

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA

MICAELA FEDERIZZI DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM RATOS COM
NEUROTOXICIDADE INDUZIDA PELA PROTEÍNA β -AMILÓIDE ($A\beta$) E
SUPLEMENTADOS COM EXTRATO DE YACON (*SMALLANTHUS
SONCHIFOLIUS*)**

**Uruguiana
2018**

MICAELA FEDERIZZI DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM RATOS COM
NEUROTOXICIDADE INDUZIDA PELA PROTEÍNA β -AMILÓIDE ($A\beta$) E
SUPLEMENTADOS COM EXTRATO DE YACON (*SMALLANTHUS
SONCHIFOLIUS*)**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Farmácia da
Universidade Federal do Pampa, como
requisito parcial para obtenção do Título de
Bacharel em Farmácia.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Vanusa Manfredini

Coorientador: Ms. Patrícia Martinez Oliveira

**Uruguiana
2018**

Micaela Federizzi de Oliveira

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM RATOS COM
NEUROTOXICIDADE INDUZIDA PELA PROTEÍNA β -AMILÓIDE (A β)
SUPLEMENTADOS COM EXTRATO DE YACON
(*Smallanthus sonchifolius*)**

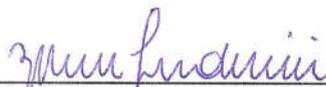
Trabalho de conclusão de curso
apresentado ao curso de Farmácia
da Universidade Federal do Pampa
(UNIPAMPA), como requisito parcial
para aprovação na disciplina de
Trabalho de Conclusão de Curso.

Orientador (a): Prof^a. Dr^a. Vanusa
Manfredini

Área de concentração: Farmácia

Trabalho de conclusão de curso defendido e aprovado em: 11 / 06 / 2018

Banca examinadora:



Prof^a. Dr^a. Vanusa Manfredini
Orientadora
Curso de Farmácia - UNIPAMPA



Prof^a. Dr^a. Cristiane Casagrande Denardin
Curso de Farmácia - UNIPAMPA



Msc^a. Deise Jaqueline Ströher
Curso de Farmácia - UNIPAMPA

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, á Deus, por escutar minhas orações e permitir que eu conquistasse tudo que almejei.

Agradeço a minha mãe Teresinha, pelo amor, dedicação e paciência, contribuindo para que eu possa ter um caminho mais fácil, e que me incentiva todos os dias a nunca pensar em desistir. A minha irmã Patrícia, que mesmo longe, me apoiou e indiretamente contribuiu para que esse trabalho se realizasse. Obrigada, amo vocês!!

Ao meu namorado Christian, por nunca deixar eu desacreditar que tudo daria certo, e pelo companheirismo. Te amo!

Aos meus amigos pelo apoio diário. Obrigada.

A minha orientadora Prof. Dra. Vanusa Manfredini, por me dar a oportunidade de realizar este trabalho, e pela confiança. Muito obrigada!!

Aos colegas do GESTOX, que de alguma maneira contribuíram, principalmente a Patrícia Martinez, que foi essencial na realização deste trabalho. Obrigada!!

“A persistência é o caminho do êxito”.

Charles Chaplin

RESUMO

A doença de Alzheimer (DA) é considerada a patologia neurodegenerativa mais frequente no mundo, e afetando principalmente idosos com idade superior a 65 anos, na qual o sistema nervoso central é comprometido. A DA é reconhecida pelo déficit de memória e pelo declínio da capacidade de raciocínio. O estresse oxidativo desempenha um importante papel no desenvolvimento e progressão da DA, e antioxidantes podem ser relevantes na prevenção e tratamento dessa doença, com isso, surge o Yacon, uma raiz tuberosa originada da região andina, rica em frutooligosacarídeos (FOS) e compostos fenólicos. Popularmente a raiz é consumida *in natura* e as folhas na forma de chá para o tratamento do diabetes e distúrbio do colesterol. No entanto, pouco se sabe sobre outras propriedades dessa planta. Assim, o objetivo deste trabalho foi investigar os efeitos neuroprotetores do Yacon na neurotoxicidade induzida por A β em ratos Wistar suplementados com extrato da folha e raiz do Yacon. Os animais dos grupos suplementados receberam o extrato por gavagem durante 14 dias consecutivos, no 15º dia os animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica para injeção intrahipocampal de β -amilóide (A β). A suplementação foi mantida por mais 10 dias, após os animais foram eutanasiados. Os marcadores de defesa antioxidante (CAT, SOD e GPx) foram avaliados no hipocampo através de metodologias clássicas. Os resultados encontrados mostraram um aumento estatisticamente significativo ($p < 0,05$) das defesas antioxidantes (CAT, SOD e GPx) no hipocampo de ratos tratados com o extrato da folha e raiz do Yacon em relação aos demais grupos. Com isso, sugere-se um possível efeito neuroprotetor do extrato do Yacon, uma vez que o estresse oxidativo é considerado uma das principais causas/consequências de neurotoxicidade e progressão da AD.

Palavras-Chave: Alzheimer, Defesas Antioxidantes, Yacon.

ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is considered to be a more common neurodegenerative disorder in the world, with the elderly being over 65 years old, in whom the central nervous system is compromised. AD is recognized by memory deficit and decline in reasoning ability. Oxidative stress plays an important role in the development and progression of AD, and antioxidants may be relevant in the prevention and treatment of the disease, resulting in yacon, a tuberous root originated from the Andean region, rich in fructooligosaccharides (FOS) and a compounds. Popularly the root is consumed in natura and as leaves in the way of making the treatment of diabetes and cholesterol disorder. However, little is said about the other properties of the plant. Thus, the objective of this work was to investigate the neuroprotective effects of yacon on A β -induced neurotoxicity in Wistar rats supplemented with leaf extract and yacon root. The animals in the supplemented groups received the probe extract for 14 consecutive days, on January 15, 1997, when they underwent intraocular β -amyloid (A β) injection surgery. Supplementation was performed for more than 10 days after the animals were euthanized. Antioxidant defense markers (CAT, SOD and GPx) were evaluated in the hippocampus through classical methodologies. The results obtained were a statistically significant ($p < 0.05$) significant of the antioxidants (CAT, SOD and GPx) without hippocampus of rats treated with leaf extract and yacon root in relation to the other groups. Therefore, a possible neuroprotective effect of yacon extract is suggested, since oxidative stress is one of the main causes / consequences of AD neurotoxicity and progression.

Keywords: Alzheimer's, Antioxidant Defenses, Yacon.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Raízes de Yacon	20
Figura 2 – Folhas de Yacon	21
Figura 3 – Biomarcadores de defesas antioxidantes.....	25

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- APP – Proteína precursora de amilóide
- A β – Peptídeo Beta-amilóide
- CAT – Catalase
- DA – Doença de Alzheimer
- ER – Espécies reativas
- ERN – Espécies reativas de Nitrogênio
- ERO – Espécies reativas de Oxigênio
- FOS – Frutooligossacarídeos
- GSH – Glutathiona
- GSH-Px– Glutathiona peroxidase
- GSH-Rd – Glutathiona redutase
- PPO – Enzima polifenol oxidase
- RL – Radicais livres
- SOD – Superóxido dismutase
- YL – Yacon Leaf (Folhas de Yacon)
- YR – Yacon Root (Raizes de Yacon)

SUMÁRIO

SUMÁRIO.....	10
1. INTRODUÇÃO	11
2. OBJETIVOS.....	13
2.1 GERAL	13
2.2 ESPECÍFICOS.....	13
3. REFERENCIAL TEÓRICO.....	14
2.1 DOENÇA DE ALZHEIMER	14
2.2 ESTRESSE OXIDATIVO.....	16
2.3 DEFESAS ANTIOXIDANTES	18
2.4 YACON.....	20
4. METODOLOGIA	23
5. APRESENTAÇÃO DA PESQUISA E ANÁLISE DOS RESULTADOS.....	25
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	27
REFERÊNCIAS.....	28

1. INTRODUÇÃO

A doença de Alzheimer (DA) é uma demência que está cada vez mais prevalente no mundo, sendo apontada como uma doença crônica e neurodegenerativa do sistema nervoso central, reconhecida pelo déficit de memória e pelo declínio da capacidade de raciocínio, aprendizagem, linguagem e outras funções cognitivas (NANAWARE *et al.*, 2017; WILLIAMSON *et al.*, 2017).

Durante o envelhecimento, essa neurodegeneração ocorre com mais facilidade e com diferentes intensidades, dependendo das características individuais de cada pessoa. Alguns fatores como processos inflamatórios, estresse oxidativo e resposta imune podem influenciar nesse processo (CHEN e ZHONG, 2014). Apesar da alta prevalência de DA em idosos, a população jovem também pode ser afetada. Na DA há presença de placas senis extracelular que são formadas por peptídeo beta-amilóide (A β) derivado da clivagem da proteína precursora de amilóide (APP) por β - e γ -secretases. A β se agrega facilmente, acumulando-se extracelularmente e formando as placas A β (CORRÊA-VELLOSO *et al.*, 2017; REITZ e MAYEUX, 2014).

Estudos mostram que o estresse oxidativo é uma condição relevante no início e avanço da DA. A possibilidade mais aceita é que o acúmulo de A β leva ao estresse oxidativo e vice-versa (CHEN e ZHONG, 2014). Como o estresse oxidativo é essencial no prosseguimento da DA, antioxidantes podem ser relevantes no tratamento dessa doença (ZHAO e ZHAO, 2013).

Antioxidante caracteriza-se como “qualquer substância que, quando presentes em baixas concentrações em comparação com as de um substrato oxidável, atrasa significativamente ou evita a oxidação do referido substrato” (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999).

Podem-se apontar dois tipos de antioxidantes: os endógenos e os exógenos, onde são responsáveis por auxiliar e reparar os danos nos tecidos causados pelos radicais livres, interrompendo sua formação, através da atividade sequestradora ou estimulando a sua decomposição, limitando o risco do aparecimento e desenvolvimento de novas doenças, como as neurodegenerativas (BHAT *et al.*, 2015; POPRAC *et al.*, 2017). Por isso, a ingestão de antioxidantes naturais tem sido associada a vários efeitos benéficos a saúde (GOMATHI *et al.*, 2012).

Conforme Sen *et al* (2010), o sistema de defesa antioxidante pode ser enzimático (catalase - CAT, superóxido dismutase - SOD, glutathionaperoxidase - GPx) ou não enzimático (glutathiona reduzida-GSH, vitamina C e E, polifenóis). Nesse contexto surge o Yacon (*Smallanthus sonchifolius*), uma raiz tuberosa (constituída principalmente de água, aproximadamente 70% do peso fresco, e carboidratos) oriunda da região Andina da América do Sul, que se adapta a diferentes solos e condições climáticas. Designa-se principalmente por ser rica em frutanos (inulina e fruto-oligossacarídeos), que agem como fibras solúveis, e ácidos fenólicos, essa composição química confere ao Yacon importantes efeitos prebiótico e antioxidante (BORGES *et al.*, 2012; SANTOS *et al.*, 2017). Estudos afirmam que tal raiz possui atividades hipoglicemiantes, e, popularmente, ela vem sendo utilizada principalmente para fins medicinais, áreas farmacêuticas e tecnológicas, e uso pessoal, por ser considerado um alimento funcional e benéfico à saúde (CORRÊA *et al.*, 2009).

2. OBJETIVOS

2.1 GERAL

- Avaliar a atividade antioxidante de ratos com neurotoxicidade induzida pela proteína β -amilóide ($A\beta$) suplementados com o extrato do Yacon (*Smallanthus sonchifolius*)

2.2 ESPECÍFICOS

- Determinar a atividade da enzima antioxidante catalase (CAT) no hipocampo de ratos induzida pela proteína β -amilóide ($A\beta$) suplementados com o extrato da folha e raiz do Yacon;

- Determinar a atividade da enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD) no hipocampo de ratos induzida pela proteína β -amilóide ($A\beta$) suplementados com o extrato do Yacon;

- Determinar a atividade da enzima antioxidante glutatona peroxidase (GPx) no hipocampo de ratos induzida pela proteína β -amilóide ($A\beta$) suplementados com o extrato do Yacon.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 DOENÇA DE ALZHEIMER

A doença de Alzheimer (DA) é a patologia neurodegenerativa mais prevalente no mundo, onde, estima-se que, aproximadamente, 24 milhões de pessoas já foram atingidas, estando os idosos entre as principais vítimas. A previsão é de que esse quantitativo cresça estrondosamente nos próximos anos (REITZ e MAYEUX, 2014). Tendo em vista que em torno de 90% dos casos têm início após os 65 anos de idade, considera-se que esta enfermidade tem o envelhecimento populacional como um fator de risco para o seu desenvolvimento. Deste modo, entendemos que a DA mantém relação diretamente proporcional ao aumento da idade (SAYEG, 2012).

A DA foi diagnosticada primeiramente em 1906, por Alois Alzheimer como um "processo de doença grave peculiar do córtex cerebral" (HIPPIUS e NEUNDÖRFER, 2003). Atualmente a DA é considerada uma doença crônica, progressiva e neurodegenerativa, caracterizada pelo déficit de memória e a queda de outras funções cognitivas, onde se destacam o pensamento, a percepção, a orientação, o raciocínio, a aprendizagem, a linguagem, a imaginação e o julgamento (NANAWARE, 2017).

Segundo Chen e Zhong (2014), a neurodegeneração ocorre com diferentes intensidades e de forma natural durante o envelhecimento, e depende das características distintas e específicas de cada pessoa. Alguns fatores como processos inflamatórios, estresse oxidativo e resposta imunológica podem influenciar nesse processo. Quando afetadas, as células neuronais específicas apresentam distúrbio e óbito, contribuindo diretamente para o desenvolvimento da DA (CORRÊA-VELLOSO *et al.*, 2017). Apesar de ser considerada uma doença de pessoas idosas, onde atinge uma faixa etária entre 65 e 85 anos, pode do mesmo modo afetar mais jovens (ZHOU *et al.*, 2016).

Na DA há a presença de placas senis extracelulares compostas de agregados filamentosos da proteína β -amiloide ($A\beta$). A $A\beta$ se agrega espontaneamente, acumulando-se extracelularmente e formando as placas $A\beta$ (CORRÊA-VELLOSO *et al.*, 2017). Fortes evidências sugerem que esse excesso de proteína $A\beta$ é um dos principais aspectos fisiopatológicos da DA, apesar da patogenia não estar totalmente

clara (ZHOU *et al.*, 2016). Por isso, estudos apontam que o falecimento costuma ocorrer entre 6 e 12 anos após o início da doença, normalmente por uma complicação da imobilidade ou por embolia pulmonar e pneumonia (HARDMAN *et al.*, 1996).

A perda da integridade do retículo endoplasmático ou a perturbação na função, devido ao estresse oxidativo, pode ser causada pelo acúmulo de proteínas não dobradas e por mudanças na homeostasia do cálcio dentro dessa organela (PASCHEN e FRANDSEN, 2001). Evidências indicam que as mitocôndrias possuem um papel indispensável em doenças neurodegenerativas, devido ao seu papel na regulação da morte celular (MICHAEL *et al.*, 2006). O aumento de relatos clínicos e experimentais sugere que o estresse oxidativo pode apresentar um papel importante na degeneração neuronal, em doenças como a DA (ALIEV *et al.*, 2013).

2.2 ESTRESSE OXIDATIVO

Radicais livres (RL) são produzidos naturalmente através do metabolismo aeróbico e exercem inúmeras funções biológicas. Quando há produção exacerbada dessas espécies que supera a capacidade antioxidante surge o estresse oxidativo (HALLIWELL e WHITEMAN, 2004; OTUNOLA *et al.*, 2014). O dano causado pelos radicais às biomoléculas pode ocasionar em alteração nas propriedades da membrana, disfunção protéica, mutações e até morte celular; devido esses efeitos o estresse oxidativo pode estar relacionado à doenças neurodegenerativas (FISCHER e MAIER, 2015).

A formação de radicais livres acontece via ação catalítica de enzimas, através dos processos de transferência de elétrons que ocorrem no metabolismo celular e pela exposição a fatores exógenos, como por exemplo, alcoolismo, dieta, tabagismo radiação e ultravioleta. Na condição de pró-oxidante a concentração desses radicais pode aumentar devido à deficiência dos mecanismos antioxidantes ou pela maior geração intracelular (CERUTTI, 1991).

Os RL caracterizam-se pela sua excessiva instabilidade e elevada reatividade e tendem ligar o elétron não-pareado, doando (redutores) ou retirando (oxidantes) elétrons a partir de outras moléculas próximas da sua formação (REIS *et al.*, 2008). Tais radicais livres cujo elétron desemparelhado situa-se centrado nos átomos de oxigênio ou nitrogênio são designados ERO (espécies reativas de oxigênio) e ERN (espécies reativas de nitrogênio).

Os mecanismos de geração de RL ocorrem principalmente nas mitocôndrias, sendo capaz de acontecer também em membranas celulares e no citoplasma. Na mitocôndria, o oxigênio sofre uma redução tetravalente, com aceitação de quatro elétrons, ocasionando a formação de água. A enzima catalisadora dessa reação é a citocromo oxidase. Aproximadamente 2% a 5% do oxigênio metabolizado nas mitocôndrias são desviados para outra rota metabólica, e reduzidos de forma univalente, originando os RL como o ânion superóxido (BARBOSA *et al.*, 2010). Eles podem também derivar de fontes externas, tais com o tabagismo, a exposição aos raios X, álcool e outros produtos químicos industriais (OTUNOLA *et al.*, 2014).

No organismo, a geração de RL está circundada em processos fisiológicos importantes, como a produção de energia via adenosina trifosfato (ATP), regulação

do crescimento celular, fagocitose, síntese de substâncias biológicas importantes e sinalização intercelular (BARREIROS *et al.*, 2006). Entretanto, quando em altas concentrações, essas espécies reativas (ER) podem resultar em dano oxidativo nas macromoléculas celulares, incluindo proteínas, lipídios e DNA, e, podendo levar à morte celular subsequente (GASPAROTTO *et al.*, 2014).

As principais ERO dividem-se em dois grupos, os radicalares (com um ou mais elétrons desemparelhados): hidroxila (OH•) superóxido (O₂•⁻), peroxila (ROO•) e alcoxila (RO•); e os não-radicalares: oxigênio (O₂), peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e ácido hipocloroso (HClO). Dentre as ERN incluem-se o óxido nítrico (NO•), óxido nítrico (N₂O), ácido nitroso (HNO₂), nitritos (NO₂⁻), nitratos (NO₃⁻) e peroxinitritos (ONOO⁻). Enquanto alguns deles podem ser altamente reativos no organismo atacando lipídios, proteínas e DNA, outros são reativos apenas com os lipídios (ARUOMA, 1998).

O organismo encontra-se sob estresse oxidativo quando ocorre um desequilíbrio entre os sistemas pró-oxidantes e antioxidantes, de modo que os primeiros sejam predominantes (SIES, 1986).

A produção constante de radicais livres durante os processos metabólicos leva ao desenvolvimento de muitos mecanismos de defesa antioxidante para estabelecer os níveis intracelulares e impedir a indução de danos (SIES, 1993). Os antioxidantes são agentes responsáveis pela inibição e redução das lesões causadas pelos radicais livres nas células.

Devido a essa capacidade de oxidar diretamente biomoléculas, estudos vem demonstrando que o estresse oxidativo é uma condição relevante no início e avanço da DA. A teoria mais aceita é que o acúmulo de Aβ leva ao estresse oxidativo e vice-versa (CHEN e ZHONG, 2014). Dessa forma, como o estresse oxidativo é essencial no prosseguimento da DA, antioxidantes podem se tornar relevantes no tratamento e prevenção dessa doença (ZHAO e ZHAO, 2013).

2.3 DEFESAS ANTIOXIDANTES

Antioxidante, em baixas concentrações em comparação com as de um substrato oxidável, é como qualquer outra substância que, quando presente, evita ou atrasa a oxidação do referido substrato (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999). Os antioxidantes são agentes responsáveis pela inibição e redução das lesões causadas pelos radicais livres nas células. O sistema de defesa antioxidante pode ser enzimático ou não enzimático ambos minimizam o efeito nocivo das ERO por vários mecanismos antioxidantes (SEN *et al.*, 2010).

O sistema de defesa antioxidante tem o propósito de manter o processo oxidativo dentro dos limites fisiológicos, impossibilitando que os danos oxidativos aumentem. Os mecanismos de geração de radicais livres ocorrem, sobretudo, nas membranas, no citoplasma celulares e nas mitocôndrias (KOURY e DONANGELO, 2003).

O excesso de RL no organismo é combatido por mecanismos de defesas antioxidantes que são produzidos *in vivo* ou absorvidos da dieta (HALLIWELL, 2008). Os antioxidantes endógenos e exógenos auxiliam e reparam os danos nos tecidos causados pelos radicais livres, interrompendo sua formação, através da atividade sequestradora ou estimulando a sua decomposição, limitando o risco do aparecimento e desenvolvimento de novas doenças, como as neurodegenerativas (BHAT *et al.*, 2015; POPRAC *et al.*, 2017). E a ingestão de antioxidantes naturais tem sido associada a vários efeitos benéficos a saúde (GOMATHI *et al.*, 2012).

Existem três sistemas enzimáticos antioxidantes, dentre eles; o primeiro sistema é SOD (superóxido dismutase) constituído por dois tipos de enzimas que catalisam a desmutação do radical ânion superóxido O_2^- , convertendo-o em oxigênio e peróxido de hidrogênio (BABIOR, 1997). No organismo, existem duas formas de SOD, a primeira contém Cu^{2+} e Zn^{2+} como centros redox e acontece no citosol; e a segunda, que contém Mn^{2+} como centro redox, ocorre na mitocôndria e sua atividade aumenta com o estresse oxidativo. O segundo sistema antioxidante é corriqueiro, sendo formado pela enzima catalase (CAT), que atua na desmutação do peróxido de hidrogênio em oxigênio e água (BARREIROS *et al.*, 2006)

O terceiro sistema é composto pela glutathiona (GSH) que pode ser considerada um dos agentes mais importantes do sistema de defesa antioxidante da

célula, protegendo-a contra a lesão resultante da exposição a agentes como íons ferro (GALLEANO e PUNTARULO, 1995), em conjunto com duas enzimas, a glutatona redutase (GSH-Rd) uma etapa essencial para manter íntegro o sistema de proteção celular, e a glutatona peroxidase (GSH-Px) com a presença de selênio na enzima (seleno-cisteína) salienta a importância desse metal e sua atuação como antioxidante no organismo. Ainda, tendo em vista que a glutatona opera em ciclos entre a sua forma oxidada e a sua forma reduzida (BARREIROS *et al.*, 2006), esse sistema também catalisa a dismutação do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio. As enzimas CAT e GPx agem com o propósito de impedir o acúmulo de peróxido de hidrogênio.

A produção das enzimas antioxidantes necessita da presença de níveis adequados de minerais como zinco, cobre e selênio, além de quantidades suficientes de proteínas de alta qualidade e vitaminas. Tanto o cobre quanto o zinco são particularmente importantes para a produção da superóxido dismutase dentro da mitocôndria, onde a maior parte dos radicais livres é produzida, e o selênio é essencial para a formação da glutatona peroxidase. Além disso, tanto a vitamina C quanto as vitaminas do complexo B são importantes para a produção de catalase extra. Com a insuficiência de vitamina B6 (piridoxina), por exemplo, o organismo não tem como produzir glutatona peroxidase (BIANCHI E ANTUNES, 1999).

Um desequilíbrio na geração de espécies reativas de O₂ pode estar relacionado com o desenvolvimento e a progressão do Alzheimer, porém, não se sabe ainda qual mecanismo antioxidante pode estar envolvido (POWERS *et al.*, 1999). A inclusão de antioxidantes naturais na dieta é de suma importância, e está relacionado com a diminuição do risco do desenvolvimento de doenças associadas ao acúmulo de radicais livres (POMPELLA, 1997).

2.4 YACON

Yacon é uma planta Andina, cultivada principalmente na América do sul (Colômbia, Equador, Peru, Bolívia e noroeste da Argentina), possui também cultivo expandido por outros lugares do mundo, como nos Estados Unidos, Europa, Nova Zelândia, Japão, entre outros (BORGES *et al.*, 2012). Tal planta é utilizada como alimento e para fins medicinais (OJANSIVU *et al.*, 2011). Da mesma maneira, Oliveira *et al* (2009) demonstraram que o consumo de extrato aquoso de raízes de Yacon pode aumentar o colesterol HDL (Lipoproteína de alta densidade), reduzir o colesterol total, triglicerídeos e outras lipoproteínas.

Denominada de *Compositae*, o Yacon é pertencente à família *Asteraceae* seu nome científico é *Smallanthus sonchifolius*. É uma espécie extremamente adaptável quanto ao clima, altitude e tipo de solo, sendo que sua alta resistência ao frio e à seca está relacionada à grande quantidade de carboidratos de reserva nos órgãos subterrâneos. Chegou ao Brasil, por volta de 1989, na região de Capão Bonito (SP), trazida por imigrantes japoneses, que faziam uso das folhas e raízes para tratamento do diabetes (OLIVEIRA *et al.*, 2009), visto que no caule do Yacon há a presença de inulina, podendo ser um substituto natural do açúcar na alimentação de diabéticos (MACHADO *et al.*, 2004).

Ainda, na medicina popular, raízes tuberosas do Yacon são usadas na forma de chá (VALENTOVÁ *et al.*, 2003). Em vários países existe uma grande variedade de produtos derivados das raízes de Yacon, como farinha, produtos desidratados, fatias ou "Chips", chá (folhas secas), sucos, purês e adoçantes na forma de xarope com um alto teor de frutooligossacarídeos (FOS) (DELGADO *et al.*, 2013).

O Yacon possui raízes tuberosas (FIGURA 1) constituídas principalmente de água (aproximadamente 70% do peso fresco) e carboidratos, suas raízes assemelham-se às de batata doces e também apresentam sabor adocicado e uma polpa mais firme. Diferente da maioria das outras raízes tuberosas no qual o principal carboidrato de reserva é o amido, o Yacon é rico em FOS, sendo, portanto, considerado um alimento funcional (OJANSIVU *et al.*, 2011).



Figura 1: Fotografia das Raízes de Yacon, produzidas em Alegrete/RS

Fonte: O autor

Alimentos funcionais são aqueles que podem contribuir para a manutenção da saúde além de desempenhar um papel potencialmente benéfico na redução do risco de doenças (MORAES e COLLA, 2006). Além disso, as raízes do Yacon – principalmente as folhas (FIGURA 2) – são ricas em compostos fenólicos, sendo estes responsáveis por inúmeros efeitos benéficos na saúde humana. Estudos fitoquímicos demonstraram que os principais compostos antioxidantes presentes no Yacon são o ácido clorogênico, ferúlico, caféico e triptofano (ARNAO *et al.*, 2012; TAKENAKA *et al.*, 2003). Ainda, segundo Valentová *et al.* (2003), o conteúdo de compostos varia de acordo com o tipo de extração.



Figura2:Fotografia das Folhas de Yacon, produzidas em Alegrete/RS
Fonte: O autor

Durante o processamento destes produtos, é preciso controlar o escurecimento enzimático que está relacionado com a oxidação de compostos fenólicos principalmente pela enzima polifenol oxidase (PPO), sendo este, o maior responsável pela perda da qualidade do produto, atualmente as principais alternativas para contornar esse problema é por tratamento térmico, uso de antioxidantes ou ambos (NEVES e SILVA, 2007). A desidratação é o mais indicado, sendo realizado o mais rápido possível após a colheita (SCHER *et al.*, 2009). Dessa maneira, devido a todas essas características e particularidades, o Yacon vem se destacando como um alimento com inúmeras funções, devido, principalmente à sua composição fitoquímica (ALMEIDA *et al.*, 2015).

4. METODOLOGIA

As raízes de Yacon foram fornecidas pela Emater/RS.

Extrato hidroalcoólico das folhas e raízes do Yacon foram obtidos a partir de etanol a 70%: água (v/v). As raízes foram lavadas, descascadas e secas a 37°C por 5 e 72 horas, respectivamente, e colocadas em contato com o solvente por 7 dias no escuro. O extrato foi filtrado e concentrado sob pressão reduzida utilizando um evaporador rotativo a 40°C, a porção de água restante foi liofilizada. O liofilizado foi armazenado a -70°C até utilização posterior. O pó liofilizado foi diluído em água para administração aos animais.

Para este estudo, foram utilizados 48 ratos Wistar machos, com 60 dias de idade, provenientes do biotério da UFSM, os quais foram divididos em 6 grupos de 8 animais cada. Durante o tratamento, os ratos ficaram alojados em caixas plásticas coletivas, a temperatura ambiente, umidade e ciclo de luz (12:12h luz-escuro), com acesso gratuito à água da torneira e alimentado com dieta padrão *ad libitum*.

O projeto possui parecer favorável da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UNIPAMPA), sob o número 040/2015.

Os grupos foram divididos conforme descrito a seguir:

- G1 (controle): animais não suplementados e submetidos à cirurgia para injeção de solução salina intra-hipocampo (farsa);
- G2 (YR): animais suplementados com extrato de raiz de Yacon (40 mg/kg) e submetidos a cirurgia para injeção de solução salina intra-hipocampo (farsa);
- G3 (YL): animais suplementados com extrato de folha de Yacon (40 mg/kg) e submetidos à cirurgia para injeção de solução salina intra-hipocampo;
- G4 (A β): animais não suplementados e submetidos à cirurgia para injeção intra-hipocamal de A β ;
- G5: (YR + A β): animais suplementados com extrato da raiz Yacon (40 mg/kg) e submetidos à cirurgia para injeção intra-hipocamal de A β ;

- - G6: (YL + A β): animais suplementados com extrato de folha de Yacon (40 mg/kg) e submetidos a cirurgia para injeção intra-hipocamal de A β .

Os animais dos grupos suplementados receberam o extrato por gavage durante 14 dias consecutivos, no dia 15, os animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica para injeção intra-hipocampo de A β ou solução salina. Os animais dos grupos G1 e G4 também receberão gavage, mas apenas com o veículo, sem extrato de planta.

A injeção da proteína A β para mimetizar uma das principais características da DA foi feita por cirurgia estereotáxica com administração intra-hipocampal de dose única (2 μ L) de proteína A β (fragmento 25-35), utilizando uma bomba de infusão e seguindo as coordenadas da Atlas de Paxinos e Watson (1986). Todo o procedimento foi realizado com animais previamente anestesiados com Cetamina e Xilazina, administrados por via intraperitoneal (IP), com doses de 0,75 mg/kg e 0,10 mg/kg, respectivamente. Uma vez confirmado o plano anestésico do animal, este foi fixado no dispositivo estereotáxico onde a assepsia do couro cabeludo era realizada com etanol a 70% e PVPI. Após as cirurgias, os animais foram colocados de volta em suas caixas e mantidos em observação por 10 dias.

A suplementação foi mantida por mais 10 dias, tempo necessário para agregação de A β e formação de placa, e em seguida eutanasiados.

A atividade da catalase (CAT) foi determinada segundo descrito por Aebi (1984), da superóxido dismutase (SOD) e (GPx) utilizando kits comerciais (RANDOX Brasil LTDA), no homogenato do hipocampo dos ratos.

5. APRESENTAÇÃO DA PESQUISA E ANÁLISE DOS RESULTADOS

A Figura 3 mostra os resultados dos biomarcadores de defesa antioxidante enzimática (SOD, CAT e GPx) e não enzimática (GSH). O grupo A β demonstrou atividades com baixa atividade antioxidante e níveis reduzidos de GSH. No entanto, houve um aumento significativo ($P < 0,05$) na atividade dessas enzimas e níveis de GSH nos grupos YR + A β e YL + A β em comparação ao grupo A β ($P = 0,0001$; Figura 3A, 3B, 3C, 3D).

Estudos indicam que a folha de Yacon apresenta importantes efeitos antioxidantes em diferentes ensaios (SUGAHRA *et al.*, 2015). Neste estudo, os grupos do tipo DA tratados com Yacon mostraram um aumento das defesas antioxidantes no hipocampo. Assumimos que os efeitos neuroprotetores do Yacon estão relacionados à sua atividade antioxidante, uma vez que o estresse oxidativo é considerado uma das principais causas de neurotoxicidade e progressão da DA (NANAWARE *et al.*, 2017).

O excesso de radicais livres no corpo é neutralizado por mecanismos de defesa antioxidante que são produzidos *in vivo* ou absorvidos pela dieta (HALLIWELL, 2008). O sistema de defesa antioxidante minimiza o efeito prejudicial de espécies reativas por vários mecanismos antioxidantes (SEN *et al.*, 2010). Entre os antioxidantes enzimáticos mais importantes estão SOD, CAT e GPx e não enzimáticos para GSH (SHARMA *et al.*, 2012).

Um estudo demonstrou que pacientes com Alzheimer que consumiram diariamente uma bebida com alto poder antioxidante por 8 meses aumentaram os níveis de GPx e SOD e diminuíram as proteínas carbonilas (RUBIO *et al.*, 2016). Outro estudo em modelo animal da DA tratado com 6 g de uva-passa (rico em compostos antioxidantes) por 60 dias demonstrou melhora da memória espacial e reduziu os níveis de MDA no plasma (GOL *et al.*, 2017). O melhor efeito observado com a suplementação com extrato de folhas pode ser justificado pela maior concentração de flavonóides de apigenina nas folhas em relação à raiz, uma vez que estudos recentes indicam que este composto possui um importante efeito neuroprotetor contra vários fatores relacionados à progressão da DA (BALEZ *et al.*, 2016). Nossos achados corroboram com um estudo realizado, em que modelos de DA de ratos foram tratados com apigenina, por gavagem oral de 40 mg / kg / dia por

12 semanas e observaram que o tratamento impedia déficits de memória ao melhorar o aprendizado e aumentar a atividade das enzimas antioxidantes (ZHAO e ZHAO, 2013).

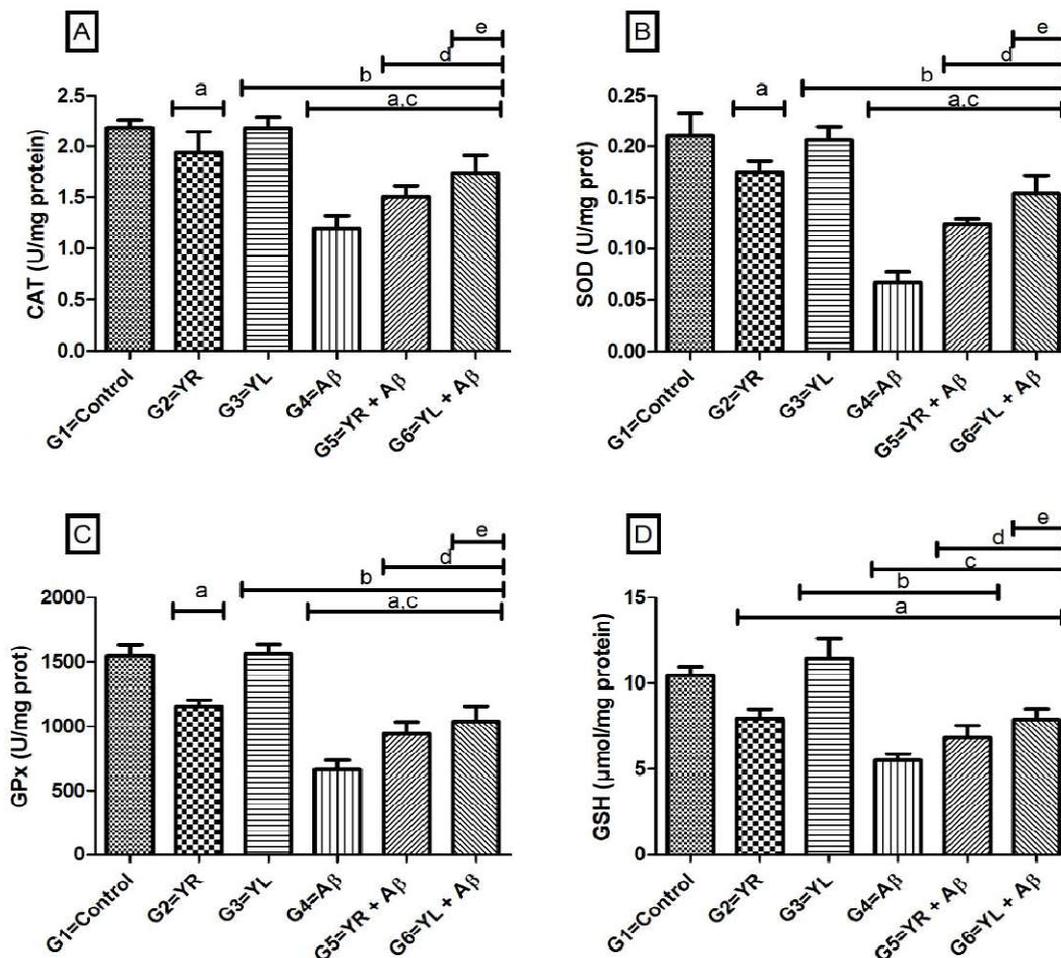


FIGURA 3 - Marcadores de defesas antioxidantes em ratos com neurotoxicidade induzida por beta-amilóide após tratamento com extrato de Yacon. Em A: atividade SOD; B: atividade de CAT; C: atividade GPx; D: níveis de GSH. As comparações foram feitas como; a: Significativamente diferente do Grupo 1; b: Significativamente diferente do Grupo 2; c: Significativamente diferente do Grupo 3; d: Significativamente diferente do Grupo 4; e: Significativamente diferente do grupo 5. P <0,05 foi considerado significativo

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os tratamentos com folhas e raízes de yacon melhoraram os parâmetros de defesas antioxidantes no hipocampo dos animais. A suplementação do extrato hidroalcoólico da folha de Yacon mostrou ter um maior efeito neuroprotetor quando comparada com a raiz. Sendo assim, o Yacon mostrou-se um candidato com futuro promissor na prevenção e/ou tratamento da doença de Alzheimer.

REFERÊNCIAS

AEBI, H., 1984. **Catalase *in vitro***. *Methods Enzymol.* 105, 121–127.

ALIEV, G. *et al.* **Link between Cancer and Alzheimer Disease via Oxidative Stress Induced by Nitric Oxide Dependent Mitochondrial DNA Over proliferation and Deletion**. *Oxid. Med. Cell. Longev.* doi: 10.1155/962984, 2013.

ALMEIDA, P. H. A.; ABRANCHES, M. V.; FERREIRA, C. L. L. F. **Yacon (Smallanthus sonchifolius): A food with multiple functions**. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 55, p.32–40, 2015.

ARNAO, I. *et al.* **Evaluación de la capacidad antioxidante de los extractos acuosos de la raíz y las hojas de Smallanthus sonchifolius (YACÓN)**. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, v. 78, n. 2, p. 120–125, 2012.

ARUOMA, O. I. **Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease**. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 75, n. 2, p. 199-212, 1998.

BABIOR, B. M. **Superoxide: a two-edged sword**. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 30, p. 141-155, 1997.

BALEZ R, STEINER N, ENGEL M, ET AL (2016) **Neuroprotective effects of apigenin against inflammation, neuronal excitability and apoptosis in an induced pluripotent stem cell model of Alzheimer's disease**. *Sci Rep* 6:31450 .

doi: 10.1038/srep31450

BARBOSA, K. B. F. *et al.* **Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios.** Revista de Nutrição, v.23 n.4, p. 629-643, 2010.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. **Estresse oxidativo: relação entre gerações de espécies reativas e defesa do organismo.** Química Nova, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.

BHAT, A. H. *et al.* **Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and neurodegenerative diseases; a mechanistic insight.** Biomedicine & Pharmacotherapy, v. 74, p. 101–110, 2015.

BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. **Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta.** RevNutr Campinas. 12(2):123-130, 1999.

BORGES, J. T. DA S. *et al.* **Yacon na alimentação humana: aspectos nutricionais, funcionais, utilização e toxicidade.** Scientia Amazonia, v. v.1, n. 3, p. 3–16, 2012.

CERUTTI, P. A. **Oxidant stress and carcinogenesis.** European Journal of Clinical Investigation. 21(1):1-5, 1991.

CHEN, Z.; ZHONG, C. **Oxidative stress in Alzheimer's disease.** v. 30, n. 2, p. 271–281, 2014.

CORRÊA, C. M.; OLIVEIRA, G. N.; ASTARITA, L. V.; SANTARÉM, E. R. **Plant regeneration through somatic embryogenesis of yacón [Smallanthussonchifolius] (Poepp. and Endl.).** H. Robinson. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 52, n. 3, p. 549- , 2009.

CORRÊA-VELLOSO, J. C. *et al.* **Pathophysiology in the comorbidity of Bipolar Disorder and Alzheimer's Disease: Pharmacological and stem cell approaches.** *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, v. 80, n. Pt A, p. 34–53, 2017.

DELGADO, G. T. *et al.* **Yacon (Smallanthussonchifolius): A Functional Food.** *Plant Foods for Human Nutrition*, v. 68, n. 3, p. 222–228, 2013.

FISCHER, R.; MAIER, O. **Interrelation of Oxidative Stress and Inflammation in Neurodegenerative Disease: Role of TNF.** *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v. 2015, p. 1–18, 2015.

GALLEANO, M.; PUNTARULO, S. **Role of antioxidants on the erythrocytes resistance to lipid peroxidation after acute iron overload in rats.** *BiochimBiophysActa*. 1271(2-3): 321-6, 1995.

GASPAROTTO, J. *et al.* **Effects of different products of peach (*Prunus persica* L. Batsch) from a variety developed in southern Brazil on oxidative stress and inflammatory parameters in vitro and ex vivo.** Journal of clinical biochemistry and nutrition, v.55, n.2, p110-119, 2014.

GOL M, GHORBANIAN D, SOLTANPOUR N, ET AL (2017) **memory impairment and oxidative stress in Protective effect of raisin (currant) against spatial memory impairment and oxidative stress in Alzheimer disease model.** Nutr **Neurosci** 0:1–9 . doi: 10.1080/1028415X.2017.1354959

GOMATHI, D. *et al.* **HPTLC fingerprinting analysis of *Evolvulus alsinoides* (L.) L.** Journal of Acute Medicine, v. 2, n. 3, p. 77–82, 2012.

HALLIWELL, B. **Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and in vivo studies?** Archives of biochemistry and biophysics.v.476, n.2, p.107-112, 2008.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine.** 3 ed ed. NY: Oxford University Press, 1999.

HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. **Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?** British journal of pharmacology, v. 142, n. 2, p. 231–255, 2004.

HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E.; GILMAN, A. G.; GOODMAN, L. S.; GILMAN, A.;
Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. McGraw-Hill:
New York, 1996.

HIPPIUS, H.; NEUNDÖRFER, G. **The discovery of Alzheimer's disease.**
Dialogues in Clinical Neuroscience, v. 5, n. 1, p. 101–108, 2003.

KOURY, J. C.; DONANGELO, C. M. **Zinco, estresse oxidativo e atividade física.**
RevNutr Campinas. 16(4):433-441, 2003.

MACHADO, S.R.*et al.* **Morfoanatomia do sistema subterrâneo de
Smallanthussonchifolius (Poepp. &Endl.) H. Robinson (Asteraceae).** Revista
Brasileira de Botânica, v. 27, n. 1, p. 115-123, 2004.

MICHAEL, T.; LIN, M.; FLINT, BEAL. **Mitochondrial dysfunction and oxidative
stress in neurodegenerative diseases.** Nature, v. 443, p. 787- 795, 2006.

MORAES F. P.; COLLA L. M. **Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições,
Legislação e benefícios à saúde.** Revista Eletrônica de Farmácia, v. 3, n.2, p. 99-
112, 2006.

NANAWARE, S. *et al.* **Neuroprotective effect of Indian propolis in b -amyloid
induced memory de fi cit : Impact on behavioral and biochemical parameters in
rats.** Biomedicine & Pharmacotherapy, v. 93, p. 543–553, 2017.

NEVES, V.A.; SILVA, M.A. **Polyphenol Oxidase from Yacon Roots (Smallanthus sonchifolius)**. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v.55, n.6, p. 2424-2430, 2007.

OJANSIVU, I.; FERREIRA, C. L.; SALMINEN, S. **Yacon, a new source of prebiotic oligosaccharides with a history of safe use**. Trends in Food Science and Technology, v. 22, n. 1, p. 40–46, 2011.

OLIVEIRA, L. A. *et al.* **Glycemic reply in diabetic rats receiving with yacon water solution**. Alimentos e Nutricao, v. 20, n. 1, p. 61–67, 2009.

OTUNOLA, G. A. *et al.* **Selected spices and their combination modulate hypercholesterolemia-induced oxidative stress in experimental rats**. Biological Research, v. 47, n. 1, p. 2–7, 2014.

PASCHEN, W.; FRANDBEN, A. **Endoplasmic reticulum dysfunction a common denominator for cell injury in acute and degenerative diseases of the brain?** J. Neurochem., v. 79, p. 719-725, 2001.

POMPELLA, A. **Biochemistry and histochemistry of oxidant stress and lipid peroxidation**. International Journal of Vitamin and Nutrition Research. 67(5):289-297, 1997.

POPRAWA, P. *et al.* **Targeting Free Radicals in Oxidative Stress-Related Human Diseases**. Trends in Pharmacological Sciences, v. 38, n. 7, p. 592–607, 2017.

POWERS, S. K.; JI, L. L.; LEEUWENBURGH, C. **Exercise training-induced alterations in skeletal muscle antioxidant capacity: a brief review.** Med Sci Sports Exerc.31(7): 987-997, 1999.

REIS, J. S. *et al.* **Oxidative stress: a review on metabolic signaling in type 1 diabetes.** Arq Bras EndocrinolMetab, v. 52, n. 7, p. 1096–105, 2008.

REITZ, C.; MAYEUX, R. **Alzheimer disease: Epidemiology, diagnostic criteria, risk factors and biomarkers.** Biochemical Pharmacology, v. 88, n. 4, p. 640–651, 2014.

RUBIO JM, MARIA P, PILAR DA, ET AL (2016) **Effects of an antioxidant beverage on biomarkers of oxidative stress in Alzheimer's patients.**Eur J Nutr 55:2105–2116 . doi: 10.1007/s00394-015-1024-9

SANTOS, K. C. *et al.* **Yacon (*Smallanthussonchifolius*) Leaf Extract Attenuates Hyperglycemia and Skeletal Muscle Oxidative Stress and Inflammation in Diabetic Rats.**Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, v. 2017, p. 1–9, 2017.

SAYEG N. **ALZHEIMER:Diagnóstico e tratamento.** São Caetano do Sul: Yendis; 2012.

SCHER, C.F.; RIOS, A.O.; NOREN, C.P.Z. **Hot air drying of yacon (Smallanthus sonchifolius) and its effect on sugar concentrations.** International Journal of Food Science and Technology v.44, n.11, p. 2169–2175, 2009.

SEN, S. *et al.* **Free radicals, antioxidants, diseases and phytomedicines: Current status and future prospect.** International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research, v. 3, n. 1, p. 91–100, 2010.

SHARMA, P. *et al.* Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. **Journal of Botany**, v. 2012, p. 1–26, 2012.

SIES, H. **Biochemistry of oxidative stress.** AngewChemInt Ed Engl. 25:1058-1071, 1986.

SIES, H. **Strategies of antioxidant defence.** Review. European Journal of Biochemistry. 215(2):213-219, 1993.

SIES, H.; STAHL, W. **Vitamins E and C, b-carotene, and other carotenoids as antioxidants.** American Journal of Clinical Nutrition. 62(6):1315-1321, 1995.

SUGAHRA Y, Ueda Y, Fukuhara K, et al (2015) **Antioxidant Effects of Herbal Tea Leaves from Yacon (Smallanthus sonchifolius) on Multiple Free Radical and Reducing Power Assays, Especially on Different Superoxide Anion Radical Generation Systems.** J food Sci 80:2420–9

TAKENAKA, M. *et al.* **Caffeic acid derivatives in the roots of yacon (*Smallanthus sonchifolius*)**. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 51, n. 3, p. 793–796, 2003.

VALENTOVA, K. *et al.* **Antioxidant activity of extracts from the leaves of *Smallanthus sonchifolius***. *European Journal of Nutrition*, v. 42, n. 1, p. 61–66, 2003.

WILLIAMSON, R. L. *et al.* **Disruption of amyloid precursor protein ubiquitination selectively increases amyloid beta (A β) 40 levels via presenilin 2-mediated cleavage**. *Journal of Biological Chemistry*, n. 1, p. jbc.M117.818138, 2017.

ZHAO, Y.; ZHAO, B. **Oxidative Stress and the Pathogenesis of Alzheimer's Disease**. v. 2013, 2013.

ZHOU, X. *et al.* **An overview on therapeutics attenuating amyloid β level in Alzheimer's disease: Targeting neurotransmission, inflammation, oxidative stress and enhanced cholesterol levels**. *American Journal of Translational Research*, v. 8, n. 2, p. 246–269, 2016.