A. et al. Iron and manganese homeostasis in chronic liver disease: Relationship to pallidal T1-weighted magnetic ressonance signal hyperintensity. **Neurotoxicology**, Little Rock, v. 20, n. 4, p. 647-652, 1999.

MANACH, C. et al. Polyphenols: food sources and bioavailability. **American Journal of Clinical Nutrition,** Nova Iorque, v. 79, p. 727-747, 2004.

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

MARTIN, K.R.; BARRETT, J.C. Reactive oxygen species as double-edged swords in cellular processes: low dose cell signaling versus high-dose toxicity. **Human Experimental Toxicology**, Nova Iorque, v. 21, p. 71-75, 2002.

MCKENNA, M.C. The glutamate-glutamine cycle is not stoichiometric: fates of glutamate in brain. **Journal of Neuroscience Research**, Nova Iorque, v. 85, p. 3347-3358, 2007.

MEEK, M.E. et al. Risk assessment practice for essential metals. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, Washington, v. 73, n. 2, p. 253-260, 2010.

MENEZES, E.M.S.; TORRES, A.T.; SABBA, A.U. Valor nutricional da polpa de açaí (Euterpe oleracea Mart) liofilizada. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 38, n. 2, p. 311-316, 2008.

MENEZES, E. et al. Preferences and attitudes towards açaí-based products among North American consumers. **Food Research International**, Barking, v.44, p. 1997-2008, 2011.

MENICHELLI, C. **Pérola da Amazônia**, 6° Ed., Disponivel em: www.colibri.com.br, 2005.

MERGLER, D., et al. Nervous system dysfunction among workers with long-term exposure to manganese. **Environmental Research**, San Diego, v. 64, p. 151-180, 1994.

MICHALAK, A. Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress. **Polish Journal of Environmental Studies**, Varsóvia, v. 15, n. 4, p. 523-530, 2006.

MICHALKE, B.; FERNSEBNER, K. New insights into manganese toxicity and speciation. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, Stuttgart, *in press*, 2013.

MILATOVIC, D. et al. Manganese induces oxidative impairment in cultured rat astrocytes. **Toxicological Sciences**, Orlando, v. 98, n. 1, p. 198-205, 2007.

MILATOVIC, D.; ASCHNER, M. Measurement of Isoprostanes as markers of oxidative stress in neuronal tissue. **Current Protocols in Toxicology**, Nova Iorque, v. 39, p. 12.14.1-12.14.12, 2009.

MILLS, C.F. Dietary interactions involving the trace elements. **Annual Review of Nutrition**, Palo Alto, v. 5, p. 173-193, 1985.

MONTES, S. et al. Striatal manganese accumulation induces changes in dopamine in the cirrhotic rat. **Brain Research**, Amsterdam, v. 891, n. 1-2, p. 123-129, 2001.

MORAES, A.A.T. **Alternativas para melhoria da qualidade do açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) consumido no município de Belém-PA.** Disponivel em: http://pt.scribd.com/doc/55565137/alternativasacai . Acesso em 17 de setembro de 2013.

MOREDA-PIÑEIRO, J. et al. In-vivo and in vitro testing to assess the bioaccessibility of arsenic, selenium and mercury species in food samples. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 30, n. 2, p. 324-345, 2011.

MORROW, J.D.; ROBERTS, L.J. Mass spectrometry quantification of F2-isoprostanes in biological fluids and tissues as measure of oxidative stress. **Methods in Enzymology**, Nova Iorque, v. 300, p. 3-12, 1999.

MUTKUS, L. et al. In vitro uptake of glutamate in GLAST and GLT-1 transfected mutant CHO-K1 cells is inhibited by the ethylmercury-containing preservative thimerosal. **Biological Trace Element Research**, Clifton, v. 105, p. 71-86, 2005.

Na, H.K.; SURH, Y.J. Modulation of Nrf2-mediated antioxidant and detoxifying enzyme induction by the green tea polyphenol EGCG. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 46, p. 1271-1278, 2008.

NARDI, E. et al. The use of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) for the determination of toxic and essential elements in different types of food samples. **Food Chemistry**, Londres, v. 112, p. 727-232, 2009.

NOUHI, F. et al. Dietary supplementation with tBHQ an Nrf2 stabilizer molecule, confers neuroprotection against apoptosis in amyloid beta-injected rats. **Neurochemical Research**, Nova Iorque, v. 36, p. 870-878, 2011.

OLIVEIRA, V.R. et al. Native foods from Brazilian biodiversity as a source of bioactive compounds. **Food Research International**, Barking, v. 48, n. 1, p. 170-179, 2012.

PACHECO-PALENCIA, L.A.; HAWKEN, P.; TALCOTT, S.T. Juice matrix composition and ascorbic acid fortification effects on the phytochemical, antioxidant and pigment stability of açaí (*Euterpe oleracea* Mart.). **Food Chemistry**, Barking, v. 105, p. 28-35, 2007.

PADILHA, J.S.; ELARRAT, S.A.; RENDEIRO, G. Avaliação do potencial dos caroços de açaí para geração de energia. **Biomassa & Energia**, Boca Raton, v.3, 2005.

PALSAMY, P.; SUBRAMANIAN, S. Resveratrol protects diabetic kidney by attenuating hyperglycemia-mediated oxidative stress and renal inflammatory

cytokines via Nrf2-Keap1 signaling. **Biochimica and Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1812, p. 719-731, 2011.

PARK, Y.K. et al. Survey of some components of propolis which were collected by Apis mellifera in Brazil. **Arquivos de Ciência e Tecnologia**, Campinas, v. 38, p. 1253-1259, 1995.

PARPURA, V. et al. Ca(2+) sources for the exocytic release of glutamate from astrocytes. **Biochemica and Biophysical Acta**, Amsterdam, v. 1813, p. 984-991,

PEDRERO, Z.; MADRID, Y. Novel approaches for selenium speciation in foodstuffs and biological specimens: A review. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 634, p. 135-152, 2009.

PENNINGTON, J.A.T. et al. Nutritional elements in US diet: results for the total diet study, 1982-1986. **Journal of the American Dietetic Association**, Chicago, v. 89, p. 659-669, 1989.

PENNINGTON, J.A.T.; SHOENM, S.A. The total diet study: estimated dietary intakes of nutritional elements 1982-1991. **International Journal for Vitamin and Nutrition Research**, Berne, v. 66, p. 350-363, 1996.

PEREIRA, K.S. et al. Chapter 3 – Transmission of Chagas Disease (American Trypanosomiasis) by food. **Advances in Food and Nutrition Research**, San Diego, v. 59, p. 63-85, 2010.

POF, Pesquisa de Orçamentos Familiares – Análise do Consumo Alimentar Pessoal no Brasil 2008-2009, IBGE, 2011.

POHL, P.; PRUSISZ, B. Fractionation analysis of manganese and zinc in tea infusions by two-column solid phase extraction and flame atomic absorption spectrometry. **Food Chemistry**, Londres, v. 102, p. 1415-1424, 2007.

POULOSE, S.M. et al. Anthocyanin-rich Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) fruit pulp fractions attenuate inflammatory stress signaling in mouse brain BV-2 microglial cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 60, p. 1084-1093, 2012.

POWELL, J.J. et al. In vitro mineral availability from digested tea: a rich dietary source of manganese. **Analyst**, Londres, v. 123, p. 1721-1724, 1998.

PROHASKA, J.R. Function of trace elements in brain metabolism. **Physical Review**, Nova Iorque, v. 67, p. 858-901, 1987.

QIN, S. et al. System Xc- and apolipoprotein E expressed by microglia have opposite effects on the neurotoxicity of amyloid-beta peptide 1-40. **Journal of Neuroscience**, Baltimore, v. 26, p. 3345-3356, 2006.

RACETTE, B.A. et al. Welding-related parkinsonism: Clinical features, treatment, and pathophysiology. **Neurology**, Boca Raton, v. 56, p. 8-13, 2001.

RADA, P. et al. Structural and functional characterization of Nrf2 degradation by the GSK-3/β-TrCP axis. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, v. 32, n. 17, p. 3486-3499, 2012.

RAMSEY, C.P. et al. Expression of Nrf2 in neurodegenerative diseases. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, Pittsburg, v. 66, p. 75-85, 2007.

RAY, P.S. et al. The red wine antioxidant resveratrol protects isolated rat hearts from ischemia reperfusion injury. **Free Radical Biology & Medicine**, Nova Iorque, v.27, p. 160-169, 1999.

RAZA, H. et al. Dual localization of glutathione S-transferase in the cytosol and mitochondria: implications in oxidative stress, toxicity and disease. **FEBS Journal**, v. 278, p. 4243-4251, 2011.

REINHOLD, J.G. et al. Binding of iron by fibre of wheat and maize. **American Journal of Clinical Nutrition**, Nova Iorque, v. 34, p. 1384-1391, 1981.

RENAUD, S.; LORGERIL, M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. **Lancet**, Londres, v. 339, p. 1523-1526, 1992.

RICE-EVANS, C.A. et al. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends in Plant Sciences**, Oxford, v. 2, p. 152-155, 1997.

RIMANDO, A.M. et al. Resveratrol, pterostilbene, and piceatannol in vaccinium berries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 52, p. 4713-4719, 2004.

RODRIGUEZ-RAMIRO, I. et al. Procyanidin B2 induces Nrf2 translocation and glutathione S-transferase P1 expression via ERKs and p38-MAPK pathways and protect human colonic cells against oxidative stress. **European Journal of Nutrition**, Londres, v. 51, p. 881-892, 2012.

ROGEZ, H. **Açaí: Preparo, Composição e Melhoramento da Conservação.** Editor, Universidade Federal do Pará – EDUPA, Belém, 2000.

ROJO, A.I. et al. Signaling pathways activated by the phytochemical nordihydroguaiaretic acid contribute to a Keap1-independent regulation of Nrf2 stability: Role of glycogen synthase kinase-3. **Free Radical Biology and Medicine**, Nova Iorque, v. 52, p. 473-487, 2012.

ROSSO, V.V.; MERCADANTE, A.Z. Identification and Quantification of Carotenoids, by HPLC-PDA-MS/MS, from Amazonian Fruits**. Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 55, n. 13, p. 5062-5072, 2007.

ROTHSTEIN, J.D. et al. Decreased glutamate transport by the brain and spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. **England Journal of Medicine**, Londres, v. 326, p. 1464-1468, 1992.

RUFINO, M.S.M. et al. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, Londres, v. 127, n. 4, p. 996-1002, 2010.

RUFINO, M.S.M. et al. Açaí (Euterpe oleraceae) 'BRS Pará': A tropical fruit source of antioxidant dietary fiber and high antioxidant capacity oil. **Food Research International**, Barking, v. 44, n. 7, p. 2100-2106, 2011.

RUSHMORE, T.H.; KONG, A.N. Pharmacogenomics, regulation and signaling pathways of phase I and II drug metabolizing enzymes. **Current Drug Metabolism**, Nova Iorque, v. 3, p. 481-490, 2002.

RUZIK, L. Speciation of challenging elements in food by atomic spectrometry. **Talanta**, Londres, v. 93, p. 18-31, 2012.

SABBE, S. et al. Consumer linking of fruit juices with different açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) concentrations. **Jornal of Food Science**, Chicago, v. 74, p. 171-176, 2009.

SAHIN, K. et al. Epigallocatechin-3-gallate activates Nrf2/HO-1 signaling pathway in cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. **Life Sciences**, Elmsford, v. 87, p. 240-245, 2010.

SANTAMARIA, A.B.; SULSKY, S.I. Risk assessment of an essential element: Manganese. **Journal of Toxicology and Environmental Health Part A**, Washington, v. 73, p. 128-155, 2010.

SANTANA, A.C.; CARVALHO, D.F.; MENDES, F.A.T. **Organização e competitividade das empresas de polpas de frutas no Estado do Pará: 1995 a 2004**, Umana, 2006.

SARLETTE, A. et al. Nuclear erythroid 2-related factor 2-antioxidative response element signaling pathway in motor cortex and spinal cord in amytrophic lateral sclerosis. **Journal of Neuropathology & Experimental Neurology**, Pittsburg, v. 67, p. 1055-1062, 2008.

SCHAUSS, A.G. et al. Phytochemical and nutrient composition of the freeze-dried Amazonian palm berry, Euterpe oleracea Mart. (Açai). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 54, p. 8598-8603, 2006a.

SCHAUSS, A.G. et al. Antioxidant capacity and other bioactivities of the freeze-dried Amazonian palm berry, Euterpe oleracea Mart (Açaí). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.54, p. 8604-8610, 2006b.

SHIH, A.Y. et al. Coordinate regulation of glutathione biosynthesis and release by Nrf2-expressing glia potently protects neurons from oxidative stress. **Journal of Neurosciences**, Baltimore, v. 23, p. 3394-3406, 2003.

SHIH, P.H. et al. Antioxidant and cognitive promotion effects of anthocyanin-rich mulberry (*Morus atropurpurea*. L.) on senescence-accelerated mice and prevention of Alzheimer's disease. **Journal of Nutritional Biochemistry**, Oxford, v. 21, p. 598-605, 2010.

SIBSON, N.R. et al. Stoichiometric coupling of brain glucose metabolism and glutamatergic neuronal activity. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 95, p. 316-321, 1998.

SIDORIK-WEGRZYNOWICZ, M. et al. Manganese-induced downregulation of astroglial glutamine transporter SNAT3 involves ubiquitin-mediated proteolytic system. **Glia**, Nova Iorque, v. 58, p. 1905-1912, 2010.

SIDORIK-WEGRZYNOWICZ, M. et al. Mechanism of Mn(II)-mediated dysregulation of glutamine-glutamate cycle: focus on glutamate turnover. **Journal of Neurochemistry**, Oxford, v. 122, p. 856-867, 2012.

SILVA, I.M.; SANTANA, A.C.; REIS, M.S. Análise dos retornos sociais oriundos de adoção tecnológica na cultura de açaí no Estado do Pará. **Amazônia: Ciência & Desenvolvimento**. Manaus, v. 2, n. 3, 2006.

SILVA, M.G.C.P.C.; BARRETO, W.S.; SERÔDIO, M.H. Caracterização química da polpa dos frutos de Juçara e Açaí. **XVIII Congresso Brasileiro de Fruticultura**, Florianópolis, Santa Catarina, 22 a 26 de novembro de 2004.

SILVERSTEIN, F. et al. Perinatal hypoxia-ischemia disrupts striatal [^{3}H]-glutamate uptake into synaptosomes. **Journal of Neurochemistry**, Oxford, v. 47, p. 1614-1619, 1986.

SINGH, A. et al. Glutathione peroxidase 2, the major cigarette smoke-inducible isoform of GPx in lungs, is regulated by Nrf2. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, Nova Iorque, v. 35, p. 639-650, 2006.

SINGLETON, V.L. et al. Analysis of total phenol and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteau reagent. **Methods of Enzymology**, Nova Iorque, v. 299, p. 152-178, 1999.

SKIBOLA, C.F.; SMITH, M.T. Potential health impact of excessive flavonoid intake. **Free Radical Biology and Medicine**, Nova Iorque, v. 29, p. 375-283, 2000.

SLOOT, W.M. et al. Manganese-induced hydroxyl radical formation in rat striatum is not attenuated by dopamine depletion or iron chelation in vivo. **Experimental Neurology**, San Diego, v. 138, p. 236-245, 1996.

SOUZA, M.O. Suplementação da dieta com polpa do fruto do açaí (Euterpe oleracea Martius) melhora o perfil lipídico e a capacidade antioxidante – uma avaliação in vivo. 2009. 86p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2009.

SPENCER, J.P. The impact of fruit flavonoids on memory and cognition. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 104, p. S40-S47, 2010.

STINTZING, F.C. et al. Color and antioxidant properties of cyaniding-based anthocyanin pigments. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 50, n. 21, p. 6172-6181, 2002.

SUN, A.Y.; SIMONYI, A.; SUN, G.Y. The “French Paradox” and beyond: neuroprotective effect of polyphenols. **Free Radical Biology & Medicine**, Nova Iorque, v.32, p. 314-318, 2002.

SUN, G.X. et al. Arsenic in cooked rice: Effect of chemical, enzymatic and microbial processes on bioaccessibility and speciation in the human gastrointestinal tract. **Environmental Pollution**, Barking, v. 162, p. 241-246, 2012.

SUZUKI, Y. et al. Study of subacute toxicity of manganese dioxide in monkey. **Tokushima Journal of Experimental Medicine**, Tokushima, v. 22, p. 5-10, 1975.

SZPUNAR, J. et al. Speciation of metal-carbohydrate complexes in fruits and vegetable samples by size-exclusion HPLC-ICP-MS. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, Londres, v. 14, p. 639-644, 1999.

TACO, Tabela Brasileira de Composição de Alimentos. 4° Ed. Unicamp, Brasil, 2011.

TANAKA, N. et al. Expression of Keap1-Nrf2 system and antioxidative proteins in mouse brain after transient middle cerebral artery occlusion. **Brain Research**, Amsterdam, v. 1370, p. 246-253, 2011.

TEMPLETON, D.M.; et al. Guidelines for terms related to chemical speciations and fractionation of elements: definitions, structural aspects, and methodological approaches (IUPAC Recommendations 2000). **Pure and Applied Chemistry**, Oxford, v. 72, p. 1453-1470, 2000.

THIRY, C. et al. Current knowledge in species-related bioavailability of selenium in food. **Food Chemistry**, Londres, v. 130, p. 767-784, 2012.

THOPPIL, R.J. et al. Black currant anthocyanins abrogate oxidative stress through Nrf2-mediated antioxidant mechanisms in rat model of hepatocellular carcinoma. **Current Cancer Drug Targets**, Oxford, v. 12, p. 1244-1257, 2012.

TIETZE, F. Enzymatic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. **Analytical Biochemistry**, Nova Iorque, v. 27, p. 502-522, 1969.

TINOCO, A.C. Açaí amazônico: novas perspectivas de negócio. Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, 2005. 1 CD-ROM. Trabalho apresentado no Workshop Regional do Açaizeiro: pesquisa, produção e comercialização. Belém, PA, 2005.

TOAIARI, S.D.A. et al. Iron bioavailability of the açaí (Euterpe oleracea Mart.) and the iron-fortified manioc flour in rats. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 18, n. 3, p. 291-299, 2005.

TONG, K.I. et al. Two-site substrate recognition model for the Keap1-Nrf2 system: a hinge and latch mechanism. **Biological Chemistry**, Berlim, v. 387, p. 1311-1320, 2006.

TROTTI, D. et al. Neuronal and glial glutamate transporters possess an SH-based redox regulatory mechanism. **European Journal of Neurosciences**, Amsterdam, v. 9, p. 1236-1243, 1997.

TURRENS, J.F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. **Journal of Physiology**, Baltimore, v. 552, p. 335-344, 2003.

URSINI, F. et al. Microsomal lipid peroxidation: mechanisms of initiation. The role od iron and iron chelators. **Free Radical Biology and Medicine**, Nova Iorque, v. 6, p. 31-36, 1989.

VAN-HORSSEN, J. et al. Nrf2 and DJ1 are consistently upregulated in inflammatory multiple sclerosis lesions. **Free Radical Biology and Medicine**, Nova Iorque, v. 49, p. 1283-1289, 2010.

VERGARA, C. et al. Comparison of high-performance liquid chromatography separation of red wine anthocyanins on a mixed-mode ion-exchange reversed-phase and on a reversed-phase column. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1217, p. 5710-5717, 2010.

VILLIERS, A. et al. High-efficiency high performance liquid chromatographic analysis of red wine anthocyanins. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1218, p. 4660-4670, 2011.

VOLTERRA, A. et al. Glutamate uptake inhibition by oxygen free radicals in rat cortical astrocytes. **Journal of Neuroscience**, Baltimore, v. 14, p. 2924-2932, 1994.

VOLTERRA, A.; MELDOLESI, J. Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. **Nature Reviews Neuroscience**, Londres, v. 6, p. 626-640, 2005.

VOMHOF-DEKREY, E.E.; PICKLO, M.J. The Nrf2-antioxidant response element pathway: a target for regulating energy metabolism. **Journal of Nutritional Biochemistry**, Stoneham, v. 23, p. 1201-1206, 2012.

XU, C.; LI, C.Y.; KONG, A.N. Induction of phase I, II, and III drug metabolism/transport by xenobiotics. **Arquives of Pharmaceutical Research**, Nova Iorque, v 28, p. 249-268, 2005.

YAMANE, Y. et al. Protective effect of sodium molybdate against the acute toxicity of cadmium chloride. **Toxicology**, Nova Iorque, v. 60, p. 235-243, 1990.

YAN, W. et al. Activation of Nrf2-ARE pathway in brain after traumatic brain injury. **Neuroscience Letters**, Limerick, v. 431, p. 150-154, 2008.

YAN, W. et al. The expression of NF-E2-related factor 2 in the rat brain after traumatic brain injury. **Journal of Trauma**, Baltimore, v. 66, p. 1431-1435, 2009.

YANG, H. et al. Cloning and characterization of the 5'-flanking region of the rat glutamate-cysteine ligase catalytic subunit. **Biochemical Journal**, Londres, v. 357, n. 2, p. 447-455, 2001.

YANG, J.J. et al. Nuclear erythroid 2-related factor 2: A novel potential therapeutic target for liver fibrosis. **Food and Chemical Toxicology,** Oxford, v. 59, p. 421-427, 2013.

YATES, A.A. Using criteria to establish nutrient intake values. **Food and Nutrition Bulletin**, Tóquio, V. 28, n. 1S, p. S38-S50, 2007.

YEN, W.J. et al. Antioxidant activity of peanut seed testa and its antioxidant component, ethyl protocatechuate. **Food Science and Tecnology**, Nova Iorque, v. 38, n. 1, p. 193-200, 2005.

WASSERMAN, G.A. et al. Water manganese exposure and children's intellectual function in Araihazar, Bangladesh. **Environmental Health Perspectives**, Research Triangle Park, v. 114, p. 124-135, 2006

WASSERMAN, G.A. et al. Arsenic and manganese exposure and children's intellectual function. **Neurotoxicology**, Little Rock, v. 32, p. 450-462, 2011.

WATAI, Y. et al. Subcellular localization and cytoplasmic complex status of endogenous Keap1. **Genes and Cells: Devoted to Molecular & Celluar Mechanisms**, Nova Iorque, v. 12, p. 1163-1178, 2007.

WEDLER, F.C. Biological significance of manganese in mammalian systems. *In*: ELLIS, P.G.; LUSCOMBE, D.K. (Ed.) **Progress in medical chemistry**, Amsterdam, 1993.

WELCH, R.M.; HOUSE, W.A. Factors affecting the bioavailability of mineral nutrients in plant foods. In: WELCH, R.M.; GABELMAN, W.H. (Eds.) **Crops as sources of nutrients for humans**. American Society of Agronomy, Madison, n. 28, p. 37-54, 1984.

WITHOLT, R. et al. The neurobehavioral effects of subchronic manganese exposure in the presence and absence of pre-parkinsonism. **Neurotoxicology and Teratology**, Oxford, v. 22, n. 6, p. 851-861, 2000.

WITZLEBEN, C.L. et al. Manganese-bilirrubin cholestasis. Further studies in pathogenesis. **Lab Investigation**, Amsterdam, v. 56, n. 2, p. 151-154, 1987.

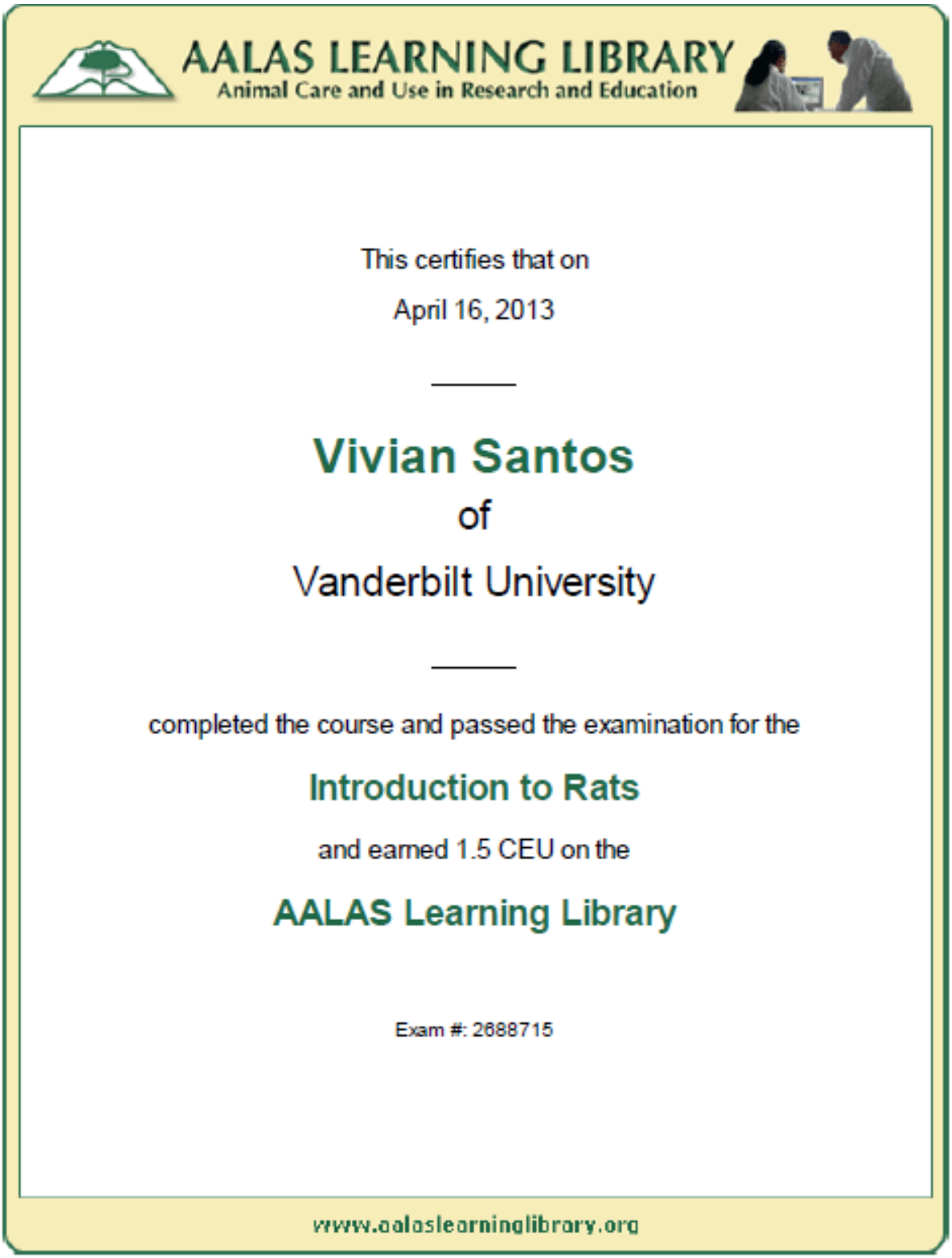
WOISKY, R.G. et al. Uso do cloreto de alumínio na qualificação de flavonóides em amostras de própolis. **Revista Mensagem Dose**, São Paulo, v. 46, p. 3-8, 1998.

ZHANG, H. et al. Submicromolar concentrations of 4-hydroxynonenal induce glutamate cysteine ligase expressin in HBE1 cells. **Redox Report**, Oxford, v. 12, n. 1, p. 101-106, 2007.

ZHANG, M. et al. Emerging roles of Nrf2 and phase II antioxidant enzymes in neuroprotection. **Progress in Neurobiology**, Oxford, v. 100, p. 30-47, 2013.

ZLOTKIN, S.H.; ATKINSON, S.; LOCKITCH, G. Trace elements in nutrition for premature infants. **Clinics in Perinatology**, Philadelphia, v. 22, p. 223-240, 1995.

Certificado de Treinamento AALAS Learning Library



AALAS LEARNING LIBRARY
Animal Care and Use in Research and Education

This certifies that on

April 16, 2013

Vivian Santos

of

Vanderbilt University

completed the course and passed the examination for the

Introduction to Rats

and earned 1.5 CEU on the

AALAS Learning Library

Exam #: 2688715

www.aalaslearninglibrary.org

Aprovação no Comitê de Ética no Uso de Animais

Vanderbilt University Medical Center

Institutional Animal Care and Use Committee

S-4322 Medical Center North
1161 21st Avenue South
phone (615) 936-8163
fax (615) 936-8160

IACUC APPROVAL LETTER

August 25, 2010

PRINCIPAL INVESTIGATOR:
Aschner, Michael
Pediatrics- Pharmacology

PROTOCOL ID: M/07/326
PROTOCOL TITLE: Mechanisms of Methylmercury Induced Neuronal Toxicity- NIEHS

The Modification request of the protocol referenced below has been approved by the Institutional Animal Care and Use Committee. Significant and Highly Significant changes to an approved protocol as defined in the IACUC SOP: Changes to an Approved IACUC Protocol need to be approved by the IACUC through a modification. This approval is for the remaining period of your protocol provided there are no additional changes to the protocol that would impact this approval, and/or the protocol does not reach 3 years from its date of initial approval by the IACUC. If there are further modifications made to this protocol, please present the changes to IACUC, through the Office of Animal Welfare Assurance, for approval prior to implementing them.

Type of Review: Modification (Additional funding)
Date Approved: 1/7/2008
Next Review: 1/7/2011 (due for re-write)
Expiration of Protocol: 1/7/2011

AUTHORIZED SIGNATURE

Ronald Emeson, Ph.D., Chair

Institutional Animal Care and Use Committee

eSirius

VANDERBILT UNIVERSITY

Protocol Search	Milatovic, Dejan	IMBR	SIGN OUT	HOME	04/04/2011

Protocol Search Results

List of Protocol Search

PI	Protocol #	Protocol Year	Protocol Title	Status	Approved	Expires On	Review On	Submitted	Agency Funded?	Dept. Funded?	Fellowship Funded?	Priv/Comm Funded?	Gift Funded?	Other Funding?	Species?	Hazardous Agents?
Aschner, Michael	M/07/156	2	Magnetic Resonance Imaging (MRI) of Manganese Accumulation in the Rat Brain Associated with Iron-Deficiency-USAMRMC	Expired	07/31/2007	07/31/2010	07/31/2010	05/10/2007	No	No	No	No	No	No	YES	
Aschner, Michael	M/07/326	5	Mechanisms of Methylmercury Induced Neuronal Toxicity- NIEHS	Approved	11/23/2010	11/23/2013	11/23/2011	10/08/2010	No	YES	No	No	No	No	YES	NO
Aschner, Michael	M/09/226	1	Estrogen neuroprotection in Manganese-induced neurotoxicity	Un-Finished	/ /	/ /	/ /	/ /	YES	No	No	No	No	No	YES	NO
Aschner, Michael	M/11/083	1	Mechanisms of Methylmercury Induced Neuronal Toxicity- NIEHS	Un-Finished	/ /	/ /	/ /	10/08/2010	No	YES	No	No	No	No	YES	NO
Aschner, Michael	M/11/084	1	Mechanisms of Methylmercury Induced Neuronal Toxicity- NIEHS	Un-Finished	/ /	/ /	/ /	10/08/2010	No	YES	No	No	No	No	YES	NO

Artigos publicados relacionados à esta tese

SANTOS, V.S.; TEIXEIRA, G.H.A.; BARBOSA JR, F. Açaí (*Euterpe oleracea* Mart.): A tropical fruit with high levels of essential minerals – especially manganese – and its- contribution as a source of natural mineral supplementation. Journal of Toxicology and Environmental Health Part A, *in press*, 2014.

SANTOS, V.S.; BISEN-HERSH, E.; YU, Y.; CABRAL, I.S.R.; NARDINI, V.; CULBRETH, M.; ROCHA, J.B.T.; BARBOSA JR, F.; ASCHNER, M. Anthocyanin-rich açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) extract attenuates manganese-induced oxidative stress in rat primary astrocytes cultures. Journal of Toxicology and Environmental Health Part A, *in press*, 2014.