

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA**

**BACHARELADO INTERDICPLINAR EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA**

**ELEN CAROLINE DE MATOS AMADOR**

**POTENCIAL ANTIOXIDANTE DO ÁCIDO *P*-CUMÁRICO E  
AVALIAÇÃO DO EFEITO SOBRE ATIVIDADE LOCOMOTORA EM  
*Drosophila melanogaster***

**Itaqui/RS**

**2019**

**ELEN CAROLINE DE MATOS AMADOR**

**POTENCIAL ANTIOXIDANTE DO ÁCIDO P-CUMÁRICO E  
AVALIAÇÃO DO EFEITO SOBRE ATIVIDADE LOCOMOTORA EM  
*Drosophila melanogaster***

Trabalho de conclusão de curso, apresentado ao curso de Bacharelado Interdisciplinar em Ciência e Tecnologia da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Bacharel Interdisciplinar em Ciência e Tecnologia.

Orientador: Gustavo Petri Guerra

**Itaqui/RS**

**2019**

Ficha catalográfica elaborada automaticamente com os dados fornecidos  
pelo(a) autor(a) através do Módulo de Biblioteca do  
Sistema GURI (Gestão Unificada de Recursos Institucionais) .

A481p Amador, Elen Caroline de Matos  
Potencial Antioxidante do Ácido p-cumárico e Avaliação do  
Efeito Sobre a Atividade Locomotora em *Drosophila melanogaster*  
/ Elen Caroline de Matos Amador.  
27 p.

Trabalho de Conclusão de Curso(Graduação)-- Universidade  
Federal do Pampa, INTERDISCIPLINAR EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA,  
2019.

"Orientação: Gustavo Petri Guerra".

1. DPPH. 2. Compostos Fenólicos . 3. ABTS. 4. Geotaxia  
Negativa. 5. Teste Campo Aberto. I. Título.

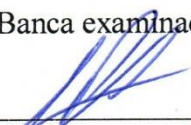
**ELEN CAROLINE DE MATOS AMADOR**

**POTENCIAL ANTIOXIDANTE DO ÁCIDO *P*-CUMÁRICO E  
AVALIAÇÃO DO EFEITO SOBRE ATIVIDADE LOCOMOTORA EM  
*Drosophila melanogaster***

Trabalho de conclusão de curso, apresentado ao curso de Bacharelado Interdisciplinar em Ciência e Tecnologia da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Bacharel Interdisciplinar em Ciência e Tecnologia.

Trabalho de Conclusão de Curso defendido e aprovado em 28 de junho de 2019.

Banca examinadora:

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Gustavo Petri Guerra

Orientador  
UNIPAMPA

  
\_\_\_\_\_  
Prof.ª. Dr.ª. Marina Prigol

UNIPAMPA

  
\_\_\_\_\_  
MSc. Stéfani Machado Araujo

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por estar sempre presente em minha vida, guiando-me e olhando por mim e toda a minha família.

Agradeço à minha família, meus pais Roseli e Evanir e meus irmãos Mateus e Guilherme pelo apoio e pela compreensão, amor incondicional e pelo exemplo de força nos momentos mais difíceis. Agradeço especialmente a esposo Fernando e meu filho Rodrigo, que é o maior presente que Deus poderia ter me dado nesta vida. Por toda felicidade, carinho, compreensão, apoio, incentivo, dedicação encontrada na minha querida família que sempre farão parte de cada vitória.

Ao Prof. Dr. Gustavo Guerra, meu orientador, pela confiança em mim depositada. Agradeço por ter acreditado no meu potencial e por todas as oportunidades que me deu. Que além de sabedoria e competência, possui uma grande determinação, muito obrigada por seus ensinamentos.

À Universidade Federal do pampa, seu corpo docente, direção e administração pela oportunidade de adquirir conhecimentos através do ensino público.

As todos os amigos que fazem parte do laboratório laftambio, em especial, Márcia, Nathalie, Dieniffer, Luana, Vandrezza e Stífani grata imensamente pela ajuda e pela amizade.

Aos amigos, pelo apoio e incentivo em especial aqueles que fizeram parte da minha formação e que vão continuar presentes em minha vida com certeza.

À todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigada.

Somos insignificantes. Por mais que  
você programe sua vida, a qualquer momento  
tudo pode mudar.

Ayrton Senna

## RESUMO

Com o aumento da expectativa de vida faz crescer o número de diagnósticos de doenças causadas pelo envelhecimento como as doenças neurodegenerativas que podem ser acarretadas pelo estresse oxidativo. Os compostos fenólicos apresentam atividade antioxidante como agentes reguladores do estresse oxidativo. O ácido *p*-cumárico é um ácido fenólico possuindo propriedades antioxidantes e sequestradoras de radicais livres, anti-inflamatórias e neuroprotetoras. O presente estudo tem como objetivo avaliar o potencial antioxidante do ácido *p*-cumárico e seu efeito sobre a atividade locomotora em *Drosophila melanogaster*. Primeiramente foi avaliado o potencial antioxidante do composto pelos testes do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH), e radical 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolína-6-ácido sulfônico) (ABTS). Para os testes *in vivo* foram utilizadas moscas com 1-4 dias de idade, foram divididas em 6 grupos de tratamento contendo 50 moscas em cada: (1) controle, (2) etanol, ácido *p*-cumárico nas concentrações de (3) 0,03 mM, (4) 0,1 mM, (5) 0,3 mM e (6) 1 mM estas foram submetidas ao tratamento durante 72h. Foram avaliados a taxa sobrevivência, atividade locomotora e exploratória pelos testes de campo aberto e geotaxia negativa. Como resultados obtivemos nos testes de avaliação da atividade antioxidante do composto *in vitro*, pelo método de DPPH os parâmetros para EC<sub>50</sub> foram nulos e inibição máxima de 24,42%, porém no método de ABTS o composto demonstrou ter poder antioxidante tendo como EC<sub>50</sub> 0,05mM, e inibição máxima de 92,57%. As moscas eram contadas diariamente para avaliar a sobrevivência neste contexto, a concentração 0,3mM de ácido *p*-cumárico aumentou a sobrevivência das moscas. Em relação aos testes comportamentais no teste de campo aberto as moscas que receberam em sua dieta a concentração de 0,3mM de ácido *p*-cumárico obtiveram o maior número de cruzando ou seja, aumentaram a atividade locomotora das mesmas. A geotaxia negativa mostrou que as moscas que receberam em sua dieta a concentração de 1mM de ácido *p*-cumárico diminuíram o tempo de escala. Sendo assim pode se concluir que o ácido *p*-cumárico mostra-se um potente antioxidante, em nossos resultados *in vitro* e este fato pode aumentar a atividade locomotora, capacidade de escala e período de vida útil de moscas da fruta *Drosophila melanogaster*.

Palavras-chave: DPPH, ABTS, Geotaxia negativa, Campo Aberto, compostos fenólicos.

## ABSTRACT

With the increase in life expectancy, the number of diseases diagnosed by aging increases as the neurodegenerative diseases can be caused by oxidative stress. Phenolic compounds exhibit antioxidant activity as oxidative stress regulators. P-coumaric acid is a phenolic acid possessing antioxidant and free radical scavenging, anti-inflammatory and neuroprotective properties. The present study aims to evaluate the antioxidant potential of p-coumaric acid and its effect on locomotor activity in *Drosophila melanogaster*. First, the antioxidant potential of the compound was evaluated by the 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl radical (DPPH) and the 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) radical (ABTS). For the in vivo tests flies with 1-4 days of age were used, were divided into 6 treatment groups containing 50 flies in each: (1) control, (2) ethanol, p-coumaric acid at concentrations of (3) 0.03 mM, (4) 0.1 mM, (5) 0.3 mM and (6) 1 mM these were subjected to treatment for 72 h. The survival rate, locomotor and exploratory activity were evaluated by the open field and negative geotaxia tests. As results we obtained in the tests of evaluation of the antioxidant activity of the compound in vitro, by the DPPH method the parameters for EC50 were zero and maximum inhibition of 24.42%, but in the ABTS method the compound showed to have antioxidant power having as EC50 0, 05mM, and maximum inhibition of 92.42%. Flies were counted daily to assess survival in this context, the 0.3 mM concentration of p-coumaric acid increased the survival of the flies. Regarding the behavioral tests in the open-field test, the flies that received in their diet the concentration of 0.3 mM of p-coumaric acid obtained the highest number of crosses, that is, increased their locomotor activity. Negative geotaxia showed that the flies that received 1mM concentration of p-coumaric acid in their diet decreased the time of scale. Therefore, it can be concluded that p-coumaric acid is a potent antioxidant in our in vitro results and this fact may increase the locomotor activity, scale capacity and shelf-life of *Drosophila melanogaster* fruit flies.

**Keywords:** DPPH, ABTS, Negative Geotaxia, Open Field, phenolic compounds.



## Lista de Figuras

Figura 1: Estrutura do ácido trans-4-cinâmico (ácido <i>p</i> -cumárico).....	13
Figura 2: Estabilização do radical DPPH .....	14
Figura 3: Estabilização do radical ABTS+ por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio. Adaptada de SOUSA et al (2007).....	15
Figura 4: Delineamento experimental. ....	16
Figura 5: Percentual de sobrevivência de moscas expostas ao ácido <i>p</i> -cumárico durante 1 dia (24h), 2 dias (48h) e 3 dias (72h) nas concentrações de 0,03mM, 0,1mM, 0,3mM e 1mM. ....	19
Figura 6: Desempenho locomotor de moscas expostas ao ácido <i>p</i> -cumárico no teste de Campo aberto. O teste foi realizado em triplicata, e os dados representam a média ± desvio padrão. *indica uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ) comparada ao grupo controle.....	20
Figura 7: Desempenho locomotor de moscas expostas ao ácido <i>p</i> -cumárico durante 72h no teste de geotaxia negativa. O teste foi realizado em triplicata, e os dados representam a média ± desvio padrão. * indica uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ) comparada ao grupo controle. ....	20

## Lista de Tabelas

Tabela 1. Efeito Máximo (%). .....	18
Tabela 2. Testes ABTS e DPPH para o ácido p-cumárico. ....	18

## **Lista de Abreviaturas**

ABTS: 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)

DPPH: 2,2-difenil-1-picril-hidrazila

## Sumário

1.	INTRODUÇÃO.....	12
2.	MATERIAL E MÉTODOS.....	14
2.1	Avaliação <i>in vitro</i> .....	14
2.1.1	Método DPPH.....	14
2.1.2	Método ABTS.....	15
2.2	Avaliação <i>in vivo</i> .....	15
2.2.1	Cultura das Moscas.....	15
2.3	Protocolo Experimental.....	16
2.4	Taxa de Sobrevivência.....	16
2.5	Testes comportamentais.....	16
2.5.1	Teste de Geotaxia negativa.....	16
2.5.2	Teste campo aberto.....	17
2.6	Análise estatística.....	17
3.	RESULTADOS.....	17
3.1	Ensaio de atividade antioxidante ( <i>in vitro</i> ).....	17
3.2	Taxa de sobrevivência com exposição de <i>Drosophila melanogaster</i> ao ácido <i>p</i> -cumárico.....	18
3.3	Teste de Campo Aberto.....	19
3.4	Geotaxia negativa.....	20
4.	DISCUSSÃO.....	21
5.	CONCLUSÃO.....	23
6.	REFERÊNCIAS.....	24

## 1. INTRODUÇÃO

Com o aumento da expectativa de vida o envelhecimento populacional um fenômeno que atinge todos os seres humanos (Fechine & Trompieri, 2012), ocorre um aumento significativo de doenças próprias da velhice, como as patologias do coração, artrites e doenças neurológicas degenerativas (Passeri *et al.*, 1985). Com o intuito de poder atenuar, atrasar o processo do envelhecimento ou até mesmo reverter os seus efeitos, vários pesquisadores durante as últimas décadas têm realizado inúmeros estudos sobre eventuais medidas que impeçam a evolução natural das doenças (Thomas, 2004).

Harraan (1955) propôs a teoria dos radicais livres/estresse oxidativo para explicar o envelhecimento. Sendo o estresse oxidativo o desequilíbrio entre a produção de radicais livres e a capacidade de defesa antioxidante do organismo. Os radicais livres, são formados no metabolismo celular e em vários eventos patológicos, mas quando em excesso pode causar a oxidação de moléculas biológicas (Machado *et al.*, 2009). O estresse oxidativo está envolvido na incidência de doenças que surgem com a idade como aterosclerose, reumatismo, câncer, artrite, e de doenças degenerativas como Parkinson e Alzheimer (Aruoma, 1998). Os radicais livres são combatidos pelos antioxidantes, os quais são compostos capazes de inibir ou retardar a oxidação de lipídios ou outras moléculas, impedindo que estes radicais livres ataquem alvos biológicos nas células (Degáspari *et al.*, 2004, Atoui *et al.*, 2005).

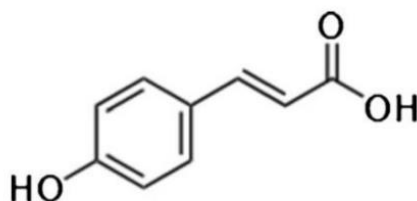
Atualmente os compostos bioativos provenientes da dieta podem ajudar a superar o desequilíbrio entre radicais livres e antioxidantes, conferindo propriedades metabólicas de proteção, prevenção ou até redução dos efeitos causados pelo estresse oxidativo que induzem doenças (Deng *et al.*, 2012; Barcia *et al.*, 2010).

Dentre as principais classes e substâncias bioativas destacam-se os compostos fenólicos, pois, são substâncias amplamente distribuídas no reino vegetal (Jelassi *et al.*, 2014). Essas substâncias podem apresentar efeitos biológicos, como ação anti-inflamatória e atividade antioxidante (Wojdylo *et al.*, 2007). Dentre os compostos fenólicos o ácido trans-4-Hydroxycinnamic ou popularmente conhecido como *p*-cumárico, é um composto absorvido no trato gastrointestinal através do transportador de ácidos monocarboxílicos. O ácido *p*-cumárico tem várias ações biológicas, tais como atividades antioxidantes e sequestradoras de radicais livres, anti-inflamatórias e neuroprotetoras (Yoon *et al.*, 2014; Guven *et al.*, 2015). O ácido *p*-cumárico pode ser

encontrado em alguns alimentos como o milho, batata, uva, feijão, aveia, trigo, pera, maçã, laranja, tomate, espinafre e cebola (Pragasam; Rasool, 2013; Pei *et al.*, 2016).

O ácido *p*-cumárico é derivado do ácido cinâmico e possui uma atividade antioxidante muito ativo isso se deve à dupla ligação presente em sua molécula, que participa da estabilização do radical por ressonância de deslocamento do elétron desemparelhado (Wanasundara, Amarowicz & Shahidi, 1994). A atividade antioxidante do ácido *p*-cumárico está associada ao grupamento fenol, em um estudo *in vitro* apresentou um ótimo desempenho como sequestrador do radical hidroxila (Mathew; Abraham; Zakaria, 2015).

O ácido *p*-cumárico é semelhante a outros ácidos hidroxicinâmicos, tal como o ácido ferúlico, existente na forma livre ou ligado podendo ou não ser solúvel em água (Sun *et al.*, 2001; Xu *et al.*, 2005). Na (figura 1) estrutura química do ácido *p*-cumárico.



**Figura 1:** Estrutura do ácido trans-4-cinâmico (ácido *p*-cumárico)

Fonte: Pragasam *et al.*, 2013.

O ácido *p*-cumárico tem várias ações biológicas, entretanto, aumentar o conhecimento sobre os efeitos terapêuticos, e sua capacidade antioxidante é importante. Para determinar a atividade antioxidante de um composto, podem ser adotados métodos *in vitro* e *in vivo*. Dentre os métodos *in vitro* destaca-se o método do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH), e radical 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolona-6-ácido sulfônico) (ABTS), (Sucupira *et al.*, 2012). Esses dois métodos avaliam a capacidade antioxidante de um composto a partir da transferência de elétrons para que as moléculas DPPH e ABTS, fiquem estáveis (Hotta *et al.*, 2001; Huang *et al.*, 2005).

Após a realização de testes *in vitro* são necessários testes *in vivo*, a mosca da fruta *Drosophila melanogaster* contribui por ser um modelo de estudo eficiente e amplamente explorado como uma poderosa ferramenta genética para a compreensão de problemas biológicos complexos, muitas propriedades de base fisiológica e neurológica são conservadas entre mamíferos e *Drosophila melanogaster*, sendo que esse modelo

animal apresenta aproximadamente 75% de homologia com genes humanos causadores de doenças (Araujo et al, 2015; Pandey & Nichols, 2011). Assim, O presente estudo tem como objetivo avaliar o potencial antioxidante do ácido *p*-cumárico e seu efeito sobre a atividade locomotora em *Drosophila melanogaster*.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

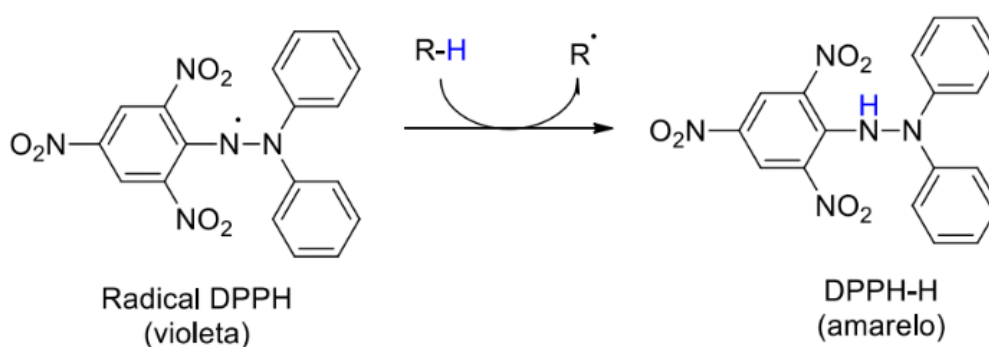
O ácido *p*-cumárico foi obtido comercialmente da empresa Sigma – Aldrich (ST Louis, MO, USA). Dissolvido em álcool etílico 99,5% PA imediatamente antes do uso.

### 2.1 Avaliação *in vitro*

#### 2.1.1 Método DPPH

Para a verificação da capacidade antioxidante foi utilizado o método sequestrador de radical livre (DPPH), descrito por Sharma et al. (2009), é representado na figura 2. Inicialmente foi preparada uma solução estoque de DPPH a 5,05 mM, que foi deixada durante um dia no gelo e no escuro. No dia seguinte, a solução estoque foi diluída para 50  $\mu$ M e então utilizada no mesmo momento. Posteriormente, em tubos de ensaio foram adicionados 1 mL da solução DPPH preparada e 10  $\mu$ L dos compostos, ácido *p*-cumárico e ácido ascórbico (Vitamina C), que foram preparados sob concentrações de 1 mM, 0,3 mM, 0,1 mM e 0,03 mM.

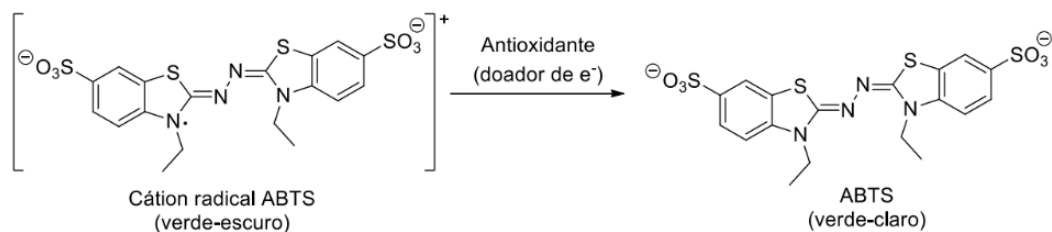
Assim, a reação de diferentes concentrações do composto. O potencial de inibição foi medido em espectrofotômetro, utilizando decréscimo da absorbância (nm= 517) após 30 minutos de incubação, em ambiente escuro e em temperatura ambiente. Os ensaios foram realizados em triplicata e utilizando ácido ascórbico como controle positivo.



**Figura 2:** Estabilização do radical DPPH

### 2.1.2 Método ABTS

Para a verificação da capacidade antioxidante também foi utilizado o método dequestrado de radical livre (ABTS), descrito por Pellegrini et al. (1999), e representado na Figura 3. Inicialmente foi preparada uma solução ABTS a uma concentração de 0,3763mM de persulfato K. A mesma foi deixada no escuro e em refrigerador por 24 horas. No dia seguinte, esta solução foi diluída para 42,77  $\mu\text{M}$  e então utilizada no mesmo momento. Em tubos de ensaio foi adicionado 1mL da solução juntamente com 10  $\mu\text{L}$  de ácido *p*-cumárico, que estava sob as concentrações de 1 mM, 0,3 mM, 0,1 mM e 0,03 mM,  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  do composto, obtendo um volume final de 1010  $\mu\text{L}$  em cada tubo. O potencial de inibição foi medido espectrofotometricamente pelo decréscimo da absorbância ( $\text{nm} = 734$ ) após 30 minutos de incubação, no escuro e em banho-maria 32°C. Os ensaios foram realizados em triplicata e utilizando ácido ascórbico (Vitamina C) como controle positivo. Os resultados foram expressos em porcentagem do controle.



**Figura 3:** Estabilização do radical ABTS<sup>+</sup> por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio. Adaptada de SOUSA *et al.*, (2007).

## 2.2 Avaliação *in vivo*

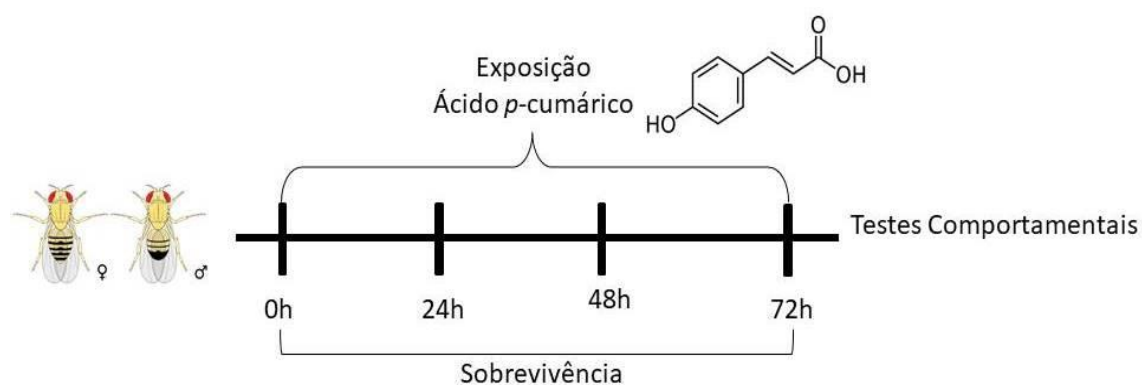
### 2.2.1 Cultura das Moscas

*Drosophila melanogaster* (linhagem Harwich) foram mantidas em ciclo claro/escuro 12h (25°C  $\pm$  1°C; 60 % de umidade) alimentadas em meio padrão do laboratório composto por 76,59% de farinha de milho, 0,43% de levedura, 8,51% de gérmen de trigo, 7,23% de sacarose, 7,23% de leite em pó, 0,08% de nipagin.



## 2.3 Protocolo Experimental

Para os tratamentos, foram selecionadas moscas de ambos os sexos de 1-4 dias de idade, estas foram divididas em 6 grupos contendo 50 moscas em cada sendo: (1) controle, (2) Álcool etílico PA 0,3%, (3) ácido *p*-cumárico 1 mM (4) ácido *p*-cumárico 0,3mM, (5) ácido *p*-cumárico 0,1 mM e (6) ácido *p*-cumárico 0,03 mM. Foram expostas ao tratamento durante 72h. As moscas foram expostas a uma dieta contendo ácido *p*-cumárico diluído em etanol 0,3%, onde foram adicionados em 10 ml de meio padrão (40% de ágar; 40% de sacarose; 20% de leite em pó; 0,08% de Nipagin), durante 72h de acordo com os respectivos grupos.



**Figura 4:** Delineamento experimental.

## 2.4 Taxa de Sobrevivência

A taxa de sobrevivência foi avaliada por contagem diária da quantidade de moscas vivas até ao final do período experimental de 72h. Cerca de 350 moscas por grupo foram incluídos nos dados de sobrevivência e o número total de moscas representa a soma das sete experiências independentes (50 moscas cada repetição / tratamento).

## 2.5 Testes comportamentais

### 2.5.1 Teste de Geotaxia negativa

O ensaio geotaxia negativa das moscas foi determinada de acordo com Coulom e Birman (2004), com adaptações de Paula *et al.*, (2016) contabilizando o tempo gasto

por cada, mosca para alcançar 8 cm, medido a partir do fundo do tubo de ensaio, num tempo máximo de avaliação de 120 segundos. O teste foi repetido 5 vezes para cada mosca e 5 moscas foram separadas a partir de cada grupo a ser avaliado. Os dados foram analisados de acordo com o tempo médio de cada mosca, de acordo com seus respectivos grupos.

### 2.5.2 Teste campo aberto

Para avaliar a atividade exploratória de cada mosca, 5 moscas foram usadas em cada grupo e estas foram mantidas numa placa de Petri divididos em quadrantes de 1cm<sup>2</sup>, conforme descrito por (Hirth, 2010). A atividade locomotora das moscas foram registradas e avaliada a trajetória realizada por cada mosca resultante para o tempo (60s), foi calculada de acordo com o número de quadrantes atravessados/explorados por cada mosca analisada em cada grupo. Foram realizados quatro experimentos independentes (5 moscas por cada grupo de tratamento).

### 2.6 Análise estatística

Os dados foram analisados por Análise de variância (ANOVA) de uma via, seguido pelo teste *post-hoc* de Tukey com valor de significância de  $p < 0,05$ . Foi realizada através do programa GraphPad Prism6. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão.

## 3. RESULTADOS

### 3.1 Ensaio de atividade antioxidante (*in vitro*)

Os resultados da análise de atividade antioxidante pelo método DPPH, expressos em EC<sub>50</sub>, indicam que as concentrações de 1 mM, 0,3 mM, 0,1 mM e 0,03mM do ácido *p*-cumárico não reagiram com 50% do radical presente na solução de DPPH, no entanto para os parâmetros de concentração efeito máximo apresentou atividade de baixa de oxidação de 22,13%. (Tabela 1)

Quando realizado o teste ABTS, que determina a atividade *scavenging* do radical ABTS, para o ácido *p*-cumárico nas mesmas concentrações, foram observados os valores demonstrados na Tabela 2. No qual pode se observar que ocorreu a atividade antioxidante do composto com valores similares ao ácido ascórbico que é utilizado

como parâmetro de referência da ação antioxidante no qual foi utilizado como controle positivo, obtendo um resultado promissor do ácido *p*-cumárico frente a este teste o mesmo representa desvio padrão da média.

**Tabela 1.** Efeito Máximo (%).

<u>Ácido <i>p</i>-cumárico</u>	<u>0,03mM</u>	<u>0,1mM</u>	<u>0,3mM</u>	<u>1mM</u>
<b>Atividade sequestrador de radical ABTS<sup>+</sup></b>	90,37± 1,87	92,22± 0,58	92,47± 0,37	92,04± 0,6
<u>Ácido Ascórbico</u>				
<b>Atividade sequestrador de radical ABTS<sup>+</sup></b>	52,16± 11,8	92,31± 0,21	92,43± 0,52	92,76± 0,45
<u>Ácido <i>p</i>-cumárico</u>				
<b>Atividade sequestrador de radical DPPH<sup>+</sup></b>	11,22± 6,45	15,67± 6,82	19,69± 8,77	24,42± 6,65
<u>Ácido Ascórbico</u>				
<b>Atividade sequestrador de radical DPPH<sup>+</sup></b>	60,6± 5,38	82,23± 4,54	84,93± 2,43	85,88± 1,26

Valores representam média ± desvio padrão.

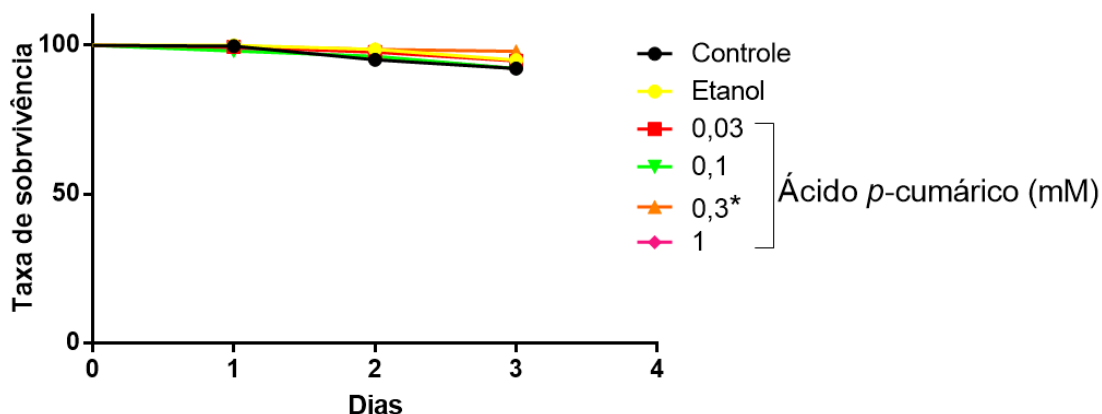
**Tabela 2.** Testes ABTS e DPPH para o ácido *p*-cumárico.

	<u>Ácido <i>p</i>-cumárico</u>		<u>Ácido Ascórbico</u>	
	<u>EC<sub>50</sub>(mM)</u>	<u>Efeito Máximo (%)</u>	<u>EC<sub>50</sub>(mM)</u>	<u>Efeito Máximo (%)</u>
<b>Atividade <i>scavenging</i> ABTS<sup>+</sup></b>	0,05±0	92,47±0,37	0,05±0,016	92,76±0,45
<b>Atividade <i>scavenging</i> DPPH<sup>+</sup></b>	>100	24,42±6,65	0,35±0,017	85,88±0,26

Valores representam média ± desvio padrão. EC<sub>50</sub> corresponde a concentração da amostra necessária para inibir 50% do radical.

### 3.2 Taxa de sobrevivência com exposição de *Drosophila melanogaster* ao ácido *p*-cumárico

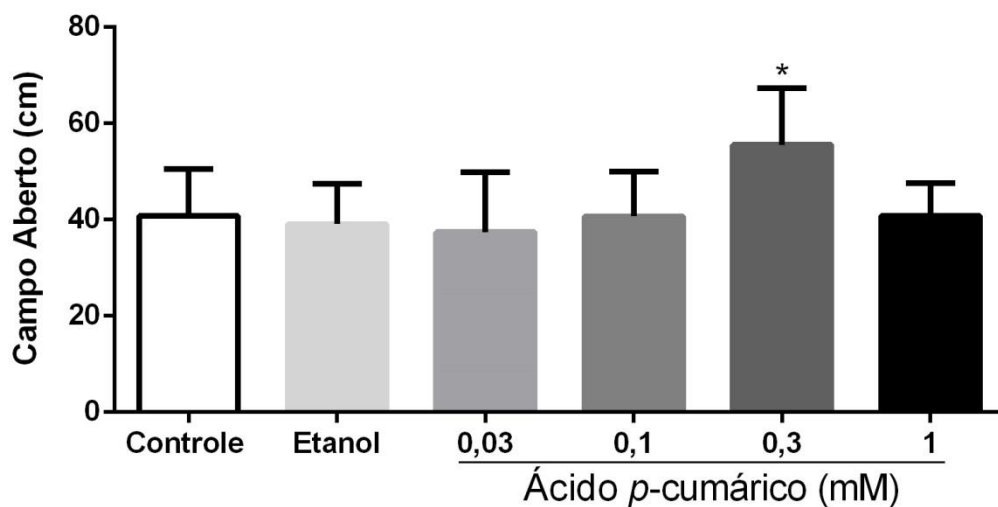
A exposição das moscas ao ácido *p*-cumárico nas concentrações de 0,03 mM, 0,1 mM e 1 mM, não apresentou diferença significativa em relação a sobrevivência quando comparadas ao grupo controle. Na figura 5, é possível observar que, as moscas expostas ao ácido *p*-cumárico na concentração de 0,3 mM, apresentaram uma maior sobrevivência quando comparadas ao grupo controle.



**Figura 5:** Percentual de sobrevivência de moscas expostas ao ácido *p*-cumárico durante 1 dia (24h), 2 dias (48h) e 3 dias (72h) nas concentrações de 0,03mM, 0,1mM, 0,3mM e 1mM.

### 3.3 Teste de Campo Aberto

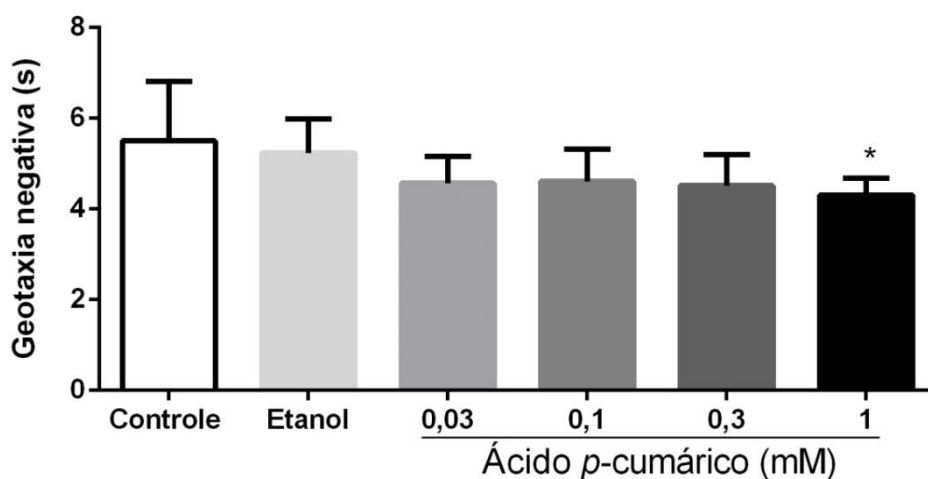
De acordo com a figura 6, em 72hs de exposição ao ácido *p*-cumárico, a concentração de 0,3mM apresentou um aumento significativo da mobilidade das moscas quando comparadas ao grupo controle. No entanto as demais concentrações não apresentaram diferença significativa quando comparadas ao grupo controle.



**Figura 6:** Desempenho locomotor de moscas expostas ao ácido *p*-cumárico no teste de Campo aberto. O teste foi realizado em triplicata, e os dados representam a média  $\pm$  desvio padrão. \*indica uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ) comparada ao grupo controle

### 3.4 Geotaxia negativa

A avaliação do comportamento pelo teste de escalada geotaxia negativa para as moscas expostas ao ácido *p*-cumárico durante 72h conforme a figura 7, mostrou que a concentração 1mM diminuiu significativamente o tempo de escalada quando comparada ao grupo controle. Nas demais concentrações não houve diferença significativa.



**Figura 7:** Desempenho locomotor de moscas expostas ao ácido *p*-cumárico durante 72h no teste de geotaxia negativa. O teste foi realizado em triplicata, e os dados representam a média  $\pm$  desvio padrão. \* indica uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ) comparada ao grupo controle.

#### 4. DISCUSSÃO

O teste da atividade antioxidante pelo método do DPPH, conforme Rufino *et. al.* (2007), é baseado na captura do radical DPPH pelo sequestro de radicais livres, também denominada atividade sequestrador de radical, demonstrando o potencial antioxidante de um composto ou substância, tendo como parâmetro de referência a atividade antioxidante do ácido ascórbico.

A EC<sub>50</sub> corresponde à concentração da amostra necessária para inibir 50% do radical (Moraes, 2011). Levando isto em consideração, no teste do DPPH para o ácido *p*-cumárico, a concentração efetiva em 50% (EC<sub>50</sub>) do composto foi nula.

O ácido *p*-cumárico é derivado do ácido cinâmico (Lafay & Gil-Izquierdo, 2008), sendo assim pode-se comparar com os resultados obtidos no trabalho de Santos *et al.*, (2009) no qual utilizou o ácido cinâmico e obteve resultados similares para o teste de DPPH, não sendo possível determinar o EC<sub>50</sub> e só se obteve uma atividade antioxidante inferior a 5%. No entanto para parâmetros de concentrações de efeito máximo o ácido *p*-cumárico neste estudo apresentou atividade de oxidação de 22,13%. Apesar do ácido *p*-cumárico não ter reduzido às moléculas DPPH, isso não determina que o composto não seja antioxidante, pois, alguns estudos demonstraram que a ação entre antioxidante e DPPH depende de sua formação estrutural, esta redução está relacionada com o número de grupos hidroxilas disponíveis no composto antioxidante (Brand-WilliamS; Cuvelier; Berset, 1995).

No teste de ABTS foram necessários 0,05mM do ácido *p*-cumárico para se obter a EC<sub>50</sub>, com atividade máxima de oxidação de 92,57% do substrato ABTS. O ácido ascórbico, conhecido por sua ação antioxidante, como destacado por Shahidi e Adams (2016), foi utilizado como parâmetro de referência da ação antioxidante, conforme os resultados obtidos os valores entre os dois ácidos estão bem semelhantes, mostrando assim que o ácido *p*-cumárico possui uma boa atividade antioxidante. A atividade antioxidante dos compostos fenólicos esta associada em sua estrutura, pois esta e a única, que pode doar um elétron ou próton a um radical livre ( Villano *et al.*, 2007). A atividade antioxidante do ácido *p*-cumárico está associada ao grupamento fenol, que em um estudo *in vitro* demonstra um ótimo desempenho como sequestrador do radical hidroxila (Mathew *et al.*, 2015). Os resultados obtidos neste trabalho podem ser comparados com o de Kiliç *et. al.* (2013) no qual realizou o teste de ABTS utilizando o

ácido *p*-cumárico nas concentrações de 15  $\mu$ M e 45  $\mu$ M, e obteve resultados semelhantes, mostrando assim que o composto exibe atividade antioxidante eficaz, sendo considerado um composto potente e promissor.

Os dados obtidos nesse estudo mostram que *Drosophila melanogaster* quando expostas ao ácido *p*-cumárico em diferentes concentrações no período de 72h, apresentam alterações comportamentais. A realização do teste de sobrevivência permitiu verificar uma predominância de sobrevivência em moscas tratadas com ácido *p*-cumárico na concentração 0,3 mM. É possível observar que os demais grupos não apresentaram diferença significativa da sobrevivência quando comparadas ao grupo controle. Jimenez *et. al.*, (2010) sugere que a taxa de sobrevivência das moscas podem estar associadas a capacidade antioxidante de um composto sendo assim, os fenólicos por apresentarem um grande potencial antioxidante podem aumentar a sobrevivência em moscas.

No teste de campo aberto as moscas que foram expostas durante 72h ao ácido *p*-cumárico nas concentrações de 0,03mM, 0,1mM e 1mM não apresentaram diferença significativa quando comparadas ao grupo controle, já as moscas que receberam em sua dieta a concentração de 0,3mM apresentaram comportamento locomotor superior ao grupo controle. Prut e Belzung (2003) ressaltam que o teste campo aberto serve não apenas para verificar os padrões de ansiedade, mas também de sedação ou atividade causados por drogas. Desta forma, a atividade das moscas no teste campo aberto, permitiu avaliar a ação do ácido *p*-cumárico no qual na concentração 0,3mM aumentou expressivamente sua atividade locomotora quando comparado aos demais grupos. Essa ação pode estar associada a padrões de ansiedade. Os polifenóis possuem atividade antioxidante, no entanto, alguns estudos *in vitro* sugerem que podem ser pró-oxidantes em certas concentrações (Galati *et al.*, 2002; Shin *et al.*, 2007).

A geotaxia negativa, segundo Gargano *et. al.* (2005), é uma habilidade inata, no qual em condições físicas normais, as moscas voam em direção à parte superior de uma parede, orientando-se pela ação da gravidade. As moscas expostas a dieta contendo ácido *p*-cumárico na concentração 1mM, diminuiu significativamente o tempo de escalada quando comparada ao grupo controle. Nas demais concentrações não houve diferença significativa, Jimenez *et. al.* (2010) em seu estudo utilizou como modelo experimental o paraquat que induziu sintomas semelhantes a doença de Parkinson no

qual demonstrou que os composto fenólicos protegem, resgataram e, mais importante, restauraram a capacidade de escalada de moscas da fruta *Drosophila melanogaster*.

## **5. CONCLUSÃO**

Esse estudo mostrou que o ácido *p*-cumárico é um composto promissor, uma vez que seus efeitos *in vitro* e *in vivo* foram positivos. Mostra-se um potente antioxidante, e aumentando a atividade de movimento, capacidade de escala e período de vida útil de moscas da fruta *Drosophila melanogaster*. No entanto, é necessário o estudo deste composto em modelos animais e no tratamento de doenças, levando em consideração que esse composto possui uma potente atividade antioxidante.



## 6. REFERÊNCIAS

ARAUJO, Stéfani Machado et al. Effectiveness of  $\gamma$ -oryzanol in reducing neuromotor deficits, dopamine depletion and oxidative stress in a *Drosophila melanogaster* model of Parkinson's disease induced by rotenone. **Neurotoxicology**, v. 51, p. 96-105, 2015.

ARUOMA, Okezie 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.

ATOUI, A.K.; Mansouri, A.; Boskou, G.; Kefalas, P. 2005. Tea and herbal infusions: their antioxidant activity and phenolic profile. **Food Chemistry**, 89 (1): 999-1003.

BARCIA, Milene Teixeira et al. Determination by HPLC of ascorbic acid and tocopherols in fruits. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 2, p. 381-390, 2010.

BRAND-WILLIAMS, Wendy; Cuvelier, Marie-Elisabeth; BERSET, C. L. W. T. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.

COULOM, Hélène; Birman, Serge. Chronic exposure to rotenone models sporadic Parkinson's disease in *Drosophila melanogaster*. **Journal of Neuroscience**, v. 24, n. 48, p. 10993-10998, 2004.

DEGÁSPARI, Cláudia Helena; Waszczynskyj, Nina. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. **Visão acadêmica**, v. 5, n. 1, 2004.

DENG, Gui-Fang et al. Potential of fruit wastes as natural resources of bioactive compounds. **International journal of molecular sciences**, v. 13, n. 7, p. 8308-8323, 2012.

FECHINE, B. R.; Trompieri, N. The aging process: the main changes that happen to the elderly with the over the years. *InterSciencePlace*, v. 1, p. 106-32, 2012.

GALATI, Giuseppe et al. Prooxidant activity and cellular effects of the phenoxyl radicals of dietary flavonoids and other polyphenolics. **Toxicology**, v. 177, n. 1, p. 91-104, 2002.

GARGANO, J. W. et al. Rapid iterative negative geotaxis (RING): a new method for assessing age-related locomotor decline in *Drosophila*. *Experimental Gerontology*, v. 40, p. 386-395, 2005.

GUVEN, Mustafa et al. Neuroprotective effect of p-coumaric acid in rat model of embolic cerebral ischemia. *Iranian journal of basic medical sciences*, v. 18, n. 4, p. 356, 2015

HARRAAN, D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. 1955.  
HIRTH, Frank. *Drosophila melanogaster* in the study of human neurodegeneration. **CNS & Neurological Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-CNS & Neurological Disorders)**, v. 9, n. 4, p. 504-523, 2010.

HOTTA, Hiroki et al. Higher radical scavenging activities of polyphenolic antioxidants can be ascribed to chemical reactions following their oxidation. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1572, n. 1, p. 123-132, 2002.

HUANG, D.; PRIOR, R. L. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays., **Journal of Agricultural and Food Chemistry** v. 53, n. 6, p. 1841-1856, 2005.

JELASSI, Amira et al. Chemical composition and characteristic profiles of seed oils from three Tunisian *Acacia* species. **Journal of food composition and analysis**, v. 33, n. 1, p. 49-54, 2014.

JIMENEZ-DEL-RIO, Marlene; Guzman-Martinez, C.; Velez-Pardo, C. The effects of polyphenols on survival and locomotor activity in *Drosophila melanogaster* exposed to iron and paraquat. **Neurochemical research**, v. 35, n. 2, p. 227-238, 2010.

KILIÇ, Ismail; Yeşiloğlu, Yeşim. Spectroscopic studies on the antioxidant activity of p-coumaric acid. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 115, p. 719-724, 2013.

LAFAY, Sophie; Gil-Izquierdo, Angel. Bioavailability of phenolic acids. **Phytochemistry Reviews**, v. 7, n. 2, p. 301, 2008.

MACHADO, L. P.; Kohayagawa, A.; Saito, M. E.; Silveira, V.F. da; Yonezawa, L. A. Lesão oxidativa eritrocitária e mecanismos antioxidantes de interesse em Medicina Veterinária. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 8, n. 1, p. 84-94, 2009.

MATHEW, Sindhu; Abraham, T. Emilia; Zakaria, Zainul Akmar. Reactivity of phenolic compounds towards free radicals under in vitro conditions. **Journal of food science and technology**, v. 52, n. 9, p. 5790-5798, 2015.

MORAIS-DE-SOUZA, Rodrigo Aparecido et al. Compostos fenólicos totais e atividade antioxidante de chás comercializados no Brasil. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 29, n. 2, 2011.

PANDEY, Udai Bhan; Nichols, Charles D. Human disease models in *Drosophila melanogaster* and the role of the fly in therapeutic drug discovery. **Pharmacological reviews**, v. 63, n. 2, p. 411-436, 2011.

PASSERI, M.; Cucinotta D.; de Mello M.; Storchi G.; Roncucci R.; Biziere K. Minaprine for senile dementia. **Lancet**, London, v. 1, n. 8432, p. 824, Apr. 1985.

PEI, Kehan et al. p-Coumaric acid and its conjugates: dietary sources, pharmacokinetic properties and biological activities. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 96, n. 9, p. 2952-2962, 2016.

PELLEGRINI, R. N. A. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay, *Free Radic. Biol. Med.* v. 26, p. 1231 – 1237, mai. 1999.

PRAGASAM, Samuel Joshua; Rasool, MahaboobKhan. Dietary component p-coumaric acid suppresses monosodium urate crystal-induced inflammation in rats. **Inflammation Research**, v. 62, n. 5, p. 489-498, 2013.

PRUT, L.; Belzung, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *European Journal of Pharmacology*. v. 463, p.03-33, 2003.

RUFINO, M. S. M. et al., Metodologia científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre DPPH. **Comunicado Técnico 127**. Embrapa. Fortaleza, CE, p. 127. 2007a.

SANTOS, Susana Isabel Pólvara et al. **Estudos de atividade inibidora de acetilcolinesterase e atividade antioxidante por derivados de colina de ácidos cafeico, cinâmico e rosmarínico: metabolismo in vitro destes compostos**. 2009. Tese de Doutorado.

SHAHIDI, Fereidoon; HO, Chi-Tang (Ed.). Antioxidant measurement and applications. American Chemical Society, 2007.

SHARMA, Om P.; Bhat, Tej K. DPPH antioxidant assay revisited. *Food chemistry*, v. 113, n. 4, p. 1202-1205, 2009.

SHIN, Jung-Keun; KIM, Gyo-Nam; JANG, Hae-Dong. Antioxidant and pro-oxidant effects of green tea extracts in oxygen radical absorbance capacity assay. **Journal of medicinal food**, v. 10, n. 1, p. 32-40, 2007.

SUCUPIRA, N. R. et al. Methods for measuring antioxidant activity of fruits. *UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde*, v. 14, n. 4, p. 263-269, 2012.

SUN, Run-Cang; Sun, Xiao-Feng; Zhang, Shi-Hong. Quantitative determination of hydroxycinnamic acids in wheat, rice, rye, and barley straws, maize stems, oil palm frond fiber, and fast-growing poplar wood. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 11, p. 5122-5129, 2001.

THOMAS, D. R. Vitamins in health and aging. **Clinics in geriatric medicine**, v. 20, n. 2, p. 259-274, 2004.

TRINDADE de Paula, Mariane et al. High-fat diet induces oxidative stress and MPK2 and HSP83 gene expression in *Drosophila melanogaster*. *Oxidative medicine and cellular longevity*, v. 2016, 2016.

VILLANO, D. et al. Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. **Talanta**, v. 71, n. 1, p. 230-235, 2007.

WANASUNDARA, Udaya; AMAROWICZ, Ryszard; SHAHIDI, Fereidoon. Isolation and identification of an antioxidative component in canola meal. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, n. 6, p. 1285-1290, 1994.

WOJDYLO, A.; Oszmianski, J.; Czemerys, R. 2007 - Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. **Food Chemistry**, v.195, p.940-949.

XU, Feng et al. Determination of cell wall ferulic and p-coumaric acids in sugarcane bagasse. **Analytica Chimica Acta**, v. 552, n. 1-2, p. 207-217, 2005.

YOON, Jeong-Hyun et al. p-Coumaric acid and ursolic acid from *Corni fructus* attenuated  $\beta$ -amyloid<sub>25-35</sub>-induced toxicity through regulation of the NF- $\kappa$ B signaling pathway in PC12 cells. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 62, n. 21, p. 4911-4916, 2014.