

Universidade de Brasília – UnB

Departamento de Nutrição

Programa de Pós-Graduação em Nutrição Humana

Linha de Pesquisa Bioquímica Nutricional

**EFEITO ANTIOXIDANTE DO TUCUM-DO-CERRADO [*Bactris setosa*] EM RATOS
SUBMETIDOS AO ETRESSE OXIDATIVO INDUZIDO POR FERRO**

Adriana Medeiros Fustinoni

BRASÍLIA-DF

2013

ADRIANA MEDEIROS FUSTINONI

**EFEITO ANTIOXIDANTE DO TUCUM-DO-CERRADO [*Bactris setosa*] EM RATOS
SUBMETIDOS AO ETRESSE OXIDATIVO INDUZIDO POR FERRO**

Tese apresentada como requisitos
para obtenção do título de doutor do
Programa de Pós-Graduação em Nutrição
Humana da Faculdade de Saúde/
Universidade de Brasília

Orientadora: Egle Machado de
Almeida Siqueira

BRASÍLIA-DF

2013

Adriana Medeiros Fustinoni

Egle Machado de Almeida Siqueira
Presidente – Universidade de Brasília (UnB)

Élida Geralda Campos
Membro – Universidade de Brasília (UnB)

Leide Rovênia Miranda de Andrade
Membro – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA -
Cerrados)

Maria Margareth Veloso Naves
Membro – Universidade Federal de Goiás (UFG)

Sandra Fernandes Arruda
Membro – Universidade de Brasília (UnB)

Nathália Marcolini Pelúcio Pizato Valério
Membro suplente – Universidade de Brasília (UnB)

Dedico este trabalho a Deus, princípio, razão e fim de tudo.

Ao Diógenes, por seu companheirismo e amor. Você foi minha força quando a
motivação me faltou!

Ao meu filho Gabriel e aos outros que virão. Vocês dão um sentido a mais a toda
esta luta.

Ao meu pai e minha mãe, por seu amor e dedicação incondicional. Dedico minha
vida a vocês! As minhas conquistas e alegrias! Obrigada por tudo o que fizeram e
ainda fazem por nós.

Aos meus irmãos, cunhados e sobrinhos que são uma grande alegria na minha vida
e que me fazem crescer.

Aos meus tios, avós, primos e sogros o meu carinho e agradecimento.

À todos os meus amigos, pela amizade, conselhos e alegrias.

AGRADECIMENTO

Agradeço a Deus.

Ao Diógenes e aos meus pais, por me ajudarem desde as coletas dos frutos até o fechamento deste manuscrito.

À minha orientadora, professora Egle, por ser um exemplo profissional. Por suas orientações, correções e conselhos. Obrigada também, por estar presente em um dos momentos mais importantes da minha vida.

À profa. Sandra por suas orientações e por todo crescimento que me proporcionou.

Aos meus colegas de laboratório: Fernanda, Juliana, Azadeh, Miriam, Lorena, Luana, Marcela, Lívia, Luciano, João Gabriel e Natália, pelas trocas de experiência, auxílio na bancada e amizade.

Ao Luciano pela análise dos índices de ferro no soro.

Aos técnicos Leandro e Francisco Erivan, pelo auxílio no laboratório. Principalmente ao Leandro pelo auxílio nas análises de ferro nos tecidos.

À Universidade de Brasília pela oportunidade.

À CAPES, ao CNPQ e a FAPDF pelo apoio financeiro à pesquisa.

“Fica Senhor comigo, pois preciso da Tua presença para não te esquecer. Sabes quão facilmente posso te abandonar.

Fica Senhor comigo, porque sou fraco e preciso da tua força para não cair.

Fica Senhor comigo, porque és minha vida, e sem Ti perco o fervor.

Fica Senhor comigo, porque é minha luz, e sem Ti reina a escuridão.

Fica Senhor comigo, para me mostrar Tua vontade.

Fica Senhor comigo, para que ouça Tua voz e Te siga.

Fica Senhor comigo, pois desejo amar-Te e permanecer sempre em Tua companhia.

Fica Senhor comigo, se queres que Te seja fiel.

Fica Senhor comigo, porque, por mais pobre que seja minha alma, quero que se transforme num lugar de consolação para Ti, um ninho de amor.”

São Padre Pio

RESUMO

O bioma Cerrado ocupa grande área do território brasileiro, sendo caracterizado por fatores abióticos extremos, como longos períodos de estiagem, queimadas ocasionais e solos ácidos com presença de metais pesados, os quais o transformaram em um dos mais ricos biomas de savana do mundo, em termos de biodiversidade. Partindo da hipótese que esses fatores abióticos adversos selecionaram espécies resistentes ao estresse, com moléculas bioativas capazes de proteger tais espécies, realizamos um estudo *in vitro* que objetivou verificar a atividade antioxidante (AA) de partes comestíveis de doze espécies nativas do Cerrado, araticum (*Annona crassiflora*), baru (*Dipteryx alata*), cagaita (*Eugenia dysenterica*), ingá (*Inga laurina*), jatobá-do-cerrado (*Hymenaea stigonocarpa*), jenipapo (*Genipa americana*), jurubeba (*Solanum paniculatum*), lobeira (*Solanum lycocarpum*), mangaba (*Hancornia speciosa*), tucum-do-cerrado (*Bactris setosa*); cajuzinho-do-cerrado (*Anacardium humile*) e o palmito da guariroba (*Syagrus oleracea*), em relação à AA da maçã vermelha (*Malus domestica*), utilizando o ensaio com o radical DPPH•. Entre as doze espécies analisadas, a lobeira, araticum, jurubeba, cagaita, cajuzinho e tucum apresentaram alta AA em relação à maçã. Com objetivo de verificar a AA *in vivo* do tucum, ratos Wistar (200g), machos, foram tratados por 30 dias com dieta para roedores (AIN-93G), suplementada ou não com ferro (agente estressor), adicionada ou não com 15% de tucum (polpa e casca). Como marcadores do estado em ferro, determinou-se os níveis de ferro sérico, nos tecidos e os níveis dos transcritos das proteínas hepcidina, ferroportina, transportador de metais bivalentes (*DMT1*). Os níveis teciduais de malondialdeído (MDA), proteína carbonilada, capacidade redutora de ferro no plasma (FRAP) e níveis de transcrito da catalase e do fator nuclear (*erythroid-derived-2*) like 2 (*Nrf2*), foram avaliados para determinação do estado oxidativo dos ratos. A suplementação com ferro resultou no aumento significativo dos níveis de ferro no soro, fígado, baço e intestino, no aumento da saturação de transferrina, nos níveis hepáticos de MDA e de transcritos de hepcidina, porém, reduziu os níveis de transcritos da ferroportina no baço. A suplementação com ferro resultou ainda, no aumento da atividade das enzimas Catalase (CAT) e Glutathione S-Transferase (GST) no rim, e da Glutathione Peroxidase (GPx) no intestino, além de aumentar os níveis de transcrito de *Nrf2* no intestino e baço. O consumo de tucum reduziu os níveis de transcrito de hepcidina hepática e de ferro intestinal. Além disso, reduziu os níveis de danos oxidativos a proteínas e lipídeos no baço, e aumentou a capacidade redutora de ferro no plasma. O consumo de tucum pelos ratos suplementados com ferro suprimiu a indução da expressão do gene da *Nrf2* no baço, o aumento das atividades das enzimas CAT, GST e GPx e a indução do gene da hepcidina induzidos pela suplementação com ferro. Além disso, o consumo de tucum aumentou a capacidade redutora no plasma dos ratos suplementados com ferro. Esses resultados sugerem que o tucum tenha compostos antioxidantes e que seu consumo protege os tecidos contra danos oxidativos, aumentando a mobilidade de ferro tecidual, pela inibição da expressão gênica da hepcidina.

Palavras-chave: Bioativos, antioxidante, Cerrado, tucum, hepcidina, *Nrf2*.

ABSTRACT

The Cerrado occupies large area of Brazil, characterized by extreme abiotic factors, such as long periods of drought, occasional fires and soils with heavy metals, which have transformed it into one of the richest savanna biomes of the world, in terms of biodiversity. Assuming that these adverse abiotic factors selected stress-resistant species with bioactive molecules that protect these species, we conducted an *in vitro* study that aimed to determine the antioxidant activity (AA) of edible parts of twelve species native from Cerrado, araticum (*Annona crassiflora*), baru (*Dipteryx alata*), cagaita (*Eugenia dysenterica*), Inga (*Inga laurina*), jatobá-do-cerrado (*Hymenaea stigonocarpa*), jenipapo (*Genipa americana*), jurubeba (*Solanuma paniculatum*), lobeira (*Solanum lycocarpum*), mangaba (*Hancornia speciosa*), tucum-do-cerrado (*Bactris setosa*); cajuzinho-do-cerrado (*Anacardium humile*) and the guariroba palm (*Syagrus oleracea*), in relation to the AA of red apple (*Malus domestica*), using the DPPH[•]. Among the twelve species studied, the lobeira, araticum, jurubeba, cagaita, cajuzinho and tucum showed high AA compared to apple. Aiming to evaluate the AA tucum *in vivo*, male Wistar rats (200g), were treated for 30 days with food for rodents (AIN-93G), supplemented or not with iron (stressor), added or not with 15 % of tucum (pulp and peel). As iron status markers, were determined the levels of serum iron and tissue levels of transcripts of protein hepcidin, ferroportin, divalent metal transporter (*DMT1*). The level of malondialdehyde (MDA) and carbonyl protein in tissues, iron reduction capacity in plasma (FRAP) and transcript levels of catalase and nuclear factor (erythroid-derived-2) like 2 (*Nrf2*), were measured to determine the oxidative state of rats. Iron supplementation resulted in a significant increase in the iron levels in serum, liver, spleen and intestine, increase transferrin saturation, hepatic levels of MDA and hepcidin transcripts, but reduced the levels of transcripts ferroportin in spleen. Iron supplementation also resulted in increased activity of the enzymes Catalase (CAT) and Glutathione S-transferase (GST) in the kidney, and Glutathione Peroxidase (GPx) in the intestine, in addition to increasing levels of *Nrf2* transcript in the intestine and spleen. The consumption of tucum reduced transcript levels of liver hepcidin and intestinal iron. Furthermore, reduced levels of oxidative damage in lipids and proteins in the spleen, and increased capacity reduction of plasma iron. Tucum consumption by rats supplemented with iron, suppressed the induction of *Nrf2* gene expression in spleen, increased activity of the CAT, GST and GPx enzymes, and the induction hepcidin gene induced by iron supplementation. Moreover, consumption of tucum increased ferric reducing ability in the plasma mice of iron supplemented. These results suggest that the tucum has antioxidant compounds and its consumption protects tissues against oxidative damage, increasing mobility of iron tissue by inhibiting the expression of hepcidin gene.

Keywords: Bioactive, antioxidant, Cerrado, tucum, hepcidin, *Nrf2*.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	11
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	14
2.1	<i>Danos Oxidativos e as Espécies Reativas de Oxigênio</i>	14
2.2	<i>Metabolismo de Ferro</i>	17
2.3	<i>Antioxidantes</i>	23
2.3.1	<i>Antioxidantes exógenos e endógenos</i>	23
2.3.2	<i>Fator nuclear (derivado de eritroide-2) tipo 2 (Nrf2)</i>	25
2.3.3	<i>A Catalase</i>	28
2.4	<i>O Cerrado</i>	29
3	OBJETIVOS.....	39
3.1	<i>Objetivo Geral</i>	39
3.2	<i>Objetivos Específicos</i>	39
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	40
4.1	<i>Amostras para avaliação da Atividade Antioxidante in vitro</i>	40
4.2	<i>Obtenção dos extratos</i>	41
4.3	<i>Determinação in vitro da Atividade Antioxidante por meio da atividade antiradicalar - DPPH•</i>	41
4.4	<i>Análise Estatística do teste DPPH•</i>	42
4.5	<i>Coleta da amostra que mais se destacou em termos de Atividade Antioxidante para estudo in vivo</i>	43
4.6	<i>Tratamento dos animais</i>	43
4.7	<i>Determinação do estado em ferro no organismo dos ratos</i>	45

4.7.1	Determinação de ferro nos tecido	45
4.7.2	Índices de Ferro no soro	46
4.8	<i>Verificação dos níveis de transcrito de genes do metabolismo de ferro e dos genes envolvidos na defesa antioxidante</i>	46
4.8.1	Extração de RNA	46
4.8.2	Síntese de cDNA	48
4.8.3	Reação em cadeia de polimerase reversa (qRT-PCR).....	48
4.8.4	Análise Estatística.....	50
5	RESULTADOS.....	51
5.1	<i>Estudo comparativo da atividade antioxidante entre partes comestíveis de doze plantas do Cerrado e a maçã vermelha – in vitro</i>	51
5.2	<i>O consumo diário de tucum previne a sobrecarga de ferro nos tecidos devido a inibição da expressão do gene da hepcidina (Hamp) no fígado</i>	52
5.2.1	Concentração de ferro nos tecidos	52
5.2.2	Expressão do gene da hepcidina (<i>Hamp</i>).....	53
5.2.1	Expressão do gene da Ferroportina 1 (<i>FPN1</i>) e da Proteína Transportadora de Metal Divalente 1 (<i>DMT1</i>).....	55
5.3	<i>O consumo diário de tucum induziu a expressão hepática do gene do fator de transcrição Nrf2 e inibiu a expressão do gene da Catalase no baço</i>	55
5.3.1	Expressão do gene do Nrf2	55
5.4	<i>O consumo diário de tucum induziu a expressão hepática do gene do fator de transcrição Nrf2 e inibiu a expressão do gene da Catalase no baço</i>	57
5.4.1	Expressão do gene do Nrf2	57
5.4.2	Expressão do gene da Catalase	57
6	DISCUSSÃO	58

7	CONCLUSÕES.....	68
7.1	<i>Estudo in vitro</i>	68
7.2	<i>Estudo in vivo</i>	68
8	PERSPECTIVAS	69
	REFERÊNCIAS	70
	APÊNDICE A – Artigo publicado na revista Plos One	87
	APÊNDICE B – Metodologias e resultados da Dissertação de mestrado de Livia Pimentel de Santana Dourado (2013).	94
	APÊNDICE C – Artigo submetido para publicação.....	102

1 INTRODUÇÃO

O ferro é vital para quase todos os organismos vivos, por ser um cofactor para muitas proteínas e enzimas necessárias para o metabolismo energético, bem como para vários outros processos vitais essenciais (CARBONI e LATOUR, 2011). No entanto, como os demais metais de transição, o ferro também atua como um íon pró-oxidante, por catalisar a conversão de espécies reativas de oxigênio (ROS) fracas, tais como H_2O_2 , ao radical hidroxila que é altamente reativa que, por sua vez, promove danos a biomoléculas (CARBONI e LATOUR, 2011). O acúmulo de danos oxidativos nas células está associado a diversas doenças crônicas, como doença cardiovascular, câncer, diabetes, mal de Parkinson e Alzheimer, entre outras (SOHAL, 1996; SOHAL e WEINDRUCH, 1996; MEHTA, 2006; MEHTA et al., 2006; MA, 2009; MA et al., 2009; MAES, 2011; MAES et al., 2011). Altos níveis de danos oxidativos também têm sido associados com o processo de envelhecimento (FINDEL e HOLBROOK, 2000). Assim, a sobrecarga de ferro celular pode acelerar disfunções celulares levando a doenças crônicas e ao envelhecimento prematuro (XU et al., 2012; ARRUDA et al., 2013). Admitindo este efeito adverso do ferro, mamíferos utilizam diferentes mecanismos para regular a homeostase de ferro nos níveis sistêmico e celular. Estes mecanismos moleculares envolvem a hepcidina, um hormônio hepático, e proteínas reguladoras de ferro, que juntos, orquestram a homeostase de ferro no organismo (PANTOPOULOS et al., 2012).

O equilíbrio entre a quantidade de ROS e antioxidantes previne o estresse oxidativo nas células. Desta forma, contrabalanceando a produção endógena de ROS, os mamíferos desenvolveram um mecanismo antioxidante eficaz, o qual é composto por enzimas antioxidantes e sequestradores não enzimáticos, tais como a glutatona, que estão envolvidos na redução de ROS (RAHMAN, BISWAS e KODE, 2006; VALKO et al., 2006; MAES et al., 2011; PAMPLONA e COSTANTINI, 2011). O aumento de danos oxidativos pode ativar a expressão de mais de 100 genes envolvidos na síntese de antioxidantes e proteínas detoxificantes (PAMPLONA e COSTANTINI, 2011). Vários genes antioxidantes possuem o elemento de resposta antioxidante (*antioxidant response element* - ARE), uma sequência específica de nucleótidos presentes nas regiões promotoras dos genes, que se liga ao fator nuclear (derivado de eritroide-2) tipo 2 [*fator nuclear (erythroid-derived-2) like 2* -

Nrf2], um fator de transcrição nuclear, que, por sua vez, regula a expressão de enzimas antioxidantes, entre outros genes envolvidos nas defesas antioxidantes (DINKOVA-KOSTOVA e TALALAY, 2008). Outro fator importante nesta via de defesa antioxidante é a proteína ECH-associado 1 como Kelch (*Kelch-like ECH-associated protein 1- Keap1*), um sensor e indutor químicos, alvo para a defesa antioxidante. Em condições normais, a Keap1 se liga ao Nrf2, mantendo-o no citoplasma, no entanto, um aumento da concentração de agentes oxidantes leva a uma oxidação da Keap1 e consequente liberação do Nrf2 para o núcleo da célula, onde forma um heterodímero com a pequena proteína Maf, a qual se liga ao ARE induzindo a expressão de genes antioxidantes (DINKOVA-KOSTOVA e TALALAY, 2008; PAMPLONA e COSTANTINI, 2011).

Além destas defesas endógenas e fortalecendo o sistema antioxidante celular, os alimentos, especialmente os de origem vegetal, contribuem com uma variedade de moléculas antioxidantes que podem proteger as células animais contra o estresse oxidativo (SIRIWARDHANA et al., 2013). No meio do território brasileiro prevalece um bioma conhecido como Cerrado, que possui uma das maiores biodiversidade de savana neotropicais do mundo e, depois da floresta amazônica, é o segundo maior bioma da América do Sul (FURLEY, 1999; MACHADO et al., 2004; CARVALHO, JÚNIOR e FERREIRA, 2009). O Cerrado abriga uma enorme biodiversidade e numerosas espécies endêmicas pouco estudadas (MENDONÇA et al., 1998; FERREIRA e HUETE, 2004; SIQUEIRA et al., 2012). Espécies estas que se desenvolveram em meio a fatores abióticos extremos com clima tipicamente quente e semiúmido e notadamente sazonal, com verões chuvosos e invernos secos, queimadas ocasionais e solos ácidos, pobres e com presença de metais pesados. Nossa hipótese é que esses fatores adversos abióticos aos quais a sua vegetação tem sido exposta, possam ter selecionado espécies resistentes ao estresse oxidativo devido a presença de moléculas bioativas. Desta forma, se faz necessário o conhecimento das características e composições de seus frutos para a valorização desta vegetação, que embora seja rica, tem sido amplamente degradada nos últimos anos (CARVALHO, JÚNIOR e FERREIRA, 2009).

O objetivo do presente trabalho foi verificar a atividade antioxidante (AA) *in vitro* de partes comestíveis de 12 espécies nativas do cerrado em relação à maçã vermelha a fim de selecionar a que mais se destacar, para então avaliar o efeito do

seu consumo diário (tucum-do-Cerrado [*Bactris setosa*]) sobre o estado metabólico do ferro e o estado oxidativo em ratos com estresse oxidativo induzido com suplementação dietética de ferro.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 DANOS OXIDATIVOS E AS ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

Com o advento da industrialização houve uma diminuição da mortalidade por doenças infecto-contagiosas, aumentando-se com isso, a expectativa de vida e a incidência de doenças crônicas (MUTATKAR, 1995; CANCHE-POOL et al., 2008). A longevidade e o envelhecimento com saúde tem sido o “cerne” da maioria dos estudos realizados na área de ciências da saúde (KENYON, 2005). Em termos celulares, o envelhecimento é o processo pelo qual as células naturalmente, e de forma progressiva, perdem sua capacidade de replicação e conseqüentemente, o seu potencial de proliferação (KILLILEA et al., 2003). Segundo Harman (1956), esse processo é conseqüência dos danos oxidativos acumulados nas células. Além do envelhecimento as doenças crônicas como Alzheimer, Parkinson, doenças cardiovascular e até o câncer também estão associadas a danos oxidativos celulares (LEVENSON e TASSABEHJI, 2004).

No organismo, os danos a biomoléculas são causados principalmente pelas Espécies Reativas de Nitrogênio (ERN) – como por exemplo o dióxido de nitrogênio (NO_2^\bullet), altamente reativo e formado a partir da reação do óxido nítrico (NO^\bullet) com o oxigênio - e pelas Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) (HERMES-LIMA, 2005). Tanto as ERN como as EROs podem promover a oxidação de lipídeos da membrana celular ou de algumas organelas, proteínas e ácidos desoxiribonucleicos (DNA). No entanto, as espécies reativas mais abundantes são as EROs por serem produzidas naturalmente pelo processo de respiração celular devido a redução incompleta do oxigênio (**Figura 1**).

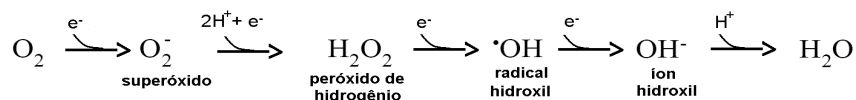


Figura 1. Reações de redução do oxigênio. Formação de alguns intermediários na redução do oxigênio até a formação da água. Adaptado de Hermes-Lima (2005).

As EROs incluem dentre outras, os radicais superóxido (O_2^\bullet), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o íon hidroxila (OH^-) e o radical hidroxila (OH^\bullet) (HALLIWELL e

GUTTERIDGE, 2007; PERRON e BRUMAGHIM, 2009). As EROs podem ser espécies radicalares e não radicalares. As espécies radicalares ou radicais livres são átomos ou moléculas que apresentam pelo menos um elétron desemparelhado. O ganho de um elétron por uma espécie não radicalar pode convertê-la em uma espécie reativa (HERMES-LIMA, 2005).

O dióxido de oxigênio (O_2) é um radical livre que apresenta dois elétrons desemparelhados cujos spins são paralelos ($\uparrow\uparrow$) (**Figura 2**). Os spins paralelos fazem com que o O_2 dificilmente receba um par de elétrons na ausência de um catalizador. O O_2 pode se converter ao oxigênio singleto (1O_2) por passar a ter spins antiparalelos ($\uparrow\downarrow$). Com isso, o 1O_2 passa a ter alto poder de oxidação, podendo atacar biomoléculas como resíduos de aminoácidos, DNA, lipídeos de membrana e carotenoides (HERMES-LIMA, 2005).

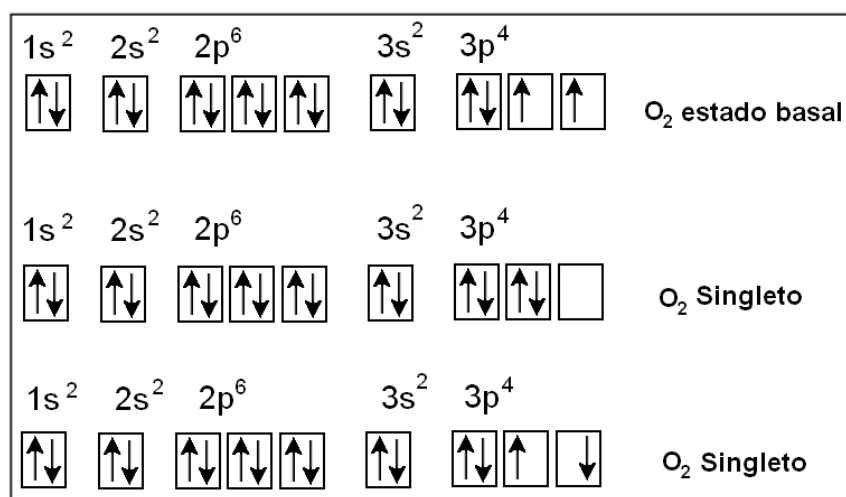
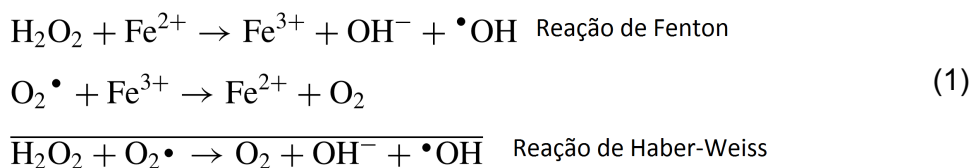


Figura 2. O O_2 em diferentes graus de energia. Adaptado de Halliwell e Gutteridge (2007).

O O_2 também pode receber um único elétron e se converter ao radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$). Estima-se que cerca de 1 a 4% do oxigênio consumido pelos mamíferos sejam convertidos em $O_2^{\cdot-}$ (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007). O $O_2^{\cdot-}$ pode atacar biomoléculas, no entanto, sua taxa de reação é muito baixa para ter significado biológico. Um dos papéis biológicos mais importantes do $O_2^{\cdot-}$ é a geração do radical hidroxila ($\cdot OH$) pela reação com o peróxido de hidrogênio na presença do Fe^{2+} . O peróxido de hidrogênio, uma espécie não radicalar, pode ser gerada a partir do recebimento de dois prótons e um elétron pelo $O_2^{\cdot-}$.

Fenton em 1876 pela primeira vez descreveu a oxidação do ácido tartárico pela adição de peróxido de hidrogênio e Fe^{2+} . Em 1896, Fenton descobriu ainda que o ferro atua como catalisador desta reação, no entanto, ele não investigou o mecanismo da reação que futuramente iria levar seu nome (**Equação 1**). Algumas décadas depois, nos anos de 1930, Haber e Weiss propuseram que o radical $\cdot\text{OH}$ era formado pela reação do superóxido com peróxido de hidrogênio na presença do ferro (**Equação 1**) (KOPPENOL, 2001; HERMES-LIMA, 2005).



Desta forma, o superóxido e o peróxido de hidrogênio devido à baixa reatividade podem difundir-se a distâncias consideráveis a partir do local de sua formação até reagirem entre si na presença do ferro gerando como produto o oxigênio molecular (O_2), o íon hidroxila e o radical hidroxila, conforme a reação de Haber-Weiss (**Equação 1**) (HERMES-LIMA, 2005). Já o radical hidroxila formado por esta reação, por ser uma das espécies radicalares conhecidas mais reativas, rapidamente oxida os compostos celulares e por isso é considerado a EROs mais perigosa (PERRON e BRUMAGHIM, 2009).

Como visto anteriormente, o ferro, devido a sua capacidade oxido-redutora, é capaz de participar de reações que geram espécies reativas altamente reativas (POLLÁ, POLLÁ e POLLÁ, 2003). E por isso, a perda da homeostase do ferro no organismo devido ao aumento da ingestão deste mineral ou por problemas nos mecanismos celulares e moleculares de regulação da absorção, transporte, incorporação, estocagem e utilização deste mineral, tem sido associada ao processo de envelhecimento natural e, conseqüentemente, as várias doenças crônicas (LEVENSON e TASSABEHJI, 2004; WU et al., 2004).

Segundo a Ingestão Dietética de Referência (IDR) o Limite Superior Tolerável de Ingestão (*Tolerble Upper Intake Level* –UL) corresponde ao maior valor de ingestão diário de um nutriente que não oferece riscos adversos a saúde de quase todos os indivíduos (NAS, 2001). No caso do ferro o UL para pessoas adultas é de 45mg/dia. No Brasil, em cumprimento à Resolução – RDC Nº 344 de 13 de

dezembro de 2002, a fortificação das farinhas de trigo e milho com 4,2 mg de ferro/100g de farinha tornou-se obrigatória em todo o território nacional. Esta resolução teve como objetivo reduzir a incidência da anemia ferropriva, no país. No entanto, indivíduos que apresentem estado nutricional em ferro adequados podem estar sendo expostos ao excesso de ferro dietético, o que poderá resultar em um aumento do estresse oxidativo corporal, nesses indivíduos.

2.2 METABOLISMO DE FERRO

A maior parte do ferro corporal está ligada a hemoglobina das células vermelhas (2 – 2,5 g de ferro no organismo humano). No plasma humano é encontrado apenas 2 - 3 mg de ferro ligado a transferrina. A transferrina é uma proteína plasmática que transporta o ferro na forma de Fe^{3+} (HILTON et al., 2012), para os tecidos alvos, principalmente à medula óssea para a eritropoiese, sendo esta a única fonte de ferro para a síntese de novos eritrócitos (GANZ e NEMETH, 2011). As demais células do organismo necessitam de menos ferro e são capazes de utilizar ferro não ligado a transferrina. Os eritrócitos humanos vivem cerca de 120 dias e, após este período, são degradados nos macrófagos do baço. O ferro exportado pelos macrófagos esplênicos retorna ao plasma, liga-se a transferrina e pode retornar normalmente a síntese de novos eritrócitos. Cerca de 95% do ferro é reciclado pelo processo de degradação das hemácias, desta forma, apenas 5% do ferro do organismo deve ser provido pela dieta (GANZ e NEMETH, 2011).

A deficiência de ferro plasmático, (hipoferremia) resultante da restrição férrica, prejudica a síntese de hemoglobina dos eritrócitos causando a anemia ferropriva, além de provocar disfunções nas demais células do organismo. Por outro lado, o excesso de ferro no plasma, em quantidade superior à capacidade de ligação da transferrina, propicia a formação de complexos de ferro com outras proteínas plasmáticas ou, simplesmente, este permanece na sua forma livre no plasma sanguíneo (GANZ e NEMETH, 2012; HILTON et al., 2012). O excesso de ferro no organismo resulta também no acúmulo deste nos hepatócitos e outras células parênquimais, o que leva a um aumento de produção das EROs e, conseqüentemente, maior geração de danos oxidativos celulares (SIQUEIRA et al., 2012).

Nos mamíferos, a excreção de ferro é inexpressiva, pois não existe um sistema de excreção de ferro capaz de eliminar seu excesso. A perda de ferro no organismo ocorre pela descamação do endotélio intestinal e por pequenas hemorragias. Desta forma, a quantidade de ferro absorvida pelo epitélio intestinal é finamente controlada em sincronia com o estado corporal em ferro (FRAZER e ANDERSON, 2003). Existem quatro proteínas que são reguladas pelo estado de ferro no organismo, as quais exercem papel fundamental na absorção e homeostase corporal do ferro:

1) o transportador de metal bivalente 1 (*divalent metal transporter 1* - DMT1), localizado na membrana das células, que transporta o ferro em sua forma ferrosa (Fe^{2+}) através da membrana apical, do lúmen intestinal para o interior do enterócito (**Figura 3**) (FRAZER e ANDERSON, 2003; ANDERSON, FRAZER e MCLAREN, 2009);

2) A Citocromo *b* duodenal (*Duodenal cytochrome b* – Dcytb), localizado também na membrana apical do enterócito, cujo papel é reduzir o ferro, que está presente na dieta predominantemente na forma férrica (Fe^{3+}) para a forma ferrosa (Fe^{2+}), para então ser transportada pela DMT1 (FRAZER e ANDERSON, 2003; DUNN, SURYO RAHMANTO e RICHARDSON, 2007; ANDERSON, FRAZER e MCLAREN, 2009);

3) A ferroportina, proteína localizada na membrana dos enterócitos (posição basolateral), dos macrófagos esplênicos, dos hepatócitos e das células da placenta, cuja função é exportar o ferro para o plasma sanguíneo (GANZ e NEMETH, 2011);

4) A hefaestina, proteína também localizada na membrana basolateral dos enterócitos, que converte o Fe^{2+} em Fe^{3+} , criando afinidade à transferrina sérica, que o transporta para as células alvo do organismo (DUNN, SURYO RAHMANTO e RICHARDSON, 2007; ANDERSON, FRAZER e MCLAREN, 2009).

A ferroportina exerce uma função fundamental na homeostase do ferro corporal, pois regula a "mobilização" de ferro para o organismo. Quanto maior a concentração de ferroportina na membrana basolateral, maior será o efluxo de ferro dos estoques ou do intestino para a circulação sanguínea, e por isso, a expressão dessa proteína exportadora de ferro nas células é finamente controlada, conforme as

demandas e o estado de ferro no organismo (GANZ e NEMETH, 2011; WARD e KAPLAN, 2012).

Os níveis da proteína ferroportina nas membranas das células são regulados por uma série de fatores em nível de transcrição, tradução e pós-tradução.

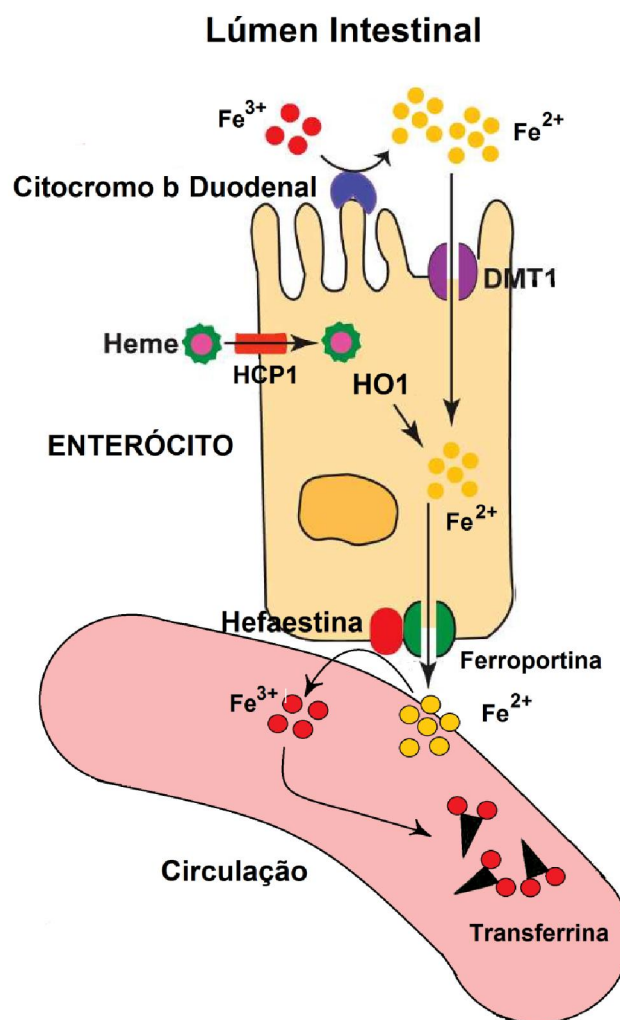


Figura 3. Absorção do ferro hêmico e não-hêmico. O ferro não-hêmico ou inorgânico advindo da dieta na forma férrica (Fe^{3+}) é convertido a sua forma ferrosa (Fe^{2+}) pela citocromo b duodenal presente na membrana apical do enterócito. O Fe^{2+} é então absorvido pelo transportador de metal divalente 1 (*divalent metal transporter 1* - DMT1) localizado na membrana das células. O ferro hêmico é absorvido pela proteína carreadora de grupo heme 1 (*heme carrier protein 1* – HCP1), em seguida o Fe^{2+} é liberado do grupo hêmico pela hemo oxigenase 1 (HO1). Adaptado de Pantopoulos et al. (2012).

A regulação da ferroportina em nível transcricional pode ocorrer pelo fator nuclear (derivado de eritroide-2) tipo 2 [*fator nuclear (erythroid-derived-2) like 2* -

Nfe2l2], conhecido como Nrf2. O Nrf2 é um fator de transcrição cujo papel central é a proteção da célula contra danos oxidativo por ativar a expressão gênica de uma série de enzimas antioxidante e detoxificante. Estudos recentes demonstram que células com o Nrf2 ativado, aumentam o efluxo de ferro por meio do aumento da transcrição da ferroportina (MARRO et al., 2010; HARADA et al., 2011; OKADA et al., 2012).

Os níveis de ferroportina também são regulados pelos níveis de ferro intracelular. A tradução do mRNA da ferroportina é regulada pelo sistema IRE-IRP, que responde diretamente aos níveis de ferro (GALY et al., 2008). Quando os níveis de ferro intracelular estão baixos, a proteína reguladora de ferro 1 ou 2 (*iron regulatory proteins* – IRP1 ou IRP2) torna-se ativa e se complexa aos elementos responsivos ao ferro (*iron-responsive elements* – IRE) (**Figura 4**), sequências específicas de nucleotídeos, sem tradução, que formam estruturas semelhantes a grampos de cabelo localizadas nas extremidades dos mRNAs de várias proteínas ligadas ao metabolismo do ferro. Quando os IREs estão localizados na extremidade 5' do mRNA, o complexo IRE-IRP, formado na deficiência de ferro, impede a tradução da proteína. Entretanto, quando o IRE está localizado na extremidade 3', o complexo IRE-IRP estabiliza a molécula de mRNA, protegendo-a da hidrólise por endonucleases, desta forma, promove a tradução do mRNA (KUHN, 1998; HENTZE, MUCKENTHALER e ANDREWS, 2004). O mRNA da ferroportina, e da ferritina apresentam IRE na extremidade 5', sendo, portanto, a tradução dessas duas proteínas impedida na deficiência de ferro. Por outro lado, os mRNAs do receptor de transferrina 1 e do *DMT1*, que apresentam IRE na extremidade 3', são traduzidos na deficiência de ferro (KUHN, 1998; GALY et al., 2008).

Finalmente, a ferroportina é regulada também em nível pós-tradução pelo principal regulador sistêmico do metabolismo do ferro, a hepcidina. Destes três mecanismos de regulação da ferroportina, o mais importante deles é a hepcidina, por regular os níveis de ferro do organismo (GANZ e NEMETH, 2011).

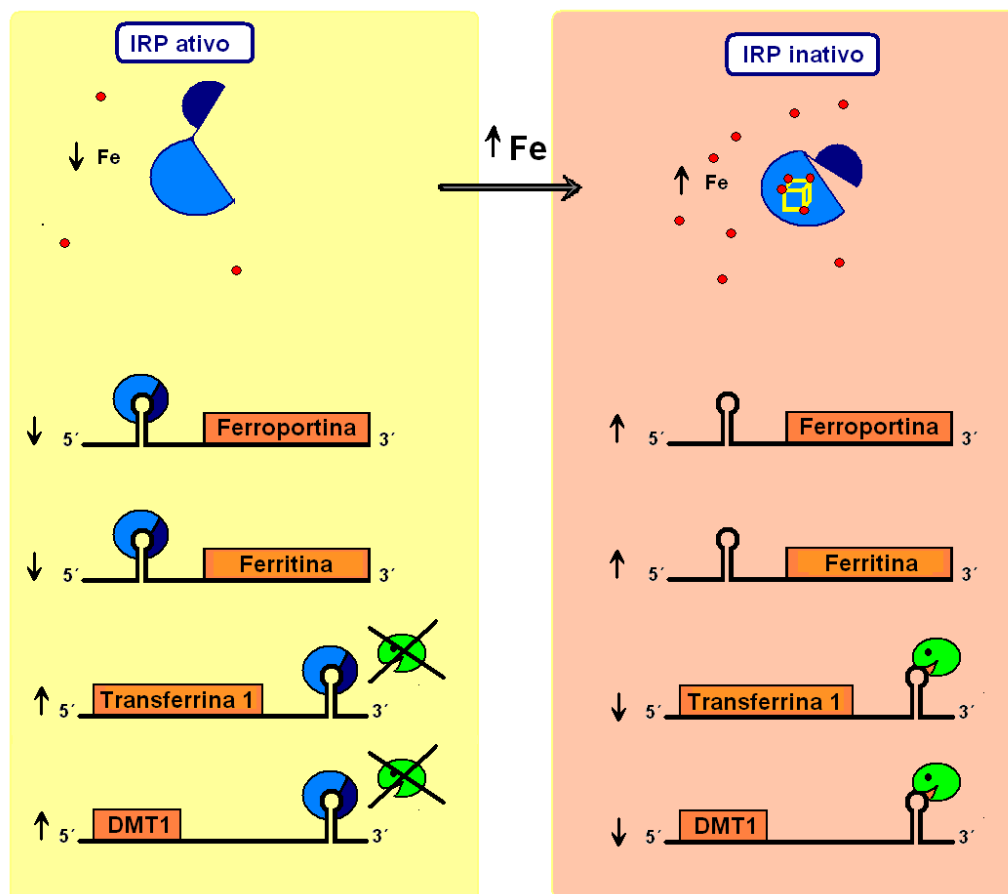


Figura 4. Regulação da tradução pelo sistema IRE/IRP. A proteína IRP torna-se ativa na deficiência de ferro e se liga a sequência IRE, sequência esta que quando localizada na região 5' impedirá a tradução deste mRNA e quando localizada na região 3' impedirá a degradação deste mRNA pelas endonucleases, favorecendo com isso a sua tradução.

A hepcidina é um hormônio polipeptídico de 25 aminoácidos sintetizado principalmente pelos hepatócitos. O estado em ferro no organismo regula a síntese de hepcidina que orchestra a homeostase sistêmica deste mineral. Além do estado corporal em ferro, vários processos fisiológicos e patológicos, dentre estes, processos inflamatórios, eritropoiese, hipóxia e outros, atuam na regulação da síntese de hepcidina hepática (PALSAMY e SUBRAMANIAN, 2011). Uma vez na corrente sanguínea, este hormônio associa-se à ferroportina das membranas celulares. O complexo ferroportina-hepcidina é internalizado e degradado (NEMETH et al., 2004). Desta forma, com o aumento da hepcidina no plasma sanguíneo, e consequente degradação da ferroportina, o ferro absorvido pelos enterócitos, por exemplo, não pode ser lançado no plasma, sendo eliminado do organismo quando

ocorre a descamação intestinal (**Figura 5**). Nos demais órgãos, como no fígado e baço, o aumento da hepcidina desencadeia um acúmulo de ferro nesses tecidos, favorecendo o aumento de danos oxidativo. O acúmulo de ferro no baço impede a reciclagem do ferro das hemácias senescentes, levando à redução da taxa de saturação de transferrina sérica e, como consequência, redução da eritropoiese (GANZ e NEMETH, 2011).

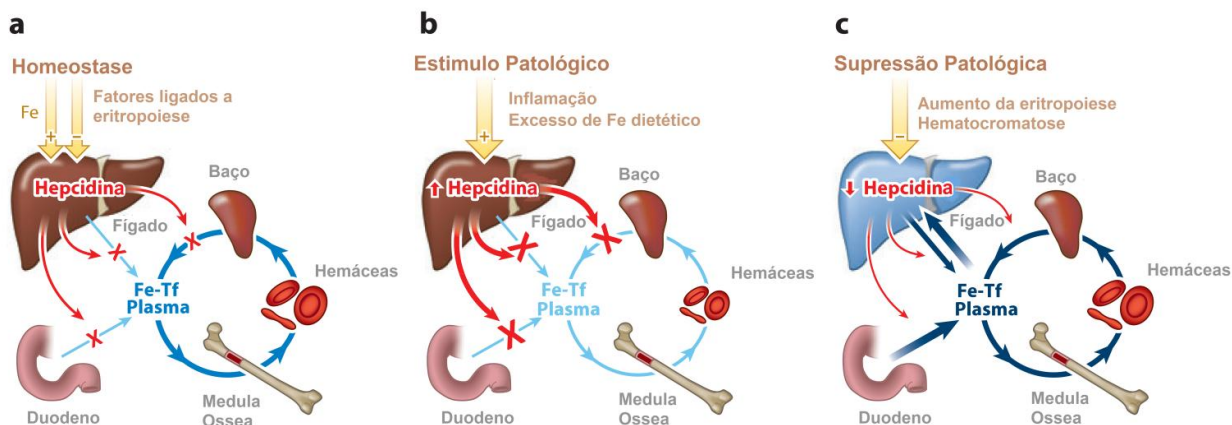


Figura 5. O papel do hepcidina na (a) homeostasia normal de ferro, (b) desordens que promovem restrição de Fe, e (c) desordens de sobrecarga de ferro. O fluxo de ferro está representado em tons de azul, a hepcidina e seus efeitos em vermelho, e os moduladores normais e patológicos da hepcidina em amarelo. Tf: Transferrina. Adaptado de Ganz and Nemeth (2011).

Por outro lado, a redução crônica dos níveis de hepcidina no plasma podem levar à sobrecarga de ferro nos tecidos e, conseqüentemente, à disfunção orgânica e aumento do estresse oxidativo. Pacientes com hemocromatose, doença hereditária, causada por mutação da hemojuvelina (HFE), proteína envolvida na via de sinalização que induz a síntese da hepcidina mediada por ferro (GANZ, 2011; GANZ e NEMETH, 2012), apresentam um aumento da absorção de ferro pelos enterócitos, aumento do ferro sérico e aumento do estoque de ferro hepático e esplênico além de apresentarem aumento de danos oxidativo celulares em relação ao indivíduos saudáveis (GANZ e NEMETH, 2011). Portanto, os níveis séricos desse hormônio, a hepcidina, são fundamentais para a homeostase de ferro no organismo.

O aumento nos níveis de ferro no organismo, causado por um desbalanço nos níveis de hepcidina, pode ser extremamente danoso por causar um aumento do

estresse oxidativo devido a um aumento da geração de EROs (GANZ e NEMETH, 2011).

2.3 ANTIOXIDANTES

2.3.1 Antioxidantes exógenos e endógenos

Devido aos efeitos danosos das EROs, os organismos aeróbicos desenvolveram sistemas moleculares de defesa: as moléculas antioxidantes, capazes de manter o equilíbrio intracelular entre as reações de redução e oxidação (REDOX). O desequilíbrio da produção das EROs e os antioxidantes promovem o estresse oxidativo celular. As moléculas antioxidantes protegem as células sequestrando e/ou detoxificando EROs, bloqueando sua produção, ou complexando-se com os metais que são fonte de elétrons livres (ANDRADE et al., 2005; WOLFE et al., 2008). Alguns destes antioxidantes são endógenos, sintetizados pelo próprio organismo, como algumas enzimas antioxidantes: a Superóxido Desmutase (SOD); Catalase (Cat); Glutathione Peroxidase (GPx); Glutathione Redutase (GR); Glutathione S-transferase (GST), dentre outras. Outros antioxidantes, no entanto, são exógenos, adquiridos pela dieta.

O consumo de frutas e hortaliças tem sido associado positivamente ao aumento da capacidade antioxidante total do organismo e a redução das doenças crônicas (WOLFE et al., 2008; HU et al., 2013). O potencial efeito benéfico desses alimentos é atribuído à presença de moléculas advindas do metabolismo secundários dos vegetais, como os polifenóis: fenóis, ácidos fenólicos e flavonóides; tocoferóis; ácido fólico; ácido ascórbico; carotenóides; e esteróis (GARCIA-ALONSO, GUIDARELLI e PERIAGO, 2007; GARCIA-ALONSO, 2007; ROESLER et al., 2007; ROESLER, 2007; WOLFE et al., 2008; WOLFE, 2008; PERRON e BRUMAGHIM, 2009; PERRON, 2009). Os antioxidantes dos vegetais propiciam uma série de benefícios a saúde pela prevenção de danos oxidativos atribuídos aos EROs.

Os polifenóis são compostos que possuem em sua estrutura grupos hidroxila ligado a um ou mais anéis aromáticos e são conhecidos por terem atividade antioxidante, antimutagênica e antimicrobiana (SÁNCHEZ-MORENO, LARRAURI e SAURA-CALIXTO, 1998; HOGAN et al., 2010). Estudos têm demonstrado que

alguns polifenóis específicos atuam sobre os radicais superóxidos e radicais hidroxilas, reduzindo a peroxidação de lipídeos (PEARSON et al., 2008; PERRON e BRUMAGHIM, 2009). Além disso, os polifenóis apresentam a capacidade de se ligarem ao Fe prevenindo as reações de formação de EROs (YOSHINO e MURAKAMI, 1998; PERRON e BRUMAGHIM, 2009). Os polifenóis, devido a sua estrutura, são potencialmente antioxidantes tanto pela redução como pela prevenção da formação de oxidantes. No entanto, por outro lado, os polifenóis também têm demonstrado ter atividade pró-oxidante e em alguns casos esta atividade pró-oxidante pode ser benéfica por promover o aumento da expressão de enzimas detoxificantes e antioxidante, por ativar o Nrf2 (ERLANK et al., 2011; KRYCH e GEBICKA, 2013).

As enzimas antioxidantes sintetizadas pelo próprio organismo também desempenham um papel fundamental na proteção antioxidante. A Superóxido Dismutase é uma família de metaloproteína, que pode conter cobre-zinco, manganês ou ferro em sua estrutura. Seu papel principal é catalisar a reação que converte o radical superóxido (O_2^{\cdot}) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio molecular (O_2) (**Figura 6**) (MRUK et al., 2002; HERMES-LIMA, 2005). O H_2O_2 , advindo da reação catalizada pela SOD ou de outras reações já citadas anteriormente, atravessa a membrana celular facilmente, sendo então convertido a H_2O pela catalase ou pela Glutaciona Peroxidase. A GPx é uma família de selenoenzima citoplasmática que apresenta uma seleniocisteína localizada em seu centro catalítico e se utiliza da glutaciona (GSH) para reduzir o peróxido de hidrogênio (MRUK et al., 2002; BRIGELIUS-FLOHÉ e MAIORINO, 2013). A GSH é reciclada pela Glutaciona Redutase (GR), que se utiliza do poder redutor da Nicotinamida Adenina Dinucleótideo Fosfato (*nicotinamide adenine dinucleotide phosphate* - NADPH) (HERMES-LIMA, 2005).

A Glutaciona S-transferase exerce também um papel antioxidante importante por promover a detoxificação celular de vários compostos xenobióticos pela conjugação com a GSH (KILTY et al., 1998; HERMES-LIMA, 2005). A GST é uma superfamília polimórfica com enzimas multifuncionais existentes na forma homodimera e heterodimera e que se localiza no citoplasma (HABDOUS et al., 2002).

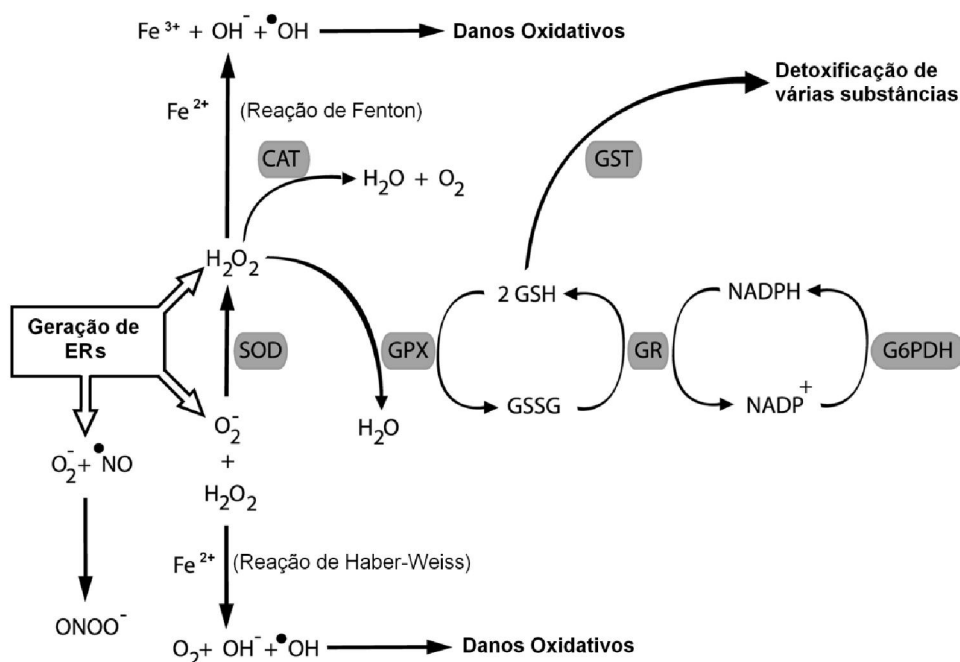


Figura 6. Enzimas antioxidantes na proteção das células contra Espécies Reativas de Oxigênio (EROs). As abreviações SOD, CAT, GST, GR, GPX e G6PDH representam respectivamente: Superóxido Desmutase, Catalase, Glutationa S-transferase, Glutationa Redutase, Glutationa Peroxidase e Glicose-6-fosfato Desidrogenase. Retirado de Hermes-Lima (2005)

2.3.2 Fator nuclear (derivado de eritroide-2) tipo 2 (Nrf2)

O Nrf2 tem demonstrado ser um importante fator de transcrição envolvido na proteção de tecidos contra danos oxidativos por promover a expressão de inúmeras enzimas antioxidantes (CHAN e KAN, 1999; RAMOS-GOMEZ et al., 2001; CHEN e KONG, 2004; SURH et al., 2005; DINKOVA-KOSTOVA e TALALAY, 2008; LAU et al., 2008; BAYRAM et al., 2012), inclusive quando os danos são causados pelo excesso de ferro (SILVA-GOMES et al., 2013). O Nrf2 é um fator nuclear pertencente a subfamília *cap`n`collar* (CNC) que possui em sua porção C-terminal um domínio chamado Neh1, o qual tem a capacidade de se ligar ao DNA por meio de zíper de leucina (b-Zip). O Nrf2 possui este nome por ser homólogo ao fator de transcrição eritroide 2 - p45, uma proteína importante na transcrição de genes específicos de eritrócitos. Além do domínio Neh1 existem mais 5 domínios, os Neh2-6. O Neh2 se liga ao domínio Kelch do Keap1, que é um regulador negativo do Nrf2 presente no citoplasma (LAU et al., 2008; PAMPLONA e COSTANTINI, 2011). O Neh 3 é responsável por ativar a transcrição dos genes que o Nrf2 regula. O Neh4 e

5 são ricos em resíduos ácidos que interagem com a proteína ligante do Elemento Responsivo Adenosina Monofosfato cíclico (AMPC) (*cAMP Responsive Element Binding protein* - CREB). O domínio Neh6 apresenta vários resíduos de serina, no entanto, pouco se sabe a seu respeito (LAU et al., 2008).

O Keap 1 (*Kelch-like ECH-associated protein 1*) é rico em resíduos de cisteínas e três deles exercem papéis fundamentais: a C152 é importante para ativar o Nrf2 e a C273 ou C288 são necessárias para reprimir o Nrf2. Quando a célula fica exposta ao estresse oxidativo os resíduos de cisteína do Keap1 ligado ao Nrf2 no citoplasma são oxidados perdendo a afinidade com o Nrf2, este último, uma vez livre, migra para o núcleo (**Figura 7**) (CHEN e KONG, 2004; ERLANK et al., 2011). No núcleo o Nrf2 forma um heterodímero com a proteína Maf e o complexo liga-se as regiões conhecidas como elementos de resposta antioxidante (*antioxidant response element* – ARE) localizadas nas regiões promotoras de vários genes antioxidantes e detoxificantes, tais como a Glutathione Peroxidase (GPx), a Catalase (Cat), a Heme Oxigenase 1 (HO1), a NADPH: quinone oxiredutase 1 [NQO1], a Superóxido Dismutase 1 (SOD1) e a Tioiredoxina redutase (TrxR) (CHAN e KAN, 1999; MCMAHON et al., 2001; BANNING et al., 2005; SURH et al., 2005). A sequência consenso do ARE é a seguinte: T^A/CAnn^A/G TGA^C/TnnGC^A/G^A/T^A/T^A/T, onde n pode ser qualquer nucleotídeo (WASSERMAN e FAHL, 1997), no entanto, alguns trabalhos contrariam esta sequência consenso. Em baixas condições de estresse, quando o estado redox da célula é mantido, o Keap1 medeia a degradação do Nrf2 por meio da ubiquitinação, razão pela qual o Nrf2 torna-se instável nessas condições. A ubiquitinação é um processo em que a ubiquitina, uma proteína com 76 amino ácidos, é covalentemente adicionada a um resíduo de lisina das proteínas em geral, no caso, mediando uma maquinaria de degradação que degrada o Nrf2. Desta forma, o Keap1 é responsável por controlar o papel do Nrf2 na célula (DINKOVA-KOSTOVA e TALALAY, 2008).

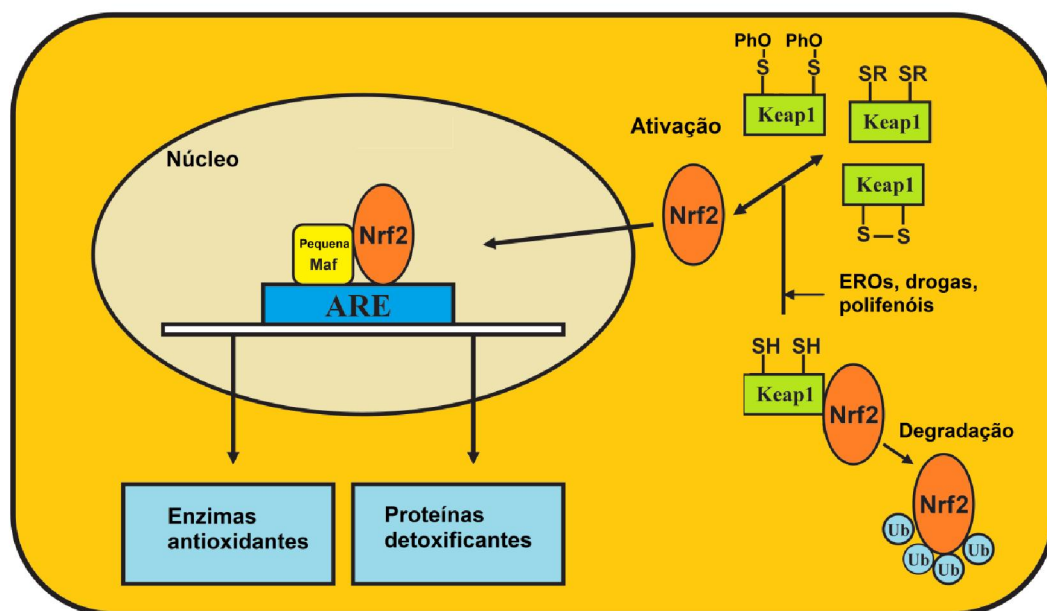
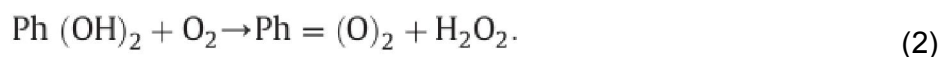


Figura 7. Ativação do fator de transcrição Nrf2. O Nrf2 é mantido no citoplasma complexado à proteína de inativação (*Kelch-like ECH-associated protein 1* - Keap1). Ubiquitina (Ub); espécies reativas de oxigênio (EROs); elementos de resposta antioxidante (*antioxidant response element* - ARE). Resíduo de serina (S); Polifenol (PhO). Adaptado de Pamplona and Costantini (2011) e Erlank et al (2011).

Nos últimos cinquenta anos têm sido identificados inúmeros compostos presentes nas plantas que apresentam um efeito preventivo ao câncer (HU et al., 2013). O interessante é que, a vários destes compostos tem-se atribuído a capacidade de indução do Nrf2 (CHO et al., 2011; BAYRAM et al., 2012), como por exemplo, o sulforafano presente no brócolis (FAHEY et al., 2002; HARADA et al., 2011), a catequina presente no chá verde (MIRANDA-VILELA, RESCK e GRISOLIA, 2008; SAHIN et al., 2010), a curcumina presente no açafrão da Índia (BALOGUN et al., 2003; YANG et al., 2009; ERLANK et al., 2011), o resveratrol, presente na uva, maçã, amendoim e mirtilo (CHEN et al., 2005; SURH et al., 2005; ERLANK et al., 2011; PALSAMY e SUBRAMANIAN, 2011).

Erlank e colegas (2011) sugerem em seu trabalho que a ativação do Nrf2 pelos polifenóis se deve tanto pela oxidação ou doação de um alcalóide da cisteína específica do Keap1 que promove a liberação do Nrf2, como também pela produção de peróxido de hidrogênio como está demonstrado pela **Equação 2**.



2.3.3 A Catalase

Estudo realizado por Chan e Kan (1999) demonstrou que ratos com o gene Nrf2 nocauteado apresentam uma redução na expressão de catalase, uma enzima “venerável” segundo Kirkman e Gaetani (2007), devido ao seu papel antioxidante celular. A catalase é uma das enzimas conhecidas a mais tempo, desde o século XIX (KIRKMAN e GAETANI, 2007).

A catalase humana é um tetrâmero com subunidades de 60kDa, cada uma contendo 527 resíduos de aminoácidos e um grupo hêmico com Fe^{3+} . Seu gene se localiza na posição 11 do cromossomo 13 (NICHOLLS, 2012; GÓTH e NAGY, 2013). Esta enzima se localiza nos peroxissomos de quase todas as células do organismo, principalmente do fígado (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007), e catalisa a decomposição do peróxido de hidrogênio em oxigênio e água (**Equação 3**) (HERMES-LIMA, 2005; NICHOLLS, 2012).



A decomposição do peróxido de hidrogênio pela catalase ocorre em duas etapas. Na primeira etapa, o peróxido de hidrogênio é reduzido a H_2O pela doação de um elétron do Fe^{3+} do grupo hêmico, formando o chamado complexo I. O complexo I, com o Fe^{4+} ligado ao oxigênio advindo da primeira molécula de peróxido de hidrogênio, na segunda etapa, é novamente reduzido a Fe^{3+} pela reação com a segunda molécula de peróxido de hidrogênio formando um oxigênio molecular (O_2) liberando então outra molécula de água (H_2O) (KIRKMAN e GAETANI, 2007). O complexo I, às vezes, pode ser convertida ao complexo II, uma forma inativa da catalase. Essa reação de conversão do complexo I a II ocorre ou devido ao recebimento de um elétron ou de um elétron e um próton, gerando o hidroxiferril no segundo caso. O complexo II se reverte espontaneamente ao complexo I, mas de forma relativamente lenta. A NADPH é capaz de se ligar a catalase e previne a formação do complexo II, evitando a inativação da catalase (KIRKMAN e GAETANI, 2007).

Em caso de deficiência da catalase, como ocorre na acatalasemia, o aumento dos níveis de peróxido de hidrogênio desencadeia danos oxidativos para as células, proteína e DNA (GÓTH e NAGY, 2013).

Estudo recente de Krych e Gebicka (2013) demonstra *in vitro* que a atividade da catalase é inibida por flavonoides, principalmente pela mircetina, (-)-Epicatequina galato e (-)-Epigallocatequina galato. Esta inibição se deve, pelo menos parcialmente, devido à formação de pontes de hidrogênio entre a catalase e os flavonóides. Segundo Krych e Gebicka (2013), na presença de flavonóides submetidos a auto-oxidação, a catalase é convertida a sua forma inativa: o complexo II.

2.4 O CERRADO

O Cerrado é o bioma que está localizado na região central do Brasil e possui uma extensão de aproximadamente 2 milhões de km² (**Figura 8**) (MACHADO et al., 2004; CARVALHO, JÚNIOR e FERREIRA, 2009) o que o torna uma das maiores vegetações neotropicais de savana do mundo. Além da sua extensão, o Cerrado possui uma das maiores biodiversidades do Brasil e uma das maiores biodiversidades de savanas do mundo quando se considera alguns táxons de vertebrados, além de apresentar um elevado número de espécies de plantas e animais endêmicas (CASTRO et al., 1999; MACHADO et al., 2004). Segundo Machado et al. (2004) a riqueza em sua biodiversidade se deve a heterogeneidade espacial, pois este bioma brasileiro apresenta diferentes fisionomias vegetais como campos mais abertos até matas de galerias (**Figura 9**).

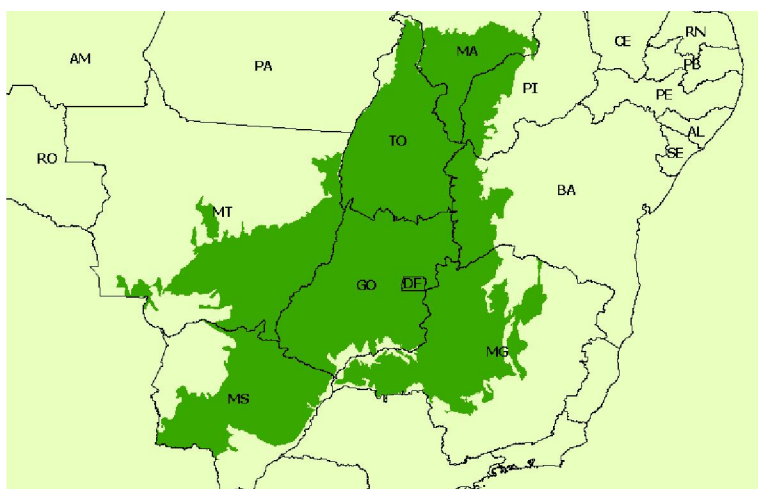


Figura 8. Área correspondente ao bioma Cerrado no Brasil (IBGE) apud Machado et al. (2004).

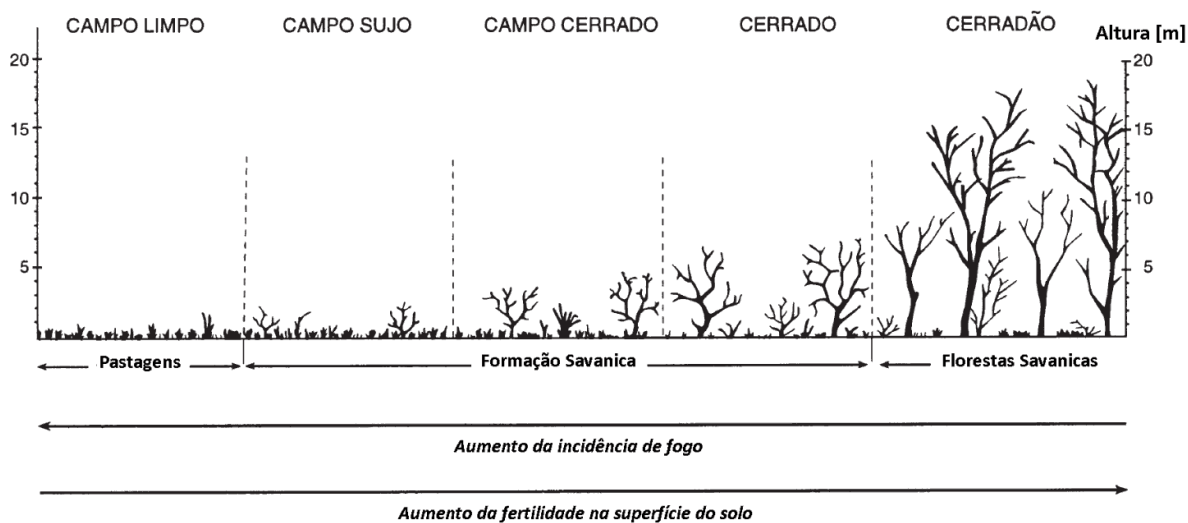


Figura 9. Diferentes fisionomias do bioma Cerrado. Esquema demonstrando os diferentes tipos de formação e a presença dos diferentes tipos de vegetação deste bioma. Adaptado de Furley (1999).

Ao longo do tempo, a região sul do continente americano, aonde se localiza o Cerrado, sofreu enormemente com mudanças climáticas extremas o que resultou na transformação da vegetação endêmica desde o último período glacial até o Holoceno. Os vestígios demonstram períodos muito secos, sinais de queimada e temperaturas muito frias incluindo geadas (FURLEY, 1999; FERREIRA e HUETE, 2004). Estes eventos podem explicar o surgimento de espécies de vegetais no Cerrado com alta capacidade de resistir ao fogo, às mudanças na umidade (KLINK e MACHADO, 2005) e a solos ácido, pobres em nutrientes, profundos, porosos e com microaglomerações de óxidos de ferro (FURLEY, 1999; HARIDASAN, 2008). A resistência a todos estes fatores abióticos adversos, conferiu à flora do Cerrado um metabolismo adaptado contendo um rico banco de moléculas bioativas pouco exploradas (MESQUITA et al., 2009).

Embora o Cerrado seja um bioma muito rico em espécies nativas que, provavelmente, apresenta grande variedade de moléculas bioativas (SAMPAIO e NOGUEIRA, 2006; ROESLERI et al., 2007; MESQUITA et al., 2009), este bioma tem sofrido fortemente efeitos do descaso humano. Digno de nota é o fato de que o Cerrado é o único bioma brasileiro que não foi citado na Constituição Federal como patrimônio nacional em 1988 (BRASIL, 1988).

Segundo Machado e colaboradores (2004) o Cerrado brasileiro tem sido degradado a uma taxa média anual de 1,1%, o que equivale a cerca de 2,2 milhões de hectares de vegetação desmatado anualmente. Machado et al. (2004) afirma ainda, que se a taxa de destruição do Cerrado continuar nestes valores o Cerrado sucumbirá em 2030. A sua degradação se deve principalmente à criação de gado e a plantações (MACHADO et al., 2004; CARVALHO, JÚNIOR e FERREIRA, 2009). Segundo Carvalho e colaboradores (2009), os efeitos negativos da ação humana sobre esse bioma são mais graves no caso de plantações, quando comparado a pastagens, pois a preparação do solo para as plantações é capaz de extinguir as espécie nativa de vegetais. As **Figuras 8 e 10** mostram a área de abrangência do Cerrado e a sua área de degradação.

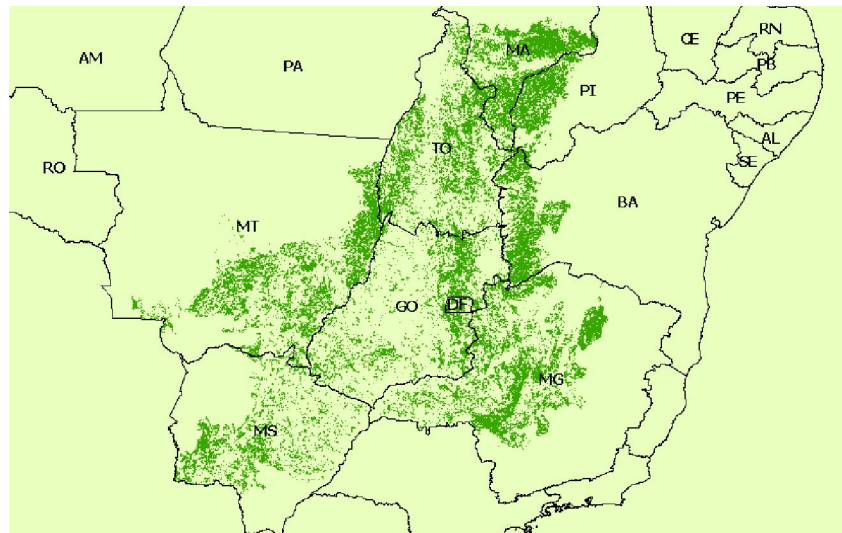


Figura 10. Mapa da cobertura atual do Cerrado. Mapa resultante de análise de imagens de satélites demonstrando as áreas desmatadas e a vegetação remanescente do Cerrado brasileiro (MACHADO et al., 2004).

Diversos são os frutos do Cerrado consumidos *in natura* ou utilizados na gastronomia regional, na forma de doces, sorvetes, geleias, bolos (SILVA et al., 2001). Alguns frutos do Cerrado são também utilizados na medicina popular (ARTICULAÇÃO PACARI, 2010). O araticum (*Annona crassiflora* Mart.), o baru (*Dipteryx alata* Vog.), a cagaita (*Eugenia dysenterica* DC.), o ingá (*Inga laurina*), o jatobá-do-Cerrado (*Hymenaea stigonocarpa* Mart.), o jenipapo (*Genipa americana* L.), a jurubeba (*Solanum paniculatum* L.), a lobeira (*Solanum lycocarpum* A.St.-Hil.), a mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes), o tucum-do-cerrado (*Bactris setosa* Mart.); o cajuzinho-do-Cerrado (*Anacardium humile* St. Hil.); e a guariroba (*Syagrus*

oleracea) são alguns exemplos de espécies do Cerrado utilizadas na culinária regional (**Figura 11**).

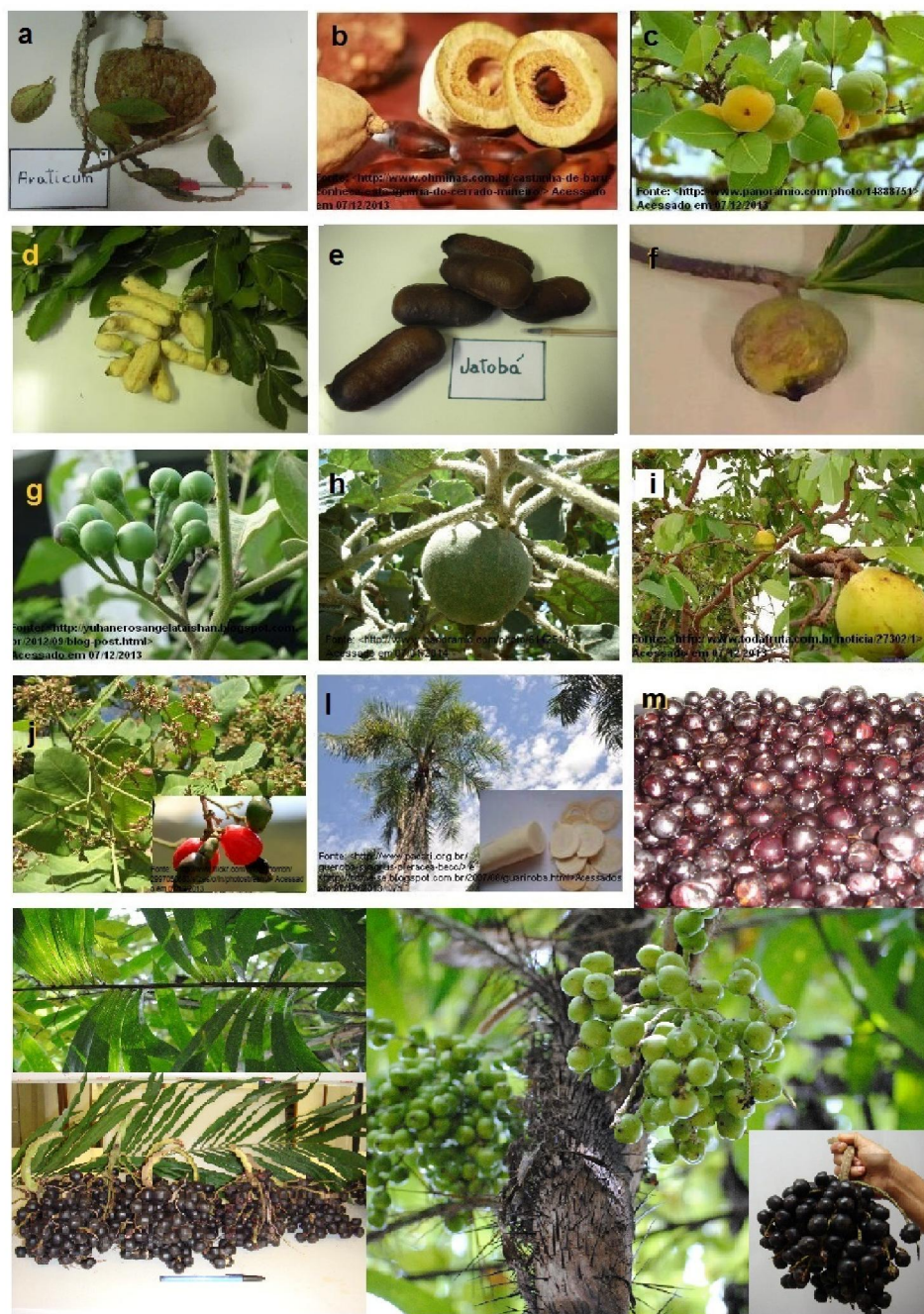


Figura 11. Algumas espécies nativas do cerrado utilizadas no consumo humano. (a) Araticum (*Annona crassiflora* Mart.), (b) baru (*Dipteryx alata* Vog.), (c) cagaita (*Eugenia dysenterica* DC.), (d) ingá (*Inga laurina*), (e) jatobá-do-Cerrado (*Hymenaea stigonocarpa* Mart.), (f) jenipapo (*Genipa americana* L.), (g) jurubeba (*Solanum paniculatum* L.), (h) lobeira (*Solanum lycocarpum* A.St.-Hil.), (i) mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes), (j) cajuzinho-do-cerrado (*Anacardium humile* St. Hil.), (l) guariroba (*Syagrus oleracea*) e (m) tucum-do-Cerrado (*Bactris setosa* Mart.).

Quadro 1. Estudos sobre o potencial nutritivo e farmacológico das plantas do cerrado.

Parte/ Órgão	Atividade	Composto	Referência
Araticum [<i>Annona crassiflora</i> Mart.]			
Polpa do fruto	<p>- antioxidante (ABTS, DPPH, ORAC e β-caroteno/ácido linoleico)</p> <p>- inibidor de α-amilase and α-glicosidase (antidiabético)</p> <p>- nutricional</p> <p>- antimutagenico</p> <p>- pro-oxidante</p> <p>- inibidores de enzimas da cadeia transportadora de elétrons</p> <p>- mutagênico</p> <p>- moluscicida (<i>Biomphalaria glabrata</i>)</p> <p>- lipasica</p>	<p>-Ácido graxos:</p> <ul style="list-style-type: none"> • ácido Málico • ácido quinico • ácido palmitoleico • ácido palmítico • ácido mirístico • ácido oleico • ácido esteárico • ácido linolênico • ácido linoleico <p>- Lípideo</p> <p>- Fibras Solúveis e Insolúveis</p> <p>Carboidratos:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Sacarose • Frutose • glicose • [hexose-H₂O-H], [hexose-H], [2 hexose-H₂O-H], [3 hexose-2 H₂O-H], [3 Hexose-H₂O-H] e [4 Hexose-H₂O-H] <p>- Proteína</p> <p>-Minerais: (cálcio, potássio, fósforo, magnésio, ferro, manganês, zinco, cobre e sódio)</p> <p>- Vitaminas A, C, B1 e B2</p> <p>-carotenóides (β-caroteno e licopeno)</p> <p>-flavonoides totais</p> <p>-polifenóis:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Kaempferol (kaempferol-3-0-galactosideo; kaempferol-3-0-glucosideo; e kaempferol-3-0-arabionose-glicose) • Quercetina (quercetina-3-0-arabinosideo; quercetina-3-0-arabinosil arabinosideo; e quercetina-3-0-arabinosil galactosideo) • Catequina 	<p>-Silva et al., 2013. Bioprocess and Biosystems Engineering. In press. 8 setembro</p> <p>-Silva et al., 2013. Journal of the Science of Food and Agriculture. In press. 21 June 2013</p> <p>-Villela et al., 2013. Food Science and Technology. 33 (3): 417-423.</p> <p>- Souza et al., 2012. Food Chemistry. 134: 381-386.</p> <p>-Oliveira et al., 2012. Food Research Interantional. 48: 170-179</p> <p>-Corrêa et al., 2011. Food Research International. 44: 2385 - 2390</p> <p>-Gonçalves et al., 2010. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 58: 4666-4674.</p> <p>-Dragano et al., 2010. Plant Foods Human Nutrition. 65: 319-325</p> <p>- Genovese et al., 2008. Food Science and Technology International. 14 (3): 207-214.</p> <p>-Roesler et al., 2007. Food Chemistry. 104: 1048-1054</p> <p>- Roesler et al., 2007. Ciência e Tecnologia dos Alimentos 27: 53-60</p> <p>-Roesler et al., 2007. Journal of Food Science-Food Chemistry and Toxicology.71 (2): C102-C107.</p> <p>-Ferreira et al., 2006. Brazilian Journal of Biology, 68 (1): 141-147</p> <p>-Santos and Sant'Ana, 2001. Phytomedicine. 8 (2): 115-120</p> <p>-Santos and Salatino, 2000. Phytochemistry, 55:567-573.</p>
Baru [<i>Dipteryx alata</i> Vog.]			

Amendoa	<ul style="list-style-type: none"> - analgésico (na coluna) - antioxidante em ratos estressados com ferro - inibe a formação de melanina - anti-reumático - propriedades sudoríferas, tônicas e reguladoras da menstruação - inibe atividades mediadas por acetil colina em animais 	<ul style="list-style-type: none"> - lupeol, lupen-3-onabetulina (Triterpenos pentacíclicos) -ácido elágico -ácido cafeico -ácido p-coumaric -ácido gálico -ácido hidroxibenzoico -catequina -ácido ferrulico -epicatequina -antocianinas -flavonoides - ácido fítico - tanino - Ca, Fe, Zn, Cu, N, P e S - ácidos graxos: oléico, linoléico, ácidos palmítico, lignocérico, esteárico, behênico, gadoleico, araquítico, Omega 3 e Omega 6. - vitaminas: α-tocoferol - beta-farneseno -proteína - carboidratos - fibras alimentares 	<ul style="list-style-type: none"> -Siqueira et al., 2012. Food Res. Int. 45: 427-433 -Lemos ET al., 2012. Food Res. Int. 48: 592-597 - Freitas e Naves, 2010. Rev. Nutr., 23: 269-279 - Vera et al., 2009. Rev. Bras. Frutic. 31: 112-118 - Takemoto et al., 2001. Revista do Instituto Adolfo Lutz, 60: 113-117 - Mattos et al., 1988. Acta Amazônica, Manaus, 18: 349-350 - Barros, 1982. Flora medicinal do Distrito Federal. Brasil Florestal, 12: 35-45 - Ferreira, 1980. Informe Agropecuário, 6: 19-23 - Kaplan et al. 1966. Anais da Academia Brasileira de Ciências e Letras, 38: 420 - Correa, 1931. Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 2
Cagaita [<i>Eugenia dysenterica</i> DC.]			
Polpa/ Casca	<ul style="list-style-type: none"> - inibidor de α-amilase e α-glicosideo (antidiabético) - nutricional -antioxidante (DPPH, ORAC e β-caroteno/ácido linoleico) 	<ul style="list-style-type: none"> -Polifenóis (e fenólicos totais) <ul style="list-style-type: none"> • catequina • quercetina • kaempferol • ácido elágico -vitamina C -proteína -lipídios -cinzas -açúcares totais 	<ul style="list-style-type: none"> - Gonçalves et al., 2010. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 58: 4666-4674. - Genovese et al., 2008. Food Science and Technology International. 14 (3): 207-214. - Roesler et al., 2007. Ciênc. Tecnol. Aliment. 27: 53-60
Cajuzinho-do-cerrado [<i>Anacardium humile</i> St. Hil.]			
Pseudofruto	<ul style="list-style-type: none"> -antioxidante (análise voltamétrica) 	<ul style="list-style-type: none"> - vitamina c 	<ul style="list-style-type: none"> - Silva et al., 2004. Pesquisa Agropecuária Tropical, 34:9-14 - Alves et al., 2004. 31ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química (SBQ), pôster
Ingá-branco [<i>Inga laurina</i>]			

Não foram encontrados trabalhos realizados com a fruta (polpa) do Ingá-branco nas bases de Science Direct e Pub Med utilizando-se do termo " <i>Ingá laurina</i> ", acessado em 06/12/2013			
Guariroba [<i>Syagrus oleracea</i>]			
Palmito	- Tônico (medicina popular) - agente antiestérico (medicina popular) - estomático (medicina popular) - carminativo (medicina popular)	-	- Plotkin and Balick, 1984. Journal of Ethnopharmacology. 10: 167-179
Jatobá-do-cerrado [<i>Hymenaea stigonocarpa</i> Mart.]			
Fruto	- nutricional	- ácidos diterpeno - proteínas - lipídeos - cinzas - fibras alimentares solúveis - fibras alimentares insolúveis - carboidratos	- Silva <i>et al.</i> , 2001. Ciência e Tecnologia de Alimentos, 21: 176-182
Jenipapo [<i>Genipa americana</i> L.]			
Polpa / casca	- bactericida, germicida - antioxidante (ABTS)	- fenólicos totais - ácido ascórbico - carotenoides (β -caroteno e licopeno) - umidade - proteína - lipídeos - carboidratos - fibras - minerais: <ul style="list-style-type: none"> • cálcio • potássio • fósforo • magnésio • ferro • manganês • zinco • cobre • sódio 	- Souza <i>et al.</i> , 2012. Food Chemistry. 134: 381-386. - EMBRAPA, 2010. Frutas nativas da Região Centro-Oeste.

Fruto verde	- anti-inflamatória, antianêmica	- ferro e vitamina C	- Brasil, 2002. Alimentos Regionais Brasileiros
Fruto e folhas	- antitumoral	- genipina	- Ueda <i>et al.</i> , 1991. Journal of Natural Products, v. 54, p. 1677-1680.
Fruto	- baixa atividade antioxidante (DPPH)		- Resende <i>et al.</i> , 2009. Fenólicos totais e atividade antioxidante de frutas tropicais da Bahia, 32 ° Reunião da Sociedade Brasileira de Química
Jurubeba [<i>Solanum paniculatum</i> L.]			
Fruto	- coagulante	- alcalóides	- Burguer <i>et al.</i> 2007. Avaliação da atividade coagulante de extratos fracionados dos frutos de <i>solanum paniculatum</i> L. (solanaceae). 5º Seminário de Iniciação Científica. UEG. Disponível em: < http://www.prp.ueg.br/06v1/conteudo/pesquisa/inic-cien/eventos/sic2007/flashsic2007/arquivos/resumos/resumo16.pdf >. Acesso em: 10 nov. 2010.
Fruto e folhas	- antioxidante	- ácidos graxos e esteróides como o lanol, campesterol, estigmasterol, estigmastenol, sistosterol e tremulona, além da solavetivona	- Coutinho, EMO. 2009. Estudo fitoquímico e de atividade biológica de espécies de <i>solanum</i> (solanaceae). 172f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.
Lobeira [<i>Solanum lycocarpum</i> Ruiz & Pav.]			
Fruto	- hipoglicemiantes, - hipocolesterolêmicos - controle da obesidade - teratogênico	- solasonina - solamargina - fenóis totais	- Yoshikawa <i>et al.</i> , 2007. J. Nat. Prod., 7, 210-214 - Peters <i>et al.</i> , 2007. Bol. Cent. Biol. Reprod., 26: 1/2- 25-27 - Maruo <i>et al.</i> , 2003a. Phytomedicine, 10: 48–52 - Mauro <i>et al.</i> , 2003b. Neurotoxicology and Teratology 25: 627–631 - Chang <i>et al.</i> , 2002; Journal of Ethnopharmacology 81: 265- 269 - Dall'Agnol, R., Poser, G.L., 2000. Journal of Ethnopharmacology, 71: 337- 341. - Correa <i>et al.</i> , 2000. Ciênc. Agrotec., Lavras, 24: 130-135

Mangaba [<i>Hancornia speciosa</i> Gomes]			
Casca	<p>-gastrite</p> <p>-hipertensão</p> <p>-doenças inflamatórias</p> <p>-anti <i>Helicobacter pylori</i></p> <p>-doenças pulmonares</p> <p>-tuberculose</p> <p>-diabetes</p> <p>-perda de peso</p> <p>-dermatite</p> <p>-doenças hepáticas</p> <p>- adstringente</p>	<p>-catequina</p> <p>-ácido clorogenico</p> <p>-ácidos fenólicos</p> <p>-catequinas</p> <p>-proantocianidinas</p>	<p>- Almeida <i>et al.</i> (<i>apud</i> Moraes <i>et al.</i>, 2008. J Ethnopharm 120: 161–168</p> <p>- Moraes <i>et al.</i>, 2008. J Ethnopharm 120: 161–168</p> <p>- Hirschmann <i>and</i> Arias (<i>apud</i> Moraes <i>et al.</i>, 2008. J Ethnopharm 120:161–168)</p> <p>-Pott <i>and</i> Pott (<i>apud</i> Moraes <i>et al.</i>, 2008. J Ethnopharm 120:161–168)</p> <p>- Mors <i>et al.</i> (<i>apud</i> Moraes <i>et al.</i> 2008. J Ethnopharm 120:161–168)</p> <p>- Rodrigues <i>and</i> Carvalho (<i>apud</i> Moraes <i>et al.</i> 2008. J Ethnopharm 120: 161–168)</p>
Fruto	<p>-antioxidante <i>in vitro</i> (DPPH e ABTS)</p>	<p>-vitamina c</p> <p>-fenolicos totais</p> <p>-total antocianinas</p> <p>-flavonoides amarelos</p> <p>-carotenóides totais</p> <p>-compostos voláteis:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Fruto verde: <ul style="list-style-type: none"> -1-octen-3-ol -(Z)-linalool oxide -(AEBI)-linalool oxide -linalool -2-phenylethanol -α-terpineol -geraniol - hexadecanal - octadecanol • Fruto em processo de maturação: <ul style="list-style-type: none"> -ethyl propanoate -n-propyl acetate -3-methyl-3-buten-1-ol -2-methyl propyl acetate -furfural -(Z)-3-hexenol -1-hexanol -3-methyl-3-buten-1-yl acetate -(Z)-3-hexen-1-yl acetate -n-hexyl acetate - (Z)-linalool oxide -(AEBI)-linalool oxide -linalool -2-phenylethanol 	<p>-Almeida <i>et al.</i>, 2011. Food Research International, 44: 2155-2159</p> <p>- Rufino <i>et al.</i>, 2009. Food Chemistry, 114: 693–695</p> <p>-Sampaio <i>and</i> Nogueira, 2006. Food Chemistry, 95: 606-610</p>

Fruto		-a-terpineol (2.5%); • - Fruto Maduro: -3-hydroxy-2- - Butanone -2,4,5-trimethyl-1,3- dioxolane -3-methyl-3-buten-1-ol -3-methyl-1-butanol -furfural -3-methyl-1-butanyl acetate -3-methyl-3-buten-1-yl acetate	
Tucum-do-cerrado [<i>Bactris setosa</i> Mart.]			
Não foram encontrados trabalhos realizados com a fruta do tucum-do-cerrado nas bases de Science Direct e Pub Med utilizando-se do termo "Bactris setosa", acessado em 06/12/2013			

Tais estudos sugerem um alto potencial em bioativos presente nas plantas nativas do Cerrado, entretanto, as distintas metodologias de análise empregadas bem como as diferentes unidades nas quais os valores foram expressos dificultam a comparação entre espécies de plantas consagradas na literatura, com reconhecida atividade antioxidante, como por exemplo, a maçã vermelha (EBERHARDT, LEE e LIU, 2000; SUN et al., 2002; LEONTOWICZ et al., 2003; LIU, LIU e CHEN, 2005; WOLFE e LIU, 2007).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve como objetivo preliminar, comparar a atividade antioxidante de partes comestíveis de doze plantas nativas do Cerrado com a da maçã vermelha e, como objetivo principal, avaliar os efeitos do consumo diário de tucum-do-Cerrado (*Bactris setosa* Mart.), sobre o estado em ferro e o estado oxidativo em ratos com alto estresse oxidativo, induzido com suplementação dietética de ferro.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Estudo *in vitro*:

- Verificar a atividade antiradicalar das partes comestíveis de doze frutos do Cerrado, utilizando o radical DPPH*.
- Selecionar um fruto, pseudofruto, castanha ou palmito que se destaca em termos de atividade antioxidante;

Estudo *in vivo*:

- Avaliar o efeito do consumo do tucum (*Bactris setosa* Mart.) nos níveis de ferro do soro, fígado, baço, intestino, rim, coração e cérebro, dos animais suplementados com ferro.
- Verificar o efeito do consumo do tucum nos níveis dos transcritos de *Hamp* no fígado; *Nrf2* no fígado, baço e intestino; Catalase no fígado, baço e intestino; *DMT1* no intestino; e *FPN1* no fígado, baço e intestino.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 AMOSTRAS PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE IN VITRO

A dosagem da atividade antioxidante *in vitro* foi realizada com a parte comestível de doze espécies nativa do Cerrado, sendo nove frutos: araticum (*Annona crassiflora* Mart.- polpa), cagaita (*Eugenia dysenterica* DC. – casca e polpa), ingá (*Inga laurina* - polpa), jatobá-do-Cerrado (*Hymenaea stigonocarpa* Mart. - polpa), jenipapo (*Genipa americana* L. – casca, polpa e semente), jurubeba (*Solanum paniculatum* L.), lobeira (*Solanum lycocarpum* A.St.-Hil. – polpa), mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes- polpa), tucum-do-cerrado (*Bactris setosa* Mart. – casca e polpa); um pseudofruto: cajuzinho-do-cerrado (*Anacardium humile* St. Hil. – casca e polpa); uma castanha: baru (*Dipteryx alata* Vog. - castanha); e um palmito: guariroba (*Syagrus oleracea* - palmito), além da maçã Red Delicious (*Malus domestica* Borkh.), que foi utilizada como comparação, pois é um pseudofruto bastante conhecido por apresentar alta atividade antioxidante.

As amostras foram coletadas na área de conservação: Estação Ecológica da Universidade de Brasília ou na Fazenda Água Limpa (F.A.L.). O gerente nacional desta Unidade de Conservação pertence à própria Universidade de Brasília, Brasil. A permissão foi emitida pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA)/Ministério do Meio Ambiente (Autorização N° 9/2012, o Ibama / Ministério do Meio Ambiente). Foram coletadas amostras de cada espécie, provenientes, no mínimo de três plantas diferentes. As amostras maduras para o consumo foram selecionadas, lavadas em água corrente, destilada e deionizada, e secas à temperatura ambiente com exceção da guariroba que foi descascada e imediatamente congelada em Nitrogênio líquido. As partes comestíveis das plantas foram retiradas e quarteadas, obtendo-se alíquotas com cerca de 400 g de cada amostra. As alíquotas foram divididas em triplicata para obtenção das soluções extrativas. Em seguida, foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer a -70°C, até extração e ou análises.

4.2 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS

Os extratos das amostras das partes comestíveis das doze plantas foram obtidos segundo método de Singh et al. (2002). Brevemente, aproximadamente 12,5 g da parte comestível foram adicionados a 50mL de solvente (acetato de etila ou água deionizada) e homogeneizados em Shaker a temperatura de 30°C e velocidade de 125 rpm durante 1h. Posteriormente, o extrato foi filtrado a vácuo em papel de filtro JP41 para retirada de partículas remanescentes, os resíduos foram submetido à uma segunda extração com 50mL do mesmo solvente e, filtrado sob as mesmas condições. Os dois extratos com o mesmo solvente foram misturados, o volume final foi registrado e, posteriormente, alíquota dos extratos foram separados em microtúbulos de plásticos de 2mL, congelados em Nitrogênio Líquido e, armazenados a 70°C até análise. Todo o procedimento foi realizado a meia luz.

4.3 DETERMINAÇÃO IN VITRO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE POR MEIO DA ATIVIDADE ANTIRADICALAR - DPPH•

A Eficiência Antiradicalar (EA) foi determinada segundo Brand-William, Cuvelier e Berest (1995) e modificada por Sánchez-Moreno, Larrauri e Saura-Calixto (1998). Em uma cubeta de vidro foram colocados 2,9mL de uma solução de 0,8 mg de 2,2-Diphenyl-1-picryl-hidrazyl (DPPH- Sigma-Aldrich)/ 100mL de Metanol (JTBacker pureza HPLC – 99,9%). A essa solução de DPPH acrescentou-se 100µL de cada um dos extratos com cinco concentrações diferentes (intervalo entre 300 a 3000ppm). A absorbância no tempo zero (A_0) foi obtida a 517nm (A_{517nm}) em espectrômetro (modelo: Spectronic Genesys 2, marca: Milton Roy) e após o acréscimo do extrato, a redução do radical DPPH• foi acompanhada por meio da curva de decaimento da A_{517nm} , registrada em intervalos de 30, 60 ou 120 segundos. Os intervalos de tempo para cada tipo de extrato foi definido de acordo com o comportamento da curva de decaimento do DPPH em uma análise preliminar. Com base na curva de decaimento calculou-se o EC_{50} , ou seja, a concentração da amostra/DPPH [g/kg] que é capaz de reduzir em 50% a concentração de DPPH• inicial, no tempo de estabilização (TEC_{50}) (**Figura 12**). O tempo de estabilização da reação foi então calculado por meio da seguinte **Equação 4**.

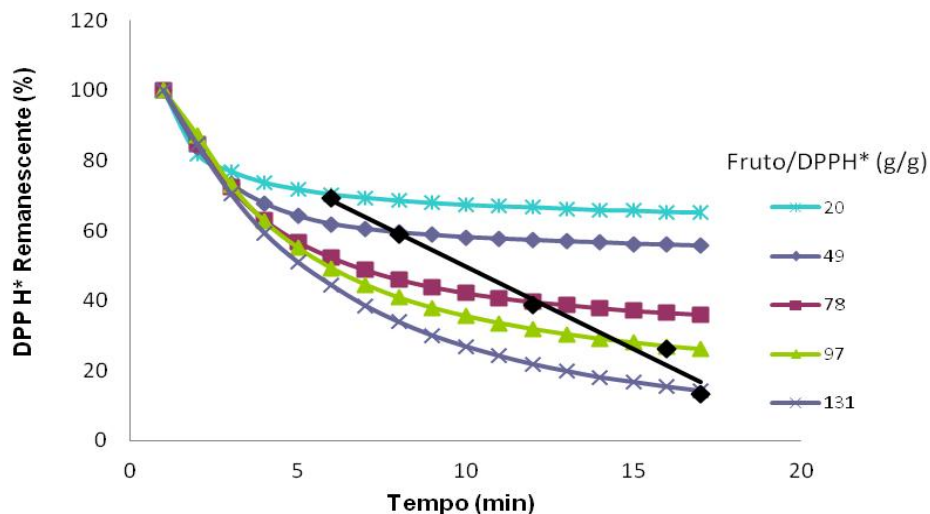


Figura 12. Modelo de curva de decaimento do DPPH* com o tempo de estabilização (TEC_{50} ; \blacklozenge) de várias concentrações diferentes do extrato acetato etílico (20, 49, 78, 97 e 131 g de fruto/ g de DPPH*) do araticum (*Annona crassiflora* Mart.).

$$\frac{(\%DPPH_{Remanescente}^t) - (\%DPPH_{Remanescente}^{t-1})}{t - (t-1)} \leq 1 \quad (4)$$

Na qual, t corresponde ao tempo de leitura da A_{517nm} , $t-1$ é igual ao tempo da leitura anterior a t . Cada curva de decaimento foi realizada no mínimo três vezes. O critério de estabilização da reação de redução do DPPH* foi estimado conforme a expressão: $\{(\%DPPH_{Remanescente}^t) - (\%DPPH_{Remanescente}^{t-1})\} / \{t - (t-1)\} \leq 1$, onde t correspondeu ao tempo de leitura da A_{517nm} e $t-1$ o tempo de leitura anterior a t . Em seguida, calculou-se a EA de cada extrato, por meio da seguinte equação: $1/(EC_{50} * TEC_{50})$, onde TEC_{50} corresponde ao tempo de estabilização do EC_{50} . A capacidade de eliminação dos radicais livres foi também expressa como μmol de equivalente de Trolox (ET)/g da planta.

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA DO TESTE DPPH*

O teste t de student para amostras independentes foi utilizado para fazer comparações entre os valores médios dos dois extratos de cada fruta e entre os valores médios de cada espécie com o da maçã. A correlação entre os valores de Equivalente de Trolox (ET) e cada parâmetro de DPPH* foi analisada utilizando a

correlação de Pearson. A análise foi realizada utilizando o programa SPSS Statistics 17.0 (SPSS Inc., Chicago, EUA). A significância foi definida como $p < 0,05$ e as variáveis são apresentadas como média \pm DP.

4.5 COLETA DA AMOSTRA QUE MAIS SE DESTACOU EM TERMOS DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PARA ESTUDO IN VIVO

As amostras do tucum-do-cerrado (*Bactris setosa* Mart.), família Arecaceae, foram coletadas em Terezópolis de Goiás (Autorização N° 9/2012, o Ibama / Ministério do Meio Ambiente) cuja exsicata se integra no patrimônio do Herbário da Universidade de Brasília, voucher Fustinoni, AM 01. Os frutos do tucum foram lavados com água destilada, secos à temperatura ambiente e armazenados à temperatura de $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, até à preparação das dietas. Depois de retirar manualmente as sementes com o fruto congelado, polpa e casca frescos foram homogeneizadas em liquidificador com água e adicionado às misturas para a preparação das dietas dos ratos. Estas misturas foram homogeneizadas manualmente e em seguida foram preparados os *pellets* das dietas, que foram mantidos a -5°C até secagem e então estocado em sacos plásticos protegidos da luz a -70°C . A massa da água utilizada na homogeneização do tucum não foi considerada no cálculo da composição da dieta.

4.6 TRATAMENTO DOS ANIMAIS

Vinte e cinco ratos Wistar maxos, recém desmamados com 21 dias de vida e obtidos da Granja Roberto Giannichi, Suzano-SP, Brasil, foram alojados, individualmente, em gaiolas de aço inoxidável a uma temperatura de $21,75 \pm 0,46\text{ }^{\circ}\text{C}$, sob um ciclo de 12h de luz / 12h de escuro. Os ratos tinham livre acesso a água e alimentos durante o ciclo escuro. Após 37 dias de aclimatação, os ratos ($278,9 \pm 20\text{ g}$) foram separados em quatro grupos: o grupo Controle (CNT) recebeu uma dieta própria para roedores, a AIN-93G, que contem 35 mg/kg de ferro (N=6) (REEVES, NIELSEN e FAHEY, 1993); o grupo suplementado com ferro (Fe) foi tratado com a dieta AIN-93G contendo 350 mg/kg de ferro (N=7); o grupo tucum (Tuc) foi tratado com dieta adicionada com 150 g do fruto do tucum (polpa e casca) / kg de dieta

(N=6); e o grupo tucum com suplementação de ferro (TucFe), recebeu a dieta para roedores suplementada com 350mg de ferro/kg de dieta e acrescida com 150 g de tucum / kg de dieta (N=6). Durante o experimento 2 animais morreram por causas adversas não relacionadas a dieta: um animal do grupo CNT e outro do grupo TucFe. A dose de ferro na dieta suplementada com ferro foi estimada com base na dose de suplementação utilizada em seres humanos adultos que é de 10% da recomendação diária de ferro. As quantidades dos macronutrientes da dieta acrescida com tucum foram ajustadas visando adequar este nutrientes conforme as recomendações previstas na dieta AIN-93G para esses roedores. A composição do tucum em termos de macronutrientes e ferro e das dietas dos ratos estão apresentada nas **Tabelas 1 e 2**, respectivamente. Os animais foram pesados semanalmente, e o consumo da dieta foi obtido pela diferença entre a dieta oferecida e a sobra, registrados diariamente. Após 30 dias de tratamento, os animais foram anestesiados numa câmara anestésica com isoflurano e o sangue foi coletado por punção cardíaca. As amostras de sangue foram recolhidas em dois tubos com e sem EDTA 7,0% (21µL/mL sangue) e os órgãos - fígado, baço, rim, coração, cérebro e intestino delgado - foram extraídos, lavados em solução de NaCl 0,9%, livre de ribonuclease (*RNAse free*). Todos os frascos utilizados no procedimento foram deixados de molho durante 5h de molho em solução 0,1% de Pirocarbonato de Dietila (*Diethylpyrocarbonate* – DEPC) para a degradação de ribonucleases. congelados rapidamente em nitrogênio líquido e armazenadas a -70 °C para análises posterior. Este protocolo foi aprovado pelo Comitê de Ética para Uso de Animais do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, Brasil, UnBDOC N° 120380/2009.

Tabela 1. Composição centesimal e níveis de ferro do tucum (*Bactris setosa* Mart.).

	Carboidrato	Lipídeo	Proteína	Cinza	Fibra	Umidade	Ferro ¹
	(g/100g)	(g/100g)	(g/100g)	(g/100g)	(g/100g)	(g/100g)	(g/100g)
Tucu m (polpa e casca)	18,66 ± 0,22	0,14 ± 0,00	1,15 ± 0,01	0,54 ± 0,03	1,69 ± 0,14	77,87 ± 0,00	1,42 ± 0,08

Os valores representam a média ± DP, triplicata;

1. Expresso por peso seco do fruto.

Tabela 2. Composição das dietas.

Componentes	Dieta ¹ (g/kg)			
	CNT	Fe	Tuc	TucFe
Amido Dextrinizado	132	132	132	132
Sacarose	100	100	100	100
Amido de milho	397,5	397,5	369,63	369,63
Carboidrato do tucum	-	-	27,85	27,85
Proteína (caseína)	200	200	198,27	198,27
Proteínas do tucum	-	-	1,73	1,73
Óleo de soja (Lipídeos)	70	70	69,7	69,7
Lipídeos do tucum	-	-	0,3	0,3
Fibras	50	50	47,47	47,47
Fibras do tucum	-	-	2,5	2,5
Mistura de vitaminas	10	10	10	10
Sulfato Ferroso hepta-hidratado	0,17	1,75	0,17	1,75
Mistura mineral sem ferro	35	35	35	35
L-cisteína	3	3	3	3
Bitartarato de colina	2,5	2,5	2,5	2,5

¹ Grupo Controle (CNT): dieta para roedores AIN-93G formuladas segundo Reeves, Nielsen e Fahey (1993) (N=5); grupo suplementado com ferro (Fe): dieta para roedores AIN-93G com suplementação de ferro (350mg de ferro/kg de dieta na forma de sulfato ferroso hepta-hidratado) (N=7); grupo tucum (Tuc): dieta AIN-93G contendo 15% de tucum (casca e polpa) (N=6); grupo suplementado com tucum e ferro (TucFe): dieta AIN-93G com suplementação de ferro (350 mg de ferro/kg de dieta) contendo 15% de tucum (N=5) (Tratamento: 30 dias).

4.7 DETERMINAÇÃO DO ESTADO EM FERRO NO ORGANISMO DOS RATOS

4.7.1 Determinação de ferro nos tecidos

A concentração de ferro nos tecidos foi determinada utilizando-se o método descrito por Baranowska, Czernickib e Aleksandrowicz (1995). Resumidamente, cerca de 0,1 g de coração e do baço, 0,4 g do rim e do intestino e 0,3 g do cérebro e do fígado foram digeridas com 5mL de HNO₃ concentrado (Sigma Aldrich Co., St.

Louis, MO, EUA) e 2,5 mL de H₂SO₄ (Sigma Aldrich Co., St Louis, MO, EUA), em um sistema de microondas Provecto Analítica (DGT 100 Plus, Jundiaí, São Paulo, Brasil, 2003). Após a digestão, as amostras foram suspensas em ácido nítrico 0,1 mol / L para obtenção do volume final de 25 mL. A concentração de ferro nas amostras foi determinada por espectrometria de emissão atômica com plasma (ICP-AES/Spectro, Kleve, Alemanha), utilizando-se a linha de 238nm para detecção do ferro. Uma curva de calibração foi obtido com soluções de Fe-Titrisol, Merck (Merck, Darmstadt, Alemanha), nas concentrações entre 0 e 10 ppm para calcular as concentrações de ferro nos tecidos.

4.7.2 Índices de Ferro no soro

As análises do ferro sérico, da Capacidade Latente de Ligação de Ferro (CLLF), da Capacidade Total de Ligação de Ferro (CTLF), da Saturação de Transferrina (TS) e da concentração de Transferrina foram realizadas utilizando o kit colorimétrico, conforme descrito pelo fabricante Labtest Diagnóstica SA (Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil).

4.8 VERIFICAÇÃO DOS NÍVEIS DE TRANSCRITO DE GENES DO METABOLISMO DE FERRO E DOS GENES ENVOLVIDOS NA DEFESA ANTIOXIDANTE

4.8.1 Extração de RNA

A extração de RNA total a partir do fígado, baço e intestino foi realizada utilizando-se o reagente Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e clorofórmio. Após a extração, o RNA da fase aquosa foi precipitado com álcool isopropílico, lavado com etanol 70%, seco, dissolvido em água deionizada e armazenado a -70°C. A integridade do RNA total foi avaliada por meio de eletroforese em gel de agarose. Resumidamente, uma alíquota de aproximadamente 600 ng de RNA total foi submetido a eletroforese em gel de agarose a 1% com tampão de corrida 1x de TAE, obtido a partir da diluição do TAE 50x (242g de Tris base: Vetec, RJ, Brasil; 100mL EDTA 0,5 mol/L: Sigma, St. Louis, MO, EUA; 57,1 mL de ácido acético glacial: Vetec; e completar volume com água deionizada para 1000mL). O gel foi

corado com 5µL de Gel GreenTM 10.000x (Biotium, Hayward, CA, EUA) para cada 50mL de gel durante seu processo de preparação e foi analisado utilizando-se o software 1D LabImage (Kapelan Bio-Imaging Solutions, Leipzig, Alemanha), para confirmar a ausência de material genético degradado. A concentração e pureza das amostras de RNA total foi verificada por determinação da absorbância a 230, 260 e 280nm em espectrofotômetro (Ultrospec 3000 UV-visível, Pharmacia Biotech, Cambridge, Inglaterra) (AZEVEDO, FELIPE e BRIGIDO, 2003). A verificação da pureza das amostras de RNA foi realizada através da avaliação da presença de proteínas pela razão A_{260}/A_{280} , enquanto a contaminação com compostos aromáticos, tais como fenol, foi verificada pela proporção A_{260}/A_{230} . O valor de referência utilizado para avaliar estas proporções (A_{260}/A_{280} e A_{260}/A_{230}) foram valores iguais ou maiores a 1,8. A_{280} representa a absorbância espectrofotométrica no comprimento de onda de 280 nm e A_{230} representa a absorbância espectrofotométrica no comprimento de onda de 230 nm (AZEVEDO, FELIPE e BRIGIDO, 2003; SCHMITTGEN e LIVAK, 2008).

O RNA total foi então precipitado com acetato de sódio anidro a 3 mol/L e pH 5,2 (0,1 volume) (Sigma, St. Louis, MO, EUA) e etanol 100% (2,5 volume) (Sigma, St. Louis, MO, EUA), incubados a 4°C por 30 min. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas a 12.000g, a 4°C durante 30 minutos (centrífuga Eppendorf 5415R, Hamburgo, Alemanha). O sobrenadante foi descartado e adicionou-se 1 mL de etanol 75% a 4°C (Sigma, St. Louis, MO, EUA) ao sedimento e este foi homogenizado delicadamente invertendo-se o tubo 10 vezes, o qual em seguida, foi mantido por 5 min em gelo. Após este período o homogenizado foi centrifugado a 12.000g por 5 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o material foi secado à temperatura de 37°C por mais ou menos 15 min. O precipitado foi suspenso em 50 µL de água deionizada e antes de ser estocado a -70°C, foi determinada a absorbância a 230, 260 e 280 nm (Ultrospec 3000 UV-visível, Pharmacia Biotech, Cambridge, Inglaterra) para o cálculo das proporções A_{260}/A_{280} e A_{260}/A_{230} e avaliação da pureza e concentração do RNA no material tratado com acetato de sódio. Esta avaliação da concentração foi realizada a partir de uma diluição de 2µL da amostra em água deionizada, para um volume final de 500 µL.

4.8.2 Síntese de cDNA

O RNA total (1 µg) foi utilizado para reações de síntese de cDNA utilizando-se do Sistema de Kit de Transcrição Reversa Improm II (Promega, Madison, WI, EUA). O volume de 1 µL dos primers oligo (dT) foram adicionados ao RNA total e a desnaturação foi realizada a 70°C durante 5 min e em seguida foram mantidas em gelo por mais 5 min. A Transcriptase Reversa Improm-II, juntamente com 5µL de água, 4 µL do tampão (INPROM II™ 5x), 3 µL de MgCl₂ (25 mmol/L), 1 µL de dNTPmix (10mmol/L), 1 µL de RNAsin (Ribo Inibition 2500u) foram adicionadas e as amostras foram incubadas inicialmente a 25°C por 5 min e em seguida a 42°C durante 50 min, seguido de inativação a 70°C por 15 min. O DNA complementar foi estocado a -20°C até análise. Como controle negativo todo este procedimento foi realizado também nas amostras sem a presença da enzima transcriptase reversa. Uma alíquota da reação com controle negativo foi submetida a RT-PCR para confirmar a ausência de DNA genômico, para isso utilizou-se um sistema de reação já testado e sequências de oligos específicos previamente utilizadas por outros autores e descritas em artigos científicos.

4.8.3 Reação em cadeia de polimerase reversa (qRT-PCR)

As concentrações de mRNA de genes de proteínas ligada ao metabolismo de ferro: peptídeo antimicrobiano hepcidina (*Hamp*) no fígado; ferroportin 1 (*Slc40a1* ou *FPN1*) no fígado, baço e intestino; e transportador de metal bivalente 1 (*Slc11a2* ou *DMT1*) no intestino; e genes ligados ao estresse oxidativo: o fator nuclear (*erythroid-derived-2*) like 2 (*Nfe2l2* ou *Nrf2*); e catalase (*Cat*), tanto no fígado, baço e intestino foram quantificados em tempo real pela reação em cadeia da polimerase (qRT-PCR) (7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). A PCR em tempo real foi realizada utilizando-se o reagente Fast SYBR Green Master Mix 2X (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), com 2 µL de cDNA (que correspondeu a 0,2 ng de RNA total), em um volume final de 10 µL com 5 µL de Fast SYBR Green Master Mix e 0,2 mmol/L de cada *primer* (concentração final). As sequências dos *primers* utilizados estão apresentados na **Tabela 3**. A PCR quantitativa foi realizada utilizando-se 40 ciclos a 95°C por 20s, 60°C por 3s e 60°C por 20s. A expressão de todos os genes foi normalizada com base no gene

constitutivo β -actina (*Actb*) e as reações foram corridas em triplicata para a validação dos experimentos. A especificidade da amplificação de cada produto amplificado foi verificada utilizando-se uma curva de fusão (*melting curve*).

Tabela 3. Sequência dos *primers* utilizados para a reação em cadeia de polimerase (qRT-PCR).

Nº de Acesso	Descrição do Gene	Símbolo do Gene	Codinome	Sequências 5'— 3'	Referência
NM_053469	Peptídeo Antimicrobiano Hepcidina	<i>Hamp</i>	-	F TGATGCTGAAGCGAAGGA R TGTGTTGAGAGGTCAGGAC	*
NM_013173.2	Transportador de Metal Divalente – 1	<i>Slc11a2</i>	<i>DMT1</i>	F CTGATTACAGTCTGGAGCAG R CACTTCAGCAAGGTGCAA	*
NM_133315.2	Ferroportina 1	<i>Slc40a1</i>	<i>FPN1</i>	F TTCCGCACTTTTCGAGATGG R TACAGTCGAAGCCCAGGACCGT	(CHRISTIANSEN, 2007)
NM_031789.1	Fator nuclear (<i>erythroid-derived-2) like 2</i>	<i>Nfe2l2</i>	<i>Nrf2</i>	F GAGACGGCCATGACTGAT R GTGAGGGGATCGATGAGTAA	(PALSAMY, 2011)
NM_012520.1	Catalase	<i>Cat</i>	-	F ACTCAGGTGCGGACATTC R GGAGTTGTACTGGTCCAGAAGAGCC	(GRIGORYANTS, 2005)
NM_031144	β -actina	<i>Actb</i>	-	F GTCGTACCACTGGCATTGTG R CTCTCAGCTGTGGTGGTGAA	(WANG, 2008)

F = forward; R = reverse. Os *primers* da *DMT1* pode amplificar as formas de *DMT1* que possuem elementos responsivo ao ferro e sem elementos responsivos ao ferro. * sequencias desenhadas em nosso laboratório.

A eficiência da reação de amplificação da qPCR foi avaliada através das curvas de diluição construída a partir de diferentes diluições de cDNA para cada *amplicon*. A eficiência de amplificação foi determinada a partir do declive obtido da curva de diluição relativo ao log [mRNA transcrito] e a variação do limiar da fase exponencial de amplificação (*cycle threshold* - C_T) com a equação $E = (10^{(-1/\text{declive})} - 1) \times 100$. O valor de aproximadamente -3,33 de declive da linha de tendência do gráfico dos valores de C_T vs log da concentração do ácido nucleico foi

considerada uma reação eficiente. A eficiência da PCR dos *primers* estudados foi entre 97 e 103%. Outro critério avaliado para a validação do ensaio de cada um dos genes foi a curva padrão do ΔC_T (C_T do gene alvo - C_T gene constitutivo) *versus* o logaritmo da quantidade de cDNA. Esse cálculo serve para examinar a especificidade dos produtos gerados por cada *primers*, o valor do declive da linha de regressão dos valores ΔC_T vs log da concentração de ácido nucleico devem ser menores do que 0,1. Para quantificar a abundância do RNA do gene alvo, o resultado final foi dado por $2^{-\Delta\Delta C_T}$, calculado a partir do C_T do gene alvo em relação ao gene constitutivo (β -actina). Este método foi realizado tal como descrito no tutorial da Applied Biosystems (2008).

4.8.4 Análise Estatística

A análise da tendência das distribuições das variáveis foi realizada pelo Teste de Kolmogorov-Smirnov. As comparações entre os tratamentos de cada grupo foram realizados por meio do Teste T para amostras independentes, utilizando-se o software SPSS versão 17 (SPSS Inc., Chicago, EUA). Em todos os testes, foi utilizado o valor $\alpha < 0,05$, para significância das diferenças.

5 RESULTADOS

5.1 ESTUDO COMPARATIVO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE ENTRE PARTES COMESTÍVEIS DE DOZE PLANTAS DO CERRADO E A MAÇÃ VERMELHA – *IN VITRO*

Na **Tabela 4** estão apresentados os resultados da atividade antiradicalar obtidas para os extratos das partes comestíveis dos doze frutos do Cerrado e da maçã vermelha, analisadas em sistema reacional utilizando-se o radical DPPH[•] como reagente. Os extratos obtidos em acetato de etila e água de seis amostras do Cerrado - araticum, cagaita, cajuzinho, jurubeba, lobeira e tucum - apresentaram maior Eficiência Antiradicalar do que o extrato da maçã vermelha com os respectivos solventes. Surpreendentemente, os valores em Equivalentes de Trolox (ET) e da Eficiência Antiradicalar (EA) obtidos no extrato de acetato de etila da lobeira foram aproximadamente 10 e 40 vezes maiores do que do extrato acetato de etila da maçã, respectivamente. A atividade antiradicalar medida por esses dois parâmetros (ET e EA) nos extratos de acetato de etila do araticum, do tucum e da cagaita também foram maiores do que os valores encontrados no extrato de acetato de etila da maçã (aproximadamente 8 e 15, 7 e 10, 3 e de 7 vezes maior, respectivamente). Além disso, as atividades antiradicalares, determinadas pelos parâmetros ET e EA dos extratos aquosos de araticum, cagaita e tucum foram de cerca de 7 e 11, 7 e 18, 8 e 6 vezes maiores, respectivamente, comparados aos valores obtidos para o extrato aquoso de maçã.

Com exceção da lobeira e da castanha de baru, a maioria das espécies apresentaram atividade antioxidante maior no extrato aquoso do que o correspondente valor encontrado no extrato de acetato de etila, quando medido por meio de Equivalente Trolox (ET) ou pela Eficiência Antiradicalar (EA). O inverso disso ocorreu em relação ao EC₅₀ (**Tabela 4**).

Para identificar a relação entre os três parâmetros cinéticos do DPPH (EC₅₀, TEC₅₀ e EA, obtidos por reações cinéticas contendo os extrato das plantas e DPPH) e a atividade antiradicalar expressa como equivalente de Trolox (ET) foi realizada uma análise comparativa usando o teste de correlação de Pearson. Desta forma,

verificou-se uma correlação positiva e significativa entre ET e EA, tanto nos extratos aquosos ($r = 0,869$ e $p = 0,000$) como nos extratos em acetato etílico ($r = 0,885$ e $p \leq 0,000$) das partes comestíveis das plantas do Cerrado, enquanto uma fraca correlação negativa foi encontrada entre ET e EC_{50} ($r = -0,436$, $p = 0,006$ e $-0,345$, $0,031$, respectivamente). Não foi encontrada correlação entre ET e TEC_{50} .

Tabela 4. Atividade antiradicalar (DPPH') dos extratos com acetato de etila e água das partes comestíveis das doze plantas do Cerrado.

Nome popular	Acetato de Etila				Água			
	Trolox $\mu\text{mol/g}$ peso fresco	EC_{50} 10^3 . (g/kg DPPH)	TEC_{50} min	EA $1/EC_{50} \cdot TEC_{50}$	Trolox $\mu\text{mol TE/g}$ peso fresco	EC_{50} 10^3 . (g . kg ⁻¹)	TEC_{50} min	EA $1/EC_{50} \cdot TEC_{50}$
Maçã	6,5 ± 0,6	123,2 ± 11,1	19,7 ± 1,1	0,4 ± 0,1	9,4 ± 0,3 ^{##}	84,7 ± 2,9 ^{##}	18,1 ± 2,4	0,7 ± 0,1 ^{##}
Araticum	54,3 ± 7,6 ^{***}	14,9 ± 2,0 ^{**}	12,5 ± 1,9 ^{**}	6,0 ± 1,5 ^{**}	67,3 ± 13,5 [*]	12,2 ± 2,6 ^{***}	11,5 ± 0,5 [*]	8,2 ± 0,8 ^{***}
Baru	0,8 ± 0,1 ^{**}	1021,8 ± 86,8 ^{***}	5,4 ± 0,3 ^{***}	0,2 ± 0,0 [†]	0,6 ± 0,1 ^{***#}	1470,9 ± 202,4 ^{***#}	10,5 ± 0,8 ^{***##}	0,1 ± 0,0 ^{***##}
Cagaita	21,5 ± 1,4 ^{***}	37,1 ± 2,4 ^{**}	9,4 ± 0,4 ^{***}	2,9 ± 0,3 ^{**}	72,7 ± 2,0 ^{***###}	10,9 ± 0,3 ^{***###}	6,9 ± 0,3 ^{##}	13,2 ± 1,0 ^{***###}
Cajuzinho	9,3 ± 1,3 ^{**}	86,5 ± 13,2 ^{**}	13,1 ± 0,6 ^{**}	0,9 ± 0,2 ^{**}	26,5 ± 6,6 [#]	31,1 ± 6,7 ^{***##}	7,0 ± 0,2 ^{###}	4,8 ± 1,4 ^{**#}
Gueroba	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Ingá	2,6 ± 0,0 ^{**}	303,2 ± 0,8 ^{**}	10,9 ± 1,9 ^{**}	0,3 ± 0,1	6,2 ± 0,7 ^{**#}	130,4 ± 17,1 ^{##}	24,1 ± 1,9 ^{##}	0,3 ± 0,0 ^{**}
Jatobá	0,2 ± 0,1 ^{**}	3760,4 ± 1299,4 ^{**}	25,4 ± 16,4	0,0 ± 0,0 ^{**}	1,7 ± 0,0 ^{***#}	454,3 ± 3,7 ^{***#}	9,5 ± 3,1 [*]	0,3 ± 0,1 ^{**##}
Jenipapo	0,8 ± 0,1 ^{**}	941,8 ± 60,4 ^{**}	2,0 ± 0,0 ^{***}	0,5 ± 0,0	0,9 ± 0,0 ^{***}	887,4 ± 0,6 ^{***}	1,9 ± 0,1 ^{**}	0,6 ± 0,0
Jurubeba	1,8 ± 0,0 ^{**}	449,5 ± 1,0 ^{***}	2,0 ± 0,0 ^{***}	1,1 ± 0,0 ^{**}	26,8 ± 0,5 ^{***###}	29,7 ± 0,5 ^{***###}	12,9 ± 0,5 ^{###}	2,6 ± 0,1 ^{***##}
Lobeira	66,8 ± 14,0 ^{**}	12,3 ± 2,6 ^{***}	5,1 ± 0,3 ^{***}	16,3 ± 2,5 ^{***}	7,9 ± 3,9 ^{##}	115,2 ± 44,1 ^{***}	9,2 ± 1,9 ^{**#}	1,2 ± 0,2 ^{##}
Mangaba	4,2 ± 0,0 [†]	187,3 ± 1,7 ^{***}	12,8 ± 0,8 ^{**}	0,4 ± 0,0	8,2 ± 0,5 ^{###}	97,3 ± 6,6 ^{###}	15,9 ± 3,2	0,7 ± 0,1 [#]
Tucum	50,6 ± 2,6 ^{***}	15,8 ± 0,8 ^{***}	18,6 ± 6,3	4,3 ± 1,1 ^{**}	75,3 ± 10,9 ^{***#}	10,8 ± 1,6 ^{***##}	22,1 ± 3,3	4,6 ± 0,2 ^{***}

Os valores representam médias ± DP da atividade antiradicalar. Valor seguido por um (*) é diferente do valor da maçã e seguida por (#) é diferente do extrato de acetato etílico da respectiva parte comestível (* e # $p \leq 0,05$, ** e ## $p \leq 0,01$, *** e ### $p \leq 0,001$) ($n \geq 3$; Teste t para amostras independentes); LD = Limite de Detecção. EC_{50} corresponde a concentração da planta requerida para reduzir a quantidade original de DPPH' a 50% e é expressa em Equivalente de Trolox e a Eficiência Antiradicalar (EA) calculada pela equação: $1/EC_{50} \cdot TEC_{50}$ onde TEC_{50} corresponde ao tempo para estabilização do EC_{50} , de acordo com (Sánchez-Moreno, Larrauri e Saura-Calixto, 1998).

Do estudo realizado *in vitro* o tucum-do-cerrado (*Bactris setosa* Mart.) foi um fruto que apresentou altos níveis de ET e EA pelo teste de DPPH', tanto no extrato aquoso como no extrato com acetato de etila. E com base nos resultados apresentadas no **APÊNDICE A** este foi o fruto selecionado para o estudo *in vivo*.

5.2 O CONSUMO DIÁRIO DE TUCUM PREVINE A SOBRECARGA DE FERRO NOS TECIDOS DEVIDO A INIBIÇÃO DA EXPRESSÃO DO GENE DA HEPICIDINA (HAMP) NO FÍGADO.

5.2.1 Concentração de ferro nos tecidos

Ratos (Wistar) suplementados com ferro durante 30 dias (grupo Fe) apresentaram maiores concentrações de ferro no fígado, baço, intestino e,

ligeiramente maior, nível de ferro renal em relação ao grupo Controle ($p = 0,000$, $0,029$, $0,011$ e $0,079$, respectivamente), apesar destes ratos terem consumido menor quantidade de dieta do que os ratos do grupo Controle ($p = 0,038$) (**Figura 13; Tabela 5**). Além disso, os ratos do grupo Fe apresentaram um aumento de ferro sérico e saturação de transferrina (TS), em comparação ao grupo Controle ($p = 0,008$ para ambas as variáveis) (**Tabela 6**). Embora a composição de ferro do fruto tucum (**Tabela 1**) tenha aumentado o teor de ferro da dieta do grupo Tuc em relação à dieta do grupo Controle ($p = 0,001$) (**Tabela 5**), não foi encontrada aumento nos níveis de ferro em qualquer um dos tecidos estudados, incluindo no soro nos animais do grupo Tuc, em comparação com o grupo Controle (**Figura 13; Tabela 6**). Finalmente, o tratamento dos ratos com dieta suplementada com ferro e contendo tucum (grupo TucFe) resultou numa redução significativa de ferro no soro e da saturação de transferrina ($p = 0,003$ e $0,001$, respectivamente) (**Tabela 6**), e, uma ligeira redução da concentração de ferro no fígado e no intestino em relação ao grupo Fe ($p = 0,069$ e $0,095$, respectivamente) (**Figura 13**). Não houve diferença no ganho de peso entre os grupos, no entanto, o grupo Tuc mostrou uma ligeira redução no ganho de peso em relação ao grupo Controle ($p = 0,055$) (**Tabela 5**).

5.2.2 Expressão do gene da hepcidina (*Hamp*)

Os níveis de mRNA de *Hamp* determinados por meio da reação de transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (**Figura 14**) revelaram que o grupo suplementado com ferro (Fe) apresentou um aumento de cerca de três vezes nos níveis hepáticos de mRNA de *Hamp*, enquanto os níveis deste transcrito foi significativamente menor no grupo tratado com dieta adicionada de tucum (Tuc), ambos em relação ao grupo Controle ($p = 0,012$ e $0,020$, respectivamente). A adição de tucum na dieta suplementada com ferro (TucFe) resultou na redução significativa dos níveis de mRNA de *Hamp* no fígado dos ratos em relação ao grupo Fe ($p = 0,023$) tornando este valor igual ao grupo Controle (**Figura 14**).

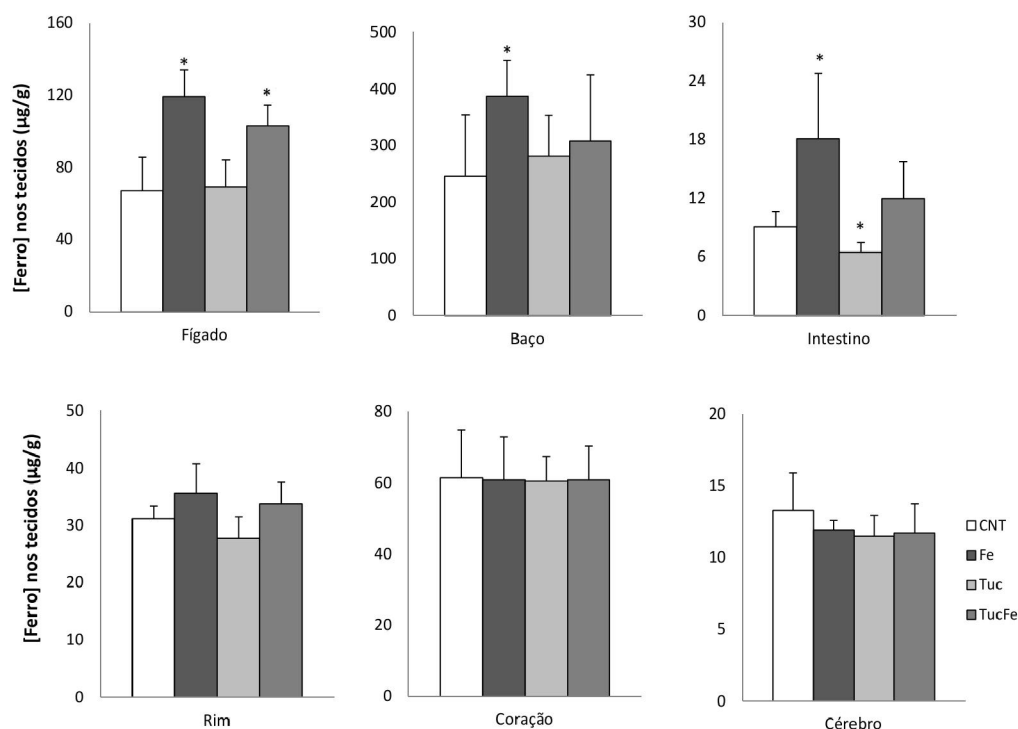


Figura 13. Concentração de ferro no fígado, baço, intestino, rim, coração e cérebro dos ratos tratados com a dieta para roedores AIN-93G (grupo CNT, n = 5); dieta suplementada com ferro contendo 350 mg de ferro na forma de sulfato ferroso heptaidrate ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)/kg dieta (grupo Fe, n = 7); dieta adicionada com 15% de tucum (grupo Tuc, n = 6); dieta suplementada com 350 mg de ferro na forma de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ / kg de dieta mais 15% de tucum (TucFe, n = 5). Valores representam a média \pm DP. (*) diferem do grupo Controle; (#) diferem do grupo Fe pelo Teste T para amostras independentes, $P \leq 0.05$.

Tabela 5. Efeito¹ do tucum [*Bactris setosa* Mart.] no consumo dietético, no ganho de peso e na ingestão de ferro em ratos tratados com dieta AIN-93G suplementada ou não com ferro por 30 dias.

	CNT	Fe	Tuc	TucFe
Ingestão Dietética ² (g)	573,88 \pm 36,14	512,77 \pm 48,11 *	571,49 \pm 56,52	584,13 \pm 35,62 [#]
Ganho de peso (g)	104,49 \pm 19,20	105,24 \pm 17,39	82,38 \pm 10,76	97,79 \pm 24,03
Ingestão de ferro (mg)	18,76 \pm 1,16	116,97 \pm 10,97*	24,07 \pm 2,38 *	123,91 \pm 7,56*
Ingestão do tucum ² (g)	-	-	66,75 \pm 6,60 *	68,23 \pm 3,72 **

¹-Os valores representam a média \pm DP. Grupo Controle (CNT): dieta para roedores AIN-93G (n = 5); Grupo suplementado com ferro (Fe): dieta para roedores AIN-93G contendo 350 mg de ferro na forma de sulfato ferroso heptaidrate ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) /kg dieta (n = 7); Grupo tucum (Tuc): dieta AIN-93G modificada mais 15% de (polpa e casca) (n = 6); e grupo suplementado com ferro e tucum (TucFe): dieta AIN-93G modificada contendo 350mg de ferro na forma de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ /kg de dieta mais 15% de tucum (n = 5) (Tratamento: 30 dias). Média com (*) difere do grupo Controle e com (#) difere do grupo Fe pelo Teste T para amostras independentes, $\alpha \leq 0,05$.

². Apresentado como peso seco. Lembrando que o cálculo dos 15% do tucum na dieta foi feito com base no peso úmido.

Tabela 6. Efeito¹ do consumo de tucum [*Bactris setosa* Mart.] nos índices de ferro sérico de ratos tratados com a dieta AIN-93G suplementadas ou não com ferro, por 30 dias.

	Parâmetros de Ferro no soro			
	CNT	Fe	Tuc	TucFe
Ferro sérico (µg/dL)	103,43519 ± 42,16	222,70 ± 53,28 *	128,48 ± 31,55	74,78 ± 13,31 #
CLLF (µg/dL)	265,95901 ± 92,97	248,85 ± 71,33	275,96 ± 43,50	310,31 ± 15,84
CTLF (µg/dL)	403,92314 ± 24,87	438,45 ± 73,60	397,75 ± 50,71	385,09 ± 17,38
Saturação de Transferrina (%)	25,949444 ± 11,72	50,72 ± 8,65 *	32,29 ± 6,91	19,39 ± 3,14 #
Transferrina (mg/dL)	282,7462 ± 17,41	306,92 ± 51,52	278,43 ± 35,49	269,56 ± 12,16

¹O

Os valores representam a média ± DP. CNT, grupo que recebeu a dieta para roedores AIN-93G (n = 5); Fe, grupo que recebeu suplementação de ferro na dieta para roedores AIN-93G, contendo 350 mg iron/kg de dieta (n = 7); Grupo Tuc recebeu dieta de roedores modificada com 150 g of tucum (polpa e casca) / kg diet (n = 6); TucFe, grupo que recebeu dieta para roedores com 350 mg de ferro /kg de dieta mais 150 g de tucum (polpa e casca) / kg dieta (n = 5). CLLF: Capacidade Latente de Ligação de Ferro; CTLF: Capacidade Total de Ligação de Ferro. Média com (*) difere do grupo Controle e com (#) difere do grupo Fe pelo Teste T para amostras independentes, $\alpha \leq 0,05$.

5.2.1 Expressão do gene da Ferroportina 1 (*FPN1*) e da Proteína Transportadora de Metal Divalente 1 (*DMT1*)

Os níveis de mRNA de *FPN1* não alteraram no fígado e no intestino (**Figura 14**). Os níveis de mRNA de *DMT1* também não alteraram no intestino. Já no baço, a ingestão de suplementação de ferro (grupo Fe e TucFe) demonstrou reduzir dos níveis de transcrito de *FPN1*.

5.3 O CONSUMO DIÁRIO DE TUCUM INDUZIU A EXPRESSÃO HEPÁTICA DO GENE DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO *NRF2* E INIBIU A EXPRESSÃO DO GENE DA CATALASE NO BAÇO.

5.3.1 Expressão do gene do *Nrf2*

A suplementação dietética com ferro aumentou os níveis de mRNA de *Nrf2* no baço e no intestino do grupo Fe em comparação ao grupo Controle ($p = 0,046$ e $0,028$, respectivamente) e o grupo tratado com tucum apresentou um aumento destes níveis no fígado em relação ao grupo Controle ($p = 0,000$). A adição de tucum na dieta suplementada com ferro resultou em um aumento nos níveis de mRNA de *Nrf2* no fígado em relação ao grupo Controle e em um ligeiro aumento deste valor relativo ao grupo Fe ($p = 0,034$ e $0,061$, respectivamente). No baço dos ratos do grupo TucFe, os níveis de mRNA do *Nrf2* foram menores em relação aos níveis

encontrados no grupo Fe ($p = 0,042$). O efeito supressor do tucum encontrado no baço na expressão do gene do *Nrf2* induzido pelo ferro não foi observado no intestino destes ratos (**Figura 14**).

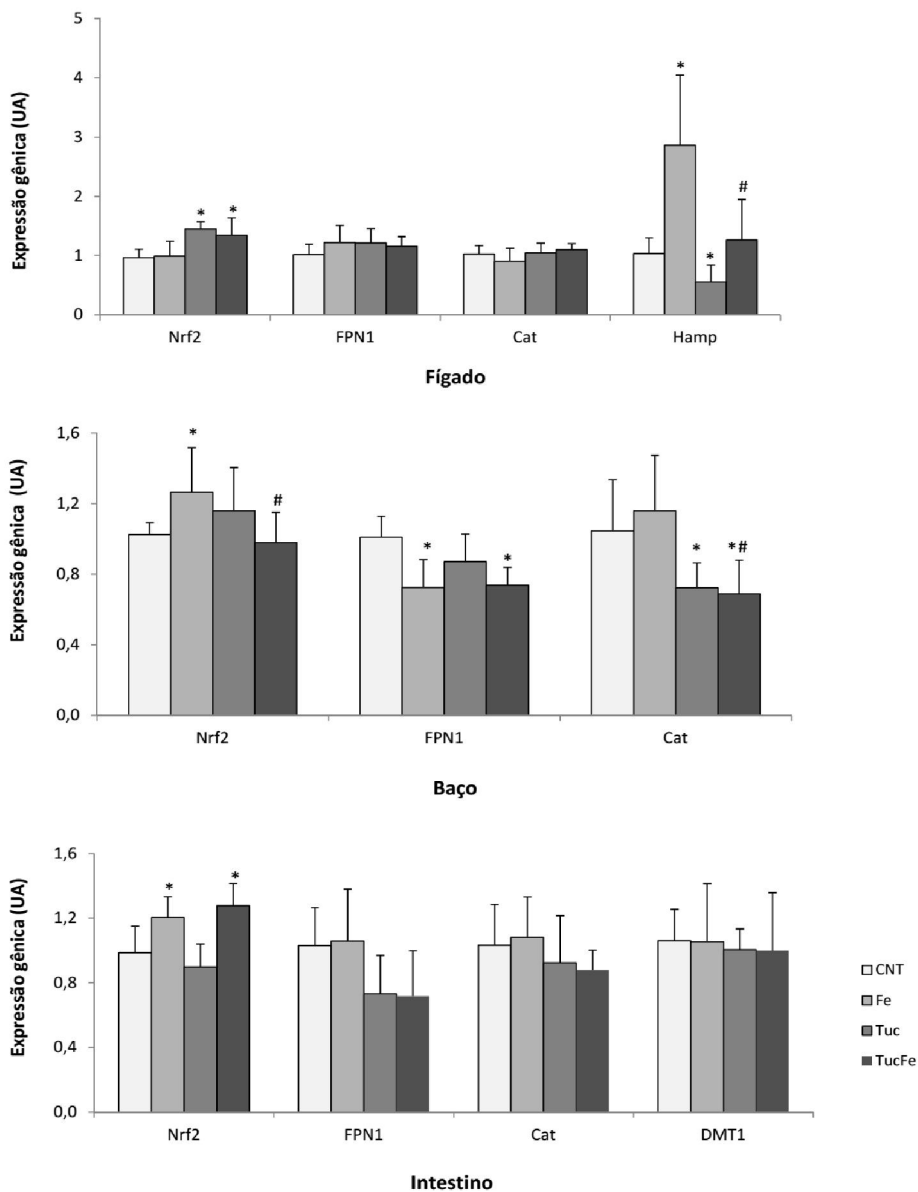


Figura 14. Efeito do consumo de tucum nos níveis de transcrito de *Nrf2*, Ferroportina 1 (*FPN1*) e Catalase (*Cat*) no fígado, baço e intestino, Hepcidina (*Hamp*) no fígado e transportador de metal divalente 1 (*DMT1*) no intestino de ratos suplementados com ferro dietético. Grupo Controle (CNT): dieta para roedores AIN-93G ($n = 5$); Grupo suplementado com ferro (Fe): dieta para roedores AIN-93G contendo 350 mg de ferro na forma de sulfato ferroso heptaidrate ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) /kg dieta ($n = 7$); Grupo tucum (Tuc): dieta AIN-93G modificada mais 15% de (polpa e casca) ($n = 6$); e grupo suplementado com ferro e tucum (TucFe): dieta AIN-93G modificada contendo 350mg de ferro na forma de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ /kg de dieta mais 15% de tucum ($n = 5$) (Tratamento: 30 dias). Unidade Arbitrária (UA). Os dados foram expressos como média \pm DP. Médias com (*) diferem do grupo Controle; (#) diferem do grupo Fe pelo Teste T para amostras independentes, $\alpha \leq 0,05$.

5.4 O CONSUMO DIÁRIO DE TUCUM INDUZIU A EXPRESSÃO HEPÁTICA DO GENE DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO *NRF2* E INIBIU A EXPRESSÃO DO GENE DA CATALASE NO BAÇO.

5.4.1 Expressão do gene do *Nrf2*

A suplementação dietética com ferro aumentou os níveis de mRNA de *Nrf2* no baço e no intestino do grupo Fe em comparação ao grupo Controle ($p = 0,046$ e $0,028$, respectivamente) e o grupo tratado com tucum apresentou um aumento destes níveis no fígado em relação ao grupo Controle ($p = 0,000$). A adição de tucum na dieta suplementada com ferro resultou em um aumento nos níveis de mRNA de *Nrf2* no fígado em relação ao grupo Controle e em um ligeiro aumento deste valor relativo ao grupo Fe ($p = 0,034$ e $0,061$, respectivamente). No baço dos ratos do grupo TucFe, os níveis de mRNA do *Nrf2* foram menores em relação aos níveis encontrados no grupo Fe ($p = 0,042$). O efeito supressor do tucum encontrado no baço na expressão do gene do *Nrf2* induzido pelo ferro não foi observado no intestino destes ratos (**Figura 14**).

5.4.2 Expressão do gene da Catalase

Os níveis de mRNA da catalase foram analisados no fígado, baço e intestino dos ratos. A **Figura 14** mostra que no baço dos ratos que receberam tucum (grupos Tuc e TucFe), os níveis de mRNA da Catalase foram menores que aqueles encontrados no baço dos ratos dos grupos Controle ($p = 0,039$ e $0,048$, respectivamente). Esta redução também ocorreu no grupo suplementado com ferro que recebeu tucum em relação ao grupo Fe ($p = 0,014$).

No fígado e intestino não houve alteração nos níveis de transcrito de Catalase em ratos que receberam os diferentes tipos de dietas.

6 DISCUSSÃO

A atividade antiradicalar dos vários extratos foi determinada utilizando o radical 2,2-diphenyl-1-picryl-hidrazyl (DPPH) pela adição de várias concentrações de extratos das porções comestíveis das plantas do Cerrado à uma solução de DPPH[•] (0,025 g/L a 0,415 g/L). A porcentagem remanescente de DPPH[•] foi avaliada durante os primeiros 30 min ou no momento em que a estabilidade de decaimento do DPPH[•] foi alcançada, ou seja, até a estabilização da A_{515nm} (BRAND-WILLIAMS, CUVELIER e BERSET, 1995). A quantidade de extrato necessária para diminuir a concentração de DPPH[•] inicial em 50% (EC_{50}) tem sido amplamente utilizada para medir o poder antioxidante dos frutos (LU e FOO, 2000; FU et al., 2011). No entanto, este valor não inclui o tempo da reação, variável fundamental na avaliação da atividade antioxidante de uma amostra (BRAND-WILLIAMS, CUVELIER e BERSET, 1995; SÁNCHEZ-MORENO, LARRAURI e SAURA-CALIXTO, 1998). Desta forma, o tempo de reação até que a mesma atingisse o estado estacionário da concentração correspondente ao EC_{50} foi também determinado juntamente com o EA das amostras (frutas, pseudofruto, castanha ou palmito), conforme proposto por Sánchez-Moreno, Larrauri e Saura-Calixto (1998) para caracterizar a atividade antiradicalar dos extratos. De acordo com a classificação de Sánchez-Moreno, Larrauri e Saura-Calixto (1998), os comportamentos cinéticos das reações observados na presença dos extratos aquosos ou dos extratos com acetato de etila das amostras, incluindo dos extratos da maçã, foram intermediários, pois atingiram para todas as reações valores de TEC_{50} dentro do intervalo de 1,9-25,4 min (dados não mostrados).

Almeida et al. (2011) avaliaram a atividade antioxidantes de frutas produzidas e consumidas na região Nordeste do Brasil, também utilizando o ensaio com o radical DPPH[•]. Comparando-se os valores obtidos naquele estudo com os valores obtidos no presente estudo, verificou-se que o araticum, a cagaita, o cajuzinho, a jurubeba e o tucum apresentaram valores maiores (cerca de 4 a 12 vezes maiores) que o valor encontrado para o murici, fruto que apresentou maior valor de atividade antioxidante do estudo de Almeida e colaboradores (2011).

O teste de DPPH[•] se baseia na capacidade de reduzir o DPPH[•], pelo mecanismo de doação de um átomo de hidrogênio de compostos antioxidante que

possuem –SH, –OH e/ou –NH em sua estrutura, como é o caso dos compostos fenólicos. Em concordância com outros estudos (LEONTOWICZ et al., 2003; ALMEIDA et al., 2011; SOUZA et al., 2012), a análise comparativa entre o teor de fenólicos totais e os parâmetros obtidos no ensaio com DPPH[•] mostraram uma forte correlação positiva entre o teor de fenólicos totais (**APÊNDICE A**) e os valores de ET e EA nos extratos de acetato de etila ($r = 0,804$, $p = 0,000$ e $r = 0,858$, $p = 0,000$, respectivamente). Embora a quantidade de fenólicos totais tenha sido maior nos extratos aquosos, semelhantemente ao observado nas análises com DPPH[•], os extratos aquosos, apresentaram correlações significativas, porém mais fracas ($r = 0,668$, $p = 0,000$ e $r = 0,339$, $p = 0,035$, respectivamente) do que os extratos com acetato de etila. Não foi encontrada correlação entre o teor de fenólicos totais e o EC₅₀, o que sugere que os valores de ET e EA são mais apropriados do que os parâmetros EC₅₀ e TEC₅₀ na determinação das atividades antirradicalares das amostras. A forte e significativa correlação entre os níveis de compostos fenólicos e o ET e EA reforça o envolvimento dos compostos fenólicos nas atividades antioxidantes dessas plantas.

Uma correlação forte e positiva entre o teor de flavonóis totais (**APÊNDICE A**) e a capacidade antioxidante obtido no ensaio com DPPH[•] (ET), observada tanto no extrato aquoso ($r = 0,727$, $p = 0,007$) como no extrato acetato de etila ($r = 0,632$, $p = 0,028$), sugerem que os flavonóis possam ser os principais compostos fenólicos responsáveis pela atividade antioxidante nas espécies estudadas. Os flavonóis são uma das maiores subclasses dos flavonóides e incluem as quercetinas, kaempferóis, miricetina e isorhamnetina (MIKULIC-PETKOVSEK et al., 2012).

O araticum, a cagaita, o cajuzinho, a jurubeba, a lobeira e o tucum foram os frutos que apresentaram, em termos gerais, maior atividade antioxidante em relação à maçã. No entanto, o tucum se destacou consideravelmente em relação ao nível de fenóis totais do extrato aquoso (**APÊNDICE A**) quando comparado a maçã, ao araticum, a cagaita e a lobeira (cerca de 12, 3, 3 e 10 vezes maior, respectivamente). Neste aspecto, o tucum se sobressaiu pela quantidade de flavonoides totais, flavonoides amarelos e antocianinas, além de apresentar alta concentração de vitamina C (**APÊNDICE A**). Embora apresente altos níveis de polifenóis em sua composição, o tucum é um fruto desconhecido em relação à sua

atividade antioxidante. Que é do nosso conhecimento, esta é a primeira vez que se investiga a atividade antioxidante do fruto tucum *in vitro* e *in vivo*.

No estudo preliminar realizado *in vitro* sobre a atividade antioxidante de frutos do Cerrado, foi verificado que o tucum, apresenta maior teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante (AA) mais elevada que a maçã vermelha e que diversos outros frutos do Cerrado (**APÊNDICE A**), fruta nativa de regiões temperadas, que apresenta reconhecida alta AA (EBERHARDT, LEE e LIU, 2000; WOLFE e LIU, 2007; FLOEGEL et al., 2011). Afim de verificar se o tucum apresenta AA também *in vivo*, foi desenvolvido este estudo em modelo animal, no qual analisou-se o efeito do consumo diário de tucum (polpa e casca) sobre o estresse oxidativo induzido pela suplementação de ferro, em ratos Wistar.

Semelhante aos resultados obtidos em estudos anteriores (SIQUEIRA et al., 2012), a sobrecarga de ferro dietético pelo período de 30 dias (**Tabela 2**) resultou no aumento da concentração de ferro no fígado, baço e intestino (**Figura 13**), os três principais tecidos responsáveis pela homeostase de ferro no corpo. Além disso, a suplementação diária de ferro pela dieta aumentou a oxidação de lipídeos no fígado (**Figura 15 - APÊNDICE B**), elevando também a atividade das enzimas antioxidantes: Catalase e Glutathione-S-Transferase no rim, Glutathione Peroxidase no intestino e também reduziu a atividade da Glutathione Redutase no cérebro (**Tabela 7 - APÊNDICE B**). Estes resultados evidenciaram o efeito oxidante da sobrecarga de ferro nos tecidos.

Por outro lado, apesar da adição de tucum à dieta AIN-93G ter aumentado o conteúdo de ferro dietético (**Tabela 5**), os ratos tratados com tucum (grupo Tuc) mostraram uma redução dos níveis de ferro no intestino (**Figura 13**), diminuição do estresse oxidativo no baço e aumento na capacidade antioxidante do soro em comparação ao grupo Controle (**Figura 15, 16 e 17 - APÊNDICE B**).

O efeito do tucum sobre a mobilização de ferro, bem como sobre o estado oxidativo dos ratos foi reforçado pelos resultados encontrados nos ratos suplementados com ferro alimentados com dieta contendo tucum (TucFe). A adição de tucum na dieta suplementada com ferro reduziu significativamente os níveis de ferro no soro (**Tabela 6**), induziu uma ligeira redução nos níveis de ferro no fígado ($p=0,069$) e intestino ($p=0,095$) relativo ao grupo Fe e também anulou as alterações

induzidas pelo ferro sobre as atividades das enzimas antioxidantes no rim, intestino e cérebro (**Tabela 7 - APÊNDICE B**). O consumo de tucum protegeu o fígado de ratos suplementados com ferro contra a peroxidação lipídica induzida por sobrecarga de ferro (**Figura 15 – APÊNDICE B**). Esses resultados, associados ao aumento da capacidade antioxidante sérica dos animais do grupo TucFe, sugerem que o tucum exerceu atividade antioxidante *in vivo* por meio da regulação dos níveis de ferro nos tecidos.

O papel adverso de ferro no corpo, como um elemento chave envolvido em vários processos fisiológicos, tais como no transporte de oxigênio, transporte de elétrons na cadeia respiratória, cofator da síntese de DNA, entre outros, e ao mesmo tempo, sua função como catalisador em reações de formação de radicais livres, provavelmente, tornou-se um grande desafio para a evolução dos organismos vivos. Nos mamíferos, vários fatores regulam a homeostase do ferro sistêmico, o principal deles é a hepcidina, hormônio sintetizado no fígado que regula a absorção e exportação do ferro pelos enterócitos e macrófagos, respectivamente, orquestrando os níveis de ferro nos tecidos e sua mobilização (NEMETH et al., 2004; GANZ, 2011; GANZ e NEMETH, 2011). O estado do organismo em ferro, por sua vez, regula a expressão de hepcidina. Elevadas concentrações de transferrina biférrica no plasma sanguíneo induz a expressão de hepcidina pelo fígado que é secretada na corrente sanguínea. Uma vez na corrente sanguínea, a hepcidina se complexa com a Ferroportina, deflagrando a internalização e degradação desta proteína (NEMETH et al., 2004; GANZ, 2011). A ferroportina é uma proteína associada a membrana celular dos enterócitos e macrófagos do baço, cuja função é exportar o ferro das células para a corrente sanguínea, desta forma, sua internalização e degradação resulta na redução da exportação de ferro intracelular para a circulação sanguínea (NEMETH et al., 2004). Os níveis sanguíneos de hepcidina também parecem modular a síntese do transportador de metal bivalente (DMT-1), a principal proteína de absorção de ferro, localizado na membrana apical dos enterócitos (FRAZER e ANDERSON, 2003; ANDERSON, FRAZER e MCLAREN, 2009). Outra molécula, além da hepcidina, que parece estar envolvido na homeostase de ferro no organismo é o fator de transcrição *Nrf2*. Vários estudos demonstraram que a indução e ativação do *Nrf2* aumenta a exportação de ferro por meio da indução da síntese de ferroportina (MARRO et al., 2010; HARADA et al., 2011; OKADA et al.,

2012). Similar aos presentes resultados observado no fígado dos animais que receberam tucum em que houve um aumento nos níveis de mRNA de *Nrf2* e uma redução nos níveis de transcrito de hepcidina, Harada e colaboradores (2011) observaram também um comportamento inverso em relação aos níveis de *Nrf2* e os níveis de hepcidina em macrófagos. Além disso, em hepatócitos cujo *Nrf2* está mais ativo, Okada et al. (2012) também verificaram que os níveis de transcrito de *Hamp* apresentam uma redução quando comparado aos animais com *Nrf2* nulo. No entanto, este efeito antagônico do *Nrf2* em relação a hepcidina parecem ser indiretos, pois em macrófagos cujo gene *Nrf2* estava nocauteado a hepcidina permaneceu sendo inibida na presença do ativador de *Nrf2*, sulforafano no caso (HARADA et al., 2011).

Além da regulação sistêmica de ferro, mediada pelos níveis séricos de hepcidina, a absorção e a exportação do ferro é também regulada em nível intracelular, por meio do sistema IRE – IRP, que regula a tradução da ferroportina e do DMT-1. A tradução do mRNA das proteínas FPN1 e DMT-1 é mediada pelas proteínas reguladoras de ferro (IRP) 1 e 2, que se ligam ao elemento responsivo ao ferro (IRE), localizados na porção não traduzida 5' da *FPN1* e 3' da *DMT1*. A ligação do IRP ao IRE da *FPN1* e do *DMT1* na deficiência de ferro, reprime a *FPN1* e induz a tradução de *DMT1*, enquanto que nas células repletas de ferro, a tradução da FPN1 é ativada e o mRNA de DMT-1 torna-se instável e suscetível à hidrólise por RNases (GALY et al., 2008). Desta forma, mesmo existindo outros mecanismos reguladores da síntese das proteínas exportadoras de ferro celular, como o IRP e o *Nrf2*, a hepcidina regula os níveis da ferroportina em nível pós-traducional, e por isso pode ser considerado um regulador chave da homeostase do ferro e, conseqüentemente, pode ser considerado um hormônio que age indiretamente como antioxidante por proteger as células contra o danos oxidativos induzidos por sobrecarga de ferro.

Apesar deste fino mecanismo molecular que regula a absorção de ferro no intestino, conforme as demandas fisiológicas, o consumo crônico de dietas ricas em ferro resulta em sobrecarga de ferro (SIQUEIRA et al., 2012). Confirmando esta afirmativa, a suplementação de ferro promoveu um aumento dos níveis de ferro no soro, aumento da saturação de transferrina, e acúmulo de ferro no fígado, baço e rim dos ratos no grupo Fe (**Tabela 6; Figura 13**). Estes resultados podem, por sua vez,

explicar a indução de transcrição da hepcidina no fígado dos animais suplementado com ferro (**Figura 14**), conforme modelo proposto na literatura (ANDERSON, FRAZER e MCLAREN, 2009; GANZ, 2011). Além do aumento de transcrito de hepcidina, os ratos suplementados com ferro também mostraram redução dos níveis de transcrito de ferroportina no baço, o que pode ter contribuído para o acúmulo de ferro neste órgão. Esta redução dos níveis de mRNA de ferroportina pode estar ligado a um aumento do processo inflamatório nos ratos suplementados com ferro (LIU et al., 2005; HARADA et al., 2011; WARD e KAPLAN, 2012).

O efeito oposto da suplementação de ferro sobre a expressão da hepcidina foi observado nos ratos tratados com a dieta contendo tucum. O consumo diário de tucum inibiu a expressão do gene da hepcidina no fígado dos animais do grupo Tuc (**Figura 14**). A ausência de alteração nos níveis de ferro no soro e na saturação de transferrina em relação ao grupo Controle indica que o efeito do tucum sobre a expressão do gene da hepcidina ocorre por um mecanismo independente dos níveis de ferro sistêmico. O nível mais baixo de ferro encontrado no intestino dos animais tratados com tucum (**Figura 13**) corrobora com a redução dos níveis de hepcidina, a qual permitiu a livre exportação de ferro através da membrana basolateral dos enterócitos, mediada pela ferroportina poupada da degradação. Além disso, a ausência de alteração nos níveis de ferro do baço e do fígado dos ratos Tuc em relação ao grupo Controle, apesar de terem consumido dieta com níveis dietéticos de ferro mais elevados (**Tabela 5**), pode ser também explicada pelos níveis menores de hepcidina que permitiram exportação eficiente de ferro pelos macrófagos e hepatócitos através da ferroportina.

Outra constatação que reforça o efeito inibidor da síntese hepática de hepcidina pelo tucum foi observada no grupo de ratos suplementados com ferro e alimentados com dieta contendo tucum (TucFe). Apesar de ingerir a mesma quantidade de ferro do grupo Fe, os ratos TucFe não acumularam ferro no baço e intestino como observado nos ratos Fe (**Figura 13**). Estes resultados sugerem que o nível reduzido de hepcidina do grupo TucFe em relação ao grupo Fe (**Figura 14**) levou a uma maior mobilização de ferro a partir do baço e intestino em relação à encontrada no grupo Fe, posto que, embora os níveis de transcritos de ferroportina estejam reduzidos como no grupo Fe, os níveis de hepcidina estão menores do que o grupo suplementado com Fe (grupo Fe). Assim, os baixos níveis de hepcidina,

encontrados no grupo TucFe devem ter resultado em uma menor degradação de ferroportina e, portanto, na maior exportação de ferro relativa ao grupo suplementado com ferro. Estes resultados reforçam as evidências de que o tucum contém moléculas bioativas, em sua composição, capazes de modular a expressão de hepcidina.

De forma semelhante ao tucum, o consumo de uma planta usada na medicina popular chinesa, *Caulis spatholobi*, no tratamento da anemia, induziu a redução dos níveis de transcrito de hepcidina (GUAN et al., 2013). Guan e colaboradores (2013) sugerem que tal planta seja utilizada no tratamento de doenças associadas ao aumento da expressão de hepcidina, como ocorre na anemia da doença crônica. A redução dos níveis de hepcidina observados no ratos que consumiram tucum sugere que o tucum pode vir a tornar-se um alimento aliado ao tratamento da anemia das doenças crônicas.

A redução de danos a lipídeos no fígado, mesmo com o aumento dos níveis de ferro nos animais suplementados com ferro e alimentados com tucum (TucFe), a redução de danos a lipídeos (grupo Tuc) e a proteínas (grupo TucFe) no baço dos animais tratados com tucum e o aumento da capacidade antioxidante do soro (FRAP) demonstram a capacidade antioxidante do tucum. Estudos indicam pelo menos três mecanismos de ação pelos quais compostos bioativos presentes em frutas exercem sua atividade antioxidante no organismo. O primeiro mecanismo está envolvido com a doação de elétrons às EROs, transformando-as em moléculas estáveis. O segundo mecanismo ocorre através da ação quelante ou modulando a homeostase de metais de transição, como o ferro por exemplo, prevenindo a produção de EROs (SIQUEIRA et al., 2012). O terceiro mecanismo envolve a modulação da expressão ou atividade de enzimas antioxidantes ou outras proteínas envolvidas em vias de defesa antioxidantes do organismo (CHEN et al., 2005; HERMES-LIMA, 2005; SURH et al., 2005; DINKOVA-KOSTOVA e TALALAY, 2008; ERLANK et al., 2011; BAYRAM et al., 2012). Os resultados preliminares, obtidos *in vitro* (**APÊNDICE A**), sugerem que o tucum exerce o seu efeito antioxidante por meio de bioativos que doam elétrons. Além disso, no presente estudo, as alterações nos níveis teciduais de ferro e a modificação dos níveis de transcrito de hepcidina no fígado sugerem ainda que o tucum possua bioativos que influenciam na homeostase do ferro, ademais as alterações nos níveis de transcrito de *Nrf2* e catalase sugerem

que a prevenção a danos oxidativos exercidas pela casca e polpa do tucum se deve também pela presença de bioativos que modulam a via de sinalização e regulação do estado oxidativo no organismo.

Alguns trabalhos demonstram que os polifenóis são capazes de aumentar os níveis de transcrito de *Nrf2* (BAYRAM et al., 2012; BAYRAM, 2012), e os níveis de proteína do *Nrf2* (BALOGUN et al., 2003; SAHIN et al., 2010). O tucum apresenta uma alta quantidade de polifenóis (**APÊNDICE A**), no entanto, outros estudos precisam ser realizados para saber quais compostos foram os responsáveis pelo aumento dos níveis de transcrito de *Nrf2* no fígado dos ratos tratados com tucum. Esse aumento dos níveis de *Nrf2* encontrados tanto do grupo sem suplementação de ferro (Tuc) como do grupo suplementado com ferro (TucFe) ($p=0,000$ e $0,034$, respectivamente) (**Figura 14**) deve estar relacionado ao papel que o fígado desempenha no metabolismo dos polifenóis. Após serem absorvidos, os polifenóis são extensamente transportados para o fígado aonde são biotransformados, sofrendo neste órgão, sulfatação, glucuronidação, metilação e conjugação de glicina (ANHÊ et al., 2013). Trabalhos realizados com amora silvestre, rica em polifenóis, e com extrato da casca de *Acanthopanax senticosus* Harms, uma planta medicinal chinesa, também demonstram aumentar os níveis de transcrito e da proteína *Nrf2* no fígado de ratos (WANG et al., 2010; CHO et al., 2011).

O *Nrf2* é um importante modulador do estado oxidativo corporal, por ser responsável pela regulação da expressão de várias enzimas antioxidantes e detoxificadoras (CHAN e KAN, 1999; SURH et al., 2005). Desta forma, mesmo com o aumento da concentração de ferro no fígado dos animais suplementados com ferro que receberam tucum na dieta (TucFe) em comparação ao grupo Controle (CNT) ($p = 0,006$) esses animais apresentam uma diminuição de danos a lipídeos quando comparados ao grupo Fe ($p=0,008$), sugerindo que o aumento do *Nrf2* no fígado dos grupos alimentados com tucum (Tuc e TucFe) possa estar envolvido com a ativação de outras moléculas antioxidantes diferentemente das enzimas investigadas no presente estudos (**Figura 14; Tabela 7 – APÊNDICE B**).

O efeito protetor da elevação dos níveis de *Nrf2* (**Figura 14**) foi reforçado pela ausência de aumento de danos a biomoléculas encontrados no baço e intestino dos

animais suplementados com ferro (grupo Fe) (**Figura 15 e 16 – APÊNDICE B**) mesmo aumentando os níveis de ferro nestes tecidos em comparação com o grupo Controle (CNT) ($p=0,029$ e $0,011$, respectivamente). O aumento da atividade da enzima GPx associado ao aumento de transcritos de *Nrf2* e o aumento de ferro sem alteração dos níveis de danos oxidativos observados no intestino dos animais deste grupo (Fe; **APÊNDICE C**), sugerem que o mecanismo de proteção que ocorreu neste órgão possa ter sido mediado pela ação antioxidante da GPx induzido pelo *Nrf2* (BANNING, 2005). A atividade da GPx tem sido associada a diminuição da oxidação a lipídeos no intestino (JIANG et al., 2010; CHAUHAN, OJHA e MAHMOOD, 2011).

A fim de se verificar o efeito do *Nrf2* sobre a expressão da Catalase, foi dosado os níveis de transcrito de Catalase (CHAN e KAN, 1999). No baço dos animais suplementados com Fe (grupo Fe), mesmo com o aumento dos níveis de *Nrf2*, não foram observadas alterações tanto nos níveis de transcritos de catalase como na atividade desta enzima. Resultados encontrados por Cho e colaboradores (2011), no fígado com amora silvestre e no rim com epigallocatequina-3-galato do chá verde de ratos (SAHIN et al., 2010) demonstraram que a atividade da Catalase também permaneceu inalterada mesmo tendo aumentado a expressão de *Nrf2* nestes órgãos. Já no baço dos animais alimentados com tucum (Tuc e TucFe), ainda que não alterando os níveis de transcrito de *Nrf2* em relação ao grupo Controle, foi verificado uma redução dos níveis de transcrito de catalase sem alteração da atividade desta enzima.

A NADPH oxidase é uma família de enzimas associadas a membrana que são responsáveis por catalisar a produção de superóxido (O_2^-) pela transferência de um elétron para o oxigênio molecular, utilizando o NADPH como doador de elétron. O aumento da atividade da NADPH oxidase aumenta a produção de superóxido, o que tem papel fundamental na morte de micro-organismos invasores nos fagócitos, mas também pode causar danos a tecidos. No baço dos animais que receberam tucum verificou-se uma tendência a diminuir a atividade da NADPH oxidase ($p=0,054$) (**Tabela 7 - APÊNDICE B**). Pearson et al. (2008) demonstrou que a presença de resveratrol, um polifenol presente na uva, quando presente na dieta de ratos conseguiu reverter o aumento da atividade da NADPH oxidase causada pela ingestão de alta caloria dietética. No coração, o tucum associado ao ferro (grupo

TucFe) também conseguiu reduzir os níveis de NADPH oxidase quando comparado aos animais suplementados com Fe. Octavia et al. (2012) defendem que o aumento da atividade de NADPH oxidase é o maior responsável pela insuficiência cardíaca induzida pelo estresse oxidativo. Esta enzima tem sido considerada a maior fonte de produção de espécies reativas de oxigênio no miocárdio e fibroblasto (OCTAVIA, BRUNNER-LA ROCCA e MOENS, 2012). Desta forma, o efeito protetor do tucum pode também estar associado à capacidade de induzir a redução de produção de superóxido no coração dos animais tratados com Tucum e suplementados com Fe (TucFe).

7 CONCLUSÕES

7.1 ESTUDO IN VITRO

- Os frutos: araticum, cagaita, cajuzinho, jurubeba, lobeira e tucum, apresentaram atividade antioxidante maior que o da maçã vermelha.
- Com exceção da lobeira e da castanha do baru, o extrato aquoso destas plantas apresentaram maior atividade antioxidante do que o extrato com acetato de etila.
- Existe uma correlação positiva entre a atividade antioxidante (DPPH) e a quantidade de fenólicos totais dos frutos.

7.2 ESTUDO IN VIVO

Os resultados encontrados neste estudo sugerem que:

- O consumo diário de tucum (*Bactris setosa* Mart.), na proporção de 15% da dieta, reduz o estresse oxidativo induzido pelo ferro, em tecidos de ratos;
- O consumo do tucum pode inibir a expressão gênica de hepcidina hepática, em ratos;
- Um ou mais compostos presentes na composição do tucum induz a expressão gênica do fator de transcrição *Nrf2*, no fígado de ratos;
- O efeito antioxidante principal do tucum, parece estar associado ao aumento da mobilização de ferro nos tecidos de armazenamento, mediada pelos baixos níveis de hepcidina.
- A ingestão do tucum também está envolvida com a ativação de genes envolvidos com a defesa antioxidante.

8 PERSPECTIVAS

O Cerrado deve ser mais valorizado, preservado e estudado, já que abarca inúmeras espécies que podem tornar-se úteis ao ser humano, na alimentação, na prevenção e no tratamento de inúmeras doenças.

Dentre essas espécies que apresentam benefícios, se destaca o tucum-do-Cerrado, um fruto pouco conhecido na literatura e que de acordo com os presentes resultados, merece ser melhor pesquisado tanto utilizando modelos animais como em humanos. Além de ter apresentado biomoléculas envolvidas na defesa antioxidante, o seu efeito inibitório na expressão do gene da hepcidina faz dele um fruto que pode vir a tornar-se um alimento aliado ao tratamento da anemia de doença crônica, na prevenção de doenças crônicas e na desaceleração do processo de envelhecimento.

REFERÊNCIAS

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods Enzymol**, v. 105, p. 121-6, 1984. ISSN 0076-6879 (Print) 0076-6879 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6727660> >.

ALMEIDA, M. M. B. et al. Bioactive compounds and antioxidant activity of fresh exotic fruits from northeastern Brazil. **Food Research International**, v. 44, p. 2155-2159, 2011.

ALMEIDA, M. M. B. S., P. H. M.; ARRIAGA, A. M. C.; PRADO, G. M.; MAGALHÃES, C. E. C.; MAIA, G. A. AND LEMOS, T. L. G. Bioactive compounds and antioxidant activity of fresh exotic fruits from northeastern Brazil. **Food Research International**, v. 44, p. 2155-2159, 2011.

ANDERSON, G. J.; FRAZER, D. M.; MCLAREN, G. D. Iron absorption and metabolism. **Curr Opin Gastroenterol**, v. 25, n. 2, p. 129-35, Mar 2009. ISSN 1531-7056 (Electronic) 0267-1379 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19528880> >.

ANDRADE, R. G., JR. et al. The antioxidant effect of tannic acid on the in vitro copper-mediated formation of free radicals. **Arch Biochem Biophys**, v. 437, n. 1, p. 1-9, May 1 2005. ISSN 0003-9861 (Print) 0003-9861 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15820211> >.

ANHÊ, F. F. et al. Polyphenols and type 2 diabetes: A prospective review. **PharmaNutrition**, v. 1, n. 4, p. 105-114, 2013. ISSN 2213-4344. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213434413000406> >.

APPLIED BIOSYSTEMS. **Guide to Performing Relative Quantitation of Gene Expression Using Real-Time Quantitative PCR**. Part Number 4371095 Rev B: Applied Biosystems 2008.

ARRUDA, L. F. et al. Dietary iron concentration may influence aging process by altering oxidative stress in tissues of adult rats. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, p. e61058, 2013. ISSN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23593390> >.

ARTICULAÇÃO PACARI. **Farmacopéia Popular do Cerrado**. PACARI, A. Goiás 2010.

AZEVEDO, M. D. O.; FELIPE, M. S. S.; BRIGIDO, M. D. M. **Técnica básicas em Biologia Molecular**. Editora UnB, 2003.

BALOGUN, E. et al. Curcumin activates the haem oxygenase-1 gene via regulation of Nrf2 and the antioxidant-responsive element. **Biochem J**, v. 371, n. Pt 3, p. 887-95, May 1 2003. ISSN 0264-6021 (Print) 0264-6021 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12570874> >.

BALOGUN, E. H., M.; GONG, P.; KILLEEN, E.; GREEN, C. J.; FORESTI, R.; ALAM, J. AND MOTTERLINI, R. Curcumin activates the haem oxygenase-1 gene via regulation of Nrf2 and the antioxidant-responsive element. **Biochemical Journal** v. 371, p. 887-895, 2003.

BANNING, A. et al. The GI-GPx gene is a target for Nrf2. **Mol Cell Biol**, v. 25, n. 12, p. 4914-23, Jun 2005. ISSN 0270-7306 (Print) 0270-7306 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15923610> >.

BANNING, A. D., S.; KLUTH, D.; ZHOU, Z. AND BRIGELIUS-FLOHE, R. . The GI-GPx Gene Is a Target for Nrf2. **Molecular and Cellular Biology**, v. 25, n. 12, p. 4914-4923, 2005.

BARANOWSKA, I.; CZERNICKI, K.; ALEKSANDROWICZ, R. The analysis of lead, cadmium, zinc, copper and nickel content in human bones from the upper Silesian industrial district. **Sci Total Environ**, v. 159, n. 2-3, p. 155-62, Jan 10 1995. ISSN 0048-9697 (Print) 0048-9697 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7878447> >.

BAYRAM, B. et al. A Diet Rich in Olive Oil Phenolics Reduces Oxidative Stress in the Heart of SAMP8 Mice by Induction of Nrf2-Dependent Gene Expression. **Rejuvenation Research**, v. 15(1), p. 71-81, 2012.

BAYRAM, B. O., B.; GRIMM, S.; ROEDER, T.; SCHRADER, C.; ERNST, I. M. A; WAGNER, A. E.; GRUNE, T; FRANK, J. AND RIMBACH, G. A Diet Rich in Olive Oil Phenolics Reduces Oxidative Stress in the Heart of SAMP8 Mice by Induction of Nrf2-Dependent Gene Expression. **Rejuvenation Research**, v. 15, n. 1, p. 71-81, 2012.

BENZIE, I. F. F. A. S., J. J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, p. 70-76, 1996.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**, v. 28, p. 25-30, 1995.

BRASIL. Constituição Federal de 5 outubro de 1988, Constituição da República Federativa do Brasil. 1988. Disponível em: < http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/constituicao/constitui%C3%A7ao.htm >. Acesso em: 10 Novembro.

BRIGELIUS-FLOHÉ, R.; MAIORINO, M. Glutathione peroxidases. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1830, n. 5, p. 3289-3303, 2013. ISSN 0304-4165. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304416512003406> >.

CANCHE-POOL, E. B. et al. Probiotics and autoimmunity: an evolutionary perspective. **Med Hypotheses**, v. 70, n. 3, p. 657-60, 2008. ISSN 0306-9877 (Print) 0306-9877 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17720327> >.

CANDAN, N. A. T., N. Very rapid quantification of malondialdehyde (MDA) in rat brain exposed to lead, aluminium and phenolic antioxidants by high-performance liquid chromatography-fluorescence detection. **NeuroToxicology**, v. 29, p. 708-713, 2008.

CARBONI, M.; LATOUR, J.-M. Enzymes with an heterodinuclear iron–manganese active site: Curiosity or necessity? **Coordination Chemistry Reviews**, v. 255, n. 1–2, p. 186-202, 2011. ISSN 0010-8545. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0010854510001773> >.

CARVALHO, F. M. V.; JÚNIOR, P. D. M.; FERREIRA, L. G. The Cerrado into-pieces: Habitat fragmentation as a function of landscape use in the savannas of central Brazil. **Biological Conservation**, v. 142, n. 7, p. 1392–1403, 2009.

CASTRO, A. A. J. F. et al. How Rich is the Flora of Brazilian Cerrados? **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 86, n. 1, p. 192-224, 1999.

CHAN, K.; KAN, Y. W. Nrf2 is essential for protection against acute pulmonary injury in mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 96, n. 22, p. 12731-6, Oct 26 1999. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10535991> >.

CHAUHAN, S. S.; OJHA, S.; MAHMOOD, A. Modulation of lipid peroxidation and antioxidant defense systems in rat intestine by subchronic fluoride and ethanol administration. **Alcohol**, v. 45, n. 7, p. 663-72, Nov 2011. ISSN 1873-6823 (Electronic) 0741-8329 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21145694> >.

CHEN, C.; KONG, A. N. Dietary chemopreventive compounds and ARE/EpRE signaling. **Free Radic Biol Med**, v. 36, n. 12, p. 1505-16, Jun 15 2004. ISSN 0891-5849 (Print) 0891-5849 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15182853> >.

CHEN, C. A. K., A.-N. T. Dietary Chemopreventive Compounds and ARE/EpRE Sinaling. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 36, n. 12, p. 1505 - 1516, 2004.

CHEN, C. Y. et al. Resveratrol upregulates heme oxygenase-1 expression via activation of NF-E2-related factor 2 in PC12 cells. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 331, n. 4, p. 993-1000, Jun 17 2005. ISSN 0006-291X (Print) 0006-291X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15882976> >.

CHO, B. O. et al. Blackberry extract attenuates oxidative stress through up-regulation of Nrf2-dependent antioxidant enzymes in carbon tetrachloride-treated rats. **J Agric Food Chem**, v. 59, n. 21, p. 11442-8, Nov 9 2011. ISSN 1520-5118 (Electronic) 0021-8561 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21888405> >.

CHRISTIANSEN, H., SHEIKH, N., SAILE, B., REUTER, F., RAVE-FRANK, M., HERMANN, R. M., DUDAS, J., HILLE, A., HESS, C. F. AND RAMADORI, G. x-Irradiation in Rat Liver: Consequent Upregulation of Hecpidin and Downregulation of Hemojuvelin and Ferroportin-1 Gene Expression. **Radiology**, v. 242, n. 1, p. 189-197, 2007.

DINKOVA-KOSTOVA, A. T.; TALALAY, P. Direct and indirect antioxidant properties of inducers of cytoprotective proteins. **Mol Nutr Food Res**, v. 52 Suppl 1, p. S128-38, Jun 2008. ISSN 1613-4133 (Electronic) 1613-4125 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18327872> >.

DOURADO, L. P. S. **Efeito do consumo do tucum do cerrado (Bactris setosa) no estresse oxidativo induzido por ferro em ratos**. 2012. 60 Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Nutrição Humana - PGNUT, Universidade de Brasília

DUNN, L. L.; SURYO RAHMANTO, Y.; RICHARDSON, D. R. Iron uptake and metabolism in the new millennium. **Trends Cell Biol**, v. 17, n. 2, p. 93-100, Feb 2007. ISSN 1879-3088 (Electronic) 0962-8924 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17194590> >.

EBERHARDT, M. V.; LEE, C. Y.; LIU, R. H. Antioxidant activity of fresh apples. **Nature**, v. 405, n. 6789, p. 903-4, Jun 22 2000. ISSN 0028-0836 (Print)

0028-0836 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10879522> >.

ERLANK, H. et al. Polyphenols activate Nrf2 in astrocytes via H₂O₂, semiquinones, and quinones. **Free Radic Biol Med**, v. 51, n. 12, p. 2319-27, Dec 15 2011. ISSN 1873-4596 (Electronic) 0891-5849 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22037513> >.

FAHEY, J. W. et al. Sulforaphane inhibits extracellular, intracellular, and antibiotic-resistant strains of *Helicobacter pylori* and prevents benzo[a]pyrene-induced stomach tumors. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, n. 11, p. 7610-5, May 28 2002. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12032331> >.

FERREIRA, L. G.; HUETE, A. R. Assessing the seasonal dynamics of the Brazilian Cerrado vegetation through the use of spectral vegetation indices. **International Journal of Remote Sensing**, v. 25, n. 10, p. 1837-1860, 2004.

FINKEL, T.; HOLBROOK, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, v. 408, n. 6809, p. 239-47, Nov 9 2000. ISSN 0028-0836 (Print) 0028-0836 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11089981> >.

FLOEGEL, A. et al. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 24, n. 7, p. 1043-1048, 2011.

FRAZER, D. M.; ANDERSON, G. J. The orchestration of body iron intake: how and where do enterocytes receive their cues? **Blood Cells Mol Dis**, v. 30, n. 3, p. 288-97, May-Jun 2003. ISSN 1079-9796 (Print) 1079-9796 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12737947> >.

FU, L. et al. Antioxidant capacities and total phenolic contents of 62 fruits. **Food Chemistry**, v. 129, n. 2, p. 345-350, 2011.

FURLEY, P. A. The nature and diversity of neotropical savanna vegetation with particular reference to the Brazilian cerrados. **Global Ecology and Biogeography**, v. 8, p. 223-241, 1999.

GALY, B. et al. Iron regulatory proteins are essential for intestinal function and control key iron absorption molecules in the duodenum. **Cell Metab**, v. 7, n. 1, p. 79-85, Jan 2008. ISSN 1550-4131 (Print) 1550-4131 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18177727> >.

GANZ, T. Hepcidin and iron regulation, 10 years later. **Blood**, v. 117, n. 17, p. 4425-33, Apr 28 2011. ISSN 1528-0020 (Electronic) 0006-4971 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21346250> >.

GANZ, T.; NEMETH, E. Hepcidin and disorders of iron metabolism. **Annu Rev Med**, v. 62, p. 347-60, 2011. ISSN 1545-326X (Electronic) 0066-4219 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20887198> >.

GANZ, T.; NEMETH, E. Hepcidin and iron homeostasis. **Biochim Biophys Acta**, v. 1823, n. 9, p. 1434-43, Sep 2012. ISSN 0006-3002 (Print) 0006-3002 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22306005> >.

GARCIA-ALONSO, F. J.; GUIDARELLI, A.; PERIAGO, M. J. Phenolic-rich juice prevents DNA single-strand breakage and cytotoxicity caused by tert-butylhydroperoxide in U937 cells: the role of iron chelation. **J Nutr Biochem**, v. 18, n. 7, p. 457-66, Jul 2007. ISSN 0955-2863 (Print) 0955-2863 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16997539> >.

GARCIA-ALONSO, F. J. G., A.; AND PERIAGO, M. J. Phenolic-rich juice prevents DNA single-strand breakage and cytotoxicity caused by tert-butylhydroperoxide in U937 cells: the role of iron chelation. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 18, p. 457-466, 2007.

GÓTH, L.; NAGY, T. Inherited catalase deficiency: Is it benign or a factor in various age related disorders? **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 753, n. 2, p. 147-154, 2013. ISSN 1383-5742. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1383574213000689> >. Acesso em: 2013/12//.

GRIGORYANTS, V., HANNAWA, K. K., PEARCE, C. G., SINHA, I., ROELOFS, K. J., AILAWADI, G., DEATRICK, K. B., WOODRUM, D. T., CHO, B. S., HENKE, P. K., STANLEY, J. C., EAGLETON, M. J. AND UPCHURCH JR, G. R. Tamoxifen up-regulates catalase production, inhibits vessel wall neutrophil infiltration, and attenuates development of experimental abdominal aortic aneurysms **Journal of Vascular Surgery**, v. 41, n. 1, p. 108-114, 2005.

GUAN, Y. et al. Screening identifies the Chinese medicinal plant *Caulis Spatholobi* as an effective HAMP expression inhibitor. **J Nutr**, v. 143, n. 7, p. 1061-6, Jul 2013. ISSN 1541-6100 (Electronic) 0022-3166 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23700338> >.

HABDOUS, M. et al. Rapid spectrophotometric method for serum glutathione S-transferases activity. **Clinica Chimica Acta**, v. 326, n. 1-2, p. 131-142, 2002.

ISSN 0009-8981. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009898102003297>>.

HABIG, W. H. A. J., W. B. Glutathione S-transferases (rat and human). **Methods in Enzymology**, v. 77, p. 218-231, 1981.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. Fourth Edition. Oxford University Press, 2007.

HARADA, N. et al. Nrf2 regulates ferroportin 1-mediated iron efflux and counteracts lipopolysaccharide-induced ferroportin 1 mRNA suppression in macrophages. **Arch Biochem Biophys**, v. 508, n. 1, p. 101-9, Apr 1 2011. ISSN 1096-0384 (Electronic) 0003-9861 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21303654>>.

HARIDASAN, M. Nutritional adaptations of native plants of the cerrado biome in acid soils. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 20, n. 3, p. 183-195, 2008.

HARMAN, D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. **J Gerontol**, v. 11, n. 3, p. 298-300, Jul 1956. ISSN 0022-1422 (Print) 0022-1422 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13332224> >.

HARTREE, E. F. Determination of Protein: A Modification of the Lowry Method that Gives a Linear Photometric Response. **Analytical Biochemistry**, v. 48, p. 422-427, 1972.

HENTZE, M. W.; MUCKENTHALER, M. U.; ANDREWS, N. C. Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism. **Cell**, v. 117, n. 3, p. 285-97, Apr 30 2004. ISSN 0092-8674 (Print) 0092-8674 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15109490>>.

HERMES-LIMA, M. Oxygen in Biology and Biochemistry: Role of Free Radicals. In: STOREY, K. B. (Ed.). **Functional Metabolism: Regulation and Adaptation**. New Jersey, USA: John Wiley & Sons, 2005. cap. 12, p.319-366.

HERMES-LIMA, M. A. S., K. B. . Relationship between anoxia exposure and antioxidant status in the frog *Rana pipiens*. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**271, v. 271, p. R918-R925, 1996.

HILTON, R. J. et al. Phosphate inhibits in vitro Fe³⁺ loading into transferrin by forming a soluble Fe(III)-phosphate complex: a potential non-transferrin bound iron species. **J Inorg Biochem**, v. 110, p. 1-7, May 2012. ISSN 1873-3344 (Electronic)

0162-0134 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22459167>>.

HOGAN, S. et al. Antiproliferative and antioxidant properties of anthocyanin-rich extract from açai. **Food Chemistry**, v. 118, n. 2, p. 208–214, 2010.

HU, Y. et al. Chinese herbal medicine-derived compounds for cancer therapy: a focus on hepatocellular carcinoma. **J Ethnopharmacol**, v. 149, n. 3, p. 601-12, Oct 7 2013. ISSN 1872-7573 (Electronic) 0378-8741 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23916858>>.

JIANG, W.-D. et al. Lipid peroxidation, protein oxidant and antioxidant status of muscle, intestine and hepatopancreas for juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian) fed graded levels of myo-inositol. **Food Chemistry**, v. 120, n. 3, p. 692–697, 2010.

JOANISSE, D. R. A. S., K. B. . Oxidative damage and antioxidants in *Rana sylvatica*, the freeze-tolerant wood frog. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 271, p. R545 - R553, 1996.

KENYON, C. The plasticity of aging: insights from long-lived mutants. **Cell**, v. 120, n. 4, p. 449-60, Feb 25 2005. ISSN 0092-8674 (Print) 0092-8674 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15734678> >.

KILLILEA, D. W. et al. Iron accumulation during cellular senescence in human fibroblasts in vitro. **Antioxid Redox Signal**, v. 5, n. 5, p. 507-16, Oct 2003. ISSN 1523-0864 (Print) 1523-0864 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14580305>>.

KILTY, C. et al. Glutathione S-transferases as biomarkers of organ damage: applications of rodent and canine GST enzyme immunoassays. **Chemico-Biological Interactions**, v. 111–112, n. 0, p. 123-135, 1998. ISSN 0009-2797. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S00092797001567>>.

KIRKMAN, H. N.; GAETANI, G. F. Mammalian catalase: a venerable enzyme with new mysteries. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 32, n. 1, p. 44-50, 2007. ISSN 0968-0004. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0968000406003203>>.

KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. Conservation of the Brazilian Cerrado. **Conservation Biology**, v. 19, n. 3, p. 707–713, 2005.

KOPPENOL, W. H. The Haber-Weiss cycle - 70 years later. **Redox Report.**, v. 6, p. 229 - 234 2001.

KRYCH, J.; GEBICKA, L. Catalase is inhibited by flavonoids. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 58, n. 0, p. 148-153, 2013. ISSN 0141-8130. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813013001700> >.

KUHN, L. C. Iron and gene expression: molecular mechanisms regulating cellular iron homeostasis. **Nutr Rev**, v. 56, n. 2 Pt 2, p. s11-9; discussion s54-75, Feb 1998. ISSN 0029-6643 (Print) 0029-6643 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9564172> >.

LAU, A. et al. Dual roles of Nrf2 in cancer. **Pharmacol Res**, v. 58, n. 5-6, p. 262-70, Nov-Dec 2008. ISSN 1043-6618 (Print) 1043-6618 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18838122> >.

LEONTOWICZ, M. et al. Apple and pear peel and pulp and their influence on plasma lipids and antioxidant potentials in rats fed cholesterol-containing diets. **J Agric Food Chem**, v. 51, n. 19, p. 5780-5, Sep 10 2003. ISSN 0021-8561 (Print) 0021-8561 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12952433> >.

LEVENSON, C. W.; TASSABEHJI, N. M. Iron and ageing: an introduction to iron regulatory mechanisms. **Ageing Res Rev**, v. 3, n. 3, p. 251-63, Jul 2004. ISSN 1568-1637 (Print) 1568-1637 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15231236> >.

LIU, R. H.; LIU, J.; CHEN, B. Apples prevent mammary tumors in rats. **J Agric Food Chem**, v. 53, n. 6, p. 2341-3, Mar 23 2005. ISSN 0021-8561 (Print) 0021-8561 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15769178> >.

LIU, X.-B. et al. Regulation of hepcidin and ferroportin expression by lipopolysaccharide in splenic macrophages. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, v. 35, n. 1, p. 47-56, 2005. ISSN 1079-9796. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1079979605000586> >. Acesso em: 2005/8//.

LU, Y.; FOO, L. Y. Antioxidant and radical scavenging activities of polyphenols from apple pomace. **Food Chemistry**, v. 68, n. 1, p. 81-85, 2000.

MA, Y. S. et al. Response to the increase of oxidative stress and mutation of mitochondrial DNA in aging. **Biochim Biophys Acta**, v. 1790, n. 10, p. 1021-9, Oct

2009. ISSN 0006-3002 (Print) 0006-3002 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19397952> >.

MA, Y. S., WU, S. B., LEE, W. Y., CHENG J. S., AND WEI, Y. H. Response to the increase of oxidative stress and mutation of mitochondrial DNA in aging. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1790 p. 1021-1029, 2009.

MACHADO, R. B. et al. **Estimativas de perda da área do Cerrado brasileiro**. Conservação Internacional. Brasília, DF. 2004

MAES, M. et al. A review on the oxidative and nitrosative stress (O&NS) pathways in major depression and their possible contribution to the (neuro)degenerative processes in that illness. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 35, n. 3, p. 676-92, Apr 29 2011. ISSN 1878-4216 (Electronic) 0278-5846 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20471444> >.

MAES, M., GALECKI P., CHANG Y. S. AND BERK, M. A review on the oxidative and nitrosative stress (O&NS) pathways in major depression and their possible contribution to the (neuro)degenerative processes in that illness. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry** v. 35, p. 676-692, 2011.

MARRO, S. et al. Heme controls ferroportin1 (FPN1) transcription involving Bach1, Nrf2 and a MARE/ARE sequence motif at position -7007 of the FPN1 promoter. **Haematologica**, v. 95, n. 8, p. 1261-8, Aug 2010. ISSN 1592-8721 (Electronic) 0390-6078 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20179090> >.

MCMAHON, M. et al. The Cap'n'Collar basic leucine zipper transcription factor Nrf2 (NF-E2 p45-related factor 2) controls both constitutive and inducible expression of intestinal detoxification and glutathione biosynthetic enzymes. **Cancer Res**, v. 61, n. 8, p. 3299-307, Apr 15 2001. ISSN 0008-5472 (Print) 0008-5472 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11309284> >.

MEHTA, J. L. et al. Oxidative stress in diabetes: a mechanistic overview of its effects on atherogenesis and myocardial dysfunction. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 38, n. 5-6, p. 794-803, 2006. ISSN 1357-2725 (Print) 1357-2725 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16442834> >.

MEHTA, J. L., RASOULI, N., SINHA, A. K. AND MOLAVI, B. Oxidative stress in diabetes: A mechanistic overview of its effects on atherogenesis and myocardial dysfunction. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 38 (2006) 794–803**, v. 38, p. 794–803 2006.

MENDONÇA, R. C. et al. Flora vascular do Cerrado. In: SANO, S. M. e ALMEIDA, S. P. D. (Ed.). **Cerrado: ambiente e flora**. Planaltina, DF: Embrapa-CPAC, 1998. p.47-86.

MESQUITA, M. L. D. et al. Cytotoxic activity of Brazilian Cerrado plants used in traditional medicine against cancer cell lines. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 123, n. 3, p. 439–445, 2009.

MIKULIC-PETKOVSEK, M. et al. HPLC–MSⁿ identification and quantification of flavonol glycosides in 28 wild and cultivated berry species. **Food Chemistry**, v. 135, p. 2138-2146, 2012.

MIRANDA-VILELA, A. L.; RESCK, I. S.; GRISOLIA, C. K. Antigenotoxic activity and antioxidant properties of organic and aqueous extracts of pequi fruit (*Caryocar brasiliense* Camb.) pulp. **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, p. 956-963, 2008. ISSN 1415-4757. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-47572008000500025&nrm=iso >.

MRUK, D. D. et al. Antioxidant superoxide dismutase - a review: its function, regulation in the testis, and role in male fertility. **Contraception**, v. 65, n. 4, p. 305-311, 2002. ISSN 0010-7824. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0010782401003201> >.

MUTATKAR, R. K. Public health problems of urbanization. **Soc Sci Med**, v. 41, n. 7, p. 977-81, Oct 1995. ISSN 0277-9536 (Print) 0277-9536 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8545672> >.

NAS, N. A. O. S. **Dietary Reference Intake for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium and Zinc**. MEDICINE, I. O. Food and Nutrition Board: 82-161 and 290-393 p. 2001.

NEMETH, E. et al. Heparin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. **Science**, v. 306, n. 5704, p. 2090-3, Dec 17 2004. ISSN 1095-9203 (Electronic) 0036-8075 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15514116> >.

NICHOLLS, P. Classical catalase: Ancient and modern. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 525, n. 2, p. 95-101, 2012. ISSN 0003-9861. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003986112000306> >.

OCTAVIA, Y.; BRUNNER-LA ROCCA, H. P.; MOENS, A. L. NADPH oxidase-dependent oxidative stress in the failing heart: From pathogenic roles to therapeutic approach. **Free Radic Biol Med**, v. 52, n. 2, p. 291-7, Jan 15 2012. ISSN 1873-4596 (Electronic) 0891-5849 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22080085> >.

OKADA, K. et al. Nrf2 inhibits hepatic iron accumulation and counteracts oxidative stress-induced liver injury in nutritional steatohepatitis. **J Gastroenterol**, v. 47, n. 8, p. 924-35, Aug 2012. ISSN 1435-5922 (Electronic) 0944-1174 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22367278> >.

PALSAMY, P.; SUBRAMANIAN, S. Resveratrol protects diabetic kidney by attenuating hyperglycemia-mediated oxidative stress and renal inflammatory cytokines via Nrf2-Keap1 signaling. **Biochim Biophys Acta**, v. 1812, n. 7, p. 719-31, Jul 2011. ISSN 0006-3002 (Print) 0006-3002 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21439372> >.

PALSAMY, P. A. S., S. Resveratrol protects diabetic kidney by attenuating hyperglycemia-mediated oxidative stress and renal inflammatory cytokines via Nrf2-Keap1 signaling. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1812, n. 7, p. 719-31, Jul 2011. ISSN 0006-3002 (Print) 0006-3002 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21439372> >.

PAMPLONA, R.; COSTANTINI, D. Molecular and structural antioxidant defenses against oxidative stress in animals. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 301, n. 4, p. R843-63, Oct 2011. ISSN 1522-1490 (Electronic) 0363-6119 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21775650> >.

PANTOPOULOS, K. et al. Mechanisms of mammalian iron homeostasis. **Biochemistry**, v. 51, n. 29, p. 5705-24, Jul 24 2012. ISSN 1520-4995 (Electronic) 0006-2960 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22703180> >.

PEARSON, K. J. et al. Resveratrol delays age-related deterioration and mimics transcriptional aspects of dietary restriction without extending life span. **Cell Metab**, v. 8, n. 2, p. 157-68, Aug 2008. ISSN 1932-7420 (Electronic) 1550-4131 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18599363> >.

PERRON, N. R.; BRUMAGHIM, J. L. A review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron binding. **Cell Biochem Biophys**, v. 53, n. 2, p. 75-100, 2009. ISSN 1559-0283 (Electronic) 1085-9195 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19184542> >.

PERRON, N. R. A. B., J. L. A Review of the Antioxidant Mechanisms of Polyphenol Compounds Related to Iron Binding. **Cell Biochem Biophys**, v. 53, p. 75-100, 2009.

PETERS, V. M. R., J. E. P.; OLIVEIRA, L. E. G.; AND GUERRA, M. O. Avaliação do Potencial Tóxico do Fruto da Lobeira (*Solanum grandiflorum*), Administrado no Período de Implantação do Blastocisto de Ratos. **Boletim Cent. Biol. Reprod., Juiz de Fora**, v. 26, n. 1/2, p. 25-27, 2007.

POLLA, A. S.; POLLA, L. L.; POLLA, B. S. Iron as the malignant spirit in successful ageing. **Ageing Res Rev**, v. 2, n. 1, p. 25-37, Jan 2003. ISSN 1568-1637 (Print) 1568-1637 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12437994> >.

RAHMAN, I.; BISWAS, S. K.; KODE, A. Oxidant and antioxidant balance in the airways and airway diseases. **Eur J Pharmacol**, v. 533, n. 1-3, p. 222-39, Mar 8 2006. ISSN 0014-2999 (Print) 0014-2999 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16500642> >.

RAMOS-GOMEZ, M. et al. Sensitivity to carcinogenesis is increased and chemoprotective efficacy of enzyme inducers is lost in nrf2 transcription factor-deficient mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, n. 6, p. 3410-5, Mar 13 2001. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11248092> >.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, G. C., JR. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **J Nutr**, v. 123, n. 11, p. 1939-51, Nov 1993. ISSN 0022-3166 (Print) 0022-3166 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8229312> >.

RICHERT, S., WEHR, N.B., STADTMAN, E.R. AND LEVINE, R.L. Assessment of Skin Carbonyl Content as a Noninvasive Measure of Biological Age. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 397, n. 2, p. 430-432, 2002.

ROESLER, R. et al. Antioxidant activity of *Annona crassiflora*: Characterization of major components by electrospray ionization mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 104, n. 3, p. 1048-1054, 2007.

ROESLER, R. M., L. G.; CARRASCO, L. C.; HOLANDA, R. B.; SOUSA, C. A. S.; AND PASTORE, G. M. Atividade Antioxidante de frutas do cerrado. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, Campinas, v. 27 (1), p. 53-60, 2007.

ROESLERI, R. et al. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, v. 27, n. 1, p. 53-60, 2007.

SAHIN, K. et al. Epigallocatechin-3-gallate activates Nrf2/HO-1 signaling pathway in cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. **Life Sci**, v. 87, n. 7-8, p. 240-5, Aug 14 2010. ISSN 1879-0631 (Electronic) 0024-3205 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20619277> >.

SAMPAIO, T. S.; NOGUEIRA, P. C. L. Volatile components of mangaba fruit (*Hancornia speciosa* Gomes) at three stages of maturity. **Food Chemistry**, v. 95, n. 4, p. 606–610, 2006.

SÁNCHEZ-MORENO, C.; LARRAURI, J. A.; SAURA-CALIXTO, F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 76, n. 2, p. 270–276, 1998.

SCHMITTGEN, T. D.; LIVAK, K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. **Nat Protoc**, v. 3, n. 6, p. 1101-8, 2008. ISSN 1750-2799 (Electronic) 1750-2799 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18546601> >.

SILVA-GOMES, S. et al. Transcription factor NRF2 protects mice against dietary iron-induced liver injury by preventing hepatocytic cell death. **J Hepatol**, Sep 7 2013. ISSN 1600-0641 (Electronic) 0168-8278 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24021424> >.

SILVA, D. B. et al. **Frutas do Cerrado**. Embrapa Informação Tecnológica. Brasília, DF. 2001

SINGH, R. P.; CHIDAMBARA MURTHY, K. N.; JAYAPRAKASHA, G. K. Studies on the antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel and seed extracts using in vitro models. **J Agric Food Chem**, v. 50, n. 1, p. 81-6, Jan 2 2002. ISSN 0021-8561 (Print) 0021-8561 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11754547> >.

SIQUEIRA, E. M. A. et al. Brazilian Savanna Fruits Contain Higher Bioactive Compounds Content and Higher Antioxidant Activity Relative to the Conventional Red Delicious Apple. **Plos One**, v. 8, n. 8, p. 1-7, 2013.

SIQUEIRA, E. M. D. A. et al. Consumption of baru seeds [*Dipteryx alata* Vog.], a Brazilian savanna nut, prevents iron-induced oxidative stress in rats. **Food Research International**, v. 45, n. 1, p. 427–433, 2012.

SIRIWARDHANA, N. et al. Modulation of adipose tissue inflammation by bioactive food compounds. **J Nutr Biochem**, v. 24, n. 4, p. 613-23, Apr 2013. ISSN 1873-4847 (Electronic) 0955-2863 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23498665> >.

SOHAL, R. S., AND WEINDRUCH R. Oxidative Stress, Caloric Restriction, and Aging. **Science**, v. 273, n. 5271, p. 59-63, 1996.

SOHAL, R. S.; WEINDRUCH, R. Oxidative stress, caloric restriction, and aging. **Science**, v. 273, n. 5271, p. 59-63, Jul 5 1996. ISSN 0036-8075 (Print) 0036-8075 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8658196> >.

SOUZA, H. P., LIU, X., SAMOUILOV, A., KUPPUSAMY, P., LAURINDO, F.R.M. AND ZWEIER, J.L. Quantitation of superoxide generation and substrate utilization by vascular NAD(P)H oxidase. **American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology**, v. 282, p. H466–H474, 2002.

SOUZA, V. R. D. et al. Determination of bioactive compounds, antioxidant activity and chemical composition of Cerrado Brazilian fruits. **Food Chemistry**, v. 134, n. 1, p. 381–386, 2012.

SUN, J. et al. Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. **J Agric Food Chem**, v. 50, n. 25, p. 7449-54, Dec 4 2002. ISSN 0021-8561 (Print) 0021-8561 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12452674> >.

SURH, Y. J. et al. Redox-sensitive transcription factors as prime targets for chemoprevention with anti-inflammatory and antioxidative phytochemicals. **J Nutr**, v. 135, n. 12 Suppl, p. 2993S-3001S, Dec 2005. ISSN 0022-3166 (Print) 0022-3166 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16317160> >.

VALKO, M. et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chem Biol Interact**, v. 160, n. 1, p. 1-40, Mar 10 2006. ISSN 0009-2797 (Print) 0009-2797 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16430879> >.

WANG, Q. D., F.; QIAN, Z.-M.; GE, X. H.; ZHU, L.; YUNG, W.H.; YANG, L.; AND KE, Y. Lipopolysaccharide Induces a Significant Increase in Expression of Iron Regulatory Hormone Hepcidin in the Cortex and Substantia Nigra in Rat Brain. 2008.

WANG, X. et al. The protective effects of *Acanthopanax senticosus* Harms aqueous extracts against oxidative stress: role of Nrf2 and antioxidant enzymes. **J Ethnopharmacol**, v. 127, n. 2, p. 424-32, Feb 3 2010. ISSN 1872-7573 (Electronic)

0378-8741 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19857565>>.

WARD, D. M.; KAPLAN, J. Ferroportin-mediated iron transport: Expression and regulation. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1823, n. 9, p. 1426-1433, 2012. ISSN 0167-4889. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016748891200064X>>.

WASSERMAN, W. W.; FAHL, W. E. Functional antioxidant responsive elements. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 94, n. 10, p. 5361-6, May 13 1997. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9144242>>.

WOLFE, K. L. et al. Cellular antioxidant activity of common fruits. **J Agric Food Chem**, v. 56, n. 18, p. 8418-26, Sep 24 2008. ISSN 1520-5118 (Electronic) 0021-8561 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18759450>>.

WOLFE, K. L.; LIU, R. H. Cellular antioxidant activity (CAA) assay for assessing antioxidants, foods, and dietary supplements. **J Agric Food Chem**, v. 55, n. 22, p. 8896-907, Oct 31 2007. ISSN 0021-8561 (Print) 0021-8561 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17902627>>.

WOLFE, K. L. K., X.; HE, X.; DONG, M.; ZHANG, Q.; AND LIU, R. H. Cellular Antioxidant Activity of Common Fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 8418-8426, 2008.

WU, T. et al. Serum iron, copper and zinc concentrations and risk of cancer mortality in US adults. **Ann Epidemiol**, v. 14, n. 3, p. 195-201, Mar 2004. ISSN 1047-2797 (Print) 1047-2797 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15036223>>.

XU, J. et al. Long-term perturbation of muscle iron homeostasis following hindlimb suspension in old rats is associated with high levels of oxidative stress and impaired recovery from atrophy. **Exp Gerontol**, v. 47, n. 1, p. 100-8, Jan 2012. ISSN 1873-6815 (Electronic) 0531-5565 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22085543>>.

YANG, C. et al. Curcumin upregulates transcription factor Nrf2, HO-1 expression and protects rat brains against focal ischemia. **Brain Res**, v. 1282, p. 133-41, Jul 28 2009. ISSN 1872-6240 (Electronic) 0006-8993 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19445907>>.

YOSHINO, M.; MURAKAMI, K. Interaction of iron with polyphenolic compounds: application to antioxidant characterization. **Anal Biochem**, v. 257, n. 1, p. 40-4, Mar 1 1998. ISSN 0003-2697 (Print) 0003-2697 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9512770>>.

APÊNDICE A – ARTIGO PULICADO NA REVISTA PLOS ONE

OPEN ACCESS Freely available online



Brazilian Savanna Fruits Contain Higher Bioactive Compounds Content and Higher Antioxidant Activity Relative to the Conventional Red Delicious Apple

Egle Machado de Almeida Siqueira¹, Fernanda Ribeiro Rosa², Adriana Medeiros Fustinoni², Livia Pimentel de Sant'Ana², Sandra Fernandes Arruda^{3*}

1 Biological Sciences Institute, Department of Cell Biology, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brazil, **2** Postgraduate Program in Human Nutrition, Faculty of Health Sciences, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brazil, **3** Nutrition Department of Health Sciences Faculty, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brazil

Abstract

The bioactive compounds content and the antioxidant activity (AA) of twelve fruits native to the Cerrado were compared with the Red Delicious apple by means of the antiradical efficiency (using the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil assay/DPPH), ferric reducing antioxidant power (FRAP) and the β -carotene/linoleic system. The antiradical efficiency (AE) and the kinetic parameters (Efficient concentration/EC₅₀ and time needed to reach the steady state to EC₅₀ concentration/TEC₅₀) of the DPPH curve were also evaluated for comparison with the Trolox equivalent (TE) values. A strong, significant and positive correlation was observed between the TE and AE values, whereas a weak and negative correlation was observed between TE and EC₅₀, suggesting that the values of AE and TE are more useful for the determination of antiradical activity in fruits than the widely used EC₅₀. The total phenolic content found in the fruits corresponded positively to their antioxidant activity. The high content of bioactive compounds (flavanols, anthocyanins or vitamin C) relative to the apple values found in araticum, cagaita, cajuzinho, jurubeba, lobeira, magaba and tucum corresponded to the high antioxidant activity of these fruits. Flavanols and anthocyanins may be the main bioactive components in these Cerrado fruits. The daily consumption of at least seven of the twelve Cerrado fruits studied, particularly, araticum, cagaita, lobeira and tucum, may confer protection against oxidative stress, and thus, they may prevent chronic diseases and premature aging. The findings of this study should stimulate demand, consumption and cultivation of Cerrado fruits and result in sustainable development of the region where this biome dominates.

Citation: Siqueira EMDA, Rosa FR, Fustinoni AM, de Sant'Ana LP, Arruda SF (2013) Brazilian Savanna Fruits Contain Higher Bioactive Compounds Content and Higher Antioxidant Activity Relative to the Conventional Red Delicious Apple. PLoS ONE 8(8): e72826. doi:10.1371/journal.pone.0072826

Editor: Tianzhen Zhang, Nanjing Agricultural University, China

Received: February 14, 2013; **Accepted:** July 12, 2013; **Published:** August 21, 2013

Copyright: © 2013 Siqueira et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: The authors acknowledge financial support from Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAPDF) and Universidade de Brasília (UnB). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: sandrafarruda@gmail.com

Introduction

Several studies have detected high antioxidant activity (AA) in fruits conventionally produced and consumed in regions of temperate climate and fertile soil, such as apples and grapes [1,2] and this high antioxidant activity has been attributed to the high flavonoids and phenolic compounds found in these fruits [3]. However, few studies have evaluated the AA of fruits grown in an arid climate and acid soils, such as the Cerrado biome, the Brazilian savanna that houses a great diversity of plant species.

The Cerrado is distinguished by high plant diversity, with 11,046 species of phanerogams [4], of which approximately 40% are endemic [5]. The hot, semi-humid, seasonal climate with rainy summers and dry winters along with the poor, deep soil and periodic fires were probably responsible for the enormous diversity of plant and animal species in this biome. Our hypothesis is that the adverse abiotic factors, such as soil acidity, the excessive exposure to sun light and frequent fire during the dry season in addition to the constant presence of opportunistic pathogens

determined the selection of species resistant to oxidative stress in the Cerrado.

Plants adapted to the adverse soil and climatic conditions of the Cerrado may have developed efficient molecular mechanisms of defense against the free radicals during their evolutionary processes. These mechanisms of defense against oxidative stress mainly take the form of bioactive compounds, especially antioxidants, and although they usually occur in small quantities in the plants, they may exert multiple actions in the human body as antioxidants, antihypertensives, anti-inflammatories or antimutagenics, among others [6,7,8,9,10].

The purpose of this study was to evaluate the bioactive compounds content and the AA of the ethyl acetate (EtOAc) and water extracts of twelve native edible portions of the Cerrado produced and consumed in the central region of Brazil in comparison to the Red Delicious apple.

Studies on the antioxidant activity of the Cerrado fruits should be encouraged, once the discovery of new sources of antioxidants can provide the development of new drugs by the pharmaceutical industry. In addition, this study may also add commercial value to

the native flora of this biome, as an alternative to the sustainable development of this region and regions whose climate is similar to the Brazilian Savanna.

Materials and Methods

Chemicals

The following chemicals were used in this study: 2,6-dichloroindophenol (DFI), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil (DPPH), 2,20-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS), 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl chroman-2-carboxylic acid (Trolox) and 2,4,6-tris(2-pyridyl)-*S*-triazine (TPTZ). All solvents/chemicals used were of analytical grade and were obtained from Merck, Rio de Janeiro, Brazil, or Sigma-Aldrich or Sigma Chemical Co., São Paulo, Brazil.

Fruits

The samples of the Red Delicious apple (*Malus domestica*) were obtained in the local market of Distrito Federal, Brazil from three different distributors. The samples of edible portions of twelve species native to the Cerrado (minimum of 1 kg fresh weight of each specie): araticum (*Annona crassiflora* Mart.); baru (*Dipteryx alata* Vog.); cagaita (*Eugenia dysenterica* DC.); cajuzinho (*Anacardium humile* St. Hil.); guariroba (*Syagrus oleracea* (Mart.) Becc.); ingá (*Inga laurina* Willd.); jatobá (*Hymenaea stigonocarpa* Mart.); jenipapo (*Genipa americana* L.); jurubeba (*Solanum paniculatum* L.); lobeira (*Solanum grandiflorum* Ruiz & Pav.); mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes) and tucum (*Bactris selosa* Mart) were collected in the Conservation Area: Ecological Station of the University of Brasilia or in Água Limpa Farm (FAL). The national manager of this Conservation Unit belongs to the own University of Brasilia, Brazil. The permission was issued by the Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA)/Ministério do Meio Ambiente (Authorization N° 9/2012, IBAMA/Ministério do Meio Ambiente).

Extraction

The extracts of the edible portions of the native species were obtained according to the method of Singh et al. (2002) [11]. The palm of guariroba and all fruits were peeled, except for apple, cagaita, cajuzinho, jurubeba and tucum. Briefly, approximately 12.5 g of the edible portions of each sample were added to 50 mL of the solvent (water or 100% ethyl acetate) and homogenized in a shaker (125 rpm) at 30°C for 1 h. The extracts were filtered under vacuum through JP41 filter paper for the removal of remaining particles and the residues were re-extracted with 50 mL of the same solvent and filtered under the same conditions. The extracts were pooled and when necessary, they were concentrated under vacuum at 40°C and stored at 70°C. The extractions were done in triplicate. The entire procedure was conducted in the dark.

Determination of Moisture Content

Samples of the frozen fruits (12 g) were macerated in a mortar using liquid nitrogen and a porcelain pestle and gradually freeze-dried in a Liotop L101 lyophilizer, São Paulo, Brazil. The moisture content was defined as the difference between the dry weight and the wet weight and was expressed as the percentage of wet fruit.

Determination of Bioactive Compounds

The total polyphenols in the ethyl acetate and aqueous extracts were determined according to the method of Jayaprakasha et al. (2001) [12]. The extracts were dissolved in methanol (Merck). The samples (0.2 mL) were mixed with 1.0 mL of 10-fold diluted Folin-

Ciocalteu reagent and 0.8 mL of a 7.5% sodium carbonate solution. After the mixture had been allowed to stand for 30 min at room temperature, the absorbance was measured at 765 nm using a UV-visible spectrophotometer (Shimadzu, model UV-1800, Japan). The estimation of the phenolic compounds in the extracts was performed in triplicate and the results were expressed as mg of tannic acid equivalents (TAE) per 100 g of fresh fruit.

Total anthocyanins and yellow flavonoids were determined according to the method of Francis (1982) [13]. Briefly, 5 g of each fruit were extracted with 15 mL of 95% ethanol and 1.5 mol/L HCl (85:15) solution, and the absorbance was measured at 535 nm and at 374 nm for anthocyanins and yellow flavonoids, respectively. The concentration was determined using the following equations: $A_{535\text{nm}} \times \text{dilution factor}/98.2$ and $A_{374\text{nm}} \times \text{dilution factor}/76.6$ for anthocyanins and yellow flavonoids, respectively.

The concentration of total flavanols was determined using the *p*-dimethylaminocinnamaldehyde (DMACA) method described by Arnous et al. (2001) [14]. Briefly, 200 μ L of each extract were added to 1 mL of the 0.1% DMACA in 0.1 mol/L HCl in methanol and homogenized in a vortex; after 10 min at room temperature the absorbance was measured at 640 nm. Seven-point standard curve was constructed using a catequin standard solution in a linear concentration range from 2.7 to 43.0 μ g/mL. The total flavanols content was expressed as mg catequin equivalents/100 g of fresh fruit.

The vitamin C content of each fresh juice, obtained by pressing well-pulped fruit and filtering, was determined using the 2,6-dichlorophenol-indophenol (DCIP) titration method, according to the AOAC procedure [15]. The ascorbic acid concentration was calculated by comparison with the standard solution of ascorbic acid (1 mg/mL) and the results were expressed as mg ascorbic/100 g of fresh weight.

Total carotenoids were extracted and quantified using the method described by Rodrigues-Amaya (2001) [16]. About 5 g of each sample were added to 20 mL of acetone, and homogenized in a shaker (125 rpm) for 1 h. The extracts were filtered under vacuum through JP41 filter paper. Solid residue was re-extracted with 20 mL of the same solvent and filtered under the same conditions. This procedure was repeated two more times. The extracts were pooled and added to 40 mL of petroleum ether; the mixture was washed with three volumes of 300 mL of water to remove acetone. The petroleum ether phase was removed and the final volume was brought to 50 mL. The absorbance was determined at 450 nm, and the carotene quantity was calculated using the $A_{450\text{nm}}^{1\%} = 2,592$. The results are expressed in μ g β -carotene/100 g of fresh fruit.

Measurement of antioxidant activity

Free Radical Scavenging Assay (DPPH). The antiradical activity was determined according to Brand-Williams et al. (1995) [17] and modified Sánchez-Moreno et al. [18] methods, which are based on the quantification of free radical scavenging. A methanol solution containing 2.5 mg DPPH per 100 mL was prepared. A 100 μ L aliquot of each of each extract (five different concentrations were used, ranging from 300 to 3000 ppm) was added to 2.9 mL of the DPPH solution. The decrease in the absorbance at 517 nm (A_{517}) of different concentrations of each extract was measured in a Spectronic Genesys 2 instrument (Milton Roy) at 30 sec intervals until the DPPH absorbance stabilized. The steady-state of the DPPH decay reaction in the presence of the extracts was established as the point at which the slope of the decay curve was ≤ 1 , i.e., $(\text{DPPH}_t \text{ remaining}) - (\text{DPPH}_{t-1} \text{ remaining})/t - (t-1) \leq 1$, where t = time of the A_{517} detection. The antioxidant activity was expressed as the concentration of edible portions

required to reduce the original amount of DPPH[•] to 50% (EC₅₀) and the value was expressed as g fruit, nut or palm/kg DPPH[•]. The antiradical efficiency (AE) of each extract was also calculated by the equation $(1/EC_{50} \cdot TEC_{50})$, in which TEC₅₀ corresponds to the time of stabilization of EC₅₀ according to Sánchez-Moreno et al. (1998) [18]. The antiradical activity was also expressed as a Trolox equivalent. The assays were conducted in triplicate and the results were expressed as the mean values ± standard deviation (SD).

Ferric Reducing Antioxidant Power Assay (FRAP). The antioxidant activity of each extract was estimated via a FRAP assay according to the Benzie and Strain (1996) [19] method with modifications. Briefly, the FRAP reagent was freshly prepared by mixing solutions of 0.3 mol/L acetate buffer (pH 3.6), 10 mmol/L 2,4,6-triazine-tripyridyl in 40 mmol/L hydrochloric acid and an aqueous solution of 20 mmol/L ferric chloride in a 10:1:1 ratio and then incubating the mixture at 37°C for 30 min. Subsequently, 900 µL of FRAP reagent was mixed with 30 µL of fruit extract and 90 µL of deionized water. A tube containing the FRAP reagent was used as a blank solution and the absorbance at 595 nm was measured after 4 min of reaction. Aqueous solutions of known Fe (II) concentrations in the range of 100–2000 µmol/L (Fe₂SO₄) were used to generate a calibration curve. The total extracts were assayed in triplicate and the mean values were expressed in µmol Fe per g of fruit. The results were expressed as the mean values ± standard deviation.

β-Carotene/linoleic System. The antioxidant activity of each extract was estimated spectrophotometrically based on the β-carotene discoloring induced by the oxidative degradation of linoleic acid described by Jayaprakasha et al. (2001) [12] and modified by Singh et al. (2002) [11]. All of the determinations were conducted in triplicate. The decrease in the absorbance of each extract was measured at 15 min intervals for a total of 180 min. The antioxidant activity (AA) of the extracts was estimated by the formula $AA = 100[1 - (A_0 - A_t)/(A^0 - A^t)]$, where A₀ and A⁰ are the absorbance values at 470 nm measured at the zero incubation time for the test sample and control, respectively and A_t and A^t are the absorbance values measured for the test sample and control, respectively, after incubation for 180 min, according to Singh et al. (2002) [11]. The results were expressed as the % inhibition of the β-carotene oxidation reaction/g fruit, nut or palm (dry matter).

Statistical Analysis. The T test for independent samples was used to make comparisons between the mean values of the two extracts of each fruit and between the mean values of each fruit and of apple. The correlation between the values of the bioactive compounds and the antioxidant activity as well as between the Trolox values and each parameter of DPPH were analyzed using the Pearson test. The analysis was performed using the SPSS Statistics 17.0 program, SPSS Brazil Ltda. Significance was defined as p<0.05 and the variables are presented as the mean ± SD.

Results and Discussion

A large number of studies have established the apple as a fruit of high antioxidant activity. Previous study showed that 100 g of fresh apples have an antioxidant activity equivalent to 1,500 mg of vitamin C, suggesting that natural antioxidants from this fruit could be more effective than a dietary supplement [20]. Sun et al. (2002) [2] investigating the profiles of total phenolics, including both soluble free and bound forms in eleven common fruits from United States of America found that with exception of cranberry, apples had the highest total phenolic content and total antioxidant

activity compared to the other common fruits (for review see reference [21]). Floegel et al. (2011) [1] studying the fifty most popular antioxidant-rich foods in the United State diet identified the apple as one of the top ten foods according to their antioxidant capacities. Wolfe et al. (2008) [22] found that among fifteen fruits commonly consumed in the United States, the apples were the largest contributors of fruit phenolics in the American diet, and beside of the strawberries they were the biggest suppliers of cellular antioxidant activity.

Thus, considering the ample evidence in the literature about the antioxidant activity of apples, in the present study, the Red Delicious apple (fresh, with pods) was used as standard fruit with high antioxidant activity to compare with twelve fruits commonly consumed in the Cerrado, a Brazilian savanna.

Bioactive compounds of Fruits

Total Phenolic Contents of Fruit Extracts. In addition to the apples obtained in the local market, twelve samples of fruits, nut or palm native to Cerrado that grow in two states of Brazil's midwest region, Minas Gerais and Goiás and Distrito Federal, were included in this study. Some of them, such as baru, have an important economic role, both in the local market and internationally. The moisture content, expressed as a percentage of the fresh fruit and total phenolic compounds, expressed as mg TAE/100 g fruit, nut or palm (dry matter), were determined in the aqueous and EtOAc extracts of the edible portions of the samples and the results are presented in Table 1. The majority of the edible portions of the plants, including the apple, exhibited moisture contents between 70 and 93%; however, a moisture content value below 7% was found in jatobá pulp and in the baru nut.

The levels of phenolic compounds found in the aqueous extract of apple with peel were higher than the levels found in the EtOAc extract (Table 1). These values have been reported to be within the range of 110 to 357 mg/100 g for apple extracts [2,20,23,24]. The aqueous extracts of eight fruits (araticum, cagaita, cajuzinho, ingá, jenipapo, jurubeba, mangaba and tucum) and the EtOAc extracts of four fruits (araticum, jenipapo, lobeira and tucum) contained a higher level of phenolic compounds than the respective apple extracts. Notably, the total phenolic contents found in the aqueous extracts of tucum, ingá, jurubeba, cagaita and araticum were 12.2-, 5.5-, 4.9-, 4.4- and 4.0-fold higher than that of the aqueous apple extract, respectively. Additionally, the EtOAc extract of lobeira had a total phenolic content approximately 8-fold higher than that of the EtOAc apple extract (Table 1). Except for lobeira, the aqueous extracts of the other fruits studied exhibited higher total phenolic contents than the EtOAc extracts. The phenolic contents of six of the twelve studied fruits of the Cerrado (araticum, cagaita, ingá, jenipapo, jurubeba and tucum) exceed the values reported in previous studies for conventional fruits [2] and for native fruits of northeast Brazil [25].

Total flavanols, yellow flavonoids, anthocyanins, vitamin C and total carotenoids contents of samples extracts. The comparative analysis of the total flavanols content showed that two fruits of the Cerrado, araticum and tucum, had levels 15 to 19-fold greater than the Red Delicious apple (Table 2). With regard to the vitamin C content, samples of cagaita, cajuzinho, lobeira, mangaba, and tucum showed higher levels compared to the Red Delicious apple (Table 2).

Five of the twelve studied fruits, cagaita, jatobá, jurubeba, lobeira and tucum showed the highest levels of yellow flavonoids, and these values were 1.5, 4.0, 9.0, 7.0 and 8.0 times higher than the value obtained for Red Delicious apple, respectively (Table 2). Although these fruits showed high levels of yellow flavonoids relative to the apple, values even higher, ranging between 65 and

Table 1. Moisture content and total phenol concentration of the ethyl acetate (EtOAc) and aqueous extracts of apple and twelve fruits native to the Brazilian Cerrado expressed as dry matter.

Common name	Species	Moisture (%)	Total phenols (mg/100 g)	
			EtOAc	Aqueous
Apple	<i>Malus domestica</i> Borkh.	84.2	151±26	273±15 [#]
Araticum	<i>Annona crassiflora</i> Mart.	70.0	580±143 [*]	1,095±159 ^{*,#}
Baru	<i>Dipteryx alata</i> Vog.	4.8	6±0 ^{**}	53±6 ^{***,###}
Cagaita	<i>Eugenia dysenterica</i> DC.	92.8	200±33	1203±53 ^{***,###}
Cajuzinho	<i>Anacardium humile</i> St. Hil.	85.1	111±29	455±55 ^{**,##}
Guariroba	<i>Syagrus oleracea</i> (Mart.) Becc.	79.5	5±1 ^{**}	185±8 ^{**,##}
Ingá	<i>Inga laurina</i> Willd.	74.7	34±6 ^{**}	1,506±55 ^{***,###}
Jatobá	<i>Hymenaea stigonocarpa</i> Mart.	6.6	5±1 ^{**}	59±2 ^{***,###}
Jenipapo	<i>Genipa americana</i> L.	81.1	651±61 ^{***}	1,015±62 ^{***,##}
Jurubeba	<i>Solanum paniculatum</i> L.	71.9	94±9 [*]	1352±226 ^{**,##}
Lobeira	<i>Solanum grandiflorum</i> Ruiz & Pav.	72.3	1,166±98 ^{***}	344±51 ^{###}
Mangaba	<i>Hancornia speciosa</i> Gomes	84.3	113±1	842±60 ^{**,##}
Tucum	<i>Bactris setosa</i> Mart.	77.9	540±92 ^{**}	3,343±664 ^{**,##}

Means ± SD (n = 3) followed by *, **, *** are significantly different from values obtained for apple and followed by #, ##, ### are significantly different from EtOAc extract (* p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001; T test, independent samples. doi:10.1371/journal.pone.0072826.t001

200 mg/100 g of fresh matter, were found in seven tropical fruits consumed in Brazil, açai, carnaúba, jaboticaba, jambolão, juçara, murta and puça preto [26].

Regarding to total anthocyanins content, tucum showed the highest content, 35-fold greater than the value found in the Red Delicious apple (83.17±6.48 versus 2.35±0.41 mg/100 g). High anthocyanins content was also observed in three Cerrado fruits, cajuzinho, jurubeba and jatobá compared to Red Delicious apple (Table 2). The levels of anthocyanins found in tucum were similar to the levels found in açai, jambolão and puça-preto, which are

three of the eighteen tropical fruit studied by Rufino et al. (2010) [26]. Those three fruits also have purple color as tucum.

In the present study, among all samples analyzed, the tucum seems to be the highlight, as an excellent source of bioactive compounds such as flavanols, yellow flavonoids, anthocyanins and vitamin C, compared to other samples, including the Red Delicious apple.

Considering the direct relationship between the total phenolic content and the antioxidant activity (AA) widely reported in fruits and vegetables [1,2], the high phenolic contents found in the

Table 2. Bioactive compounds (mg/100 g of fresh matter) of apple and twelve fruits native to the Brazilian Cerrado.

Fruits	Bioactive compounds				
	Total flavanols (mg catechin/100 g fruit)	Yellow flavonoids (mg/100 g)	Total anthocyanins (mg/100 g)	Vitamin C (mg/100 g)	Total carotenoids (mg β-carotene/100 g)
Apple	37.06±2.64	5.212±0.896	2.354±0.410	26.55±3.79	0.140±0.028
Araticum	549.19±22.12 ^{**}	4.584±0.613	0.855±0.105 ^{**}	7.88 ±1.58 [*]	0.354±0.042 ^{**}
Baru	0.28±0.05 ^{**}	5.056±0.296	1.974±0.157	0.22±0.00	0.100±0.009
Cagaita	2.55±0.38 ^{***}	8.038±1.277 ^{**}	0.468±0.047 ^{**}	64.10±6.39 ^{***}	0.716±0.089 ^{***}
Cajuzinho	11.37±0.41 ^{***}	5.597±0.889	6.905±0.453 ^{***}	89.44±5.86 ^{***}	0.288±0.048 [*]
Guariroba	3.83±0.13 ^{***}	4.088±0.199	0.389±0.030 ^{**}	4.77±2.07 ^{**}	0.021±0.005 ^{**}
Ingá	26.18±2.38 ^{**}	3.047±0.452 [*]	0.559±0.042 ^{**}	20.19±3.36	0.056±0.003 ^{**}
Jatobá	9.61±0.66 ^{***}	22.585±0.910 ^{***}	3.441±0.400 [*]	0.40±0.17	0.749±0.128 ^{**}
Jenipapo	< LD	7.832±0.435 [*]	0.219±0.050 ^{**}	12.18±2.11 ^{**}	0.038±0.003 ^{**}
Jurubeba	2.56±0.26 ^{***}	48.228±5.328 ^{***}	4.653±0.105 ^{**}	12.95±3.24 [*]	1.362±0.153 ^{***}
Lobeira	< LD	35.123±3.866 ^{***}	0.195±0.019 ^{**}	55.36±3.26 [*]	0.057±0.005 ^{**}
Mangaba	2.36±0.46 ^{***}	6.516±0.291	0.294±0.032 ^{**}	73.41±15.818 ^{**}	0.359±0.010 ^{***}
Tucum	717.56±50.67 ^{**}	42.254±2.111 ^{***}	83.171±6.485 ^{**}	78.37±15.828 ^{**}	0.148±0.020

Means ± SD (n = 3) followed by *, **, *** are significantly different from Red Delicious apple values (* p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001; T test, independent samples. <LD: detection limit. doi:10.1371/journal.pone.0072826.t002

edible portions of Cerrado fruits suggest that they have higher AA than apple. To investigate this hypothesis we analyzed the antioxidant activity in these samples by using three methodologies.

Free Radical Scavenging Activity of the Extracts Using the DPPH Assay. The antiradical activity of various extracts fruits has been determined using the free radical 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) by the addition of various concentrations of edible portions extracts to DPPH[•] (0.025 g/L to 0.415 g/L). The percentage of remaining DPPH[•] was determined at 30 min or the time at which a steady state of DPPH[•] was reached based on the absorbance at 515 nm Brand-Williams et al. (1995) [17]. The amount of extract required to decrease the initial DPPH[•] concentration by 50% (EC₅₀) has been widely used to measure the antioxidant power (free radical scavenging) of fruits [26,27]; however, this value does not take the reaction time into account. Thus, we also determined the reaction time needed to reach the steady state at the concentration corresponding to EC₅₀ along with the AE of the sample (fruits, nut or palm), a new parameter proposed by Sánchez-Moreno et al. (1998) [18] to characterize the antiradical activity of extracts. The free radical scavenging capacity was also expressed as μmol Trolox equivalent (TE)/g and the results are presented in Table 3.

According to the classification of Sánchez-Moreno et al. (1998) [18], the kinetic behaviors of the reactions observed for both aqueous and EtOAc extracts of all studied edible portions, including apple, were intermediate, as the TEC₅₀ values for all reactions ranged between 1.9 to 25.4 min (data not shown). Except for lobeira and baru nut, the aqueous extracts of most species exhibited higher antiradical activity values than the corresponding EtOAc extracts as measured by Trolox equivalent (TE) or by antiradical efficiency (AE) and lower values of EC₅₀ (Table 3), following the same trend observed for the concentration of the phenolic compounds.

To identify the relationship between the three kinetic DPPH parameters (EC₅₀, TEC₅₀ and AE, obtained by the kinetics of the reactions containing the fruit extract and DPPH) and the antiradical activity expressed as the Trolox equivalent (TE), a comparative analysis was performed using a Pearson correlation test. A strong and significant positive correlation was found between TE and AE in both the aqueous ($r=0.869$ and $p=0.000$) and EtOAc ($r=0.885$ and $p<0.000$) extracts of the fruits, while a weak negative correlation was found between TE and EC₅₀ ($r=-0.436$, $p=0.006$ and -0.345 , 0.031 , respectively). No correlation was found between TE and TEC₅₀.

Five EtOAc extracts and five aqueous extracts of the Cerrado fruits showed higher antiradical activity than the respective apple extracts as determined by the TE and AE parameters. Surprisingly, the TE and AE values of in the lobeira EtOAc extract were approximately 10- and 40-fold higher than those of the EtOAc apple extract, respectively. The antiradical activity measured by these two parameters (TE and AE) in the EtOAc extracts of araticum, tucum and cagaita also exceeded (approximately 8- and 15-, 7- and 10-, 3- and 7-fold higher, respectively) the corresponding values in the EtOAc extract of apple. Additionally, the antiradical activities as determined by the TE and AE parameters in the aqueous extracts of araticum, cagaita and tucum were 7- and 11-, 7- and 18-, 8- and 6-fold greater than the TE and AE of the aqueous extract of apple, respectively. The aqueous and EtOAc extracts of araticum, cagaita, cajuzinho, lobeira and tucum had EC₅₀ values 3.5-fold to 40-fold lower than other studied nontraditional tropical fruits from Brazil [26], demonstrating their high antioxidant activity.

The comparative analysis between the total phenolic content and the DPPH parameters showed a strong positive correlation between the total phenolic content and the values of TE and AE in the EtOAc extracts ($r=0.804$, $p=0.000$ and $r=0.858$, $p=0.000$, respectively). In the aqueous extracts, both correlations were weak

Table 3. The free radical scavenging capacity (DPPH) in the EtOAc and aqueous extracts of the fruits expressed as the Trolox equivalent (TE), the concentration of antioxidant required to reduce the original amount of DPPH[•] to 50% (EC₅₀), and the antiradical efficiency (AE) estimated by the equation $(1/EC_{50} \cdot TEC_{50})$ in which TEC₅₀ corresponds to the time of stabilization of EC₅₀ according to Sánchez-Moreno et al. (1998).

Common name	EtOAc extracts				Aqueous extracts			
	Trolox μmol/g fruit	EC ₅₀ 10 ³ . (g/kg DPPH)	TEC ₅₀ min	AE 1/EC ₅₀ ·TEC ₅₀	Trolox (μmol TE/g fruit)	EC ₅₀ 10 ³ . (g/kg DPPH)	TEC ₅₀ min	AE 1/EC ₅₀ ·TEC ₅₀
Apple	6.5±0.6	123.2±11.1	19.7±1.1	0.4±0.1	9.4±0.3 [#]	84.7±2.9 [#]	18.1±2.4	0.7±0.1 [#]
Araticum	54.3±7.6 ^{***}	14.9±2.0 ^{**}	12.5±1.9 ^{**}	6.0±1.5 ^{**}	67.3±13.5 [*]	12.2±2.6 ^{***}	11.5±0.5 [*]	8.2±0.8 ^{***}
Baru	0.8±0.1 ^{**}	1,021.8±86.8 ^{***}	5.4±0.3 ^{***}	0.2±0.0 [*]	0.6±0.1 ^{***#}	1470.9±202.4 ^{***#}	10.5±0.8 ^{**###}	0.1±0.0 ^{***##}
Cagaita	21.5±1.4 ^{***}	37.1±2.4 ^{**}	9.4±0.4 ^{***}	2.9±0.3 ^{**}	72.7±2.0 ^{***###}	10.9±0.3 ^{***###}	6.9±0.3 ^{###}	13.2±1.0 ^{***##}
Cajuzinho	9.3±1.3 ^{**}	86.5±13.2 [*]	13.1±0.6 ^{**}	0.9±0.2 ^{**}	26.5±6.6 ^{.*}	31.1±6.7 ^{***##}	7.0±0.2 ^{###}	4.8±1.4 ^{.*}
Guariroba	< DL	< DL	< DL	< DL	< DL	< DL	< DL	< DL
Ingá	2.6±0.0 ^{**}	303.2±0.8 ^{**}	10.9±1.9 ^{**}	0.3±0.1	6.2±0.7 ^{**#}	130.4±17.1 ^{.*}	24.1±1.9 ^{.*#}	0.3±0.0 ^{**}
Jatobá	0.2±0.1 ^{**}	3,760.4±1299.4 ^{**}	25.4±16.4	0.0±0.0 ^{**}	1.7±0.0 ^{***#}	454.3±3.7 ^{***#}	9.5±3.1 [*]	0.3±0.1 ^{***#}
Jenipapo	0.8±0.1 ^{**}	941.8±60.4 ^{**}	2.0±0.0 ^{***}	0.5±0.0	0.9±0.0 ^{***}	887.4±0.6 ^{***}	1.9±0.1 ^{**}	0.6±0.0
Jurubeba	1.8±0.0 ^{**}	449.5±1.0 ^{***}	2.0±0.0 ^{***}	1.1±0.0 ^{**}	26.8±0.5 ^{***###}	29.7±0.5 ^{***###}	12.9±0.5 ^{###}	2.6±0.1 ^{***##}
Lobeira	66.8±14.0 ^{**}	12.3±2.6 ^{***}	5.1±0.3 ^{***}	16.3±2.5 ^{***}	7.9±3.9 [#]	115.2±44.1 ^{***}	9.2±1.9 ^{.*#}	1.2±0.2 ^{.*#}
Mangaba	4.2±0.0 [*]	187.3±1.7 ^{***}	12.8±0.8 ^{**}	0.4±0.0	8.2±0.5 ^{.*##}	97.3±6.6 ^{.*##}	15.9±3.2	0.7±0.1 ^{.*}
Tucum	50.6±2.6 ^{***}	15.8±0.8 ^{***}	18.6±6.3	4.3±1.1 ^{**}	75.3±10.9 ^{***#}	10.8±1.6 ^{***##}	22.1±3.3	4.6±0.2 ^{***}

Means ± SD (n = 3) followed by *, **, *** are significantly different from values obtained for apple and followed by #, ##, ### are significantly different from EtOAc extract (*# p<0.05; **## p<0.01; ***### p<0.001; T test, independent samples.

doi:10.1371/journal.pone.0072826.t003

($r = 0.668$, $p = 0.000$ and $r = 0.339$, $p = 0.035$, respectively), but also significant. No correlation was found between total phenolic content and EC_{50} . These results suggest that the TE and AE values are more meaningful than the EC_{50} and TEC_{50} parameters in determining the antiradical activities of samples. These results demonstrated that high activity levels against free radicals were present mainly in the samples that contained higher levels of phenolic compounds, suggesting that these phytochemicals may be responsible for this high antiradical activity. The significant high correlation found between the levels of phenolic compounds and these two DPPH parameters reinforces the involvement of the phenolic compounds in the antioxidant activities of these fruits.

A strong and positive correlation between total flavanols content and the antioxidant activity measured by DPPH assay was observed in both aqueous ($r = 0.727$, $p = 0.007$) and EtOAc ($r = 0.632$, $p = 0.028$) extracts, suggesting that the flavanols could be the main phenolic compound responsible by the antioxidant activity of these studied fruits.

Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP). The aqueous extracts studied, including apple, exhibited higher FRAP values than the EtOAc extracts. The EtOAc extract of tucum exhibited the highest value in the FRAP assay, it was approximately 6-fold higher than the values found in the EtOAc apple extract. The FRAP values of the EtOAc extracts of araticum, cagaita, cajuzinho and lobeira were approximately 2-fold higher than that of the apple EtOAc extract. The aqueous extracts of tucum and araticum showed the highest FRAP values (approximately 6-fold higher than the apple extract), followed by cagaita, cajuzinho, jurubeba and mangaba (Table 4). The antioxidant activities estimated by FRAP assay in aqueous extracts of araticum, cagaita, cajuzinho, jurubeba, lobeira, mangaba and tucum (39.7 to 220 $\mu\text{mol/g}$ fruit) were higher than conventional fruits commonly consumed by population such as avocado, banana, grape, orange, papaya, pineapple and watermelon whose values ranged between 2.76 to 14.5 $\mu\text{mol/g}$ fruit [28].

In this study, we observed a high and significant correlation between the levels of total phenolic content and the FRAP values in the aqueous extracts of the fruits ($r = 0.689$ and $p = 0.000$). In

the EtOAc extracts, this correlation was lower, but it was still significant ($r = 0.404$ and $p = 0.011$). A strong and positive correlation between total flavanols content and the antioxidant activity measured by FRAP assay was observed in both aqueous ($r = 0.918$, $p = 0.000$) and EtOAc ($r = 0.765$, $p = 0.004$) extracts of the fruits. Anthocyanins levels also positively correlated with FRAP values in aqueous ($r = 0.630$, $p = 0.028$) and in EtOAc extracts ($r = 0.873$, $p = 0.000$) of the fruits. These results reinforce that flavanols could be the main antioxidant compounds, but the anthocyanins may also contribute to antioxidant activity of these fruits.

Antioxidant Activity of Fruits Using the β -Carotene/linoleic Acid System. The antioxidant activity was also evaluated by the β -Carotene/linoleic assay, and the results, expressed as the percent inhibition of β -carotene oxidation, are shown in Table 4. Following the trend observed in the DPPH and FRAP assays, the aqueous extracts of most species studied inhibited the oxidation of β -carotene to a greater extent than the EtOAc extracts. Notably, the percentage of inhibition induced by the aqueous extract of lobeira was approximately 14-fold higher than that of the apple aqueous extract. The aqueous extract of tucum had the second highest value of antioxidant activity in this assay, approximately 6-fold higher than the aqueous apple extract, and was followed by araticum and cagaita, which inhibited β -carotene oxidation approximately 5-fold more extensively than the apple aqueous extract. The aqueous extracts of baru nut, mangaba and jurubeba also exhibited higher antioxidant activities in this assay than apple ($p < 0.05$). Except for tucum and mangaba, the EtOAc extracts from the other fruits showed antioxidant activities equal to or lower than the apple EtOAc extract (Table 4). No correlation was observed between the levels of total phenolic content and the antioxidant activity measured in the β -Carotene/linoleic assay (% inhibition) in both the EtOAc and aqueous extracts. No correlation was obtained between β -Carotene/linoleic assay (% inhibition) and bioactive compounds.

Table 4. Ferric reducing antioxidant power (FRAP) and inhibition of β -carotene/linoleic oxidation assays.

Common name	FRAP	($\mu\text{mol/g}$ of fruit)	β -Carotene/linoleic	(% Inhibition/g)
	EtOAc	Aqueous	EtOAc	Aqueous
Apple	8.6 \pm 1.7	33.8 \pm 3.9 [#]	4.0 \pm 0.3	3.2 \pm 0.6
Araticum	16.0 \pm 1.7 ^{**}	212.0 \pm 27.5 ^{***##}	2.3 \pm 0.1 ^{**}	17.0 \pm 1.5 ^{***##}
Baru	1.3 \pm 0.1 [†]	8.8 \pm 0.2 ^{***##}	0.6 \pm 0.1 ^{***}	6.0 \pm 0.5 ^{**##}
Cagaita	19.6 \pm 1.0 ^{**}	107.0 \pm 2.0 ^{***###}	0.6 \pm 0.4 ^{***}	16.4 \pm 2.0 ^{***###}
Cajuzinho	18.5 \pm 0.5 ^{**}	45.5 \pm 1.9 ^{###}	1.9 \pm 0.4 ^{**}	0.7 \pm 0.3 ^{**#}
Guariroba	2.2 \pm 0.8 ^{**}	8.8 \pm 1.6 ^{**##}	1.5 \pm 0.4 ^{**}	0.7 \pm 0.1 ^{**#}
Ingá	2.0 \pm 0.3 [†]	14.9 \pm 3.3 ^{**##}	0.1 \pm 0.1 ^{***}	0.4 \pm 0.2 ^{**#}
Jatobá	0.7 \pm 0.1 [†]	5.4 \pm 1.3 ^{***##}	0.4 \pm 0.0 ^{***}	0.4 \pm 0.1 ^{**}
Jenipapo	1.3 \pm 0.2 [†]	8.2 \pm 3.0 ^{**#}	1.1 \pm 0.1 ^{***}	0.4 \pm 0.2 ^{**#}
Jurubeba	8.6 \pm 0.3	54.1 \pm 0.4 ^{**###}	0.7 \pm 0.3 ^{***}	4.7 \pm 0.2 ^{**##}
Lobeira	17.5 \pm 0.7 ^{**}	39.7 \pm 0.6 ^{###}	-0.3 \pm 0.5 ^{**}	45.1 \pm 1.2 ^{***###}
Mangaba	7.4 \pm 2.2	47.2 \pm 2.3 ^{**###}	5.7 \pm 0.1 ^{**}	5.3 \pm 0.9 [†]
Tucum	53.2 \pm 3.9 ^{***}	220.0 \pm 19.6 ^{***###}	6.0 \pm 0.5 ^{**}	19.9 \pm 3.0 ^{**#}

Means \pm SD (n = 3) followed by *, **, *** are significantly different from apple value; and followed by #, ##, ### are significantly different from EtOAc extract ([†] $p < 0.05$; ^{**##} $p < 0.01$; ^{***###} $p < 0.001$; T test, independent samples).

doi:10.1371/journal.pone.0072826.t004

Conclusions

Comparing with the Red Delicious apple, nine of the twelve fruits of the Cerrado studied; araticum, cagaita, cajuzinho, ingá, jenipapo, jurubeba, lobeira, magaba and tucum showed high levels of phenolic contents. The araticum and tucum are rich in flavonoids. The fruits cajuzinho, jatobá, jurubeba and tucum showed high content of anthocyanins. Cagaita, cajuzinho, lobeira, mangaba and tucum showed high levels of vitamin C. The high content of bioactive compounds found araticum, cagaita, cajuzinho, jurubeba, lobeira, magaba and tucum corresponded to the high antioxidant activity of these fruits. Daily consumption of at least seven of these Cerrado fruits studied, particularly, araticum, cagaita, lobeira, tucum may protect human tissues against oxidative stress, and thus, they may prevent chronic diseases and

premature aging. Moreover, such fruits can provide a source of new bioactive compounds with functional properties beneficial to health, which should stimulate the pharmaceutical and food industries for the development of new products, promoting the sustainable development of regions with the characteristics of the Cerrado. New studies *in vivo* aimed at evaluating the antioxidant activity of these seven Cerrado fruits that showed high antioxidant potential are underway in our laboratory.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: EMAS SFA. Performed the experiments: AMF FRR LPS. Analyzed the data: EMAS SFA. Contributed reagents/materials/analysis tools: EMAS AMF FRR LPS SFA. Wrote the paper: EMAS SFA.

References

- Floegel A, Kim D, Chung SJ, Koo SI, Chun OK (2011) Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *J Food Comp Anal* 24: 1043–1048.
- Sun J, Chu YF, Wu XZ, Liu RH (2002) Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. *J Agric Food Chem* 50: 7449–7454.
- He X, Liu RH (2008) Phytochemicals of Apple Peels: Isolation, Structure Elucidation, and Their Antiproliferative and Antioxidant Activities. *J Agric Food Chem* 56: 9905–9910.
- Mendonça RC, Felfili JM, Walter BMT, Silva Júnior MC, Rezende AV, et al. (1998) Flora Vascular do Cerrado. In: Embrapa-CPAC, editor. *Cerrado: Ambiente e Flora*. pp. 289–556.
- Myers N, Mittermeier RA, Mittermeier CG, Fonseca GAB, Kent J (2000) Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403: 853–858.
- Kaur G, Jabbar Z, Athar M, Alam MS (2006) Punica granatum (pomegranate) flower extract possesses potent antioxidant activity and abrogates Fe-NTA induced hepatotoxicity in mice. *Food Chem Toxicol* 44: 984–993.
- Liu RH, Liu J, Chen B (2005) Apples prevent mammary tumors in rats. *J Agric Food Chem* 53: 2341–2343.
- Leontowicz M, Gorinstein S, Leontowicz H, Krzeminski R, Lojek A, et al. (2003) Apple and pear peel and pulp and their influence on plasma lipids and antioxidant potentials in rats fed cholesterol-containing diets. *J Agric Food Chem* 51: 5780–5785.
- Kayano SI, Kikuzaki H, Fukutsuka N, Mitani T, Nakatani N (2002) Antioxidant activity of prune (*Prunus domestica* L.) constituents and a new synergist. *J Agric Food Chem* 50: 3708–3712.
- Kotamballi N, Murthy C, Jayaprakasha GK, Singh RP (2002) Studies on Antioxidant Activity of Pomegranate (*Punicagranatum*) Peel Extract Using *in Vivo* Models. *J Agric Food Chem* 50: 4791–4795.
- Singh RP, Murthy KNC, Jayaprakasha GK (2002) Studies on the Antioxidant Activity of Pomegranate (*Punicagranatum*) Peel and Seed Extracts Using *in Vitro* Models. *J Agric Food Chem* 50: 81–86.
- Jayaprakasha GK, Singh RP, Sakariah KK (2001) Antioxidant activity of grape seed (*Vitis Vinifera*) extracts on peroxidation models *in Vitro*. *Food Chem* 73: 285–290.
- Francis FJ (1982) Analysis of anthocyanins. In: Markakis P, editor. *Anthocyanins as food colors*. Academic Press: New York, United States of America. pp. 181–207.
- Arnoos A, Makris D, Kefalas P (2002) Correlation of pigment and flavanol content with antioxidant properties in selected aged regional wines from Greece. *J Food Comp Anal* 15: 655–665.
- AOAC (1998) Vitamins and Other Nutrients. In: Association of Official Analytical Chemists, editor. *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists International*. Maryland: United States of America. pp. 16–17.
- Rodrigues-Amaya BB (2001) A guide to carotenoid analysis in foods. Washington: ILST Press. 64 p.
- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C (1995) Use of Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *Food Sci Technol* 28: 25–30.
- Sánchez-Moreno C, Larrauri JA, Sauro-Calixto A (1998) A Procedure to Measure the Antiradical Efficiency of Polyphenols. *J Sci Food Agric* 76: 270–276.
- Benzie IFF, Strain JJ (1996) The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay. *Anal Biochem* 239: 70–76.
- Eberhardt MV, Lee CY, Liu RH (2000) Antioxidant activity of fresh apples. *Nature* 405: 903–904.
- Boyer J, Liu RH (2004) Apple phytochemicals and their health benefits. *Nutr J* 3: 1–15.
- Wolfe KL, Kang X, He X, Dong M, Zhang Q, et al. (2008) Cellular Antioxidant Activity of Common Fruits. *J Agric Food Chem* 56: 8418–8426.
- Podsedek A, Wilska-Jeska J, Anders B, Markowski J (2000) Compositional characterization of some apple varieties. *Eur Food Res Technol* 210: 268–272.
- Liu RH, Eberhardt MV, Lee CY (2001) Antioxidant and antiproliferative activities of selected New York apple cultivars. *NY Fruit Quarterly* 9: 15–17.
- Almeida MMB, Sousa PHM, Arriaga AMC, Prado GM, Magalhães CEC, et al. (2011) Bioactive compounds and antioxidant activity of fresh exotic fruits from northeastern Brazil. *Food Res Intern* 44: 2155–2159.
- Rufino MSM, Alves RE, Brito ES, Pérez-Jiménez J, Saura-Calixto F, et al. (2010) Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. *Food Chem* 121: 996–1002.
- Lu Y, Foo LY (2000) Antioxidant and radical scavenging activities of polyphenols from apple pomace. *Food Chem* 68: 81–85.
- Fu L, Xu BT, Xu XR, Gan RY, Zhang Y, et al. (2011) Antioxidant capacities and total phenolic contents of 62 fruits. *Food Chem* 129: 345–350.

APÊNDICE B – METODOLOGIAS E RESULTADOS DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE LÍVIA PIMENTEL DE SANTANA DOURADO (2013).

Metodologia

Atividade das enzimas antioxidantes e NADPH Oxidase nos tecidos

Os tecidos do fígado, baço e intestino foram extraídas 1:20 (m/v) em um homogeneizador Ultraturrax utilizando-se tampão fosfato de potássio 0,5 mol/L (pH 7,2) contendo 50 mmol/l de EDTA e 1 mmol/L de fluoreto de fenilmetilsulfonilo (PMSF) em etanol 95% na proporção de 1% do volume do final. O homogeneizado foi centrifugado a 15.000xg, 4°C durante 20 min. O sobrenadante foi utilizado para a determinação das atividades enzimáticas

Ensaio de atividade da Catalase (EC 1.11.1.6)

A atividade da catalase foi quantificada pelo consumo de 10 mmol/L de H₂O₂, que foi medida pela absorção a 240 nm em solução tampão contendo 10-50 uL de tecidos homogeneizados (Aebi, 1984). Uma unidade da Catalase foi definida como a quantidade de enzima necessária para decompor 1 µmol H₂O₂/min.

Ensaio da Atividade da Glutathione redutase (GR, EC 1.6.4.2)

A atividade de GR foi determinada através da detecção do consumo de NADPH a A_{340nm} (Joanisse, 1996). O ensaio da reação foi dosado pela adição de 0,5mmol/L de EDTA, 1mmol/L GSSG em 20-100uL do homogeneizado de tecido em 50mmol/L de tampão fosfato de potássio (pH 7,2). O branco foi medido com a ausência de GSSG. Uma unidade (U) de um Glutathione redutase foi definida como a quantidade de enzima necessária para oxidar 1 nmol de NADPH/minuto.

Ensaio da atividade da Glutathione peroxidase (GPx, EC 1.11.1.9)

A atividade da glutathione peroxidase foi dosada utilizando-se H_2O_2 como substrato num ensaio de oxidação juntamente com glutathione-redutase catalisadora da oxidação de Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato (NADPH) a A_{340nm} (espectrofotômetro Shimadzu - TCC 240A) (Joanisse, 1996). Em primeiro lugar, foi medido o consumo basal de 0,15 mmol/L de NADPH em tampão contendo 2 mmol/L de azida, 5 mmol/L de glutathione (GSH), 1,5 U de glutathione redutase e 10-50 mL de tecidos homogeneizados. Em seguida, 20 μ L de H_2O_2 foi adicionado para obter uma concentração final de 0,2 mmol/L. Os brancos foram obtidos sem o homogeneizado de tecido (Hermes-Lima, 1996). Uma unidade de glutathione peroxidase foi definida como a quantidade de enzima necessária para oxidar 1 nmol de NADPH/min.

Glutathione-S-transferase ensaio da atividade (GST, EC 2.5.1.18)

A atividade de GST foi medida avaliando-se a conjugação de 1 mmol/L de GSH com 1 mmol/L de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) a 340 nm (espectrofotômetro Shimadzu - TCC 240A) em solução tampão de fosfato de potássio 50 mmol/L (pH 7,2) contendo 50 μ L de homogeneizado de tecido (Habig, 1981). Uma unidade (U), da glutathione-S-transferase, foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir um nmol de conjugado / min.

NADPH oxidase (Nox, EC 1.6.3.1) ensaio da atividade

A atividade da NADPH oxidase foi baseada no coeficiente de extinção molar obtida pela decomposição de 6,22 mmol/L·cm de NADPH a 340 nm em espectrofotômetro (Shimadzu espectrofotômetro - TCC 240A) (Souza, 2002). O período experimental foi de 300 segundos, a atividade enzimática foi obtida a partir da mistura de um tampão de fosfato de potássio 50 mmol/L com pH de 7,2 (Sigma Aldrich ®, Alemanha), 0,5 mmol/L de ácido acético etilenodiaminetetra (EDTA) (Reagen ®, Brasil), 0,1 mmol/L de NADPH (Sigma Aldrich ®, Alemanha) e 125 - 250 μ L de homogeneizado de tecido (dependendo do tecido). O branco continha todas as soluções de ensaio, com exceção do homogeneizado de tecido. Uma unidade (U)

de inibição da NADPH oxidado foi definida como a quantidade de enzima necessária para oxidar 1 nmol de NADPH/minuto.

Níveis de peroxidação lipídica nos tecidos

As concentrações de malondialdeído (MDA) no homogeneizado fígado, baço, intestino, rim, coração e cérebro foram medidas por cromatografia líquida de alta eficiência (coluna de 25cm Shim-park C18 CLC-ODS (M) Shimadzu, Kyoto, Japão) (Candan, 2008). Os comprimentos de onda do detector espectrofluorométrico foram fixados em 532 nm (excitação) e 553 nm (emissão). Uma curva padrão de quatro pontos (0,05-2,02 nmol/mL) foi feita com tetraetoxipropano (TEP, Sigma, St. Louis, MO, EUA) dissolvida em 1 % de H₂SO₄ , como a hidrólise ácida do rendimento TEP quantidades estequiométricas de MDA ($y = 1 \cdot 10^{-6}x + 0.0203$; $R^2 = 0.9998$). A concentração de proteína total do homogeneizado foi determinada pelo método de Hartree et al. (1972) (Hartree, 1972). Os resultados foram expressos em nmoles de MDA/ mg de proteína total (Hartree, 1972).

Níveis de oxidação de proteínas nos tecidos

A oxidação de proteínas nos homogeneizados de fígado, baço, intestino, rim, coração e cérebro foi medida pelo teor de carbonil de acordo com o método do Richert et al. (2002) (Richert, 2002). A absorvância foi medida a 376 nm (espectrofotometro Shimadzu - TCC 240A) e o conteúdo de carbonil foi expresso como nmol de grupos carbonil por miligrama de proteína total utilizando-se um coeficiente de extinção de 22 mmol/L·cm. A concentração de proteína total do homogeneizado foi determinado pelo método de Hartree et al. (1972) (Hartree, 1972).

Capacidade antioxidante do soro (FRAP)

A capacidade antioxidante do soro foi calculada pelo método potencial de redução do ferro (*Ferric Reducing Ability of Plasma*- FRAP) meio do ensaio de FRAP

de acordo com o método Benzie e colaboradores (1996) (Benzie, 1996) com modificações. Resumidamente, inicialmente o sangue recolhido em tubos de vácuo estéril foi centrifugado a 15.500g durante 30 minutos, o soro obtido foi armazenado a -70 ° C até a análise. O reagente FRAP foi preparado misturando-se uma solução de 0,3 mol/L de tampão de acetato (pH 3,6), 10 mmol/L de 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) em 40 mmol/L de ácido clorídrico (HCl) e uma solução aquosa de 20 mmol/L de cloreto férrico numa proporção de 10:01:01, esta solução foi incubada a 37°C durante 30 min. Em seguida 900 µL do reagente FRAP foi misturada com 30 µL de soro e 90 µL de água deionizada sendo medida a reação por absorvância a 595 nm (espectrofotometro Shimadzu - TCC 240A) no tempo inicial (T_0) e 4 minutos depois (T_{4min}). Para o calculo foi subtraído a solução final menos a solução inicial. O tubo contendo o reagente FRAP sem o soro foi utilizado como uma solução branco. As soluções aquosas de Fe (II) nas concentrações de 100-2000 mmol/L (Fe_2SO_4) foram usadas para gerar uma curva de calibração ($y = 0,0006x - 0,0014$). Os testes foram realizados em triplicado e os valores foram expressos como a média \pm desvio padrão em $\mu\text{mol Fe/L}$ de soro.

Resultados

O consumo diário de tucum reduz as atividades de Catalase, Glutaciona Redutase e Glutaciona Peroxidase induzida pela suplementação de ferro.

As atividades enzimáticas das enzimas Catalase (Cat), Glutaciona Redutase (GR), Glutaciona Peroxidase (GPx), Glutaciona-S-transferase (GST) e NADPH Oxidase (Nox) foram dosadas nos homogeneizados de fígado, baço, intestino, rim, coração e cérebro de ratos e os resultados estão apresentados na **Tabela 7**. A suplementação dietética com ferro aumentou significativamente a atividade específica de CAT e GST no rim e de GPx no intestino de ratos do grupo Fe em relação aos ratos do grupo Controle ($p = 0,031$, $0,015$ e $0,046$, respectivamente). No entanto, no cérebro houve uma diminuição significativa na atividade de GR ($p = 0,015$). O consumo do tucum não alterou as atividades específicas das enzimas analisadas (grupo Tuc), no entanto, a atividade de GR apresentaram a tendência de reduzirem no baço quando comparado ao grupo Controle ($p = 0,103$). O consumo de

tucum pelo grupo suplementado com ferro (TucFe) reduziu significativamente a atividade da CAT e GST no rim e GPx no intestino em comparação com o grupo Fe ($p = 0,033$, $0,006$ e $0,027$, respectivamente) e também reduziu a atividade da enzima pró-oxidante NADPH Oxidase no coração desses animais em comparação ao grupo Fe ($p = 0,038$). Uma redução significativa na atividade da GR no baço também foi observada no grupo TucFe em relação ao grupo Controle ($p = 0,008$).

O consumo diário de tucum aumenta a atividade antioxidante e protege os tecidos contra danos oxidativos induzido pela suplementação dietética com ferro.

Os níveis de malonaldeído (MDA) e de proteína carbonilada foram analisados como marcadores de danos oxidativos moleculares, nos homogeneizado de tecidos dos ratos e os resultados estão apresentados nas **Figuras 15 e 16**. A suplementação dietética de ferro durante 30 dias aumentou significativamente o nível de MDA no fígado em relação ao grupo Controle ($p = 0,002$). Enquanto o consumo de tucum pelos ratos suplementados com ferro reduziram significativamente estes valores em relação ao grupo Fe ($p = 0,008$) (**Figura 15**). Houve também uma redução significativa da peroxidação lipídica no baço dos ratos Tuc em relação ao grupo Controle ($p = 0,019$).

Em relação à oxidação de proteínas verificou-se uma redução significativa no nível de proteína carbonilada no baço dos ratos de ambos os grupos alimentados com dietas adicionadas com tucum em relação aos ratos do grupo Controle ($p = 0,001$ e $0,017$, respectivamente) (**Figura 16**).

A capacidade antioxidante do soro medida pelo reagente FRAP foi significativamente maior nos ratos alimentados com dieta contendo tucum, mesmo naqueles que foram alimentados com suplementação de ferro em relação ao Controle ($p = 0,006$ e $0,011$, respectivamente). O efeito positivo do consumo do tucum na capacidade antioxidante do soro foi observada mesmo em relação aos ratos suplementados com ferro ($p=0,022$) (**Figura 17**).

Tabela 7. Efeito da suplementação de ferro e tucum dietético nas atividades das enzimas¹: Catalase, Glutaciona redutase, glutaciona peroxidase, glutaciona s-transferase e NADPH oxidase; no fígado, baço, intestino, rim, coração e cérebro de ratos.

	CAT (U/mg)			
	CNT	Fe	Tuc	TucFe
Fígado	187,4 ± 11,2	190,0 ± 30,2	194,7 ± 13,6	181,2 ± 15,7
Baço	47,4 ± 10,5	49,2 ± 9,8	41,4 ± 5,4	42,9 ± 5,9
Intestino	12,2 ± 3,4	10,9 ± 6,5	12,9 ± 2,8	11,8 ± 3,4
Rim	178,4 ± 33,6	250,8 ± 52,3 *	191,2 ± 14,6	172,6 ± 19,1 #
Coração	24,4 ± 4,2	26,7 ± 3,7	23,0 ± 5,4	21,3 ± 4,9
Cérebro	5,8 ± 2,1	5,3 ± 1,4	4,9 ± 0,9	4,4 ± 0,6
	GR (U/mg)			
	CNT	Fe	Tuc	TucFe
Fígado	31,0 ± 6,0	31,5 ± 3,8	28,6 ± 4,8	28,3 ± 2,0
Baço	31,0 ± 3,7	27,0 ± 5,5	24,6 ± 7,0	23,5 ± 1,8 *
Intestino	87,5 ± 25,6	77,6 ± 9,0	83,1 ± 15,6	79,1 ± 14,2
Rim	93,6 ± 11,2	105,7 ± 15,5	92,9 ± 15,0	81,0 ± 11,8 #
Coração	8,3 ± 1,5	7,6 ± 1,1	8,9 ± 2,9	7,9 ± 1,6
Cérebro	17,9 ± 2,7	13,9 ± 1,7 *	15,0 ± 4,1	14,6 ± 3,0
	GPX (U/mg)			
	CNT	Fe	Tuc	TucFe
Fígado	719,2 ± 89,1	651,0 ± 142,7	659,5 ± 165,7	659,2 ± 97,4
Baço	291,3 ± 79,2	333,8 ± 121,4	288,7 ± 104,6	287,8 ± 108,9
Intestino	112,8 ± 43,8	264,1 ± 124,2 *	137,9 ± 64,9	112,1 ± 46,3 #
Rim	337,3 ± 67,0	408,7 ± 111,2	398,4 ± 85,9	355,0 ± 40,4
Coração	373,4 ± 119,9	342,3 ± 128,5	375,6 ± 60,5	372,6 ± 74,5
Cérebro	47,4 ± 21,7	44,8 ± 16,6	44,6 ± 11,1	37,7 ± 8,9
	GST (U/mg)			
	CNT	Fe	Tuc	TucFe
Fígado	213,1 ± 36,2	202,0 ± 32,8	197,2 ± 13,7	217,7 ± 43,8
Baço	15,1 ± 2,7	21,0 ± 8,1	20,4 ± 8,2	19,2 ± 2,3
Intestino	151,9 ± 61,6	142,3 ± 34,6	122,3 ± 11,8	172,9 ± 41,7
Rim	169,6 ± 26,0	215,8 ± 25,2 *	176,1 ± 28,7	162,5 ± 23,4 #
Coração	10,5 ± 2,7	11,4 ± 4,8	9,9 ± 4,4	12,1 ± 4,3
Cérebro	39,5 ± 7,2	42,7 ± 2,3	40,4 ± 7,9	44,7 ± 6,5
	NADPH Oxidase (U/mg)			
	CNT	Fe	Tuc	TucFe
Fígado	1,2 ± 0,3	1,3 ± 0,3	1,4 ± 0,2	0,8 ± 0,4
Baço	2,7 ± 0,6	2,5 ± 0,3	2,0 ± 0,5	2,6 ± 0,1
Intestino	4,0 ± 0,6	4,7 ± 1,0	4,4 ± 1,2	3,8 ± 1,4
Rim	0,7 ± 0,2	1,0 ± 0,3	0,9 ± 0,2	0,7 ± 0,2
Coração	0,7 ± 0,3	0,7 ± 0,3	0,7 ± 0,3	0,4 ± 0,1 #
Cérebro	1,0 ± 0,2	0,9 ± 0,1	0,9 ± 0,2	1,0 ± 0,1

¹ Os dados estão expressos pela média ± DP. Grupo Controle (CNT): dietas para roedores AIN-93G (n = 5); Grupo Ferro (Fe): dieta controle suplementada 350 mg de ferro/kg (n = 7); Tucum (Tuc): dieta controle modificada com 15% de tucum (n = 6); ou dieta controle mais 350 mg de ferro na forma de FeSO₄ 7H₂O mais 15 % de tucum (TucFe; n = 5). Período de tratamento: 30 dias. Média com (*) diferem do grupo Controle; (#) diferem do grupo ferro pelo Teste T para amostras independentes, α ≤ 0.05.

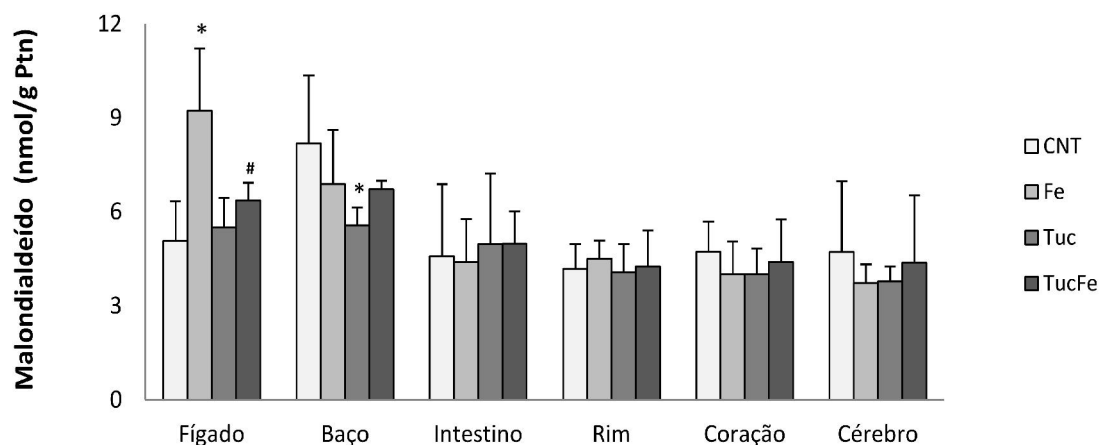


Figura 15. Efeito de suplementação de ferro e consumo de tucum por 30 dias na peroxidação lipídica no fígado, baço, intestino, rim, coração e cérebro de ratos. Grupo Controle (CNT): dieta para roedores AIN-93G; grupo ferro (Fe): dieta controle mais 350 mg de suplementação de ferro como sulfato ferroso heptaidratado ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) / kg de dieta; grupo tucum (Tuc): dieta controle mais 15% de tucum; ou grupo tucum com ferro (TucFe): dieta controle mais 350 mg de ferro como $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ mais 15 % de tucum. CNT (n = 5); Fe (n = 7); Tuc (n = 6); TucFe (n = 5). Os dados foram expressos pela média \pm DP. Means with (*) differ from Control group; (#) differ from Fe group in the Test T for independent samples, $\alpha \leq 0.05$.

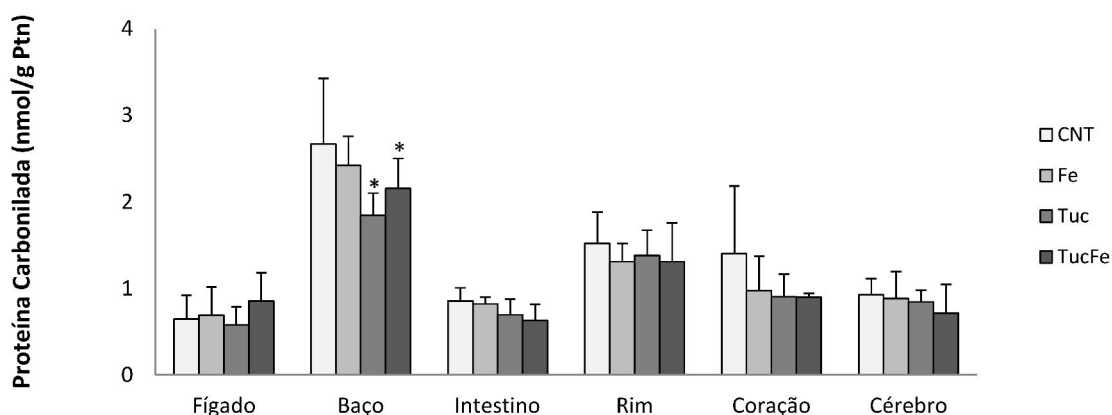


Figura 16. Efeito da suplementação de ferro e consumo de tucum por 30 dias em danos a proteína no fígado, baço, intestino, rim, coração e cérebro. Grupo Controle (CNT): dieta para roedores AIN-93G; grupo ferro (Fe): dieta controle mais 350 mg de ferro na forma de sulfato ferroso heptaidratado ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) / kg; grupo tucum (Tuc): dieta controle mais 15% de tucum; ou grupo tucum com ferro (TucFe): dieta controle mais 350 mg do ferro como $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ / kg da dieta mais 15 % de tucum. CNT (n = 5); Fe (n = 7); Tuc (n = 6); TucFe (n = 5). Os dados foram expressos como média \pm DP. Médias com (*) diferem do grupo Controle pelo Teste T para amostras independentes, $\alpha \leq 0.05$.

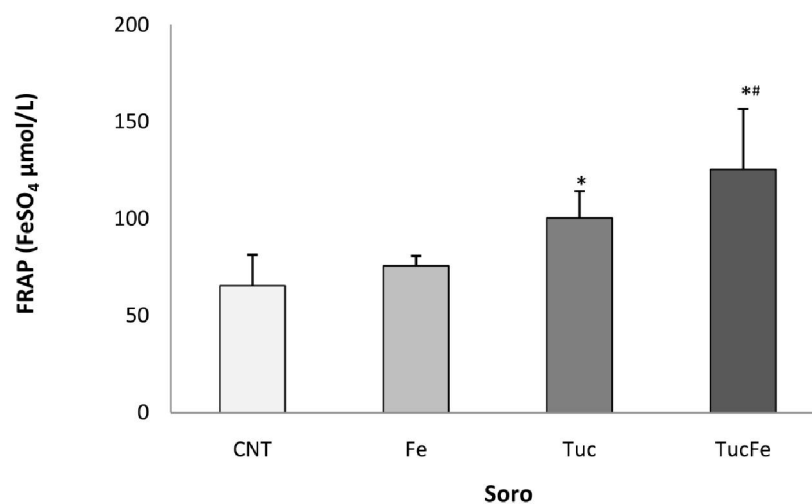


Figura 17. Efeito da suplementação de ferro e consumo de tucum na capacidade antioxidante no soro medida pelo reagente FRAP em ratos tratados por 30 dias. Grupo Controle (CNT): dieta para roedores AIN-93G; grupo ferro (Fe): dieta controle mais 350 mg de ferro como sulfato ferroso heptaidratado ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$); grupo tucum (Tuc): dieta controle mais 15% de tucum; ou grupo tucum com ferro (TucFe): dieta controle mais 350 mg de ferro como $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ / kg de dieta mais 15 % de tucum. CNT (n = 5); Fe (n = 7); Tuc (n = 6); TucFe (n = 5). Os dados foram expressos como média \pm DP. Médias com (*) difere do grupo Controle; (#) difere do grupo Fe pelo Teste T para amostras independentes, $\alpha \leq 0.05$.

APÊNDICE C – ARTIGO SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO.

Tucum [*Bactris setosa* Mart.] consumption prevents iron-induced oxidative stress by down-regulating hepcidin expression in rats

Adriana M. Fustinoni-Reis¹, Sandra A. F. Arruda¹, Lívia P. S. Dourado¹, Egle M. A. Siqueira²

¹*Department of Nutrition, Faculty of Health Sciences;* ²*Department of Cell Biology, Biological Sciences Institute, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brazil. P.O. Box 70910- 900*

E-mail addresses: adriana.fustinoni3@gmail.com; sandrafarruda@gmail.com; liviapdourado@gmail.com; eglemasi@gmail.com.

Corresponding author: Egle Machado de Almeida Siqueira, Departamento de Biologia Celular, Instituto de Ciências Biológicas, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Universidade de Brasília, Asa Norte, Distrito Federal, Brazil, 70910900, Phone: +55 61 31073099, Fax: +55 61 32733676, E-mail: eglemasi@gmail.com

Short title: Tucum antioxidant activity

Abstract

Foods, especially vegetables, contribute to a variety of antioxidant molecules that protect cells against oxidative stress. Previous *in vitro* study showed that Tucum, a Cerrado fruit had higher antioxidant activity (AA) relative to the Red Delicious apple. The aim of the present study was to analyze the *in vivo* AA of tucum. Iron supplemented rats (Wistar males) were treated with tucum; iron and oxidative status as well as the expression of genes involved in both factors were analyzed. The iron-supplemented diet increased iron levels in the serum, liver, spleen and intestine ($p = 0.008$, 0.000 , 0.029 and 0.011 , respectively), as well as the transferrin saturation ($p = 0.008$) and liver MDA level ($p = 0.002$); it also increased the levels of liver hepcidin mRNA and the *Nrf2* mRNA in the spleen and intestine. Tucum consumption reduced the intestinal iron level, reduced the level of lipid and protein damage in the spleen and increased serum AA. Tucum consumption by iron supplemented rats up-regulated the *Nrf2* gene and down-regulated *Hamp* gene expression in the liver. Moreover, daily tucum consumption prevented tissue iron overload induced by iron supplementation; it suppressed the increase of the activity of catalase, glutathione reductase and glutathione peroxidase iron supplement-induced in tissues, and also suppressed the increase of expression of the genes of liver *Hamp* and spleen *Nrf2* induced by iron supplementation. These results suggest that tucum protects tissues against oxidative damage by increasing iron mobility through the down-regulation of *Hamp* gene expression.

Keywords: Oxidative stress, Tucum (*Bactris setosa* Mart.), antioxidant activity, hepcidin.

1. Introduction

Iron is vital for almost all living organisms because it is a cofactor for many proteins and enzymes involved in energy metabolism, as well as several other essential biological processes ⁽¹⁾. As a transition metal, iron also acts as a pro-oxidative ion by catalyzing the conversion of weakly reactive oxygen species (ROS) such as H₂O₂ into highly reactive hydroxyl radicals, which in turn promotes oxidative stress in cells ⁽²⁾. The accumulation of cellular oxidative damage is associated with several chronic diseases such as cardiovascular disease, cancer, diabetes, Parkinson's and Alzheimer's diseases, among others ⁽³⁻⁶⁾. High levels of oxidative damage have also been associated with the aging process ⁽⁷⁾. Thus, cellular iron overload may accelerate cellular dysfunction, leading to chronic disease and premature aging ⁽⁸⁻⁹⁾. In responding to this adverse effect, mammals employ distinct mechanisms to regulate iron homeostasis at the systemic and cellular levels. These molecular mechanisms involve the hepatic hormone hepcidin and iron regulatory proteins, which together orchestrate the body's iron balance ⁽¹⁰⁾.

Mammals have established an efficient antioxidant mechanism by counterbalancing endogenous ROS production. This mechanism comprises antioxidant enzymes and non-enzymatic scavengers such as glutathione that are involved in scavenging ROS ^(5; 11-13). Increased oxidative damage can activate the expression of more than 100 genes that are involved in the synthesis of antioxidant and detoxifying proteins ⁽¹²⁾. Several antioxidant genes have an antioxidant response element (ARE), which is a specific nucleotide sequence in the promoter gene regions that binds to the nuclear factor-erythroid 2- related factor 2 (Nrf2), a basic leucine zipper nuclear transcription factor. This factor regulates the expression of antioxidant enzymes, among other genes involved in antioxidant defenses ⁽¹⁴⁾. Another actor in this antioxidant defense pathway is Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1), a sensor and chemical target inducer for antioxidant defense. Under normal conditions, Keap1 binds Nrf2, keeping it in the cytoplasm; however, an increased concentration of oxidant agents leads to Keap1 oxidation and the consequent release of Nrf2 into the nucleus of the cell, where Nrf2 forms a heterodimer with the small Maf protein, which binds to ARE and induces antioxidant gene expression ^(12; 15). The imbalance between antioxidant and ROS quantities promotes oxidative stress in cells.

In addition to these endogenous defenses and strengthening the antioxidant cellular system, foods, especially vegetables, contribute to a variety of antioxidant molecules that can protect animal cells against oxidative stress ⁽¹⁶⁾. A biome known as the Cerrado dominates the central region of

Brazil; after the Amazon rainforest, this ecosystem is the second-largest biome in South America. The Cerrado is characterized by a hot climate; it is semi-humid and notably seasonal with rainy summers and dry winters. This area houses enormous biodiversity with numerous (and little-studied) endemic species⁽¹⁷⁻¹⁹⁾. In a previous study performed in our laboratory, we compared the concentration of phenolic compounds and antioxidant activities (AA) in the edible parts of twelve Cerrado plants species. We identified at least seven with higher antioxidant potential relative to the Red Delicious apple⁽²⁰⁾. Among these species, the Tucum [*Bactris setosa* Mart.], a fruit with a purple peel, whitish pulp and a unique and large seed that is produced by a palm tree, was one of the highlighted fruits. Tucum fruit can be consumed fresh or as a liquor. The aim of this study was to analyze the in vivo AA of tucum. To that end, rats receiving daily oral iron supplements were treated with tucum, and the effects of tucum consumption on the expression of genes involved in the rats' oxidative and iron status were analyzed.

2. Methods and Materials

2.1 Tucum fruit

Tucum fruit (*Bactris setosa* Mart.) samples were collected from the Conservation Area/ Ecological Station of the University of Brasilia or from Água Limpa Farm. The national manager of this Conservation Unit belongs to the University of Brasilia in Brazil. The permission to collect was issued by the Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) / Ministério do Meio Ambiente (Authorization Number 9/2012, IBAMA/Ministério do Meio Ambiente). The tucum fruits were washed with distilled water, dried at room temperature and stored at - 80°C until preparation. After manually removing the seeds from frozen fruits, the pulp and peel were homogenized in a blender with a small amount of water and added to the rats' diets.

2.2 Animal treatment

Twenty-four male 21-day-old Wistar rats were provided by Granja Roberto Giannichi, Suzano-São Paulo state, Brazil. They were housed individually in stainless steel cages at a temperature of $21.75 \pm 0.46^{\circ}\text{C}$ under a 12-h light/dark cycle. The rats had free access to water and food during the dark cycle. After 37 days of acclimatization, the rats (278.9 ± 20 g) were divided into four groups as follows: the adult control group (CNT) received a rodent diet, namely the AIN-93G diet, containing 35 mg/kg iron⁽²¹⁾; the iron-supplemented group (Fe) was fed with the AIN-93G diet containing 350 mg/kg iron; the Tucum group (Tuc) received the rodent diet with 150 g of tucum fruit (pulp and peel)/kg diet; and the Tucum iron-supplemented group (TucFe) received iron-

supplemented rodent diet and 150 g of tucum fruit/kg diet. The iron dose in the iron-supplemented diet was estimated by using the “tolerable upper limit intake” for humans (70 kg, adult), and the value was proportionally adjusted to the recommendation for rats. The AIN-93G diet was modified for groups that received tucum fruit to adjust the macronutrient compounds to rat requirements, according to **Table 1**. The rats were weighed weekly, and their food intake was recorded daily. After 30 days of treatment, the rats were anesthetized in an anesthetic chamber with isoflurane (Cristália, Itapira, São Paulo, Brazil) and sacrificed by cardiac puncture. Blood samples were collected into two tubes with and without 7.0 % EDTA (21 μ L/mL blood) and the organs, specifically the liver, spleen, kidney, heart, brain and intestine (a 1 cm length of the small intestine distal to the pylorus and 1 cm proximal to the ileocecal valve was excised and the lumen was rinsed with saline), were excised, washed in a cold 0.9% NaCl solution, rapidly frozen in liquid nitrogen and stored at -70°C for further analysis. This protocol was approved by the Ethics Committee for the Use of Animals of the Institute of Biological Sciences, University of Brasilia, Brazil as UnBDOC N° 120380/2009.

2.3 Iron status

2.3.1 Tissue iron determination

The iron concentrations in the tissues were determined by using a method described by Baranowska et al. (1995) ⁽²²⁾. In brief, approximately 0.1 g of heart and spleen, 0.4 g of kidney and intestine and 0.3 g of liver and brain samples were digested with 5 mL of concentrated HNO₃ (Sigma Aldrich Co., St Louis, MO, USA) and 2.5 mL of H₂SO₄ (Sigma Aldrich Co., St Louis, MO, USA) in a Provecto Analítica Microwave System (DGT 100 Plus, Jundiai, São Paulo, Brazil, 2003). After the digestion, the samples were resuspended in 0.1 mol/L nitric acid to a final volume of 25 mL. The iron concentration in the samples was determined by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (ICP-AES/Spectro, Kleve, Germany) with a 238 nm line. A calibration curve was produced in a range from 0 to 10 ppm with Fe-Merck Titrisol solution (Merck, Darmstadt, Germany) to calculate the iron concentrations of the tissues.

2.3.2 Serum iron parameters

Serum iron, unsaturated iron binding capacity (UIBC), total iron binding capacity (TIBC), transferrin saturation (TS) and transferrin concentration were analyzed by using a colorimetric kit, as described in the manufacturer's Labtest Diagnóstica S.A. (Lagoa Santa, Minas Gerais, Brazil).

2.4 mRNA expression of iron metabolism and antioxidant genes

2.4.1 RNA extraction

A total RNA extraction of the liver, spleen and intestine samples was performed with Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and chloroform. After the extraction, RNA from the aqueous phase was precipitated with isopropyl alcohol, washed with 70% ethanol, dried and dissolved in deionized water and stored at - 80°C. The integrity of the total RNA was evaluated by electrophoresis. Briefly, an aliquot of total RNA was subjected to electrophoresis on a 1% agarose gel with 1 x TAE running buffer (Tris: Vetec, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil; EDTA: Sigma, St. Louis, MO, USA; acetic acid: Vetec, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil) and stained with GreenTM Gel (Biotium, Hayward, CA, USA). The gel was analyzed by using 1D LabImage software (Kapelan Bio-Imaging Solutions, Leipzig, Germany) to confirm the absence of degraded genetic material. The concentration and purity of the total RNA samples was evaluated by determining the absorbance at 230, 260 and 280 nm in a spectrophotometer (UV-visible Ultrospec 3000, Pharmacia Biotech, Cambridge, England) ⁽²³⁾. The RNA purity was verified by assessing the presence of proteins using the 260/280 nm ratio, and contamination with aromatic compounds, such as phenol, was assessed with the 260/230 nm ratio. The benchmark used to evaluate these ratios (A_{260}/A_{280} and A_{260}/A_{230}) was greater than or equal to 1.8, where A_{280} = the spectrophotometric absorbance at a wavelength of 280 nm and A_{230} = the spectrophotometric absorbance at a wavelength of 230 nm. The total RNA was then precipitated by using anhydrous sodium acetate at 3 mol/L, pH 5.2 (0.1 vol) (Sigma, St. Louis, MO, USA) and 100% ethanol (2.5 vol) at 4°C (Sigma, St. Louis, MO, USA, 2.5 times the 825 μ L volume) and incubated at -20°C overnight. After the incubation, the samples were centrifuged at 10,000 x g at 4°C for 30 min (Centrifuge Eppendorf 5415R, Hamburg, Germany). Ethanol (1 mL) (Sigma, St. Louis, MO, USA) was added to the pellet and the resulting mixture was centrifuged at 10,000 x g for 5 min at 4°C, dried at room temperature and diluted in 20 μ L of deionized water. After this procedure, the absorbance at 230, 260 and 280 nm was determined (UV-visible Ultrospec 3000, Pharmacia Biotech, Cambridge, England) and the A_{260}/A_{280} and A_{260}/A_{230} ratios were again measured to assess the purity and concentration of the RNA in the treated material.

2.4.2 cDNA synthesis

Total RNA (1 µg) was used for cDNA synthesis reactions with a Reverse Transcription Kit Improm II System (Promega, Madison, WI, USA). Oligo (dT) primers were added to the total RNA and denaturation was performed at 70°C for 5 min. Improm-II Reverse Transcriptase was added and the samples were incubated at 42°C for 50 min, followed by inactivation at 70°C for 15 min. An attempt at cDNA synthesis without the reverse transcriptase enzyme was performed for each sample (negative control). An aliquot of the reaction control (no reverse transcriptase) was subjected to RT-PCR by using a reaction system that had been previously tested, and the oligonucleotide sequences had previously been used by other authors (and described in scientific articles to confirm the absence of amplified genetic material).

2.4.3 Reverse transcription-polymerase chain reaction analysis (qRT-PCR)

mRNA concentrations were quantified by using a real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) (7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) for hepcidin antimicrobial peptide (*Hamp*) in the liver; Ferroportin 1 (*Slc40a1*) in the liver, spleen and intestine; divalent metal transporter 21 (*Slc11a2*) in the intestine; and oxidative stress nuclear factor (erythroid-derived-2) like 2 /Nfe2l2 (*Nrf2*) and catalase (*Cat*), both of which were measured in the liver, spleen and intestine. Real-time PCR was performed by using the Fast SYBR Green Master Mix 2X reagent (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) with 2 µL of cDNA (corresponding to 0.2 ng of total RNA) in a final volume of 10 µL with 5 µL Fast SYBR Green Master Mix and 0.2 µmol/L (final concentration) of each primer. The primer sequences used were: (1) hepcidin (*Hamp*), forward: TGATGCTGAAGCGAAGGA, reverse: TGTGTTGAGAGGTCAGGAC; (2) divalent metal transporter-1 (*Slc11a2*), forward: CTGATTTACAGTCTGGAGCAG, reverse: CACTTCAGCAAGGTGCAA; (3) Ferroportin 1 (*Slc40a1*), forward: TTCCGCACTTTTCGAGATGG, reverse: TACAGTCGAAGCCCAGGACCGT⁽²⁴⁾; (4) nuclear factor erythroid derived 2 like 2 (*Nfe2l2*), forward: GAGACGGCCATGACTGAT, reverse: GTGAGGGGATCGATGAGTAA⁽²⁵⁾; (5) catalase (*Cat*), forward ACTCAGGTGCGGACATTC, reverse: GGAGTTGTACTGGTCCAGAAGAGCC⁽²⁶⁾; (6) β-actin (*Actb*), forward: GTCGTACCACTGGCATTGTG, reverse: CTCTCAGCTGTGGTGGTGAA⁽²⁷⁾. *Dmt-1* primers can amplify iron-responsive element and non-iron-responsive element forms of *Dmt-1* cDNA. Quantitative PCR was performed with a 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) for 40 cycles at 95°C for 20 s, 60°C for 3 s and 60°C for 30 s. The amplification specificity of each amplified product was verified by using a melting curve. The qPCR amplification efficiency was evaluated by running standard curves for each amplicon with

different cDNA template dilutions. All gene expression was normalized to housekeeping gene β -actin (Actb) expression and the reactions were run in triplicate. The amplification efficiency was determined from the slope, which was obtained from the standard curve relating the \log [transcribed mRNA] and variation threshold cycle with the equation $E = (10^{(-1/\text{slope})}-1) \times 100$. A slope value of approximately -3.33 for the regression line plot of C_T values vs. the \log of nucleic acid input was considered an efficient reaction. The PCR efficiency ranged between 97 and 103% for all primers. A standard curve was plotted for each studied gene; the curve correlated the ΔC_T (C_T target - C_T reference) with the \log of the cDNA amount, and a slope value of the regression line plot of ΔC_T values vs. the \log of the input nucleic acid of less than 0.1 was used as a general criterion to validate the experiment. A melting curve analysis was used to examine the specificity of the products generated for each primer set. The comparative C_T method was used to quantify the abundance of target gene mRNA, and the results are presented as $2^{-\Delta\Delta C_T}$. This method was performed as described in the "Guide to Performing Relative Quantitation of Gene Expression Using Real-Time Quantitative PCR" tutorial (Part †: 4371095 Rev B, Applied Biosystems).

2.5 Antioxidant enzyme and NADPH oxidase tissue activity

The liver, spleen and intestine tissues were extracted in a 1:20 (w/v) mixture in an Ultra-Turrax homogenizer (Ika Werke GmbH & Co. KG, Germany) with 0.5 mol/L potassium phosphate buffer (pH 7.2) containing 50 mmol/L EDTA and 1 mmol/L phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) in 95% ethanol. The homogenate was centrifuged at $15,000 \times g$, 4°C for 20 min. The supernatant was used to determine enzymatic activities.

2.5.1 Catalase activity assay (EC 1.11.1.6)

Catalase activity was quantified by measuring the consumption of 10 mmol/L H_2O_2 , which was measured at 240 nm in buffer containing 10–50 μL of the tissue homogenates⁽²⁸⁾. One unit of catalase was defined as the amount of enzyme required to decompose 1 μmol $\text{H}_2\text{O}_2/\text{min}$.

2.5.2 Glutathione reductase (GR, EC 1.6.4.2) activity assay

GR activity was determined by detecting the NADPH consumption at 340 nm⁽²⁹⁾. The reaction assay consisted of 0.5 mmol/L EDTA, 1 mmol/L GSSG and 20–100 μL of the tissue homogenate in 50 mmol/L potassium phosphate buffer (pH 7.2). Blanks were measured in the

absence of GSSG. One unit (U) of glutathione reductase was defined as the amount of enzyme required to oxidize 1 nmol NADPH/min.

2.5.3 Glutathione peroxidase (GPx, EC 1.11.1.9) activity assay

GPx activity was quantified by using H₂O₂ as a substrate in an assay coupled with the GR-catalyzed oxidation of NADPH, which was measured at 340 nm. First, the basal consumption of 0.15 mmol/L NADPH was measured in buffer containing 2 mmol/L azide, 5 mmol/L GSH, 1.5 U glutathione reductase, and 10–50 µL of the tissue homogenates. Then, 20 µL of H₂O₂ was added to produce a final concentration of 0.2 mmol/L. The blanks were measured in the absence of tissue homogenate (Hermes-Lima & Storey, 1996). One unit (U) of glutathione peroxidase was defined as the amount of enzyme required to oxidize 1 nmol NADPH/min.

2.5.4 Glutathione-S-transferase (GST, EC 2.5.1.18) activity assay

GST activity was measured by following the conjugation of 1 mmol/L GSH with 1 mmol/L 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) at 340 nm in 50 mmol/L potassium phosphate buffer (pH 7.2) containing 10–50 µL of tissue homogenate (Hagib & Jakoby, 1981). One unit (U) of glutathione-S-transferase was defined as the amount of enzyme required to yield 1 nmol conjugate/min.

2.5.5 NADPH Oxidase (Nox, EC 1.6.3.1) activity assay

The Nox activity measurement was based on the molar extinction coefficient obtained by taking the decay of NADPH consumption from the NADPH value of 6.22 mM⁻¹cm⁻¹ at A_{340nm} in a spectrophotometer (Shimadzu spectrophotometer - TCC 240A) in accordance with Souza and colleagues (2002)⁽³⁰⁾, with modifications. The experiment lasted 300 seconds, and the enzyme activity value was obtained by mixing a 50 mmol/L potassium phosphate buffer at pH 7.2 (Sigma Aldrich, Germany) with 0.5 mmol/L EDTA (Reagen, Brazil), 0.1 mmol/L NADPH (Sigma Aldrich, Germany) and tissue homogenate (125 µL of liver, spleen or intestine homogenate). The blank contained all the test solutions except the homogenate. One unit (U) of NADPH oxidase inhibition was defined as the amount of enzyme required to oxidize 1 nmol NADPH/min.

2.6 Tissue lipid peroxidation level

The malondialdehyde (MDA) concentrations in liver, spleen, intestine, kidney, heart and brain homogenates were measured by high performance liquid chromatography (25 cm Shim-park C18 CLC-ODS (M) column Shimadzu, Kyoto, Japan)⁽³¹⁾. The spectrofluorometric detector

wavelengths were set at 532 nm (excitation) and 553 nm (emission). A four-point standard curve (0.05–2.02 nmol/mL) was produced with tetraethoxypropane⁽³²⁾ (Sigma, St. Louis, MO, USA) dissolved in 1% H₂SO₄ because the acid hydrolysis of TEP yields stoichiometric amounts of MDA ($y = 10^{-6}x + 0.0203$; $r^2 = 0.9998$). The total protein concentrations of the homogenates were determined by using a method by Hartree et al. (1972)⁽³³⁾. The results were expressed as nmol MDA/mg total protein⁽³³⁾.

2.7 Tissue protein oxidation level

The protein oxidation of liver, spleen, intestine, kidney, heart and brain homogenates was assessed by carbonyl content according to a method by Richert et al. (2002)⁽³⁴⁾. The absorbance was measured at 376 nm (spectrophotometer Shimadzu - TCC 240A) and the carbonyl content was expressed as the nmol of carbonyl groups per milligrams of total protein with an extinction coefficient of 22 mmol·L⁻¹·cm⁻¹. The total homogenate protein concentration was determined according to Hartree et al. (1972)⁽³³⁾.

2.8 Antioxidant capacity of serum (FRAP)

The antioxidant capacity of serum was estimated via FRAP assay according to the Benzie and Strain (1996)⁽³⁵⁾ method, with modifications. In brief, blood was initially collected in a sterile vacuum tube and centrifuged at 15,500 g for 30 min, and the resulting serum was stored at - 80°C until analysis. FRAP reagent was freshly prepared by mixing solutions of 0.3 mol/L acetate buffer (pH 3.6), 10 mmol/L 2,4,6-triazine-tripyridyl in 40 mmol/L hydrochloric acid and an aqueous solution of 20 mmol/L ferric chloride in a 10:1:1 ratio and then incubating the mixture at 37°C for 30 min. Subsequently, 900 µL of FRAP reagent was mixed with 30 µL of serum and 90 µL of deionized water. A tube containing the FRAP reagent was used as a blank solution and the absorbance was measured at 595 nm for the initial reaction (T₀) and after 4 min (T_{4min}) of reaction. Aqueous solutions of known Fe⁽³⁶⁾ concentrations ranging from 100-2000 µmol/L (Fe₂SO₄) were used to generate a calibration curve ($y = 0.0006x - 0.0014$). The total extracts were assayed in triplicate and the values were expressed as the mean ± standard deviation in µmol Fe per L of serum.

2.9 Statistical analysis

Comparisons among the treatments in each group were tested by independent sample t-test for equality of means by using SPSS version 17 software (SPSS Inc., Chicago, USA). In all tests, a value $P < 0.05$ was considered statistically significant.

3. Results

3.1. Daily tucum consumption prevents tissue iron overload by down-regulating liver *Hamp* expression

3.1.1 Tissue iron concentration

Iron-supplemented rats (Wistar) were treated with a diet containing tucum (pulp with peel) over 30 d to characterize the effects of this fruit on rat iron status. We found that although the iron-supplemented animals (**Fe** group) consumed less of the diet than the Control group ($p = 0.038$), they had higher iron concentrations in the liver, spleen, intestine, and marginally higher kidney iron levels relative to the **Control** ($p = 0.000, 0.029, 0.011$ and 0.079 , respectively, Figure 1). Moreover, the **Fe** group showed an increase in serum iron and transferrin saturation (TS) relative to the **Control** group ($p = 0.008$ for both, Table 2). The iron rich composition of the tucum fruit (Table 1) increased the level of iron in the diet of the **Tuc** group relative to that of the Control group ($p = 0.001$); however, tucum did not change the iron levels in any studied tissues including the blood serum when compared with the **Control** group. Finally, treating iron-supplemented rats with a diet containing Tucum (**Tuc+Fe** group) resulted in a significant reduction in serum iron and transferrin saturation ($p = 0.003$ and 0.001 , respectively, Table 2) and in a slight reduction in the liver and intestine iron concentrations relative to the **Fe** group ($p = 0.069$ and 0.095 , respectively). Moreover, the iron concentrations in the liver, spleen and intestine from iron-supplemented rats treated with tucum were not different from those of the Control rats. There was no difference in the weight gain among the groups; however, the **Tuc** group showed a slight reduction in weight gain relative to the Control group ($p = 0.055$) (Table 1, Figure 1).

3.1.2 Modulating *Hamp* gene expression

The liver *Hamp* mRNA level measured by reverse transcription-polymerase chain reaction analysis (Figure 2) revealed that the iron-supplemented group (Fe) experienced an increase of about three times that of the liver *Hamp* mRNA levels ($p = 0.012$). The *Hamp* mRNA level in the liver was significantly lower in the group receiving a diet with Tucum (Tuc) than in the Control group (p

= 0.020). Adding tucum to the iron-supplemented diet (TucFe) significantly reduced the level of *Hamp* mRNA in the liver relative to that of the Fe group ($p = 0.023$), making this value no different from the Control group (Figure 2).

3.2. Daily tucum consumption induces Nrf2 expression in the liver and inhibits catalase expression in the spleen.

3.2.1. Nrf2 expression

The iron-supplemented diet increased the level of *Nrf2* mRNA in the spleens and intestines of the Fe group when compared with the Control group ($p = 0.046$ and 0.028 , respectively), and the group treated with tucum experienced an increase of this value in the liver relative to the Control group ($p < 0.001$). The addition of tucum to the iron-supplemented diet resulted in an enhanced increase in the liver *Nrf2* mRNA level relative to the Control group and a slightly enhanced increase of this value relative to the Fe group ($p = 0.034$ and 0.061 , respectively). In the spleens of the TucFe group, the *Nrf2* mRNA level was slightly reduced relative to that of the Fe group ($p = 0.054$). The inhibitory effect of tucum on iron-induced *Nrf2* expression was not observed in the intestines of these rats (Figure 2).

3.2.1. Catalase expression

Catalase mRNA levels in the rat liver, spleen and intestine were analyzed. Figure 2 shows that catalase mRNA levels were lower in the spleen of rats that received tucum (Tuc and TucFe groups) compared to the Control group ($p = 0.039$ and 0.048 , respectively); however, no change was found in the catalase activity of the spleen among the groups (Table 3).

3.3. Daily tucum consumption reduces the activities of catalase, glutathione reductase and glutathione peroxidase that were increased by iron supplementation in a tissue-dependent manner.

The enzyme activities of catalase, glutathione reductase (GR), glutathione peroxidase, glutathione-s-transferase (GST) and NADPH oxidase (Nox) were assayed in rat liver, spleen, intestine, kidney, heart and brain homogenates, and the results are presented in Table 3. An iron-supplemented diet significantly increased the specific activity of CAT and GST in the kidney and intestinal GPx of Fe rats relative to the Controls ($p = 0.031$; 0.015 and 0.046 , respectively), but it significantly decreased the GR activity in the brain ($p = 0.015$). Tucum consumption did not significantly change the specific activities of the analyzed enzyme in the Tuc group. However, the

consumption of tucum by the iron-supplemented group (TucFe) significantly reduced the CAT, GR and GST activities in the kidney and the intestinal GPx in comparison with the Fe group ($p = 0.033$; 0.014 ; 0.006 and 0.027 , respectively) and it also reduced the activity of the pro-oxidant NADPH oxidase enzyme in the heart relative to the Fe group (0.038). A significant reduction in the spleen GR activity was also observed in TucFe relative to the Control group ($p = 0.008$).

3.4. Daily tucum consumption increases antioxidant activity and protects tissues against oxidative damage

Malonaldehyde (MDA) and carbonyl protein levels were analyzed as markers of molecular oxidative damage in the rat tissue homogenates and the results are presented in Figures 3 and 4. Giving dietary iron supplements over 30 d significantly increased the level of liver MDA relative to the Control group ($p = 0.002$). The consumption of tucum by iron-supplemented rats significantly decreased the level of liver MDA relative to the Fe group ($p = 0.008$) (Figure 3). There was also significantly reduced lipid peroxidation in the spleens from Tuc rats relative to the Control group ($p = 0.019$).

With regards to protein oxidation, we found a significant reduction in the spleen carbonyl level in rats that had received a diet with added tucum from both groups relative to the Control rats ($p = 0.001$ and 0.017).

The serum antioxidant capacity (as measured by FRAP assay) was significantly higher in the rats receiving a tucum diet and even in those receiving an iron-supplemented diet relative to the Control ($p = 0.006$ and 0.011 , respectively). A positive tucum consumption effect was also observed on the serum antioxidant capacity in TucFe rats relative to the Fe rats ($p = 0.022$) (**Fig. 5**)

4. Discussion

Our previous study was performed *in vitro*, and it showed that Tucum, a fruit that is native to the Cerrado, has more phenolic compounds and higher antioxidant activity (AA) than the Red Delicious apple⁽²⁰⁾, which has a high known AA⁽³⁷⁻⁴⁰⁾. In the present study, we analyzed the effects of daily Tucum (pulp and peel) consumption on the oxidative stress induced by an iron-supplemented diet in Wistar rats to discover if the tucum fruit exhibited any *in vivo* AA.

Iron is a key element in several physiological processes such as oxygen and electron transport in the respiratory chain. It is a cofactor in DNA synthesis among other processes, but it also acts as a catalyst in the reactions that produce free radicals, which has most likely been a challenge during the evolution of living organisms. In mammals, body iron homeostasis is maintained by hepcidin, a liver hormone. The levels of this hormone regulate the uptake and exportation of iron by enterocytes and macrophages, respectively, which orchestrate tissue iron levels and mobilization. In turn, the body iron status regulates the synthesis of hepcidin hormone, which adjusts the body's iron demands through iron mobilization and intestinal absorption by regulating the level of ferroportin protein ⁽⁴¹⁾. High levels of transferrin saturation induces the expression of liver hepcidin. Once hepcidin enters the bloodstream, it binds to ferroportin, a protein associated with enterocyte cell membranes and splenic macrophages, which are responsible for iron exportation. The hepcidin-ferroportin complex is internalized into the cell where ferroportin is degraded, resulting in the reduction of cellular iron exportation into the bloodstream ⁽⁴²⁻⁴³⁾. Blood levels of hepcidin also seem to modulate the synthesis of divalent metal transporter (*Dmt-1*), the main iron carrier protein located in the apical membrane of enterocytes ⁽⁴⁴⁾.

Despite this fine molecular regulation of the intestinal iron absorption mechanism, the chronic consumption of an iron-enriched diet results in tissue iron overload ^(18; 45). This study confirmed those findings, showing that iron supplementation promoted an increase in serum iron levels and transferrin saturation in the Fe group, which can in turn explain the induction of liver hepcidin transcription (Figure 2) and iron accumulation in the livers, spleens and intestines of these rats (Figure 1). Iron-supplemented rats also displayed reduced levels of ferroportin mRNA in the spleen, which may contribute to the accumulation of iron in this organ. In addition, iron supplementation increased liver lipid oxidation and the activities of some antioxidant enzymes, namely catalase and glutathione S-transferase in the kidney and glutathione peroxidase in the intestine, and it further reduced the activity of glutathione reductase in the brain (Table 3). These results demonstrate the oxidative effect of iron overload on tissues.

In contrast, adding tucum to the AIN-93G diet significantly reduced intestinal iron levels (Figure 1), decreased oxidative stress in the spleen (Figures 3 and 4) and increased the serum antioxidant activity relative to the control group (Figure 5). In addition, tucum consumption down-regulated liver hepcidin, which could explain the reduced level of iron in the intestine.

Another finding that reinforces the down-regulatory effect of tucum on the synthesis of liver hepcidin was observed in the iron-supplemented rat group that received a diet containing Tucum.

Despite ingesting the same amount of iron as the Fe group, the TucFe rats did not accumulate iron in the spleens and intestines, unlike Fe rats (Figure 1). These results reflect the reduced hepcidin levels found in the TucFe group relative to the Fe group (Figure 2), which led to a high iron mobilization from the spleen and intestine, resulting in similar iron levels in these two tissues to those found in Control rats. These results strengthen the evidence that tucum has bioactive molecules that modulate hepcidin expression.

The effect of tucum on iron mobilization as well as on the oxidative status of rats was reinforced by the results found in the iron-supplemented rats receiving a diet with tucum (TucFe). The addition of tucum to the iron-supplemented diet significantly reduced the levels of serum iron and transferrin saturation (Table 2). Tucum also abolished iron-induced changes in antioxidant enzyme activities in the kidneys, as well as in the intestine and brain relative to the Fe group (Table 3). Moreover, Tucum consumption protected rat livers against oxidative damage that was induced by iron overload (Figure 3). Finally, tucum consumption also suppressed the up-regulation of hepcidin in the liver induced by iron supplementation (Figure 2), resulting in the reduction of iron levels in the spleens and intestines of Fe rats, which were not different from the control rats (Figure 1). The slight reduction in the levels of iron found in the tissues of the TucFe rats relative to the Fe rats reinforces the down-regulatory effect of tucum on hepcidin gene expression. These results, beside the increase of antioxidant activity found in the blood serum of Tuc and Tuc-Fe groups (Figure 5) suggest that tucum exerts some "in vivo" antioxidant activity by regulating the iron content in the tissues.

In a recent study, Guan and collaborators (2013) ⁽⁴⁶⁾ identified a hepcidin expression inhibitor in *Caulis spatholobi*, a Chinese medicinal plant. Earlier studies performed by Pearson and collaborators (2008) ⁽⁴⁷⁾ in mice showed that resveratrol alters gene expression patterns in multiple tissues that parallel those induced by dietary restriction (DR) through every-other-day feeding. These authors concluded that the action of resveratrol mimics the capacity of dietary restriction (DR) to delay age-related diseases in mice. However, in opposition to our findings, the authors observed an increase in hepcidin gene expression in mice treated with resveratrol. These results are inconsistent with the age delay, which the authors suggested as an effect of resveratrol because hepcidin is actually an age marker, i.e., younger animals have less hepcidin than older animals ⁽⁴⁸⁾.

Okada and collaborators ⁽³⁶⁾ found that increasing the Nrf2 expression resulted in reduced intracellular iron levels in hepatocytes. In the present study, although tucum-treated rats showed

increased liver Nrf2, they did not show lower liver iron levels; instead, low iron levels were found in the intestines of Tuc rats.

Both tucum and/or iron-supplementation treatments simultaneously altered the expression of liver hepcidin and tissue Nuclear Factor-Erythroid 2 - Related Factor 2 (*Nrf2*). An *Nrf2* role in regulating genes involved in antioxidant defenses has been widely reported^(14-15; 49). Findings in the literature have shown that increased oxidative damage induces *Nrf2* gene expression⁽⁵¹⁾. Recently, Moon and collaborators (2012)⁽⁵¹⁾ found that elevated hepatic iron activates the Nrf2-regulated pathway in a mouse model of dietary iron overload. One year earlier, Harada et al. (2011)⁽⁵²⁾ observed that Nrf2 increases iron export in peritoneal macrophages by inducing ferroportin synthesis. In the present study, iron supplementation did not increase liver Nrf-2 transcripts, but it up-regulated *Nrf2* gene expression in the spleen and intestine of Fe rats. However, we did not find an enhancement of iron mobilization in these tissues; instead, the iron-supplemented rats experienced ferroportin gene down-regulation and higher spleen iron concentrations. This result was associated with the up-regulation of hepcidin found in the liver of iron-supplemented rats, suggesting that hepcidin suppressed the iron mobilization induced by Nrf2, resulting in tissue iron overload. By contrast, in spite of the iron overload found in the spleen and intestine of iron-supplemented rats, there was no increase in the oxidative damage in these tissues, suggesting an antioxidant effect mediated by iron-induced Nrf2 in the spleens and intestines of the supplemented rats.

Tucum consumption suppressed iron-induced Nrf2 expression in the spleen along with a significant reduction in oxidative protein damage. These results suggest that the antioxidant effect of tucum could be mediated by a reduction in the intracellular iron levels, which were induced by a low level of hepcidin. Thus, the down-regulation of *Nrf2* observed in the spleen of iron-supplemented rats who received tucum could be mediated by a reduction in the carbonyl level, which was in turn a consequence of the slight iron level reduction. Similar to the spleen results, iron supplementation also up-regulated *Nrf2* gene expression in the intestines of Fe rats and simultaneously increased the intestinal GPX activity (Table 3), which was reduced in iron-supplemented rats treated with tucum. Furthermore, TucFe rats also showed a slight reduction in intestinal iron ($p=0,095$) and carbonyl ($p=0,089$) levels relative to the Fe rats. These results suggested that *Nrf2* was induced by increased oxidative stress, and the antioxidant effect of tucum suppressed the oxidative stress-induced up-regulation of *Nrf2*.

Several studies have indicated the consumption of fruits or fruit extracts attenuates oxidative stress by up-regulating Nrf2-dependent antioxidant enzymes^(15; 53-55). Early studies performed in cells suggest that both curcumin and resveratrol can activate Nrf2, promoting its nuclear translocation by disrupting the Nrf2-Keap1 complex^(15; 53). Naturally occurring compounds confer protection against subsequent toxic/carcinogenic exposure⁽⁵⁶⁾. A recent study carried out in our laboratory identified high levels of three antioxidant compounds in tucum, namely flavanols (717.6 mg catechin/100 g), yellow flavonoids (42.3/100 g) and anthocyanins (83.2 mg/100 g), as well as Vitamin C (78.4 mg/100 g)⁽²⁰⁾. Thus, one of the antioxidant compounds in tucum could have the capacity to modulate Nrf2 gene expression in rat liver, which could in turn regulate the expression of genes that express antioxidant enzymes. The down-regulation of hepcidin observed in Tuc rats may be independent of Nrf2 up-regulation. Harada et al. (2011)⁽⁵²⁾ observed that sulforaphane, an activator of Nrf2 that is present in broccoli, independently decreased the mRNA hepcidin levels of *Nrf2* expression.

A recent study performed in male Sprague-Dawley rats showed that blackberry extract inhibited lipid peroxidation and increased the activity and protein expression of antioxidant enzymes by activating Nrf2 in CCl4-treated rats. In addition, it significantly decreased aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) levels in CCl4-treated rats, suggesting that blackberry extract is protective against acute hepatic damage by oxidative stress⁽⁵⁴⁾. In the present study, Tucum consumption significantly reduced oxidative iron-induced liver injury as measured by the lipid peroxidation assay. However, the increase in *Nrf2* transcripts found in livers from tucum-treated rats (Figure 2) did not affect the activity of the four studied antioxidant enzymes (catalase, GR, GPx and GST, and Nox enzyme activity, as shown in Table 3). Moreover, although Tucum consumption significantly reduced the MDA and carbonyl levels in Tuc rat spleens, no significant alteration was found in the activity of the five enzymes studied, or in the Nrf2 transcript levels in the spleen.

In conclusion, the results indicate an important role for iron in the redox state of tissue-iron stores and suggest that one or more Tucum compounds simultaneously up-regulate the expression of *Nrf2* and down-regulate the hepcidin gene in the liver. The antioxidant mechanism of tucum appears to be associated with increased iron mobilization from the tissue stores and is mediated by low levels of hepcidin, which prevents the accumulation of iron in the tissues and thereby reduces iron-induced cellular oxidative stress.

Acknowledgments

We thank Luciano Trindade for his assistance for analyzing iron in the tissues.

Financial Support

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Conflict of Interest

None.

Authorship

Adriana M. F-R. A. M. contributed to the development of the overall research plan and study protocol, statistical analyses, data collection, and the preparation of the manuscript; A. S. F. contributed to the development of the overall research plan and study protocol, project management, laboratory logistics, and manuscript revision; D. L. P. S. contributed to the laboratory analyses, statistical analyses and manuscript revision; S. E. M. A. S. participated in the blood sampling, was responsible for the project management and study oversight, and was responsible for the preparation of the manuscript.

5. References

1. Reliene R, Fleming S, Chesselet MF *et al.* (2008) Effects of antioxidants on cancer prevention and neuromotor performance in Atm deficient mice. *Food and Chemical Toxicology* 46, 1371-1377.
2. Barbouti A, Doulias P-T, Zhu B-Z *et al.* (2001) Intracellular iron, but not copper, plays a critical role in hydrogen peroxide-induced DNA Damage. *Free Radical Biology & Medicine* 31, 490-498.
3. Sohal RS and Weindruch (1996) Oxidative Stress, Caloric Restriction, and Aging. *Science* 273, 59-63.
4. Ma YS, Wu SB, Lee WY *et al.* (2009) Response to the increase of oxidative stress and mutation of mitochondrial DNA in aging. *Biochimica et Biophysica Acta* 1790, 1021-1029.
5. Maes M, Galecki P, Chang YS *et al.* (2011) A review on the oxidative and nitrosative stress (O&NS) pathways in major depression and their possible contribution to the (neuro)degenerative processes in that illness. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 35, 676-692.

6. Mehta JL, Rasouli N, Sinha AK *et al.* (2006) Oxidative stress in diabetes: A mechanistic overview of its effects on atherogenesis and myocardial dysfunction. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 38 (2006) 794–803 38, 794–803.
7. Finkel T and Holbrook (2000) Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408, 239-247.
8. Xu J, Hwang JC, Lees HA *et al.* (2012) Long-term perturbation of muscle iron homeostasis following hindlimb suspension in old rats is associated with high levels of oxidative stress and impaired recovery from atrophy. *Experimental Gerontology* 47, 100-108.
9. Arruda LF, Arruda SF, Campos NA *et al.* (2013) Dietary Iron Concentration May Influence Aging Process by Altering Oxidative Stress in Tissues of Adult Rats. *PLOS one* 8, e61058.
10. Pantopoulos K, Porwal SK, Tartakoff *et al.* (2012) Mechanisms of mammalian iron homeostasis. *Biochemistry* 51, 5705-5924.
11. Rahman I, Biswas SK and Kode A (2006) Oxidant and antioxidant balance in the airways and airway diseases. *European Journal of Pharmacology* 533, 222-239.
12. Pamplona R and Costantini D (2011) Molecular and structural antioxidant defenses against oxidative stress in animals. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 301, R843 - R863.
13. Valko M, Rhodes CJ, Moncola J *et al.* (2006) Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions* 160, 1-40.
14. Dinkova-Kostova AT and Talaly P (2008) Direct and indirect antioxidant properties of inducers of cytoprotective proteins. *Mol Nutr Food Res* 52, S128 - S138.
15. Surh Y-J, Kundu JK, Na H-K *et al.* (2005) Redox-Sensitive Transcription Factors as Prime Targets for Chemoprevention with Anti-Inflammatory and Antioxidative Phytochemicals. *Journal of Nutrition* 135, 2993S–3001S.
16. Siriwardhana N, Kalupahana NS, Cekanova M *et al.* (2013) Modulation of adipose tissue inflammation by bioactive food compounds. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 24, 613-623.
17. Mendonça RC, Felfili JM, Walter BMT *et al.* (1998) Flora Vascular do Cerrado. In *In Sano, S M; and Almeida, S P (Eds) Cerrado: Ambiente e Flora Brasil*, pp. 286-556 [(EMBRAPA-CPAC), editor].
18. Siqueira EMA, Marin AMF, Cunha MSB *et al.* (2012) Consumption of baru seeds [Dipteryx alata Vog.], a Brazilian savanna nut, prevents iron-induced oxidative stress in rats. *Food Research International* 45, 427-433.

19. Ferreira LG and Huete AR (2004) Assessing the seasonal dynamics of the Brazilian Cerrado vegetation through the use of spectral vegetation indices. *International Journal of Remote Sensing* 25, 1837-1860.
20. Siqueira EMA, Rosa FR, Fustinoni AM *et al.* (2013) Brazilian Savanna Fruits Contain Higher Bioactive Compounds Content and Higher Antioxidant Activity Relative to the Conventional Red Delicious Apple. *PLOS one* 8, 1-7.
21. Reeves PG, Nielsen FH and Fahey GCJr (1993) AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents: Final Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet. *The Journal of Nutrition* 123, 1939-1951.
22. Baranowska I, Czernickib, K. and Aleksandrowicz, R. (1995) The analysis of lead, cadmium, zinc, copper and nickel content in human bones from the Upper Silesian industrial district. *The Science of the Total Environment* 159, 155-162.
23. Azevedo OF, Soares SM, Brígido M *et al.* (2003) *Técnicas Básicas em Biologia Molecular*, 1st. Brasília: Editora Universidade de Brasília.
24. Christiansen H, Sheikh N, Saile B *et al.* (2007) x-Irradiation in Rat Liver: Consequent Upregulation of Hecpidin and Downregulation of Hemojuvelin and Ferroportin-1 Gene Expression. *Radiology* 242, 189- 197.
25. Palsamy P and Subramanian S (2011) Resveratrol protects diabetic kidney by attenuating hyperglycemia-mediated oxidative stress and renal inflammatory cytokines via Nrf2-Keap1 signaling. *Biochimica et Biophysica Acta* 1812, 719-731.
26. Grigoryants V, Hannawa KK, Pearce CG *et al.* (2005) Tamoxifen up-regulates catalase production, inhibits vessel wall neutrophil infiltration, and attenuates development of experimental abdominal aortic aneurysms *Journal of Vascular Surgery* 41, 108-114.
27. Wang Q, Du F, Qian Z-M *et al.* (2008) Lipopolysaccharide Induces a Significant Increase in Expression of Iron Regulatory Hormone Hecpidin in the Cortex and Substantia Nigra in Rat Brain.
28. Aebi H (1984) Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 105, 121-126.
29. Joannis DR and Storey KB (1996) Oxidative damage and antioxidants in *Rana sylvatica*, the freeze-tolerant wood frog. *American Journal of Physiology- Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 271, R545 - R553.
30. Souza HP, Liu X, Samouilov A *et al.* (2002) Quantitation of superoxide generation and substrate utilization by vascular NAD(P)H oxidase. *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology* 282, H466–H474.

31. Candan N and Tuzmen N (2008) Very rapid quantification of malondialdehyde (MDA) in rat brain exposed to lead, aluminium and phenolic antioxidants by high-performance liquid chromatography-fluorescence detection. *Neuro Toxicology* 29, 708-713.
32. Fahey JW, Haristoy X, Dolan PM *et al.* (2002) Sulforaphane inhibits extracellular, intracellular, and antibiotic-resistant strain of *Helicobacter pylori* and prevents benzo[a]pyrene-induced stomach tumors. *PNAS* 99, 7610-7615.
33. Hartree EF (1972) Determination of Protein: A Modification of the Lowry Method that Gives a Linear Photometric Response. *Analytical Biochemistry* 48, 422-427.
34. Richert S, Wehr NB, Stadtman ER *et al.* (2002) Assessment of Skin Carbonyl Content as a Noninvasive Measure of Biological Age. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 397, 430-432.
35. Benzie IFF and Strain JJ (1996) The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry* 239, 70-76.
36. Okada K, Warabi E, Sugimoto H *et al.* (2012) Nrf2 Inhibits Hepatic Iron Accumulation and Counteracts Oxidative Stress-Induced Liver Injury in Nutritional Steatohepatitis. *Journal Gastroenterology* 47, 924-935.
37. Floegel A, Kim D, Chung SJ *et al.* (2011) Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *Journal Food Comp Anal* 24, 1043-1048.
38. Eberhardt MV, Lee CY and Liu RH (2000) Antioxidant activity of fresh apples. *NATURE* 405, 903-904.
39. Liu RH, Liu J and Chen B (2005) Apples Prevent Mammary Tumors in Rats. *Journal Agric Food Chem* 53, 2341-2343.
40. Sun J, Chu YF, Wu X *et al.* (2002) Antioxidant and Antiproliferative Activities of Common Fruits. *Journal Agric Food Chem* 50, 7449-7454.
41. Ganz T (2012) Macrophages and Systemic Iron Homeostasis. *Journal of Innate Immunity* 4, 446-453.
42. Anderson GJ, Frazer DM and McLaren (2009) Iron absorption and metabolism. *Current Opinion in Gastroenterology* 25, 129-135.
43. D'Anna MC and Roque ME (2013) Physiological focus on the erythropoietin-hepcidin-ferroportin axis. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 91, 338-345.
44. Ganz T (2011) Heparin and iron regulation, 10 years later. *Blood* 117, 4425-4433.

45. McDonald CJ, Ostini L, Wallace DF *et al.* (2011) Iron loading and oxidative stress in the *Atm*^{-/-} mouse liver. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* 300, G554-560.
46. Guan Y, An P, Zhang Z *et al.* (2013) Screening identifies the Chinese medicinal plant *Caulis Spatholobi* as an effective HAMP expression inhibitor. *The Journal of Nutrition* 143, 1061-1066.
47. Pearson KJ, Baur JA, Lewis KN *et al.* (2008) Resveratrol Delays Age-Related Deterioration and Mimics Transcriptional Aspects of Dietary Restriction without Extending Life Span. *Cell Metabolism* 8, 157-168.
48. McCranor BJ, Langdon JM, Prince OD *et al.* (2013) Investigation of the role of interleukin-6 and hepcidin antimicrobial peptide in the development of anemia with age. *Haematologica* 98, 1633-1640.
49. Chan K and Kan YW (1999) Nrf2 is essential for protection against acute pulmonary injury in mice. *PNAS* 96, 12731-12736.
50. Ma Q (2013) Role of Nrf2 in Oxidative Stress and Toxicity. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 53, 401-426.
51. Moon MS, McDevitt EL, Zhu J *et al.* (2012) Elevated Hepatic Iron Activates NF-E2-Related Factor 2-Regulated Pathway in a Dietary Iron Overload Mouse Model. *Toxicological Sciences* 129, 74-85.
52. Harada N, Kanayama M, Maruyama A *et al.* (2011) Nrf2 Regulates Ferritin 1-Mediated Iron Efflux and Counteracts Lipopolysaccharide-Induced Ferritin 1 mRNA Suppression in Macrophages. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 508, 101-109.
53. Chen C-Y, Jang J-H, Li M-H *et al.* (2005) Resveratrol upregulates heme oxygenase-1 expression via activation of NF-E2-related factor 2 in PC12 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 331, 993-1000.
54. Cho BO, Ryu HW, Jin CH *et al.* (2011) Blackberry Extract Attenuates Oxidative Stress through Up-regulation of Nrf2-Dependent Antioxidant Enzymes in Carbon Tetrachloride-Treated Rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59, 11442-11448.
55. Bayram B, Ozcelik B, Grimm S *et al.* (2012) A Diet Rich in Olive Oil Phenolics Reduces Oxidative Stress in the Heart of SAMP8 Mice by Induction of Nrf2-Dependent Gene Expression. *Rejuvenation Research* 15, 71-81.
56. Lau A, Villeneuve NF, Sun Z, *et al.* (2008) Dual roles of Nrf2 in cancer. *Pharmacological Research* 58, 262-270.

TABLE 1 Dietary compositions

Components	Diet ¹ (g/kg)			
	CNT	Fe	Tuc	Tuc+ Fe
Cornstarch	397.5	397.5	369.6	369.6
Starch (tucum)	n.a.	n.a.	27.8	27.8
Protein (casein)	200.0	200.0	198.3	198.3
Protein (tucum)	n.a.	n.a.	1.7	1.7
Dextrinized starch	132.0	132.0	132.0	132.0
Sucrose	100.0	100.0	100.0	100.0
Soybean oil	70.0	70.0	69.7	69.7
Tucum fat	n.a.	n.a.	0.3	0.3
Fiber	50	50	47.5	47.5
Fiber (tucum)	n.a.	n.a.	2.5	2.5
Vitamin mix	10.0	10.0	10.0	10.0
Mineral mix without Iron	35.0	35.0	35.0	35.0
L-cystine	3.0	3.0	3.0	3.0
Choline bitartrate	2.5	2.5	2.5	2.5
Iron	0.035	0.350	0.037	0.350

¹ Control group (CNT): AIN-93G rodent diet (n=5); Iron-supplemented group (Fe): AIN-93G rodent diet iron-supplemented (350 mg of iron/kg diet, in the form of ferrous sulfate heptahydrate) (n=7); Tucum group (Tuc): AIN-93G diet containing 15% Tucum (pulp and peel) (n = 6); Tucum-Iron-supplemented group (Tuc-Fe): AIN-93G diet with iron supplementation (350 mg of iron/kg) and 15% tucum (N=5) (Treatment: 30 days). n.a.: not available.

TABLE 2 Effects of tucum [*Bactris setosa* Mart.] consumption on serum iron parameters in rats treated with a AIN-93G diet supplemented or not supplemented with iron for 30 days¹.

	Serum Iron Parameters							
	CNT		Fe		Tuc		TucFe	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
Serum Iron ($\mu\text{g/dL}$)	103.4	42.2	222.7*	53.3	128.5	31.5	74.8†	13.3
UIBC ($\mu\text{g/dL}$)	266.0	93.0	248.8	71.3	276.0	43.5	310.3	15.8
TIBC ($\mu\text{g/dL}$)	403.9	24.9	438.4	73.6	397.7	50.7	385.1	17.4
Transferrin Saturation (%)	25.9	11.7	50.7*	8.6	32.3	6.9	19.4†	3.1
Transferrin (mg/dL)	282.7	17.4	307.0	51.5	278.4	35.5	269.6	12.2

¹Values are the means \pm SD. Means with (*) differ from the Control group and those with (†) differ from the Fe group in the Test T for independent samples, $P < 0.05$. CNT; this group received rodent diet, AIN-93G (n = 5); Fe, this group received iron-supplemented rodent diet, AIN-93G, containing 350 mg iron/kg diet (n = 7); the Tuc group received a rodent diet with 150 g of tucum (pulp and peel)/kg diet (n = 6); Tuc + Fe, this group received a rodent diet with 350 mg iron/kg diet of iron supplementation plus 150 g of tucum (pulp and peel)/kg diet (n = 5).

TABLE 3 Effects of dietary iron supplementation and tucum on the activities of the following enzymes¹: catalase (CAT), glutathione reductase (GR), glutathione peroxidase (GPX), glutathione s-transferase (GST) and NADPH oxidase (NOX); these activities were studied in the livers, spleens, intestines, kidneys, hearts and brains of rats.

	CAT (U/mg)							
	CNT		Fe		Tuc		TucFe	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
Liver	187.4	11.2	190.0	30.2	194.7	13.6	181.2	15.7
Spleen	47.4	10.5	49.2	9.8	41.4	5.4	42.9	5.9
Intestine	12.2	3.4	10.9	6.5	12.9	2.8	11.8	3.4
Kidney	178.4	33.6	250.8*	52.3	191.2	14.6	172.6†	19.1
Heart	24.4	4.2	26.7	3.7	23.0	5.4	21.3	4.9
Brain	5.8	2.1	5.3	1.4	4.9	0.9	4.4	0.6
	GR (U/mg)							
Liver	31.0	6.0	31.5	3.8	28.6	4.8	28.3	2.0
Spleen	31.0	3.7	27.0	5.5	24.6	7.0	23.5*	1.8
Intestine	87.5	25.6	77.6	9.0	83.1	15.6	79.1	14.2
Kidney	93.6	11.2	105.7	15.5	92.9	15.0	81.0†	11.8
Heart	8.3	1.5	7.6	1.1	8.9	2.9	7.9	1.6
Brain	17.9	2.7	13.9*	1.7	15.0	4.1	14.6	3.0
	GPX (U/mg)							
Liver	719.2	89.1	651.0	142.7	659.5	165.7	659.2	97.4
Spleen	291.3	79.2	333.8	121.4	288.7	104.6	287.8	108.9
Intestine	112.8	43.8	264.1*	124.2	137.9	64.9	112.1†	46.3
Kidney	337.3	67.0	408.7	111.2	398.4	85.9	355.0	40.4
Heart	373.4	119.9	342.3	128.5	375.6	60.5	372.6	74.5
Brain	47.4	21.7	44.8	16.6	44.6	11.1	37.7	8.9
	GST (U/mg)							
Liver	213.1	36.2	202.0	32.8	197.2	13.7	217.7	43.8
Spleen	15.1	2.7	21.0	8.1	20.4	8.2	19.2	2.3
Intestine	151.9	61.6	142.3	34.6	122.3	11.8	172.9	41.7
Kidney	169.6	26.0	215.8*	25.2	176.1	28.7	162.5†	23.4
Heart	10.5	2.7	11.4	4.8	9.9	4.4	12.1	4.3
Brain	39.5	7.2	42.7	2.3	40.4	7.9	44.7	6.5
	NOX (U/mg)							
Liver	1.2	0.3	1.3	0.3	1.4	0.2	0.8	0.4
Spleen	2.7	0.6	2.5	0.3	2.0	0.5	2.6	0.1
Intestine	4.0	0.6	4.7	1.0	4.4	1.2	3.8	1.4
Kidney	0.7	0.2	1.0	0.3	0.9	0.2	0.7	0.2
Heart	0.7	0.3	0.7	0.3	0.7	0.3	0.4†	0.1
Brain	1.0	0.2	0.9	0.1	0.9	0.2	1.0	0.1

¹ The data are expressed as the means±SD. Control (CNT): AIN-93G Rodent diet (n=5); iron (Fe): control diet iron supplemented with 350 mg of iron/kg (n=7); Tucum (Tuc): Control diet modified with 15% fruit tucum; or Control diet plus 350 mg of iron as FeSO₄ 7H₂O plus 15% fruit tucum (Tuc +Fe). Treatment period: 30 days. CNT (n=5); Fe (n=7); Tuc (n=6); Tuc + Fe (n=5). Means with (*) differ from the Control group; (+) differ from the Fe group in the Test T for independent samples, P < 0.05.

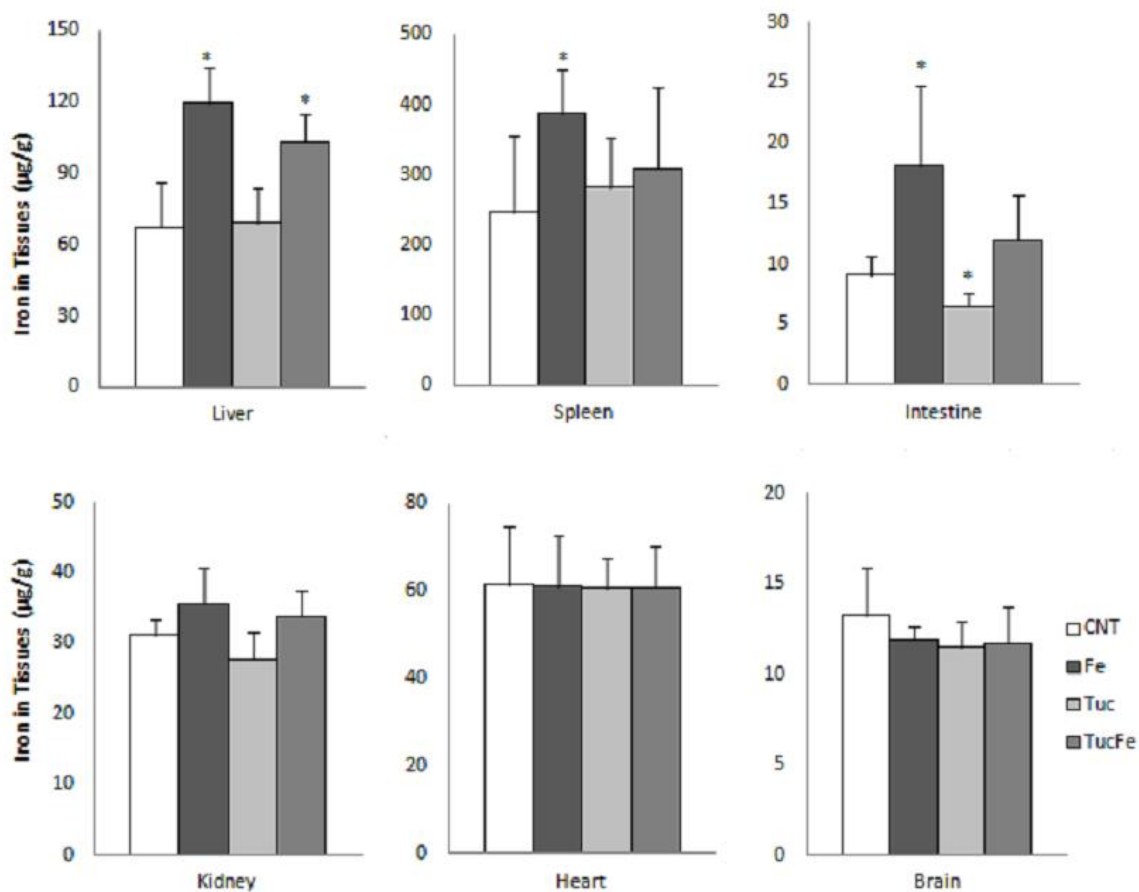


FIGURE 1. Tucum consumption tends to reduce liver and intestine iron overload as induced by an iron-supplemented diet in rats. Iron concentrations in the tissues of rats receiving AIN-93G chow (CNT group, n=5); iron-supplemented chow (Fe group, n=7); tucum added to the chow (Tuc group, n=6); iron-supplemented chow plus tucum (TucFe, n=5). Values are the means \pm SD. Means with (*) differ from the Control group; (†) differ from the Fe group in the Test T for independent samples, $P < 0.05$.

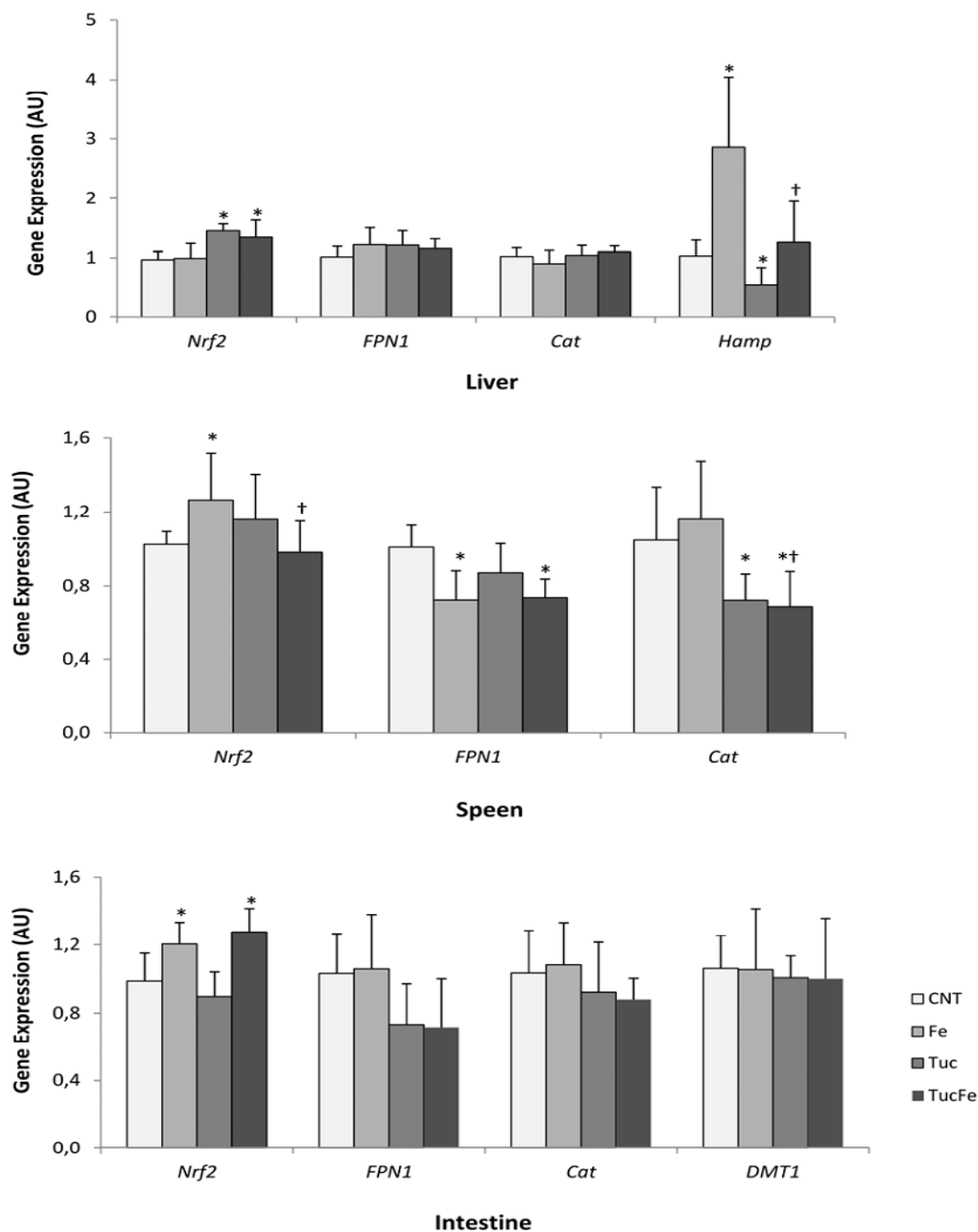


FIGURE 2 Effects of dietary iron supplementation and tucum on the gene expression in the livers, spleens and intestines of rats. Control (CNT): AIN-93G rodent diet; iron (Fe): control diet plus 350 mg of iron supplementation in the form of ferrous sulfate heptahydrate ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$); tucum (Tuc): control diet plus 15% fruit tucum; or tucum plus iron (Tuc +Fe): control diet plus 350 mg of iron as $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ plus 15% fruit tucum. Treatment period: 30 days CNT (n=5); Fe (n=7); Tuc (n=6); Tuc + Fe (n=5). Arbitrary unit (AU). The data are expressed as the means \pm SD. Means with (*) differ from the Control group; (†) differ from the Fe group in the Test T for independent samples, $P < 0.05$.

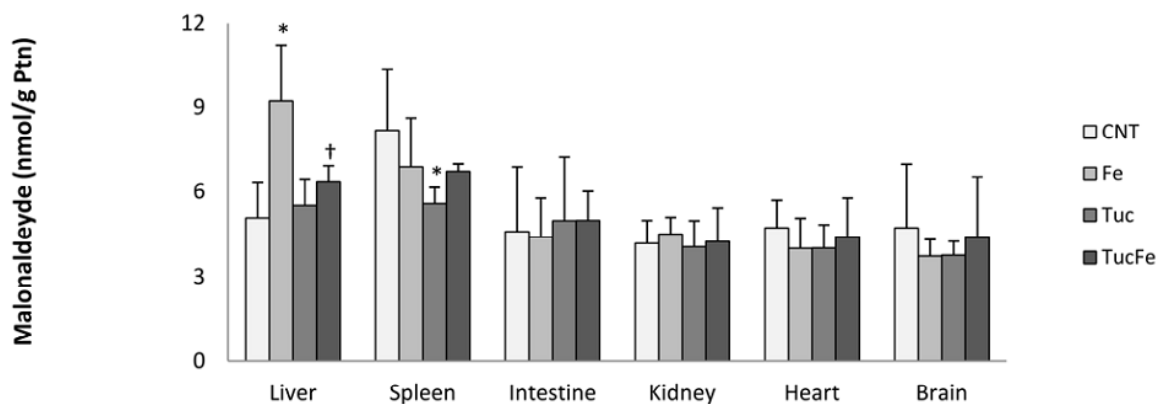


FIGURE 3 Effects of iron supplementation and tucum consumption over 30 days on lipid peroxidation in the livers, spleens, intestines, kidneys, hearts and brains of rats. Control (CNT): AIN-93G rodent diet; iron (Fe): control diet plus 350 mg of iron supplements in the form of ferrous sulfate heptahydrate ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$); tucum (Tuc): control diet plus 15% fruit tucum; or tucum plus iron (Tuc +Fe): control diet plus 350 mg of iron as $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ plus 15% fruit tucum. CNT (n=5); Fe (n=7); Tuc (n=6); Tuc + Fe (n=5). The data are expressed as the means \pm SD. Means with (*) differ from the Control group; (†) differ from Fe group in the Test T for independent samples, $P < 0.05$.

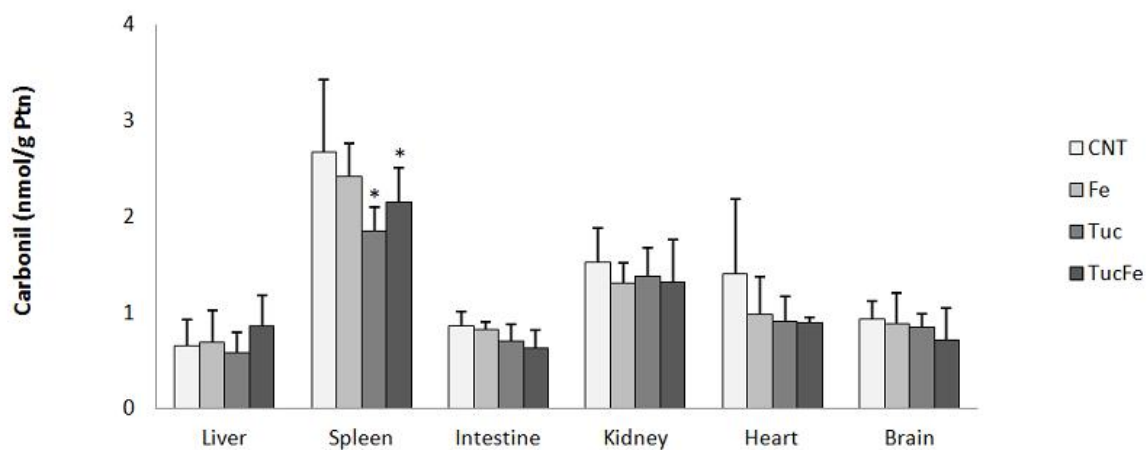


FIGURE 4 Effects of iron supplementation and tucum consumption over 30 days on protein damage in the livers, kidneys, intestines, hearts, spleens and brains of rats. Control (CNT): AIN-93G rodent diet; iron (Fe): control diet plus 350 mg of iron supplementation in the form of ferrous sulfate heptahydrate ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$); tucum (Tuc): control diet plus 15% fruit tucum; or tucum plus iron (Tuc +Fe): control diet plus 350 mg of iron as $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ plus 15% fruit tucum. CNT (n=5); Fe (n=7); Tuc (n=6); Tuc + Fe (n=5). The data are expressed as the means+SD. Means with (*) differ from the Control group in the Test T for independent samples, $P < 0.05$.

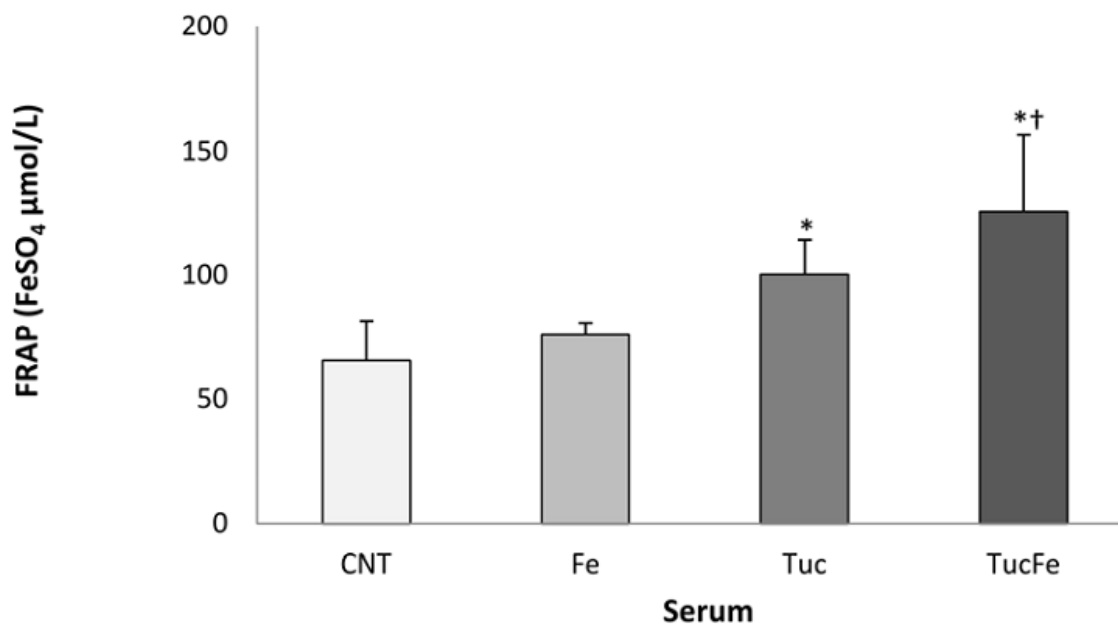


FIGURE 5 Effects of iron supplementation and tucum consumption on the serum antioxidant capacity as measured by FRAP reagent in rats that were treated for 30 days. Control (CNT): AIN-93G rodent diet; iron (Fe): control diet plus 350 mg of iron supplementation in the form of ferrous sulfate heptahydrate (FeSO₄ 7H₂O); tucum (Tuc): control diet plus 15% fruit tucum; or tucum plus iron (Tuc +Fe): control diet plus 350 mg of iron as FeSO₄ 7H₂O plus 15% fruit tucum. CNT (n=5); Fe (n=7); Tuc (n=6); Tuc + Fe (n=5). The data are expressed as the means±SD. Means with (*) differ from the Control group; (†) differ from the Fe group in the Test T for independent samples, P < 0.05.