



Universidade de Brasília
Faculdade de Ciências da Saúde
Departamento de Nutrição Humana
Programa de Pós-Graduação em Nutrição Humana

Renata Cristina da Silva

Ação do extrato aquoso da casca do tucum-do-cerrado (*Bactris setosa* Mart.) em células eucarióticas

BRASÍLIA - DF
2022

Renata Cristina da Silva

Ação do extrato aquoso da casca do tucum-do-cerrado (*Bactris setosa* Mart.) em células eucarióticas

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição Humana da Universidade de Brasília como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Nutrição Humana.

Orientadora: Dr^a. Élide Geralda Campos

BRASÍLIA - DF

2022

Renata Cristina da Silva

Ação do extrato aquoso da casca do tucum-do-cerrado (*Bactris setosa* Mart.) em células eucarióticas

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição Humana da Universidade de Brasília como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Nutrição Humana.

Banca examinadora

Prof^a. Dr^a. Élide Geralda Campos

Universidade de Brasília – UnB

Orientadora

Prof^a Dr^a Livia de Lacerda de Oliveira Pineli

Universidade de Brasília – UnB

Prof^a Dr^a Jakeline Rossetti Mateus

Universidade de São Paulo – USP

Prof^a Dr^a Gazielle Freitas de Bem

Universidade do Estado do Rio de Janeiro – UERJ

Prof. Dr. Daniel Moreira Carneiro

Universidade de Brasília – UnB

AGRADECIMENTOS

À minha mãe e ao meu irmão, por serem meu alicerce, me incentivarem a buscar cada vez mais conhecimento e traçar meu próprio caminho e, principalmente, por todo o apoio desde que saí de casa para a graduação.

Aos professores orientadores Élide Geralda Campos e Klass Nico Faber, por acreditarem no meu potencial, darem apoio, pelas oportunidades e aprendizados transmitidos.

Aos professores da banca pela disponibilidade, interesse pelo tema aqui proposto e pelas contribuições para a versão final deste trabalho.

À equipe do University Medical Center Groningen (UMCG) pelo acolhimento, aprendizagem e por toda a experiência compartilhada no tempo em que estive na Holanda. Em especial ao Raphael Fagundes, aos técnicos Tjasso Blokzijl e Manon Buist-Homan.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por permitir, desde o mestrado, que eu continuasse perseguindo a ciência.

Ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição Humana da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

À Alexandra Elbakyan por abrir as portas do conhecimento produzido por cientistas de todo o mundo.

Aos queridos Lívia Barbosa, Bia Porfírio, Cynthia Tach, José Henrique, Luna Assef, Rodrigo Rocha, Jennifer Albuquerque, Gabriel Gurgel, Rafael Lira, Yasmin Rezende, Hara Rezende, Daniel Átila e tantos outros que estiveram ao meu lado durante essa trajetória mesmo quando não foi possível estarmos perto fisicamente. E à Isabel e Noelma por terem me ajudado a segurar essa barra que é a vida para além da academia.

“A ciência nunca resolve um problema sem criar pelo menos outros dez.”

- *George Bernard Shaw*

“Todas as vitórias ocultam uma abdicação.”

- *Simone de Beauvoir*

RESUMO

Dietas ricas em compostos bioativos possuem papel importante na prevenção de doenças. Os compostos fenólicos podem atuar como sequestradores de radicais livres, quelantes de íons metálicos, e moduladores do sistema antioxidante endógeno. Sua ação tem grande importância contra o estresse oxidativo. Polifenóis podem atuar na prevenção e tratamento de alguns tipos de câncer por meio da inibição do crescimento das células tumorais. O tucum-do-cerrado (*Bactris setosa* Mart.) é um fruto que possui diversos compostos como vitamina C, flavonoides, antocianidinas e quercetina. Seu potencial antioxidante vem sendo demonstrado em diversos estudos. O objetivo desse trabalho foi avaliar os efeitos do extrato aquoso do tucum-do-cerrado (*Bactris setosa* Mart.) em células eucarióticas. Células de *Saccharomyces cerevisiae* selvagem e sem o fator de transcrição Yap1, envolvido na transcrição de genes de enzimas antioxidantes, foram utilizadas em ensaios de crescimento e sobrevivência. Foram utilizados os oxidantes menadiona (5 e 15 μM) e peróxido de hidrogênio (0,5 e 1 mM). O extrato do tucum-do-cerrado foi testado em concentrações de 10-150 $\mu\text{g/mL}$. Modelos de células cancerígenas intestinais, fibroblastos intestinais e organoides do jejuno humano foram avaliados quanto a viabilidade celular após serem expostos ao extrato aquoso de tucum. Os níveis de mRNA das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase, glutatona peroxidase (GPx), dos fatores de transcrição NF-E2-related factor 2 (Nrf2) e da subunidade alfa do fator 1 induzível por hipóxia (HIF-1 α), envolvido na transcrição de diversos genes, incluindo genes envolvidos na angiogênese, foram avaliados. As concentrações de 15 μM de menadiona e 1 mM de H₂O₂ resultaram em menor crescimento e sobrevivência em *S. cerevisiae*. O extrato do tucum não prejudicou o crescimento e sobrevivência de *S. cerevisiae* em nenhuma concentração testada, além de exercer efeito protetor no crescimento de células selvagens expostas a menadiona e ao H₂O₂. O mesmo efeito não foi observado em células sem Yap1, onde o extrato de tucum não protegeu contra a exposição ao H₂O₂. Os resultados indicaram que a ação protetora do tucum contra o estresse oxidativo promovido por H₂O₂ depende da presença de Yap1. Para as células intestinais, o extrato do tucum na concentração de 1 mg/mL reduziu a proliferação celular de células Caco-2, mas não de organoides do jejuno e de fibroblastos. Esse resultado indica uma ação específica do extrato para as células cancerígenas. Na concentração de 0,5 mg/mL, o extrato foi capaz de aumentar a produção mitocondrial de superóxido e de reduzir os níveis de mRNA das enzimas

SOD, catalase e GPx e dos fatores de transcrição Nrf2 e HIF-1 (subunidade α), mas não da sintase de óxido nítrico. Embora os níveis de mRNA tenham sido reduzidos, a expressão proteica da MnSOD e catalase se mantiveram em níveis próximos ao do grupo controle. Os resultados encontrados sugerem que a ação do extrato de tucum nas células Caco-2 está relacionada ao aumento do estresse oxidativo causado pelo aumento do superóxido e manutenção das enzimas antioxidantes em níveis normais.

Palavras-chave: estresse oxidativo, tucum-do-cerrado, antioxidantes, Nrf2, Yap1, *Saccharomyces cerevisiae*, intestino, Caco-2, organoides, câncer.

ABSTRACT

Diets rich in bioactive compounds play an important role in disease prevention. Phenolic compounds can act as free radical scavengers, chelators of metal ions, and modulators of the endogenous antioxidant system. Its action is of great importance against oxidative stress. Polyphenols may act in the prevention and treatment of some types of cancer by inhibiting the growth of tumor cells. Tucum-do-cerrado (*Bactris setosa* Mart.) is a fruit that has several compounds such as vitamin C, flavonoids, anthocyanidins and quercetin. Its antioxidant potential has been demonstrated in several studies. The objective of this work was to evaluate the effects of the aqueous extract of tucum-do-cerrado (*Bactris setosa* Mart.) on eukaryotic cells. *Saccharomyces cerevisiae* wild-type cells and cells lacking the transcription factor Yap1, involved in the transcription of antioxidant enzyme genes, were used in growth and survival assays. The oxidants menadione (5 and 15 μ M) and hydrogen peroxide (0.5 and 1 mM) were used. The tucum-do-cerrado extract was tested at concentrations of 10-150 μ g/mL. Intestinal cancer cell models, intestinal fibroblasts and human jejunal organoids were evaluated for cell viability after being exposed to aqueous tucum extract. The mRNA levels of the antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase (GPx), the transcription factors NF-E2-related factor 2 (Nrf2) and the hypoxia-inducible factor 1 alpha subunit (HIF-1 α), involved in the transcription of several genes, including genes involved in angiogenesis, were evaluated. Concentrations of 15 μ M menadione and 1 mM H₂O₂ resulted in lower growth and survival in *S. cerevisiae*. The tucum extract did not impair growth and survival of *S. cerevisiae* at any concentration tested, in addition to exerting a protective effect on the growth of wild-type cells exposed to menadione and H₂O₂. The same effect was not observed in cells lacking Yap1, where tucum extract did not protect against exposure to H₂O₂. The results indicated that the protective action of tucum against oxidative stress promoted by H₂O₂ depends on the presence of Yap1. For intestinal cells, tucum extract at a concentration of 1 mg/mL reduced cell proliferation of Caco-2 cells, but not of jejunal organoids and fibroblasts. This result indicates a specific action of the extract towards cancer cells. At a concentration of 0.5 mg/mL, the extract was able to increase the mitochondrial production of superoxide and to reduce the mRNA levels of SOD, catalase and GPx enzymes and of the transcription factors Nrf2 and HIF-1 (α subunit), but not nitric oxide synthase. Although mRNA levels were reduced, the protein

expression of MnSOD and catalase remained at levels close to that of the control group. The results suggest that the action of tucum extract on Caco-2 cells is related to an increase in oxidative stress caused by increase in superoxide and maintenance of antioxidant enzymes at normal levels.

Key words: oxidative stress, tucum-do-cerrado, antioxidants, Nrf2, Yap1, *Saccharomyces cerevisiae*, intestine, Caco-2, organoids, cancer.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Classificação dos compostos fenólicos.	19
Tabela 2 -	Identificação de compostos fenólicos no extrato aquoso da casca do tucum-do-cerrado em HPLC-DAD e MALDI-ToF	22
Tabela 3 -	Sequências de oligonucleotídeos utilizados para a reação de qPCR.	41

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Fruto do tucum-do-cerrado (<i>Bactris setosa</i> Mart.)	21
Figura 2 -	Redução do oxigênio molecular com 1 ou 4 elétrons	25
Figura 3 -	Ação da vitamina E como sequestrador de radicais contra a peroxidação lipídica	28
Figura 4 -	Defesa enzimática antioxidante	31
Figura 5 -	Alvos dos polifenóis na terapia em câncer	35

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

O ₂ ^{•-}	Radical ânion superóxido
•OH	Radical hidroxil
NO [•]	Óxido nítrico
Nrf-2	<i>NF-E2-related factor 2</i>
Yap1	<i>Yeast activator protein 1</i>
GSH	Glutaciona
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
HIF-1 α	Fator Induzido por Hipóxia 1 α
HPLC	<i>High Performance Liquid Cromatography</i>
TBARS	<i>Thiobarbituric acid reactive substances</i>
MDA	Malondialdeído
GST	Glutaciona S-transferase
SOD	Superóxido Dismutase
AMPK	<i>AMP-activated protein kinase</i>
Dmt1	<i>Divalent metal transporter 1</i>
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
ATP	Adenosina trifosfato
MnSOD	Superóxido dismutase manganês
Cu/ZnSOD	Superóxido dismutase cobre/zinco
GSSG	Glutaciona oxidada
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reduzida
G6PDH	Glicose-6-fosfato desidrogenase
CAT	Catalase
GPx	Glutaciona Peroxidase
GR	Glutaciona Redutase
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Crm1	Receptor de exportação nuclear 1
IBD	<i>Intestinal Bowel Diseases</i>
UC	Colite ulcerativa

HIF-1 β	Fator Induzido por Hipóxia 1 β
PHD	Prolil-hidroxilases
Caco-2	Células de adenocarcinoma do cólon
YPD	<i>Yeast extract – Peptone – Dextose</i>
OD	Densidade Ótica
EP	Erro padrão
miRNA	MicroRNA
NF- κ B	Fator nuclear kappa B
HADACs	Histonas desacetilases
HATs	Histonas acetiltransferases
DNMTs	DNA metil transferases
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
IC ₅₀	<i>Concentration required for 50% inhibition</i>
RT-qPCr	<i>Real-Time Polymerase Chain Reaction</i>
cDNA	DNA complementar
mRNA	RNA mensageiro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	18
2.1 Compostos bioativos na dieta	18
2.2 Tucum-do-cerrado (<i>Bactris setosa</i> Mart.)	20
2.3 Estresse oxidativo	23
2.3.1 Geração celular de Espécies Reativas de Oxigênio	23
2.3.2 Radicais Livres	24
2.4 Sistema Antioxidante	26
2.4.1 Sistema antioxidante não-enzimático	26
2.4.2 Sistema antioxidante enzimático	29
2.5 Resposta antioxidante em Leveduras.....	31
2.6 Estresse oxidativo e interações da mucosa intestinal.....	33
3. MATERIAIS E MÉTODOS	35
4. OBJETIVOS.....	44
4.1 Objetivo Geral.....	44
4.2 Objetivos Específicos	44
5. RESULTADOS	45
Artigo 1: <i>Bactris setosa</i> Mart. (Tucum-do-cerrado) aqueous extract increases growth and viability in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> BY4741 and YAP1 Δ under stress caused by menadione and hydrogen peroxide	46
Artigo 2: Pro-Oxidant and Cytotoxic Effects of Tucum-Do-Cerrado (<i>Bactris setosa</i> Mart.) Extracts in Colorectal Adenocarcinoma Caco-2 Cells.	65
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	90
7. CONCLUSÃO	91
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92

1. INTRODUÇÃO

Dietas que apresentam compostos bioativos em sua composição, tais como compostos fenólicos, possuem um papel importante na saúde e na prevenção de doenças tais como obesidade e doenças crônicas associadas. Além disso esses compostos apresentam efeitos anti-inflamatório, antioxidante, quimiopreventivo e neuropreventivo (CHUNG et al., 1998; HANHINEVA et al., 2010). As concentrações dos polifenóis na corrente sanguínea dependem de sua absorção, metabolismo (LEWANDOWSKA et al., 2013), da natureza do polifenol e da fonte alimentar (MANACH; SCALBERT; MORAND; RÉMÉSY et al., 2004). Os polifenóis atuam como sequestradores de radicais livres, capturando moléculas como radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), radical hidroxil ($\bullet OH$), e óxido nítrico ($NO\bullet$) (DUTHIE; DUTHIE; KYLE, 2000) e são reconhecidos por sua ação quelante de íons metálicos (WEI et al., 2006; YOSHINO; MURAKAMI, 1998).

Outro mecanismo importante exercido pelos polifenóis é a modulação do sistema antioxidante endógeno formado pelas enzimas catalase, glutathione peroxidase (GPX), e superóxido dismutase (SOD) (FORMAN; DAVIES; URSINI, 2014). Tal modulação se dá por meio da ativação de fatores de transcrição. O Nrf2 (*NF-E2-related factor 2*) é um fator de transcrição que participa da resposta antioxidante em células animais e é ativado sob condições de estresse oxidativo. O Nrf2 atua no núcleo celular, por meio da ativação de genes que codificam enzimas antioxidantes (LUSHCHAK, 2014). Na levedura *Saccharomyces cerevisiae*, o fator de transcrição Yap1 exerce papel similar ao do Nrf2 quando esse microrganismo é exposto a agentes estressores. O Yap1 (*Yeast activator protein 1*) ativa genes que codificam enzimas antioxidantes ou enzimas envolvidas na síntese de antioxidantes, como por exemplo a glutathione (GSH) (RODRIGUES-POUSADA, CLAUDINA. MENEZES, REGINA A. PIMENTEL, 2010). Dessa forma, foram utilizadas cepas de leveduras selvagens (BY4741) e cepas de leveduras que não possuem o fator de transcrição Yap1 (Yap1 Δ) em leveduras *Saccharomyces cerevisiae* a fim de verificar a ação do extrato aquoso do tucum-do-cerrado nessas células.

Nas doenças inflamatórias intestinais, ocorrem níveis anormalmente altos de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), o que indica que o estresse oxidativo é um potencial fator etiológico ou desencadeante (REZAIIE; PARKER; ABDOLLAHI, 2007).

A hipóxia ocorre nas doenças inflamatórias intestinais e o fator induzível por hipóxia (HIF-1 α), uma das subunidades de HIF-1, foi detectado tanto na colite ulcerativa, quanto na doença de Crohn (GIATROMANOLAKI *et al.*, 2003). HIF-1 α é um fator de transcrição responsivo à hipóxia que controla a expressão de inúmeros genes alvo, incluindo genes cujos produtos estão envolvidos no processo de eritropoiese, angiogênese, e metabolismo energético (CABRERO MANRESA *et al.*, 2016). A partir do modelo de células intestinais, foi investigado se o extrato aquoso do tucum-do-cerrado é capaz de proteger essas células contra o estresse oxidativo e se interfere na ativação e proliferação de células intestinais cancerígenas e normais.

O tucum-do-cerrado (*Bactris setosa* Mart.) é um fruto que pode ser consumido nas formas de sucos, geléias, sorvetes ou vinhos (SILVA *et al.*, 2001). O fruto possui maior potencial antioxidante na casca quando comparada à polpa (FUSTINONI-REIS *et al.*, 2016; ROSA *et al.*, 2016; SIQUEIRA, DE *et al.*, 2013). A casca possui diversos compostos, como a vitamina C, flavonóides, antocianinas, catequinas, cianidina, peonidina e quercetina (SIQUEIRA *et al.*, 2013; DANTAS, 2016). A capacidade antioxidante do tucum-do-cerrado foi demonstrada por meio da redução da peroxidação lipídica medida pela redução da formação de malondialdeído (MDA), em fígado de camundongos (FUSTINONI-REIS *et al.*, 2016) e em células de *Saccharomyces cerevisiae*, e também pela redução do dano oxidativo à proteína albumina do soro bovino (BSA) (SIQUEIRA, DE *et al.*, 2013).

Devido ao envolvimento do estresse oxidativo com doenças inflamatórias, desenvolvimento carcinogênico entre outras, as propriedades antioxidantes do tucum-do-cerrado podem auxiliar na descoberta de mecanismos envolvidos no desenvolvimento e evolução dessas doenças e oferecer potencial para a prevenção e tratamento. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a ação antioxidante do extrato aquoso do tucum-do-cerrado (*Bactris setosa* Mart.) em células eucarióticas.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Compostos bioativos na dieta

Compostos bioativos podem ser definidos como compostos naturais presentes em pequenas quantidades em plantas e alimentos ricos em gordura e que possuem impacto positivo no funcionamento ou condição do organismo e sua saúde (KRIS-ETHERTON *et al.*, 2002). Esses compostos são encontrados em diversas fontes animais e vegetais e apresentam estrutura e função variadas, podendo ser vitaminas, proteínas e peptídeos, oligossacarídeos, ácidos graxos e compostos fenólicos (SCHIEBER; STINTZING; CARLE, 2001; TORRES-FUENTES *et al.*, 2015).

Compostos fenólicos formam um extenso grupo de fitoquímicos resultantes do metabolismo secundário de plantas e são encontrados de forma abundante na alimentação humana, principalmente em frutos e vegetais. Esses compostos apresentam grande diversidade em sua estrutura e possuem, no mínimo, um grupamento fenol, que é formado por um anel aromático e um grupo hidroxil (OH) (HANHINEVA *et al.*, 2010). A atividade antioxidante dos polifenóis é caracterizada por meio de sua estrutura química, sendo os mais efetivos aqueles com maior potencial para estabilizar moléculas com elétrons desemparelhados. Polifenóis atuam como sequestradores de radicais livres, capturam moléculas como o radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), o OH , e o óxido nítrico (NO), por exemplo, e assim inibem suas ações (DUTHIE; DUTHIE; KYLE, 2000).

A capacidade antioxidante dos polifenóis depende da posição dos grupos OH e sua biodisponibilidade dependerá da quantidade ofertada e das modificações metabólicas ocorridas durante a absorção e seu caminho pelo trato digestório humano (LEWANDOWSKA *et al.*, 2013). Os flavonoides, por exemplo, podem ter sua biodisponibilidade alta (entre 33 a 100% no caso das isoflavonas), sendo absorvidos pelo estômago ou intestino e entrando na circulação sanguínea entre 1 e 3 horas após seu consumo. Aqueles que não são rapidamente absorvidos seguem para o cólon e tornam-se substratos do metabolismo da microbiota, podendo ser benéficos para o perfil de bactérias intestinais (MANACH; SCALBERT; MORAND; REMESY *et al.*, 2004; RIO, DEL *et al.*, 2013). Além disso, ainda que a biodisponibilidade oral desses compostos seja conhecidamente baixa, os metabólitos gerados pelo intestino, fígado e pela microbiota a partir dos polifenóis ingeridos na dieta são capazes de exercer

atividade biológica e, portanto, exercem papel importante na saúde e prevenção de diversas doenças (LUCA *et al.*, 2019).

Tabela 1: Classificação dos compostos fenólicos.

Flavonoides	Flavonois	Kaempferol, quercetina, isorhammetina e miricetina
	Flavonas	Apigenina, luteonina, wogonin e baicalein
	Isoflavonas	Daidzeína e genistéina
	Flavononas	Naringenina e hesperetina
	Antocianidinas	Pelargonidina, cianidina, peonidina, delphinidina, petunidina e malvidina
	Flavan-3-ois	Catequinas, epicatequinas e afzelequina
Não Flavonoides	Dihidrochalcone	Aspalatina, notofagina e florizina
	Ácidos fenólicos	Ácido gálico, ácido elágico, ácido cafeico, ácido clorogénico, ácido ferúlico, ácido rosmarínico
	Curcuminoídes	Curcumina
	Estilbenos	Resveratrol
	Taninos	Procianidinas, teogalina e punicalagina
Lignanós	Enterodiól, enterolactona, matairesinol e secoisolariciresinol	

Fonte: Del Rio, 2013.; Mojzer, 2016.

Diversos estudos mostram que os polifenóis apresentam propriedades benéficas à saúde como efeitos anti-inflamatórios, efeitos antioxidantes, quimiopreventivos e neuroprotetores (HANHINEVA *et al.*, 2010). Devido ao papel importante do dano oxidativo no desenvolvimento de diversas doenças, a ação antioxidante dos alimentos com compostos fenólicos pode ser associada à prevenção dessas doenças (CROFT, 2016). A estimativa de consumo diário de polifenóis na dieta humana é de 1g (MANACH; SCALBERT; MORAND; RÉMÉSY *et al.*, 2004; OVASKAINEN *et al.*, 2008).

Os polifenóis atuam não apenas como antioxidantes, mas também reduzem a suscetibilidade do colesterol LDL à oxidação ao reduzirem a quantidade de agentes

oxidantes. Além disso, exercem papel fundamental como moduladores e sinalizadores de vias metabólicas (SIES; JONES, 2007).

As principais fontes de polifenóis são frutos como uvas, maçãs, cerejas, e outras frutas cítricas. Esses compostos podem ser também encontrados em sementes, café, vinho tinto, cerveja, chás (como chá verde ou preto), cacau e soja. Nos vegetais são facilmente encontrados em espinafre, brócolis, cebola, tomate, cenoura, beterraba, azeitonas e muitos outros. Alguns temperos como alecrim, sálvia, gengibre e cúrcuma também são fontes de compostos fenólicos. Várias classes de compostos fenólicos são encontradas na dieta, tais como flavonas, flavonoides, antocianidinas, fenilpropanoides (HERMES-LIMA, 2004.; MOJZER, 2016).

Frutos comumente encontrados no cerrado são conhecidamente ricos em compostos bioativos, principalmente compostos fenólicos (FANK-DE-CARVALHO; MARCHIORETTO, 2015). Dessa forma, se tornam opções de alimentos funcionais. Alguns dos frutos do cerrado como, por exemplo, cajá, araticum, baru, jabuticaba, goiaba, jenipapo e a mangaba possuem atividade antioxidante, além de diversos nutrientes. Esses frutos, portanto, são importantes fontes alimentares, e podem gerar renda para a economia local (BAILÃO *et al.*, 2015).

2.2 Tucum-do-cerrado (*Bactris setosa* Mart.)

O Tucum-do-Cerrado (*Bactris setosa* Mart.) é um fruto comestível encontrado em palmeiras pertencentes a ordem *Arecales* e família *Aracacea*. As palmeiras são cobertas de espinhos e medem cerca de 2 a 6 m de altura (MENDONÇA *et al.*, 2008). O tucum-do-cerrado é também conhecido popularmente como tucum, tucum amarelo, tucum bravo e tucum do brejo. Ele é consumido por animais e está amplamente distribuído no cerrado e mata Atlântica, podendo também ser consumido na dieta humana de diversas formas, como sucos, geleias, sorvetes ou vinhos (SILVA *et al.*, 2001). Este fruto é encontrado em cachos abundantes, tem cerca de 2 a 3 cm de diâmetro (Figura 1A e 1B) e coloração arroxeada e escura, semelhante aos frutos de jabuticaba.

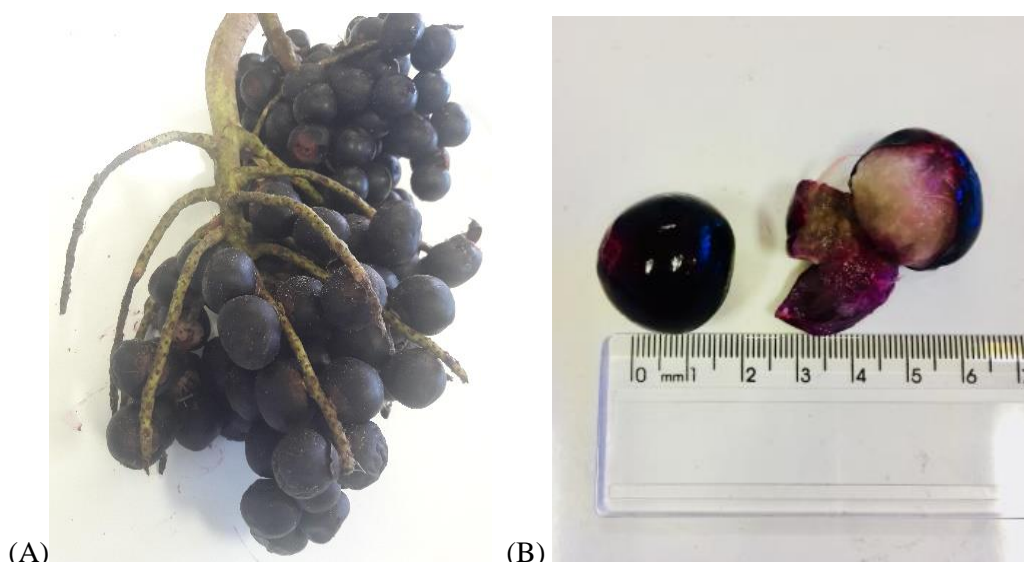


Figura 1: Fruto do tucum-do-cerrado (*Bactris setosa* Mart.). Apresenta-se em cacho (A) e em fruto separado (B). A figura 1B mostra um fruto com casca intacta (roxa) e outro com o fruto aberto para demonstrar a polpa (branca). Fonte: da Silva, R. C. (2022).

Existem diversos compostos bioativos presentes no tucum-do-cerrado, como a vitamina C, flavonoides e antocianinas. Esses compostos estão presentes em maiores quantidades quando comparadas, por exemplo, às encontradas na maçã da variedade *red delicious* (SIQUEIRA, DE *et al.*, 2013).

O extrato aquoso da casca do tucum-do-cerrado foi fracionado por meio de cromatografia líquida de alta eficiência – *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC), o que possibilitou a identificação de alguns compostos, como catequinas, cianidina, peonidina e quercetina, mostrados na tabela 2. Esses compostos apresentaram maior atividade antioxidante quando comparados aos demais compostos isolados por HPLC, em ensaios *in vitro* de dano oxidativo a 2-desoxiribose (DANTAS, 2016).

O tucum-do-cerrado possui significativo potencial antioxidante e alto conteúdo de compostos fenólicos, que são encontrados principalmente na casca do fruto quando comparada à polpa (FUSTINONI-REIS *et al.*, 2016; ROSA *et al.*, 2016; SIQUEIRA, DE *et al.*, 2013). Em estudos anteriores, foram encontrados cinco tipos de antocianinas no extrato alcóolico/aquoso (1:1) da casca e polpa do fruto. Porém, esses compostos não estão presentes no extrato da semente. Corroborando com o estudo de Dantas, 2016, o extrato da casca também apresentou compostos como catequinas, epicatequinas e quercetina, além de carotenóides (BOEING *et al.*, 2017).

Tabela 2 - Identificação de compostos fenólicos no extrato aquoso da casca do tucum-do-cerrado por HPLC-DAD e MALDI-ToF.

Número do pico	Tempo de retenção (min)	UvMax	Fragmento(s) ions m/z (MS mode)	Composto
6	20.62	220, 278, 524	-	Catechin *
9	27.66	216, 278, 517	-	Catechin *
15	41.73	211, 279, 326, 517	287	Cyanidin
17	47.30	206, 269, 357, 518	301	Peonidin
18	49.35	254, 353, 520	303	Quercetin

*Avaliado em espectro UV.

Fonte: Dantas, 2016.

O extrato da casca do tucum-do-cerrado atua como sequestrador contra espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e sua atividade é maior quando comparada aos extratos da polpa e semente. Além disso, o extrato da casca do tucum-do-cerrado se mostrou eficiente na redução da produção de espécies reativas em neutrófilos, sugerindo que seria uma alternativa de tratamento em casos inflamatórios. Células provenientes de adenocarcinoma intestinal (Caco-2) também foram expostas ao extrato alcoólico/aquoso (100 µg/mL) e os resultados demonstraram que na concentração avaliada, não há toxicidade, mas há proteção contra o dano oxidativo (BOEING *et al.*, 2017).

Estudos *in vivo* demonstraram que o consumo diário da casca e polpa do tucum-do-cerrado tem efeito protetor contra a peroxidação lipídica, por meio da redução da formação de malondialdeído (MDA), em fígado de camundongos (FUSTINONI-REIS *et al.*, 2016). Em células de *Saccharomyces cerevisiae*, o extrato da casca também reduz a peroxidação lipídica e, em ensaios *in vitro*, reduz o dano oxidativo da proteína albumina do soro bovino (BSA) (SOUSA, 2013).

Em um estudo realizado com ratos Wistar que foram induzidos a desenvolver câncer colorretal, o tucum-do-cerrado (polpa e casca) demonstrou ser eficaz em prevenir o aparecimento de células cancerígenas. Além disso, as células do cólon desses animais aumentaram a atividade de SOD enquanto houve redução de MDA e aumento na atividade de Glutathione S-Transferase hepático. O tucum promoveu um ambiente pró-inflamatório e pró-apoptótico para os animais que tiveram as lesões induzidas no cólon (CAMPOS; CUNHA, DA; ARRUDA, 2018).

Resultados mais recentes mostram que o tucum-do-cerrado pode melhorar a resposta de glicose hepática por meio de supressão da gliconeogênese e modulação da via da Proteína Quinase Ativada por Monofosfato de Adenosina (AMPK), mesmo em condições com suplementação moderada de ferro em ratos Wistar que tiveram a polpa e casca do tucum adicionado à ração (HEIBEL *et al.*, 2018). Ainda com ratos e em modelo similar, adicionando o tucum (polpa e casca) na ração dos animais, foi demonstrado que o tucum reduz a hepcidina hepática possivelmente por meio da regulação negativa das expressões hepática de HJV e intestinal de DMT1. O estudo sugere que a modulação de hepcidina hepática pelo tucum-do-cerrado envolve a via inflamatória, além de sua ação quelante (ARRUDA, *et al.* 2020).

2.3 Estresse oxidativo

O estresse oxidativo é definido como um desequilíbrio entre os oxidantes e antioxidantes, em favor dos oxidantes, que leva à ruptura do sistema de sinalização redox e controle do dano molecular. Diversas vias de sinalização para a divisão celular, e o controle de renovação de tecidos são prejudicadas devido a esse desequilíbrio do sistema redox (SIES; JONES, 2007). Além disso diversas patologias estão diretamente relacionadas ao estresse oxidativo devido a oxidação de componentes do metabolismo (HALLIWELL, 2006b). Essa oxidação está envolvida em diversos processos como os de inflamação, aterosclerose, envelhecimento, carcinogênese e ação e toxicidade de drogas (SIES; JONES, 2007).

Todos os organismos que utilizam o oxigênio podem sofrer danos oxidativos. Acredita-se que a toxicidade causada pelo oxigênio é principalmente pela formação em excesso de superóxido, que favorece também a formação da molécula de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (HALLIWELL, 2006a).

2.3.1 Geração celular de Espécies Reativas de Oxigênio

Durante o metabolismo celular aeróbico, Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) são constantemente formadas a partir de oxigênio. A mitocôndria contribui em maior parte para essa geração de EROs, por meio do consumo de aproximadamente 80% do oxigênio molecular durante a fosforilação oxidativa. A cadeia transportadora de elétrons possui 5 complexos, conhecidos como complexos I, II, III, IV e adenosina trifosfato

(ATP) sintase localizados na membrana interna da mitocôndria. Dessa forma, durante o processo de respiração celular os elétrons são transportados por essa série de complexos mitocondriais até o seu receptor final que é o oxigênio molecular (HAN; WILLIAMS; CADENAS, 2001).

Elétrons liberados pela cadeia transportadora durante o processo de metabolismo celular reagem com o oxigênio molecular, gerando o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$). Esses $O_2^{\bullet-}$ gerados nos complexos I e III são liberados no espaço intermembranar, que é responsável por receber cerca de 80% dessa espécie reativa gerada na mitocôndria enquanto cerca de 20% são recebidos pela matriz mitocondrial (HAN; WILLIAMS; CADENAS, 2001). Os poros de transição localizados na parte externa da membrana mitocondrial permitem a passagem do $O_2^{\bullet-}$ para o citoplasma, onde ocorre sua dismutação a peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que é uma molécula com alta difusibilidade. Essa reação é catalisada pela superóxido dismutase localizada na matrix mitocondrial (MnSOD) ou no citosol (Cu/ZnSOD) (CROMPTON, 1999).

Outra importante fonte de produção de EROs são os peroxissomas, onde superóxido e peróxido de hidrogênio são gerados por meio da ação de xantina oxidase na matriz peroxissomal e nas membranas. Além disso, alguns metabólitos endógenos como prostaglandinas, ácidos graxos, compostos encontrados em medicamentos e componentes de corantes e saborizantes também podem se tornar fontes de EROs. Esses radicais livres são processados no retículo endoplasmático liso e transformados comumente em OH^{\bullet} (DANSEN; WIRTZ, 2001; RÍO, DEL *et al.*, 1992).

O sistema imunológico também faz parte da produção e sinalização de EROs por meio das enzimas ligadas à membrana chamadas NADPH oxidases, conhecidas como a família das NOXs. Esse mecanismo envolve diversos estágios como o uso de proteínas para transporte de elétrons entre as membranas biológicas, onde o oxigênio molecular é reduzido a $O_2^{\bullet-}$ pelas NOX (KUMARI *et al.*, 2018).

2.3.2 Radicais Livres

Radicais livres são definidos como átomos ou moléculas que possuem um ou mais elétrons desemparelhados em seus orbitais (HALLIWELL, 2006a). Os radicais gerados a partir do oxigênio molecular representam a classe mais importante de espécies reativas geradas em organismos vivos. Em células normais, a geração de EROs é necessária e benéfica para as funções fisiológicas, pois essas espécies exercem papel protetor,

danificam os patógenos nos sítios de inflamação (HALLIWELL, 2006b). Além disso, as EROs participam da regulação cardíaca, vascular e da concentração intracelular de cálcio (VALKO, Marian *et al.*, 2007).

No entanto, altas concentrações de EROs podem causar danos a ácidos nucleicos, estruturas celulares, proteínas e lipídeos, o que pode estimular vias metabólicas de carcinogênese, mutagênese e envelhecimento celular (HALLIWELL, 2006b; VALKO, Marian *et al.*, 2007). A geração de EROs a partir da disfunção mitocondrial, por exemplo, gera mudança na permeabilidade da membrana e leva à ativação da via das caspases, causando também a depleção de moléculas como a glutatona (GSH) (ARMSTRONG, 2006).

Na cadeia respiratória, menos de 10% do oxigênio consumido é reduzido em radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$). O radical superóxido pode sofrer uma reação de dismutação com adição de prótons e gerar o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que não é um radical livre, mas é mais reativo que o oxigênio molecular e, por isso, é incluído no grupo das EROs. O peróxido de hidrogênio consegue atravessar facilmente diversas membranas celulares, o que o torna extremamente danoso. Quando essa molécula de H_2O_2 recebe mais um elétron (Figura 2), ela se divide e resulta em OH^{\cdot} e ânion hidroxila (HO^-). Por fim, a molécula de OH^{\cdot} recebe mais um elétron e um próton para formar água (H_2O) (Hermes-Lima, 2004; Lushchak, 2014).

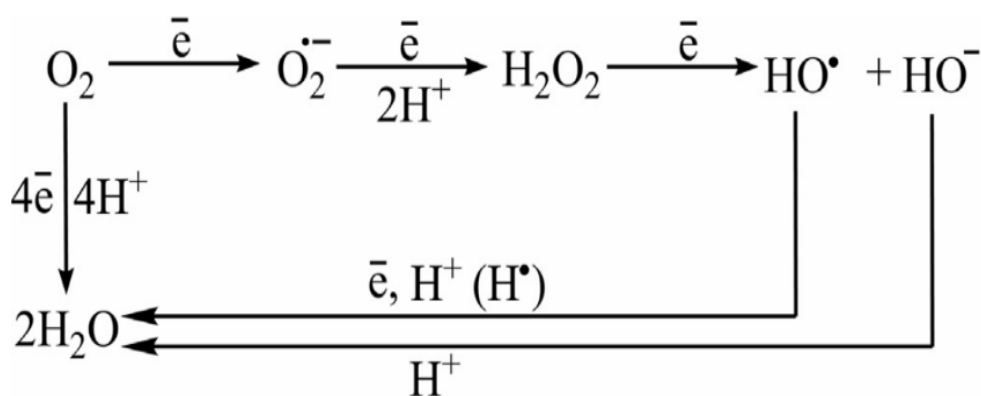
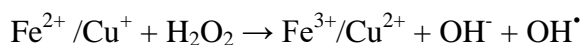


Figura 2: Redução do oxigênio molecular com 1 ou 4 elétrons.

Fonte: (Lushchak, 2011), adaptado.

O radical superóxido possui apenas um elétron desemparelhado e não é reativo com a maioria das biomoléculas (HALLIWELL, 2006a). Em bactérias, por exemplo, sua toxicidade se dá por meio da inativação de enzimas que possuem átomos de ferro

e/ou enxofre em sua estrutura (IMLAY, 2003). Os átomos de Fe⁺² ou Cu²⁺ possibilitam a conversão da molécula de H₂O₂ em OH[•], conhecida como a reação de Fenton, descrita a seguir:



A reação entre o ferro e o H₂O₂ gera OH[•] e OH⁻. Os radicais hidroxila são conhecidos por atacarem bases nitrogenadas do DNA, causando diversos danos (HALLIWELL, 2006a).

O OH[•] pode reagir com diversas moléculas e está envolvido na iniciação do processo de peroxidação lipídica, assim como na oxidação e danos em proteínas e moléculas de DNA. Sua ação nessas moléculas, incluindo carboidratos, leva a mecanismos naturais como o de envelhecimento (HERMES-LIMA, 2004; LUSHCHAK, 2014).

2.4 Sistema Antioxidante

Todos os organismos que utilizam o oxigênio em seu metabolismo sofrem exposição ao estresse oxidativo. Dessa forma, células de diferentes organismos desenvolveram mecanismos de proteção para evitar danos oxidativos a componentes celulares (JAMIESON, 1998). Para manter os sistemas biológicos protegidos da toxicidade das EROs diversos mecanismos funcionam para manter e controlar sua ação e quantidade e isso envolve defesas enzimáticas e não enzimáticas (HERMES-LIMA, 2004).

2.4.1 Sistema antioxidante não-enzimático

Grande parte dos antioxidantes não-enzimáticos não são sintetizados pelos seres humanos e precisam ser consumidos na dieta. Antioxidantes ingeridos por meio da dieta são essenciais para, junto aos antioxidantes endógenos, proteger contra o estresse oxidativo. Uma nutrição incompleta, com deficiência em alguns antioxidantes pode estar correlacionada a diversas doenças, como doenças pulmonares e intestinais (LIU *et al.*, 2018).

Os antioxidantes dietéticos são conhecidos como substâncias presentes nos alimentos que auxiliam na redução significativa dos efeitos causados por espécies reativas de oxigênio e nitrogênio nas funções fisiológicas do organismo. Dentro dessa

definição estão a vitamina C, vitamina E e selênio. Outros componentes dietéticos como carotenoides e polifenóis, apesar de não estarem dentro da definição, influenciam em diversas reações bioquímicas decorrentes do processo oxidativo (INSTITUTE OF MEDICINE, 2000). O baixo consumo ou baixa biodisponibilidade de antioxidantes dietéticos, como polifenóis e alguns micronutrientes, reduzem a eficácia do processo antioxidante no organismo (SIES; JONES, 2007).

O ácido ascórbico (Vitamina C) exerce a função fisiológica de antioxidante solúvel devido a sua alta capacidade redox. Além disso, possui a capacidade de reciclar a vitamina E atua como sequestrador de moléculas como o radical superóxido, oxigênio singlete, peroxinitrito e OH^\bullet . Já foi demonstrado que a vitamina C possui papel importante na inibição da peroxidação lipídica, por meio do sequestro de espécies reativas antes que a peroxidação seja iniciada, e na proteção contra o dano a proteínas e DNA causados por radicais. A vitamina C oferece proteção indireta contra os danos causados por EROs recuperando outros antioxidantes, como a glutatona e o α -tocoferol para o seu estado inicial (INSTITUTE OF MEDICINE, 2000; FREI, STOCKER E AMES, 1988). A biodisponibilidade da vitamina C está em cerca de 80% da ingestão. Dessa forma, o consumo diário de vitamina C deve estar entre 60 e 100 mg para manter os níveis plasmáticos adequados (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY, 2013).

A Vitamina E (α -tocopherol) é uma vitamina lipossolúvel, o que auxilia a prevenção da peroxidação lipídica celular. Sua atuação como sequestradora de moléculas como o radical peroxil evita que esse radical ataque os lipídeos para transformá-los em hidroperóxidos e propaguem a peroxidação em cadeia (NIKI; TRABER, 2012). Dessa forma, a vitamina E forma um radical tocoferil, como demonstrado a seguir, na figura 3. A vitamina E elimina o radical peroxil antes que ele ataque o ácido graxo para produzir hidroperóxido, que propaga a oxidação da cadeia. O radical tocoferil restante pode ser reduzido pelo ácido ascórbico (vitamina C) ou pelo ubiquinol para retornar à forma de vitamina E, pode atacar os ácidos graxos ou hidroperóxido, pode reagir com radical peroxil para produzir um aduto ou ainda reagir com outro radical tocoferil para produzir um dímero estável.

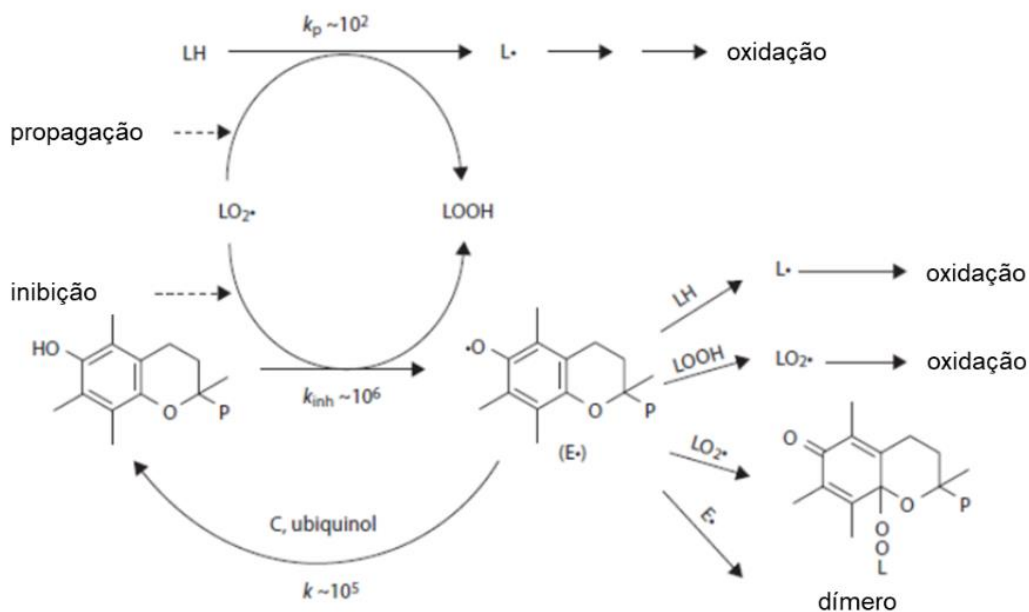


Figura 3: Ação da vitamina E como sequestrador de radicais contra a peroxidação. Radical peróxido ($LO_2\cdot$), ácido graxo (LH), radical lipídico ($L\cdot$), Hidroperóxido (LOOH), radical tocoferil ($E\cdot$), ácido ascórbico (C).

Fonte: (NIKI; TRABER, 2012), Adaptado.

O radical tocoferil ($E\cdot$) poderá ser reduzido por outros antioxidantes a tocoferol, formar dímeros de tocoferol não reativos, ser oxidado a tocoferil quinona ou ainda, atuar como pró-antioxidante e oxidar outros lipídeos (INSTITUTE OF MEDICINE, 2000).

Os carotenóides mais encontrados no plasma humano são o β -caroteno, licopeno, luteína e criptoxantina. A ação antioxidante dos carotenóides consiste em reduzir a quantidade de oxigênio singlete disponível. Os carotenóides podem reagir com EROs, o que resulta na retirada de hidrogênio, transferência de elétrons ou adição de espécies radiculares. Podem atuar também de forma sinérgica para recuperar moléculas de vitamina C e E (HERMES-LIMA, 2004; BÖHM *et al.*, 2020).

O selênio, que atua como um cofator em enzimas antioxidantes, também compõe o sistema antioxidante não-enzimático. O selênio atua junto a quatro enzimas de Glutathiona Peroxidases (GSHPx 1 a 4) no combate ao estresse oxidativo e também junto a tiorredoxinas redutases, com função de restabelecer a atividade do ácido ascórbico oxidado através da doação de elétron (MAY *et al.*, 1998; INSTITUTE OF MEDICINE, 2000).

A glutathiona é um tripeptídeo formado a partir da L-cisteína, L-glutamato e L-glicina, conhecido como principal antioxidante solúvel nas células e apresenta concentração de até 15 mM no citosol, núcleo e mitocôndria. Sua porção cisteína-tiol confere sua ação antioxidante, vez que o tiol é oxidado e forma o dissulfeto de glutathiona oxidada (GSSG) (MEISTER; ANDERSON, 1983). Suas principais funções contra o estresse oxidativo são atuar em conjunto com enzimas como a GPX e glutathiona-S-transferase (GST), como sequestrador para o OH^\bullet , evitar a peroxidação lipídica e regenerar outros antioxidantes como as Vitaminas C e E. Altas concentrações de GSSG podem danificar uma série de enzimas e acumular dentro das células. Por isso, a razão entre GSSG e GSH é um bom indicador do estresse oxidativo (VALKO *et al.*, 2007).

2.4.2 Sistema antioxidante enzimático

A linha de defesa primária contra o radical superóxido inclui a superóxido dismutase (SOD), que tem sua função prioritariamente na proteção mitocondrial contra o dano oxidativo causado pelo radical superóxido (HERMES-LIMA, 2004). A SOD catalisa a reação de dismutação do radical superóxido em peróxido de hidrogênio (reação 1), o que permite o controle efetivo de níveis desse radical no organismo.

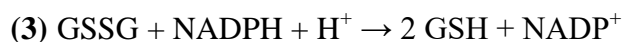
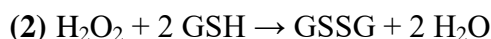


Existem diversas isoenzimas de SOD que diferem entre si, principalmente, nos metais que estão ligados a elas como o cobre, zinco, ferro ou manganês. A SOD1 (CuZnSOD) contém cobre e zinco e é encontrada no citosol. A enzima SOD2 (MnSOD), composta com manganês é encontrada na matriz mitocondrial e comumente em leveduras e bactérias. A SOD3 (ecSOD) tem em sua composição íons de zinco e cobre e é encontrada principalmente na superfície celular e na matriz extracelular (FUKAI; USHIO-FUKAI, 2011).

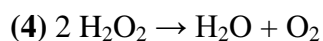
Na saúde humana, a SOD desempenha papel importante na prevenção de doenças relacionadas a disfunções endoteliais, como angiogênese e aterosclerose, através da inibição da oxidação de óxido nítrico, que resulta em menor produção de OH^\bullet (FUKAI; USHIO-FUKAI, 2011). Além disso, a SOD também desempenha função na prevenção

de doenças como Parkinson, Alzheimer, câncer, síndrome de Down (NOOR; MITTAL; IQBAL, 2002).

A enzima glutationa peroxidase (GPx) converte a glutationa reduzida (GSH) em glutationa oxidada (GSSG), utilizando na reação o peróxido de hidrogênio. Dessa forma, o peróxido de hidrogênio é removido do organismo e há formação de duas moléculas de água (reação 2). Outras enzimas auxiliares fazem parte do sistema antioxidante enzimático, como a enzima glutationa redutase (GR), que é responsável por reciclar a GSSG a GSH por meio de sua redução, utilizando para isso a molécula de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) (reação 3) que é produzida prioritariamente pelas reações catalisadas pelas enzimas glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) e 6-fosfogluconato desidrogenase. A Glutationa S-Transferase (GST) utiliza a glutationa para formar complexos junto a xenobióticos, como fármacos, pesticidas e outros, para auxiliar na detoxificação do organismo. (HERMES-LIMA, 2004; WU, 2013).



A enzima catalase é composta por um grupamento heme e uma molécula de NADPH, e é encontrada principalmente em peroxissomas (AEBI, 1984). A reação catalisada por esta enzima causa a decomposição do H_2O_2 para gerar água e oxigênio (reação 4).



A catalase atua também na oxidação de outras moléculas como o etanol, metanol e fenóis, por meio do consumo de uma molécula de peróxido. Nesse tipo de reação, o peróxido de hidrogênio é utilizado como doador de elétron, para gerar uma molécula de água e reduzir a molécula alvo (CHELIKANI; FITA; LOEWEN, 2004).

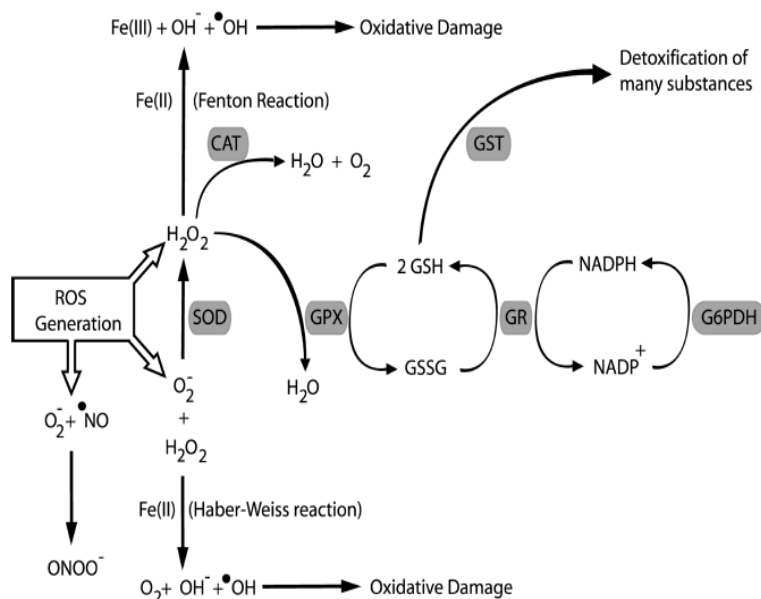


Figura4: Defesa enzimática antioxidante.

Fonte: Hermes-Lima, M., 2004, adaptado.

2.5 Resposta antioxidante em Leveduras

Espécies reativas, como o H_2O_2 e OH^\cdot , são conhecidos por afetarem o metabolismo de leveduras (HIGGINS *et al*, 2003). Nesses microrganismos, alguns mecanismos são utilizados em situações de estresse onde as defesas antioxidantes não são capazes de suprir a demanda celular. A menadiona é um composto apresentado como cristais amarelados e não é solúvel em água, mas em álcool ou metanol. Um de seus mecanismos de ação é atuar como catalizador para a formação do peróxido de hidrogênio em células viáveis, sendo proporcional a quantidade de menadiona disponível na reação. A interação da menadiona com a glutatona reduzida forma um conjugado entre essas duas moléculas, resultando na geração do ânion superóxido e H_2O_2 durante esse processo. A produção de glutatona oxidada também pode resultar da interação da menadiona com a GSH (HASSAN, 2013). Dessa forma, a menadiona resulta no aumento da formação de EROs, podendo ser parte das mudanças na morfologia e viabilidade nas células de leveduras (KIM, II-SUN; HO-YONG, SOHN; JIN, 2011).

A resposta antioxidante da levedura *Saccharomyces cerevisiae* é realizada de diversas formas. Essa célula possui em sua composição o ácido ascórbico, ainda que em baixa concentração, embora seu mecanismo não seja conhecido nesta célula.

Metalotioneínas são importantes para a proteção contra metais como o cobre e também desempenham papel na proteção contra o estresse induzido por menadiona, uma vez que seu gene CUP1 é ativado na presença desse agente estressor. A parede celular de leveduras também confere maior proteção devido a sua composição com ácidos graxos saturados (JAMIESON, 1998).

Um dos mecanismos de proteção celular das leveduras é a redução do crescimento celular para prevenir o estresse oxidativo (WU *et al*, 2011). Estudos de crescimento celular são indicadores da resposta fisiológica e são realizados a fim de determinar a resposta de células selvagens ou mutantes a condições normais, de estresse ou a combinação de ambos (XU *et al*, 2014). Além disso, a fim de contornar as condições desfavoráveis geradas pela presença de menadiona, as células de leveduras ativam a produção de proteínas e enzimas antioxidantes, além de outros mecanismos de defesa (KIM, II-SUN; HO-YONG, SOHN; JIN, 2011).

As células de leveduras possuem sistemas antioxidante enzimáticos e não-enzimáticos para prevenir os danos causados pelo estresse oxidativo (AUESUKAREE, 2017). As principais enzimas antioxidantes atuantes nas leveduras são a SOD, catalase e as peroxidases, enquanto o sistema não-enzimático inclui tiorredoxinas e moléculas que atuam como sequestradoras de radicais, como a glutathione (HERRERO, E.; ROS, J.; BELLÍ, G.; CABISCOL, 2008). Leveduras também possuem cinco tiorredoxinas redutases, também conhecidas como peroxirredoxinas, que atuam na redução de hidroperóxidos. A reação acontece com a interação dos grupos cisteína e tiol e gera moléculas de água e álcool. A tiorredoxina oxidada é posteriormente reduzida pela tiorredoxina redutase, por meio da utilização da molécula de NADPH como doadora de elétron (TOLEDANO *et al.*, 2013).

Outro mecanismo utilizado pelas células contra o estresse oxidativo é a modulação do sistema antioxidante endógeno. Em situações de alto estresse em células animais, o fator de transcrição Nrf2 (*NF-E2-related factor 2*) participa da resposta antioxidante, tendo sua atuação no núcleo celular por meio da ativação de genes que codificam enzimas antioxidantes (LUSHCHAK, 2011). Em *S. cerevisiae*, o fator de transcrição Yap1 (*Yeast Activator Protein 1*) exerce papel similar ao Nrf2 quando as células são expostas a agentes estressores. As leveduras possuem sensores que detectam níveis extremamente baixos de H₂O₂ e ativam as vias de tiorredoxina e glutathione, que em contrapartida ativam a Yap1, processo conhecido como sinalização antioxidante e redox (RODRIGUES-POUSADA *et al*, 2010).

A ativação da Yap1 quando exposta ao estresse oxidativo ocorre pela regulação de sua exportação nuclear. Esse processo é mediado principalmente pelo receptor de exportação nuclear 1 (Crm1). Em células não estressadas, Yap1 é rapidamente transportada para o citoplasma pelo Crm1 (YAN; LEE; DAVIS, 1998). Em situação de estresse, os dois domínios ricos em cisteína (CRD) que estão localizados nas partes N e C terminais da proteína formam dissulfetos entre o N-terminal Cys303 e o C-terminal Cys598, principalmente em resposta a oxidação causada pelo H₂O₂. Em consequência a essa mudança estrutural, a interação entre Yap1 e Crm1 é inibida, o que causa o acúmulo nuclear do Yap1 e sua consequente ativação (DELAUNAY *et al* 2002).

2.6 Estresse oxidativo e interações da mucosa intestinal

O epitélio intestinal constitui uma barreira física entre o indivíduo e os microrganismos e exerce função imunoregulatória essencial para a homeostase de células imunes da mucosa (PETERSON; ARTIS, 2014). Quando comparado a outros órgãos, o intestino é mais vulnerável ao estresse oxidativo porque os enterócitos são continuamente expostos aos mais diferentes compostos exógenos, incluindo oxidantes, e são continuamente renovados (SONG *et al.*, 2017). Além disso, o intestino é continuamente exposto a variações nas concentrações de oxigênio, incluindo condições de hipóxia (TAYLOR; COLGAN, 2007). As doenças intestinais inflamatórias (IBD – *Intestinal Bowel Diseases*), isto é, colite ulcerativa e doença de Crohn, são caracterizadas por ativação imune e inflamação dentro do trato gastrointestinal. Nessas doenças, de causa ainda desconhecida, ocorrem níveis anormalmente altos de EROs, o que indica que o estresse oxidativo é um potencial fator etiológico ou desencadeante para IBD porque EROs apresentam papel prejudicial nos processos inflamatórios (REZAIE; PARKER; ABDOLLAHI, 2007).

A ocorrência de hipóxia tem sido verificada nas doenças inflamatórias intestinais, como IBD. O fator 1 induzível por hipóxia (HIF-1 α), uma das subunidades de HIF-1, foi detectado localmente (por meio de imunohistoquímica) tanto na colite ulcerativa, quanto na doença de Crohn (GIATROMANOLAKI *et al.*, 2003). HIF-1 é um fator de transcrição responsivo à hipóxia que controla a expressão de inúmeros genes alvo, incluindo genes cujos produtos estão envolvidos no processo de eritropoiese, angiogênese, e metabolismo energético. As duas subunidades de HIF-1, HIF-1 α e HIF-1 β , dimerizam para ativar a transcrição gênica após a ligação a uma sequência consenso

chamada HRE (Elemento de resposta à hipóxia). Enquanto HIF-1 β é sintetizado constitutivamente, o HIF- α é produzido e degradado continuamente pelo proteossoma sob níveis normais de oxigênio (normóxia) devido à poli-ubiquitinação por um complexo de ubiquitina-proteína ligase. O reconhecimento do HIF-1 α para ser degradado pelo proteossoma é dependente da ligação da proteína von Hippel Lindau (pVHL) a resíduos hidroxilados de prolina. Assim, as enzimas prolil-hidroxilases (PHD) devem ser inibidas para que HIF-1 α possa dimerizar com HIF- β e HIF-1 possa exercer sua ação. Durante a hipóxia, a ação das prolil-hidroxilases é inibida devido à falta de oxigênio ou inativação por EROs (CHANDEL *et al.*, 2001). Assim, inibidores da via de HIF-1 podem ter um potencial terapêutico na fibrose intestinal induzida por inflamação (CABRERO MANRESA *et al.*, 2016).

Câncer é a segunda maior causa de morte no mundo, tendo ocorrido cerca de 9,6 milhões de mortes no ano de 2018. O câncer colorretal é reconhecido como uma das principais causas de morte em países ocidentais e é o tipo mais comum de câncer entre os gêneros. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a dieta é um fator de risco chave para a prevenção ou desenvolvimento da doença.

Espécies reativas de oxigênio estão envolvidas nos três estágios de desenvolvimento do câncer, conhecidos como iniciação, promoção e desenvolvimento. O excesso de produção de EROs pode resultar em mutação de genes gerando um ambiente favorável ao desenvolvimento cancerígeno (LIU *et al.*, 2018; WELLS *et al.*, 2009). Junto a isso, a disfunção do metabolismo e aumento de demanda energética de células tumorais favorece a maior produção de EROs, que propicia ainda mais o desenvolvimento de células cancerígenas por meio de mecanismos adaptativos como sinalização para crescimento celular, aumento de suprimento sanguíneo, promoção de metástases e resistência a terapias (VALKO, M. *et al.*, 2006).

Compostos bioativos, como antocianinas, flavonoides e polifenóis vêm sendo estudados como inibidores do crescimento em células tumorais e como pró-oxidantes, sendo amplamente reconhecidos na prevenção de diversos tipos de câncer (DUTHIE, G. G.; DUTHIE; KYLE, 2000.; LAMBERTJ. D.; ELIAS, R. J., 2010.). Estudos indicam que a ação pró-oxidante de polifenóis pode se dar pela indução da morte celular por meio da ativação de caspases, citocromo C, parada do ciclo celular e modulação de vias metabólicas, evitando a progressão e desenvolvimento do tumor (GONZÁLEZ-VALLINAS, M. *et al.* 2013).

O uso de polifenóis como a quercetina, resveratrol e catequinas nas terapias antitumorais é direcionado a diversos alvos específicos, como por exemplo a modulação epigenética de histonas desacetilases, histonas acetiltransferases ou metil transferases, em células-tronco cancerígenas (CSCs) ou no status redox modulado por esses compostos (MILEO, A.M.; MICCADEI, S., 2016), como mostrado na figura 5, a seguir.

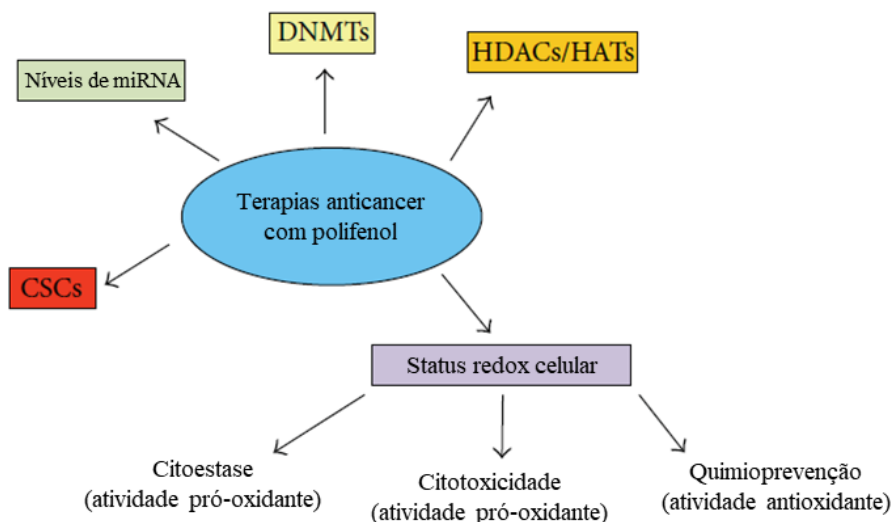


Figura 5: Alvos dos polifenóis na terapia em câncer. Histonas desacetilases (HADACs), histonas acetiltransferases (HATs), metil transferases (DNMTs) e células-tronco cancerosas (CSCs).

Fonte: adaptado de Mileo, A. M.; Miccadei, S., 2016.

Alterações epigenéticas, como metilação e modificações em histonas, podem gerar, por exemplo, a não codificação de microRNAs (miRNA) e estão amplamente associadas ao desenvolvimento do ambiente tumoral. O estresse oxidativo possui papel na reprogramação epigenética da expressão de oncogenes, citocinas e genes supressores, promovendo a progressão de doenças crônicas inflamatórias e carcinogênese (GUINA, T. *et al*, 2015). Dessa forma, os efeitos positivos do uso de polifenóis estão relacionados ao seu poder de modular essa expressão de forma a ativar ou silenciar genes (YANG, P.; HE, X.; MALHOTRA, A. 2014). Além disso, diversos polifenóis foram relacionados a modulação do fator nuclear kappa B (NF- κ B) e de proteínas pela ação de histonas desacetilases (HADACs) e histonas acetiltransferases (HATs), envolvidas na remodelação de cromatina, além de DNA metil transferases (DNMTs), relacionada à metilação do DNA (SHANKAR, S. *et al.*, 2014).

Estratégias utilizadas para o estudo dos efeitos de polifenóis em células-tronco cancerígenas sugerem que esses compostos podem atuar reduzindo a renovação celular, interferindo em seu metabolismo, aumentando a ativação de vias pró-inflamatórias e neutralizando o ambiente ácido favorável ao desenvolvimento do câncer, consequentemente, reduzindo também a evolução da doença. Além disso, um dos principais alvos dos polifenóis na terapia do câncer é a alteração do status redox, que pode induzir a citotoxicidade ou a redução do metabolismo celular, respectivamente com a alta ou baixa concentração de EROs (MILEO, A.M. E MICCADEI, S., 2016).

Dietas ricas em frutas e vegetais podem auxiliar na prevenção, reduzindo o risco de câncer no trato gastrointestinal, de acordo com diversos estudos que mostram iniciativas como “cinco ao dia” (que recomenda a ingestão de cinco porções de frutas durante um dia) entre outras (LA VECCHIA, 2004). A alta ingestão de nutrientes como a vitamina D, cálcio e antioxidantes está associada à redução do risco relativo para o desenvolvimento de câncer colorretal quando comparados a baixa ingestão desses nutrientes (LA VECCHIA *et al.*, 1997). Compostos bioativos podem ser encontrados em uma grande variedade de plantas e são estudados por seus efeitos antitumorais, como revisado anteriormente em um estudo com polifenóis naturais encontrados em plantas como soja, chá verde, café, tomate, cúrcuma e outros (MILEO, A.M.; MICCADEI, S., 2016).

Devido à importância dos compostos bioativos, em especial os polifenóis, em diversas vias metabólicas, este trabalho buscou investigar a resposta de células eucarióticas de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e células de adenocarcinoma do cólon (Caco-2) quando expostas ao extrato aquoso da casca do tucum, rico em diversos desses compostos. Consequentemente, os experimentos propostos visaram responder se o extrato do tucum é seguro e não causa toxicidade para uso nesses modelos, bem como se as concentrações propostas foram eficazes em promover a resposta antioxidante nas células Caco-2.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Obtenção do Tucum-do-cerrado e do extrato aquoso

Os frutos do tucum-do-cerrado foram obtidos na Fazenda Grama, em Teresópolis de Goiás – GO (16°28'115.4" S e 49°03'144.1" W). Foram colhidos no dia 10 de março de 2018 às 10 horas, na época de colheita e maduros. Após a colheita, os frutos foram soltos dos cachos, lavados em água corrente e em água destilada, foram secos ao ar livre e armazenados em freezer -80 °C. Para a obtenção do extrato aquoso, a casca foi retirada manualmente, macerada, separada em tubos de 50 mL e liofilizada. Após a liofilização, foi pesado 1 g da casca e adicionado 10 mL de água destilada. O conteúdo ficou em agitação durante 16 horas e foi filtrado em filtro de 0,22 µm. O extrato aquoso foi armazenado em freezer -20 °C até o uso.

3.2 Linhagens celulares de *Saccharomyces cerevisiae*

Foram utilizadas células de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* de cepas selvagem BY4741 (*MATa his3 leu2 met15 ura3*) e mutante *Yap1Δ* (que não apresenta o gene codificador do fator de transcrição Yap1). As cepas foram cedidas pelo professor Marcos Dias Pereira, do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) em setembro de 2016.

3.3 Cultura e Condições de Crescimento Celular de *Saccharomyces cerevisiae*

As células foram mantidas em meio de Extrato de levedura, peptona e glicose (*Yeast extract, Peptone, Dextrose* – YPD), composto por 1% de extrato de levedura, 2% (p/v) de peptona, 2% (p/v) de glicose e 2% (p/v) ágar a temperatura de 4 °C. Para o crescimento, as células foram inoculadas em meio YPD líquido, incubadas em *shaker* a 28 °C e 200 rpm. A avaliação do crescimento foi realizada através da leitura da densidade óptica (OD) em espectrofotômetro a 600 nm.

3.3.1 Ensaio experimental

As células selvagem e mutante *Yap1Δ* de *S. cerevisiae* foram utilizadas para os ensaios após serem incubadas previamente, durante 18 horas, junto as concentrações do extrato do tucum-do-cerrado (10, 25, 50, 100 e 150 µg/mL), menadiona (5 e 15 µM) (DALVI, 2014) e H₂O₂ (0,5 e 1 mM) (PELÁEZ-SOTO *et al.*, 2017). Dois controles

foram utilizados: sem adição de nenhum composto e com adição de etanol (utilizado para diluir a menadiona). Após os períodos de incubação do tucum-do-cerrado e dos agentes estressores determinados em cada ensaio, as células resultantes foram utilizadas para verificar a viabilidade celular e o crescimento em placa.

3.3.2 Curva de peso seco

Um inóculo de cada cepa de levedura (BY4741 e mutante *Yap1Δ*) foi preparado em 50 mL de meio YPD com 2% (p/v) de glicose em um erlenmeyer de 250 mL. O inóculo foi incubado por 18 horas em *shaker* a 28 °C e 180 rpm. Em seguida, 2 mL do inóculo foram transferidos para tubo de 2 mL previamente pesados. As amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm durante 5 minutos. O sobrenadante foi descartado, os tubos tiveram as tampas perfuradas com alfinetes, as células foram aquecidas a 60 °C em incubador seco com placas para tubos e pesadas a cada hora até atingirem peso estável. Para o cálculo da quantidade de células obtidas em mg/mL, foi utilizada a fórmula peso estável-peso inicial=peso finaldiluição x 1.000. Foram realizadas também, diluições dos inóculos para cada cepa a 20, 25, 50 e 100 e as absorvâncias foram lidas a em espectrofotômetro a 600 nm. Os valores obtidos a partir da leitura das absorvâncias foram utilizados para a composição do gráfico a fim de encontrar o coeficiente angular (f) da equação linear, através da fórmula $f=1/k$, onde o valor de k foi calculado pela equação da reta $y = ax + b$. O valor do coeficiente angular foi utilizado para ajuste da quantidade de células a serem utilizadas nos ensaios subsequentes.

3.3.3 Curva de crescimento

Um inóculo de cada cepa de levedura (BY4741 e mutante *Yap1Δ*) foi preparado em 10 mL de meio YPD com 2% (p/v) de glicose em tubo Falcon de 50 mL. O inóculo foi incubado durante 18 horas em *shaker* a 28 °C e 160rpm. Após a incubação, a leitura da densidade ótica (OD) foi realizada em espectrofotômetro a 600 nm e, a partir do valor obtido, foi calculada a concentração das células em mg/mL através da fórmula =leitura OD x diluição x f. A concentração celular foi ajustada para 40 µg/mL, correspondente à fase exponencial (MARIANI *et al.*, 2008) através da fórmula $c=m/v$. Após esse cálculo, as células foram transferidas para 1 mL do novo meio YPD (na concentração de 40 µg/mL) e adicionadas das concentrações de etanol 1% (v/v) e das concentrações variadas do extrato aquoso do tucum-do-cerrado (10, 25, 50, 100 e 150 µg/mL), menadiona (5 e 15 µM) e H₂O₂ (0,5 e 1 mM). Em seguida as células foram

homogeneizadas, transferidas para placa de 96 poços em volume de 100 µL por poço e foram levadas para leitura no equipamento EON durante 24 horas. A leitura foi realizada a cada 30 minutos, em espectrofotômetro com absorvância de 600 nm.

3.3.4 Crescimento em placa

Um inóculo de cada cepa de levedura (BY4741 e mutante *Yap1Δ*) foi preparado em 10 mL de meio YPD com 2% (p/v) de glicose em tubo Falcon de 50 mL. Cada inóculo foi incubado durante 18 horas em *shaker* a 28 °C e 160 rpm. Após a incubação, a leitura da densidade ótica (OD) foi realizada em espectrofotômetro a 600 nm e a partir do valor obtido, foi calculada a concentração das células em mg/mL através da fórmula =leitura OD x diluição x f. A concentração celular foi ajustada para 40 µg/mL através da fórmula $c=m/v$. Após esse cálculo, as células foram transferidas para 5 mL do novo meio YPD (na concentração de 40µg/mL) e adicionadas das concentrações separadas e combinadas do extrato aquoso do tucum-do-cerrado (50 e 150 µg/mL), menadiona (5 µM) e H₂O₂ (0,5 mM). Em seguida, as células foram homogeneizadas e novamente incubadas por 24 horas. Após o pré-tratamento, as células foram lavadas com tampão PBS e foram realizadas diluições seriadas de 10⁰, 10⁻¹, 10⁻² e 10⁻³. Após realizadas as diluições, as células foram plaqueadas em meio YPD com 2% (p/v) de glicose e 2% (p/v) de ágar, em volume de 10 µL de cada concentração. Em seguida, as placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 28 °C durante 72 horas. Após a incubação foi feita a contagem das colônias nas placas da diluição de 10⁻³ para as análises estatísticas.

3.3.5 Análise estatística

As análises foram realizadas através de teste comparativo One-way ou Two-way ANOVA. Quando aplicáveis, as diferenças entre os grupos foram analisadas através de pós teste de Bonferroni, com significância de 95% (p<0,05). Todas as análises estatísticas foram feitas no *software GraphPad Prism* versão 6. Os resultados foram expressos em médias ± erro padrão (EP). Para o experimento da curva de peso seco das cepas de levedura (BY4741 e mutante *Yap1Δ*), o gráfico e a equação da reta foram feitos em software Microsoft Excel.

3.4 Linhagens de células epiteliais e fibroblastos intestinais humanos

Foram utilizadas células intestinais CaCo-2 (células epiteliais de adenocarcinoma de cólon ; ATCC®, HTB-37TM, Manassas, USA), organoides do jejuno (obtidos

através de material de ressecção cirúrgica) e fibroblastos, cedidas em colaboração pelo laboratório do Prof. Klass Nico Faber (*Department of Gastroenterology and Hepatology of the University Medical Center Groningen of the University of Groningen, The Netherlands*).

3.4.1 Cultura e condições de crescimento celular

As células CaCo-2 (human epithelial colon adenocarcinoma; ATCC[®], HTB-37TM, Manassas, USA) e as células primárias de fibroblastos intestinais foram mantidas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, ThermoFisher Scientific Inc) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FCS; Invitrogen), 1% de coquetel de antibióticos (penicillin (10 U/mL), sulfato de streptomicina (100µg/ mL) (Lonza, Bazel, Switzerland) e 1% de aminoácidos não essenciais (NEAA, Gibco). O crescimento celular foi realizado a 37°C e 5% CO₂.

Os organoides do jejuno foram obtidos através das ressecções cirúrgicas realizadas no *Medical Center Groningen of the University of Groningen* e mantidas em matrigel[®] (Life science 354262) e meio hGF (meio DMEM/F12, Glutamax 1%, HEPES 1M, PSF 1%, Gentamycin 50 µg/mL). As células de organoides foram cultivadas em meio de expansão, que consiste em hGF adicionado de meio condicionado com Wnt3 1:1, Rspo-1 100 ng/mL (R&D Systems, Mineápolis, Minnesota, EUA, 4645-RS), 100 ng/mL Noggin (R&D Systems 6057-ng-100), 1x B27 (Invitrogen 17504-044), 1.25 mM NAC (Sigma-Aldrich, San Luis, Missouri, EUA, A9165), 50 ng/mL EGF (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA, PMG8041), 10 mM nicotinamida (Sigma N0636-100g), 10 µM SB202190 (Sigma S7067-5 mg), 10 µM Y-27632 (Sigma Y0503), 0.5 µM A83 (Tocris Bioscience, Bristol, Reino Unido, 2939). O meio de diferenciação foi o mesmo do meio de expansão, retirando nt3, nicotinamida, SB202190 e Y-26632.

3.4.2 Ensaio experimental

As células foram utilizadas após crescimento prévio durante 18 horas. Para as condições estudadas, o meio utilizado foi substituído após o crescimento por meio sem soro fetal bovino. As concentrações utilizadas do extrato do tucum-do-cerrado foram de 0,5 e 1mg/mL. O controle foi realizado apenas com a adição de meio de cultura DMEM sem soro fetal bovino e sem extrato do tucum-do-cerrado.

3.4.3 Ensaio de viabilidade celular

Para avaliar a viabilidade celular, o ensaio WST-1 foi realizado. Células viáveis clivam o sal de tetrazólio em formazam, dessa forma, a quantidade de formazam resultante é diretamente relacionada ao número de células viáveis em cultura.

As células foram plaqueadas a 5×10^5 células/poço em placa de 12 poços após atingirem confluência de 80% em cultura celular prévia. Após 24h de incubação, as células foram expostas a diferentes concentrações do extrato aquoso do tucum-do-cerrado (0,5 e 1mg/mL) e incubadas por mais 24h. Concentrações mais baixas (100 e 200 $\mu\text{g/mL}$) foram testadas em meio DMEM com soro fetal bovino. O reagente WST-1 (Roche, Basel, Switzerland, 11644807001) foi utilizado na diluição de 1:10 em tampão HBSS e as células foram incubadas por 45 minutos. Para a leitura, cada condição foi plaqueada em triplicata em placa de 96 poços e a leitura foi realizada a 450 nm no leitor de microplacas Epoch2 (Biotek Instruments).

O resultado encontrado no ensaio de viabilidade celular foi utilizado para o cálculo do IC_{50} , feito através do software GraphPad Prism versão 6.

3.4.4 Produção de Espécies Reativas de Oxigênio mitocondrial

O ensaio MitoSOX foi realizado para avaliar a geração mitocondrial de EROs. O reagente MitoSOX red é oxidado pelo radical superóxido quando dentro da mitocôndria, indicando aumento do estresse oxidativo celular.

Após atingirem confluência de 80%, as células Caco-2 e os fibroblastos foram plaqueadas em quintuplicatas na quantidade de 100 μl por poço em placa de 96 poços. A placa foi incubada durante 24h e, em seguida, a exposição ao extrato aquoso do tucum-do-cerrado foi realizada durante 24h na concentração de 0,5 e 1 mg/mL. O reagente MitoSOX red (Roche) foi diluído em 13 μl de DMSO e 3 μl da solução final foram acrescentados a 2 mL de meio DMEM. O reagente foi adicionado na quantidade de 100 μl por poço e a placa foi incubada durante 30 min. A leitura foi realizada a 510 nm a cada 10 min durante 2h em leitor de microplaca Synergy H4 Hybrid Reader (Biotek Instruments).

3.4.5 Expressão gênica e Isolamento de RNA

A análise por meio de RT-qPCR foi realizada a fim de quantificar o mRNA de diversas proteínas e fatores de transcrição envolvidos na resposta antioxidante.

As células Caco-2 foram plaqueadas a 5×10^5 células/poço em meio DMEM com soro fetal bovino. Após atingirem 80% de confluência, as células tiveram o meio trocado por

novo meio sem soro fetal bovino e adicionado do extrato aquoso do tucum-do-cerrado nas concentrações de 0,5 e 1 mg/mL, que foram levados para a incubadora a 37°C e 5% de CO₂ durante 24 horas.

Para isolar o RNA total, as células foram lavadas 2x com tampão HBSS (Gibco®) e adicionadas de 500 µl do reagente TRIzol (Sigma-Aldrich) em cada poço. As células foram desprendidas da placa com *scrappers* e transferidas para tubos de 1,5 mL. Em seguida, 100 µl de clorofórmio foram adicionados em cada tubo e vortexado por 10 segundos. O tubo foi incubado em temperatura ambiente por 5 min e, em seguida, centrifugado a 12.000g durante 15 min a 4°C. Após essa etapa, a fase aquosa de cada amostra foi transferida para novo tubo de 1,5 mL e 250 µl de álcool isopropil foi adicionado a cada tubo. As amostras foram agitadas manualmente de forma branda e foram novamente incubadas em temperatura ambiente por 10 min. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas a 12.000g durante 10 min a 4°C. Em seguida, o sobrenadante foi retirado e 500 µl de álcool 75% foi adicionado a cada amostra e os tubos foram vortexados por 5 seg. As amostras foram centrifugadas a 7.500g durante 5 min a 4°C, o sobrenadante retirado e a centrifugação foi repetida nos mesmos parâmetros. O sobrenadante foi retirado com pipeta, o *pelet* foi deixado para secar em temperatura ambiente durante 10 min e dissolvido em 20 µl de água RNase free. As amostras foram incubadas por 5 min a 65°C. O RNA foi quantificado no software NanoDrop 2000 espectofotômetro (Thermo-Scientific).

A síntese do DNA complementar (cDNA) foi realizado com RNase mix com tampão RT (500 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, 30 mM MgCl₂, 50 mM DTT), 10% de dNTP mix (10 mM dATP, dGTP, dTTP, Sigma-Aldrich), 2% de random primers (0,5 µg/µl, Sigma-Aldrich), 1,5% RNase OUT and 2% M-MLV RT (respectivamente, 40 U/µl e 200 U/µl; Invitrogen), somando um volume final de 50 µl. A reação de síntese do cDNA foi incubada durante 10 min a 25°C, seguido por 60 min a 37°C e 5 min a 95°C, no ciclador termal Bio-Rad T100.

Para a análise de expressão gênica, foi feito o mix com cDNA 20%, probe 4%, sense 1,8%, antisense 1,8%, tampão RT x2 50%, água RNase free 22,4%, somando 20 µl de volume final para cada gene alvo de interesse. Os níveis de expressão gênica da superóxido dismutase (Cu/Zn) (SOD1), superóxido dismutase (Mn) (SOD2), catalase (CAT), glutathiona peroxidase (GPx), *Nuclear factor E2-related* (Nrf2), *Hypoxia-inducibile factor 1-alpha* (HIF1A), Óxido nítrico sintase 2 (NOS2) e 18S RNA ribossomal foram analisados através de PCR (RT-qPCR) (Thermo-Scientific). O valor

limite do ciclo (*Ct – cycle threshold*) foi calculado utilizando o software QuantStudio. Para o mix de corrida do qPCR, a amostra utilizada foi de 0.4 µl cDNA, 0.8 µl probe, 0.86 µl sense primer, 0.36 µl anti-sense primer, 10 µl x2 tampão RT and 4.48 µl de água em cada poço. A sequência de *primers 5'-3'* utilizados estão descritas na **tabela abaixo**. Para a quantificação da expressão de mRNA foi realizado o método comparativo de *Ct*, utilizando a eficiência de amplificação para cada gene. Todos os resultados foram normalizados utilizando o gene 18S como gene constitutivo.

Tabela 3: Sequências dos oligonucleotídeos utilizados para a reação de qPCR.

Gene name	Gene	Amplicon size		Oligonucleotides sequence (5'-3')
18S ribosomal RNA	18S	110	F	<i>CGGCTACCACATCCAAGGA</i>
			R	<i>CCAATTACAGGGCCTCGAA</i>
Superoxide Dismutase [Cu/Zn]	SOD1	82	F	<i>CCGTACAATGGTGGTCCATGA</i>
			R	<i>CCCAGCATTTCAGTCTTTGTACT</i>
Superoxide Dismutase [Mn]	SOD2	79	F	<i>CACCGAGGAGAAGTACCACGA</i>
			R	<i>GAACTTCAGTGCAGGCTGAAG</i>
Catalase	CAT	77	F	<i>CCCGCATCCAGGCTCTT</i>
			R	<i>GCCGGCCTGCGTGTAG</i>
Glutathione Peroxidase	GPX1	537	F	<i>CAGCAGGGTTTCTATGTCAGGTT</i>
			R	<i>CCCGTGCGAGGTACAG</i>
Nuclear Factor Erythroid Related Factor 2	NRF2 2-	115	F	<i>AGCCCAGCACATCCAGACA</i>
			R	<i>TGTCTCTGCCAAAAGCTGCAT</i>
Nitric Oxide Synthase 2	NOS2	78	F	<i>GGC TCA AAT CTC GGC AGA ATC</i>
			R	<i>GGC CAT CCT CAC AGG AGA GTT</i>
Hypoxia-inducible factor 1-alpha	HIF1A	82	F	<i>TGAACATAAAGTCTGCAACTGGA</i>
			R	<i>TGAGGTTGGTTACTGTTGGTATCATATA</i>

Temperatura de anelamento para os primers foi de 60°C.

3.4.6 Quantificação de Proteínas

As células Caco-2 foram lavadas 2x com tampão HBSS e 200 µl de tampão de lise (25 mM HEPES, 150 mM KAc, 2 mM EDTA pH 8.0, 0.1% NP-40), contendo inibidor de protease (10 mM NaF, 50 mM PMSF, 1 µg/µl a-protinina, 1 µg/µl pepstatina, 1 µg/µl leupeptina, 1 mM DTT; em diluição de 1:25) foi adicionado às amostras. As células lisadas foram retiradas utilizando *scraper* e transferidas para tubos de 1,5mL. A quantificação de proteínas foi realizada através do ensaio de BCA (Biorad). Eletroforese foi realizada utilizando 40 µg da proteína total. As proteínas foram eletrotransferidas para as membranas de nitrocelulose. Após as transferências, as membranas foram coradas com corante S-Ponceau para confirmar que houve a transferência correta. Em seguida, as membranas foram lavadas com PBS e bloqueadas com 0.5% BSA in 0.1% PBS Tween (PBS Gibco, 10019-015; Tween 20 Gibco, P2281) durante 1h. As amostras foram incubadas *overnight* a 4°C com anticorpos policlonal de coelho para MnSOD, pNRF2 ou β-actina, ou anticorpo policlonal de rato para catalase. Todos os anticorpos (Sigma-Aldrich) foram utilizadas na diluição a 1:1.000. As membranas foram lavadas com 0.1% PBS tween e incubados com anticorpo secundário IgG de coelho ou cabra em diluição sw 1:2.000 (Sigma-Aldrich) durante 1h e lavados e seguida com PBS 1x. Para detecção da leitura de proteína foram utilizados *Enhanced chemiluminescence* (ECL), kit de detecção avançada de western blot e ECL hiperfilme (GE Healthcare, Madison, WI). Os sinais foram visualizados em ChemiDoc Resolutions System (Biorad) e as bandas foram quantificadas no software Image Pro Plus v 7.01 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA).

3.4.7 Expressão proteica por Imunofluorescência

Para avaliar a expressão de MnSOD, foi realizado o ensaio de imunofluorescência. Células Caco-2 foram plaqueadas a 5×10^5 células/poço com coverslips e após atingirem 80% de confluência, foram expostas ao extrato aquoso do tucum-do-cerrado (0,5 e 1mg/mL) durante 24h. Após exposição, as células foram lavadas duas vezes com 500 µl PBSx1 e fixadas com paraformaldeído 4% durante 10 minutos. As células foram novamente lavadas duas vezes com PBSx1 e 500µl de tampão permeabilizante (Triton 0,01% em PBS) foi adicionado por 30 minutos em estufa a 37°C. As coverslips foram lavadas duas vezes com PBSx1 e tampão de

bloqueio (BSA 2% em PBS) foi adicionado por 30 minutos. Após o bloqueio, anticorpo policlonal para imunoglobulina G contra Mn SOD na concentração de 1:400 foi adicionado por 1 hora. As células foram lavadas com tampão de bloqueio (BSA 2% em PBS) e a probe com anticorpo conjugado anti-rabbit (Alexa Fluor™ 488) na concentração de 1:500 foi adicionado por 30 minutos. As placas para leitura foram compostas utilizando o reagente Vectashield com DAPI (corante nuclear) (Vector Laboratories, CA, USA) e as imagens foram realizadas utilizando microscópio eletrônico (Leica DMI6000B) com fluorescência no aumento de 25µm e software Leica Application Suite Advanced Fluorescence 3,1,0 build 8587.

3.4.8 Análise estatística

Os resultados foram expressos em média \pm SEM. As amostras foram comparadas utilizando análise de variância one-way (ANOVA) e o pós-teste utilizado foi de Bonferroni. Para significância estatística, foi utilizado o valor de $p < 0,05$.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Avaliar a resposta celular e antioxidante em células eucarióticas após exposição ao extrato aquoso da casca do fruto do tucum-do-cerrado (*Bactris setosa* Mart.).

4.2 Objetivos Específicos

1. Avaliar o crescimento celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, cepa selvagem e cepa Yap1 Δ , na presença de diversas concentrações do extrato aquoso do tucum-do-cerrado, após estresse induzido por peróxido de hidrogênio (H₂O₂) ou menadiona;
2. Avaliar a viabilidade celular de células de adenocarcinoma do cólon (Caco-2), organoides do jejuno e fibroblastos intestinais após exposição ao extrato aquoso do tucum-do-cerrado;
3. Quantificar a produção de Espécies Reativas de Oxigênio em células de adenocarcinoma do cólon (Caco-2) e fibroblastos intestinais após exposição ao extrato aquoso do tucum-do-cerrado;
4. Quantificar o mRNA de enzimas antioxidantes SOD, CAT e GPx, dos fatores de transcrição Nrf2 e HIF-1 α e a expressão proteica de MnSOD, Catalase e Nrf2 em células de adenocarcinoma do cólon (Caco-2) após exposição ao extrato aquoso do tucum-do-cerrado;

5. RESULTADOS

Artigo 1: *Bactris setosa* Mart. (Tucum-do-cerrado) aqueous extract increases growth and viability in *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 and Yap1 Δ under stress caused by menadione and hydrogen peroxide.

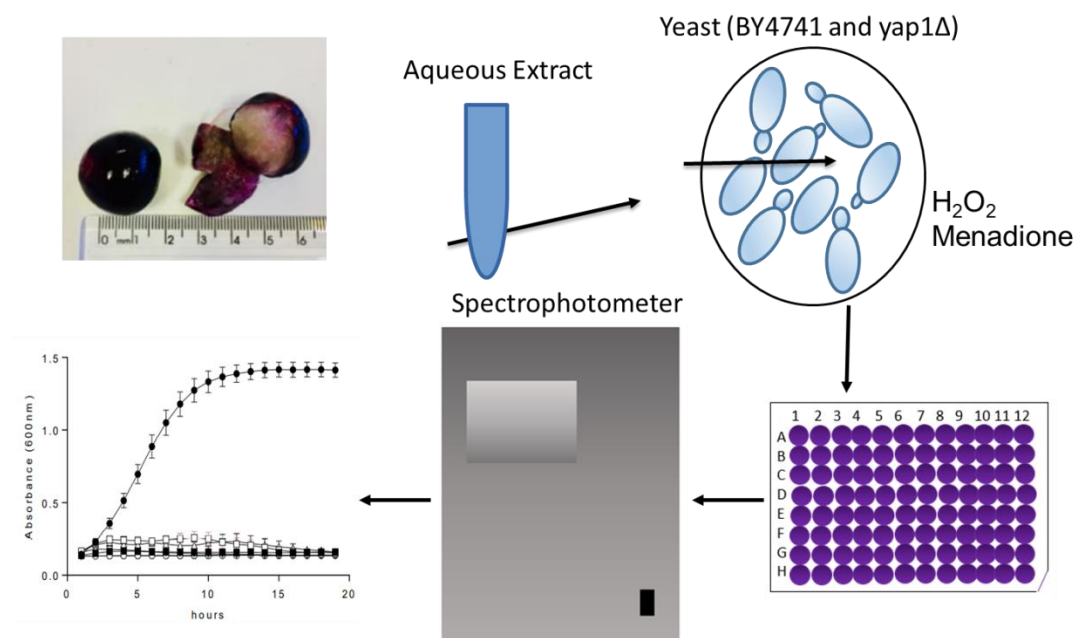
Bactris setosa* Mart. (Tucum-do-cerrado) protection against oxidants correlates with the presence of Yap1 transcription factor in *Saccharomyces cerevisiae

Renata Cristina da Silva¹, Élide Geralda Campos¹.

*1*Programa de Pós-Graduação em Nutrição Humana, Laboratório de Biologia Molecular, Departamento de Biologia Celular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brazil.

Corresponding author: Renata Cristina da Silva. E-mail: nutrsilva@gmail.com +55 61 981900735 Depto. de Biologia Celular, Universidade de Brasília. Brasília - DF - CEP 70910-900.

GRAPHICAL ABSTRACT



ABSTRACT

'Tucum-do-cerrado' (*Bactris setosa* Mart.) is a Brazilian fruit rich in polyphenols and other bioactive compounds that are mainly found in the peel. This fruit have properties that could be beneficial for human health, but studies on it are scarce. The yeast *Saccharomyces cerevisiae* can be used to investigate the antioxidant potential of plant extracts. The antioxidant action of different compounds can be achieved through induction of genes that encode antioxidant enzymes. Yap1 is an yeast transcription factor that activates antioxidant genes. This study, therefore, investigated cell growth and viability of *S. cerevisiae* BY4741 wild type and Yap1 Δ mutant strains stressed with hydrogen peroxide (H₂O₂) or menadione and exposed to 'tucum' peel aqueous extract and Yeast cells were exposed for 20 h to different concentrations of 'tucum' extract, menadione and H₂O₂, separately or in combination, and cell growth was measured at 600 nm. To investigate colony survival, yeast cells were exposed to these compounds for 72 h in agar plates. The results showed that growth remained unchanged in cells (BY4741 and Yap1 Δ) exposed to 10-50 μ g/mL of tucum extract, but was delayed when 100 μ g/mL and 150 μ g/mL were tested. When cells were treated with H₂O₂ or menadione in the presence of 10-150 μ g of tucum extract, only BY4741 resume cell growth, but not yap1 Δ cells. The results on colony survival, however, showed that cell viability was restored in both, BY4741 and Yap1 Δ cells, treated with menadione and tucum extract, while viability was restored only in BY4741 cells treated with H₂O₂ and tucum extract. These results indicate that the protective effect of tucum extract in yeast cells treated with H₂O₂ correlates with the presence of Yap1 transcription factor. These findings open the possibility for further investigation on the nature of such correlation.

Keywords: yeast, tucum-do-cerrado, antioxidant, growth.

1. INTRODUCTION

Tucum-do-cerrado (*Bactris setosa* Mart.), or simply ‘tucum’ is a Brazilian fruit that is consumed fresh or in the form of juice, ice cream, jelly and wine (Silva *et al.* 2001). Its popular names are: ‘tucum-do-cerrado’, ‘tucum-do-brejo’, ‘jacum’, ‘tucum-piranga’ (Schulz *et al.* 2020). The fruit is dark purplish, round, with a thick fibrous peel and a whitish pulp, and it has an approximate diameter of 1-2 cm. ‘Tucum’ has a high antioxidant activity evaluated by the ferric reducing antioxidant power (FRAP assay) when compared to Red Delicious apple, and most of the antioxidant activity is found in the peel (Siqueira *et al.* 2013). In animals, the antioxidant activity of polyphenols can be due to metal chelating and scavenger activities, but it can also involve the regulation of transcription factors, such as the nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2). Nrf2 controls the expression of around 250 genes, including genes of the antioxidant defense system, such NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1), catalase, superoxide dismutase, and glutathione peroxidase (Kobayashi and Yamamoto 2006; Jaiswal 2004). Nrf2 also controls antioxidant-related genes such as those involved in glutathione synthesis, phase II detoxification or “stress-response” genes, genes involved in limiting the inflammatory process and pulmonary fibrosis, and genes conferring protection against ischemia/reperfusion injury (Kobayashi and Yamamoto 2006; Hybertson *et al.* 2011). Several polyphenols have been shown to be activators of the Keap1-Nrf2 signaling pathway, such as resveratrol, caffeic acid and epigallocatechin-galate (Xhou *et al.* 2019). An increase in Nrf2 and two of its target genes, heme oxygenase 1 (HMOX1) and NQO1, mRNA levels was observed in the liver of rats that consumed ‘tucum’ in their diet, suggesting that ‘tucum’ compounds may induce gene expression via Nrf2 up-regulation (Heibel *et al.* 2018).

Saccharomyces cerevisiae can be used to study antioxidant properties of plant compounds and the characteristics of several dietary constituents have been studied using this organism (Wu *et al.* 2011; Meng *et al.* 2017). The advantages of its use include high similarity to cells of multicellular organisms at the biochemical level, the easy by which it can be grown in the laboratory and the existence of numerous mutant strains. Yeast cells have both, enzymatic and non-enzymatic antioxidant systems to counteract the toxic effects of reactive oxygen species (ROS) (Auesukaree 2017). Its main antioxidant enzymes are superoxide dismutase (SOD), catalase and peroxidases, including glutathione peroxidase (GPx). The non-enzymatic defense system includes

scavenger molecules such as glutathione (Stephen and Jamieson 1996).

A key mechanism used by yeast against oxidative stress is regulation of the endogenous antioxidant system by transcription factors. Hydrogen peroxide modulates transcription by different mechanisms, including control of the activity of transcription factors. In yeast, there are five transcription factors that are activated by reactive oxygen species (ROS): Yap1, Skn7, Maf1, Hsf1 and Msn2/4. Yap1 (*Yeast Activator Protein 1*) is regulated by H₂O₂ at the level of its transport between the nucleus and the cytoplasm. In the presence of H₂O₂, GPx3 (glutathione peroxidase 3), forms a disulfide bond between its Cys36 and Yap1 Cys598 that resolves in an intramolecular disulfide bond between Yap1 Cys598-Cys303 inhibiting nuclear export (Picazo and Molin 2021). A decrease in cellular growth can be used by yeast as a physiological response to prevent oxidative stress caused by H₂O₂ and menadione (Wu *et al.* 2011). Menadione increases H₂O₂ production and it is responsible for the generation and accumulation of ROS, which affect the viability of yeast cells (Hassan 2013; Kim *et al.* 2011).

‘Tucum’ has several compounds that can be beneficial to human health, however, further studies are needed to better understand its effects on cells and organisms. The aim of this study was, therefore, to evaluate cell growth and viability using a *S. cerevisiae* strain that is unable to express Yap1 and the correspondent wild type strain exposed to oxidants and ‘tucum’ peel aqueous extract.

2. RESULTS AND DISCUSSION

In order to compare the growth of yeast strains we calculated the factor (f) for converting absorbance into dry weight and found it to be 0.5 for BY4741 and Yap1Δ. This factor was used to guarantee that the amount of cells in each experiment was similar. Both yeast strains were exposed to menadione and H₂O₂ in two different concentrations (Figure 1). BY4741 strain growth was reduced in a dose dependent manner when in the presence of menadione (5 μM and 15 μM) or H₂O₂ (0.5 mM and 1 mM), while growth of Yap1Δ was completely abolished when the cells were exposed to these agents at the same concentrations. Growth of both strains in the presence of ethanol (1% v/v) was similar to growth of control samples in the presence of YPD medium alone. These results were used to select concentrations to further analysis.

The yeast cells were then exposed to ‘tucum’ extract alone (Figure 2). Growth of BY4741 and Yap1Δ was not significantly affected when cells were exposed to different concentrations of ‘tucum’ extract (10, 25 and 50 μg/mL). Upon exposure to higher

extract concentrations (100 and 150 µg/mL), however, a delay in cell growth was observed for both yeast strains. These results indicate that ‘tucum’ is not toxic to the yeast strains when at low concentrations (10-50 µg/mL). The concentrations of 50 µg/mL and 150 µg/mL were selected for further experiments.

Yeast cells were exposed to menadione or H₂O₂ in the absence and in the presence of ‘tucum’ extract (Figure 3) and growth was followed at 600 nm. In the case of BY4741, ‘tucum’ extract rescued the cells from the suppressing effects of menadione and H₂O₂ on cell growth. As for Yap1Δ, ‘tucum’ extract showed no such effect.

The previous experiments were conducted using colony counting to investigate the effect of ‘tucum’ extract on yeast cells viability and protection against oxidative stress (Figure 4). ‘Tucum’ extract (50 µg/mL and 150 µg/mL) reduced Yap1Δ cell viability by approximately 75% and 50%, respectively, while it showed no effect on BY4741 cell viability (Figure 4A). ‘Tucum’ extract reversed the negative effect of menadione and H₂O₂ on BY4741 viability, while it partially reversed the effect of menadione on Yap1Δ viability (Figure 4B). In addition, ‘tucum’ extract did not reverse the effect of H₂O₂ on Yap1Δ cell viability.

In this study we wanted to investigate if ‘tucum’ aqueous extract could have an effect beyond antioxidation in *S. cerevisiae* subject to oxidative stress by exposure to menadione and H₂O₂. For this we used a wild-type yeast strain (BY4741) and a mutant strain (Yap1Δ) that lacks the transcription factor Yap1. The main finding was that the protection afforded by the extract against oxidative stress correlated with the presence of Yap1. This result, therefore, indicate that the compounds present in the ‘tucum’ aqueous extract play a role in the Yap1 signaling pathway in *S. cerevisiae*.

Saccharomyces cerevisiae cells were treated with different compounds, including ethanol, the vehicle used to dissolve menadione. This was done because ethanol can reduce yeast cell viability when in high concentrations (Weber and Bont 1996). Yeast cells BY4741 and Yap1Δ, in the presence of ethanol, grew in a similar way as cells in the presence of YPD medium only. Therefore, we can exclude any ethanol effect in yeasts treated with menadione.

Previous studies showed that wild type BY4741 *S. cerevisiae* have their growth reduced with 1 to 4 mM H₂O₂ and 150 µM to 750 µM menadione (Wu *et al.* 2011; Peláez-Soto *et al.* 2017). Hydrogen peroxide can reduce BY4741 yeast colony formation as well, at 2.5 mM concentration (Dani *et al.* 2008). We found that 0.5 mM H₂O₂ and 15 µM menadione caused a significant reduction in cell grown in both wild-

type (BY4741) and mutant (Yap1 Δ) *S. cerevisiae*. In our experiments the BY4741 strain, therefore, was sensitive to lower concentrations of H₂O₂ compared to the concentrations investigated by other authors (Wu *et al.* 2011; Dani *et al.* 2008; Peláez-Soto *et al.* 2017). The observed increased deleterious effects of the oxidants, H₂O₂ and menadione, on Yap1 Δ , when compared with its wild-type counterpart (BY4741), demonstrates the important role of this transcription factor for antioxidant protection.

Secondary plant metabolism compounds have been extensively investigated for their antioxidant potential. Curcumin, when used at the concentrations of 50 and 150 $\mu\text{g/mL}$, delays *S. cerevisiae* cell growth, without reducing cell density, after 20 hours of exposure (Minear *et al.* 2011). Pomegranate juice (100 $\mu\text{l/mL}$) increases yeast cell density after 72 hours, but also delay the cell cycle (Aslan *et al.* 2014). According to our findings, concentrations of 100 $\mu\text{g/mL}$ and 150 $\mu\text{g/mL}$ of ‘tucum’ extract had similar effects on BY4741 and Yap1 Δ yeast strains, indicating that some ‘tucum’ compounds may delay cell growth progression without causing cell death. A propolis alcoholic extract was shown to be nontoxic to wild type *S. cerevisiae* at the concentrations of 50 $\mu\text{g/mL}$ and 100 $\mu\text{g/mL}$ which is similar to the concentrations we used in our study. Such concentrations were toxic to the mutant Yap1 Δ strain while had no effect on the wild type yeast strain (de Sá *et al.* 2013).

Some foods rich in polyphenols have been shown to maintain normal cell growth when cells are stressed with H₂O₂ or menadione (Peláez-Soto *et al.* 2017; Minear *et al.* 2011; Aslan *et al.* 2014). In the same experimental condition, ‘tucum’ extract was effective on improving cell growth of wild-type *S. cerevisiae* in concentrations such as 10, 25 and 50 $\mu\text{g/mL}$. The higher concentrations (100 and 150 $\mu\text{g/mL}$) also improved cell growth but delayed cell growth progression and maintained cell density slightly lower than control group. Moreover, ‘tucum’ extract was not able to increase cell growth on mutant stressed yeast cells, suggesting that Yap1 gene expression may be involved in protection mechanism on this strain.

In the liquid medium experiments, ‘tucum’ extract showed no protection from the action of both, H₂O₂ and menadione in the mutant yeast strain, but restored growth to the level in the absence of the oxidants in the wild type strain. Regarding the results in solid medium, the ‘tucum’ extract showed partial protection from the action of menadione in the mutant and in the wild type strain. Protection against H₂O₂ was non-existent in the mutant and partial in the wild type strains. This indicates that ‘tucum’

protection against H₂O₂ correlates with the presence of Yap1, but not in the case of protection against menadione.

Saccharomyces cerevisiae shows different responses to stress caused by menadione and H₂O₂ (Jamieson 1992; Cuinica 2019). The antioxidant response of these cells is adapted to react to different levels of H₂O₂ by activating expression of genes coding for antioxidant enzymes such as two superoxide dismutases (SOD), a cytosolic Cu-Zn SOD (Sod1) and a mitochondrial manganese SOD (Sod2), as well as cytosolic 2Cys-peroxiredoxins, TSA1 and AHP1, that are targeted by Yap1 (Rodrigues-Pousada *et al.* 2010; Lushchak 2011). Menadione can increase superoxide and H₂O₂ concentrations (Hassan 2013) in the mutant strain, therefore the protection afforded by ‘tucum’ extract in menadione stressed cells, is probably partially through an Yap1 independent pathway.

The aqueous extract of the ‘tucum’ peel has been shown to contain the polyphenols gallic acid, caffeic acid, and cyanidin, catechin and rutin derivatives (Rosa *et al.* 2016). Another study showed the isolation of two catechins, a cyanidin, a peonidin, and a quercetin in the tucum peel aqueous extract. One catechin and quercetin showed the highest in vitro antioxidant activity among the isolated compounds (Dantas *et al.* 2022). Compounds similar to those present in ‘tucum’ have been implicated in controlling gene transcription and transcription factor activity in mammalian cells. For example, gallic acid causes a decrease in the mRNA levels of the hepatic genes coding for the enzymes gamma glutamyl transferase and heat shock protein gp96 in rat hepatocellular carcinoma (Aglan *et al.* 2017). Caffeic acid inhibits matrix metalloproteinase 9 gene transcription through suppression of NF-κB activity in human hepatocellular carcinoma cells (Chung *et al.* 2004). The tea catechin epigallocatechin gallate is a known inhibitor of NF-κB activity and can directly bind NF-κB-p65 (Lakshmi *et al.* 2020). Rutin causes an increase in the mRNA levels of hepatic Nrf2 and inducible nitric oxide synthase in mice treated with t-butyl hydroperoxide (Rani and Singh 2015). ‘Tucum’ also showed a role in intestinal carcinoma cells (Caco-2). In these cells the aqueous ‘tucum’ extract reduced cell proliferation and induced oxidative stress, showing a pro-oxidant effect. These effects seem to be specific for Caco-2, but not the normal counterpart cells. In addition ‘Tucum’ exposed Caco-2 cells showed decreased mRNA levels of the main antioxidant enzymes (catalase, Mn and Cu-Zn superoxide dismutase and glutathione peroxidase) and Nrf2 (da Silva *et al.* 2022). In our experiments we found that sensitivity to H₂O₂

toxicity was more pronounced in the Yap1 mutant. This indicates that Yap1 activation by H₂O₂ plays a role in cell survival. We hypothesized that ‘tucum’ extract, therefore, may act by increasing the activation of Yap1 in the wild type cells. This ‘tucum’ effect would be abolished in the absence of Yap 1 in the mutant strain.

3. EXPERIMENTAL

1.1 Extract of tucum-do-cerrado

Fruits were obtained from a local merchant from “Fazenda Grama”, 16°28'115.4” S and 49°03'144.1” W, Teresópolis de Goiás, Goiás, Brazil. They were collected in the harvested season (from January to March) at full maturity. Fruits were washed with distilled water and peel was manually removed and lyophilized. For preparation of the crude aqueous extract, 1g of pulverized peel was mixed with 10 mL of distilled water. The contents were shaken for 16 h at 4°C and filtered through a 0.22 µm filter. The aqueous extract was stored in a -20 °C freezer until use. The mg/mL concentrations described in the results correspond to the mg of pulverized peel in water.

1.2 Yeast strains

Saccharomyces cerevisiae wild type BY4741 (*MATa his3 leu2 met15 ura3*) and mutant Yap1Δ cells were used in this study. Strains were provided by Dr. Marcos Dias Pereira from Chemistry Institute of Federal University of Rio de Janeiro, Brazil.

1.3 Cell culture and growth

S. cerevisiae cells were maintained in YPD medium composed of 1% yeast extract, 2% peptone, 2% dextrose and 2% ágar at 4°C. Yeast cells were grown in YPD liquid medium at 28°C and 200 rpm. Growth was measured by the optical density at 600 nm.

1.4 Yeast dry weight curve

A yeast colony (BY4741 and Yap1Δ) was inoculated in 50 mL of YPD medium. After 18 h incubation at 28°C and 200 rpm, dilutions of 1:20, 1:25, 1:50 and 1:100

were made for each strain and the absorbance at 600 nm was measured. Concomitantly, 2 mL of each dilution was transferred to 2mL tubes previously weighed. Samples were centrifuged at 10.000 rpm for 5 min at room temperature. The supernatant was discarded and the samples were heated at 60°C until they reached a stable weight. The cell concentration (mg/mL) of the sample was calculated using the expression: (stable weight – inicial weight)/2 mL. A graph of Abs600 nm (y axis) versus sample concentration (mg/mL, x axis) was constructed for the diluted samples and a regression line ($y=ax+b$) was obtained. The angular coeficient (a) from the line equation was then used to calculate the fator (f) for conversion of absorbance into dry weight using the formula: $f=1/a$. This fator was used throughout the experiments. To calculate the concentration of any new culture, in mg/mL, the following equation was used: Concentration = Abs600nm x dilution fator x f.

1.5 Growth curve

One colony of each yeast strain (BY4741 and Yap1 Δ) was inoculated in 10 mL YPD medium. After 18 h incubation at 28°C and 200 rpm, the absorbance of the culture at 600 nm was measured, and its concentration in mg/mL was calculated and adjusted to 40 μ g/mL (Mariani *et al.* 2008). Two control samples were prepared, one with yeast cells in YPD medium and another added of 1% (v/v) ethanol. Ethanol was used to dilute menadione and was tested for any effect on cell growth. The aqueous extract of ‘tucum’ was tested at five concentrations (10, 25, 50, 100 and 150 μ g/mL). Menadione was tested at 5 and 15 μ M and hydrogen peroxide (H₂O₂) at 0.5 and 1 mM. These compounds were tested separately or in combination. The cell cultures were distributed in 96 well plates. Growth was measured at 600nm in 30min intervals during 20h using the equipment Synergy HTX Multi-Mode Microplate Reader. Data was collected by using the Gen5 software.

1.6 Cell Viability

One colony of each yeast strain (BY4741 and Yap1 Δ) was inoculated in 10 mL YPD medium. After 18 h incubation at 28°C and 200 rpm, the absorbance of the culture at 600 nm was measured, and its concentration in mg/mL was calculated and adjusted to 40 μ g/mL (Mariani *et al.* 2008). The aqueous extract of ‘tucum’ was tested at 50 and

150 µg/mL), menadione at 5µM and H₂O₂ at 0.5mM. The samples were incubated for 24h at 28°C and 200 rpm and after the incubation the cells were washed with PBS buffer 1X, diluted in YPD medium at 100, 10⁻¹, 10⁻² e 10⁻³ and 10µl of the cultures were plated in solid YPD medium. Plates were incubated for 72h at 28°C. After this time the colonies were counted and 10⁻³ dilution was used for data collection.

1.7 Statistical Analysis

The results are expressed as mean ± SEM. Samples were compared using one-way analysis of variance (ANOVA) and the post hoc test of Bonferroni. For statistics significance, P-value < 0.05 was used. Analysis were made by using the software GraphPad Prism v6.

4. CONCLUSION

In conclusion, the present study demonstrates that the protective action of the ‘tucum’ aqueous extract against the stress caused by H₂O₂ correlates with the presence of Yap1. These results are in agreement with those obtained with mice that ingested ‘tucum’ and that showed activation of liver Nrf2 target genes. Although the importance of the ‘tucum’ fruits has been established by its high antioxidant content in relation to other fruits from the Brazilian savannah, the mechanism of action of the ‘tucum’ extract needs further investigations. Thus, studies on the involvement of transcription factors in the mechanism of action of ‘tucum’ extract may unravel specific components of the extract that affect their activities. The use of different yeast mutants may be suitable for such studies.

5. ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Professor Marcos Dias Pereira for Yap1Δ yeast strain.

6. CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

The authors certify that they have NO affiliations with or involvement in any organization or entity with any financial or non-financial interest in the subject matter or materials described in this manuscript.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

7. FIGURES

Figure 1

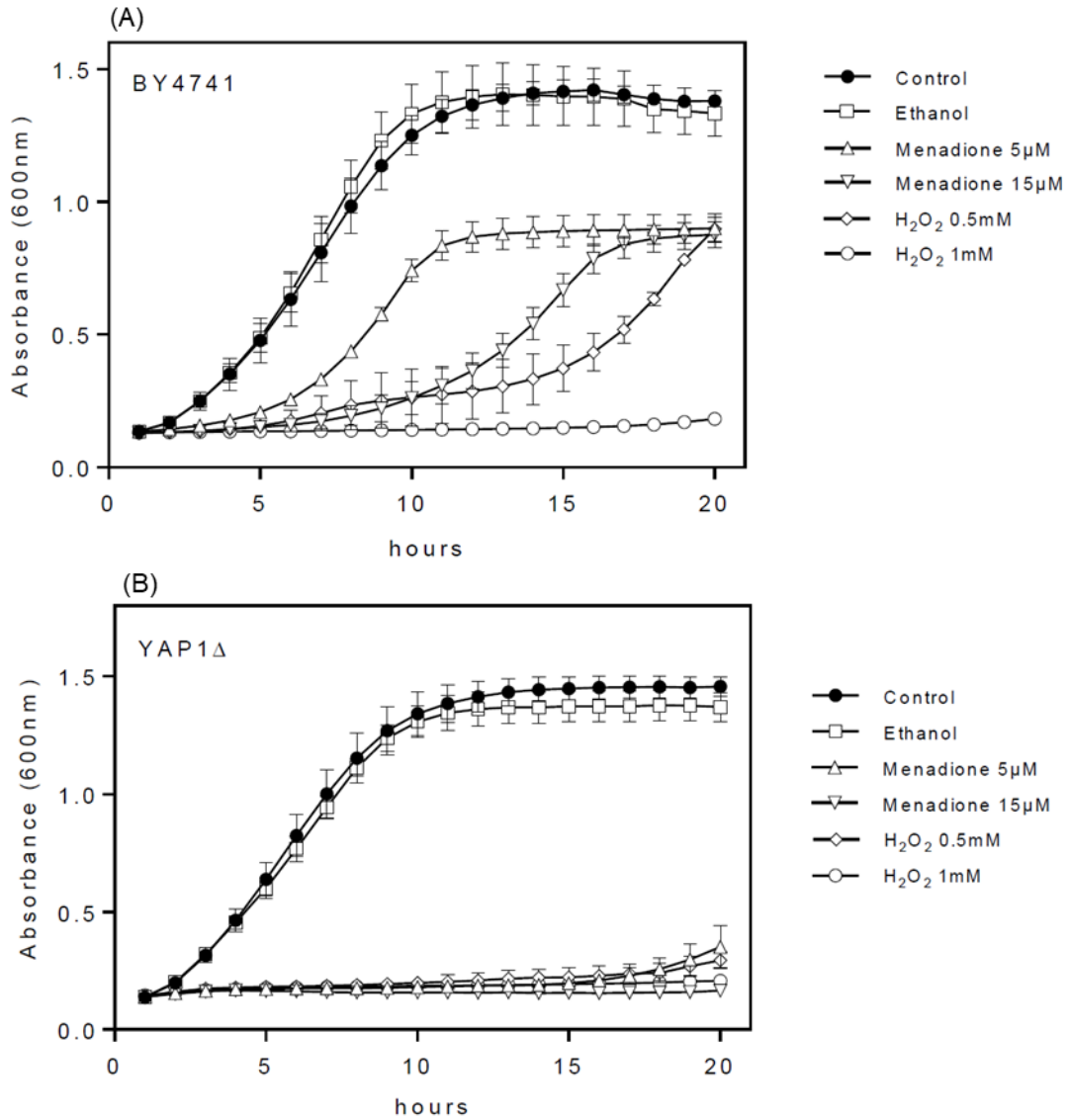


Figure 1 – Growth curves of *S. cerevisiae* strains BY4741 (A) and Yap1Δ (B) exposed to ethanol 1%, menadione (5μM and 15μM) and H₂O₂ (0.5mM and 1mM). Error bars indicate the standard error of the mean (n=3) of three different experiments.

Figure 2

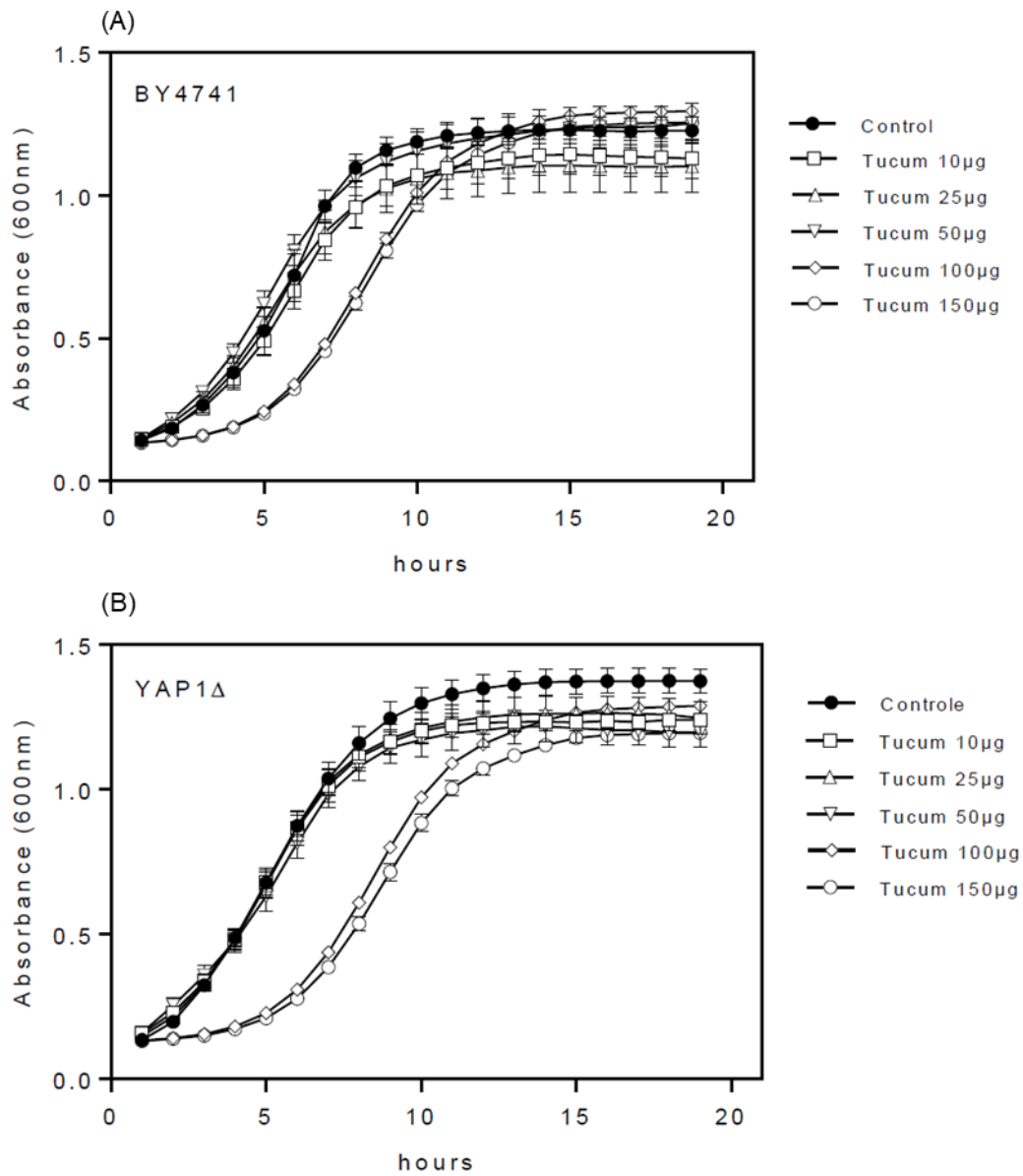


Figure 2 – Effect of different concentrations of tucum's aqueous extract (10, 25, 50, 100 and 150µg/mL) in *S. cerevisiae* strains BY4741 (A) and Yap1Δ (B) growth curves. Error bars indicate the standard error of the mean (n=3) of three different experiments.

Figure 3

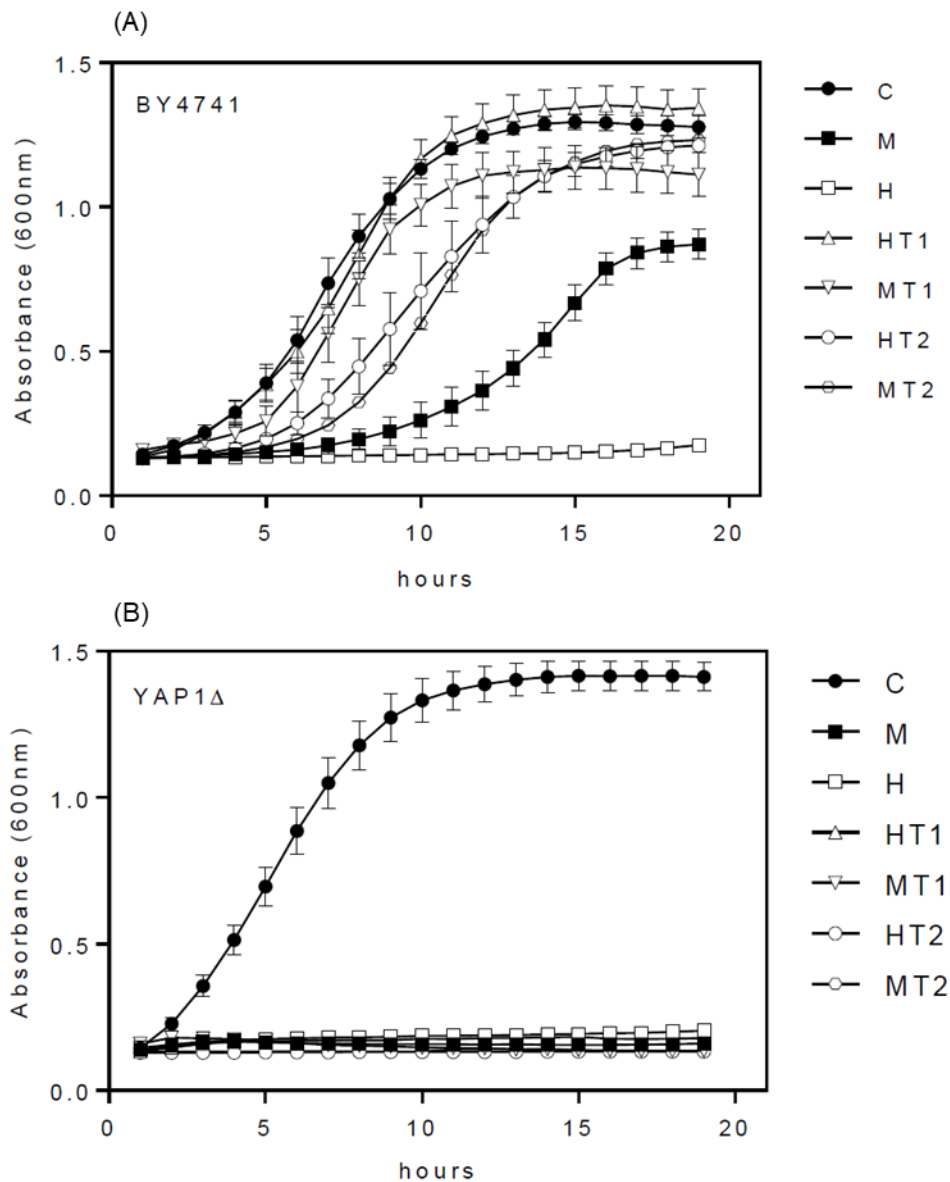


Figure 3 – Effect on growth curves of different concentrations of tucum’s aqueous extract in *S. cerevisiae* strains BY4741(A) and Yap1Δ (B) only with YPD medium (C) or exposed to menadione (15μM) (M), H2O2 (1mM) (H), tucum extract 50μg/mL (MT1) or 150μg/mL (MT2) and menadione (15μM), tucum extract 50μg/mL (HT1) or 150μg/mL (HT2) and 1mM of H2O2. Error bars indicate the standard error of the mean (n=3) of three different experiments.

Figure 4

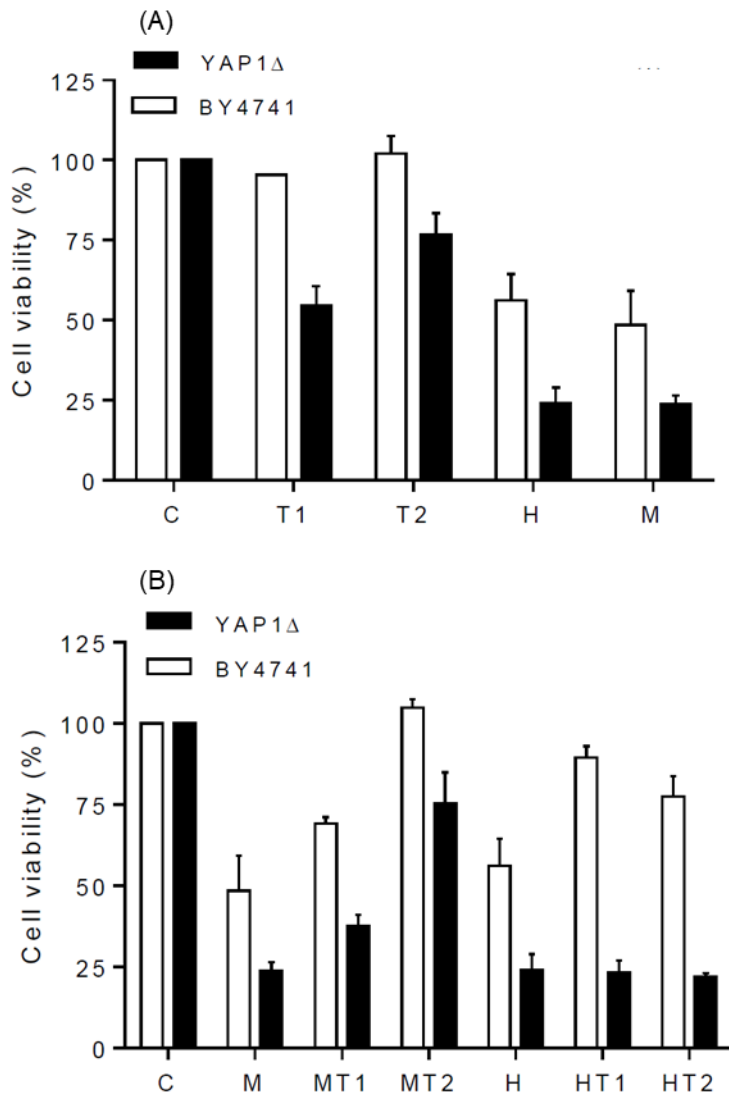


Figure 4 – Colony viability of *S. cerevisiae* strains BY4741 (A) and Yap1Δ (B) only with YPD medium (C) or exposed to menadione (5μM) (M), H₂O₂ (0.5mM) (H), 50μg/mL (T1) or 150μg/mL (T2) of tucum's extract, pretreated with 50μg/mL (MT1) or 150μg/mL (MT2) of tucum extract before menadione induced stress and with 50μg/mL (HT1) or 150μg/mL (HT2) of tucum extract before H₂O₂ induced stress. Error bars indicate the standard error of the mean (n=3) of three different experiments.

8. REFERENCES

Auesukaree C. 2017. Molecular mechanisms of the yeast adaptive response and tolerance to stresses encountered during ethanol fermentation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 124(2):133–142. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2017.03.009>

Boeing JS, Ribeiro D, Chisté RC, Visentainer JV, Costa VM, Freitas M, Fernandes E. 2017. Chemical characterization and protective effect of the *Bactris setosa* Mart. fruit against oxidative/nitrosative stress. *Food Chemistry*. 220:427–437. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.188>

Chung T, Moon S, Chang Y, Ko J, Lee Y, Cho G, Kim S, Kim J, Kim C. 2004. Novel and therapeutic effect of caffeic acid and caffeic acid phenyl ester on hepatocarcinoma cells: complete regression of hepatoma growth and metastasis by dual mechanism. *FASEB j*. 18(14):1670–1681. <https://doi.org/10.1096/fj.04-2126com>

Cuinica LG. Estresse oxidativo induzido por peróxido de hidrogênio e menadiona em células de *Saccharomyces cerevisiae* BY4741. 25(2):29–46.

da Cunha M, Arruda S. 2017. Tucum-do-Cerrado (*Bactris setosa* Mart.) May Promote Anti-Aging Effect by Upregulating SIRT1-Nrf2 Pathway and Attenuating Oxidative Stress and Inflammation. *Nutrients*. 9(11):1243. <https://doi.org/10.3390/nu9111243>

Da Silva R, Fagundes R, Faber K, Campos E. 2022. Pro-Oxidant and Cytotoxic Effects of Tucum-Do-Cerrado (*Bactris setosa* Mart.) Extracts in Colorectal Adenocarcinoma Caco-2 Cells. *Nutrition and cancer* 1-12. <https://doi.org/10.1080/01635581.2022.2086704>

Dani C, Bonatto D, Salvador M, Pereira MD, Henriques JAP, Eleutherio E. 2008. Antioxidant Protection of Resveratrol and Catechin in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Agric Food Chem*. 56(11):4268–4272. <https://doi.org/10.1021/jf800752s>

Dantas M, Junior O, Campos L, Campos E. Compounds of tucum-do-cerrado (*Bactris setosa*) fruit with antioxidant activity. *Nat Prod Res.* 2022 Jun 7;1-5. doi: 10.1080/14786419.2022.2085698

Fustinoni-Reis A, Arruda S, Dourado L, da Cunha M, Siqueira E. 2016. Tucum-Do-Cerrado (*Bactris setosa* Mart.) Consumption Modulates Iron Homeostasis and Prevents Iron-Induced Oxidative Stress in the Rat Liver. *Nutrients.* 8(2):38. <https://doi.org/10.3390/nu8020038>

Hassan GS. 2013. Menadione. In: Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology [Internet]. Vol. 38. [place unknown]: Elsevier; [accessed 2022 Jun 6]; p. 227–313. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407691-4.00006-X>

Heibel AB, da Cunha M de SB, Ferraz CTS, Arruda SF. 2018. Tucum-do-cerrado (*Bactris setosa* Mart.) may enhance hepatic glucose response by suppressing gluconeogenesis and upregulating Slc2a2 via AMPK pathway, even in a moderate iron supplementation condition. *Food Research International.* 113:433–442. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.07.032>

Hybertson BM, Gao B, Bose SK, McCord JM. 2011. Oxidative stress in health and disease: The therapeutic potential of Nrf2 activation. *Molecular Aspects of Medicine.* 32(4–6):234–246. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2011.10.006>

Jaiswal AK. 2004. Nrf2 signaling in coordinated activation of antioxidant gene expression. *Free Radical Biology and Medicine.* 36(10):1199–1207. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2004.02.074>

Jamieson DJ. 1992. *Saccharomyces cerevisiae* has distinct adaptive responses to both hydrogen peroxide and menadione. *J Bacteriol.* 174(20):6678–6681. <https://doi.org/10.1128/jb.174.20.6678-6681.1992>

Kim I-S, Sohn H-Y, Jin I. 2011. Adaptive stress response to menadione-induced oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae* KNU5377. *J Microbiol.* 49(5):816–823. <https://doi.org/10.1007/s12275-011-1154-6>

Kobayashi M, Yamamoto M. 2006. Nrf2–Keap1 regulation of cellular defense mechanisms against electrophiles and reactive oxygen species. *Advances in Enzyme Regulation.* 46(1):113–140. <https://doi.org/10.1016/j.advenzreg.2006.01.007>

Lakshmi SP, Reddy AT, Kodidhela LD, Varadacharyulu NCh. 2020. The tea catechin epigallocatechin gallate inhibits NF-κB-mediated transcriptional activation by covalent modification. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 695:108620. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2020.108620>

Lushchak VI. 2011. Adaptive response to oxidative stress: Bacteria, fungi, plants and animals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology.* 153(2):175–190. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2010.10.004>

Mariani D, Mathias CJ, da Silva CG, Herdeiro R da S, Pereira R, Panek AD, Eleutherio ECA, Pereira MD. 2008. Involvement of glutathione transferases, Gtt1 and Gtt2, with oxidative stress response generated by H₂O₂ during growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Redox Report.* 13(6):246–254. <https://doi.org/10.1179/135100008X309028>

Meng D, Zhang P, Li S, Ho C-T, Zhao H. 2017. Antioxidant activity evaluation of dietary phytochemicals using *Saccharomyces cerevisiae* as a model. *Journal of Functional Foods.* 38:36–44. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.08.041>

Miner S, O'Donnell AF, Ballew A, Giaever G, Nislow C, Stearns T, Cyert MS. 2011. Curcumin Inhibits Growth of *Saccharomyces cerevisiae* through Iron Chelation. *Eukaryot Cell.* 10(11):1574–1581. <https://doi.org/10.1128/EC.05163-11>

Peláez-Soto A, Fernández-Espinar MT, Roig P, Gil JV. 2017. Evaluation of the Ability of Polyphenol Extracts of Cocoa and Red Grape to Promote the Antioxidant Response in Yeast Using a Rapid Multiwell Assay: Antioxidant response in yeast. *Journal of Food Science*. 82(2):324–332. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13602>

Picazo C, Molin M. 2021. Impact of Hydrogen Peroxide on Protein Synthesis in Yeast. *Antioxidants*. 10(6):952. <https://doi.org/10.3390/antiox10060952>

Qiu S, Wang M, Wang F, Chen J, Li X, Li Q, Lin C, Lin X. 2013. Effects of open drainage ditch design on bacterial and fungal communities of cold waterlogged paddy soils. *Braz J Microbiol*. 44(3):983–991. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822013000300050>

Rani V, Yadav UCS, editors. 2015. *Free Radicals in Human Health and Disease* [Internet]. New Delhi: Springer India; [accessed 2022 Jun 6]. <https://doi.org/10.1007/978-81-322-2035-0>

Rodrigues-Pousada C, Menezes RA, Pimentel C. 2010. The Yap family and its role in stress response. *Yeast*. 27(5):245–258. <https://doi.org/10.1002/yea.1752>

Rosa F, Arruda A, Siqueira E, Arruda S. 2016. Phytochemical Compounds and Antioxidant Capacity of Tucum-Do-Cerrado (*Bactris setosa* Mart), Brazil's Native Fruit. *Nutrients*. 8(3):110. <https://doi.org/10.3390/nu8030110>

Schulz M, Seraglio SKT, Brugnerotto P, Gonzaga LV, Costa ACO, Fett R. 2020. Composition and potential health effects of dark-colored underutilized Brazilian fruits – A review. *Food Research International*. 137:109744. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109744>

Silva, D B; Silva, J A; Junqueira, N T V; Andrade LRM. 2001. *Frutas do Cerrado*. Embrapa p179.

Siqueira EM de A, 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. Zhang T, editor. PLoS ONE. 8(8):e72826. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072826>

Stephen DWS, Jamieson DJ. Glutathione is an important antioxidant molecule in the yeast. :6.

Weber FJ, de Bont JAM. 1996. Adaptation mechanisms of microorganisms to the toxic effects of organic solvents on membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes*. 1286(3):225–245. [https://doi.org/10.1016/S0304-4157\(96\)00010-X](https://doi.org/10.1016/S0304-4157(96)00010-X)

Wu MJ, O'Doherty PJ, Fernandez HR, Lyons V, Rogers PJ, Dawes IW, Higgins VJ. 2011. An antioxidant screening assay based on oxidant-induced growth arrest in *Saccharomyces cerevisiae*: Antioxidant assay based on oxidant-induced growth arrest. *FEMS Yeast Research*. 11(4):379–387. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2011.00726.x>

**Artigo 2: Pro-Oxidant and Cytotoxic Effects of Tucum-Do-Cerrado (*Bactris setosa*
Mart.) Extracts in Colorectal Adenocarcinoma Caco-2 Cells.**

DOI: 10.1080/01635581.2022.2086704

Pro-oxidant and cytotoxic effects of Tucum-do-cerrado (*Bactris setosa* Mart.) extracts in colorectal adenocarcinoma Caco-2 cells.

Renata Cristina da Silva^{1,2} Raphael Rosa Fagundes², Klaas Nico Faber², Élide Geralda Campos¹.

¹Programa de Pós-Graduação em Nutrição Humana, Laboratório de Biologia Molecular, Departamento de Biologia Celular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brazil.

²Department of Gastroenterology and Hepatology, University of Groningen, University Medical Center Groningen, Groningen, The Netherlands.

Running title: *Bactris setosa* is pro-oxidant and cytotoxic in caco-2 cells.

Corresponding author: Renata Cristina da Silva. E-mail: nutrsilva@gmail.com +55 61 981900735 Depto. de Biologia Celular, Universidade de Brasília. Brasília - DF - CEP 70910-900.

Author contributions:

Study concept and design: Élide Geralda Campos, Renata Cristina da Silva and Klaas Nico Faber; acquisition of data: Renata Cristina da Silva and Raphael Fagundes; analysis and interpretation of data: Renata Cristina da Silva and Élide Geralda Campos; drafting of the manuscript: Renata Cristina da Silva, Raphael Fagundes, Élide Geralda Campos and Klaas Nico Faber; statistical analysis: Renata Cristina da Silva; obtained funding: Renata Cristina da Silva; contributed reagents/materials/analysis tools: Klaas Nico Faber; study supervision: Klaas Nico Faber and Élide Geralda Campos. Authors that contributed equally to this work.

ABSTRACT

Colorectal cancer is one of the most common types of cancer. Bioactive natural compounds can act in cancer chemoprevention as tumor growth inhibitors. Tucum-do-cerrado (*Bactris setosa* Mart.) is a Brazilian fruit that contains several phenolic compounds. This study investigated the effect of tucum aqueous extract in Caco-2 cells in comparison to primary human intestinal organoids and fibroblasts. Cells were exposed to 0.5 and 1 mg/mL of tucum aqueous extract for 24 hours. ROS production, mRNA levels for SOD1 and SOD2, CAT, GPx1, NFE2L2, HIF1A and NOS2 were evaluated in Caco-2 cells exposed to tucum extract. Cell viability of Caco-2 cells was decreased upon tucum extract exposure. Mitochondrial ROS levels increased in Caco-2 cells exposed to tucum extract. The mRNA levels of SOD1, SOD2, CAT, GPx, NFE2L2 and HIF1A were downregulated in Caco-2 cells exposed to tucum extract, while NOS2 mRNA levels remained unchanged. Protein levels of SOD2, CAT and NRF2 remained unchanged in Caco-2 cells treated with tucum extract, indicating that catalase and SOD2 cellular functions may be unaffected by the tucum extract at 24 hours of exposure. Aqueous extract of tucum-do-cerrado may induce cellular toxicity in a cancer cell-specific manner, possibly through increased mitochondrial ROS production and gene expression regulation.

Key words: polyphenols, bioactive compounds, carcinoma cells, antioxidants.

INTRODUCTION

According to the World Health Organization (WHO), cancer is the second leading cause of death in the world and resulted in 9.6 million deaths in 2018. Colorectal cancer is one of the most common types of cancer, in both men and women, and dietary factors are key risk factors in the development and prevention of this disease[1]. Multiple studies have shown that diets with a high content of fruits and vegetables prevent and reduce the risk of gastrointestinal cancer[2–5]. For instance, vitamin D, calcium and antioxidants are associated with a relative risk reduction for the development of colorectal cancer when compared to low intake of these nutrients[6]. Moreover, bioactive compounds found in a variety of plants, such as coffee, soy, green tea, tomato and curcuma, are widely studied for their anticancer effects[7]. The antioxidant activity of polyphenols is well known, however, they can also act as prooxidants and induce oxidative DNA damage in the presence of metal ions such as copper and iron[8]. Caffeic acid, for example, induces DNA damage in human peripheral lymphocytes in a copper-dependent reaction. This effect has also been observed with gallic acid, a structural constituent of tannins, and epigallocatechin-3-gallate (EGCG), an apoptosis inducer [9]. The copper concentration in cancer cells is higher than in normal cells, which would explain a selective cytotoxic effect on these cells. The selective genotoxic effect of polyphenols led to the hypothesis that their prooxidant property is involved in the anti-cancer action of these compounds [9]. Colon cancer cells show defective DNA repair[10] and, therefore, compounds that induce the DNA repair machinery are relevant to be considered as anticancer agents. Polyphenols have been shown to induce DNA repair genes. For example, a major polyphenol from green tea, (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG), inhibits, in cancer cell lines, the activity of the enzyme 5-cytosine DNA methyltransferase, involved in the methylation of newly synthesized DNA strand[11]. As a consequence of this inhibition, reactivation of methylation-silenced genes coding DNA repair enzymes occurs. In addition, naringenin (NR), a citrus flavonoid, can stimulate, in a beyond antioxidation manner, the induction of base excision repair gene expression in LNCap prostate cancer cells following oxidative stress[12]. Modulation of the cellular redox status is one of the main target of polyphenols in their effect on cancer development and progression. Polyphenols may act either as pro-oxidants and induce cell cytotoxicity, or act as antioxidants and inhibit metabolism and cellular activity[7]. The dual effects of polyphenols on cancer cells

seems to depend on dose and treatment time. For example, treatment of MCF-7 breast cancer cells with low doses of flavonoids (1 to 8 μM) for 60 h slightly increases cell growth while high doses of flavonoids (20 to 120 μM) for 48 h inhibits cell proliferation and induces cell death due to excessive oxidative stress (Xi *et al.*, 2022).

Tucum-do-cerrado (*Bactris setosa* Mart.) is a fruit found in the Brazilian savanna, which has high levels of different bioactive compounds, including vitamin C, as well as at least 46 phenolic compounds, such as anthocyanins, catechins, rutins, cyanidin, peonidin, caffeic acid, resveratrol and quercetin[13–15]. These compounds are mainly found in the peel of the fruit, which was shown to have the major antioxidant activity, *in vitro* and *in vivo*, when compared to the pulp[14–18]. In the present study, the effects of the aqueous extract of the tucum-do-cerrado peel were evaluated in colorectal cancer cells (Caco-2) and normal intestinal mucosal cells, e.g. primary human intestinal organoids and fibroblasts.

MATERIAL AND METHODS

Extract of tucum-do-cerrado

Fruits were obtained from a local merchant and were from “Fazenda Grama”, Teresópolis de Goiás – GO/Brazil. Fruits were washed with distilled water and the peel was manually removed and lyophilized. For preparation of the crude aqueous extract, 1 g of pulverized peel was mixed with 10 mL of distilled water. The contents were mixed for 16 h at 4°C and filtered through a 0.22 μm filter. The aqueous extract was stored at -20 °C until use. The extract concentrations in mg/mL corresponded to the pulverized peel dissolved in water.

Cell Culture

Caco-2 cells (human epithelial colon adenocarcinoma; ATCC[®], HTB-37TM, Manassas, USA) and primary human intestinal fibroblasts cells were maintained in DMEM medium (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, ThermoFisher Scientific Inc, Massachusetts, EUA) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS; Invitrogen), 1% antibiotic cocktail [penicillin (10 U/mL), streptomycin sulfate (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and fungi zone; Lonza, Bazel, Switzerland] and 1% w/v non-essential amino acids (NEAA, Gibco). Cells were cultured at 37 °C and 5% CO_2 .

Human gut (jejunum) organoids were obtained from surgical resection material at University Medical Center Groningen and maintained on Matrigel[®] (Life science

354262) and hGF medium (DMEM/F12 medium, Glutamax 1%, HEPES 1M, PSF 1%, Gentamycin 50 µg/mL). Organoids were cultured in expansion medium (EM), which consisted on hGF medium added with Wnt3-conditioned medium 1:1, Rspo-1 100 ng/mL (R&D Systems, Mineápolis, Minnesota, EUA, 4645-RS), 100 ng/mL Noggin (R&D Systems 6057-ng-100), 1x B27 (Invitrogen 17504-044), 1.25 mM NAC (Sigma-Aldrich, San Luis, Missouri, EUA, A9165), 50 ng/mL EGF (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA, PMG8041), 10 mM nicotinamide (Sigma N0636-100g), 10 µM SB202190 (Sigma S7067-5 mg), 10 µM Y-27632 (Sigma Y0503), 0.5 µM A83 (Tocris Bioscience, Bristol, Reino Unido, 2939). Differentiation medium were the same as expansion medium, but without nt3, nicotinamide, SB202190 and Y-26632.

Cell viability

Cells were plated at 5×10^5 cells/well in a 24-well plate in supplemented DMEM medium. When cells reached 80% confluence, aqueous extract of tucum-do-cerrado (0.5 and 1 mg/mL) in DMEM medium was added and the cells were incubated for another 24 h. Cell viability after 24 h treatment was measured using the WST-1 reagent (Roche, Basel, Switzerland, 11644807001) according to the manufacturer's instructions. Cells were incubated for 45 min with WST-1 reagent diluted on HBSS buffer to 1:10 and the absorbance of the samples was measured at 450 nm on Epoch2 microplate reader (Biotek Instruments). Results were used to calculate IC_{50} in GraphPad prism 6 software. For IC_{50} results, the following concentrations of the aqueous tucum extract were tested: 0.01, 0.025, 0.50, 0.100, 0.250, 0.500, 1.0, 1.25 and 1.5 mg/mL. The IC_{50} was calculated using the GraphPad prism 6 software.

ROS Production

Fibroblasts and Caco-2 cells were plated in 96-well plates at 5×10^4 cells/well (100 µl/well) and after 24 h the aqueous extract of tucum-do-cerrado was added (0.5 and 1 mg/mL). The cells were then incubated for 24 h. ROS production assay was carried out according to the manufacturer's instructions. Briefly, the stock solution (one vial dissolved in 13 µl DMSO) of Reagent MitoSox red (Roche) was diluted in culture medium (1:1,000 dilution) and 100 µl was added to each well. Cells were incubated for 30 min and after that the absorbance was measured at 510 nm on a Synergy H4 Hybrid Reader (Biotek Instruments) microplate reader.

RNA isolation and gene expression

For total RNA isolation cells were washed twice with HBSS buffer (Gibco) and 500 μ l of TRIzol reagent (Sigma-Aldrich) was added in each well, and RNA isolation was carried out according to manufacturer's instructions. RNA was quantified on a NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo-Scientific). Complementary DNA (cDNA) synthesis was made with RNA and mix with RT-buffer (50 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 5 mM DTT), 10% dNTP mix (1 mM dATP, dGTP, dTTP, Sigma-Aldrich), 2% random primers (0.05 μ g/ μ l, Sigma-Aldrich), 1.5% RNase OUT and 2% M-MLV RT (respectively, 4 U/ μ l and 20 U/ μ l; Invitrogen) to a final volume of 50 μ l. The reaction for cDNA synthesis was incubated for 10 min at 25 °C followed by 60 min at 37 °C and 5 min at 95 °C, using a thermal cycler (BioRad, CA, USA, T100). Annealing temperature for primers was 60°C.

For gene expression analysis, cDNA was mixed with oligonucleotides (probe, sense and antisense) for different target genes. The gene expression levels of Superoxide Dismutase [Cu/Zn] (SOD1), Superoxide Dismutase [Mn] (SOD2), Catalase (CAT), Glutathione Peroxidase (GPx), Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2 (NFE2L2), Hypoxia-inducible factor 1-alpha (HIF1A), Nitric Oxide Synthase 2 (NOS2) and 18S were analyzed by quantitative real-time PCR (RT-qPCR). The cycle threshold (Ct) was calculated using QuantStudio software. For qPCR running, mix were sample 0.4 μ l cDNA, 0.8 μ l probe, 0.86 μ l sense primer, 0.36 μ l anti-sense primer, 10 μ l x2 RT buffer and 4.48 μ l water in each well. The Primer sequences are described in **supplementary table 1**. The comparative Ct method was used for quantification of mRNA expression levels using the amplification efficiency of each gene. All results were normalized using *18S* as the housekeeping gene.

Cell lysates, Protein Quantification and Western blot analysis

Caco-2 cells were washed 2x with HBSS buffer and 200 μ l of lysis buffer (25 mM HEPES, 150 mM KAc, 2 mM EDTA pH 8.0, 0.1% NP-40) containing protease inhibitor (10 mM NaF, 50 mM PMSF, 1 μ g/ μ l a-proteinase, 1 μ g/ μ l pepstatine, 1 μ g/ μ l leupeptin, 1 mM DTT; 1:25 dilution) were added to samples. Lysed cells were scraped and transferred to 1.5 mL conical tubes. Protein was quantified by BCA protein assay (Biorad). Electrophoresis was performed using 40 μ g of total protein and the proteins were electro-transferred to nitrocellulose membranes. Membranes were stained with Ponceau-S to check for protein transfer and washed once with PBS before blocked with

0.5% BSA in 0.1% PBS Tween (PBS Gibco, 10019-015; Tween 20 Gibco, P2281) for 1 h. Samples were incubated overnight at 4 °C with rabbit polyclonal antibodies against MnSOD (manganese superoxide dismutase), pNRF2 (nuclear factor, erythroid 2-like 2) or β -actin, or mouse polyclonal antibodies against Catalase. All antibodies (Sigma-Aldrich) were used at a 1:1,000 dilution. Membranes were washed with 0.1% PBS Tween and incubated with secondary rabbit or goat IgG antibodies (1:2,000, Sigma Aldrich) for 1 h and washed again using 1x PBS. Enhanced chemiluminescence (ECL), advanced Western blotting detection kit and ECL Hyperfilm (GE Healthcare, Madison, WI) were used to detect protein expression. The signals were visualized by ChemiDoc Resolutions System (Biorad) and bands were quantified using Image Pro Plus software v 7.01 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA).

Immunofluorescence

Caco-2 cells were plated at 5×10^5 cell/well in 12-well plates with coverslips and after they reached 80% confluency, the aqueous tucum extract (0.5 and 1 mg/mL) was added and the cells incubated for 24 h. Cells exposed to 1 mM hydrogen peroxide (H_2O_2) were used as positive control and coverslips incubated without the secondary antibody were used as negative control. Cells were washed twice with PBS (500 μ l) and fixed with 4% paraformaldehyde for 10 min. After fixation, cells were washed 2x with PBS and 500 μ l permeabilizing buffer (Triton 0.01% in PBS) was added. The samples were then incubated for 30 min at 37°C. The coverslips were washed twice with PBS and were incubated 30 min in a blocking buffer (2% BSA in PBS). Rabbit polyclonal immunoglobulin G raised against MnSOD (1:400) was added and the coverslips were incubated for 1 h at room temperature. Cells were washed with a blocking buffer (2% BSA in PBS) and probed with an Alexa Fluor™488-conjugated anti-rabbit antibody (1:500) for 30 min at room temperature. Slides were mounted using a Vectashield antifade reagent with DAPI (nuclear stain) (Vector Laboratories, CA, USA) and images were taken using a fluorescent microscope (Leica DMI6000B) with software Leica Application Suite Advanced Fluorescence 3,1,0 build 8587.

Statistical Analysis

The results are expressed as mean \pm SEM. Samples were compared using one-way analysis of variance (ANOVA) and the post hoc test of *Bonferroni*. For statistics significance, p-value < 0.05 was used.

RESULTS

The cell viability of Caco-2 cells was dose-dependently reduced after 24 h exposure to the tucum aqueous extract with an IC_{50} of 0.59 mg/mL (Fig. 1A). Thus, cells were exposed for 24 h to either 0.5 and 1.0 mg/mL tucum aqueous extract in subsequent experiments. Cell viability decreased with increasing extract concentration from 0.01 to 1.5mg/mL and was 20.1% at the lowest concentration and 91.6% at the highest concentration. Caco-2 cell viability was significantly reduced to 57.8% and 33.8% after 24 h exposure to 0.5 and 1.0 mg/mL tucum aqueous extract, respectively, when compared to untreated control cells (Fig. 1B). In sharp contrast, cell viability of primary human intestinal organoids and primary human intestinal fibroblasts was not affected by exposure to tucum aqueous extract (Fig. 1C and 1D, respectively). Further analysis showed that mitochondrial ROS production in Caco-2 increased to value 99.1% in the cells exposed to 0.5 mg/mL and 84.3% in the cells exposed to 1.0 mg/mL of the tucum aqueous extract compared to untreated control cells ($p < 0.05$, Fig. 2A). In contrast, tucum exposure did not show significant changes on mitochondrial ROS production in primary human intestinal fibroblasts (Fig. 2B).

Protein and mRNA levels were analyzed for antioxidant superoxide dismutases. Tucum aqueous extract dose-dependently reduced *SOD1* (Cu/ZnSOD) and *SOD2* (MnSOD) mRNA levels (Fig. 3A and B). However, MnSOD protein levels remained unchanged in Caco-2 cells exposed for 24 h to tucum aqueous extract, when compared to untreated control cells (Fig. 3C). Immunofluorescence microscopy analysis revealed that tucum aqueous extract did not evidently affect MnSOD-specific staining in Caco-2 cells, while it was clearly induced in cells exposed to 1 mM H_2O_2 (Fig. 3D).

Tucum aqueous extract also reduced, in a dose-dependent manner, the mRNA levels of *GPx1*, *CAT* (FIG. 4A and 4B) and of the oxidative stress-related transcription factors *HIF1A* and *NFE2L2* (Fig. 5A and C). Just like observed for *SOD2*/MnSOD, however, protein levels of catalase and Nrf2 were not overtly affected in the 24 h time frame of tucum exposure. In contrast to effects on mRNA levels on antioxidant genes, tucum aqueous extract did not change mRNA levels of the inflammation marker *NOS2*, encoding inducible nitric oxide synthase iNOS (Fig. 5B).

DISCUSSION

In this study, we investigated the oxidative and cytotoxic effects of aqueous extract of tucum-do-cerrado in human colon cancer cells and the likely underlying mechanisms. We choose the Caco-2 cell line because: 1) colorectal cancer ranks 3rd in terms of cancer incidence, 2) these cells are a model of the intestinal epithelium, 3) the intestinal epithelium enters in contact with tucum components after ingestion of the fruit or its products [54]. The IC_{50} for aqueous extract of tucum's peel was 590 $\mu\text{g/mL}$. Studies with plant extracts have reported reduction on viability in Caco-2 cells [19–21]. For example, Caco-2 cells showed to be sensitive to a colored fraction of sweet cherry fruits and had an IC_{50} value of $667.84 \pm 2.46 \mu\text{g/mL}$ [19]. Three concentrations of juice (10, 1 and 0.1 mg/mL) and 50% hydroethanolic extract (1, 0.1 and 0.01 mg/mL) from *Saposhnikovia divaricata* root statistically significantly reduced Caco-2 cells viability [20]. Extracts from *Arthrocnemum indicum* shoot inhibited Caco-2 cell growth in a dose-dependent manner at the concentrations of 10 to 100 $\mu\text{g/mL}$ [21].

Our results indicate that tucum extract (0.5 and 1 mg/mL), had a toxic effect on Caco-2 cells, although it did not showed the same effect on organoids (on tested concentrations of 0.25, 0.5 and 1 mg/mL) and fibroblasts (on tested concentrations of 0.025 up to 1.5 mg/mL), which may indicate a selective action towards cancer cells. Further analysis may be important to determine if this effect is also antiproliferative. Caco-2 cells exposed to a grape seed proanthocyanidins extract (10-100 $\mu\text{g/mL}$) had survival pathway inactivated and activation of apoptosis, while the viability of normal colon cells was not altered by the same treatments[22], in line with our results. Resistance to multiple drugs remains one of the challenges in the area of cancer treatment and, therefore, the search for potential sources of new anti-cancer drugs can help this endeavor. The selective effect of tucum extract on Caco-2 cells, when compared to organoids or fibroblast, is relevant when considering its anti-cancer potential. Changes in the composition and metabolism of tumor cells, when compared to normal cells, may be related to this selective effect. Regarding the fact that mitochondrial ROS production was higher at 0.5 mg/mL than at 1.0 mg/mL, we speculate that the extract may be exerting some antioxidant effect at the concentration of 1.0 mg/mL, but this remains to be investigated. This same effect has been observed in a study with eugenol, a flavoring agent used in cosmetic and food products, showing that it caused biphasic ROS production in human submandibular cell line treated with

H₂O₂ and horseradish peroxidase characterized by enhanced at lower eugenol concentrations (5–10 microM) and decreased at higher concentrations (500 microM) [55].

Fruits, vegetables and other plants with bioactive compounds, such as polyphenols, have been studied for their antiproliferative and potential anticancer effects[23–28]. Polyphenols have been related to cancer chemoprevention and adaptative responses to stress, but they can also induce production of reactive oxygen species that can play a crucial role in cancer therapy through activation of apoptotic pathways[29]. The results show that tucum aqueous extract induces mitochondrial ROS production in colorectal adenocarcinoma Caco-2 cells, but not in primary human intestinal epithelial cells (organoids) or primary human intestinal fibroblasts. This is accompanied by a reduction in viable cells after 24 h of tucum aqueous extract exposure. The increase in ROS production in Caco-2 cells exposed to tucum extract may be related to its higher copper and iron content. Colorectal cancer tissue from patients has been reported to have higher levels of copper and iron compared to normal tissue[51]. Copper and iron are important catalysts in Fenton reactions, which generate the extremely reactive hydroxyl radical[52]. Tucum aqueous extract contains gallic and caffeic acids (**supplementary table 2**), compounds that induce DNA damage in a copper-dependent reaction in human cells[53]. It is reasonable to think that these polyphenols may be acting as pro-oxidants and causing DNA damage in Caco2-cells. This effect remains to be investigated.

The composition of the tucum peel aqueous extract has been described and is summarized in **supplementary table 2**. The total phenolics in the tucum peel is 28,287.6 mg of gallic acid equivalent (GAE)/100 g fresh matter[15]. This is a high value when compared with some common fruits such as apple (red delicious) 73.96 ± 3.52 mg GAE/100 g fruit [13]. An study by Rosa *et al.* (2016) identified major phenolic compounds of the tucum-do-cerrado (*Bactris setosa*) peel, as well as antioxidant activity and total phytochemical compound concentration of different extracts of the peel, including an aqueous extract. It will be relevant to repeat these analyses with the extract used in the present study. One characteristic of our extract is its purple color indicating the presence of anthocyanins. Tucum, as green tea (*Camellia sinensis*), has catechins, whose antioxidant mechanism of action is linked to a transition metal chelating property[30]. However, tucum extract demonstrated a potent pro-oxidant effect in Caco-2 cells by increasing mitochondrial ROS production that was not

observed in intestinal fibroblasts, thus indicating a cell type-specific action. The pro-oxidant effect of catechins is related to apoptosis induction in tumor cells, such as HL-60, HT-29 and RAW 264.7 due to interference with cellular signaling pathways or by increasing H₂O₂ and hydroxyl radical production under experimental conditions[30–33]. ROS production is increased when *Rosa canina* is combined with a drug to treat colorectal cancer, but when Caco-2 cells treated with hydrogen peroxide are exposed to only *Rosa canina*'s extract, ROS production decreases, showing an antioxidant effect[34,35].

Tucum extract reduced mRNA levels of the antioxidant enzymes SOD, GPx and catalase, but this reduction was not observed in protein levels of catalase and MnSOD. These results suggest that Caco-2 cells treated with aqueous tucum extract alone can develop a higher oxidative stress environment since they produce more mitochondrial ROS whilst their antioxidant defense is not being strengthened. Aqueous extract of *Barringtonia racemosa* leaf on Caco-2 cells increased catalase and GPx activity, however ROS production was increased[42]. Similar results were found with grape seed extract which increased SOD and GPx mRNA levels[43]. Plant extracts such as sage, oregano, rosemary and echinacea rich in polyphenols, likewise tucum extract, do not induce a significant increase in antioxidant enzymes when exposed to H₂O₂[44]. A diet rich in fruits and vegetables is highly important to prevent chronic diseases such as diabetes and obesity, thence effective on preventing inflammatory environment and an increase on oxidative status. Although it was not observed in this study a significant effect of tucum extract on antioxidant response, the fruit is rich in bioactive compounds which may be important to maintain a healthy diet.

The transcription factor Nrf2 (*Nuclear factor E2-related factor 2*) is involved in the antioxidant response[36–39]. Tucum extract decreased mRNA, but not protein levels of Nrf2. While the difference between the mRNA and protein levels seems striking, it is not an unusual observation. For example, an analysis of matrix metalloproteinases and the tissue inhibitor of metalloproteinases 1 in prostate cancer cells showed no correlation between their levels of mRNA and proteins [36]. Protein and mRNA levels within the same lung adenocarcinoma show significant correlation only in a subset of the proteins[40]. Down regulation of Nrf2 is associated with cancer cells death as shown in lung cancer cells A549 in which up to 200 µM catechins from green tea suppressed this transcriptional factor and led to a lower antioxidative response and activated apoptosis [41].

Hypoxia-Inducible Factor-1 is a key transcription factor that induces angiogenesis and is important in mammalian cells survival under low oxygen concentrations [45,46]. It is composed of two subunits, HIF-1 α and HIF-1 β , and HIF-1 α is regulated in an oxygen dependent manner. Under normoxia, ROS are able to indirectly regulate HIF-1 α by inhibiting proline hydroxylation, the event that triggers its degradation pathway [47]. Our findings showed that tucum extract caused a decrease in HIF-1 α gene expression in a dose-dependent way in Caco-2 cells, while superoxide radical increased under the same conditions. Superoxide radical is known to increase HIF-1 α levels under hypoxia and H₂O₂ is able to stabilize it under normoxia [48,49].

Peroxynitrite (HOONO) is formed by the reaction between nitric oxide (\bullet NO) and the superoxide radical and is a potent oxidizer that can attack various biological targets[50]. We then investigated whether tucum-do-cerrado has an effect on the gene expression of the inducible enzyme that catalyzes the synthesis of nitric oxide. The gene expression of NOS2 remained unchanged when the Caco-2 cells were exposed to the tucum-do-cerrado extract, indicating that the extract has no molecules with effect on the gene expression of this enzyme. Therefore, tucum might be responsible for increasing ROS production and suppresses antioxidant response while not affecting the inflammation pathway.

For two investigated antioxidant enzymes, MnSOD and CAT, and also for the transcription factor Nrf2, a decrease in mRNA levels, caused by tucum exposure, did not correlate with a decrease in protein levels. These data are interesting with regard to the importance of these proteins in colorectal cancer because it indicates that they are differently influenced at mRNA and protein levels and that post-transcriptional regulation of gene expression is a mechanism to maintain their function in Caco-2 cells. While the results seem promising, these are only primary experiments and, therefore, more cell lines should be investigated to conclude about tucum anticancer activity.

CONCLUSION

In conclusion, tucum-do-cerrado extract probably contains molecules with antioxidant action, and others with pro-oxidant action. The results of our study reflect the total sum of these opposite actions in Caco-2 cells and indicate that there is a prevalence of pro-oxidant action related to a decrease in cell viability. Our findings show the antiproliferative activity of tucum-do-cerrado extract on colon cancer cells possibly through ROS production. This observation is relevant from the point of view of

searching for compounds that reduce tumor cell growth. We hope that the results described here pave the way to further studies on tucum-do-cerrado as a potential source of anti-cancer compounds.

Declaration of Interest Statement: The authors certify that they have NO affiliations with or involvement in any organization or entity with any financial or non-financial interest in the subject matter or materials described in this manuscript.

Funding: Renata Cristina da Silva was supported by CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

Administrative numbers: Word count manuscript: **3.905**; Word count abstract: **200**; Figures: **5**; Supplementary Tables: **2**, References: **46**.

Declarations of interest: none.

REFERENCES

- [1] WHO. Cancer 2018. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer> (accessed June 1, 2021).
- [2] Negri E, La Vecchia C, Franceschi S, D'Avanzo B, Talamini R, Parpinel M, et al. Intake of selected micronutrients and the risk of breast cancer. *Int J Cancer* 1996;65:140–4. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0215\(19960117\)65:2<140::AID-IJC3>3.0.CO;2-Z](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0215(19960117)65:2<140::AID-IJC3>3.0.CO;2-Z).
- [3] Corrêa Lima MP, Gomes-Da-Silva MHG. Colorectal cancer: Lifestyle and dietary factors. *Nutr Hosp* 2005;20:235–41.
- [4] Chan AT, Giovannucci EL. Primary Prevention of Colorectal Cancer. *Gastroenterology* 2010;138:2029–2043.e10. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2010.01.057>.
- [5] Cho YA, Lee J, Oh JH, Chang HJ, Sohn DK, Shin A, et al. Genetic risk score, combined lifestyle factors and risk of colorectal cancer. *Cancer Res Treat* 2019;51:1033–40. <https://doi.org/10.4143/crt.2018.447>.
- [6] Duthie GG, Duthie SJ, Kyle JAM. Plant polyphenols in cancer and heart disease: implications as nutritional antioxidants. *Nutr Res Rev* 2000;13:79. <https://doi.org/10.1079/095442200108729016>.
- [7] Mileo AM, Miccadei S. Polyphenols as Modulator of Oxidative Stress in Cancer Disease: New Therapeutic Strategies. *Oxid Med Cell Longev* 2016;2016. <https://doi.org/10.1155/2016/6475624>.
- [8] León-González AJ, Auger C, Schini-Kerth VB. Pro-oxidant activity of polyphenols and its implication on cancer chemoprevention and chemotherapy. *Biochem Pharmacol* 2015;98:371–80. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2015.07.017>.
- [9] Bhat SH, Azmi AS, Hadi SM. Prooxidant DNA breakage induced by caffeic acid in human peripheral lymphocytes: Involvement of endogenous copper and a putative mechanism for anticancer properties. *Toxicol Appl Pharmacol* 2007;218:249–55. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2006.11.022>.
- [10] Jiricny J, Marra G. DNA repair defects in colon cancer. *Curr Opin Genet Dev* 2003;13:61–9. [https://doi.org/10.1016/S0959-437X\(03\)00004-2](https://doi.org/10.1016/S0959-437X(03)00004-2).
- [11] Fang MZ, Wang Y, Ai N, Hou Z, Sun Y, Lu H, et al. Tea Polyphenol (-)-Epigallocatechin-3-Gallate Inhibits DNA Methyltransferase and Reactivates Methylation-Silenced Genes in Cancer Cell Lines. *Cancer Res* 2003;63:7563–70.
- [12] Gao K, Henning SM, Niu Y, Youssefian AA, Seeram NP, Xu A, et al. The citrus flavonoid naringenin stimulates DNA repair in prostate cancer cells. *J Nutr Biochem* 2006;17:89–95. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2005.05.009>.
- [13] de Siqueira EMA, Rosa FR, Fustinoni AM, de Sant'Ana LP, Arruda SF. Brazilian Savanna Fruits Contain Higher Bioactive Compounds Content and Higher Antioxidant Activity Relative to the Conventional Red Delicious Apple. *PLoS One* 2013;8:2–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072826>.
- [14] Boeing JS, Ribeiro D, Chisté RC, Visentainer JV, Costa VM, Freitas M, et al. Chemical characterization and protective effect of the *Bactris setosa* Mart. fruit against oxidative/nitrosative stress. *Food Chem* 2017;220:427–37. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.188>.
- [15] Rosa FR, Arruda AF, Siqueira EMA, Arruda SF. Phytochemical compounds and antioxidant capacity of tucum-do-cerrado (*Bactris setosa* mart), Brazil's native fruit. *Nutrients* 2016;8. <https://doi.org/10.3390/nu8030110>.

- [16] Fustinoni-Reis AM, Arruda SF, Dourado LPS, da Cunha MSB, Siqueira EMA. Tucum-do-cerrado (*Bactris setosa* mart.) consumption modulates iron homeostasis and prevents iron-induced oxidative stress in the Rat Liver. *Nutrients* 2016;8. <https://doi.org/10.3390/nu8020038>.
- [17] Heibel AB, da Cunha M de SB, Ferraz CTS, Arruda SF. Tucum-do-cerrado (*Bactris setosa* Mart.) may enhance hepatic glucose response by suppressing gluconeogenesis and upregulating *Slc2a2* via AMPK pathway, even in a moderate iron supplementation condition. *Food Res Int* 2018;113:433–42. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.07.032>.
- [18] Barreto da Cunha M de S, Arruda SF. Tucum-do-cerrado (*Bactris setosa* Mart.) may promote anti-aging effect by upregulating *SIRT1-Nrf2* pathway and attenuating oxidative stress and inflammation. *Nutrients* 2017;9. <https://doi.org/10.3390/nu9111243>.
- [19] Gonçalves AC, Rodrigues M, Santos AO, Alves G, Silva LR. Antioxidant status, antidiabetic properties and effects on Caco-2 cells of colored and non-colored enriched extracts of sweet cherry fruits. *Nutrients* 2018;10. <https://doi.org/10.3390/nu10111688>.
- [20] Matusiewicz M, Bączek KB, Kosieradzka I, Niemiec T, Grodzik M, Szczepaniak J, et al. Effect of juice and extracts from *Saposhnikovia divaricata* root on the colon cancer cells Caco-2. *Int J Mol Sci* 2019;20. <https://doi.org/10.3390/ijms20184526>.
- [21] Boulaaba M, Mkadmini K, Tsolmon S, Han J, Smaoui A, Kawada K, et al. In vitro antiproliferative effect of arthrocnemum indicum extracts on CACO-2 cancer cells through cell cycle control and related phenol LC-TOF-MS Identification. Evidence-Based Complement Altern Med 2013;2013. <https://doi.org/10.1155/2013/529375>.
- [22] Engelbrecht AM, Mattheyse M, Ellis B, Loos B, Thomas M, Smith R, et al. Proanthocyanidin from grape seeds inactivates the PI3-kinase/PKB pathway and induces apoptosis in a colon cancer cell line. *Cancer Lett* 2007;258:144–53. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2007.08.020>.
- [23] Sani HA, Rahmat A, Ismail M, Rosli R, Endrini S. Potential anticancer effect of red spinach (*Amaranthus gangeticus*) extract. *Asia Pac J Clin Nutr* 2004;13:396–400. [https://doi.org/10.1111/\(ISSN\)1440-6047/](https://doi.org/10.1111/(ISSN)1440-6047/).
- [24] Silva AM, Martins-Gomes C, Fangueiro JF, Andreani T, Souto EB. Comparison of antiproliferative effect of epigallocatechin gallate when loaded into cationic solid lipid nanoparticles against different cell lines. *Pharm Dev Technol* 2019;24:1243–9. <https://doi.org/10.1080/10837450.2019.1658774>.
- [25] Yu Y, Deng Y, Lu BM, Liu YX, Li J, Bao JK. Green tea catechins: A fresh flavor to anticancer therapy. *Apoptosis* 2014;19:1–18. <https://doi.org/10.1007/s10495-013-0908-5>.
- [26] Shih PH, Yeh CT, Yen GC. Effects of anthocyanidin on the inhibition of proliferation and induction of apoptosis in human gastric adenocarcinoma cells. *Food Chem Toxicol* 2005;43:1557–66. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2005.05.001>.
- [27] Zhang Y, Vareed SK, Nair MG. Human tumor cell growth inhibition by nontoxic anthocyanidins, the pigments in fruits and vegetables. *Life Sci* 2005;76:1465–72. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2004.08.025>.
- [28] Moore J, Yousef M, Tsiani E. Anticancer effects of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract and rosemary extract polyphenols. vol. 8. 2016. <https://doi.org/10.3390/nu8110731>.
- [29] Stevens JF, Revel JS, Maier CS. Mitochondria-centric review of polyphenol bioactivity in cancer models. *Antioxidants Redox Signal* 2018;29:1589–611. <https://doi.org/10.1089/ars.2017.7404>.

- [30] Joshua D. Lamberta RJE. The antioxidant and pro-oxidant activities of green tea polyphenols: a role in cancer prevention. *Arch Biochem Biophys* 2010;501:65–72. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2010.06.013>.
- [31] Elbling L, Weiss R-M, Teufelhofer O, Uhl M, Knasmueller S, Schulte-Hermann R, et al. Green tea extract and (–)-epigallocatechin-3-gallate, the major tea catechin, exert oxidant but lack antioxidant activities. *FASEB J* 2005;19:1–26. <https://doi.org/10.1096/fj.04-2915fje>.
- [32] Forester, Sarah C. Lambert JD. Antioxidant effects of green tea SARAH. *Mol Nutr Food Res* 2011;55:844–54. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201000641>.
- [33] Oikawa S, Furukawa A, Asada H, Hirakawa K, Kawanishi S. Catechins induce oxidative damage to cellular and isolated DNA through the generation of reactive oxygen species. *Free Radic Res* 2003;37:881–90. <https://doi.org/10.1080/1071576031000150751>.
- [34] Mármol I, Jiménez-Moreno N, Ancín-Azpilicueta C, Osada J, Cerrada E, Rodríguez-Yoldi MJ. A combination of Rosa canina extracts and gold complex favors apoptosis of caco-2 cells by increasing oxidative stress and mitochondrial dysfunction. *Antioxidants* 2020;9:1–12. <https://doi.org/10.3390/antiox9010017>.
- [35] Jiménez S, Gascón S, Luquin A, Laguna M, Ancin-Azpilicueta C, Rodríguez-Yoldi MJ. Rosa canina extracts have antiproliferative and antioxidant effects on caco-2 human colon cancer. *PLoS One* 2016;11:1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159136>.
- [36] Ma Q. Role of Nrf2 in oxidative stress and toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2013;53:401–26. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-011112-140320>.
- [37] Hayes JD, Dinkova-Kostova AT. The Nrf2 regulatory network provides an interface between redox and intermediary metabolism. *Trends Biochem Sci* 2014;39:199–218. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2014.02.002>.
- [38] Schmidt HHHW, Stocker R, Vollbracht C, Paulsen G, Riley D, Daiber A, et al. Antioxidants in Translational Medicine. *Antioxidants Redox Signal* 2015;23:1130–43. <https://doi.org/10.1089/ars.2015.6393>.
- [39] Huang Y, Li W, Su Z yuan, Kong ANT. The complexity of the Nrf2 pathway: Beyond the antioxidant response. *J Nutr Biochem* 2015;26:1401–13. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2015.08.001>.
- [40] Chen G, Gharib TG, Huang CC, Taylor JMG, Misek DE, Kardia SLR, et al. Discordant protein and mRNA expression in lung adenocarcinomas. *Mol Cell Proteomics* 2002;1:304–13. <https://doi.org/10.1074/mcp.M200008-MCP200>.
- [41] Kweon MH, Adhami VM, Lee JS, Mukhtar H. Constitutive overexpression of Nrf2-dependent heme oxygenase-1 in A549 cells contributes to resistance to apoptosis induced by epigallocatechin 3-gallate. *J Biol Chem* 2006;281:33761–72. <https://doi.org/10.1074/jbc.M604748200>.
- [42] Ho IYM, Abdul Aziz A, Mat Junit S. Evaluation of Anti-proliferative Effects of Barringtonia racemosa and Gallic Acid on Caco-2 Cells. *Sci Rep* 2020;10:1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-66913-x>.
- [43] Rameshprabu Nallathambi, Alexander Poulev, Joshua B. Zuk IR. Proanthocyanidin-Rich Grape Seed Extract Reduces Inflammation and Oxidative Stress and Restores Tight Junction Barrier Function in Caco-2 Colon Cells. *Nutrients* 2020;12:1623. <https://doi.org/10.3390/nu12061623>.
- [44] Aherne SA, Kerry JP, O’Brien NM. Effects of plant extracts on antioxidant status and oxidant-induced stress in Caco-2 cells. *Br J Nutr* 2007;97:321–8. <https://doi.org/10.1017/S0007114507250469>.

- [45] Ratcliffe PJ, O'Rourke JF, Maxwell PH, Pugh CW. Oxygen sensing, hypoxia-inducible factor-1 and the regulation of mammalian gene expression. *J Exp Biol* 1998;201:1153–62.
- [46] Chandel NS, Maltepe E, Goldwasser E, Mathieu CE, Simon MC, Schumacker PT. Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:11715–20. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.20.11715>.
- [47] Chandel SN, McClintock DS, Feliciano CE, Wood TM, Melendez JA, Rodriguez AM, et al. Remodeling of Yeast Genome Expression in Response to Environmental Changes. *Mol Biol Cell* 2001;12:323–37. <https://doi.org/10.1091/mbc.12.2.323>.
- [48] Navdeep S. Chandel, David S. McClintock, Carlos E. Feliciano TMW, J. Andres Melendez, Ana M. Rodriguez and PTS. Reactive Oxygen Species Generated at Mitochondrial Complex III Stabilize Hypoxia-inducible Factor-1a during Hypoxia. *J Biol Chem* 2000;275:25130–8. <https://doi.org/10.1074/jbc.M001914200>.
- [49] Brunelle JK, Bell EL, Quesada NM, Vercauteren K, Tiranti V, Zeviani M, et al. Oxygen sensing requires mitochondrial ROS but not oxidative phosphorylation. *Cell Metab* 2005;1:409–14. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2005.05.002>.
- [50] Pryor WA, Squadrito GL. The chemistry of peroxynitrite: A product from the reaction of nitric oxide with superoxide. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol* 1995;268. <https://doi.org/10.1152/ajplung.1995.268.5.1699>.
- [51] Hornik P, Milde D, Trenz Z, Vysloužil K, Stučka V. Colon tissue concentrations of copper, iron, selenium, and zinc in colorectal carcinoma patients. *Chem Pap* 2006;60:297–301. <https://doi.org/10.2478/s11696-006-0052-6>.
- [52] Sutton HC, Winterbourn CC. On the participation of higher oxidation states of iron and copper in fenton reactions. *Free Radic Biol Med* 1989;6:53–60. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(89\)90160-3](https://doi.org/10.1016/0891-5849(89)90160-3).
- [53] Ahmad A, Syed FA, Singh S, Hadi SM. Prooxidant activity of resveratrol in the presence of copper ions: Mutagenicity in plasmid DNA. *Toxicol Lett* 2005;159:1–12. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2005.04.001>.
- [54] Sambuy, Y. et al. The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. *Cell Biology and Toxicology*. 2005; 21: 1-26. Doi: 10.1007/s10565-005-0085-6.
- [55] Atsumi, T., S. Fujisawa, and K. Tonosaki. "A comparative study of the antioxidant/prooxidant activities of eugenol and isoeugenol with various concentrations and oxidation conditions." *Toxicology in vitro* 19.8 (2005): 1025-1033.
- [56] Xi, Xiaomin, et al. "The Biphasic Effect of Flavonoids on Oxidative Stress and Cell Proliferation in Breast Cancer Cells." *Antioxidants* 11.4 (2022): 622.

FIGURES

Figure 1

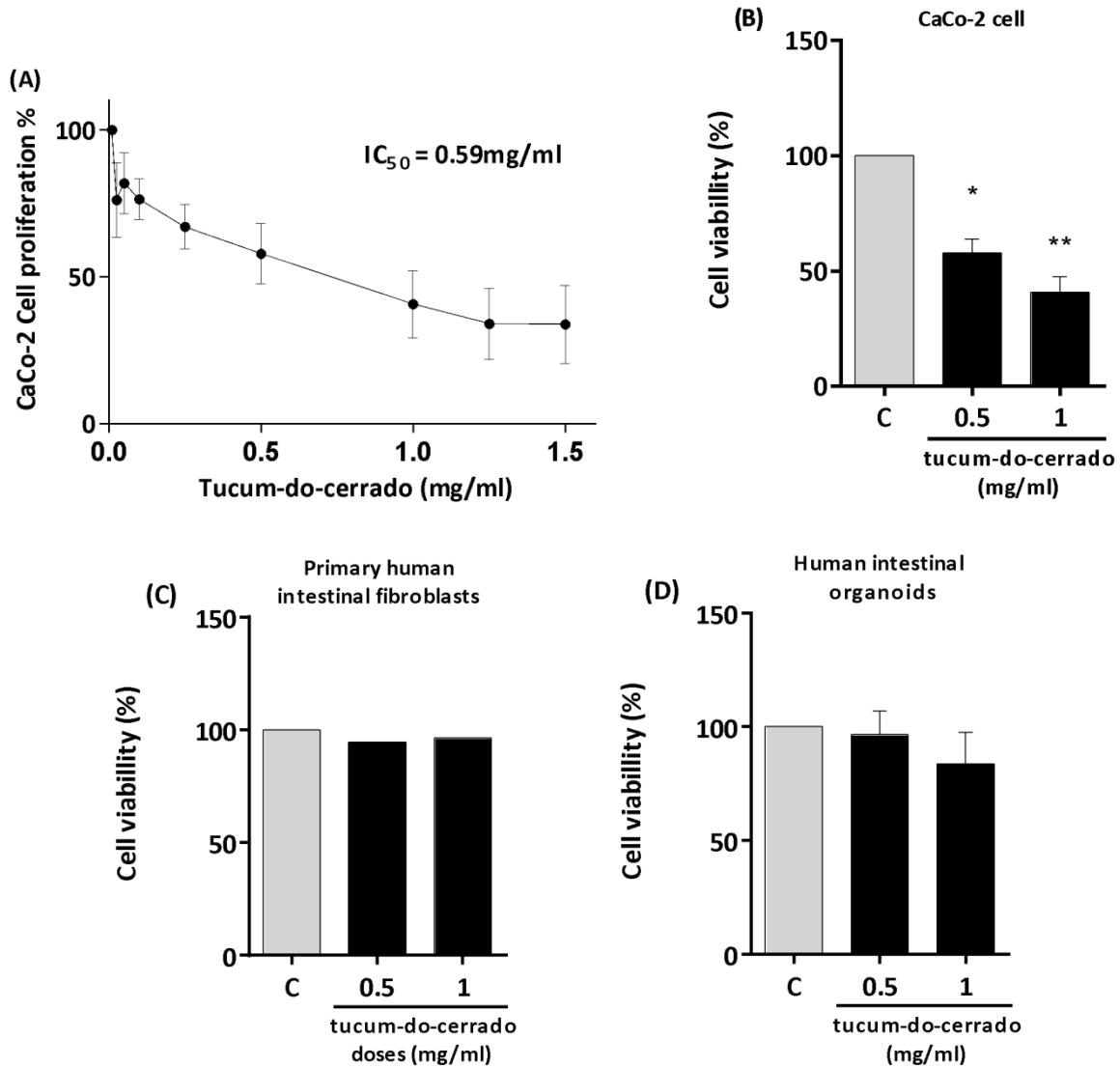


Figure 1. IC₅₀ of tucum aqueous extract for Caco-2 cells (A) after a 24 h exposure of different concentrations (25, 50, 100, 250, 500, 1,000, 1,250 µg/mL). n=3. Results expressed in mean ± SEM. WST-1 cell viability assay to evaluate proliferation of Caco-2 cells (B) n=3, Human intestinal organoids (C) n=2 and Primary human intestinal fibroblasts (D) n=1 exposed to aqueous extract of tucum-do-cerrado (0.5 and 1 mg/mL) for 24 h. Results expressed in mean ± SEM, p<0.05.

Figure 2

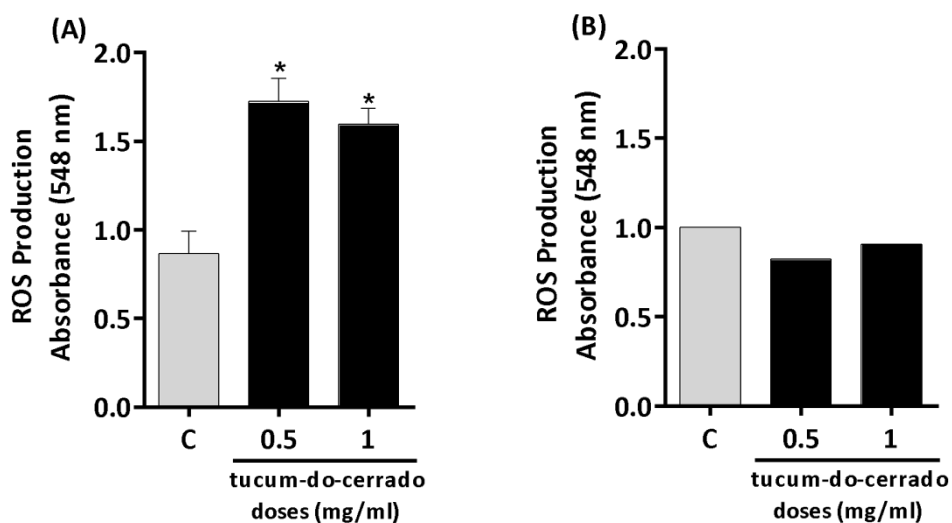
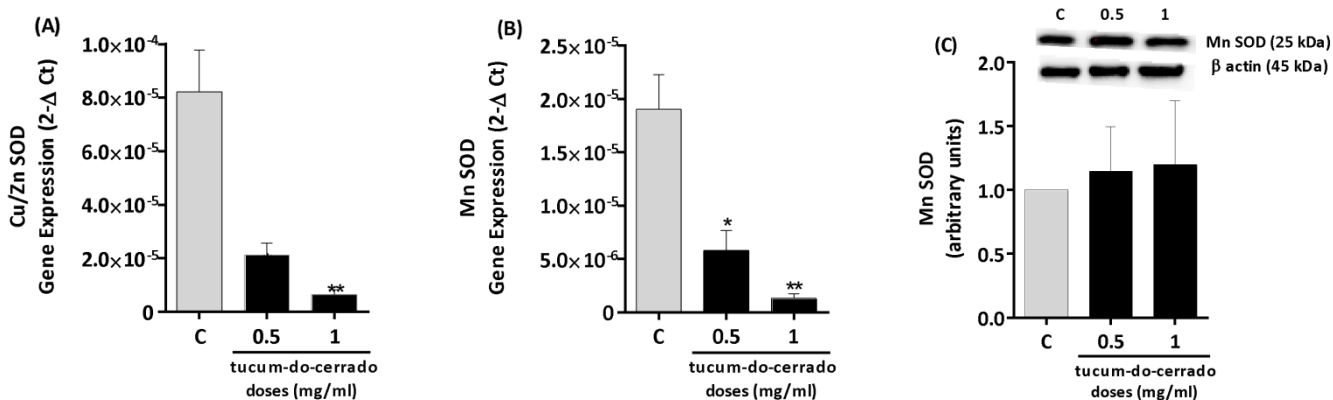


Figure 2. Mitochondrial ROS production quantified by the MitoSOX. **(A)** Caco-2 cells exposed to aqueous extract of tucum-do-cerrado (0.5 and 1 mg/mL) for 24 h. n=3. Results expressed in mean \pm SEM, $p < 0.05$. **(B)** Primary human intestinal fibroblasts exposed to aqueous extract of tucum-do-cerrado (0.5 and 1 mg/mL) for 24h. DMEM medium were without fetal bovine serum. n=1.

Figure 3



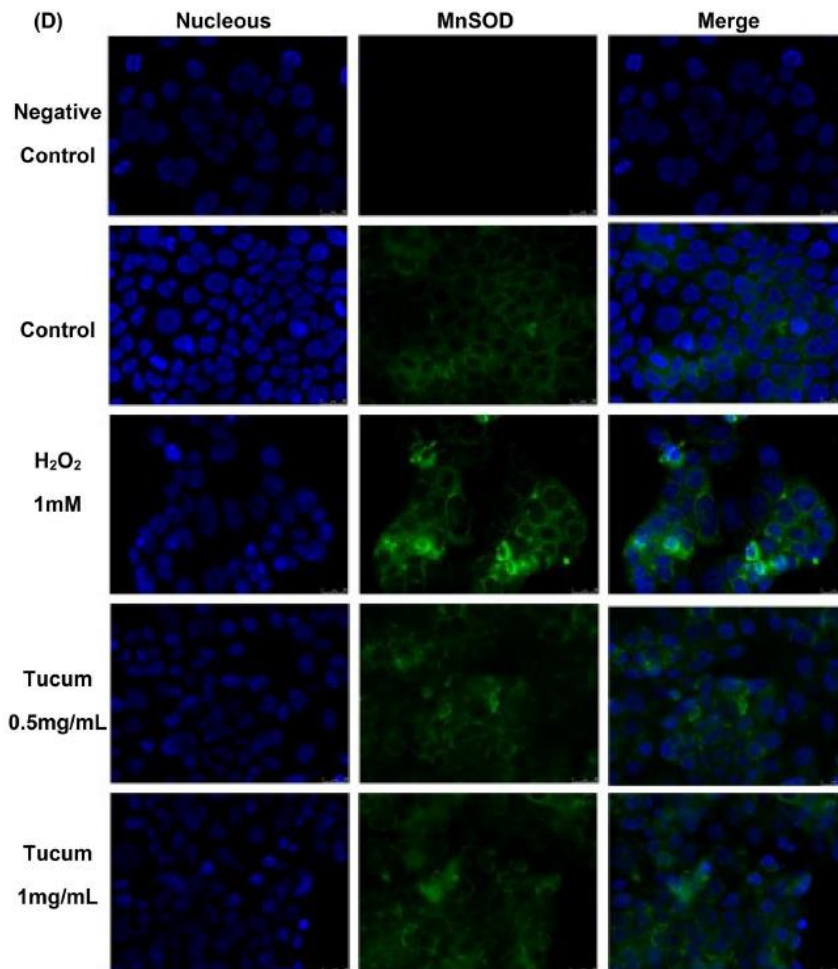


Figure 3. Tucum extract exposure downregulates Cu/Zn SOD (SOD1) and MnSOD (SOD2) genes in Caco-2 cells. **(A and B)** Cu/Zn SOD and MnSOD gene expression (qPCR-RT) and **(C)** MnSOD protein expression (Western Blot). CaCo-2 cells were exposed to aqueous extract of tucum-do-cerrado (0.5 and 1mg/mL) for 24h in DMEM medium without fetal bovine serum. Control represents cells exposed to medium alone. Results expressed in mean \pm SEM. **(D)** Immunofluorescence analysis for mitochondrial MnSOD expression (green staining) on Caco-2 cells exposed for 24 h with aqueous extract of tucum-do-cerrado (0.5 and 1 mg/mL). Negative control are cells without secondary antibody. Positive control are Caco-2 cells exposed to 1 mM H₂O₂. Scale bar = 25 μ m. The qPCR-RT experiments were performed with two biological replicates, each with N=4. The western blot was performed with one gel containing samples from two experiments performed in different days.

Figure 4

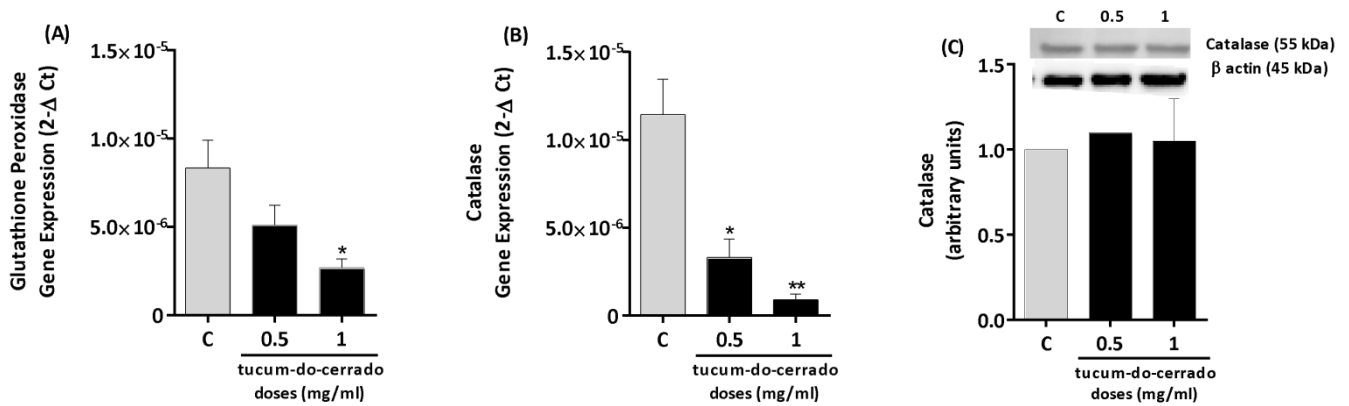
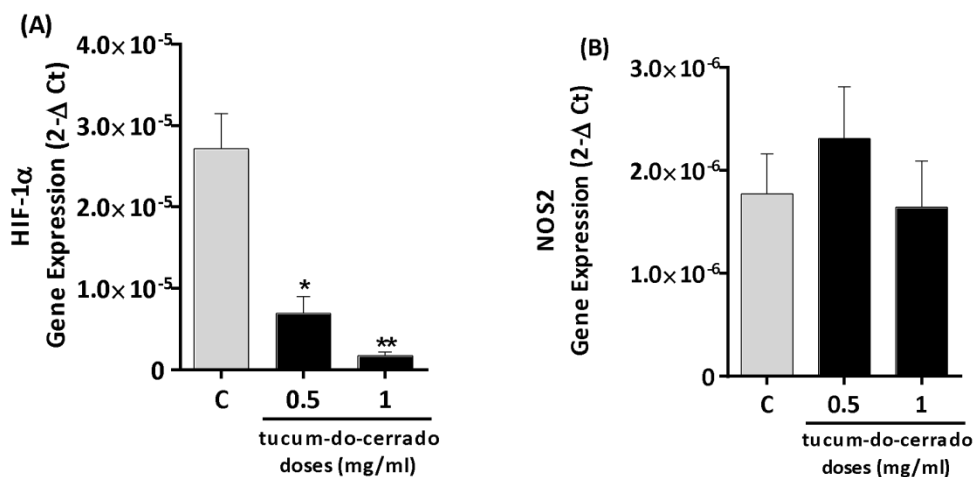


Figure 4. Tucum extract exposure downregulates glutathione peroxidase 1 (GPx1) and catalase genes in Caco-2 cells. **(A and B)** GPx1 and catalase gene expression (qPCR-RT) and **(C)** catalase protein expression. Caco-2 cells were exposed to aqueous extract of tucum-do-cerrado (0.5 and 1mg/mL) for 24h in DMEM medium without fetal bovine serum. Control represents cells exposed to medium alone. Results expressed in mean \pm SEM. The qPCR-RT experiments were performed with two biological replicates, each with N=4. The western blot was performed with one gel containing samples from two experiments performed in different days.

Figure 5



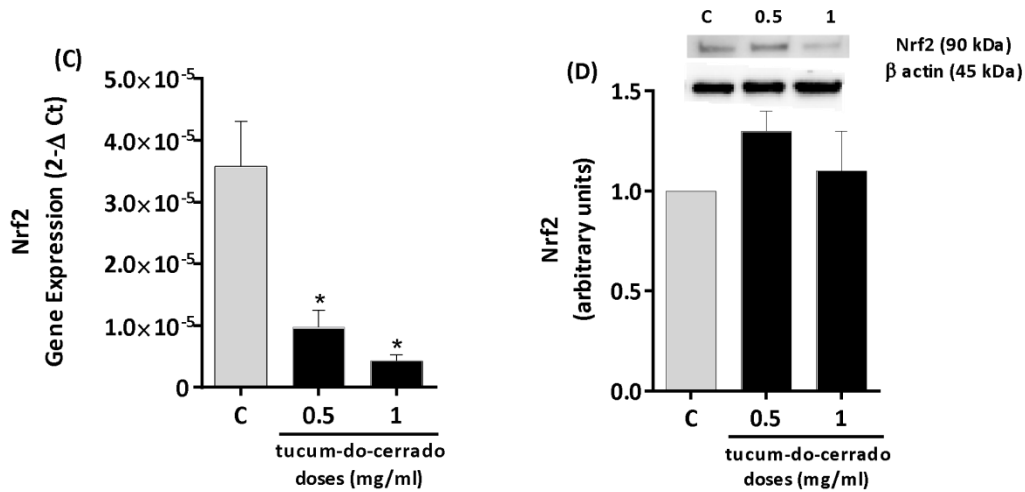


Figure 5. HIF-1 α , NOS2 and Nrf2 gene expression in Caco-2 cells exposed to tucum-do-cerrado extract. (A, B and C) HIF-1 α , NOS2 and Nrf2 gene expression (qPCR-RT), respectively. (D) Nrf2 protein expression. Caco-2 cells were exposed to aqueous extract of tucum-do-cerrado (0.5 and 1mg/mL) for 24h in DMEM medium without fetal bovine serum. Control represents cells exposed to medium alone. Results expressed in mean \pm SEM. The qPCR-RT experiments were performed with two biological replicates, each with N=4. The western blot was performed with one gel containing samples from two experiments performed in different days.

TABLES

Table 1: Sequences of the oligonucleotides used for qPCR reaction

Gene name	Gene	Amplicon size		Oligonucleotides sequence (5'-3')
18S ribosomal RNA	18S	110	F	<i>CGGCTACCACATCCAAGGA</i>
			R	<i>CCAATTACAGGGCCTCGAAA</i>
Superoxide Dismutase [Cu/Zn]	SOD1	82	F	<i>CCGTACAATGGTGGTCCATGA</i>
			R	<i>CCCAGCATTTCAGTCTTTGTACT</i>
Superoxide Dismutase [Mn]	SOD2	79	F	<i>CACCGAGGAGAAGTACCACGA</i>
			R	<i>GAACTTCAGTGCAGGCTGAAG</i>
Catalase	CAT	77	F	<i>CCCGCATCCAGGCTCTT</i>
			R	<i>GCCGGCCTGCGTGTAG</i>
Glutathione Peroxidase	GPX1	537	F	<i>CAGCAGGGTTTCTATGTCAGGTT</i>
			R	<i>CCCGTGCGAGGTACAG</i>
Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2	NRF2	115	F	<i>AGCCCAGCACATCCAGACA</i>
			R	<i>TGTCTCTGCCAAAAGCTGCAT</i>
Nitric Oxide Synthase 2	NOS2	78	F	<i>GGC TCA AAT CTC GGC AGA ATC</i>
			R	<i>GGC CAT CCT CAC AGG AGA GTT</i>
Hypoxia-inducible factor 1-alpha	HIF1A	82	F	<i>TGAACATAAAGTCTGCAACTGGA</i>
			R	<i>TGAGGTTGGTTACTGTTGGTATCATATA</i>

Annealing temperature for primers were 60°C.

Table 2 – Main classes of phenolic compounds identified and quantified in aqueous extracts of tucum-do-cerrado peel by HPLC-DAD.

Class	Subclass	Hypothesis	Amount mg/100 FW
Phenolic acids	Benzoic Acids	Galic acid derivative	61.46
		Galic acid derivative	0.65
	Cinnamic Acids	Caffeic	1.95
Flavonoids	Anthocyanins	Cyanidin derivative	25.13
		Cyanidin derivative	71.44
		Cyanidin derivative	6.52
		Cyanidin derivative	1.74
	Flavonols	ND	
	Flavan-3-ols	Catechin derivative	214.61
		Catechin derivative	88.97
	Flavanones	ND	
	Flavones	Rutin	60.56
Rutin derivative		8.19	
Isoflavones	ND		

Data Source: Rosa, Fernanda R., *et al. Nutrients* 8 (2016): 110. ND: note detected.

6. CONCLUSÃO

O presente estudo conclui, com base nos experimentos realizados e de acordo com o encontrado previamente na literatura científica, que o extrato aquoso da casca do tucum-do-cerrado foi capaz de aumentar o crescimento celular de levedura *S. cerevisiae* da cepa BY4741 selvagens que foram estressadas com menadiona e H₂O₂. Entretanto, o mesmo resultado não foi observado nas células de leveduras mutantes sem a presença do fator de transcrição Yap1. De acordo com esses resultados, se presume que a proteção desempenhada pelo extrato do tucum nas células estressadas é, provavelmente, através da via de sinalização desse fator de transcrição.

Além disso, os experimentos realizados em células de leveduras demonstraram que os compostos presentes no extrato do tucum reduzem a progressão celular sem causar a morte dessas células.

Quando testado em células intestinais, o extrato aquoso do tucum demonstrou que os compostos encontrados em sua composição atuam provavelmente como antioxidantes e pró-oxidantes simultaneamente, de acordo com o tipo celular testado. Em células de carcinoma intestinal (Caco-2), o extrato demonstra ação prioritária pró-oxidante, reduzindo a viabilidade celular. Os resultados mostram que essa ação antiproliferativa do extrato nas células cancerígenas do cólon intestinal acontece possivelmente através do aumento de produção de espécies reativas de oxigênio.

Em ambos os modelos experimentais, os estudos realizados demonstram que o extrato aquoso do tucum-do-cerrado não apresenta efeitos negativos em baixas concentrações para células consideradas normais. Além disso, em ambos os modelos, o extrato parece desempenhar um papel protetivo para o estresse oxidativo e potencial para o tratamento anti-câncer.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ainda que a importância do tucum-do-cerrado já esteja muito bem estabelecida por seu alto teor de antioxidantes quando comparado a outras frutas encontradas no cerrado brasileiro, os mecanismos de ação desse extrato necessitam de maiores investigações para que seja mais bem compreendido e para que os papéis desenvolvidos por compostos específicos contidos nele sejam revelados a fim de demonstrar como afetam a atividade do objeto desse estudo.

Os resultados observados em células intestinais demonstram um importante ponto de vista para as pesquisas que buscam compostos que são capazes de reduzir o crescimento de células tumorais.

Para os estudos futuros, sugerimos que o uso de outras linhagens celulares tanto de leveduras como de células humanas possam ser testadas a fim de elucidar a capacidade do extrato em diversos tecidos. Além disso, estudos mais aprofundados nas linhagens testadas no presente estudo seriam de grande importância para que os mecanismos envolvidos possam ser mais bem compreendidos e explicados.

Em nosso projeto inicial, tivemos também o objetivo de realizar experimentos para quantificar a atividade enzimática da Catalase, SOD, GR, GPx e GST nas cepas de levedura *Saccharomyces cerevisiae* nos grupos experimentais realizados nesse estudo. Entretanto, devido a pandemia e algumas dificuldades técnicas, não pudemos finalizar. Esperamos que os próximos projetos possam envolver a elucidação desse objetivo.

Esperamos que os resultados aqui encontrados sirvam como caminho para novos estudos do tucum-do-cerrado como um fruto com enorme potencial.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AEBI, H. **Oxygen Radicals in Biological Systems**. *Methods in Enzymology*, [s.l.], v. 105, n° 1947, p. 121–126, 1984. ISBN: 9780121820053, ISSN: 00766879, DOI: 10.1016/S0076-6879(84)05016-3.
- AHERNE, S. A.; KERRY, J. P.; O'BRIEN, N. M. **Effects of plant extracts on antioxidant status and oxidant-induced stress in Caco-2 cells**. *British Journal of Nutrition*, [s.l.], v. 97, n° 2, p. 321–328, 2007. ISSN: 00071145, DOI: 10.1017/S0007114507250469.
- ARMSTRONG, J. S. **Mitochondria: A target for cancer therapy**. *British Journal of Pharmacology*, [s.l.], v. 147, n° 3, p. 239–248, 2006. ISBN: 0007-1188 (Print)r0007-1188 (Linking), ISSN: 00071188, DOI: 10.1038/sj.bjp.0706556.
- AUESUKAREE, C. **Molecular mechanisms of the yeast adaptive response and tolerance to stresses encountered during ethanol fermentation**. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, [s.l.], v. 124, n° 2, p. 133–142, 2017. ISBN: 1347-4421 (Electronic)1347-4421 (Linking), ISSN: 13474421, DOI: 10.1016/j.jbiosc.2017.03.009.
- BAILÃO, E. F. L. C. et al. **Bioactive compounds found in Brazilian cerrado fruits**. *International Journal of Molecular Sciences*, [s.l.], v. 16, n° 10, p. 23760–23783, 2015. ISSN: 14220067, DOI: 10.3390/ijms161023760.
- BOEING, J. S. et al. **Chemical characterization and protective effect of the *Bactris setosa* Mart. fruit against oxidative/nitrosative stress**. *Food Chemistry*, [s.l.], v. 220, p. 427–437, 2017. ISSN: 18737072, DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.09.188.
- BÖHM, V. et al. **From carotenoid intake to carotenoid blood and tissue concentrations – implications for dietary intake recommendations**. *Nutrition Reviews*, Vol. 79(5):544–573. doi: 10.1093/nutrit/nuaa008.
- CABRERO MANRESA, M. et al. **Hydroxylases regulate intestinal fibrosis through the suppression of ERK mediated TGF- β 1 signaling**. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, [s.l.], p. ajpgi.00229.2016, 2016. ISSN: 1522-1547, DOI: 10.1152/ajpgi.00229.2016.
- CAMPOS, N. A.; CUNHA, M. S. B. DA; ARRUDA, S. F. **Tucum-do-cerrado (*Bactris setosa* Mart.) modulates oxidative stress, inflammation, and apoptosis-related proteins in rats treated with azoxymethane**. *PLoS ONE*, [s.l.], v. 13, n° 11, p. 1–20, 2018. ISBN: 1111111111, ISSN: 19326203, DOI: 10.1371/journal.pone.0206670.

- CAROLINE, D. et al. **Antioxidant Protection of Resveratrol and Catechin in *Saccharomyces cerevisiae***. [s.l.], p. 4268–4272, 2008.
- CHANDEL, N. S. et al. **Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription**. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, [s.l.], v. 95, n° 20, p. 11715–11720, 1998. ISSN: 00278424, DOI: 10.1073/pnas.95.20.11715.
- CHANDEL, S. N. et al. **Remodeling of Yeast Genome Expression in Response to Environmental Changes**. *Molecular Biology of the Cell*, [s.l.], v. 12, n° 2, p. 323–337, 2001. ISBN: 1059-1524, ISSN: 1059-1524, DOI: 10.1091/mbc.12.2.323.
- CHELIKANI, P.; FITA, I.; LOEWEN, P. C. **Diversity of structures and properties among catalases**. *Cellular and Molecular Life Sciences*, [s.l.], v. 61, n° 2, p. 192–208, 2004. ISBN: 1420-682X, ISSN: 1420682X, DOI: 10.1007/s00018-003-3206-5.
- CHUNG, K. T. et al. **Tannins and human health: A review**. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, [s.l.], v. 38, n° 6, p. 421–464, 1998. ISSN: 10408398, DOI: 10.1080/10408699891274273.
- CROFT, K. D. **Dietary polyphenols: Antioxidants or not?** *Archives of Biochemistry and Biophysics*, [s.l.], v. 595, p. 120–124, 2016. ISSN: 10960384, DOI: 10.1016/j.abb.2015.11.014.
- CROMPTON, M. **The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death**. *Biochemical Journal*, [s.l.], v. 341, n° 2, p. 233–249, 1999. ISSN: 02646021, DOI: 10.1042/0264-6021:3410233.
- DALVI, L. T. **Estudo da capacidade antioxidante do polifenol ácido elágico in vitro e em *Saccharomyces cerevisiae* selvagem e deficiente em superóxido dismutase 1**. [s.l.], 2014.
- DANSEN, T. B.; WIRTZ, K. W. A. **The peroxisome in oxidative stress**. *IUBMB Life*, [s.l.], v. 51, n° 4, p. 223–230, 2001. ISSN: 15216543, DOI: 10.1080/152165401753311762.
- DELAUNAY, AGNÈS; PFLIEGER, DELPHINE; BARRAULT, MARIE-BENEDICTE; VINH, JOELLE; TOLEDANO, M. B. **A Thiol Peroxidase Is an H₂O₂ Receptor and Redox-Transducer in Gene Activation**. *Cell*, [s.l.], v. 11, p. 471–481, 2002. ISSN: 15292908, DOI: 10.1038/ni0108-15.
- DING, J. et al. **Tolerance and stress response to ethanol in the yeast *Saccharomyces cerevisiae***. *Applied Microbiology and Biotechnology*, [s.l.], v. 85, n° 2, p. 253–263, 2009. ISBN: 1432-0614 (Electronic)n0175-7598 (Linking), ISSN: 01757598, DOI:

10.1007/s00253-009-2223-1.

DUTHIE, G. G.; DUTHIE, S. J.; KYLE, J. A. M. **Plant polyphenols in cancer and heart disease: implications as nutritional antioxidants.** *Nutrition Research Reviews*, [s.l.], v. 13, n° 01, p. 79, 2000. ISBN: 0954422001087, ISSN: 0954-4224, DOI: 10.1079/095442200108729016.

ELBLING, L. et al. **Green tea extract and (–)-epigallocatechin-3-gallate, the major tea catechin, exert oxidant but lack antioxidant activities.** *The FASEB Journal*, [s.l.], v. 19, n° 7, p. 1–26, 2005. ISSN: 0892-6638, DOI: 10.1096/fj.04-2915fje.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY, E. **Scientific Opinion on Dietary Reference Values for vitamin C.** *EFSA Journal*, [s.l.], v. 11, n° 11, p. 1–68, 2013. ISSN: 18314732, DOI: 10.2903/j.efsa.2013.3418.

FANK-DE-CARVALHO, S. M. N. S. S.; MARCHIORETTO, M. S. M. S. N. B. **Plant Structure in the Brazilian Neotropical Savannah Species.** *Biodiversity in Ecosystems—Linking Structure and Function*, [s.l.], p. 425–459, 2015. ISBN: 9789537619992, DOI: 10.5772/32009.

FORESTER, SARAH C. LAMBERT, J. D. **Antioxidant effects of green tea SARAH.** *Mol Nutr Food Res.*, [s.l.], v. 55, n° 6, p. 844–854, 2011. DOI: 10.1002/mnfr.201000641.

FORMAN, H. J.; DAVIES, K. J. A.; URSINI, F. **How do nutritional antioxidants really work: Nucleophilic tone and para-hormesis versus free radical scavenging in vivo.** *Free Radical Biology and Medicine*, [s.l.], v. 66, p. 24–35, 2014. ISSN: 18734596, DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.05.045.

FREI, B.; STOCKER, R.; AMES, B. N. **Antioxidant defenses and lipid peroxidation in human blood plasma.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, [s.l.], v. 85, n° 24, p. 9748–9752, 1988. ISBN: 0021-9568, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/pnas.85.24.9748.

FUKAI, T.; USHIO-FUKAI, M. **Superoxide Dismutases: Role in Redox Signaling, Vascular Function, and Diseases.** *Antioxidants & Redox Signaling*, [s.l.], v. 15, n° 6, p. 1583–1606, 2011. ISBN: 1557-7716 (Electronic)r1523-0864 (Linking), ISSN: 1523-0864, DOI: 10.1089/ars.2011.3999.

FUSTINONI-REIS, A. M. et al. **Tucum-do-cerrado (Bactris setosa mart.) consumption modulates iron homeostasis and prevents iron-induced oxidative stress in the Rat Liver.** *Nutrients*, [s.l.], v. 8, n° 2, 2016. ISBN: 2072-6643 (Electronic)r2072-6643 (Linking), ISSN: 20726643, DOI: 10.3390/nu8020038.

GIATROMANOLAKI, A. et al. **Hypoxia inducible factor 1 α and 2 α overexpression in inflammatory bowel disease.** *Journal of Clinical Pathology*, [s.l.], v. 56, n^o 3, p. 209–213, 2003. ISBN: 0021-9746 (Print)r0021-9746 (Linking), ISSN: 00219746, DOI: 10.1136/jcp.56.3.209.

HALLIWELL, B. **Free Radicals in Biology and Medicine.** [s.l.], v. 141, n^o June, p. 312–322, 2006a. DOI: 10.1104/pp.106.077073.312.

_____. **Phagocyte-derived reactive species: salvation or suicide?** *Trends in Biochemical Sciences*, [s.l.], v. 31, n^o 9, p. 509–515, 2006b. ISBN: 0968-0004 (Print), ISSN: 09680004, DOI: 10.1016/j.tibs.2006.07.005.

HAN, D.; WILLIAMS, E.; CADENAS, E. **Mitochondrial respiratory chain-dependent generation of superoxide anion and its release into the intermembrane space.** *Biochemical Journal*, [s.l.], v. 353, n^o 2, p. 411–416, 2001. ISSN: 02646021, DOI: 10.1042/0264-6021:3530411.

HANHINEVA, K. et al. **Impact of dietary polyphenols on carbohydrate metabolism.** *International Journal of Molecular Sciences*, [s.l.], v. 11, n^o 4, p. 1365–1402, 2010. ISBN: 9780123984562, ISSN: 14220067, DOI: 10.3390/ijms11041365.

HAYES, J. D.; DINKOVA-KOSTOVA, A. T. **The Nrf2 regulatory network provides an interface between redox and intermediary metabolism.** *Trends in Biochemical Sciences*, [s.l.], v. 39, n^o 4, p. 199–218, 2014. ISSN: 09680004, DOI: 10.1016/j.tibs.2014.02.002.

HEIBEL, A. B. et al. **Tucum-do-cerrado (Bactris setosa Mart.) may enhance hepatic glucose response by suppressing gluconeogenesis and upregulating Slc2a2 via AMPK pathway, even in a moderate iron supplementation condition.** *Food Research International*, [s.l.], v. 113, n^o July, p. 433–442, 2018. ISSN: 18737145, DOI: 10.1016/j.foodres.2018.07.032.

HERMES-LIMA, M. **Role of Free Radicals.** [s.l.]: [s.n.], 2004. 319–368 p. ISBN: 047141090X.

HERRERO, E.; ROS, J.; BELLÍ, G.; CABISCOL, E. . **Redox control and oxidative stress in yeast cells.** *Biochimica et Biophysica Acta*, [s.l.], p. 1217–1235, 2008. ISSN: 09725210, DOI: 10.1016/j.bbagen.2007.12.004.

HO, I. Y. M.; ABDUL AZIZ, A.; MAT JUNIT, S. **Evaluation of Anti-proliferative Effects of Barringtonia racemosa and Gallic Acid on Caco-2 Cells.** *Scientific Reports*, [s.l.], v. 10, n^o 1, p. 1–13, 2020. ISSN: 20452322, DOI: 10.1038/s41598-020-66913-x.

HUANG, Y. et al. **The complexity of the Nrf2 pathway: Beyond the antioxidant response.** *Journal of Nutritional Biochemistry*, [s.l.], v. 26, n° 12, p. 1401–1413, 2015. ISSN: 18734847, DOI: 10.1016/j.jnutbio.2015.08.001.

IMLAY, J. A. **Pathways of Oxidative Damage.** *Annual Review of Microbiology*, [s.l.], v. 57, n° 1, p. 395–418, 2003. ISBN: 0066-4227 (Print)n0066-4227 (Linking), ISSN: 0066-4227, DOI: 10.1146/annurev.micro.57.030502.090938.

INSTITUTE OF MEDICINE. **Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids.** [s.l.]: National Academies Press, 2000. ISBN: 978-0-309-06935-9, ISSN: 00296643, DOI: 10.17226/9810.

JAMIESON, D. J. **Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.** *Yeast*, [s.l.], v. 14, n° 16, p. 1511–1527, 1998. ISBN: 0749-503X, ISSN: 0749-503X, DOI: 10.1002/(SICI)1097-0061(199812)14:16<1511::AID-YEA356>3.0.CO;2-S.

JIMÉNEZ, S. et al. **Rosa canina extracts have antiproliferative and antioxidant effects on caco-2 human colon cancer.** *PLoS ONE*, [s.l.], v. 11, n° 7, p. 1–14, 2016. ISSN: 19326203, DOI: 10.1371/journal.pone.0159136.

JOSHUA D. LAMBERTA, R. J. E. **The antioxidant and pro-oxidant activities of green tea polyphenols: a role in cancer prevention.** *Arch Biochem Biophys.*, [s.l.], v. 501, n° 1, p. 65–72, 2010. ISBN: 6176321972, ISSN: 15378276, DOI: 10.1016/j.abb.2010.06.013.

KIM, II-SUN; HO-YONG, SOHN; JIN, I. **Saccharomyces cerevisiae KNU5377 , menadione stress , adaptive response , cell rescue proteins , tre- Yeast cells have striking similarities to mammalian cells with respect to macromolecular and cellular organelles , and a large number of yeast proteins h.** [s.l.], v. 49, n° 5, p. 816–823, 2011. DOI: 10.1007/s12275-011-1154-6.

KRIS-ETHERTON, P. M. et al. **Bioactive Compounds in Foods: Their Role in the Prevention of Cardiovascular Disease and Cancer.** *The American Journal of Medicine*, [s.l.], v. 9343, n° 01, 2002. ISBN: 0002-9343, ISSN: 00029343, DOI: 10.1016/S0002-9343(01)00995-0.

KUMARI, S. et al. **Reactive Oxygen Species: A Key Constituent in Cancer Survival.** *Biomarker Insights*, [s.l.], v. 13, p. 1–9, 2018. ISSN: 11772719, DOI: 10.1177/1177271918755391.

KWEON, M. H. et al. **Constitutive overexpression of Nrf2-dependent heme oxygenase-1 in A549 cells contributes to resistance to apoptosis induced by epigallocatechin 3-gallate.** *Journal of Biological Chemistry*, [s.l.], v. 281, n° 44, p.

33761–33772, 2006. ISSN: 00219258, DOI: 10.1074/jbc.M604748200.

LEWANDOWSKA, U. et al. **Overview of metabolism and bioavailability enhancement of polyphenols.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, [s.l.], v. 61, n° 50, p. 12183–12199, 2013. ISBN: 1520-5118 (Electronic)r0021-8561 (Linking), ISSN: 00218561, DOI: 10.1021/jf404439b.

LIU, Z. et al. **Role of ROS and nutritional antioxidants in human diseases.** *Frontiers in Physiology*, [s.l.], v. 9, n° MAY, p. 1–14, 2018. ISSN: 1664042X, DOI: 10.3389/fphys.2018.00477.

LUCA, S. V. et al. **Bioactivity of dietary polyphenols: The role of metabolites.** *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, [s.l.], v. 60, n° 4, p. 626–659, 2019. ISSN: 15497852, DOI: 10.1080/10408398.2018.1546669.

LUSHCHAK, V. I. **Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification.** *Chemico-Biological Interactions*, [s.l.], v. 224, n° October, p. 164–175, 2014. ISBN: 0009-2797, ISSN: 18727786, DOI: 10.1016/j.cbi.2014.10.016.

MA, Q. **Role of Nrf2 in oxidative stress and toxicity.** *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, [s.l.], v. 53, n° 1, p. 401–426, 2013. ISSN: 03621642, DOI: 10.1146/annurev-pharmtox-011112-140320.

MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORAND, C.; RÉMÉSY, C. et al. **Polyphenols: food sources and bioavailability.** *The American Journal of Clinical Nutrition*, [s.l.], v. 79, n° 5, p. 727–747, 2004. ISSN: 0002-9165, 1938-3207.

MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORAND, C.; REMESY, C. et al. **Polyphenols - Food Sources and Bioavailability.pdf.** *Am J Clin Nutr*, [s.l.], v. 79, n° 5, p. 727–47, 2004. ISBN: 0002-9165 (Print)r0002-9165 (Linking), ISSN: 00029165, DOI: 10.1038/nature05488.

MARIANI, D. et al. **Involvement of glutathione transferases, Gtt1 and Gtt2, with oxidative stress response generated by H₂O₂ during growth of *Saccharomyces cerevisiae*.** *Redox Report*, [s.l.], v. 13, n° 6, p. 246–254, 2008. ISBN: 1351-0002, ISSN: 1351-0002, DOI: 10.1179/135100008X309028.

MÁRMOL, I. et al. **A combination of *Rosa canina* extracts and gold complex favors apoptosis of caco-2 cells by increasing oxidative stress and mitochondrial dysfunction.** *Antioxidants*, [s.l.], v. 9, n° 1, p. 1–12, 2020. ISSN: 20763921, DOI: 10.3390/antiox9010017.

MAY, J. M. et al. **Reduction of the ascorbyl free radical to ascorbate by thioredoxin reductase.** *Journal of Biological Chemistry*, [s.l.], v. 273, n° 36, p. 23039–23045, 1998.

ISBN: 0021-9258 (Print)r0021-9258 (Linking), ISSN: 00219258, DOI: 10.1074/jbc.273.36.23039.

MEISTER, A.; ANDERSON, M. E. **Glutathione**. *Annual review of biochemistry*, [s.l.], v. 52, p. 711–760, 1983. ISBN: 0066-4154, ISSN: 0066-4154, DOI: 10.1146/annurev.bi.52.070183.003431.

MENDONÇA, R. C. DE FELFILI, J. M. WALTER, B. M T. SILVA JÚNIOR, M. C. REZENDE, A. V. FILGUEIRAS, T. S. NOGUEIRA, P. E. FAGG, C. W. **lora Vascular do Bioma Cerrado**. [s.l.]: [s.n.], 2008. p. 422–442.

MINEAR, S. et al. **Curcumin inhibits growth of saccharomyces cerevisiae through iron chelation**. *Eukaryotic Cell*, [s.l.], v. 10, n° 11, p. 1574–1581, 2011. ISSN: 15359778, DOI: 10.1128/EC.05163-11.

NIKI, E.; TRABER, M. G. **A history of vitamin E**. *Annals of Nutrition and Metabolism*, [s.l.], v. 61, n° 3, p. 207–212, 2012. ISBN: 1421-9697 (Electronic)r0250-6807 (Linking), ISSN: 02506807, DOI: 10.1159/000343106.

NOOR, R.; MITTAL, S.; IQBAL, J. **Superdioxide dismutase - applications and relevance to human disease**. *Med Sci Monit*, [s.l.], v. 8, n° 9, p. RA210–RA215, 2002.

OIKAWA, S. et al. **Catechins induce oxidative damage to cellular and isolated DNA through the generation of reactive oxygen species**. *Free Radical Research*, [s.l.], v. 37, n° 8, p. 881–890, 2003. ISSN: 10715762, DOI: 10.1080/1071576031000150751.

OVASKAINEN, M.-L. et al. **Dietary intake and major food sources of polyphenols in Finnish adults**. *The Journal of Nutrition*, [s.l.], v. 138, n° 3, p. 562–566, 2008. ISSN: 1541-6100.

PELÁEZ-SOTO, A. et al. **Evaluation of the Ability of Polyphenol Extracts of Cocoa and Red Grape to Promote the Antioxidant Response in Yeast Using a Rapid Multiwell Assay**. *Journal of Food Science*, [s.l.], v. 82, n° 2, p. 324–332, 2017. ISBN: 1750-3841, ISSN: 17503841, DOI: 10.1111/1750-3841.13602.

RAMESHPRABU NALLATHAMBI, ALEXANDER POULEV, JOSHUA B. ZUK, I. R. **Proanthocyanidin-Rich Grape Seed Extract Reduces Inflammation and Oxidative Stress and Restores Tight Junction Barrier Function in Caco-2 Colon Cells**. *Nutrients*, [s.l.], v. 12, p. 1623, 2020. DOI: 10.3390/nu12061623.

RATCLIFFE, P. J. et al. **Oxygen sensing, hypoxia-inducible factor-1 and the regulation of mammalian gene expression**. *Journal of Experimental Biology*, [s.l.], v. 201, n° 8, p. 1153–1162, 1998. ISSN: 00220949.

REZAIIE, A.; PARKER, R. D.; ABDOLLAHI, M. **Oxidative stress and pathogenesis**

of inflammatory bowel disease: An epiphenomenon or the cause? *Digestive Diseases and Sciences*, [s.l.], v. 52, n° 9, p. 2015–2021, 2007. ISBN: 0163-2116, 1573-2568, ISSN: 01632116, DOI: 10.1007/s10620-006-9622-2.

RIO, D. DEL et al. **Dietary (poly)phenolics in human health: Structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases.** *Antioxidants and Redox Signaling*, [s.l.], v. 18, n° 14, p. 1818–1892, 2013. ISSN: 15230864, DOI: 10.1089/ars.2012.4581.

RÍO, L. A. DEL et al. **Metabolism of oxygen radicals in peroxisomes and cellular implications.** *Free Radical Biology and Medicine*, [s.l.], v. 13, n° 5, p. 557–580, 1992. ISSN: 08915849, DOI: 10.1016/0891-5849(92)90150-F.

RODRIGUES-POUSADA, CLAUDINA. MENEZES, REGINA A. PIMENTEL, C. **The Yap family and its role in stress response Claudina.** *Yeast*, [s.l.], v. 27, n° February, p. 245–258, 2010. DOI: 10.1002/yea.1752.

ROSA, F. R. et al. **Phytochemical compounds and antioxidant capacity of tucumdo-cerrado (*Bactris setosa* mart), Brazil's native fruit.** *Nutrients*, [s.l.], v. 8, n° 3, 2016. ISSN: 20726643, DOI: 10.3390/nu8030110.

SÁ, R. A. DE et al. **Brazilian propolis protects *saccharomyces cerevisiae* cells against oxidative stress.** *Brazilian Journal of Microbiology*, [s.l.], v. 44, n° 3, p. 993–1000, 2013. ISSN: 15178382, DOI: 10.1590/S1517-83822013000300050.

SCHIEBER, A.; STINTZING, F.; CARLE, R. **By-products of plant food processing as a source of functional compounds—recent developments.** *Trends in Food Science & Technology*, [s.l.], v. 12, n° 2001, p. 401–413, 2001. ISBN: 0924-2244, ISSN: 09242244, DOI: 10.1016/S0924-2244(02)00012-2.

SCHMIDT, H. H. H. W. et al. **Antioxidants in Translational Medicine.** *Antioxidants and Redox Signaling*, [s.l.], v. 23, n° 14, p. 1130–1143, 2015. ISSN: 15577716, DOI: 10.1089/ars.2015.6393.

SIES, H.; JONES, D. **Oxidative Stress.** *Encyclopedia of Stress*, [s.l.], p. 45–48, 2007. ISBN: 9780123739476, ISSN: 0370-629X, DOI: 10.1016/B978-012373947-6.00285-3.

SIQUEIRA, E. M. A. DE et al. **Brazilian Savanna Fruits Contain Higher Bioactive Compounds Content and Higher Antioxidant Activity Relative to the Conventional Red Delicious Apple.** *PLoS ONE*, [s.l.], v. 8, n° 8, p. 2–8, 2013. ISSN: 19326203, DOI: 10.1371/journal.pone.0072826.

TOLEDANO, M. B. et al. **Functions and Cellular Compartmentation of the Thioredoxin and Glutathione Pathways in Yeast.** *Antioxidants & Redox Signaling*,

[s.l.], v. 18, n° 13, p. 1699–1711, 2013. ISBN: 1557-7716, ISSN: 1523-0864, DOI: 10.1089/ars.2012.5033.

TORRES-FUENTES, C. et al. **A natural solution for obesity: bioactives for the prevention and treatment of weight gain. A review.** *Nutritional neuroscience*, [s.l.], v. 18, n° 2, p. 49–65, 2015. ISBN: 1476-8305 (Electronic)r1028-415X (Linking), ISSN: 1476-8305 (Electronic), DOI: 10.1179/1476830513Y.0000000099.

VALKO, M. et al. **Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer.** *Chemico-Biological Interactions*, [s.l.], v. 160, n° 1, p. 1–40, 2006. ISSN: 00092797, DOI: 10.1016/j.cbi.2005.12.009.

VALKO, Marian et al. **Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease.** *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, [s.l.], v. 39, n° 1, p. 44–84, 2007. ISBN: 1357-2725, ISSN: 13572725, DOI: 10.1016/j.biocel.2006.07.001.

WEBER, F. J.; BONT, J. A. M. De. **Adaptation mechanisms of microorganisms to the toxic effects of organic solvents on membranes.** *Biochimica et biophysica acta*, [s.l.], v. 1286, p. 225–245, 1996. ISBN: 0304-4157, ISSN: 03044157, DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4157\(96\)00010-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4157(96)00010-X).

WEI, Q. Y. et al. **Synergistic effect of green tea polyphenols with trolox on free radical-induced oxidative DNA damage.** *Food Chemistry*, [s.l.], v. 96, n° 1, p. 90–95, 2006. ISSN: 03088146, DOI: 10.1016/j.foodchem.2005.01.053.

WELLS, P. G. et al. **Oxidative stress in developmental origins of disease: Teratogenesis, neurodevelopmental deficits, and cancer.** *Toxicological Sciences*, [s.l.], v. 108, n° 1, p. 4–18, 2009. ISSN: 10966080, DOI: 10.1093/toxsci/kfn263.

WU, M. J. et al. **An antioxidant screening assay based on oxidant-induced growth arrest in *Saccharomyces cerevisiae*.** *FEMS Yeast Research*, [s.l.], v. 11, n° 4, p. 379–387, 2011. ISBN: 1567-1364 (Electronic)r1567-1356 (Linking), ISSN: 15671356, DOI: 10.1111/j.1567-1364.2011.00726.x.

YAN, C.; LEE, L. H.; DAVIS, L. I. **Crm1p mediates regulated nuclear export of a yeast AP-1-like transcription factor.** *EMBO Journal*, [s.l.], v. 17, n° 24, p. 7416–7429, 1998. ISBN: 0261-4189 (Print)r0261-4189 (Linking), ISSN: 02614189, DOI: 10.1093/emboj/17.24.7416.

YOSHINO, M.; MURAKAMI, K. **Interaction of iron with polyphenolic compounds: Application to antioxidant characterization.** *Analytical Biochemistry*, [s.l.], v. 257, n° 1, p. 40–44, 1998. ISBN: 0003-2697 (Print)0003-2697, ISSN: 00032697, DOI:

10.1006/abio.1997.2522.