

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO

INSTITUTO DE QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

TESE

EFEITO DE COMPOSTOS FENÓLICOS E PROBIÓTICOS EM
MODELO PARKINSONIANO DE *Saccharomyces cerevisiae*

Edlene Ribeiro Prudêncio de Souza

Seropédica

2021



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO

INSTITUTO DE QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**EFEITO DE COMPOSTOS FENÓLICOS E PROBIÓTICOS EM
MODELO PARKINSONIANO DE *Saccharomyces cerevisiae***

EDLENE RIBEIRO PRUDÊNCIO DE SOUZA

Orientador

Prof. Dsc. Cristiano Jorge Riger

Co-orientador

Prof. Dsc. Marcos Dias Pereira

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutora em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Química, Área de concentração Química Biológica

Seropédica-RJ

Abril de 2021

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro Biblioteca Central / Seção de
Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S719e Souza, Edlene Ribeiro Prudêncio de, 1991-
Efeito de compostos fenólicos e probióticos em modelo parkinsoniano de
Saccharomyces cerevisiae / Edlene Ribeiro Prudêncio de Souza. -
Seropédica, RJ: 2021. 100 f.: il.

Orientador: Cristiano Jorge Riger.

Coorientador: Marcos Dias Pereira.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro,
Programa de Pós Graduação em Química.

1. Doença de Parkinson. 2. *Saccharomyces cerevisiae*. 3. Compostos
fenólicos. 4. Probióticos. 5. Estresse Oxidativo. I. Riger, Cristiano Jorge, 1972-
II. Pereira, Marcos Dias, 1975-, coorient. III. Universidade Federal Rural do Rio
de Janeiro. Programa de Pós Graduação em Química. V. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

EDLENE RIBEIRO PRUDÊNCIO DE SOUZA

Tese submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de **Doutora em Química**, no Programa de Pós-Graduação em Química

TESE APROVADA EM 30/04/2021

Conforme deliberação número 001/2020 da PROPPG, de 30/06/2020, tendo em vista a implementação de trabalho remoto e durante a vigência do período de suspensão das atividades acadêmicas presenciais, em virtude das medidas adotadas para reduzir a propagação da pandemia de Covid-19, nas versões finais das teses e dissertações as assinaturas originais dos membros da banca examinadora poderão ser substituídas por documento(s) com assinaturas eletrônicas. Estas devem ser feitas na própria folha de assinaturas, através do SIPAC, ou do Sistema Eletrônico de Informações (SEI) e neste caso a folha com a assinatura deve constar como anexo ao final da tese / dissertação.

Membros da banca:

Cristiano Jorger Riger
(Dr.) UFRRJ (Orientador) Presidente da Banca

Tiago Fleming Outeiro
(Dr.) Max - Planck -Institut/Für Expremintelle Medizin/Göttinger-Alemanha externo

Yraima Moura Lopes Cordeiro
(Dr^a.) UFRJ

Rosa Helena Luchese
(Dr^a.) UFRRJ

Cristiane Martins Cardoso de Salles
(Dr.) UFRRJ



Emitido em 30/04/2021

DELIBERAÇÃO Nº 202/2021 - PPGQ (12.28.01.00.00.60)

(Nº do Protocolo: NÃO PROTOCOLADO)

(Assinado digitalmente em 03/05/2021 10:28)
CRISTIANE MARTINS CARDOSO DE SALLES
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DBQ (11.39.00.24)
Matrícula: 1681790

(Assinado digitalmente em 03/05/2021 10:38)
CRISTIANO JORGE RIGER
COORDENADOR CURS/POS-GRADUACAO - TITULAR
CHEFE DE UNIDADE
CoordCGQ (12.28.01.00.00.58)
Matrícula: 1844240

(Assinado digitalmente em 04/05/2021 09:22)
ROSA HELENA LUCHESE
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DTA (12.28.01.00.00.00.46)
Matrícula: 359403

(Assinado digitalmente em 03/05/2021 09:38)
TIAGO FLEMING OUTEIRO
ASSINANTE EXTERNO
Passaporte: C820267

(Assinado digitalmente em 03/05/2021 10:14)
YRAIMA MOURA LOPES CORDEIRO
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 042.483.817-61

Para verificar a autenticidade deste documento entre em <https://sipac.ufrrj.br/documentos/> informando seu número:
202, ano: **2021**, tipo: **DELIBERAÇÃO**, data de emissão: **03/05/2021** e o código de verificação: **803e7681d8**

AGRADECIMENTOS

Eu agradeço imensamente a Deus por todo amor que me conduziu até aqui e me inspira em ser uma pessoa melhor. Agradeço a intercessão de Nossa Senhora em todos os momentos de minha vida.

“Se vi mais longe, foi por estar sobre os ombros de gigantes”. Isaac Newton conseguiu resumir numa pequena frase a sabedoria de compreender que a todo lugar que chegamos, carregamos em nós a força de muitos outros. Eu agradeço aos meus gigantes Susana e Edmundo Prudêncio que, na simplicidade de suas origens, fizeram escolhas e renúncias para impulsionar suas filhas a ir cada vez mais longe. De meus pais recebi amor incondicional com sabedoria, que me deu tudo que eu precisava e ao mesmo tempo ensinou a importância de buscar minhas conquistas. Pai, gratidão por seus exemplos de esforço e perseverança. Mãe, gratidão por seus exemplos de doçura, bravura e fé.

Diante de toda aleatoriedade do universo, gratidão, Deus, por eu ter como orientador o professor Cristiano Riger. Hoje entendo que nada é por acaso, o privilégio de estar sob sua tutela me mostrou a grandeza de estar na função de mestre. Todos nós, seus alunos, podemos descrever as inúmeras vezes que conversar sobre resultados incluía pensar em nossas motivações, sonhos, objetivos de vida e como o Laboratório 24 poderia participar disso tudo. Unir a vivência na área científica com um profundo respeito à humanidade de cada um é para poucos. E isto se traduziu na alegria e motivação que tivemos em trabalhar com o Cristiano. Se um dia eu tiver a oportunidade de ser professora, terei no meu orientador uma referência e um amigo.

Deus me concedeu a alegria de ter uma irmã amorosa, a Edna, com quem tenho uma grande conexão desde pequenina. Sua dedicação e esmero são inspirações para mim. Perdi as contas da quantidade de vezes que busquei o seu apoio e sempre encontrei. Você é importantíssima em minha jornada, gratidão por todo seu amor e carinho.

Deus me presenteou com um companheiro melhor do que eu saberia pedir. Agradeço imensamente a André, meu marido, por seu contínuo apoio e torcida desde que nos conhecemos. Agradeço por cada palavra de incentivo, cada visualização positiva e por todas as vezes em que você teve paciência invejável com meu processo de crescimento. Amo-te muito, muito e muito!

Agradeço a Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro por ter me concedido conhecimento na forma de graduação e pós-graduação, muitos amigos e também memórias indescritíveis. São inesquecíveis os pores do sol espetaculares, o espetáculo de vagalumes que só é visto quando falta luz, as paisagens lindíssimas e a adrenalina e risos causados por correr do enxame de algum inseto. Minha imensa gratidão a esta instituição por cada experiência.

Agradeço a todos os alunos contemporâneos a mim no Laboratório 24: Priscila, Nathan, Lynn, Francine, Nathalia, Izabel, Julyana, Beatriz, Larissa, Nathaly, Andréia, Marina, Bárbara, Marcos, Danniell, Rodrigo Osorio, Rodrigo Teixeira, Karine, Jéssica e alguém mais que eu possa ter esquecido, pelo convívio com vocês no dia a dia e nas viagens, pela partilha dos aprendizados, pela troca de experiências, por tudo mais. Vocês foram muito importantes para mim nesse processo de estudos. Agradeço cada incentivo na busca de meus sonhos. Continuo contando com a torcida de vocês.

Gratidão imensa a todos os meus amigos, que acompanharam a jornada de estudos e floresceram meus dias com conversas, risadas, apoio, carinho e companheirismo: Raquel, Flavio, Marcela, Jessica Zickwolf, Jessica Azevedo, Nathalia, Luana, Clara, Leonardo e todos os que iluminaram minha jornada até aqui.

Agradeço a todos os amigos que fiz no trabalho e ao apoio que recebi. O Departamento de Tecnologia de Alimentos foi muito importante para meu crescimento. Um agradecimento especial para Daniel e Roberto, meus padrinhos, Ivan, Dina, professora Rosa e professor Romulo com os quais eu dividi o dia a dia e aprendi imensamente. Gratidão para todos que compartilharam comigo suas experiências e aprendizados.

Agradeço às agências de fomento CAPES e CNPq por apoiar o Programa de Pós-Graduação em Química da UFRRJ.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

RESUMO

Souza, Edlene Ribeiro Prudêncio de. **Efeito de compostos fenólicos e probióticos em modelo parkinsoniano de *Saccharomyces cerevisiae***. 2021. 132 p. Tese. (Doutorado em Química, Química Medicinal e Biológica). Instituto de Química. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2021.

A doença de Parkinson (DP) é uma desordem neurodegenerativa progressiva associada principalmente ao envelhecimento e que não tem cura até o momento. O entendimento atual sobre a fisiopatologia da DP sugere um papel central do acúmulo da proteína α -sinucleína (α -sin) e diversas evidências vêm direcionando que o local inicial deste processo seria o sistema nervoso entérico. É sabido que a ingestão de substâncias fenólicas contribui para o equilíbrio redox do organismo, no entanto suas bioatividades são altamente impactadas por biotransformações microbianas que ocorrem no lúmen intestinal. O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência das biotransformações microbianas na atividade antioxidante das substâncias fenólicas éster fenílico do ácido cafeico (CAPE) e mangiferina, assim como seus efeitos sobre a toxicidade da proteína α -sinucleína, ambos em células eucarióticas da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Nos ensaios para avaliação da atividade antioxidante, CAPE e mangiferina (0,1 mM) diminuíram os danos oxidativos induzidos por peróxido de hidrogênio na cepa controle (BY4741) e nas cepas mutantes $\Delta sod1$, $\Delta gsh1$ e $\Delta ctt1$, deficientes em sistemas antioxidantes. A fermentação microbiana manteve a capacidade antioxidante do CAPE e da mangiferina no modelo *in vivo*, revelando aumento somente com o CAPE na análise *in vitro*. Contudo, esta atividade da mangiferina não foi significativa nos testes de viabilidade e oxidação intracelulares. Quando as substâncias CAPE e mangiferina foram avaliadas em levedura transformada que expressava o gene da α -sinucleína observou-se que as substâncias sem fermentar não inibiram a agregação da proteína, mas que os seus fermentados reduziram a agregação em cerca de 50% no ensaio de microscopia de fluorescência. A inibição da agregação não teve correlação com a atividade antioxidante, mas sim com a presença de metabólitos fermentados. A detecção de 3-HPPA, metabólito microbiano associado à redução da toxicidade de α -sin, converge com as teorias recentes de que a microbiota influencia na etiologia da doença de Parkinson, entretanto estudos posteriores são necessários em investigar quais micro-organismos produziram este metabólito e se outros produtos do metabolismo microbiano estariam envolvidos na redução da toxicidade de α -sin. Os resultados de nossos estudos sugerem que interações entre o microbioma e certos fatores dietéticos podem embasar novas estratégias terapêuticas para modular o início e/ou progressão de sinucleinopatias.

Palavras-chaves: Doença de Parkinson, *Saccharomyces cerevisiae*, compostos fenólicos, probióticos, estresse oxidativo.

ABSTRACT

Souza, Edlene Ribeiro Prudêncio de. **Effect of phenolic and probiotic compounds in a parkinsonian model of *Saccharomyces cerevisiae***. 2021. 132 p. Thesis. (PhD in Chemistry, Medicinal and Biological Chemistry). Chemistry Institute. Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2021.

Parkinson's disease (PD) is a progressive neurodegenerative disorder associated mainly with aging and that has not been cured until now. The current understanding of the pathophysiology of PD suggests a central role in the accumulation of the protein α -synuclein (α -sin) and several evidences have been directing that the initial site of this process would be the enteric nervous system. It is known that the intake of phenolic substances contributes to the redox balance of the organism, however its bioactivities are highly impacted by microbial biotransformations that occur in the intestinal lumen. The objective of this work was to evaluate the influence of microbial biotransformations on the antioxidant activity of phenolic substances phenethyl ester of caffeic acid (CAPE) and mangiferin, as well as their effects on the toxicity of α -synuclein protein, both in eukaryotic cells of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. In the tests to evaluate the antioxidant activity, CAPE and mangiferin (0.1 mM) decreased the oxidative damage induced by hydrogen peroxide in the control strain (BY4741) and in the mutant strains $\Delta sod1$, $\Delta gsh1$ and $\Delta ctt1$, deficient in antioxidant systems. Microbial fermentation maintained the antioxidant capacity of CAPE and mangiferin in the *in vivo* model, revealing an increase only with CAPE in the *in vitro* analysis. However, this mangiferin activity was not significant in intracellular viability and oxidation tests. When the CAPE and mangiferin substances were evaluated in transformed yeast that expressed the α -synuclein gene, it was observed that the substances without fermentation did not inhibit the aggregation of the protein, but that their fermentates reduced the aggregation by about 50% in the fluorescence microscopy assay. The inhibition of aggregation was not correlated with antioxidant activity, but with the presence of fermented metabolites. The detection of 3-HPPA, a microbial metabolite associated with the reduction of α -sin toxicity, converges with recent theories that the microbiota influences the etiology of Parkinson's disease, however further studies are needed to investigate which microorganisms would produce this metabolite and whether other products of microbial metabolism are involved in reducing the toxicity of α -sin. The results of our studies suggest that interactions between the microbiome and certain dietary factors may support new therapeutic strategies to modulate the onset and/or progression of synucleinopathies.

Keywords: Parkinson's disease, *Saccharomyces cerevisiae*, phenolic compounds, probiotics, oxidative stress.

ÍNDICE DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Estrutura molecular e característica funcional de α -sin. A proteína alfa-sinucleína é dividida em domínios N-terminal (1-60 aa), NAC (61-95 aa) e C-terminal (96-140 aa). O domínio N-terminal contém quatro motivos (cor azul) e tem cinco locais de mutação pontuais ligados a DP (A30P, E46K, H50Q, G51D e A53T), além de um resíduo de tirosina (Y39) que é um alvo de fosforilação. O domínio NAC, que engloba a maioria dos resíduos hidrofóbicos, promove a agregação, com um sítio de fosforilação (S87). O domínio C-terminal exibe atividade chaperona que tende a diminuir a agregação de proteínas, tem um local de fosforilação (S129) e três resíduos de tirosina (Y125, Y133, Y136) (TENREIRO; ECKERMANN; OUTEIRO, 2014, adaptado).....	5
Figura 2. Estrutura tridimensional da α -sin (PARIHAR et al., 2018).....	5
Figura 3: Polímeros de α -sin e suas prováveis estruturas que causariam toxicidades (WONG; KRAINIC, 2017).....	6
Figura 4. (A) Estrutura básica de polifenóis, onde a diferenciação ocorre pela quantidade e posição de hidroxilas. (B) Possíveis pontos de coordenação de flavonoides com metais (PROCHÁZKOVÁ; BOUŠOVÁ; WILHELMOVÁ, 2011).....	12
Figura 5. Estrutura da mangiferina, onde estrutura fenólica tem ligação carbono-carbono com uma molécula de glicose (EL-SEEDI et al., 2010).....	14
Figura 6. Estrutura química do éster fenetílico do ácido cafeico (CAPE) (MURTAZA; KARIM; AKRAM, 2014).....	16
Figura 7. Modelo Parkinsoniano de levedura, onde a expressão de duas cópias do gene α -sin leva a toxicidade (TENREIRO; OUTEIRO, 2016).....	18
Figura 8. Redução da resazurina em resorufina.	24
Figura 9. Curva de crescimento de <i>S. cerevisiae</i> em presença de glicose onde a densidade celular foi estimada pela turbidez lida a 600 nm (SWINNEN et al., 2006 - Adaptado).....	25
Figura 10 - Produto formado a partir da reação do ácido 2-tiobarbitúrico e o malonaldeído.	27
Figura 11. Avaliação da população microbiana ao longo do tempo de fermentação.....	30
Figura 12. Meio de cultivo sem contato com as bactérias (tempo 0).....	32
Figura 13. CAPE no momento inicial da fermentação (tempo 0).....	32
Figura 14. Caldo fermentado após 168 h de incubação com CAPE.	32
Figura 15. Mangiferina no momento inicial da fermentação (tempo 0).....	33
Figura 16. Caldo fermentado após 168 h de incubação com mangiferina.....	33
Figura 17. Figura ilustrativa do resultado de citotoxicidade avaliada pelo método da resazurina na cepa BY4741.	35
Figura 18. Comparativo da toxicidade dos meios de cultivo utilizados na incubação com H_2O_2 . (T) Tampão, (MM) meio mínimo, (MMF) meio mínimo fermentado, ($+H_2O_2$) tratamento posterior com peróxido de hidrogênio 2,0 mM por 1 h. Os resultados	

representam a média de pelo menos três experimentos independentes. Letras diferentes mostram resultados estatisticamente distintos ($p < 0,05$) na análise de ANOVA seguida de pós teste de Tukey.38

Figura 19. Viabilidade celular na cepa BY4741 com células tratadas com CAPE a 0,1 mM (CP) e CAPE 0,1 mM após 168 h de fermentação microbiana (FCP); mangiferina 0,1 mM (MF) e mangiferina 0,1 mM após 168 h de fermentação microbiana (FMG). Todos os tratamentos foram pós-incubados por 1 h com peróxido de hidrogênio (2,0 mM). CT representa as células sem tratamento usadas como referência. Os resultados representam a média de pelo menos três experimentos independentes. Letras diferentes mostram resultados estatisticamente distintos ($p < 0,05$) na análise de ANOVA one way seguida de pós teste de Tukey.39

Figura 20. Enzimas do sistema de defesa antioxidante. Superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPX), glutathione reductase (GR), glutathione reduzida (GSH) e glutathione oxidada (GSSG).41

Figura 21. Viabilidade celular na cepa mutante Δ ctt1 com células tratadas com CAPE a 0,1 mM (CP) e CAPE 0,1 mM após 168 h de fermentação microbiana (FCP); mangiferina 0,1 mM (MF) e mangiferina 0,1 mM após 168 h de fermentação microbiana (FMG). Todos os tratamentos foram pós-incubados por 1 h com peróxido de hidrogênio (2,0 mM). CT representa as células sem tratamento usadas como referência. Os resultados representam a média de pelo menos três experimentos independentes. Letras diferentes mostram resultados estatisticamente distintos ($p < 0,05$) na análise de ANOVA one way seguida de pós teste de Tukey.42

Figura 22. Viabilidade celular na cepa mutante Δ gsh1 com células tratadas com CAPE a 0,1 mM (CP) e CAPE 0,1 mM após 168 h de fermentação microbiana (FCP); mangiferina 0,1 mM (MF) e mangiferina 0,1 mM após 168 h de fermentação microbiana (FMG). Todos os tratamentos foram pós-incubados por 1 h com peróxido de hidrogênio (2,0 mM). CT representa as células sem tratamento usadas como referência. Os resultados representam a média de pelo menos três experimentos independentes. Letras diferentes mostram resultados estatisticamente distintos ($p < 0,05$) na análise de ANOVA one way seguida de pós teste de Tukey.44

Figura 23. Viabilidade celular na cepa Δ sod1 com células tratadas com CAPE a 0,1 mM (CP) e CAPE 0,1 mM após 168 h de fermentação microbiana (FCP); mangiferina 0,1 mM (MF) e mangiferina 0,1 mM após 168 h de fermentação microbiana (FMG). Todos os tratamentos foram pós-incubados por 1 h com peróxido de hidrogênio (2,0 mM). CT representa as células sem tratamento usadas como referência. Os resultados representam a média de pelo menos três experimentos independentes. Letras diferentes mostram resultados estatisticamente distintos ($p < 0,05$) na análise de ANOVA one way seguida de pós teste de Tukey.45

Figura 24. Níveis de oxidação intracelular avaliados na cepa BY4741 As células foram tratadas com tampão PBS (T) e com o meio mínimo fermentado (MMF); CAPE a 0,1 mM em MMF (CP) e CAPE 0,1 mM após 168 h de fermentação microbiana (FCP); mangiferina 0,1 mM em MMF (FMG) e mangiferina a 0,1 mM após 168 h de fermentação microbiana (FMG). Tratamentos sem estresse (barras pretas) e tratamentos sob estresse por 1 h com peróxido de hidrogênio 2,0 mM (barras brancas). Os resultados representam a média de pelo menos três experimentos independentes. Letras diferentes mostram resultados estatisticamente distintos ($p < 0,05$) na análise de ANOVA two way seguida de pós teste de Tukey.46

Figura 25. Níveis de oxidação intracelular avaliados na cepa Δ ctt1. As células foram tratadas com tampão PBS (T) e com o meio mínimo fermentado (MMF); CAPE a 0,1 mM em MMF (CP) e CAPE 0,1 mM após 168 h de fermentação microbiana (FCP); mangiferina 0,1 mM em MMF (FMG) e mangiferina a 0,1 mM após 168 h de fermentação microbiana (FMG). Tratamentos sem estresse (barras pretas) e tratamentos sob estresse por 1 h com peróxido de hidrogênio 2,0 mM (barras brancas). Os resultados representam a média de pelo menos três experimentos independentes. Letras diferentes mostram resultados estatisticamente distintos ($p < 0,05$) na análise de ANOVA two way seguida de pós teste de Tukey.....48

Figura 26. Níveis de oxidação intracelular avaliados na cepa Δ gsh1. As células foram tratadas com tampão PBS (T) e com o meio mínimo fermentado (MMF); CAPE a 0,1 mM em MMF (CP) e CAPE 0,1 mM após 168 h de fermentação microbiana (FCP); mangiferina 0,1 mM em MMF (FMG) e mangiferina a 0,1 mM após 168 h de fermentação microbiana (FMG). Tratamentos sem estresse (barras pretas) e tratamentos sob estresse por 1 h com peróxido de hidrogênio 2,0 mM (barras brancas). Os resultados representam a média de pelo menos três experimentos independentes. Letras diferentes mostram resultados estatisticamente distintos ($p < 0,05$) na análise de ANOVA two way seguida de pós teste de Tukey.....48

Figura 27. Níveis de oxidação intracelular avaliados na cepa Δ sod1. As células foram tratadas com tampão PBS (T) e com o meio mínimo fermentado (MMF); CAPE a 0,1 mM em MMF (CP) e CAPE 0,1 mM após 168 h de fermentação microbiana (FCP); mangiferina 0,1 mM em MMF (FMG) e mangiferina a 0,1 mM após 168 h de fermentação microbiana (FMG). Tratamentos sem estresse (barras pretas) e tratamentos sob estresse por 1 h com peróxido de hidrogênio 2,0 mM (barras brancas). Os resultados representam a média de pelo menos três experimentos independentes. Letras diferentes mostram resultados estatisticamente distintos ($p < 0,05$) na análise de ANOVA two way seguida de pós teste de Tukey.....49

Figura 28. Peroxidação lipídica avaliada na cepa BY4741. As células foram tratadas com CAPE a 0,1 mM (CP) e CAPE 0,1 mM após 168 h de fermentação microbiana (FCP); mangiferina 0,1 mM (MF) e mangiferina a 0,1 mM após 168 h de fermentação microbiana (FMG). Todos os tratamentos foram submetidos por 1 h ao peróxido de hidrogênio (2,0 mM) e comparados com células não estressadas - controle (CT). Os resultados representam a média de pelo menos três experimentos independentes. Letras diferentes mostram resultados estatisticamente distintos ($p < 0,05$) na análise de ANOVA one way seguida de pós teste de Tukey.....51

Figura 29. Peroxidação lipídica nas cepas mutantes: (A) cepa Δ ctt1, (B) cepa Δ gsh1 e (C) cepa Δ sod1. As células foram tratadas com CAPE a 0,1 mM (CP) e CAPE 0,1 mM após 168 h de fermentação microbiana (FCP); mangiferina 0,1 mM (MF) e mangiferina a 0,1 mM após 168 h de fermentação microbiana (FMG). Todos os tratamentos foram submetidos por 1 h peróxido de hidrogênio (2,0 mM) e comparados com células não estressadas - controle (CT). Os resultados representam a média de pelo menos três experimentos independentes. Letras diferentes mostram resultados estatisticamente distintos ($p < 0,05$) na análise de ANOVA one way seguida de pós teste de Tukey. 52

Figura 30. (A) Curvas de crescimento da cepa P426 em meio SGLI: Controle (CT); Meio mínimo fermentado por 168 h (MMF); CAPE 0,1 mM (CP); CAPE 0,1 mM após 168 h de fermentação microbiana (FCP); mangiferina 0,1 mM (MG) e mangiferina 0,1 mM após 168 h de fermentação microbiana (FMG). (B) Plaqueamento spot da cepa

P426 em meio SGAL após 20 h com os mesmos tratamentos. Os resultados representam a média de pelo menos três experimentos independentes.	56
Figura 31. (A) Curvas de crescimento da cepa P426 em meio SGAL: Controle (CT); Meio mínimo fermentado por 168 h (MMF); CAPE 0,1 mM (CP); CAPE 0,1 mM após 168 h de fermentação microbiana (FCP); mangiferina 0,1 mM (MG) e mangiferina 0,1 mM após 168 h de fermentação microbiana (FMG). (B) Plaqueamento spot da cepa P426 em meio SGAL após 20 h com os mesmos tratamentos. Os resultados representam a média de pelo menos três experimentos independentes.	57
Figura 32. (A) Curvas de crescimento da cepa α -sin em meio SGLI: Controle (CT); Meio mínimo fermentado por 168 h (MMF); CAPE 0,1 mM (CP); CAPE 0,1 mM após 168 h de fermentação microbiana (FCP); mangiferina 0,1 mM (MG) e mangiferina 0,1 mM após 168 h de fermentação microbiana (FMG). (B) Plaqueamento spot da cepa α -sin em meio SGLI após 20 h com os mesmos tratamentos. Os resultados representam a média de pelo menos três experimentos independentes.	58
Figura 33. (A) Curvas de crescimento da cepa α -sin em meio SGAL: Controle (CT); Meio mínimo fermentado por 168 h (MMF); CAPE 0,1 mM (CP); CAPE 0,1 mM após 168 h de fermentação microbiana (FCP); mangiferina 0,1 mM (MG) e mangiferina 0,1 mM após 168 h de fermentação microbiana (FMG). (B) Plaqueamento spot da cepa α -sin em meio SGAL após 20 h com os mesmos tratamentos. Os resultados representam a média de pelo menos três experimentos independentes.	59
Figura 34. Coloração de Gram. (A) Morfologia de leveduras (1) e bactérias (2). Tratamentos fermentados: MMF (B), FCP (C) e FMG (D).....	60
Figura 35. Imagens da microscopia de fluorescência: somente as células (A), imagem apenas com as células fluorescentes (B) e junção das duas imagens anteriores (C). Leveduras contabilizadas como fluorescendo na membrana (1) e como inclusões proteicas no citosol (2).	61
Figura 36. Percentual de fluorescência relativo ao ensaio controle (CT) da levedura α -sin induzida por 20 h com os respectivos tratamentos: Meio mínimo fermentado (MMF); CAPE a 0,1 mM (CP); CAPE 0,1 mM após 168 h de fermentação microbiana (FCP); mangiferina 0,1 mM (MG) e mangiferina 0,1 mM após 168 h de fermentação microbiana (FMG). Os resultados representam a média de pelo menos três experimentos independentes, contabilizando pelo menos 200 células cada um. Letras diferentes mostram resultados estatisticamente distintos ($p < 0,05$) na análise de ANOVA two way seguida de pós teste de Tukey.	61
Figura 37. Avaliação da oxidação intracelular em células das cepas α -sin e P426 pré-tratadas com o Meio Mínimo Fermentado (MMF) e o Meio SGAL indutor da expressão de α -sin. Os resultados representam a média de pelo menos três experimentos independentes. Letras diferentes mostram resultados estatisticamente distintos ($p < 0,05$) na análise de ANOVA two way seguida de pós teste de Tukey.....	63
Figura 38. Ácido etanoico ou acético, massa molar 60,052 g.mol ⁻¹	64
Figura 39. Ácido propanoico, massa molar 74,08 g.mol ⁻¹	64
Figura 40. Ácido butírico, massa molar 88,11 g.mol ⁻¹	65
Figura 41. Ácido 3-hidróxibenzoico (3-HBA) (massa molecular 138,12 g.mol ⁻¹).	65
Figura 42. Ácido 3-(3-hidróxifenil) propiônico (3-HPPA) (massa molecular 166,17 g.mol ⁻¹).	65

Figura 43. Ácido 3,4-di-hidróxibenzoico (3,4-diHBA) (massa molecular $154,12 \text{ g.mol}^{-1}$).....	65
Figura 44. Cromatograma total do sobrenadante MMF. As diferentes cores representam os distintos cromatogramas das massas analisadas (m/z).	66
Figura 45. (A) Perfil de fragmentação associado ao íon propionato. (B) Cromatograma do íon propionato em $1,845 \pm 0,05 \text{ min}$	67
Figura 46. (A) Perfil de fragmentação associado ao íon -(3-hidróxi-fenil) propanoico. (B) Cromatograma do íon -(3-hidróxi-fenil) propanoico.	68

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> utilizadas no trabalho.....	22
Tabela 2. Valores de CE_{50} das substâncias puras e após a fermentação. Os resultados representam a média de pelo menos três experimentos independentes. Letras diferentes mostram resultados estatisticamente distintos ($p < 0,05$) na análise de ANOVA seguida de pós teste de Tukey.	36
Tabela 3. Densidade óptica da suspensão celular da cepa P426 em meio de cultivo SGLI. Os resultados representam a média de pelo menos três experimentos independentes.....	56
Tabela 4. Densidade óptica da suspensão celular da cepa P426 em meio de cultivo SGAL. Os resultados representam a média de pelo menos três experimentos independentes.....	57
Tabela 5. Densidade óptica da suspensão celular da cepa α -sin em meio de cultivo SGLI. Os resultados representam a média de pelo menos três experimentos independentes.....	58
Tabela 6. Densidade óptica da suspensão celular da cepa α -sin em meio de cultivo SGAL. Os resultados representam a média de pelo menos três experimentos independentes.....	59

SIGLAS E ABREVIATURAS

α -sin - α -sinucleína

ATP- Adenosina trifosfato

AGCC - Ácidos Graxos de Cadeia Curta

BHE - Barreira Hematoencefálica

CEEs - Células Enteroendócrinas

CL - Corpos de Lewy

CN - Corpos de Neurite

CTE - Cadeia de Transporte de Elétrons

DP - Doença de Parkinson

EROs - Espécies Reativas de Oxigênio

GABA - Ácido γ -Aminobutírico

GI- Gastrointestinal

L-DOPA - Levodopa

LPS - Lipopolissacarídeos

MI - Microbiota Intestinal

MPP⁺ - 1-metil-4-fenilpiridínio

MPTP - 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina

SNARE - Soluble NSF Attachment Receptor (Receptor de anexo NSF solúvel)

SNC - Sistema Nervoso Central

SNE - Sistema Nervoso Entérico

TLRs - Toll-Like Receptors (Receptores do Tipo Pedágio)

SUMÁRIO

1.	Introdução.....	1
2.	Revisão da literatura.....	3
2.1	A doença de Parkinson	3
2.1.1	A proteína α -sinucleína.....	4
2.1.2	Mecanismos de toxicidade da α -sinucleína	6
2.2	Tratamentos atuais disponíveis para a doença de Parkinson	7
2.3	Relação entre o sistema nervoso entérico e a doença de Parkinson ...	8
2.4	Probióticos.....	10
2.5	As substâncias fenólicas e a microbiota	11
2.6	Alternativas terapêuticas dietéticas	13
2.6.1	Mangiferina.....	14
2.6.2	Éster fenílico do ácido cafeico	15
2.7	A levedura como modelo de estudo da Doença de Parkinson	17
3.	Objetivo geral.....	20
4.	Objetivos específicos.....	20
5.	METODOLOGIA	21
5.1	Substâncias testadas	21
5.2	Fermentação microbiana.....	21
5.2.1	Culturas de Lactobacillus e Bifidobacterium.....	21
5.2.2	Fermentação microbiana.....	21
5.2.3	Caracterização da biotransformação bacteriana por cromatografia líquida	22
5.3	Culturas de leveduras e condições de crescimento	22
5.4	Citotoxicidade das substâncias fenólicas	23
5.5	Ensaio antioxidantes.....	24
5.5.1	Pré-tratamento das cepas controle e mutantes de <i>S. cerevisiae</i> .	24
5.5.2	Capacidade antioxidante in vitro.....	25
5.5.3	Viabilidade celular	26
5.5.4	Oxidação intracelular.....	26
5.5.5	Peroxidação lipídica	26
5.6	Estudos de neuroproteção em modelo biológico de <i>S. cerevisiae</i>	27
5.6.1	Pré-tratamento das cepas p426 e α -sin.....	27
5.6.2	Curvas de crescimento.....	27
5.6.3	Viabilidade celular avaliada por ensaios “spot”	28
5.6.4	Microscopia de fluorescência	28

5.7	Detecção de metabólitos por HPLC-Q-TOF-MS.....	28
5.8	Análise estatística.....	29
6.	RESULTADOS E DISCUSSões	30
6.1	Fermentação microbiana e perfil fenólico	30
6.2	Citotoxicidade.....	34
6.3	Ação antioxidante	35
6.3.1	Capacidade antioxidante pelo método de DPPH.....	36
6.3.2	Viabilidade celular	37
6.3.3	Oxidação intracelular.....	46
6.3.4	Peroxidação lipídica	50
6.4	Considerações sobre as propriedades antioxidantes das substâncias fenólicas sobre <i>S. cerevisiae</i>	53
6.5	Influência da fermentação microbiana sobre a cepa contendo α -sinucleína	55
6.5.1	Curva de crescimento e plaqueamento spot	55
6.5.2	Microscopia de fluorescência	60
6.5.3	Oxidação intracelular.....	63
6.5.4	Metaboloma.....	64
7.	CONCLUSÕES.....	70
8.	BIBLIOGRAFIA.....	71

1. INTRODUÇÃO

Projeções apontam que a expectativa de vida deve aumentar em mais de 10 anos em diversos países, além disso, a proporção de idosos na população deve dobrar nos próximos 30 anos, evidenciando que doenças associadas ao envelhecimento terão relevância cada vez maior no âmbito da saúde pública. Neste contexto, as doenças neurodegenerativas como as doenças de Alzheimer e Parkinson ganham especial atenção visto que ainda não possuem cura, até mesmo os entendimentos das causas da doença não foram completamente elucidados. Os tratamentos atuais conseguem apenas uma melhora na qualidade de vida dos pacientes. Estes fatos elevam a importância das pesquisas por uma melhor compreensão da doença para desenvolvimento de tratamentos mais eficazes.

No cérebro dos pacientes acometidos com a doença de Parkinson (DP) são encontrados agregados citoplasmáticos insolúveis conhecidos como corpos de Lewy. Eles são ricos em uma proteína amiloide chamada α -sinucleína (α -sin). Estes agregados levam a uma variedade de disfunções celulares e sinápticas, que, em última instância, levam a morte celular.

Apesar de suas funções celulares ainda não estarem totalmente esclarecidas, a proteína α -sin interage nos terminais sinápticos com numerosas proteínas que regulam a homeostase da dopamina nos neurônios. O defeito na função proteica causa estresse no retículo endoplasmático, contribui para uma disfunção no armazenamento vesicular da dopamina e promove seu acúmulo citoplasmático; resultando em estresse oxidativo e em alterações funcionais do metabolismo intracelular dos neurônios. Nos pacientes com DP também é observada a inibição dos complexos mitocondriais, onde este processo tem várias consequências prejudiciais para a célula; como o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio, levando ao estresse oxidativo; decréscimo da produção de adenosina trifosfato (ATP); aumento intracelular da concentração de cálcio; dentre outros.

Vários dados suportam a relação próxima entre a α -sin e os danos oxidativos celulares e, de fato, compostos antioxidantes demonstraram ter capacidade de diminuir a oxidação intracelular aliada à agregação desta proteína fibrinogênica. Além disso, a geração de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio parece aumentar os efeitos tóxicos causados pelas mutações da α -sin, destacando a influência do estresse oxidativo no início e na propagação da DP.

Os polifenóis têm comprovada ação antioxidante em modelos *in vitro* e *in vivo*, e em alguns trabalhos revelaram também ação neuroprotetora. Os mecanismos envolvidos incluem a complexação com metais redox ativos, sequestro de radicais livres, ação anti-inflamatória e ativação de sinalizações relacionadas à preservação das funções celulares, evitando a morte celular e outros mecanismos de toxicidade. A maioria dos polifenóis consumidos pode ser transformada pela microbiota intestinal, aumentando seus níveis de absorção e interferindo na atividade biológica destes compostos no organismo. Além disso, já foi verificado que polifenóis são capazes de modular espécies de micro-organismos presentes na microbiota intestinal; favorecendo probióticos benéficos ao organismo, como os *Lactobacillus* e as *Bifidobacterium*, em detrimento dos patogênicos e comensais.

Numerosos estudos apontam que o quadro de disbiose tem relação com a doença de Parkinson, e que os sintomas não motores (gastrointestinais e olfativos) precedem os sintomas motores em mais de 10 anos; portanto, recentes pesquisas têm buscado entender a relação da microbiota no início da doença. A hipótese mais recente para a etiologia da doença sugere uma agregação iniciada por príon, proteína defeituosa que funcionaria como uma “semente” para desestruturar outras, tendo início no intestino e propagando-se para o cérebro.

Neste contexto, mostra-se importante a investigação da relação entre probióticos e polifenóis na citotoxicidade e agregação da α -sin como forma de auxiliar a compreensão da etiologia da doença de Parkinson, realizada neste trabalho em modelo de levedura.

2. REVISÃO DA LITERATURA

O primeiro registro da doença de Parkinson foi feito em 1817 pelo médico James Parkinson. Ele relatou uma doença que chamou de “Paralisia agitada”, onde o paciente apresentava progressiva perda de coordenação motora e tremores. Baseado em sintomas de pacientes e poucas autopsias disponíveis, Parkinson criou a hipótese de que a doença estava associada ao sistema nervoso central, desde a medula espinhal até a medula oblongata. Além disso, Parkinson sugeriu que a doença poderia estar associada a causas remotas, como infecções ou injúrias nos sistemas periféricos, podendo afetar regiões do sistema nervoso central e causar a síndrome. Nos relatos, conta que os pacientes apresentavam também severas desordens intestinais, como constipação; e indicadores de inflamação no intestino, como cor escurecida e comprimento encurtado (SAMPSON, 2019).

Curiosamente, Parkinson termina seu relato em 1817 descrevendo que um paciente em estágio inicial dos sintomas motores da doença juntamente com severas constipações, quando tratado com sais de Calomelano [Cloreto de mercúrio (I) - Hg_2Cl_2] e Epsom (Sulfato de Magnésio - $MgSO_4 \cdot 7H_2O$) por 10 dias deixou de apresentar os sintomas motores. Este relato do livro “Shaking palsy” é a primeira sugestão de que a doença de Parkinson poderia ter relação com o intestino (PARKINSON, 2002).

2.1 A doença de Parkinson

A doença de Parkinson (DP) é uma desordem neurodegenerativa progressiva associada principalmente ao envelhecimento e que, até a atualidade, não tem tratamento que leve a cura. Essa doença atinge cerca de 2-3 % da população mundial acima de 65 anos de idade e 4-5 % acima de 85 anos (MILLER-FLEMING; GIORGINI; OUTEIRO, 2008), sendo a segunda doença neurodegenerativa mais incidente, atrás apenas da doença de Alzheimer (MELO; COPRAY; FERRARI, 2018). Entre os vários sintomas da DP destacam-se os sintomas motores; como o tremor em repouso, a rigidez muscular, a bradicinesia (movimentos mais lentos e limitados), a instabilidade postural e a acinesia (dificuldade na iniciação dos movimentos). Embora seja conhecida pelos sintomas motores, uma sequência de sintomas não motores também são característicos da doença, como depressão, ansiedade, sonolência diurna excessiva, anosmia (perda de capacidade olfativa), movimento rápido dos olhos, distúrbios do sono, constipação, dificuldade em engolir e dispepsia (desconforto digestivo); que se apresentam até 20 anos antes dos sintomas motores (PARIHAR et al., 2018; POEWE et al., 2017).

A DP caracteriza-se essencialmente pela degeneração dos neurônios dopaminérgicos na região da substância *nigra pars compacta* do mesencéfalo, a qual resulta numa diminuição do conteúdo de dopamina estriatal e conseqüentemente perda de função motora (FELICE et al., 2016).

Várias outras doenças neurodegenerativas - conhecidas coletivamente como distúrbios parkinsonianos - compartilham a apresentação clínica da DP (isto é, parkinsonismo). No entanto, essas doenças apresentam diferenças histopatológicas e padrões de degeneração neuronal características. A DP se distingue de outras formas de parkinsonismo pela presença de corpos de Lewy (CL) e corpos de neurite

(CN), que são agregados citoplasmáticos insolúveis. De composição complexa, os corpos de Lewy são ricos em uma proteína amiloide chamada alfa-sinucleína (α -sin). Estes agregados levam a uma variedade de disfunções celulares e sinápticas, que, em última instância, colapsam as funções celulares, levando à apoptose. Há ainda alguns distúrbios que apresentam agregados de α -sin e alguns sintomas parkinsonianos, como a demência com corpos de Lewy e a atrofia de múltiplos sistemas, entretanto distinguem-se clinicamente e patologicamente da DP por apresentarem quadro de demência que progride rapidamente. Estas doenças, juntamente com a DP, são chamadas de sinucleinopatias (AULUCK; CARAVEO; LINDQUIST, 2010).

Algumas alterações genéticas afetam a predisposição da α -sin de se agregar ou a capacidade desta proteína em manter a homeostase celular e, portanto, foram associadas ao desenvolvimento da DP, como é o caso da substituição Alanina-53-Treonina (A53T) no gene da α -sin, em uma família com DP familiar autossômica dominante. Além disso, a implicação da α -sin na DP foi corroborada pela descoberta de outras mutações do gene SNCA, que codifica a α -sin, envolvendo Alanina-30-Prolina (A30P), Glutamato-46-Lisina (E46K) em outras famílias com DP herdadas (PARIHAR et al., 2018). No entanto, a maioria das incidências de DP são idiopáticas, onde menos de 10% dos pacientes tem histórico familiar. Na ausência de riscos genéticos altamente penetrantes, isto é, muito recorrentes, provavelmente fatores ambientais predispõem a doença (SAMPSON, 2019).

Muitos estudos epidemiológicos têm buscado identificar fatores não genéticos que contribuem para o desenvolvimento da DP. Foi encontrada correlação positiva com o uso de pesticidas e atividade rural, enquanto foi verificada correlação negativa com o uso de nicotina e consumo de cafeína. De fato, alguns pesticidas são usados inclusive como indutor de fenômenos neurodegenerativos semelhantes à DP em modelos animais. É o caso da rotenona, um composto orgânico derivado das raízes de várias plantas, utilizado em pesquisas com peixes, insetos e ratos; o herbicida paraquat, usado pelos agricultores para eliminar as ervas daninhas entre as culturas, é administrado em camundongos, ratos ou primatas para investigações de neurodegeneração (ASCHERIO; SCHWARZSCHILD, 2016). Há ainda a substância 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetra-hidropiridina (MPTP), que leva ao desenvolvimento de parkinsonismo instantâneo. Estruturalmente, o MPTP é bastante semelhante ao paraquat e acredita-se ter um mecanismo de ação similar. Esses produtos químicos exercem toxicidade ligando-se ao complexo mitocondrial I e interferindo na fosforilação oxidativa (JANDA et al., 2012), mostrando que fatores ambientais podem influenciar fortemente no desenvolvimento da DP e também apontam caminhos sobre as causas para o desenvolvimento da doença.

2.1.1 A proteína α -sinucleína

Apesar do consenso de que o acúmulo de α -sin é patogênico na DP, seu papel fisiológico é amplamente debatido. Há evidências crescentes de que a proteína α -sin é necessária para o funcionamento adequado do complexo de Golgi e do tráfego de vesículas sinápticas. Existem evidências de que esteja envolvida na formação de complexos SNARE (do inglês, soluble NSF attachment receptor) que regulariam a fusão das vesículas às sinapses durante a exocitose do neurotransmissor dopamina na fenda sináptica (INGELSSON, 2016).

Trata-se de uma proteína de 140 aminoácidos, (14 kDa, pKa de 4,7) expressa pelo gene SNCA no cromossomo humano 4, sintetizada em neurônios em condições fisiológicas (INGELSSON, 2016). Por sua estrutura, a proteína α -sin consiste de três domínios; um terminal amino (N-terminal - resíduos 1 a 60), uma região hidrofóbica central (61 a 95), o chamado NAC (componente não amiloide A β), e um terminal carboxila (C-terminal – resíduo 96 a 140) (Figura 1), que é propenso a não ser estruturado. O domínio N-terminal é particularmente significativo para a disfunção patológica da α -sin, pois mutações pontuais raras como A53T, A30P, E46K, H50Q e G51D estão presentes nessa região. No entanto, o domínio NAC (Figura 2) é o responsável pelos atributos de agregação da α -sin via inibição de sua degradação e promoção de sua fibrilação (PARIHAR et al., 2018).

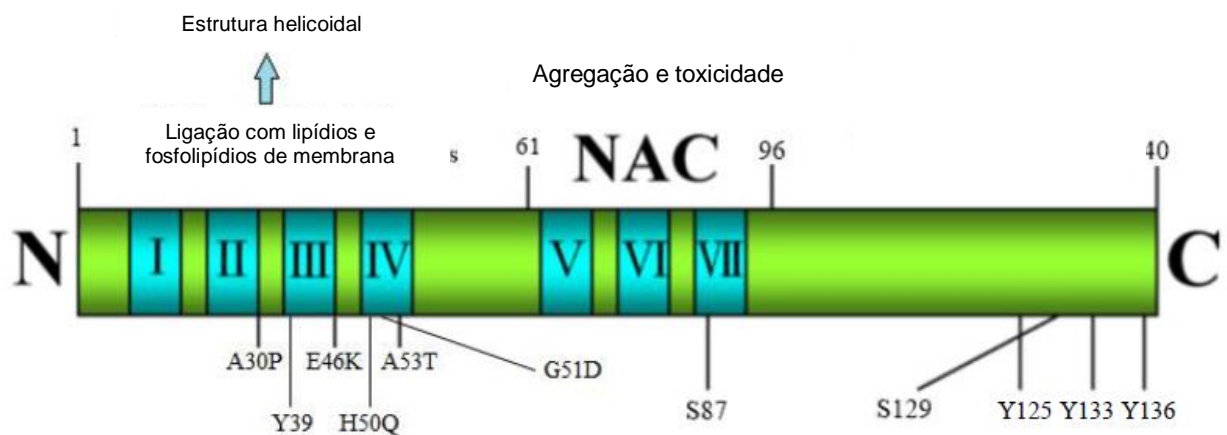


Figura 1. Estrutura molecular e característica funcional de α -sin. A proteína alfa-sinucleína é dividida em domínios N-terminal (1-60 aa), NAC (61-95 aa) e C-terminal (96-140 aa). O domínio N-terminal contém quatro motivos (cor azul) e tem cinco locais de mutação pontuais ligados a DP (A30P, E46K, H50Q, G51D e A53T), além de um resíduo de tirosina (Y39) que é um alvo de fosforilação. O domínio NAC, que engloba a maioria dos resíduos hidrofóbicos, promove a agregação, com um sítio de fosforilação (S87). O domínio C-terminal exibe atividade chaperona que tende a diminuir a agregação de proteínas, tem um local de fosforilação (S129) e três resíduos de tirosina (Y125, Y133, Y136) (TENREIRO; ECKERMANN; OUTEIRO, 2014, adaptado).

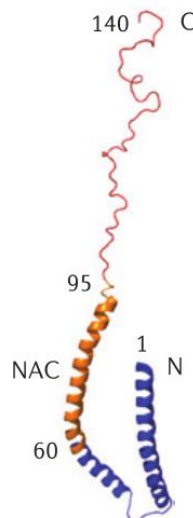


Figura 2. Estrutura tridimensional da α -sin (PARIHAR et al., 2018).

Pesquisas sugerem que a α -sin exista como uma proteína intrinsecamente desordenada ou como um monômero não estruturado no citosol, e adota conformação helicoidal quando associado a membranas celulares (ROCHA; DE MIRANDA; SANDERS, 2018). Além disso, uma hipótese mais recente sugere que a α -sin exista em equilíbrio nos neurônios saudáveis como monômeros não estruturados e oligômeros tetraméricos α -helicoidais, ambos solúveis (WONG; KRAINIC, 2017). Modificações estruturais miscence levariam a formação de conformações insolúveis altamente ordenadas caracterizadas por folhas β , organizada em fibrilas (INGELSSON, 2016) (Figura 3).

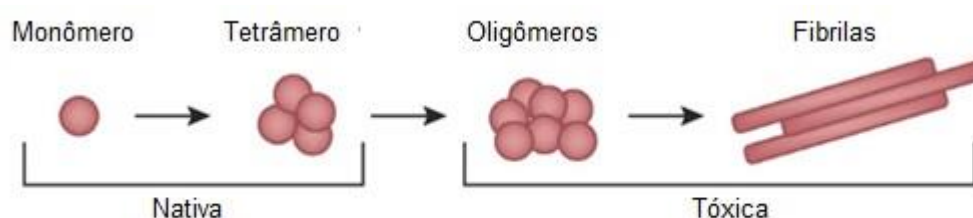


Figura 3: Polímeros de α -sin e suas prováveis estruturas que causariam toxicidades (WONG; KRAINIC, 2017).

Sob condições patogênicas, o acúmulo progressivo de α -sin e a formação de oligômeros têm sido propostos como cruciais na patogênese da DP. Embora os mecanismos não tenham sido completamente esclarecidos, observam-se danos à bicamada lipídica, alterações nos mecanismos de depuração celular e disfunção mitocondrial, acompanhados de um estresse oxidativo provocado pela agregação da proteína.

2.1.2 Mecanismos de toxicidade da α -sinucleína

A disfunção mitocondrial é considerada um ponto central para a patogênese de DP esporádica e familiar. Observações em modelos experimentais de DP humana fornecem fortes evidências de rupturas na dinâmica mitocondrial, defeitos na bioenergética, inibição do complexo I da cadeia de transporte de elétrons (CTE) e aumento de espécies reativas de oxigênio (EROs) (ROCHA; DE MIRANDA; SANDERS, 2018). Dados da literatura mostram que a α -sin pode interagir com as mitocôndrias, visto que são organelas membranosas (GALLEGOS et al., 2015); e mais recentemente foi possível demonstrar que os oligômeros da α -sin podem impedir a importação de proteínas para as mitocôndrias de uma cultura de células; interagindo com a translocase da membrana externa e, assim, interferir na sua atividade (DI MAIO et al., 2016). Isso levanta a possibilidade de que exista uma relação importante entre a proteína α -sin e mitocôndrias em condições fisiológicas normais e/ou patológicas (ROCHA; DE MIRANDA; SANDERS, 2018).

A falha nas vias de degradação de proteínas, como o sistema ubiquitina-proteassoma ou a via lisossomal autofágica, em várias investigações tem sido implicada como consequência da formação de oligômeros de α -sin (INGELSSON, 2016). Um dos estudos que avaliou a toxicidade de α -sin descobriu que a indução da expressão da proteína α -sin com a mutação na região A53T em células PC12, modelo de células nervosas, aumentava a morte celular de maneira dependente do tempo. A

expressão de α -sin defeituosa inibiu a atividade quimiotróptica, tríplica e proteossômica pós-ácida. Além disso, a expressão de α -sin aumentou significativamente o nível intracelular de EROs. Esses resultados indicam que a expressão de α -sin nesse tipo celular causou alterações bioquímicas precoces, levando à inibição do proteossoma e ao estresse oxidativo (GALLEGOS et al., 2015). O estresse oxidativo é uma convergência de diversas vias de toxicidade induzidas por α -sin. Além dos radicais gerados na disfunção mitocondrial somado ao impedimento das vias de degradação, o acúmulo de oligômeros no retículo endoplasmático também pode levar à formação de estresse oxidativo, contribuindo para a neurodegeneração.

As mitocôndrias são as principais armazenadoras celulares de cálcio e reguladoras de sua homeostase. A expressão de α -sin com mutação A53T está associada a maiores concentrações de Ca^{2+} mitocondrial e o excesso deste pode favorecer a ativação da cascata apoptótica. Assim, a α -sin induz apoptose por vias dependentes de mitocôndrias, incluindo a ativação de caspases 3 e 9. De fato, é sabido que alterações nos níveis celulares de cálcio contribuem para a apoptose dos neurônios dopaminérgicos em DP (GALLEGOS et al., 2015).

Um mecanismo adicional para o desenvolvimento de agregados de α -sin foi recentemente proposto. A hipótese do tipo príon para a α -sin postula que, uma vez que os agregados de α -sin formam-se em um neurônio, os mesmos podem ser transportados intra-axionalmente para outras regiões do cérebro, liberados no espaço extracelular e captados pelos neurônios vizinhos. A agregação na célula seguinte iniciar-se-ia das “sementes” de α -sin captadas (KHANAM et al., 2016; MULAK; BONAZ, 2015; POEWE et al., 2017).

Estudos em cultura de células de neuroblastoma demonstraram que o comprometimento do lisossoma leva ao aumento da secreção de α -sin no espaço extracelular através de exossomos, e que a endocitose é um mecanismo chave de captação de α -sin extracelular. Assim, a agregação inicial da α -sin em um pequeno número de células pode levar progressivamente à disseminação de agregados de α -sin para várias regiões do cérebro ao longo de anos ou décadas após o insulto inicial. Isso é consistente com a ideia de que a patologia da α -sin envolve gradualmente mais regiões do cérebro à medida que a doença progride. Além disso, este modelo é coerente com a hipótese de que os primeiros locais de agregação de α -sin podem estar nos nervos entéricos do intestino e no bulbo olfativo, onde estão subjacentes aos sinais e sintomas não-motores associados à doença de Parkinson (por exemplo, anosmia e constipação); quando então eles se espalhariam, eventualmente levando à disfunção motora quando atingissem a região da substância *nigra* (POEWE et al., 2017).

2.2 Tratamentos atuais disponíveis para a doença de Parkinson

Atualmente não existe nenhuma cura ou forma de atenuar a progressão da DP, sendo a terapia farmacológica atual apenas paliativa. A principal estratégia terapêutica consiste na administração de levodopa (L-DOPA), precursor da dopamina que tem a capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica (BHE). Este geralmente é associado a um inibidor da dopa-descarboxilase periférica, como a carbidopa. Esta associação impede a descarboxilação da levodopa em tecidos periféricos, a qual implicaria na administração de doses muito elevadas para se observar uma redução da sintomatologia (DONG et al., 2016). Agonistas

dopaminérgicos isolados ou em associação com a levodopa também podem ser utilizados contra a doença (POEWE et al., 2017).

Uma outra linha terapêutica baseia-se na utilização de anticolinérgicos centrais, antagonistas dos receptores muscarínicos da acetilcolina. Os anticolinérgicos bloqueiam a atividade parassimpática, antagonizando a ação da acetilcolina, que se encontra aumentada na DP devido à diminuição da dopamina. Os anticolinérgicos são eficazes sobre o tremor e a rigidez muscular observada nos doentes (DONG et al., 2016). Há ainda a utilização de inibidores da monoamino oxidase (MAO)-B ou inibidores da catecol-orto-metil-transferase (COMT) em associação com a levodopa. Ambos permitem a inibição da degradação da dopamina, que já se encontra reduzida na DP (GALLEGOS et al., 2015).

Quando não há melhora com os tratamentos medicamentosos, uma estratégia é a cirurgia para a implantação de eletrodo de estimulação cerebral profunda, que é usado para tratar os sintomas da DP, como tremor, rigidez, movimentos lentos e problemas de locomoção. O eletrodo implantado fornece impulsos elétricos para áreas específicas do cérebro que controlam os movimentos. Esses impulsos bloqueiam sinais elétricos anormais que causam sintomas motores da DP (DONG et al., 2016).

2.3 Relação entre o sistema nervoso entérico e a doença de Parkinson

O atual entendimento sobre a fisiopatologia da doença de Parkinson sugere um papel central do acúmulo de α -sin na patogenia da DP, e diversas evidências vêm direcionando ao entendimento de que o local inicial deste processo seria o sistema nervoso entérico (SNE). Estudos epidemiológicos mostraram que a constipação no trato gastrointestinal é um sintoma não motor muito precoce da DP; onde o início da constipação geralmente precede os sintomas motores e a progressão da doença piora o quadro intestinal (GERSHANIK, 2018). Utilizando-se de um exame de imunocoloração, observa-se que α -sin é expressa no sistema nervoso entérico tanto em amostras cirúrgicas em indivíduos afetados pela DP como em amostras de indivíduos sem o diagnóstico da doença (BARBUT; STOLZENBERG; ZASLOFF, 2019).

Após estudos patológicos avaliando a progressão clínica da DP, com sintomas não-motores precedendo os motores, Braak et al. (2003) levantaram a hipótese de que o acúmulo aberrante de α -sin começaria no intestino e progrediria através do nervo vago para o cérebro, de maneira semelhante a um príon após a ingestão de um patógeno neurotrópico, levando à DP (LIDDLE, 2018). Já foi demonstrado que a α -sinucleína é transportada nas direções anterógrada e retrógrada no nervo vago. Um estudo em ratos, onde foi feita injeção na parede intestinal de um lisado cerebral de um paciente humano contendo diferentes formas de α -sin [monomérico, oligomérico e fibrilar], demonstrou que a α -sin foi transportada pelo nervo vago até o núcleo motor dorsal do vago no tronco cerebral de maneira dependente do tempo (HOLMQVIST et al., 2014). Esse estudo gera evidências da possibilidade de um mecanismo semelhante ocorrer em doenças humanas.

De fato, em dois estudos epidemiológicos com duração de até 30 anos realizados na Suécia e na Dinamarca, observou-se que pacientes que tiveram uma vagotomia truncal (na qual o nervo vago abdominal foi cortado), mas não uma vagotomia altamente seletiva (na qual apenas a parte superior do nervo vago gástrico foi cortada, seletiva para úlcera péptica), tiveram um risco menor de desenvolver DP

do que a população que não foi submetida a este procedimento (LIU et al., 2017; SVENSSON et al., 2015). Esses estudos indicam não apenas que a vagotomia reduz o risco de DP, mas sugerem que o nervo vago está envolvido na transmissão da DP e apóiam a hipótese de Braak de que a DP surge no intestino (LIDDLE, 2018).

A exposição ambiental a herbicidas e pesticidas tem sido associada a um risco aumentado de DP devido aos altos níveis de α -sin no cérebro. Experimentalmente, em camundongos, a administração intragástrica do pesticida rotenona, que inibe a atividade do complexo mitocondrial I, induziu alterações neuropatológicas do tipo parkinsoniana que foram vistas pela primeira vez no sistema nervoso entérico e somente posteriormente no *nigra pars compacta* (PAN-MONTOJO et al., 2010). Em outro trabalho, usando rotenona aplicada localmente na parede entérica para desencadear a patologia e a progressão de aglomerados de α -sin em camundongos; a seção cirúrgica dos nervos autonômicos foi capaz de interromper esta progressão (GERSHANIK, 2018).

Apesar das evidências associando o sistema nervoso entérico na patogênese da DP (BARBUT; STOLZENBERG; ZASLOFF, 2019; RATAJCZAK; MURPHY; MARTINSON, 2019), não se sabe como os agentes administrados por via oral induzem alterações nos nervos entéricos, uma vez que os nervos entéricos se estendem à submucosa do intestino, mas não penetram no lúmen intestinal. Assim, os nervos não são diretamente expostos aos conteúdos dentro do lúmen intestinal. Embora a DP possa surgir no intestino, não se sabe ainda como as toxinas ambientais ingeridas induziriam a α -sin anormal nos neurônios entéricos.

Uma das hipóteses se baseia no fato das células enteroendócrinas (CEEs) serem quimiossensíveis, ou seja, eletricamente excitáveis por substâncias ingeridas ou bactérias presentes no trato gastrointestinal, onde tais estímulos liberam hormônios da superfície basal. Em virtude de sua localização na interface do lúmen intestinal e dos nervos entéricos, as CEEs podem estar sujeitas à exposição a patógenos ou toxinas que podem afetar a conformação da α -sin naturalmente presente no SNE. Se a α -sin se desdobrar nas CEEs, sua transmissão via nervo vago pode ser o primeiro passo em uma cascata tipo príon que leva à DP (LIDDLE, 2018).

Essa população dinâmica de micro-organismos, denominada microbiota, reside principalmente no trato gastrointestinal. Recentemente, foi demonstrado que a composição do microbioma intestinal difere entre indivíduos saudáveis e pacientes com DP. Um estudo clínico mostrou que a presença de *Prevotellaceae* nas fezes de pacientes com DP pode ser reduzida em 77,6% em comparação aos controles, embora os níveis muito baixos e baixos de *Prevotellaceae* não sejam específicos para a DP. Trabalhos já demonstraram que o sulfeto de hidrogênio secretado pelo gênero *prevotella* exerce um efeito protetor nos neurônios dopaminérgicos nos modelos de DP de ratos e camundongos (CAKMAK, 2015; HU et al., 2010; KIDA et al., 2011). Além disso, foi encontrada uma correlação positiva entre a microbiota intestinal e o fenótipo clínico entre a abundância de *Enterobacteriaceae* e a gravidade da instabilidade postural e da dificuldade da marcha, sugerindo que uma ou mais alterações em bactérias específicas podem estar relacionadas aos sintomas ou à patologia da DP (SCHEPERJANS et al., 2015).

No entanto, não se sabe se as alterações na microbiota intestinal encontradas nos pacientes com DP desempenham um papel causador na patogênese da doença ou são simplesmente uma consequência da doença (LIDDLE, 2018). Estudos sugerem que os processos patológicos iniciados pelo intestino na DP não requerem

necessariamente um patógeno e/ou uma toxina ambiental, pois podem ser desencadeados apenas pela microbiota intestinal (PEREZ-PARDO et al., 2017).

A avaliação de biópsias do tecido intestinal de crianças com média de idade de 12 anos, de forma a excluir o grupo de adultos que poderiam ter um caso pré-clínico de DP, verificou que a presença de α -sin nas células intestinais correlacionou-se positivamente com o grau de inflamação aguda e crônica na parede intestinal. A expressão da proteína α -sin, nestes tecidos estudados, apresentou atividade quimioatrativa de neutrófilos e monócitos. Esses achados sugerem fortemente que a α -sin é expressa dentro do humano para direcionar a inflamação intestinal, implicando em infecções gastrointestinais comuns na patogênese da DP (STOLZENBERG et al., 2017).

Essa possibilidade foi examinada em um modelo de DP em camundongos, no qual a microbiota de pacientes com DP transplantada em camundongos induziu uma disfunção motora do tipo parkinsoniana. Usando camundongos livres de micro-organismos, foi demonstrado que a colonização bacteriana intestinal era necessária para induzir a patologia da α -sinucleína, a neuroinflamação e os déficits motores. Essas alterações pareciam ser mediadas por metabólitos microbianos, incluindo ácidos graxos de cadeia curta (SAMPSON; MAZMANIAN, 2015). Este estudo fornece fortes evidências de que as bactérias intestinais regulam a sinucleinopatia e a disfunção motora da DP. Assim, alguns micro-organismos intestinais podem desempenhar um papel patogênico na DP enquanto outros tem ação probiótica; no entanto, como os micro-organismos intestinais e os ácidos graxos de cadeia curta afetam a progressão da DP não é completamente compreendido (LIDDLE, 2018).

Os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) são os principais produtos finais microbianos da fermentação bacteriana no intestino grosso, sendo derivados principalmente da decomposição de polissacarídeos complexos por bactérias anaeróbias (RATAJCZAK et al., 2019). Os AGCCs também são formados a partir da fermentação de oligossacarídeos, proteínas, peptídeos e glicoproteínas (por exemplo, mucinas). Os principais AGCCs derivados de carboidratos e aminoácidos são acetato, propionato e butirato, enquanto que valerato, formato e caproato são formados em uma extensão muito menor (ANHÉ et al., 2015).

2.4 Probióticos

É amplamente aceito que a microbiota altamente diversificada e estável promove a saúde humana em geral. A colonização do intestino com microbiota comensal e patogênica, em detrimento das probióticas, é um estado também conhecido como disbiose, e está associada a uma variedade de doenças, que variam do diabetes mellitus tipo 2 às doenças intestinal, cardiovascular e inflamatória. Mais recentemente a disbiose microbiana tem sido associada a várias patologias cerebrais, incluindo distúrbios do espectro autista, doenças de Alzheimer e Parkinson e esclerose lateral amiotrófica; sugerindo uma comunicação direta ou indireta entre bactérias intestinais e o sistema nervoso central (SNC) (SUN; SHEN, 2018).

A homeostase da microbiota intestinal pode ser modificada alterando a ingestão alimentar de probióticos e prebióticos. Segundo a Organização Mundial da Saúde e a Associação Científica Internacional de Probióticos e Prebióticos (ISAPP), probióticos são “microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefício à saúde do hospedeiro” (HILL et al., 2014), enquanto

os prebióticos são definidos como componentes não viáveis do alimento que conferem benefício a saúde pela modulação da microbiota do hospedeiro. Os pós-bióticos são subprodutos do processo de fermentação realizado pelos probióticos no intestino (DAVANI-DAVARI et al., 2019; TOMASIK; TOMASIK, 2020). Em outras palavras, à medida que os probióticos se alimentam de prebióticos, os pós-bióticos são produzidos; que são, basicamente, “catabólitos ou resíduos” de probióticos (TOMASIK; TOMASIK, 2020). O uso de probióticos, prebióticos e pós-bióticos pode ser visto como uma nova estratégia para alterar a composição da microbiota intestinal, modulando o eixo intestino-cérebro (FILOSA; DI MEO; CRISPI, 2018).

Numerosos estudos pré-clínicos e em animais demonstraram os benefícios dos probióticos na prevenção e no tratamento de várias doenças, incluindo doenças do trato gastrointestinal e do sistema nervoso central; sendo os gêneros bacterianos *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* os mais usados em estudos com animais e humanos (SUN; SHEN, 2018). Estes ensaios levaram à melhoria na integridade da barreira na mucosa intestinal, na resposta à imunoglobulina-A da mucosa e na imunomodulação benéfica ao hospedeiro, quando ingeridos em quantidades adequadas. Recentemente, a partir da avaliação da taxonomia de *Lactobacillaceae* e *Leuconostocaceae* foi proposta a reclassificação em 25 gêneros, sendo 23 novos gêneros. As espécies do grupo *Lactobacillus casei* foram reclassificadas no novo gênero *Lacticaseibacillus*, enquanto aquelas pertencentes ao grupo *Lactobacillus reuteri* / e *Lactobacillus fermentum* foram alocadas no gênero *Limosilactobacillus*, também novo. Já aqueles pertencentes ao grupo *Lactobacillus delbrueckii* continuarão a ser denominados como *Lactobacillus* (ZHENG et al., 2020).

Além disso, a microbiota é capaz de produzir neurotransmissores, como é o caso de *Bifidobacterium infantis* que influencia a transmissão central de serotonina, aumentando os níveis plasmáticos de triptofano (O'MAHONY et al., 2015). Diferentes espécies de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* são capazes de produzir ácido γ -aminobutírico (GABA) (YUNES et al., 2016), enquanto *Streptococcus*, *Escherichia* e *Enterococcus* spp. produzem serotonina. Todos esses neurotransmissores que atravessam a mucosa do intestino atingem o cérebro, onde podem mediar diferentes eventos fisiológicos (FILOSA; DI MEO; CRISPI, 2018). Ao atuar no sistema nervoso, endócrino e imunológico, a microbiota intestinal pode influenciar as funções cerebrais.

A administração periférica de *Lactobacillus* spp. também demonstrou ter um efeito anti-inflamatório e antioxidante no cérebro de ratos com isquemia cerebral. Os animais que foram tratados por via intravenosa com *Lactobacillus* inativado apresentaram uma diminuição na apoptose das células cerebrais, bem como um aumento na atividade da enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD) (WANCHAHO et al., 2018). A avaliação de cepas de *Lactobacillus* apontou que o sobrenadante das bactérias, bem como seu lisado, possuíam atividade antioxidante em estudo *in vitro* (WANG et al., 2014).

2.5 As substâncias fenólicas e a microbiota

Cada indivíduo tem sua própria microbiota intestinal específica e uma variedade de fatores exógenos pode afetar a composição desta microbiota no hospedeiro; incluindo dieta, infecções, estilo de vida, uso de antibióticos e preferências de higiene (SOMMER; BÄCKHED, 2013). Estudos emergentes têm proposto que a modulação da microbiota pode ser realizada usando moléculas bioativas naturais,

como as substâncias fenólicas. Estas substâncias poderiam agir de forma semelhante aos prebióticos, favorecendo grupos de micro-organismos benéficos em detrimento a outros. Estes podem ser usados para influenciar indiretamente e até restaurar funções cerebrais alteradas que caracterizam doenças neurodegenerativas (FILOSA; DI MEO; CRISPI, 2018). Diversos fenólicos, como os compostos com núcleo flavan-3-ol, possuem ação antimicrobiana, entretanto grupos de lactobacillus são mais tolerantes a variações na concentração de flavan-3-ol do que outros gêneros microbianos (SÁNCHEZ-PATÁN et al., 2012).

De fato, fortes evidências epidemiológicas sugerem que fumantes e pessoas com consumo regular de café ao longo da vida têm um risco menor de DP (ASCHERIO; SCHWARZSCHILD, 2016; KARDANI; ROY, 2015; KARDANI; SETHI; ROY, 2017), possivelmente através do deslocamento da composição da microbiota intestinal em direção a uma função de barreira aprimorada na mucosa intestinal e à diminuição da liberação de citocinas pró-inflamatórias do intestino para a corrente sanguínea; causando redução na neuroinflamação, um evento central na patogênese da DP.

O grupo dos polifenóis (Figura 4A) inclui um grande número de substâncias oriundas do metabolismo secundário de plantas, conferindo a elas cor, sabor e adstringência. Estes compostos apresentam a característica comum de possuir pelo menos um anel fenólico em sua estrutura (SHAHIDI; AMBIGAIPALAN, 2015); e são reconhecidos por suas propriedades antioxidantes *in vitro*, podendo neutralizar uma ampla gama de espécies reativas de oxigênio (O_2 , OH^\bullet , radicais peroxílicos (RO_2^\bullet)), nitrogênio (ácido peroxinitroso ($ONOOH$)) e cloro (ácido hipocloroso ($HOCl$)), doando um elétron ou um próton. Os fenólicos interrompem o estágio de propagação das reações em cadeia da autoxidação lipídica, estabilizando radicais ou atuando como quelantes de metais para que não catalisem a formação de radicais (reações de Fenton e Harber Weiss); por exemplo, inibindo diretamente a redução de Fe^{3+} (Figura 4B), reduzindo a produção de OH^\bullet via reação de Fenton. Tanto os ácidos fenólicos quanto os flavonoides possuem uma atividade eficaz de eliminação de radicais, no entanto, o potencial quelante do metal e o poder redutor podem variar dependendo de suas características estruturais (ZHANG; TSAO, 2016).

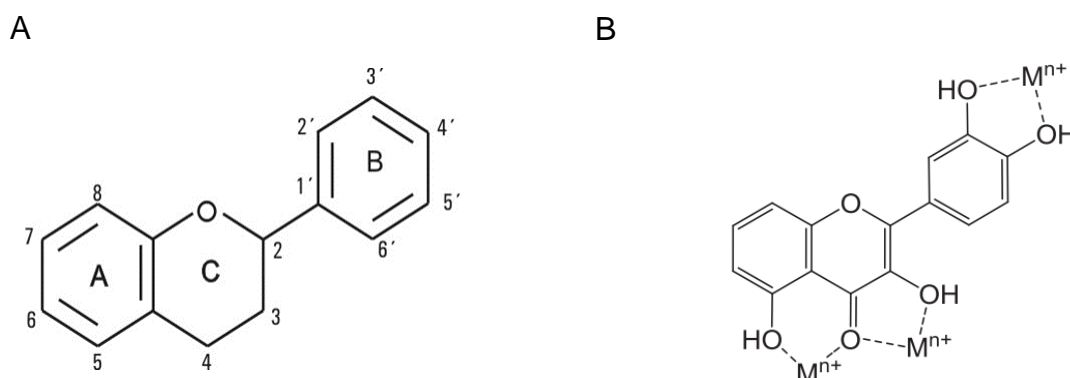


Figura 4. (A) Estrutura básica de polifenóis, onde a diferenciação ocorre pela quantidade e posição de hidroxilas. (B) Possíveis pontos de coordenação de flavonoides com metais (PROCHÁZKOVÁ; BOUŠOVÁ; WILHELMOVÁ, 2011).

Os polifenóis podem exercer uma ação antioxidante intracelular através de vários outros mecanismos, que não incluem a ação direta sobre as EROs. Além da eliminação de EROs, os polifenóis podem exercer uma ação antioxidante intracelular por meio de uma série de outros mecanismos, que geralmente requerem menor quantidade do que concentrações *in vitro* e não envolvem o consumo oxidativo estequiométrico das moléculas de polifenol. Tais mecanismos compreendem principalmente a modulação favorável da expressão e/ou atividade de enzimas removedoras de EROs (como as enzimas catalase, glutathione peroxidase e superóxido dismutase), produtoras de EROs e/ou sintetizadoras de antioxidantes endógenos. Embora esses mecanismos antioxidantes possam ocorrer em diferentes níveis, afetando vários compartimentos subcelulares, o alcance de sua modulação por polifenóis no nível mitocondrial foi recentemente reconhecido como particularmente importante visto que as mitocôndrias representam não apenas o principal local de geração de superóxido dentro das células, mas também um alvo principal para a ação oxidativa das EROs (SANDOVAL-ACUÑA; FERREIRA; SPEISKY, 2014).

A maioria dos polifenóis nativos nos alimentos está na forma de glicosídeos (flavonóis, flavonas, flavanonas, isoflavonas e antocianinas), juntamente com os oligômeros menos frequentes (proantocianinas), formas que não podem ser absorvidos na mucosa intestinal. Apenas agliconas e alguns glicosídeos intactos podem ser absorvidos; portanto, a liberação de polifenóis nativos de sua matriz, impulsionada por enzimas humanas e microbianas, é um mecanismo necessário para que eles passem pela barreira intestinal e seu impacto fisiológico torna-se dependente destes mecanismos (VALDÉS et al., 2015). Por exemplo, muitos flavonóis, como kaempferol, quercetina e miricetina, são metabolizados por *Clostridium* spp.; enquanto antocianinas, como cianidina, peonidina e malvidina, são metabolizadas por *Lactobacillus* spp., ambos gerando compostos que podem atravessar a mucosa intestinal. Estes compostos podem então ser modificados e transportados para outros tecidos e órgãos para exibir seus vários efeitos benéficos, como é o caso dos metabólitos da antocianina delfinidina 3-O-glicosídeo e da cianidina 3-O-glicosídeo, que demonstraram ser protetores contra lesões cardíacas isquêmicas (SPIELMAN; GIBSON; KLEGERIS, 2018).

Diversos estudos verificaram a capacidade do gênero lactobacilos de metabolizar substâncias fenólicas. Curiel et al. (2010) detectaram a capacidade de *L. brevis* de metabolizar fenólicos de extratos vegetais, obtendo derivados benzoicos; Sz wajgier & Jakubczyk (2010) verificaram a capacidade de lactobacilos e bifidobactérias de biotransformarem ésteres de ácido ferúlico por meio da produção de esterases específicas; e Sánchez-Patán et al. (2012) constataram a capacidade de *L. plantarum* de clivar a ligação heterocíclica de anel de flavan-3-ols monoméricos.

2.6 Alternativas terapêuticas dietéticas

É de conhecimento que o início da patogênese da DP precede em vários anos os sintomas motores, além disso, que a patogênese tem correlação com um desequilíbrio microbiano (FELICE et al., 2016; GERSHANIK, 2018; LIDDLE, 2018; SAMPSON, 2019). Os tratamentos atuais não focam estas evidências e isto pode explicar por que as abordagens terapêuticas usadas até então têm pouco ou nenhum efeito sobre a progressão da doença.

Como a microbiota intestinal pode interagir com o sistema nervoso central através de diferentes mecanismos e vias, a homeostase da microbiota pode impactar em desordens neurodegenerativas complexas (FILOSA; DI MEO; CRISPI, 2018). Levando em consideração a relação mutualística de substâncias fenólicas e bactérias, onde estas regulam sua biodisponibilidade e esses regulam a diversidade da população microbiana, o desenvolvimento de estratégias para regular e manter a MI saudável pode ser uma abordagem válida para diminuir o risco individual e a progressão das doenças neurodegenerativas (SPIELMAN; GIBSON; KLEGERIS, 2018). Além disso, a investigação de metabólitos microbianos que possam influenciar na agregação da proteína α -sin pode ser uma via importante na compreensão de como a microbiota interfere em doenças neurodegenerativas.

2.6.1 Mangiferina

A mangiferina (Figura 5) (2-C-d-glicopiranosil-1,3,6,7-tetra-hidróxixantona), cujo nome de acordo com a IUPAC é 1,3,6,7-tetra-hidróxi-2-[3,4,5-trihidróxi-6 (hidróximetil)oxan-2-il] xanten-9-ona, pertence à classe dos xantonoides, uma das várias classes de compostos naturais denominados coletivamente de polifenóis. A estrutura deste polifenol compreende uma molécula de glicose ligada covalentemente ao polifenol, noratriol (CANUTO, 2009).

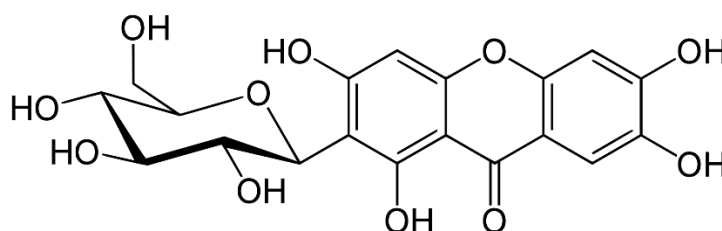


Figura 5. Estrutura da mangiferina, onde estrutura fenólica tem ligação carbono-carbono com uma molécula de glicose (EL-SEEDI et al., 2010).

A mangiferina é encontrada em variadas espécies de plantas, mas a principal e mais fácil fonte é a mangueira (*Mangifera indica*). Diversas partes desta árvore são fonte da mangiferina, desde o fruto (especialmente suas cascas e grãos) até folhas e cascas. Além dessa espécie, plantas pertencentes à família Gentianaceae (como *Canscora decussate*), gênero *Swertia* (como *Swertia chirata*, *Swertia punicea*) e gênero *Salacia* (como *Salacia hananensis*, *Salacia oblonga*) contêm mangiferina em concentrações variadas (SAHA; SADHUKHAN; SIL, 2016). A mangiferina extraída, isolada e purificada é um sólido amarelo à temperatura ambiente que absorve luz ultravioleta (230-260 e 317 nm). Em razão da ligação heterosídica ocorrer através de uma ligação carbono-carbono, sua estrutura mostra-se mais resistente a hidrólise ácida, alcalina e enzimática do que a dos O-heterosídeos (CANUTO, 2009).

A atividade de eliminação de radicais livres da mangiferina é atribuída à sua estrutura xantonóide com ligação C-glicosil juntamente com a presença de múltiplos grupos hidroxila. A estrutura é fundamental para sua atividade antioxidante eficaz. Juntamente com a capacidade antioxidante *in vitro*, a mangiferina pode atuar como um modulador de genes intracelulares, além de possuir propriedades imunomoduladoras e anticâncer (DU et al., 2018; FENG et al., 2019). Diversos estudos reportam a atribuição de atividade neuroprotetora para a mangiferina,

interferindo em diversas vias envolvidas na patologia da doença de Parkinson. Com suas propriedades multifacetadas, essa molécula tem mostrado desempenhar um papel protetor contra diferentes doenças neurodegenerativas (ALBERDI et al., 2018; KAVITHA et al., 2013; SETHIYA; MISHRA, 2014).

A mangiferina e sua aglicona sofrem um extenso metabolismo *in vivo* (WU et al., 2011). Até o momento foram relatados aproximadamente 40 metabólitos, incluindo o noratriol, resultantes da biotransformação da mangiferina. A biotransformação da mangiferina, assim como de outros fenólicos, inclui vários processos, como desidroxilação, deglicosilação, metilação, glucuronidação, glicosilação, sulfatação, etc (SAHA; SADHUKHAN; SIL, 2016).

Em um estudo de Kavitha et al. (2013) foi observado que a mangiferina preveniu déficits comportamentais induzidos por MPTP, um pró-fármaco da neurotoxina 1-metil-4-fenilpiridínio (MPP⁺), diminuiu o estresse oxidativo, a apoptose, a degeneração neuronal dopaminérgica e a depleção de dopamina em modelos de ratos. Além do mais, concluíram também que a mangiferina atenua a neurodegeneração dopaminérgica principalmente por suas propriedades antioxidantes e anti-apoptóticas. O mesmo autor, realizando ensaios com células de neuroblastoma humano, verificou que o pré-tratamento com mangiferina aumentou significativamente a viabilidade celular, diminuiu o potencial da membrana mitocondrial e causou diminuição da sinalização apoptótica induzida por rotenona no modelo celular da doença de Parkinson. Além disso, o desequilíbrio oxidativo induzido pela rotenona foi parcialmente atenuado pela mangiferina. Os resultados indicaram que as propriedades anti-apoptóticas deste composto natural, devido à sua função de proteção antioxidante e mitocondrial, protegeram da citotoxicidade induzida pela rotenona (KAVITHA et al., 2014).

Em outro trabalho, utilizando ratos e neurodegeneração induzida por cloreto de alumínio (AlCl₃), a mangiferina preveniu os déficits cognitivos, a depleção de fator neurotrófico no hipocampo e as anomalias bioquímicas induzidas pelo tratamento com AlCl₃; é o caso dos níveis elevados de marcadores de estresse oxidativo, e os níveis de citocinas pró-inflamatórias. Como conclusão, os resultados demonstraram que a mangiferina oferece neuroproteção na neurotoxicidade induzida por AlCl₃ e pode ser uma potencial abordagem terapêutica no tratamento do estresse óxido-nitrosativo e da neurotoxicidade associada à inflamação (KASBE; JANGRA; LAHKAR, 2015).

Outros sintomas da doença de Parkinson são amenizados com a administração de mangiferina. Em modelo de camundongo com distúrbio de motilidade intestinal, quadro que leva à alta resposta inflamatória, o tratamento com mangiferina diminuiu a inflamação e aumentou a motilidade gastrointestinal (MORAIS et al., 2015). A ação anti-inflamatória também foi verificada por Siswanto et al. (2016) e Peng et al. (2019), onde a mangiferina apresentou ação antioxidante estimulando o Nrf2 e promovendo a homeostase redox intracelular.

2.6.2 Éster fenílico do ácido cafeico

O éster fenílico do ácido cafeico [CAPE, nome iupac 2-feniletil (2E)-3-(3,4-dihidróxifenil)acrilato] (Figura 6) é um composto bioativo natural identificado primeiramente em própolis, mas encontrado em diversas plantas (CHEN; GONG, 2011).

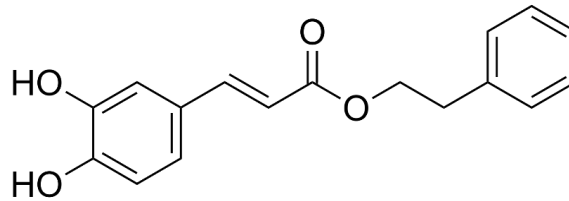


Figura 6. Estrutura química do éster fenílico do ácido cafeico (CAPE) (MURTAZA; KARIM; AKRAM, 2014).

Este polifenol pode ser sintetizado pela reação do ácido cafeico com álcoois fenéticos, contendo grupos hidroxila no anel catecol responsáveis por muitas de suas atividades biológicas. Na literatura estão descritos estudos que reportam sua eficácia contra várias patologias, como câncer e diabetes; além de combater infecções, o estresse oxidativo, inflamações, neurodegenerações e até a ansiedade (MURTAZA; KARIM; AKRAM, 2014).

Diversos trabalhos sustentam que o CAPE tem ação neuroprotetora e pode atuar em mecanismos subjacentes à doença de Parkinson. O estudo de Santos et al. (2014) demonstrou que o CAPE protegeu cultura de células neuronais da morte celular induzida pela neurotoxina dopaminérgica MPP⁺, aumentando a rede de comunicação neuronal. O CAPE seria capaz de atravessar a BHE e exercer seus efeitos neurotróficos no cérebro. Este estudo corrobora o potencial terapêutico do CAPE em doenças neurodegenerativas e propõe o envolvimento da neuroplasticidade no mecanismo de neuroproteção.

Quando células de neuroblastoma humanas foram tratadas com CAPE, a expressão de genes relacionados ao estresse oxidativo no retículo endoplasmático aumentou; entretanto, o pré-tratamento de células com CAPE protegeu as mesmas contra a neurotoxina 6-hidróxidopamina (6-OHDA) de maneira dependente da autofagia. Esses resultados sugerem que o CAPE induz o estresse oxidativo mediado, que podem ter um efeito pré-condicionante nesse tipo celular (TOMIYAMA et al., 2018).

Outros mecanismos envolvidos na doença de Parkinson são atenuados com o tratamento com CAPE. Em modelo de ratos neonatais, o pré-tratamento com este composto inibiu efetivamente a neuroapoptose induzida por agente tóxico, modulando a expressão e a fosforilação de proteínas da via apoptótica (WANG; TANG; HAN, 2016). A administração de CAPE em ratos Wistar levou à atenuação do estresse oxidativo e da inflamação de ratos tratados com o agente tóxico estreptozotocina (CELIK; ERDOGAN, 2008).

O precursor do CAPE também tem atividade neuroprotetora descrita na literatura, onde a hidrólise do CAPE em ácido cafeico pode ser realizada por bactérias do trato gastrointestinal e gerar este composto que também possui atividades biológicas (CELLI et al., 2007). Recentemente foi demonstrado que alguns derivados do ácido cafeico são capazes de potencializar a neuroproteção e induzir neurogênese por meio de interações com vias de sinalização intracelular neuronal. No entanto, os mecanismos celulares pelos quais esses compostos induzem efeitos neurotróficos não são completamente compreendidos (MOOSAVI et al., 2017). O tratamento com ácido cafeico em camundongos alterou a maioria dos déficits motores induzidos por rotenona, diminuiu a expressão da micróglia e de mediadores inflamatórios. Esses resultados confirmaram a atividade anti-inflamatória do ácido cafeico e destacaram

sua atividade neuroprotetora contra a agregação de α -sin induzida pela rotenona em camundongos (ZAITONE et al., 2019).

2.7 A levedura como modelo de estudo da Doença de Parkinson

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* tem sido um modelo muito versátil para esclarecer mecanismos básicos conservados associados à DP (TENREIRO; OUTEIRO, 2016). Vulgarmente conhecida como a levedura de pão ou da cerveja, a *S. cerevisiae* apresenta diversas vantagens como modelo biológico. Estas células incluem tempo de geração curto (aproximadamente 90 min em meio rico); fácil manuseio, que é ainda mais simplificado por sua natureza não patogênica (MENEZES et al., 2015); sobrevivem sob congelamento em glicerol; apresentam condições de cultivo de baixo custo; e, o mais importante, possuem seu genoma totalmente sequenciado, que permite produção de cepas mutantes em diversos genes de interesse (MILLER-FLEMING; GIORGINI; OUTEIRO, 2008).

O grau notavelmente alto de conservação entre *S. cerevisiae* e eucariotos superiores, com relação a processos básicos como ciclo celular, transporte intracelular e sistemas de defesa antioxidante intracelular, é outra característica que torna esta levedura tão atraente (BRÁS et al., 2019). Estudos usando leveduras contribuíram para a elucidação de diversos mecanismos celulares fundamentais envolvidos na replicação, recombinação e reparo do DNA, no metabolismo do RNA e na divisão e progressão do ciclo celular (MENEZES et al., 2015).

Várias vias celulares associadas a doenças também são altamente conservadas entre *S. cerevisiae* e mamíferos, permitindo a modelagem de aspectos específicos de doenças neste organismo. Sistemas de controle na produção de proteínas, tráfico e secreção vesicular, mecanismos antioxidantes, vias autofágicas, biogênese e metabolismo mitocondrial estão entre os mecanismos celulares conservados; permitindo o estudo de mecanismos fundamentais associados a doenças neurodegenerativas, como a DP, em modelos de células de leveduras (BRÁS et al., 2019).

A ortologia com genes de mamíferos superiores inclui os principais mecanismos de defesa biológica contra danos oxidativos, ou seja, incluem proteínas protetoras capazes de remover as EROs e manter a homeostase redox intracelular. Como a maioria dos eucariotos, esta levedura contém uma superóxido dismutase cobre-zinco citosólica (CuZnSOD - Sod1) codificada pelo gene *SOD1*; uma superóxido dismutase manganês mitocondrial (MnSOD - Sod2) codificada pelo gene nuclear *SOD2* e sintetizada no citosol como um pré-peptídeo que é clivado após a entrada nas mitocôndrias; uma catalase citosólica codificada pelo gene *CTT1*; e uma catalase peroxissômica codificada pelo gene *CTA1* (ROEHRS et al., 2010). Fora outras proteínas antioxidantes de mamíferos/humanos que também são encontradas na levedura.

A levedura *S. cerevisiae* foi o primeiro organismo eucariótico a ter o seu genoma completamente sequenciado em 1996. Atualmente, cerca de 80% dos seus cerca de 6000 genes encontram-se funcionalmente caracterizados, o que faz da levedura a célula eucariótica mais bem estudada em nível genético e fisiológico. A sua manipulação tem elevada eficiência de transformação e uma eficiente via de recombinação homóloga que permite eliminar ou mutar o seu genoma ou mesmo inserir DNA exógeno com elevada eficiência (TENREIRO; OUTEIRO, 2016).

O primeiro modelo da DP em levedura expressa o gene humano SNCA que codifica a proteína α -sin em levedura sob a regulação de um promotor induzível por galactose, o promotor GAL, e com uma fusão C-terminal com o gene que codifica a proteína verde fluorescente (do inglês green fluorescent protein-GFP). A expressão de uma cópia do gene humano não se mostrou tóxica para as células de levedura, enquanto a expressão de duas cópias do gene induziu toxicidade (Figura 7). Estes resultados mostraram que a superexpressão da proteína α -sin em levedura é suficiente para induzir toxicidade, à semelhança do reportado em algumas formas da doença (TENREIRO; OUTEIRO, 2016).

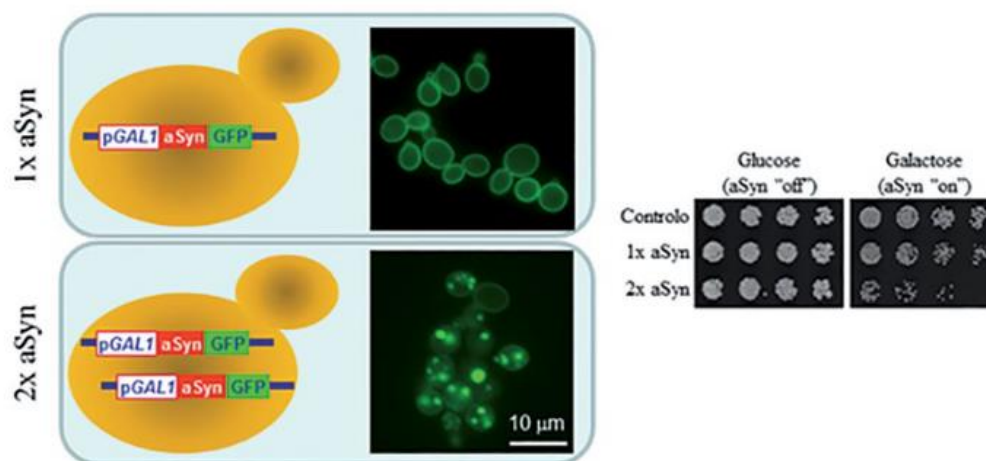


Figura 7. Modelo Parkinsoniano de levedura, onde a expressão de duas cópias do gene α -sin leva a toxicidade (TENREIRO; OUTEIRO, 2016).

A proteína α -sin-GFP localiza-se na membrana plasmática das células contendo apenas uma cópia do gene humano. No entanto, nas células que expressam duas cópias do gene humano há formação de inclusões intracelulares de α -sin-GFP de maneira dependente da concentração (MILLER-FLEMING; GIORGINI; OUTEIRO, 2008). Estudos posteriores revelaram que as inclusões de α -sin formadas em levedura são aglomerados de vesículas, como resultado da disfunção causada por esta proteína no tráfico vesicular. É importante destacar que vesículas e estruturas membranares também parecem ser acumuladas na periferia dos corpos de Lewy presentes em cérebros de doentes acometidos pela DP (TENREIRO; OUTEIRO, 2016).

Também foi reportado que em células selvagens e contendo o gene de α -sin contendo a mutação A53T são direcionados para a membrana plasmática através da via secretora e causam estresse no retículo endoplasmático. Achados recentes indicam que α -sin em células contendo a mutação A30P é direcionada ao vacúolo, através da via endocítica, onde é degradado proteoliticamente (TENREIRO; OUTEIRO, 2016).

A toxicidade induzida pela expressão da α -sin em levedura deve-se à sua interferência em várias vias celulares como endocitose, tráfico vesicular, em particular do retículo endoplasmático para o golgi, aumento do estresse oxidativo e da formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), disfunção mitocondrial, deficiência do proteassoma e autofagia (FLEMING; LINDQUIST, 2003; SANCENON et al., 2012; SOPER et al., 2008). A geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) e a apoptose

também foram reproduzidas com sucesso em leveduras, valorizando ainda mais esse modelo (MILLER-FLEMING; GIORGINI; OUTEIRO, 2008). Além disso, há indícios de que a proteína α -sin pode formar em levedura fibrilas amiloides semelhantes às dos corpos de Lewy, uma vez que algumas inclusões de α -sin mostraram marcação com compostos que identificam especificamente este tipo de conformação: a tioflavina S e a tioflavina T (TENREIRO; OUTEIRO, 2016).

Diversos grupos têm utilizado este modelo para a investigação de moléculas com atividades intracelulares que interfiram em mecanismos patológicos associados a neurodegeneração (ARENDARSKI et al., 2018; BRÁS et al., 2019; GOLOMIDOV et al., 2018; GUPTA et al., 2018; KARDANI; SETHI; ROY, 2017; LEE et al., 2011; MACEDO et al., 2017; POPOVA; KLEINKNECHT; BRAUS, 2015; RENCUS-LAZAR et al., 2019; TARDIFF et al., 2013; WINDERICKX et al., 2012; ZAMPOL; BARROS, 2018). A formação de espécies radicais é frequentemente associada a danos celulares que culminam em danos neurológicos. Devido a isto, o grupo de MACEDO et al. (2015b) já investigou a ação de polifenóis de *Corema album* na levedura, observando que estas moléculas atuam reduzindo o estresse oxidativo e promovendo a autofagia. Este mesmo grupo avaliou também o efeito de digestão *in vitro* de folhas de *Arbutus unedo* neste mesmo modelo (MACEDO et al., 2018).

Em suma, a levedura mostra-se um modelo biológico simplificado mas eficiente para a avaliação de mecanismos patológicos da doença de Parkinson, bem como para a investigação de novas estratégias terapêuticas.

3. OBJETIVO GERAL

Avaliar a influência de substâncias fenólicas e micro-organismos probióticos em modelo parkinsoniano de levedura.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Identificar os produtos majoritários resultantes do crescimento de *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp.) em presença de CAPE e mangiferina;
2. Investigar as propriedades antioxidantes de compostos fenólicos metabolizados ou não por micro-organismos probióticos em células de *Saccharomyces cerevisiae* com genótipo completo (BY4741) e deficientes em sistemas de defesa antioxidante ($\Delta ct1$, $\Delta gsh1$, $\Delta sod1$);
3. Verificar a influência dos compostos fenólicos e dos metabólitos bacterianos sobre a formação dos agregados de alfa-sinucleína através da sua localização por microscopia de fluorescência na cepa transformada contendo o gene da proteína alfa-sinucleína;
4. Avaliar a relação da atividade antioxidante e a agregação de proteína alfa-sinucleína em modelo de levedura.

5. METODOLOGIA

5.1 Substâncias testadas

As substâncias éster fenólico do ácido cafeico (CAPE) e mangiferina foram adquiridas da Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim, Alemanha) e solubilizadas em mistura de dimetilsulfóxido (DMSO) e álcool etílico P.A. (Vetec, Brasil) na proporção 1:1. Uma solução estoque na concentração de 5,0 mM foi mantida a -20 °C.

A concentração dos solventes não-tóxica às leveduras é de 3% de DMSO (SADOWSKA-BARTOSZ et al., 2013) e 12% de etanol nas culturas celulares (SILVA et al., 2008). A concentração atingida nas culturas celulares durante os ensaios foi de no máximo 2,5% para ambos os solventes.

5.2 Fermentação microbiana

5.2.1 Culturas de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*

Utilizou-se um *blend* liofilizado de nome comercial Baby Biotic®, produzido e distribuído pela International Nutrition (USA), contendo as cepas probióticas *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus salivarius*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium breve*, na ordem de grandeza total de 5×10^8 UFC/g, além do ingrediente prebiótico inulina.

5.2.2 Fermentação microbiana

As culturas liofilizadas foram mantidas sob refrigeração a 7 °C. No momento da utilização, cerca de 0,05 g do liofilizado foi ressuspense em Caldo de Man, Rogosa e Sharpe (MRS) e incubado a 36 °C por 48 h em jarra de anaerobiose contendo gerador de anaerobiose (PROBAC, São Paulo, Brasil). Após o crescimento, o inóculo foi ajustado para a concentração de 10^8 UFC.mL⁻¹ utilizando curva de correlação de absorvância x UFC.mL⁻¹. Após centrifugação, o precipitado de células foi ressuspense em meio mínimo para lactobacilos descrito por Szwajgier e Jakubczyk (2010), contendo peptona (2,0 g.L⁻¹), extrato de levedura (2,0 g.L⁻¹), cisteína (0,5 g.L⁻¹), cloreto de sódio (NaCl) (0,1 g.L⁻¹), bicarbonato de sódio (NaHCO₃) (2,0 g.L⁻¹), fosfato de potássio dibásico (K₂HPO₄) (0,04 g.L⁻¹), fosfato de potássio monobásico (KH₂PO₄) (0,04 g.L⁻¹), sulfato de magnésio (MgSO₄.7H₂O) (0,01 g.L⁻¹), cloreto de cálcio (CaCl₂) (0,01 g.L⁻¹) e Tween 80 (2,0 g.L⁻¹).

Embora a referência do meio não tenha mencionado o pH ideal, este foi ajustado a pH 6.0 adicionando HCl 2,0 M, baseado em outros artigos que utilizaram este pH como sendo o ótimo para o crescimento de *Lactobacillus* (ÁVILA et al., 2009). O meio MRS também teve seu pH ajustado (5,7). Em seguida, o meio mínimo inoculado com o *blend* probiótico foi incubado a 36 °C durante 168 horas sob anaerobiose, em contato com os fenólicos CAPE (0,1 mM), mangiferina (0,1 mM) e o ensaio controle (sem fenólicos). O acompanhamento da sobrevivência das bactérias foi realizado por meio de diluições sucessivas e plaqueamento em ágar MRS utilizando a técnica da microgota, incubando-se por 48 h a 36 °C em anaerobiose.

5.2.3 Caracterização da biotransformação bacteriana por cromatografia líquida

As análises dos sobrenadantes foram realizadas em um sistema de Cromatografia Líquida de Alta Pressão com Detector de Arranjo de Diodos (High Pressure Liquid Chromatography, Diode Array Detector - HPLC-DAD) Shimadzu Prominence equipado com um módulo de bomba LC-20AT, um detector de matriz de diodos SPD-M20A, um centro de controle CBM-20A, um injetor manual Rheodyne® e forno CTO-20A (Shimadzu, Japão). A aquisição e a análise dos dados foram realizadas no software LCSolution (Shimadzu, Japão). A separação foi obtida com uma coluna Betasil C18 (250 mm x 4,5 mm, 5 µm; Thermo Fisher Scientific, Runcorn, Reino Unido), utilizando 1% de ácido acético em água (solvente A) e 10% de acetonitrila em metanol (solvente B) como fase móvel a uma vazão constante de 1,0 mL.min⁻¹.

O gradiente (v/v) começou com 35% do solvente B, subindo para 70% em 20 min, 85% em 25 min e 100% em 30 min e permanecendo nessa concentração por mais 5 min. O volume de injeção foi de 20 µL e os cromatogramas foram registrados a 320 nm. A identificação de CAPE e mangiferina presentes nos fermentados baseou-se na comparação dos tempos de retenção e das características espectrais de UV com os cromatogramas de padrões autênticos obtidos utilizando os mesmos parâmetros.

5.3 Culturas de leveduras e condições de crescimento

Neste estudo foram utilizadas quatro cepas de *Saccharomyces cerevisiae* portadoras ou não de deficiências no sistema antioxidante (Tabela 1) além das cepas transformadas com o plasmídeo P426 (pRS426GAL) e P426- α -sin (p426GAL- α Syn-GFP) contendo o gene da proteína alfa-sinucleína.

Tabela 1 - Cepas de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas no trabalho.

Cepas	Genótipos	Fenótipos
BY4741	<i>MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0</i>	Controle
Δ sod1	Isogênica da BY4741, exceto <i>YJR104c::kanMX4</i>	Cepa deficiente na enzima SOD citoplasmática (Sod1p)
Δ gsh1	Isogênica da BY4741, exceto <i>YJL101c::kanMX4</i>	Cepa deficiente no tripeptídeo glutationa (Gsh1p)
Δ ctt1	Isogênica da BY4741, exceto <i>YGR088w::kanMX4</i>	Cepa deficiente na enzima catalase T

As cepas BY4741 (controle) e suas isogênicas mutantes ($\Delta sod1$, $\Delta gsh1$ e $\Delta ctt1$) foram adquiridas da companhia Euroscarf (<http://www.euroscarf.de/>), sediada em Frankfurt, na Alemanha; e armazenadas em meio sólido 2% a 4 °C. No meio de armazenamento das cepas mutantes houve adição de geneticina (0,02%), uma vez que a mutação confere resistência a este antibiótico.

Neste estudo foram utilizadas diferentes formulações de meios de cultivo: meio Yeast extract, Peptone, Dextrose (YPD) 2% líquido, composto de 1% de extrato de levedura (Difco, EUA), 2% de peptona (Difco, EUA) e 2% de glicose (Vetec, Brasil); meio YPD 2% sólido, constituído pelos mesmos compostos do meio YPD 2% líquido, porém com a adição de 2% de ágar (Difco, EUA) para solidificar o meio.

Como modelo biológico para o estudo do potencial neuroprotetor, foi utilizada a levedura *S. cerevisiae* (α -sin) transformada com o plasmídeo p426GAL- α Syn-GFP contendo o gene humano SNCA, com uma fusão C-terminal a GFP sob a regulação do promotor induzível GAL1. Como cepa controle foi utilizada a cepa P426, que apresentava o plasmídeo vazio no processo de transformação da levedura (pRS426GAL). Esta cultura foi cedida gentilmente pelo professor Marcos Dias Pereira do Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da UFRJ sob autorização do prof. Tiago Outeiro.

As cepas foram mantidas estocadas a 4 °C em meio sintético com glicose (SGLI) sólido [base nitrogenada de levedura a 0,67% (p/v) sem aminoácidos (Difco), 2% (p/v) de glicose e 0,79 g.L⁻¹ de aminoácidos (histidina, metionina e leucina)]. O cultivo foi realizado em meio SGLI líquido (composição igual ao meio sólido com ausência de ágar) a 30 °C e agitação de 160 rpm.

5.4 Citotoxicidade das substâncias fenólicas

A determinação da concentração mínima inibitória (CIM) das substâncias fenólicas foi realizada através da técnica da microdiluição. Inicialmente foram distribuídos 50 μ L de caldo YPD nos orifícios das placas de microdiluição contendo 96 cavidades, de fundo chato, com tampa. Em seguida, foram distribuídos 50 μ L da solução dos fenólicos nos primeiros poços contendo o meio YPD, estabelecendo-se uma concentração inicial de 800 mM e realizando-se diluições seriadas a partir da retirada de uma alíquota de 50 μ L da cavidade mais concentrada para a cavidade sucessora. Após a diluição, adicionou-se em cada poço 10 μ L da suspensão celular (inóculo) da levedura *S. cerevisiae* (BY4741), de forma a obter uma leitura da absorvância no espectrofotômetro (Bioespectro, Curitiba, Brasil) de 0,03 em comprimento de onda de 600 nm (DO₆₀₀). Para a levedura α -sin realizou-se o mesmo procedimento, substituindo o meio de cultivo YPD pelo SGLI. Como controle negativo foi verificada a viabilidade da levedura no meio de cultura sem adição de fenólicos e como controle positivo utilizou-se o meio de cultura não inoculado.

Após 24 h de contato com as leveduras, a citotoxicidade das diversas concentrações de CAPE e mangiferina foi avaliada por meio do ensaio de capacidade metabólica, baseado na capacidade das células vivas de reduzir a substância resazurina em resorufina (Figura 8). Portanto, adicionou-se 10 μ L de solução aquosa de resazurina 0,01% (p/v) e após 30 minutos o surgimento de uma coloração rosa é indicativo da presença de atividade metabólica, enquanto a violeta indica a ausência

desta. Após 30 min, as amostras foram inspecionadas visualmente (TORRES et al., 2018).

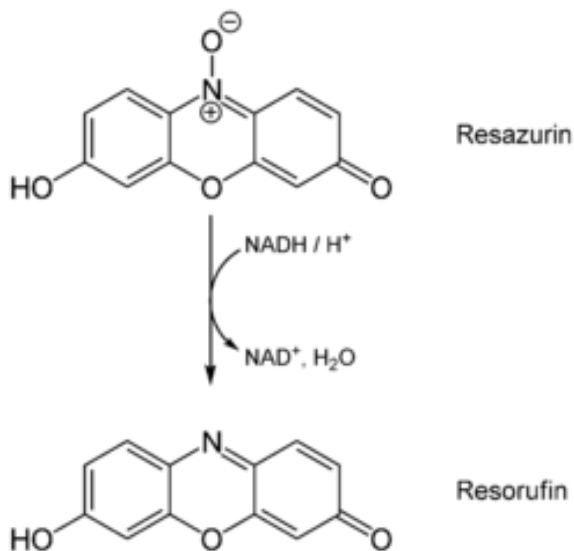


Figura 8. Redução da resazurina em resorufina.

5.5 Ensaios antioxidantes

Os erlenmeyers contendo meio YPD 2% líquido foram preparados obedecendo a razão de 5/1 de volume do frasco/meio de cultura no frasco. Os meios foram esterilizados em autoclave a 121 °C por 15 minutos. Os meios sólidos foram vertidos em placas de petri estéreis no ambiente de fluxo laminar (Cabine horizontal com filtro ULPA, Marca Esco[®], USA).

5.5.1 Pré-tratamento das cepas controle e mutantes de *S. cerevisiae*

Para o preparo do inóculo, uma alçada com células de um repique fresco foi transferida para um tubo de ensaio com tampa contendo 10 mL de água destilada estéril. Um volume de solução correspondente a 20 µg de células foi transferido para um erlenmeyer contendo 100 mL de meio YPD líquido. O inóculo foi incubado a 28 °C por 22 horas sob agitação de 160 rpm em incubadora tipo shaker (Incubadora orbital refrigerada, Marca NOVATECNICA[®], Brasil). Após o crescimento das células, a concentração das mesmas foi determinada através da medida da absorvância em espectrofotômetro (UV/Vis, Marca Biospectro[®], Brasil) a 570 nm de uma suspensão celular convertida em massa de célula (mg de peso seco de célula.mL⁻¹).

A fim de se trabalhar com células no início do crescimento exponencial (Figura 9) (primeira fase de crescimento celular), onde ainda encontravam-se mais sensíveis à ação dos radicais livres, os inóculos eram retirados para as subseqüentes análises quando a concentração celular estava entre 0,5 e 1,2 mg.mL⁻¹.

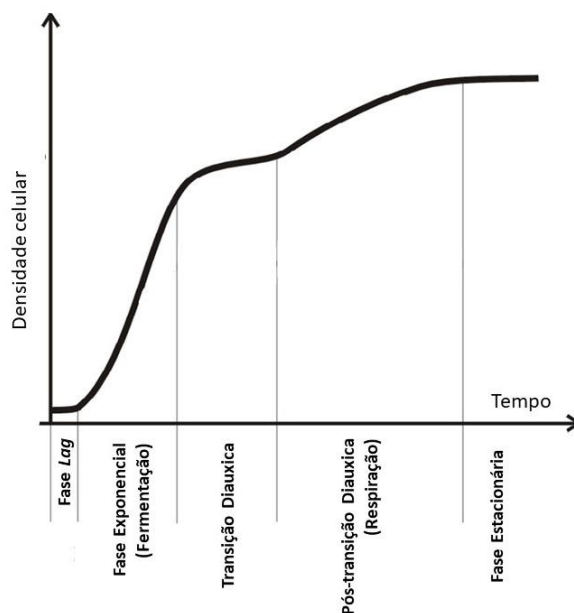


Figura 9. Curva de crescimento de *S. cerevisiae* em presença de glicose onde a densidade celular foi estimada pela turbidez lida a 600 nm (SWINNEN et al., 2006 - Adaptado).

As suspensões celulares foram centrifugadas, ressuspensas de forma que a concentração celular estivesse em $1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$, e separadas em diferentes tratamentos: controle (MMF – meio fermentado), células sob estresse oxidativo ($2,0 \text{ mM}$ de H_2O_2 em MMF), solução de CAPE puro sem fermentar na concentração de $0,1 \text{ mM}$ em MMF (CP), caldo com o CAPE fermentado (FCP), solução de mangiferina pura sem fermentar na concentração de $0,1 \text{ mM}$ em MMF (MG) e caldo com a mangiferina fermentada (FMG). As suspensões celulares com os tratamentos permaneceram durante 2 h sob agitação e temperatura controlados ($28 \text{ }^\circ\text{C}/160 \text{ rpm}$), e em seguida as suspensões celulares em contato com os fenólicos puros ou fermentados foram centrifugadas, as células lavadas duas vezes, e ressuspensas em tampão fosfato de sódio 50 mM pH $6,0$, sendo então expostas à solução de H_2O_2 ($2,0 \text{ mM}$).

5.5.2 Capacidade antioxidante *in vitro*

A determinação da atividade antioxidante das substâncias foi avaliada antes e após a fermentação microbiana, onde foram feitas diluições da solução de CAPE ($0,1$; $0,5$; $1,0$; $2,5$; $5,0$ e $10 \text{ } \mu\text{M}$) e de mangiferina ($0,1$; $0,5$; $1,0$; $2,5$; $5,0$ e $7,5 \text{ } \mu\text{M}$) para se determinar a faixa de melhor capacidade antioxidante. Os ensaios foram realizados em microplacas com 96 poços cada, onde foram adicionados $71 \text{ } \mu\text{L}$ da amostra e $29 \text{ } \mu\text{L}$ da solução metanólica de 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) na concentração de $0,3 \text{ mM}$. Após 30 minutos de incubação no escuro foram realizadas as leituras em espectrofotômetro de leitura de microplacas (ELISA) a 517 nm . O branco específico para cada amostra foi determinado utilizando-se $29 \text{ } \mu\text{L}$ de metanol e $71 \text{ } \mu\text{L}$ da amostra (em cada concentração). Para o controle positivo foi utilizado $29 \text{ } \mu\text{L}$ de DPPH e $71 \text{ } \mu\text{L}$ de metanol. Todos os ensaios foram realizados em triplicata. A atividade antiradicalar (%AA) foi calculada como a porcentagem de descoloração do radical DPPH, segundo a equação abaixo, adaptada de MENSOR et al. (2001):

$$\%AA = 100 - [(Abs_{amostra} - Abs_{branco}) \times 100] / Abs_{controle\ positivo}$$

A atividade sequestrante do radical livre DPPH também foi expressa em termos de CE_{50} (concentração mínima necessária para que a substância avaliada reduza em 50% a concentração do DPPH em solução), através da média obtida nos gráficos que relacionam o percentual de atividade contra a concentração da substância analisada (MENSOR et al., 2001).

5.5.3 Viabilidade celular

Após o tempo de incubação, alíquotas das suspensões celulares correspondentes a 40 μ g de células foram diluídas em água destilada estéril, e em seguida plaqueadas no meio de cultura sólido YPD 2% por espalhamento utilizando a alça de Drigalski flambada a cada contato com as suspensões celulares. As placas foram preparadas em duplicata e as colônias foram contadas após 48 horas de incubação em estufa B.O.D (SOLAB, São Paulo, Brasil). à temperatura de 28 °C para posterior visualização do crescimento celular. A viabilidade celular foi avaliada em relação às células controle (sem estresse) utilizadas como parâmetro.

5.5.4 Oxidação intracelular

Após 2 horas de contato com os tratamentos descritos no item 5.5.1, 3,0 mg de células foram ressuspensas em 1,0 mL de tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,8). Em seguida, adicionou-se a esta suspensão celular uma solução contendo a prova fluorescente 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (H_2DCFDA) (Sigma, EUA) a partir de uma solução estoque em etanol 1,0 mM, mantendo-se uma concentração final de 20 μ M em contato com as células. Após 15 minutos para a absorção do reagente pelas células, foi adicionada solução de peróxido de hidrogênio mantendo-se a concentração de 2,0 mM deste oxidante em contato com as células, e em seguida, incubou-se por 1 h a 28 °C e 200 rpm. As suspensões celulares foram centrifugadas e a fluorescência dos sobrenadantes foi medida usando um leitor de microplacas (HIDEX, Turku, Finlândia) nos comprimentos de onda de excitação e emissão de 488 e 520 nm, respectivamente. Os resultados foram expressos em unidades de fluorescência (U.F.) e comparados com as células tratadas com MMF (SUBHASWARAJ et al., 2017).

5.5.5 Peroxidação lipídica

Após a etapa de pré-tratamento (5.5.1), um volume correspondente a 50 mg de células foi centrifugado e lavado duas vezes com água destilada estéril, ressuspenso em 500 μ L de TCA (ácido tricloroacético) 10% (v/v) em água e transferido para tubo de parede grossa. Adicionou-se 1,5 g de pérolas de vidro e as células foram lisadas sob agitação vigorosa com 6 ciclos de 20 segundos no vortex (agitador de tubos, Marca Gehaka®) e 20 segundos no gelo. Os extratos foram recolhidos em microtubos tipo eppendorf e as pérolas de vidro lavadas com 500 μ L de TCA 10% (Vetec), sendo este segundo volume recolhido nos mesmos microtubos. Após a lise celular os extratos passaram por uma centrifugação a 4000 rpm, onde o sobrenadante foi coletado e utilizado para as análises de peroxidação lipídica através do método

TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico). O ensaio foi realizado com a mistura reacional contendo 150 µL de extrato, 150 µL de H₂O, 100 µL de EDTA (ácido etileno diamino tetracético) (Vetec) 0,1 M e 600 µL de ácido tiobarbitúrico (Merck) 1% em NaOH 0,05 M. Também foi preparado um branco reacional contendo 0,3 mL de H₂O sem o extrato celular. A mistura reacional foi incubada a 100 °C por 15 minutos. Os tubos foram resfriados e a absorvância medida espectrofotometricamente a 532 nm. A dosagem foi feita em duplicata e os resultados expressos em picomoles de malonaldeído (MDA – produto da peroxidação lipídica) por miligrama de células (pmoles MDA/mg cel) (STEELS; LEARMONTH; WATSON, 1994). O produto gerado é o resultado da reação do ácido tiobarbitúrico e o produto gerado pela peroxidação dos lipídios de membrana – malonaldeído (MDA) (Figura 10).

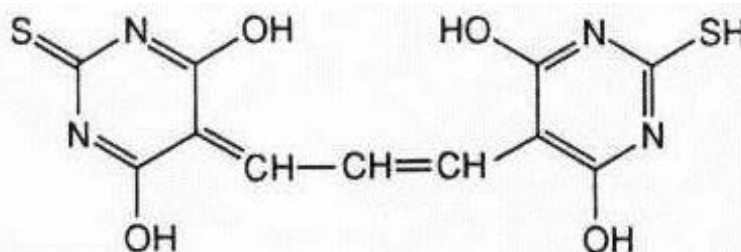


Figura 10 - Produto formado a partir da reação do ácido 2-tiobarbitúrico e o malonaldeído.

5.6 Estudos de neuroproteção em modelo biológico de *S. cerevisiae*

5.6.1 Pré-tratamento das cepas p426 e α -sin

Um pré-inóculo foi preparado em SGLI até a densidade óptica a 600 nm (DO_{600}) atingir $0,5 \pm 0,1$ (fase de crescimento logarítmico) sob agitação de 160 rpm a 30° C. As células foram centrifugadas e ressuspensas em meio de tratamento de forma que a DO_{600} atingisse 1,0.

Para os tratamentos utilizou-se os meios líquidos SGLI e SGAL (base nitrogenada sem aminoácidos a 0,67%, galactose 1% e 0,08% dos aminoácidos histidina, leucina e metionina), suplementando-se estes meios com CAPE e mangiferina, ambos na concentração de 0,1 mM. Para os tratamentos com CAPE e mangiferina fermentados a água destilada do preparo foi substituída pelo sobrenadante da fermentação, preparado por centrifugação do meio fermentado por 5 min a 2000xg. Os meios de cultivo SGLI e SGAL com os sobrenadantes de fermentação foram esterilizados por filtração em membrana de poro com diâmetro de 0,22 µm. Células cultivadas apenas em meio SGAL ou SGLI foram utilizadas para fins de comparação.

5.6.2 Curvas de crescimento

A suspensão celular foi ajustada para 0,3 em DO_{600} nos tratamentos descritos anteriormente e mantidas a 30 °C com agitação de 160 rpm. O crescimento foi monitorado cineticamente nos tempos 0, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 e 35 h,

medindo-se a densidade óptica em espectrofotômetro (UV/Vis - Biospectro®) (MACEDO et al., 2015).

Para o cálculo da velocidade específica de crescimento celular (μ) foram consideradas as absorvâncias da suspensão celular obtidas durante as 24 horas de fermentação. Os dados coletados foram ajustados ao modelo de curva exponencial através do Software Microsoft Excel 2016, obtendo-se curva do tipo concentração de $X = X_0 \cdot e^{\mu t}$, onde X_0 representa a concentração de células inicial, X é a concentração de células num tempo (t) específico e μ a velocidade específica. Para o tratamento com CAPE foi utilizado o ajuste linear, onde $y = ax + b$, onde x representa a velocidade específica.

5.6.3 Viabilidade celular avaliada por ensaios “spot”

O volume de 30 μ L de células de cada tratamento após 20h de indução foi recolhido e a DO_{600} foi ajustada para $0,05 \pm 0,005$ em tampão fosfato de potássio 50 mM pH 6,0. As diluições em série foram feitas com uma proporção de 1:4, e 3,0 μ L de cada diluição foram inoculados em meio SGLI e SGAL sólidos, sendo incubados por 2 dias a 30 °C (MACEDO et al., 2015).

5.6.4 Microscopia de fluorescência

Células de levedura α -sin foram mantidas no pré-tratamento descrito em 5.6.1 por 20 horas a 30 °C. Imagens fluorescentes foram obtidas com o Zeiss Observer microscópio Z1 (Zeiss) equipado com objetiva confocal (ZeissPlan-Apochromat 63 x 1.4Oil) e pacote de software ZEN BLACK. Para a quantificação da agregação foram contadas pelo menos 200 células para cada tratamento usando o software Image J. Os resultados foram normalizados em relação à expressão no tratamento controle (células mantidas em meio sintético com galactose).

5.7 Detecção de metabólitos por HPLC-Q-TOF-MS

A avaliação do metaboloma foi realizada com cromatografia de alta eficiência acoplada a massas (HPLC-MS). A análise foi realizada no Sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) Nexera X0 (Shimadzu, Japão). A coluna utilizada foi a ODS Hypersil C18 de dimensões 150 x 2,1 mm, 3,0 μ m de tamanho de partícula (Thermo Fischer Scientific, Massachusetts, EUA) acoplado a pré-coluna C18 com dimensões 4 x 3.0 mm (Phenomenex, EUA). O volume de injeção foi de 20 μ L e a temperatura da coluna foi ajustada para 30 °C. O gradiente programado continha fase móvel A, que era composta por formiato de amônio (5,0 mM) pH 7,0 em água, enquanto a fase móvel B era composta por formiato de amônio (5,0 mM) pH 7,0 em acetonitrila, e a taxa de fluxo foi de 0,20 mL.min⁻¹.

O gradiente de eluição do solvente B foi 0% de B (0-6 min); 30% (6-12 min); 50% (12-18 min); 70% (18-24 min); 90% (24-27 min); 95% (27,5-40,5 min) e 20% B (41-55 min). O volume de injeção foi de 2,0 μ L e a temperatura da coluna foi ajustada para 35 °C.

A espectrometria de massas foi realizada no equipamento Maxis Impact, configuração ESI-Q-TOF (Bruker, Massachusetts, EUA), com calibração interna com formiato de sódio 100 μ M em água/acetonitrila (1:1). A ionização por eletrospray (ESI)

foi usada para varrer no modo de ionização negativo, como modo de aquisição dependente de dados (DDA/AutoMS), com isolamento/fragmentação de 5 precursores por ciclo. A faixa de varredura quadrupolar estava entre 50 e 1000 m/z , com taxa de aquisição de 2,0 Hz. A temperatura da fonte de íons era de 200 °C, a pressão de nebulização foi de 2,0 bar e a taxa de fluxo de nitrogênio para a evaporação do solvente foi de 8,0 L.min⁻¹. A tensão de ionização capilar foi de 4,5 kV.

5.8 Análise estatística

Os resultados são apresentados como uma média e desvio padrão de três experimentos independentes, no mínimo. Utilizou-se o teste de análise de variância ANOVA one way seguido de pós-teste de Tuckey para a comparação das diversas médias. Os resultados do ensaio de oxidação intracelular foram analisados por ANOVA two way e comparados pelo teste de comparações múltiplas de Tuckey. A diferença foi considerada estatisticamente significativa quando $p < 0,05$ para todos os resultados obtidos. A representação com letras diferentes mostra resultados estatisticamente distintos em todos os ensaios.

6. RESULTADOS E DISCUSSÕES

6.1 Fermentação microbiana e perfil fenólico

As transformações bacterianas podem levar à produção de substâncias mais ou menos ativas, dependendo do substrato metabolizado e dos produtos formados nesta bioconversão. Devido a isto, a contagem total de micro-organismos deve ser acompanhada ao longo do processo fermentativo, de forma a avaliar possíveis variações na população microbiana em contato por determinado período com as substâncias fenólicas utilizadas neste estudo.

A fermentação partiu de uma contagem inicial de micro-organismos na ordem de grandeza de 10^8 UFC.mL⁻¹ ($8,47 \pm 0,0081$ log UFC.mL⁻¹) e teve duas reduções logarítmicas ao longo do tempo de fermentação (10^6 UFC.mL⁻¹), atingindo $6,41 \pm 0,083$ log UFC.mL⁻¹ no fermentado de CAPE, $6,35 \pm 0,049$ log UFC.mL⁻¹ no fermentado de mangiferina e $6,96 \pm 0,57$ log UFC.mL⁻¹ no meio apenas com as bactérias chamado aqui de controle (Figura 11). Comparando-se a contagem total dos micro-organismos ao longo do tempo de fermentação, observa-se que nenhum dos tratamentos interferiu na sobrevivência das células das bactérias probióticas, uma vez que mantiveram quantidades semelhantes ao controle.

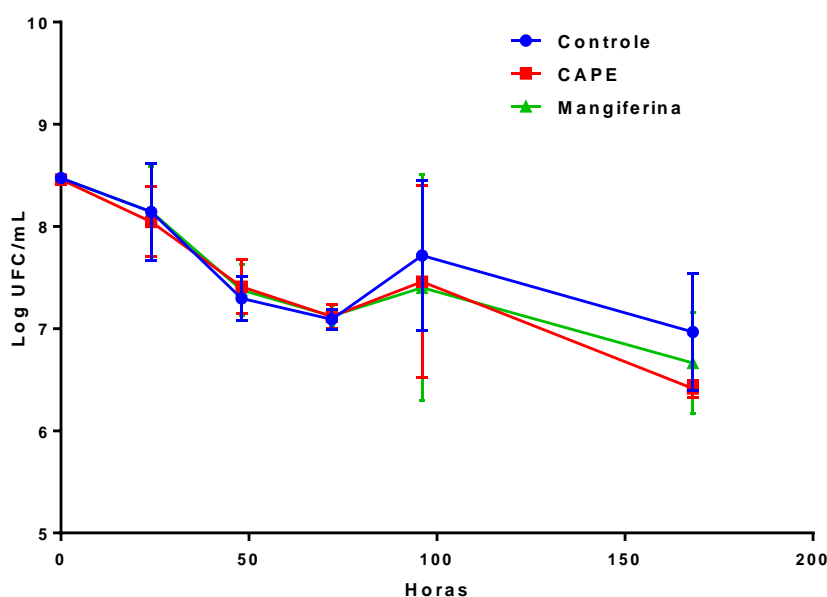


Figura 11. Avaliação da população microbiana ao longo do tempo de fermentação.

Estudos que avaliaram a bioconversão de fenólicos existentes em matrizes vegetais observaram aumento da contagem de células ao longo do tempo (JUNG et al., 2017; VALERO-CASES; NUNCIO-JÁUREGUI; FRUTOS, 2017). Entretanto, esses trabalhos avaliaram matrizes vegetais ricas em diversas outras substâncias, principalmente açúcares; enquanto neste estudo, por se tratar de meio de cultivo com restrição de glicose para a fermentação microbiana, é compreensível a queda de viabilidade observada após 168 h (PAN et al., 2019). Uma escassez significativa de fontes de carbono pode fazer com que o lactobacillus diminua a proliferação (para garantir sua sobrevivência), de modo que entre em um período de estabilização

(WANG et al., 2012) seguida de morte celular por inanição quando são exauridas as fontes energéticas.

Um parâmetro importante para a manutenção da viabilidade destas bactérias probióticas é o pH, e neste caso não ocorreram alterações significativas após o tempo de fermentação devido a presença de agentes tamponantes (K_2HPO_4 e KH_2PO_4) no meio de cultivo. O pH do meio foi ajustado para pH 6,0; e atingindo $6,2 \pm 0,12$ no meio mínimo fermentado, $6,1 \pm 0,38$ na mangiferina fermentada e $6,3 \pm 0,095$ no CAPE fermentado após 168 h de incubação.

A modulação da população e da diversidade microbianas no intestino está ligada a diversos fatores, como tipo de organismo, alimentação, fisiologia, etc (FILOSA; DI MEO; CRISPI, 2018). Compostos fenólicos presentes cotidianamente na dieta podem provocar mudanças significativas nesta microbiota intestinal; seja de forma direta, através de uma ação antimicrobiana ou pela indução da proliferação desses micro-organismos; ou de forma indireta, pois os benefícios ou malefícios à saúde do organismo estão diretamente associados à biotransformação intestinal, que é a principal responsável por modular a atividade biológica desses compostos (SÁNCHEZ-PATÁN et al., 2012).

As bactérias lácticas são uma parte importante da microbiota na fermentação de vegetais, matriz de onde são extraídos vários compostos fenólicos. Quando comparados a outras bactérias, incluindo *Enterobacteriaceae*, *Clostridium* spp. e *Bacteroides* spp., os *Lactobacillus* spp. são geralmente mais resistentes à exposição a alguns fenólicos. Contudo, a capacidade de tolerar e metabolizar essas substâncias é dependente da espécie ou da cepa. *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus fermentum* e *Lactobacillus plantarum* são alguns dos lactobacilos que metabolizam ácidos fenólicos por meio de atividades de descarboxilação e/ou redução. Já outras vias metabólicas identificadas em lactobacilos baseiam-se em glicosil-hidrolases, que convertem glicosídeos flavonoides nas agliconas correspondentes; e esterases, que transformam taninos ou ésteres de ácidos fenólicos (FILANNINO et al., 2015).

Com o intuito também de acompanhar o perfil de substâncias fenólicas constituintes do meio ao longo do processo fermentativo na presença dos fenólicos CAPE e mangiferina, o caldo gerado foi submetido à análise por HPLC/UV-Vis; verificando-se a presença dos fenólicos originais e o possível aparecimento de outros fenólicos inicialmente ausentes no meio de cultivo. Nem todas as substâncias orgânicas presentes podem ser visualizadas por este ensaio. Isto porque a maioria das substâncias orgânicas e grupamentos funcionais não absorve luz na região de espectro do ultravioleta utilizada para este ensaio (320 nm), e geralmente apenas moléculas com elétrons em sistemas aromáticos deslocalizados absorvem a luz no UV (SCHMID, 2001).

Avaliando-se o tempo inicial de fermentação do meio de cultivo pelos probióticos sem a adição de fenólicos, observa-se que o pico que aparece no tempo de retenção de 2,6 minutos (Figura 12) mantém-se constante ao longo de todo o processo fermentativo; aparecendo inclusive nas suspensões bacterianas adicionadas com os fenólicos (Figura 13 a Figura 16). Isto provavelmente é referente a substâncias do próprio meio de cultivo, como a cisteína adicionada ao meio que absorve no comprimento de onda de 320 nm (ZAIA; ZAIA; LICHTIG, 1998).

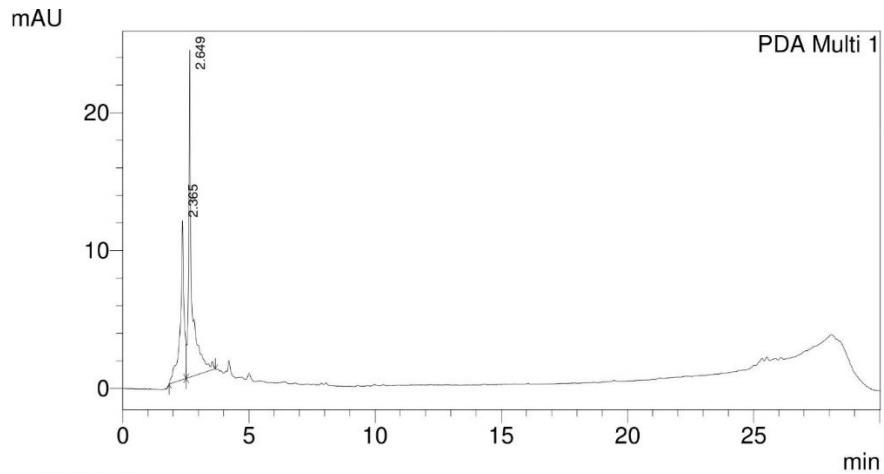
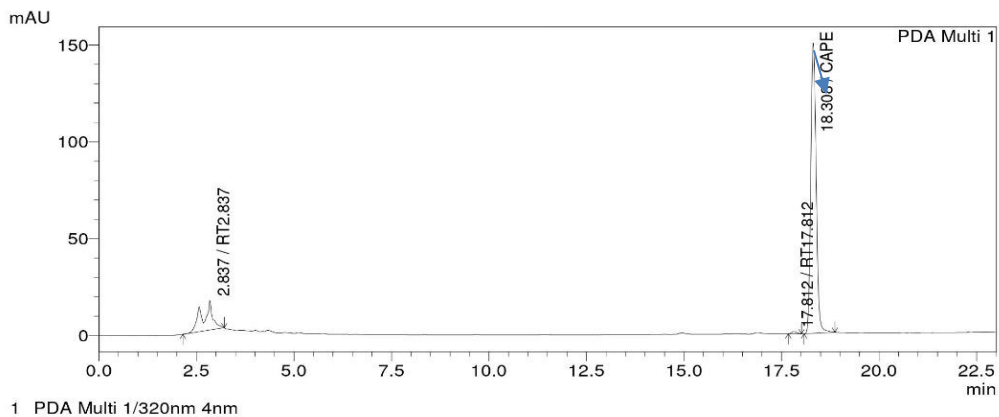


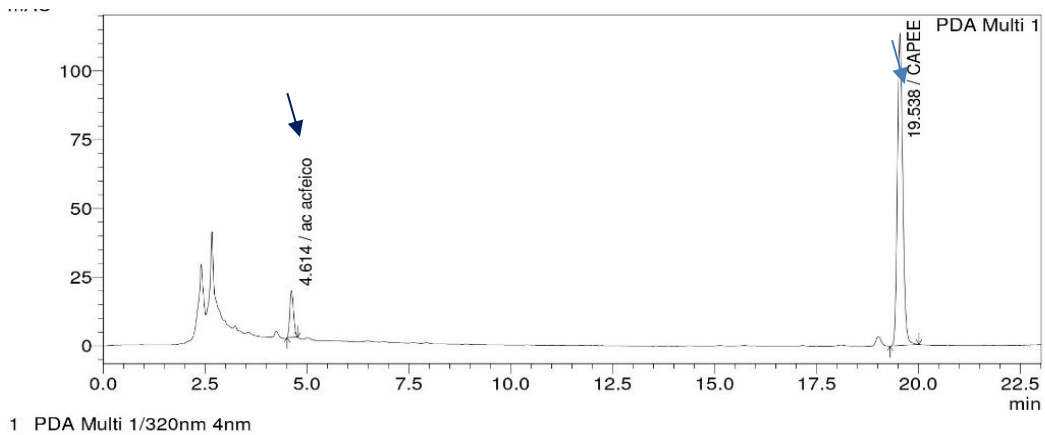
Figura 12. Meio de cultivo sem contato com as bactérias (tempo 0).

Observa-se durante a biotransformação que há uma redução na intensidade de área do pico referente ao CAPE, atingindo 87% do inicial após o tempo de 168 h de fermentação (Figura 13 e Figura 14). Além disso, ocorre o aparecimento de um pico um antes do tempo de retenção de 5 min, com a confirmação de ser o pico referente ao composto ácido cafeico por meio de padrão autêntico. O pico referente ao ácido cafeico partiu de 0 para cerca de 13% da área, portanto, fica claro que durante a incubação com o éster fenético do ácido cafeico (CAPE) o processo fermentativo bacteriano induziu a hidrólise do CAPE.



1 PDA Multi 1/320nm 4nm

Figura 13. CAPE no momento inicial da fermentação (tempo 0).



1 PDA Multi 1/320nm 4nm

Figura 14. Caldo fermentado após 168 h de incubação com CAPE.

Estes resultados revelam que houve biotransformação bacteriana do CAPE, com seu consumo ao longo do tempo. O surgimento do ácido cafeico presume que uma clivagem da ligação éster presente entre o ácido fenético e o ácido cafeico na estrutura do CAPE pode ter ocorrido; pois é conhecido que bactérias presentes neste *blend* probiótico produzem esterases capazes de clivar esta ligação.

Gardana et al. (2012), avaliando a capacidade de *L. helveticus* de eliminar moléculas alergênicas da própolis por meio da diminuição da quantidade de ésteres do ácido cafeico, obtiveram cerca de 50% de conversão de CAPE em outras espécies após a fermentação por 48 h, reduzindo a concentração deste de $34,62 \pm 1,42$ para $26,01 \pm 1,12$ mg/g na própolis. Cabe ressaltar que nas condições de análise aplicadas o álcool fenético não foi visualizado, uma vez que não possui grupamento cromóforo capaz de absorver luz em 320 nm (LEI et al., 2015).

Com relação à fermentação na presença da mangiferina (Figura 15 e Figura 16) observou-se um pico crescente no tempo de 8 minutos de retenção ao longo do tempo de incubação. Embora sem a utilização de um padrão para identificar a substância, o fato de seu crescimento ser acompanhado de um decréscimo de mangiferina suscitou-se a hipótese de que esta substância poderia ser o noratriol, porção aglicosídica do polifenol mangiferina (WU et al., 2011).

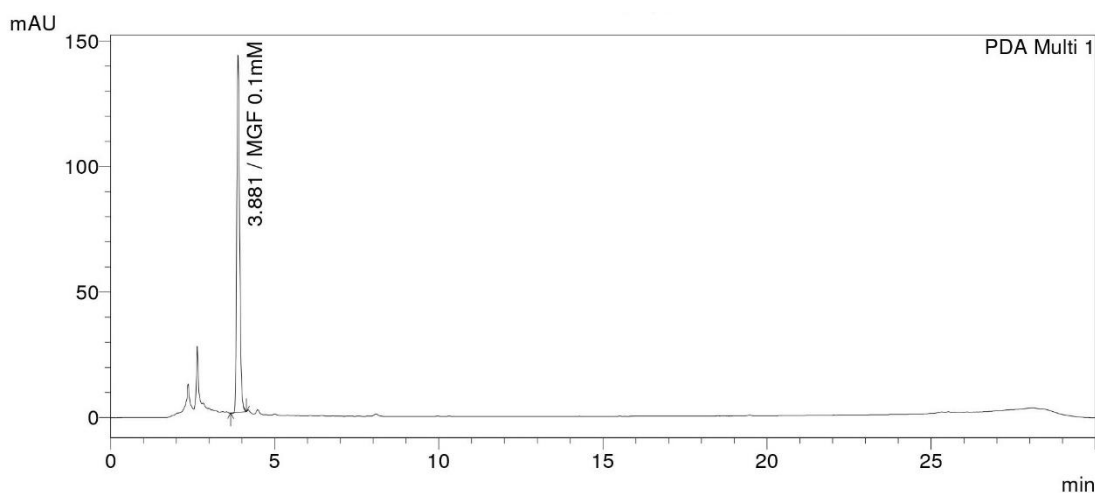


Figura 15. Mangiferina no momento inicial da fermentação (tempo 0).

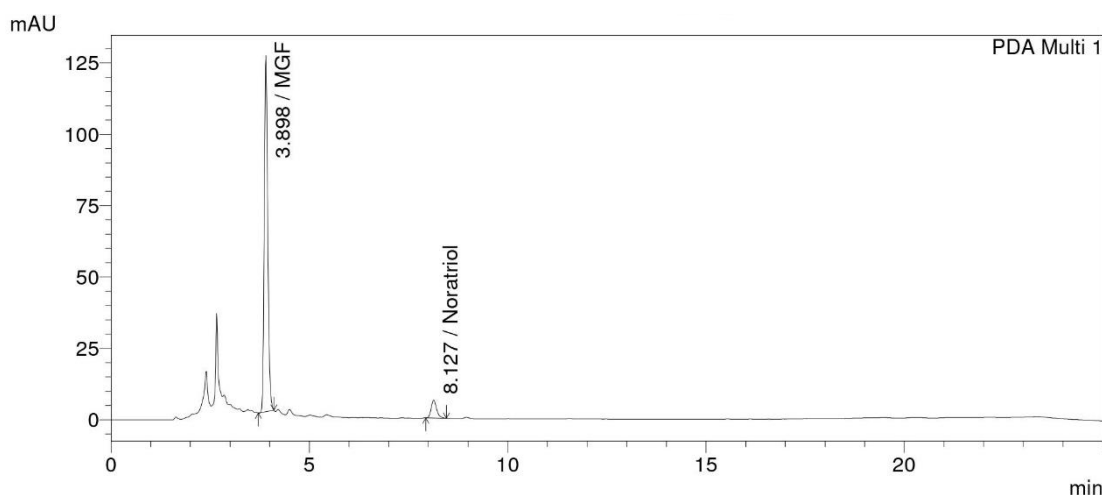


Figura 16. Caldo fermentado após 168 h de incubação com mangiferina.

Os C-glicosídeos são mais resistentes à hidrólise ácida, alcalina e enzimática que os O-glicosídeos, e mesmo a exposição prolongada a ácidos não é capaz de clivar com significativa eficiência a ligação glicosil dos C-glicosídeos, na qual a glicose é ligada por uma ligação carbono-carbono à porção aglicona. No entanto, as bactérias intestinais humanas podem clivar a ligação carbono-carbono em vários C-glicerídeos (SANUGUL et al., 2005; WU et al., 2011). Independente disso, esta possível conversão representa menos de 3% de redução na intensidade de área do pico da mangiferina, de onde presume-se que houve baixa conversão em outras espécies químicas.

Estudos de fermentação colônica em animais encontraram altas taxas de conversão de mangiferina em noratriol e em outros metabólitos como a 1,7-dihidróxioxantona. Entretanto, em nossos resultados não observamos o surgimento desta substância. Sanugul et al. (2005) investigando cepas isoladas, incluindo *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Eubacterium*, *Fusobacterium*, *Gaffkya*, *Klebsiella*, *Lactobacillus*, *Pepto-streptococo*, *Ruminococcus* e *Veillonella*, também não observaram metabolização da mangiferina. O metabolismo de compostos fenólicos é fortemente dependente da composição e de fatores intrínsecos do meio intestinal, por isso resultados obtidos na fermentação intestinal em organismos vivos não são totalmente transferíveis para meios laboratoriais (FILANNINO et al., 2015).

6.2 Citotoxicidade

Substâncias fenólicas naturais estão entre as mais antifúngicas substâncias ativas presentes nos extratos das plantas. Juntamente com sua alta eficácia antifúngica, antibacteriana e inseticida, estas substâncias mostram um efeito tóxico muito baixo em animais. A atividade antifúngica tem relação dose-dependente e também varia conforme a alteração de substituintes no anel fenólico (ZABKA; PAVELA, 2013).

Esta característica poderia ser uma limitação nas análises realizadas utilizando células de levedura como modelo biológico de investigação; portanto, é de crucial importância verificar as concentrações não-citotóxicas destas substâncias nas células da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, visto que essa toxicidade pode variar com a molécula ou extrato e com os micro-organismos empregados como modelo de estudo (WANG et al., 2019).

O ensaio da capacidade metabólica é um método baseado na capacidade das células vivas de converter a substância resazurina (roxo) em resorufina (rosa), sendo um ensaio qualitativo que avalia a partir de qual concentração da substância analisada há inibição metabólica no organismo estudado. A redução celular da resazurina ocorre por meio de enzimas metabólicas localizadas nas mitocôndrias, no citosol e nas frações microssomais (CHEN; STEELE; STUCKEY, 2018). Com isso, este é um método rápido e prático para a determinação da toxicidade a partir da interferência negativa dessas substâncias no metabolismo e na homeostase celulares.

Os resultados apresentados revelaram que a mangiferina não apresentou qualquer citotoxicidade nas concentrações testadas (6,125 a 800 μ M) nas cepas BY4741 (controle) (Figura 17) e em suas mutantes isogênicas Δ *ctt1*, Δ *gsh1* e Δ *sod1* (meio YPD 2%), bem como na cepa que expressa o α -sin (meio SGAL). Já o CAPE

apresentou toxicidade em concentrações maiores que 100 μM nas cepas BY4741, Δctt1 , Δgsh1 e Δsod1 e acima de 50 μM na cepa $\alpha\text{-sin}$.

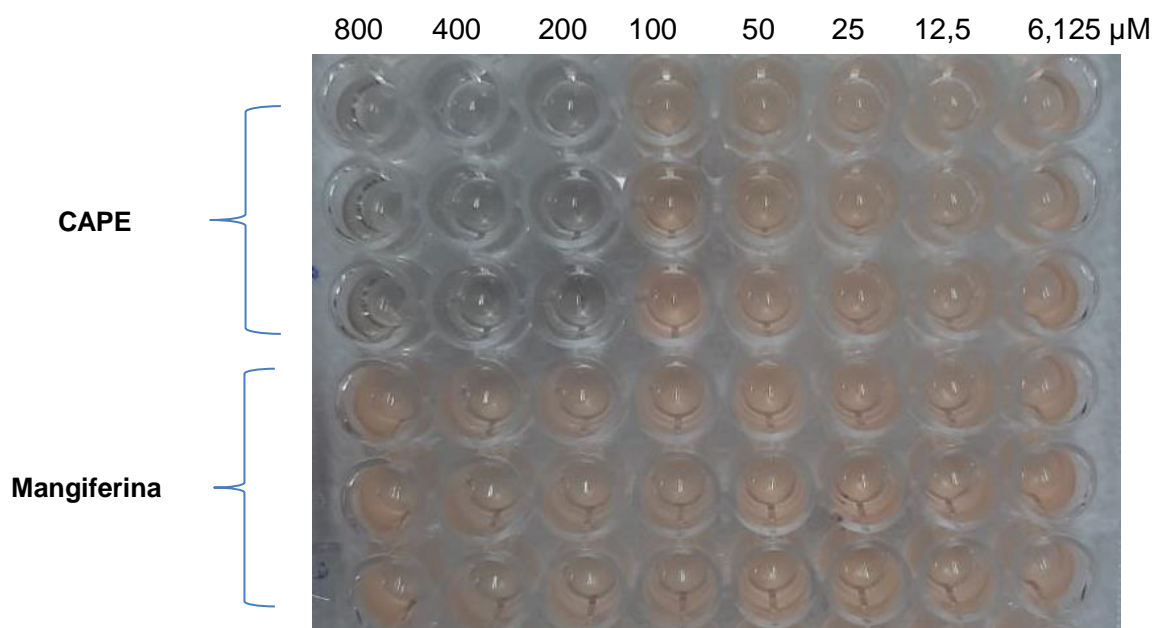


Figura 17. Figura ilustrativa do resultado de citotoxicidade avaliada pelo método da resazurina na cepa BY4741.

A citotoxicidade verificada com o CAPE em *S. cerevisiae* corrobora os resultados de toxicidade encontrados num estudo que utilizou uma cepa de *Candida albicans*, onde o CAPE revelou alto efeito fungicida na concentração de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, equivalente a 282 μM (BREGGER et al., 2007). Mandalari et al. (2007) determinaram que os flavonoides naringenina, naringina, hesperidina, neohesperidina, eriodictiol e neoeriocitrina tiveram ação tóxica em *Saccharomyces cerevisiae* em concentrações a partir de 800 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, indicando que diversas substâncias fenólicas têm baixa toxicidade em elevadas concentrações neste modelo biológico; o que pode ser o caso da tolerância à mangiferina neste estudo. De acordo com nossos resultados, também é mostrado que as células de *S. cerevisiae* são mais sensíveis ao CAPE do que a outras substâncias fenólicas, tais como naringenina, naringina, hesperidina e mangiferina.

6.3 Ação antioxidante

O processo de agregação da proteína alfa-sinucleína pode ser modulado por vários estímulos internos e externos, incluindo oxidantes e toxinas mitocondriais. Esta proteína é altamente susceptível a modificações pós-traducionais induzidas por estresse oxidativo, que causam seu desdobramento e aumenta sua citotoxicidade. Além disso, a alfa-sinucleína oxidada é mais propensa à agregação e quando agregada induz estresse oxidativo, reforçando um papel proeminente deste efeito no início e na progressão da DP (JARDIM et al., 2017). Portanto, a identificação de novos agentes que impeçam a produção das EROs é considerada de particular interesse no estudo dos mecanismos envolvidos na evolução desta doença.

Polifenóis da dieta são conhecidos por sua proteção contra danos oxidativos no organismo como um todo, inclusive no cérebro, sugerindo que eles podem ser modificadores da agregação da alfa-sinucleína (ZHANG et al., 2015). Assim, a possibilidade de mitigar doenças através da aplicação de novos componentes alimentares ou substâncias com propriedades funcionais têm grande relevância para redução do estresse oxidativo e aumento da neuroproteção (MACEDO et al., 2015). Entretanto, compostos fenólicos da dieta são frequentemente metabolizados antes de sua absorção pelo intestino. Estas transformações alteram a bioatividade e podem ser decisivas na atividade antioxidante destas substâncias (JILANI et al., 2015) e, por este motivo, os fenólicos CAPE e mangiferina foram avaliados quanto à sua capacidade de proteger do estresse induzido por peróxido de hidrogênio antes e depois de fermentados pelos probióticos.

6.3.1 Capacidade antioxidante pelo método de DPPH

Diversos estudos tem reportado que a fermentação promove a capacidade antioxidante *in vitro*, ou seja, a capacidade antioxidante é maior após a fermentação principalmente utilizando extratos vegetais (FILANNINO et al., 2015; FRITSCH et al., 2016; HUR et al., 2014; JUNG et al., 2017; MARAZZA et al., 2012; SÁNCHEZ-PATÁN et al., 2012). Outros trabalhos apontam ainda que bactérias probióticas como os lactobacilos possuem grande resistência ao estresse oxidativo (WANG et al., 2014) e são capazes de diminuir o acúmulo de EROs quando as células são ingeridas pelo organismo superior (POURRAMEZAN et al., 2017), o que pode potencializar ainda mais a capacidade antioxidante de fermentados.

Um dos métodos mais comuns para avaliação da capacidade antioxidante consiste no ensaio com o DPPH, onde o radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH•) apresenta coloração púrpura a 515 nm e, quando tem seu radical sequestrado, passa para a forma reduzida de coloração amarela. A mudança de cor é monitorada por espectrofotometria, e com os resultados obtidos determina-se a porcentagem de atividade antioxidante de uma substância. A concentração do antioxidante necessária para diminuir pela metade o DPPH• inicialmente em solução é denominada concentração eficiente (CE₅₀), também chamada de concentração inibitória (CI₅₀) (SOUSA et al., 2007), utilizada como referência para comparar a atividade antioxidante de diferentes substâncias. CAPE e mangiferina foram avaliados quanto ao potencial antioxidante por este método antes e após o processo fermentativo (Tabela 2).

Tabela 2. Valores de CE₅₀ das substâncias puras e após a fermentação. Os resultados representam a média de pelo menos três experimentos independentes. Letras diferentes mostram resultados estatisticamente distintos ($p < 0,05$) na análise de ANOVA seguida de pós teste de Tukey.

Substâncias	CE ₅₀
CAPE (CP)	4,61 ± 0,927 µM ^a
CAPE fermentado (FCP)	3,10 ± 0,689 µM ^b
Mangiferina (MG)	3,53 ± 0,441 µM ^b
Mangiferina fermentada (FMG)	2,91 ± 0,243 µM ^b

Quanto a menor a concentração da amostra necessária para consumir 50% do DPPH•, menor será a sua CE₅₀ e maior a sua atividade antioxidante. De acordo com a Tabela 2, a fermentação promoveu um aumento da capacidade antioxidante do CAPE, visto que o valor de CE₅₀ foi reduzido em cerca de 32% em relação ao CAPE não fermentado. Este incremento pode estar relacionado com a geração do ácido cafeico durante o processo fermentativo (Figura 14), onde é observado a conversão de CAPE em seu precursor ácido cafeico. A presença dessas duas espécies pode estar relacionada a uma potencialização no sequestro do radical DPPH•, visto que o ácido cafeico também tem elevada capacidade antioxidante (SINGAB et al., 2018); além do que este fato corrobora outros estudos onde revelaram que a fermentação produz variedades de espécies que contribuem para a atividade antioxidante (BEL-RHLID et al., 2013; KALKAN YILDIRIM et al., 2018).

A capacidade antioxidante da mangiferina não sofreu alteração com a fermentação segundo a análise estatística, o que é coerente com a avaliação do perfil fenólico, onde também não foi verificada biotransformação significativa (Figura 16). O valor de CE₅₀ encontrado para o CAPE neste trabalho ($4,608 \pm 0,927 \mu\text{M}$) assemelha-se com dados encontrados na literatura, com valores de $4,27 \mu\text{M} \pm 0,10$ (WU et al., 2007) e $3,3 \mu\text{M}$ (GÖÇER; GÜLÇİN, 2011). Já com relação à mangiferina, o valor de CE₅₀ encontrado neste trabalho ($3,527 \pm 0,441 \mu\text{M}$) aponta uma capacidade antioxidante superior em mais de 10 vezes ao encontrado na literatura $18,50 \pm 0,18 \text{ mg.mL}^{-1}$, equivalente a $43,38 \mu\text{M}$ (SETHIYA; MISHRA, 2014).

6.3.2 Viabilidade celular

Várias razões tornam a levedura *S. cerevisiae* um dos melhores modelos eucarióticos para se estudar o estresse oxidativo, pois seu metabolismo energético, envolvendo defesas antioxidantes e a síntese de biomoléculas, entre outros é semelhante ao dos eucariotos superiores, que possuem mecanismos próprios de ativação metabólica e que estão ausentes nas bactérias. Além disso, ensaios com células de *S. cerevisiae* permitem avaliar a atividade antioxidante de várias substâncias de maneira rápida, econômica e reprodutível em comparação com células de mamíferos (PIOVEZAN-BORGES et al., 2016). O ensaio de viabilidade celular visa verificar a influência dos tratamentos no aumento da tolerância ao estresse provocado pelo peróxido de hidrogênio. Diferente de um ensaio de capacidade antioxidante *in vitro*, como o DPPH, a viabilidade celular utiliza um organismo vivo unicelular para verificar o impacto do tratamento na sobrevivência das células (MENDES et al., 2015). Com isso, diversos mecanismos celulares podem estar envolvidos na proteção celular, como a indução de sistemas de defesa endógenos, a ação protetora direta no interior da célula e até a toxicidade de substâncias exógenas que ativam sistemas de defesa frente a oxidantes agressivos (MENG et al., 2017).

A presença de substâncias no meio externo da célula, ainda que não captadas pela levedura, pode influenciar em mecanismos de sinalização que levam a um aumento na atividade do sistema antioxidante. Embora a captação das substâncias não tenha sido avaliada neste trabalho, as células foram centrifugadas e lavadas de forma a reduzir significativamente a concentração de substâncias antioxidantes extracelulares, evitando sua interferência na ação direta com o agente oxidante (H₂O₂) promotor do estresse oxidativo intracelular. Previamente à análise antioxidante, avaliou-se a toxicidade dos metabólitos microbianos oriundos da fermentação nas leveduras, bem como o meio no qual as células estariam expostas à ação oxidativa

pelo peróxido, comparando-se a sobrevivência das células expostas ao peróxido de hidrogênio na concentração de 2,0 mM em tampão fosfato de sódio na concentração de 50 mM e pH 6,0 (T), no meio mínimo puro (MM) e no meio mínimo após a fermentação microbiana (MMF) por 1 h (Figura 18).

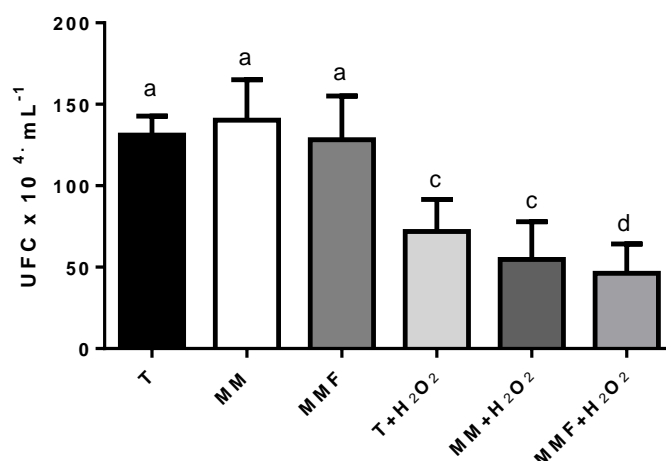


Figura 18. Comparativo da toxicidade dos meios de cultivo utilizados na incubação com H₂O₂. (T) Tampão, (MM) meio mínimo, (MMF) meio mínimo fermentado, (+H₂O₂) tratamento posterior com peróxido de hidrogênio 2,0 mM por 1 h. Os resultados representam a média de pelo menos três experimentos independentes. Letras diferentes mostram resultados estatisticamente distintos ($p < 0,05$) na análise de ANOVA seguida de pós teste de Tukey.

A sobrevivência das leveduras é semelhante estatisticamente quando mantidas em T, MM e MMF por 1 hora. Este resultado revelou que o processo fermentativo somente em meio de cultura não gerou substâncias capazes de diminuir a viabilidade das células de levedura. Contudo, quando as células foram pós-incubadas com o peróxido de hidrogênio houve redução de 45,8% da viabilidade no tratamento com tampão fosfato de sódio (PBS), sendo também possível detectar uma distinção de toxidez entre os tratamentos, visto que MMF apresentou maior toxicidade (redução de 64%). Este resultado aponta que os metabólitos microbianos presentes, quando na presença do H₂O₂, apresentaram um pequeno aumento de citotoxicidade em comparação com a condição em que as células foram mantidas em tampão e em meio mínimo.

O metabolismo bacteriano gera diversos ácidos orgânicos, como ácidos láctico, acético, fórmico, caproico, propiônico, butírico e valérico; além de outras substâncias inibidoras do metabolismo microbiano, como o H₂O₂, CO₂, diacetil e bacteriocinas (ZALÁN et al., 2010). Com isso, à produção de alguns desses compostos pode somar-se ao peróxido de hidrogênio aumentando os produtos tóxicos à levedura, levando a diminuição da viabilidade das células em meio mínimo fermentado submetidas ao estresse por peróxido de hidrogênio (MMF + H₂O₂). O peróxido de hidrogênio, embora não seja um radical livre, penetra nas células da levedura *S. cerevisiae* por meio de canais de transporte de água através das proteínas aquaporinas, e no meio celular podem reagir com as macromoléculas oxidando-as.

Além disso, em presença de íons Fe^{2+} ou Cu^{2+} o peróxido de hidrogênio pode originar o radical superóxido via reação de Fenton, sendo altamente reativo e prejudicial à homeostase intracelular (BIENERT; SCHJOERRING; JAHN, 2006). Diversos estudos utilizam o peróxido de hidrogênio em concentrações variadas (0,5 a 20 mM) como agente indutor de estresse oxidativo (BAYLIAK; BURDYLYUK; LUSHCHAK, 2016; BELINHA et al., 2007; DA SILVA et al., 2012; FRASSINETTI et al., 2012; MANFREDINI et al., 2004; PIOVEZAN-BORGES et al., 2016; SÁ et al., 2013; WANG et al., 2018).

A fim de avaliar a atividade antioxidante das substâncias fenólicas puras ou fermentadas pelas bactérias em células de *S. cerevisiae*, minimizando a interferência dos metabólitos microbianos sobre a diminuição da viabilidade celular e avaliando a influência da fermentação sobre o potencial antioxidante dos fenólicos; os tratamentos com CAPE e mangiferina, ambos na concentração de 0,1 mM, foram realizados em células lavadas e ressuspensas em MMF. Como controle de células não estressadas utilizou-se células ressuspensas em MMF sem nenhum tratamento posterior e, como controle estressado, células ressuspensas em MMF e tratadas com peróxido de hidrogênio (2,0 mM) por 1 h (Figura 18).

O uso do MMF fez-se necessário com o intuito de equalizar o ambiente celular no tratamento com os fenólicos. Isto deve-se ao fato de que as células tratadas com o MMF teriam um meio de cultivo com os metabólitos resultantes do metabolismo bacteriano, ao passo que se as tratássemos com as substâncias puras ressuspensas em tampão fosfato de sódio (50 mM) ou com o meio mínimo não fermentado teríamos um resultado que não avaliaria a influência dos metabólitos produzidos durante o processo fermentativo; que são importantes para a avaliação específica destes resultados e estão em sintonia com os objetivos deste estudo.

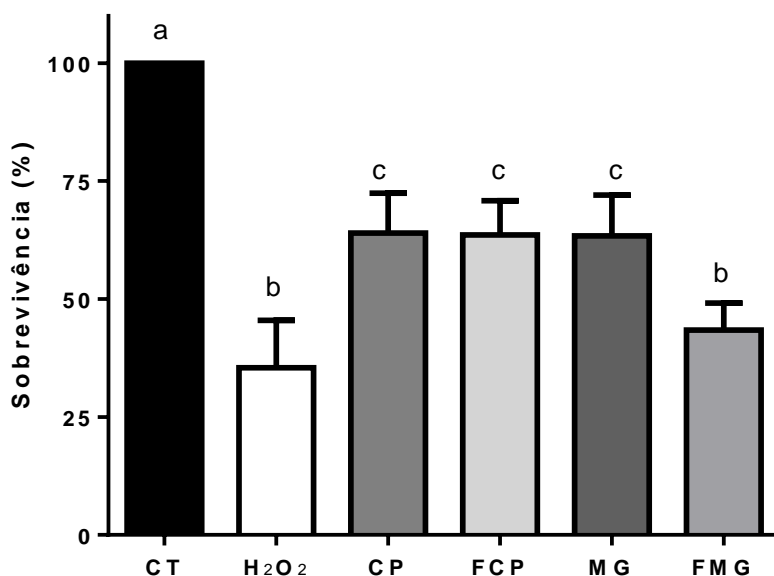


Figura 19. Viabilidade celular na cepa BY4741 com células tratadas com CAPE a 0,1 mM (CP) e CAPE 0,1 mM após 168 h de fermentação microbiana (FCP); mangiferina 0,1 mM (MF) e mangiferina 0,1 mM após 168 h de fermentação microbiana (FMG). Todos os tratamentos foram pós-incubados por 1 h com peróxido de hidrogênio (2,0 mM). CT representa as células sem tratamento usadas como referência. Os resultados representam a média de pelo menos três experimentos independentes. Letras diferentes mostram resultados estatisticamente distintos ($p < 0,05$) na análise de ANOVA *one way* seguida de pós teste de Tukey.

As células utilizadas para o ensaio antioxidante encontravam-se na 1ª fase exponencial de crescimento, onde apresentam maior sensibilidade ao estresse oxidativo (PEREIRA; ELEUTHERIO; PANEK, 2001). Quando avaliada na cepa BY4741, isto é, células da levedura contendo integridade genômica dos sistemas de defesa antioxidantes, obteve-se que o tratamento com o peróxido reduziu a viabilidade celular em cerca de 65% do tratamento controle. Já a sobrevivência das células estressadas aumentou em 30% quando pré-tratadas com CAPE, mangiferina e o CAPE fermentado em comparação com as células sob estresse, o que demonstra proteção às células de levedura contra os danos oxidativos induzidos por peróxido de hidrogênio (Figura 19).

O tratamento com a mangiferina fermentada (FMG) não promoveu aumento de tolerância ao estresse, mantendo a sobrevivência em $43,4 \pm 5,73\%$ semelhante ao controle sob estresse ($35,5 \pm 10,1\%$). Por outro lado, a mangiferina pura (MG) promoveu tolerância ao estresse por peróxido, atingindo $63,4 \pm 8,63\%$ de viabilidade celular. Este resultado sugere que houve perda de atividade protetora com a fermentação, o que é curioso quando trata-se de uma substância fenólica, visto que a conversão de mangiferina em outras espécies foi considerada baixa (Figura 16).

Já a substância CAPE não teve sua atividade antioxidante alterada com a fermentação, obtendo cerca de 70% de células viáveis mesmo após o estresse com o peróxido de hidrogênio. Isto indica que mesmo ocorrendo o consumo de CAPE durante a fermentação, os metabólitos gerados nesta biotransformação não comprometeram os resultados da atividade antioxidante durante a exposição ao CAPE puro. Isto é bastante relevante do ponto de vista das propriedades biológicas das substâncias ingeridas, uma vez que a biotransformação pode manter e por vezes aumentar a atividade antioxidante relacionada a estas substâncias.

Alguns estudos mostram um aumento da capacidade antioxidante após a fermentação de matrizes vegetais (FILANNINO et al., 2015; FRITSCH et al., 2016; JUNG et al., 2017; MARAZZA et al., 2012; SÁNCHEZ-PATÁN et al., 2012), o que não obtivemos com a fermentação das substâncias CAPE e mangiferina. Estes estudos que observaram aumento de capacidade antioxidante utilizaram uma mistura complexa de polifenóis, e justamente o aumento da diversidade de substâncias por meio de hidrólises ocorridas na fermentação está associado ao aumento da capacidade antioxidante dos produtos destes fermentados (HUR et al., 2014). É possível que o uso de substâncias isoladas tenha minimizado este efeito sinérgico responsável por promover uma maior atividade antioxidante, visto que isto é um dos principais fatores para um incremento da atividade antioxidante quando utiliza-se extratos de matrizes vegetais (JARDIM et al., 2017); além disso, a metabolização é dependente da cepa e das condições fermentativas. Um outro ponto a ser destacado é que os metabólitos bacterianos apresentaram maior caráter tóxico quando as células foram tratadas com o peróxido de hidrogênio (Figura 18), influenciando diretamente na análise do potencial antioxidante dos fermentados sobre as células.

Este resultado difere da avaliação antioxidante com o DPPH, onde os valores de CE_{50} entre CP e FCP foram diferentes, enquanto FCP, MG e FMG foram estatisticamente semelhantes entre si (Tabela 2). Essa discrepância pode ser explicada pelo fato de que os ensaios em levedura consideram um enorme número de interações e respostas celulares não avaliadas em ensaios *in vitro* (MENG et al., 2017). Esta diferença na interpretação entre os ensaios é verificada em outros autores

e essa observação reforça a ideia de que outros mecanismos, além da atividade de eliminação dos radicais livres, podem estar envolvidos na proteção intracelular mediada por polifenóis (MACEDO et al., 2015).

Nas células heterotróficas as mitocôndrias são as principais geradoras de EROs, visto que uma pequena parcela dos elétrons escapa da cadeia respiratória nos complexos levando à produção de $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 e OH^{\cdot} (LUSHCHAK, 2014). No entanto seres eucariotos possuem alta capacidade de acionar mecanismos de defesa antioxidantes capazes de prevenir o acúmulo de EROs e o estresse oxidativo extremo. Três enzimas destacam-se no sistema de defesa antioxidante enzimático, tanto em mamíferos quanto na levedura *S. cerevisiae*: catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e o sistema glutaciona peroxidase (GPX)/redutase (GR) reciclando a glutaciona (GSH) (Figura 20) (BARBOSA et al., 2010; BIRBEN et al., 2012).

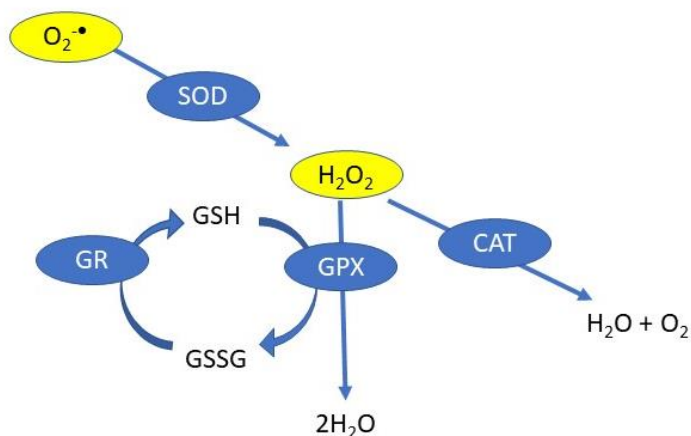


Figura 20. Enzimas do sistema de defesa antioxidante. Superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutaciona peroxidase (GPX), glutaciona redutase (GR), glutaciona reduzida (GSH) e glutaciona oxidada (GSSG).

A enzima superóxido dismutase (SOD) age sobre o radical superóxido, convertendo-o em peróxido de hidrogênio. Este é substrato da enzima catalase (CAT), que o converte em água e oxigênio. Esta mesma conversão é obtida pelo ciclo da glutaciona, que por ação da enzima glutaciona peroxidase (GPX) o tripeptídeo glutaciona (GSH) é oxidado (GSSG). A enzima glutaciona redutase (GR) regenera o GSH com poder redutor (BIRBEN et al., 2012).

As células de *S. cerevisiae* possuem uma Cu,Zn-superóxido dismutase citosólica (Sod1p), que também está presente no espaço intermembranar mitocondrial e em outros compartimentos celulares; e uma Mn-superóxido dismutase (Sod2p), localizada na matriz mitocondrial. Quanto à catalase, existe uma forma citosólica (Ctt1p) e uma catalase peroxisomal (Cta1p).

O tripeptídeo glutamato-cisteína-glicina (GSH) é sintetizado pela ação da γ - Glutamilcisteína sintetase (Gsh1p) e da glutaciona sintetase (Gsh2p). A Gsh1p catalisa a condensação da cisteína ao carbono gama do glutamato na etapa limitante dessa via biossintética, enquanto a Gsh2p forma GSH pela adição da glicina. O resíduo de cisteína é o responsável pelas propriedades redutoras do GSH, pois possui um

potencial de redução muito baixo (-240 mV) em comparação com outras cisteínas presentes em biomoléculas, o que permite doar seus elétrons como hidrogênio radicalar reduzindo espécies oxidantes. Uma vez oxidado, o GSH dimeriza-se no dissulfeto GSSG, que é reduzido de volta a GSH pela glutathione redutase (Glr1p) dependente de NADPH ligada a FAD (TOLEDANO et al., 2003). Outras enzimas como tioredoxinas e glutaredorinas também possuem ação redox nas células desta levedura, ainda que em menor grau. Neste trabalho foram avaliados o potencial antioxidante das substâncias puras e fermentadas em cepas desta levedura deficientes nas enzimas catalase ($\Delta ctt1$), superóxido dismutase ($\Delta sod1$) e no tripeptídeo glutathione ($\Delta gsh1$).

Pesquisas anteriores apontam que uma substância antioxidante pode estar associada ao mecanismo de proteção nas células de levedura quando parte de sua ação protetora numa cepa deficiente em um sistema antioxidante específico é diminuída, permanecendo inalterada quando exposta a uma cepa com o genoma completo (WANG et al., 2018). Portanto, as cepas mutantes $\Delta sod1$, $\Delta ctt1$ e $\Delta gsh1$ foram empregadas neste estudo para determinar se as enzimas superóxido dismutase e catalase citosólicas ou o tripeptídeo glutathione estão conectados ao mecanismo de aquisição de tolerância nas condições dos ensaios com as substâncias fenólicas puras ou fermentadas (FERNANDES et al., 2007; WANG et al., 2018).

Após a pré-incubação com os fenólicos puros ou fermentados, nenhum dos pré-tratamentos aos quais as cepas $\Delta ctt1$, $\Delta gsh1$ e $\Delta sod1$ foram expostas promoveu aumento de sobrevivência após o estresse oxidativo (Figura 21 a Figura 23). Estes resultados sugerem que a catalase citosólica, a glutathione e a superóxido dismutase citosólica podem estar envolvidas na proteção antioxidante proporcionada pelo CAPE e pela mangiferina, como afirmam autores que investigaram o mecanismo de deleção de genes (GAO et al., 2019; WANG et al., 2018).

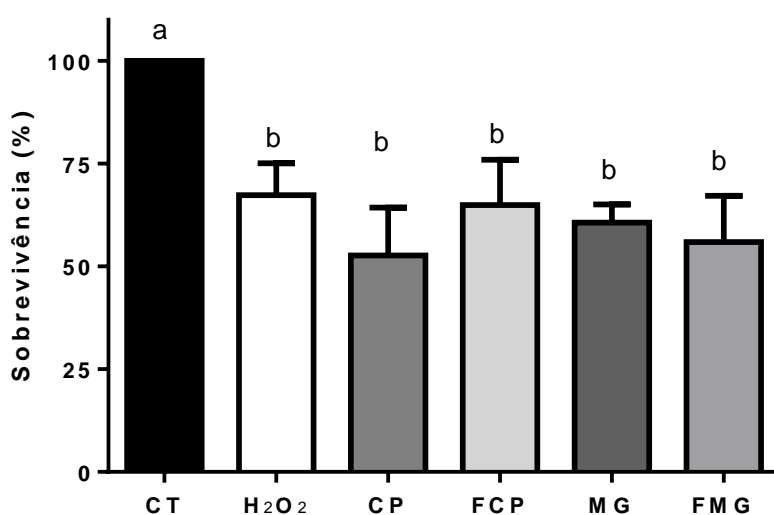


Figura 21. Viabilidade celular na cepa mutante $\Delta ctt1$ com células tratadas com CAPE a 0,1 mM (CP) e CAPE 0,1 mM após 168 h de fermentação microbiana (FCP); mangiferina 0,1 mM (MF) e mangiferina 0,1 mM após 168 h de fermentação microbiana (FMG). Todos os tratamentos foram pós-incubados por 1 h com peróxido de hidrogênio (2,0 mM). CT representa as células sem tratamento usadas como referência. Os resultados representam a média de pelo menos três experimentos independentes. Letras diferentes mostram resultados estatisticamente distintos ($p < 0,05$) na análise de ANOVA *one way* seguida de pós teste de Tukey.

Curiosamente verificou-se que a cepa mutante deficiente na catalase ($\Delta ctt1$) (Figura 21) adquiriu uma tolerância ao estresse por peróxido maior que a cepa BY4741, mantendo $67,3 \pm 7,80\%$ de sobrevivência frente a $35,4 \pm 10,1\%$ da cepa controle. Embora isto contrarie a expectativa de que uma cepa mutante é mais sensível ao estresse, este resultado pode ser correlacionado com a superexpressão de outros sistemas antioxidantes remanescentes como compensação de uma deficiência em um sistema antioxidante específico (GAO et al., 2019; WANG et al., 2018). Mecanismos antioxidantes da superóxido dismutase e da glutatona, bem como de outros inúmeros mecanismos antioxidantes, poderiam ter compensado a ausência de catalase nestas células. França; Panek; Eleutherio (2005) verificaram que em células deficientes em Ctt1p sob estresse hídrico a taxa de glutatona reduzida por glutatona oxidada (GSH:GSSG) foi superior à de uma cepa controle; indicando um mecanismo compensatório de defesa em resposta à desidratação.

Já no caso da cepa $\Delta gsh1$ (Figura 22) os sistemas de defesa remanescentes não foram efetivos em aumentar a tolerância ao estresse, uma vez que a sobrevivência das células estressadas apresentou apenas $18,9 \pm 4,10\%$ de sobrevivência, contrastando com $35,4 \pm 10,1\%$ de sobrevivência na cepa BY4741 (Figura 19). Isto sugere que o tripeptídeo glutatona tem um papel relevante na proteção celular deste modelo biológico neste experimento. Maris et al. (2001) mostraram que o GSH é uma defesa fundamental no mecanismo da resistência contra a exposição a H_2O_2 em leveduras em crescimento exponencial. Michiels et al. (1994) relataram que a GPx (glutatona peroxidase) tem maior afinidade por H_2O_2 do que a catalase, sugerindo que este é essencialmente degradado pela GPx em condições normais.

Nem sempre a falta de um sistema antioxidante é compensada por uma maior expressão ou atividade dos sistemas remanescentes. Na cepa $\Delta gsh1$, a atividade da catalase não é esperada neste contexto de proteção, visto que o crescimento celular está na fase exponencial fermentativa e, portanto, há baixa expressão de *CTT1*. Esse gene é induzido em uma extensão apreciável após a transição diáuxica, que ocorre quando o meio exaure os conteúdos de carbono para a fermentação e inicia a síntese de proteínas e enzimas para o metabolismo respiratório (FERNANDES et al., 2007; ROEHRS et al., 2010). Ainda na cepa $\Delta gsh1$, o fermentado de mangiferina mostrou-se mais tóxico do que o estresse direto com peróxido de hidrogênio. Este perfil converge com o resultado encontrado na cepa controle, onde a mangiferina perdeu sua atividade antioxidante após a fermentação. Como a atividade antioxidante resultante da incubação com a mangiferina observada na cepa com genoma completo foi perdida na mutante $\Delta gsh1$, conclui-se que a atividade antioxidante deste tratamento é dependente de *GSH1*.

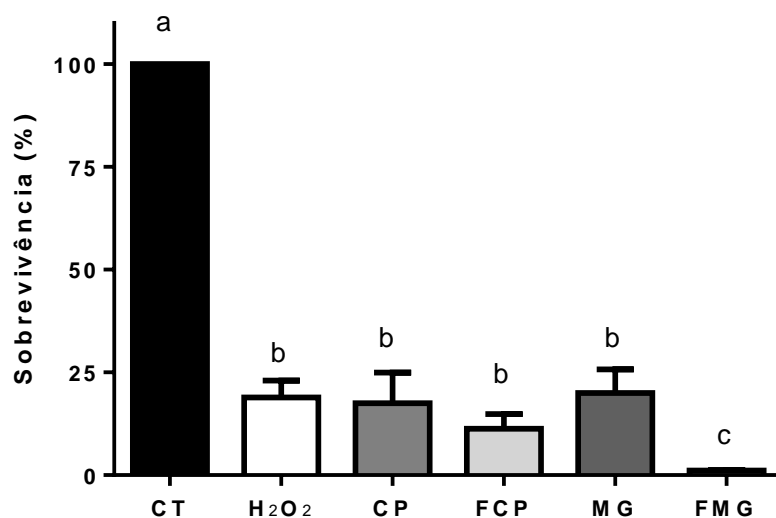


Figura 22. Viabilidade celular na cepa mutante $\Delta gsh1$ com células tratadas com CAPE a 0,1 mM (CP) e CAPE 0,1 mM após 168 h de fermentação microbiana (FCP); mangiferina 0,1 mM (MF) e mangiferina 0,1 mM após 168 h de fermentação microbiana (FMG). Todos os tratamentos foram pós-incubados por 1 h com peróxido de hidrogênio (2,0 mM). CT representa as células sem tratamento usadas como referência. Os resultados representam a média de pelo menos três experimentos independentes. Letras diferentes mostram resultados estatisticamente distintos ($p < 0,05$) na análise de ANOVA *one way* seguida de pós teste de Tukey.

A cepa deficiente em *SOD1* ($\Delta sod1$) apresentou perfil diferenciado (Figura 23), visto que o CAPE apresentou sua maior toxicidade aliada ao estresse oxidativo; o que não foi observado em nenhuma das demais cepas. Conclui-se, portanto, comparando-se com os outros resultados, que a ausência de *SOD1* não foi compensada pela ação dos outros sistemas de defesa remanescentes. Cabe lembrar que o radical $O_2^{\cdot-}$ pode reagir com o H_2O_2 , utilizado neste estudo como indutor do estresse oxidativo; gerando via reação de Harber-Weiss o radical hidroxila (OH^{\cdot}), que é um radical altamente nocivo para os organismos vivos (JILANI et al., 2016).

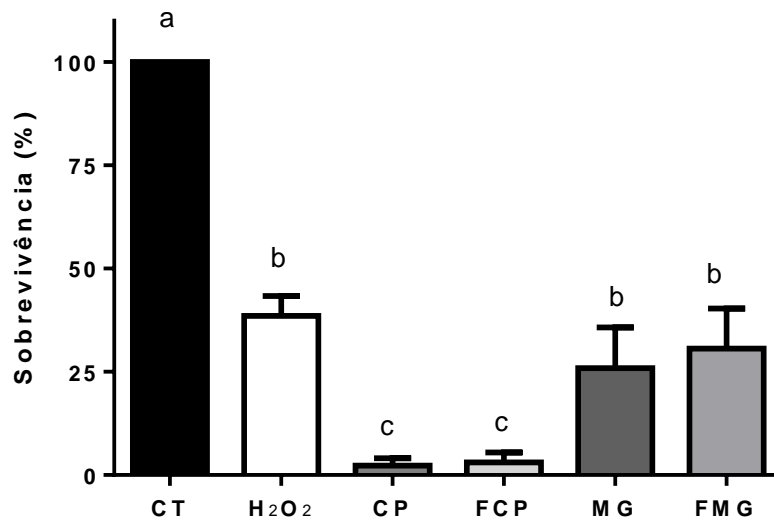


Figura 23. Viabilidade celular na cepa $\Delta sod1$ com células tratadas com CAPE a 0,1 mM (CP) e CAPE 0,1 mM após 168 h de fermentação microbiana (FCP); mangiferina 0,1 mM (MF) e mangiferina 0,1 mM após 168 h de fermentação microbiana (FMG). Todos os tratamentos foram pós-incubados por 1 h com peróxido de hidrogênio (2,0 mM). CT representa as células sem tratamento usadas como referência. Os resultados representam a média de pelo menos três experimentos independentes. Letras diferentes mostram resultados estatisticamente distintos ($p < 0,05$) na análise de ANOVA *one way* seguida de pós teste de Tukey.

É possível que o tratamento com o CAPE aumente a produção do radical ânion superóxido e isso leve a uma maior citotoxicidade deste composto na ausência do gene *SOD1*. Jardim et al. (2017) também sugerem o aumento dos níveis do ânion radical superóxido como um evento chave no efeito protetor de fenólicos oriundos de folhas de *A. unedo* (medronheiro). O extrato confere às células uma espécie de mecanismo de adaptação, que permite uma ativação das defesas para uma posterior exposição ao estresse severo. A possível indução de espécies reativas por CAPE converge com sua maior toxicidade observada no ensaio qualitativo de capacidade metabólica por resazurina (Figura 17), podendo ser a explicação para sua maior toxicidade.

Outros trabalhos mostram a importância da enzima superóxido dismutase na atividade antioxidante de substâncias. Roehrs et al. (2010) descreveram em seus estudos que esta enzima é importante para a proteção celular contra o estresse oxidativo induzido por uma substância incluída no grupo das vitaminas. Seus estudos mostraram que a cepa $\Delta sod1$ apresentava tolerância reduzida para o tratamento com vitamina A quando comparada com uma cepa controle. Frassinetti et al. (2012), avaliando a atividade antioxidante de Lisosan G, observaram que não era observado efeito protetor nas células da cepa deletada no gene *SOD1*; sugerindo que o extrato de Lisosan G (pó produzido a partir da fermentação de *Triticum aestivum*, um tipo de trigo) na presença da enzima superóxido dismutase auxilia na proteção às células sob estresse oxidativo.

6.3.3 Oxidação intracelular

A oxidação intracelular foi estimada usando-se a substância diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (H₂DCFDA), capaz de ser oxidada pelo ambiente intracelular gerando um produto fluorescente. Esta sonda fluorescente é administrada como diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (H₂DCFDA), que penetra facilmente na membrana plasmática e é hidrolisada no interior das células por esterases inespecíficas. No ambiente intracelular a 2',7'-diclorofluoresceína não fluorescente (H₂DCF) é oxidada a 2',7'-diclorofluorescência (DCF) fluorescente, que é então determinada fluorimetricamente em comprimento de onda específico. Estudos anteriores já estabeleceram que a DCF permeia as membranas celulares, neste caso, a quantificação da fluorescência extracelular da DCF é válida para detecção do ambiente oxidante no interior das células (JAKUBOWSKI; BARTOSZ, 1997).

Quando a oxidação intracelular foi avaliada na cepa BY4741, observou-se que antes da exposição ao estresse por peróxido de hidrogênio os tratamentos apresentaram níveis de oxidação intracelular semelhantes às células incubadas em meio mínimo fermentado (MMF) e também em tampão PBS (T), indicando que em nenhum tratamento prévio houve aumento do ambiente oxidante intracelular (Figura 24). Isto corrobora o ensaio com resazurina (Figura 17), revelando que as concentrações utilizadas não induzem citotoxicidade para as células e, provavelmente, pouco interferem no ambiente redox intracelular.

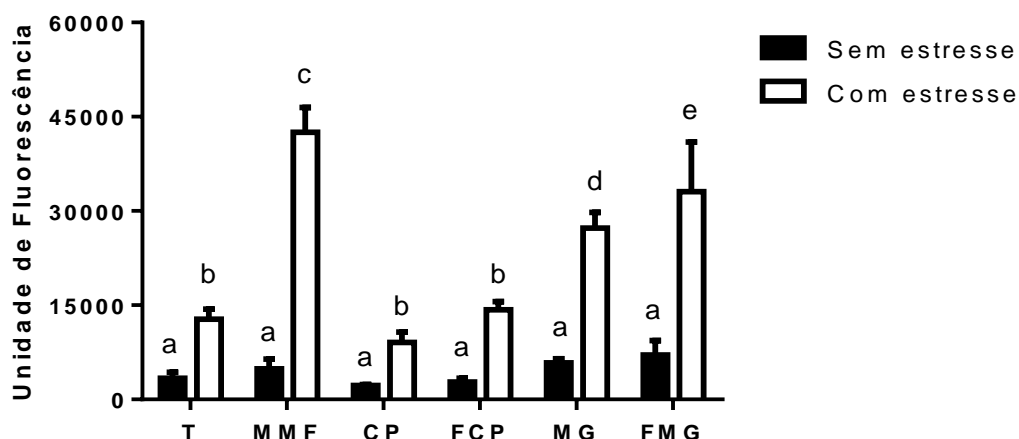


Figura 24. Níveis de oxidação intracelular avaliados na cepa BY4741. As células foram tratadas com tampão PBS (T) e com o meio mínimo fermentado (MMF); CAPE a 0,1 mM em MMF (CP) e CAPE 0,1 mM após 168 h de fermentação microbiana (FCP); mangiferina 0,1 mM em MMF (FMG) e mangiferina a 0,1 mM após 168 h de fermentação microbiana (FMG). Tratamentos sem estresse (barras pretas) e tratamentos sob estresse por 1 h com peróxido de hidrogênio 2,0 mM (barras brancas). Os resultados representam a média de pelo menos três experimentos independentes. Letras diferentes mostram resultados estatisticamente distintos ($p < 0,05$) na análise de ANOVA *two way* seguida de pós teste de Tukey.

Nas células previamente tratadas com MMF e depois submetidas ao estresse, o nível de oxidação intracelular aumentou em 8,7 vezes, alcançando 42.523 ± 3.950 unidades de fluorescência (UF). A adição de peróxido em MMF elevou consideravelmente a oxidação intracelular, embora seja observado apenas um pequeno aumento de letalidade no ensaio de viabilidade celular (Figura 18). Comparando-se com as células em tampão, a adição de peróxido aumentou a

fluorescência em 3,8 vezes quando comparada com a ausência de estresse, atingindo 12.761 ± 1.625 (UF), um efeito de oxidação menos pronunciado do que o verificado em MMF. É possível que substâncias oriundas do metabolismo microbiano presentes em MMF estejam promovendo estresse oxidativo nas células de levedura.

Os pré-tratamentos com as substâncias fenólicas foram realizados em matrizes contendo MMF de forma a ter um ambiente extracelular semelhante entre os tratamentos para fins comparativos. Com a posterior incubação com peróxido de hidrogênio, um tratamento foi considerado antioxidante quando a leitura de unidades de fluorescência foi inferior ao encontrado de MMF sob estresse.

Quando na presença de CP e FCP, as células adicionadas de peróxido de hidrogênio tiveram incremento de oxidação muito menos pronunciados do que em MMF, obtendo 9.092 ± 1.650 e 14.272 ± 1.305 UF; reduções de 78% e 66%, respectivamente. Estes resultados mostram que tanto CP quanto FCP tiveram ação antioxidante e este resultado corrobora com o encontrado no ensaio de viabilidade celular, onde CP e FCP promoveram aumento da viabilidade celular após estresse oxidativo (Figura 19). A mangiferina pura (MG), embora tenha tido ação antioxidante semelhante a CP e FCP na viabilidade celular, reduziu a oxidação intracelular em 35% em comparação a MMF, enquanto o tratamento com FMG manteve baixa atividade antioxidante nos dois ensaios citados. Com o objetivo de avaliar a oxidação em cepas mutantes; e, portanto, teoricamente com um nível de oxidação intracelular maior com a exposição ao agente oxidante peróxido de hidrogênio, o mesmo estudo foi realizado nas cepas $\Delta gsh1$, $\Delta ctt1$ e $\Delta sod1$ (Figura 25 a Figura 27).

Antes da adição de peróxido, todos os tratamentos foram semelhantes estatisticamente na cepa $\Delta ctt1$ em relação aos níveis de fluorescência observados (Figura 25). Após o estresse por peróxido de hidrogênio, houve um incremento de 94% na oxidação intracelular no tratamento com MMF. Já o tratamento com CP foi efetivamente antioxidante, visto que a oxidação foi de 30.244 ± 2.019 em MMF para 15.177 ± 3.633 em CP, ou seja, uma redução de 50% na fluorescência. Os tratamentos com MG e FMG tiveram efeito contrário, aumentando a oxidação intracelular em 48% e 74%, respectivamente, comparada a MMF sob estresse. Na viabilidade celular todos os tratamentos na cepa $\Delta ctt1$ apresentaram sobrevivência semelhante, entretanto no ensaio de oxidação intracelular MG e FMG foram significativamente mais tóxicos com a adição de peróxido. Além disso, cabe ressaltar que o tratamento com FCP não apresentou atividade antioxidante.

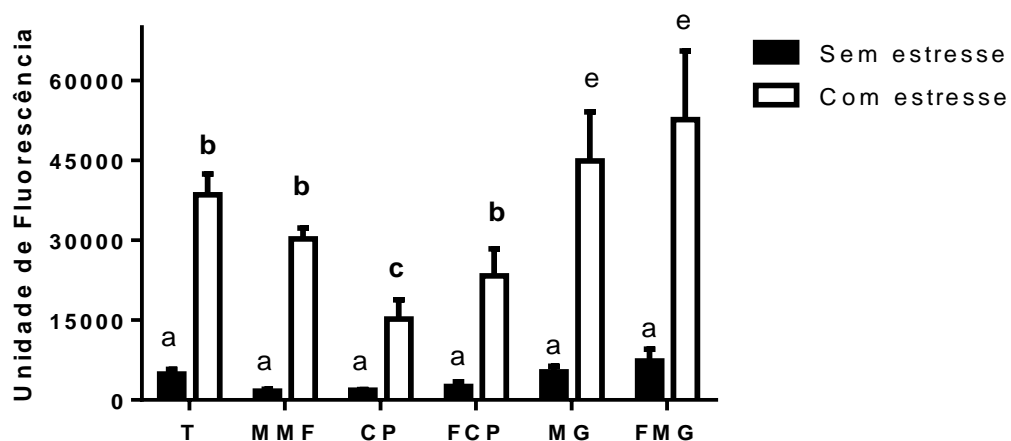


Figura 25. Níveis de oxidação intracelular avaliados na cepa $\Delta ctt1$. As células foram tratadas com tampão PBS (T) e com o meio mínimo fermentado (MMF); CAPE a 0,1 mM em MMF (CP) e CAPE 0,1 mM após 168 h de fermentação microbiana (FCP); mangiferina 0,1 mM em MMF (FMG) e mangiferina a 0,1 mM após 168 h de fermentação microbiana (FMG). Tratamentos sem estresse (barras pretas) e tratamentos sob estresse por 1 h com peróxido de hidrogênio 2,0 mM (barras brancas). Os resultados representam a média de pelo menos três experimentos independentes. Letras diferentes mostram resultados estatisticamente distintos ($p < 0,05$) na análise de ANOVA *two way* seguida de pós teste de Tukey.

Na cepa $\Delta gsh1$ (Figura 26), a adição de peróxido elevou a oxidação intracelular de 2.003 ± 213 UF para 42.473 ± 6.250 UF nas células pré-incubadas com MMF. Os tratamentos com CP e FCP tiveram ação antioxidante significativa, reduzindo a oxidação intracelular em 82% e 68%, respectivamente; já o tratamento com MG reduziu em 41% e com FMG em 24%. Vale ressaltar que, quando avaliado no ensaio de viabilidade celular, FMG promoveu letalidade nas células de *S. cerevisiae* enquanto os demais tratamentos não apresentaram atividade antioxidante (Figura 22).

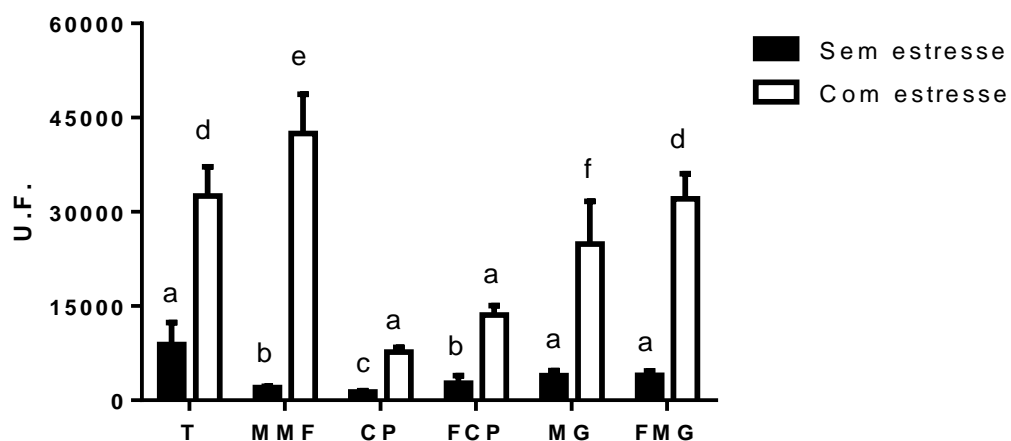


Figura 26. Níveis de oxidação intracelular avaliados na cepa $\Delta gsh1$. As células foram tratadas com tampão PBS (T) e com o meio mínimo fermentado (MMF); CAPE a 0,1 mM em MMF (CP) e CAPE 0,1 mM após 168 h de fermentação microbiana (FCP); mangiferina 0,1 mM em MMF (FMG) e mangiferina a 0,1 mM após 168 h de fermentação microbiana (FMG). Tratamentos sem estresse (barras pretas) e tratamentos sob estresse por 1 h com peróxido de hidrogênio 2,0 mM (barras brancas). Os resultados

representam a média de pelo menos três experimentos independentes. Letras diferentes mostram resultados estatisticamente distintos ($p < 0,05$) na análise de ANOVA *two way* seguida de pós teste de Tukey.

Na cepa $\Delta sod1$, assim como também já observado nas cepas $\Delta ctt1$ e $\Delta gsh1$, a adição de peróxido de hidrogênio elevou significativamente a oxidação intracelular no tratamento com MMF (10,5 vezes) e com tampão T (5,1 vezes).

Diferente do observado nas demais cepas, na $\Delta sod1$ o resultado do tratamento com CP foi estatisticamente semelhante ao resultado da suspensão celular em MMF, ambos sob estresse (Figura 27), ou seja, não apresentando ação antioxidante. Isto converge com a suposição de que a substância CAPE deixa de apresentar uma ação antioxidante na ausência da enzima superóxido dismutase. No entanto, o tratamento com FCP obteve leitura de oxidação intracelular de 18.862 ± 2.582 UF frente a 39.823 ± 7.672 UF de MMF, o que representa redução de 52%. MG e FMG não apresentaram atividade antioxidante, corroborando os resultados encontrados sobre o potencial antioxidante destas substâncias no ensaio de viabilidade celular; mas tanto CP quanto FCP apresentaram elevada toxicidade naquele ensaio (Figura 23).

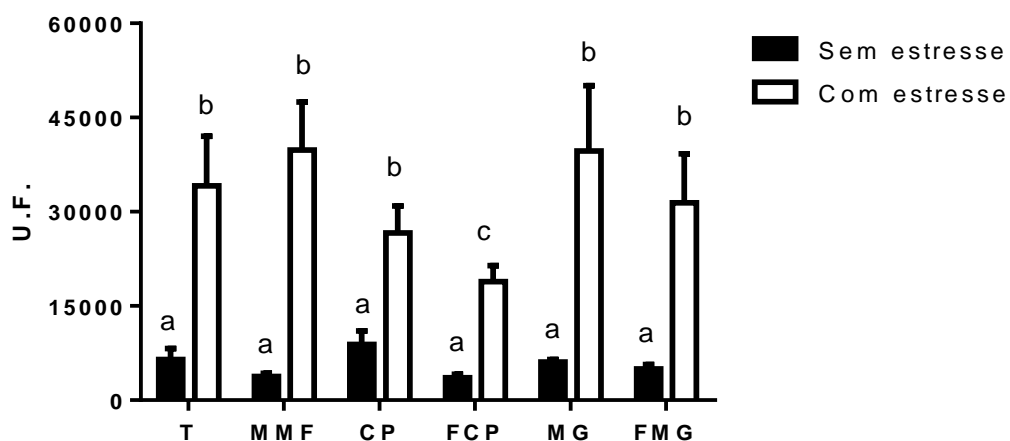


Figura 27. Níveis de oxidação intracelular avaliados na cepa $\Delta sod1$. As células foram tratadas com tampão PBS (T) e com o meio mínimo fermentado (MMF); CAPE a 0,1 mM em MMF (CP) e CAPE 0,1 mM após 168 h de fermentação microbiana (FCP); mangiferina 0,1 mM em MMF (FMG) e mangiferina a 0,1 mM após 168 h de fermentação microbiana (FMG). Tratamentos sem estresse (barras pretas) e tratamentos sob estresse por 1 h com peróxido de hidrogênio 2,0 mM (barras brancas). Os resultados representam a média de pelo menos três experimentos independentes. Letras diferentes mostram resultados estatisticamente distintos ($p < 0,05$) na análise de ANOVA *two way* seguida de pós teste de Tukey.

Não foram encontrados na literatura estudos avaliando a oxidação intracelular da levedura *Saccharomyces cerevisiae* tratada com caldos fermentados, mas alguns trabalhos investigaram o efeito de substâncias fenólicas isoladas. Wang et al. (2018) avaliaram o efeito dos polifenóis nobiletina, 5-desmetilnobiletina, tangeretina e 5-desmetiltangeretina, que foram isolados de cascas de cítricos sobre os níveis de oxidação intracelular em diferentes cepas de *S. cerevisiae*; e observaram que a concentração de $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ das substâncias reduziu em 4 vezes o nível de oxidação

intracelular nas cepas BY4741, $\Delta sod1$ e $\Delta ctt1$ comparados a um tratamento controle. Neste estudo CAPE e mangiferina foram utilizados nas concentrações 35,43 e 42,22 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivamente.

Um estudo em modelo de levedura com os polifenóis miricetina, pirogalol e floroglucinol obteve que apenas os dois primeiros apresentavam atividade antioxidante no ensaio de oxidação intracelular. Os autores atribuíram as diferenças de atividade das substâncias empregadas no estudo ao número e à posição das hidroxilas em suas estruturas (MENDES et al., 2015). Analisando a ação antioxidante de metabólitos oriundos de digestão química do extrato de *A. unedo*, rico em fenólicos, não foi observada qualquer neutralização do aumento de oxidação intracelular durante o estresse oxidativo. O trabalho aponta que a eliminação direta de EROs não é o principal mecanismo de proteção pelo qual os metabólitos de *A. unedo* atuam sobre as células, onde a proteção antioxidante estaria associada à indução da maquinaria de defesa celular, verificada por aumento da expressão de genes relacionados às defesas antioxidantes (JARDIM et al., 2017).

6.3.4 Peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica ou lipoperoxidação (LPO) constitui-se num evento citotóxico primário que desencadeia uma sequência de lesões na célula. As alterações nas membranas levam a transtornos relacionados à permeabilidade na membrana, alterando o fluxo iônico e o fluxo de outras substâncias; o que resulta na perda da seletividade para entrada e/ou saída de nutrientes e substâncias tóxicas à célula, danos no DNA e alterações no ciclo celular, oxidação da LDL e comprometimento dos componentes da matriz extracelular (AYALA; MUÑOZ; ARGÜELLES, 2014; LIMA; SAES; ABDALLA, 2001).

Células em condição de estresse oxidativo, como as células acometidas por formação de agregados proteicos, podem ter um aumento na concentração de radicais livres, os quais podem reagir com insaturações dos fosfolipídeos de membrana, gerando principalmente radicais lipídicos ($L\cdot$, $LO\cdot$ e $LOO\cdot$); levando à destruição de sua estrutura, falência dos mecanismos de troca de metabólitos e, numa condição extrema, à morte celular.

Após o tratamento com as substâncias CAPE e mangiferina nas cepas de levedura, com ou sem passarem pelo processo de fermentação bacteriana, obteve-se o perfil de peroxidação dos lipídeos através do método TBARS. Neste método, a peroxidação lipídica é mensurada por meio da formação de malonaldeído, produto estável formado a partir de reações radiculares entre os fosfolipídeos de membrana e os radicais livres, que reage com o ácido tiobarbitúrico formando um produto que pode ser quantificado por espectrofotometria a 532 nm. Com isso, a peroxidação lipídica foi avaliada para determinar se as substâncias CAPE e mangiferina teriam alteração na sua atividade antioxidante sobre a membrana plasmática das células quando submetidas à fermentação microbiana.

Na cepa controle BY4741 (Figura 28), o tratamento com peróxido de hidrogênio (H_2O_2) elevou em 95% (de $62,70 \pm 11,05$ para $122,5 \pm 11,84$ pmol de MDA/mg de células) a peroxidação lipídica encontrada no tratamento controle (CT). Já nas células pré-tratadas com os fenólicos, com ou sem fermentação, os níveis de peroxidação lipídica não aumentaram após o estresse com peróxido de hidrogênio, permanecendo iguais estatisticamente ao controle ($62,12 \pm 5,057$ pmol de MDA/mg

de células), com $57,52 \pm 16,20$ pmol de MDA/mg de células; $60,76 \pm 6,179$ pmol de MDA/mg de células; $49,28 \pm 6,741$ pmol de MDA/mg de células; e $62,70 \pm 11,04$ pmol de MDA/mg de células para CP, FCP, MG e FMG, respectivamente.

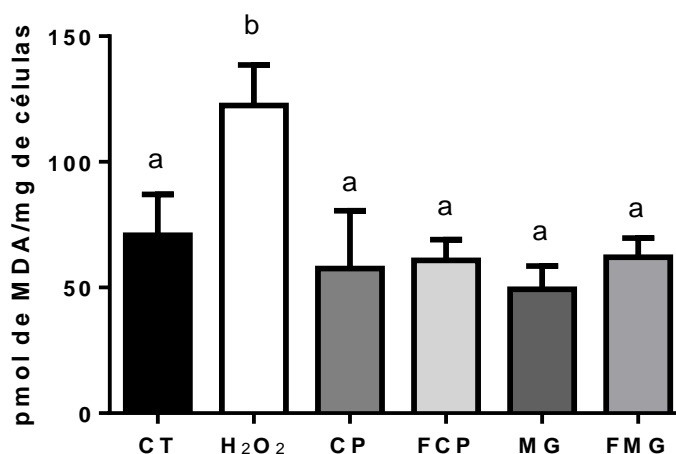


Figura 28. Peroxidação lipídica avaliada na cepa BY4741. As células foram tratadas com CAPE a 0,1 mM (CP) e CAPE 0,1 mM após 168 h de fermentação microbiana (FCP); mangiferina 0,1 mM (MF) e mangiferina a 0,1 mM após 168 h de fermentação microbiana (FMG). Todos os tratamentos foram submetidos por 1 h ao peróxido de hidrogênio (2,0 mM) e comparados com células não estressadas - controle (CT). Os resultados representam a média de pelo menos três experimentos independentes. Letras diferentes mostram resultados estatisticamente distintos ($p < 0,05$) na análise de ANOVA one way seguida de pós teste de Tukey.

Apesar desta análise de lipoperoxidação ser bastante específica para uma estrutura celular (membranas celulares), o aumento do ambiente oxidante intracelular por agentes oxidantes pode causar danos nesta estrutura, enquanto a manutenção da homeostase redox intracelular pode auxiliar na proteção contra o estresse oxidativo. Nesse caso, cepas mutantes ($\Delta sod1$, $\Delta ctt1$ e $\Delta gsh1$) em sistemas de defesa endógenos poderiam apresentar em suas células uma maior quantidade de danos nas membranas celulares capazes de danificar esta estrutura celular e comprometer a sua função.

Contudo, observou-se nas cepas mutantes (Figura 29) um comportamento muito semelhante ao observado na cepa controle (Figura 28), onde os tratamentos com as substâncias fenólicas, puras ou fermentadas, impediram a elevação dos níveis de peroxidação lipídica induzidos pelo estresse com peróxido de hidrogênio. Ou seja, nas cepas mutantes $\Delta ctt1$, $\Delta gsh1$ e $\Delta sod1$ os tratamentos com CP, FCP, MG e FMG conservaram os níveis de peroxidação lipídica semelhantes ao controle (CT), anulando a ação deletéria do peróxido de hidrogênio nos lipídeos avaliados por este método.

Levando-se em consideração que as cepas mutantes $\Delta ctt1$, $\Delta gsh1$ e $\Delta sod1$ e a cepa controle tiveram comportamentos semelhantes quanto aos resultados apresentados, a falta dos genes *CTT1*, *GSH1* e *SOD1* não alterou a proteção contra a oxidação lipídica conferida pelos tratamentos com as substâncias puras ou fermentadas. De fato, estudos mostram que fenólicos podem ser adsorvidos em

bicamadas lipídicas (JILANI et al., 2015, 2016) e assim agir como antioxidantes diretos; seja como doadores de hidrogênio ou aprisionando os radicais livres e inibindo ainda mais a formação de radicais lipídicos (WANG et al., 2018).

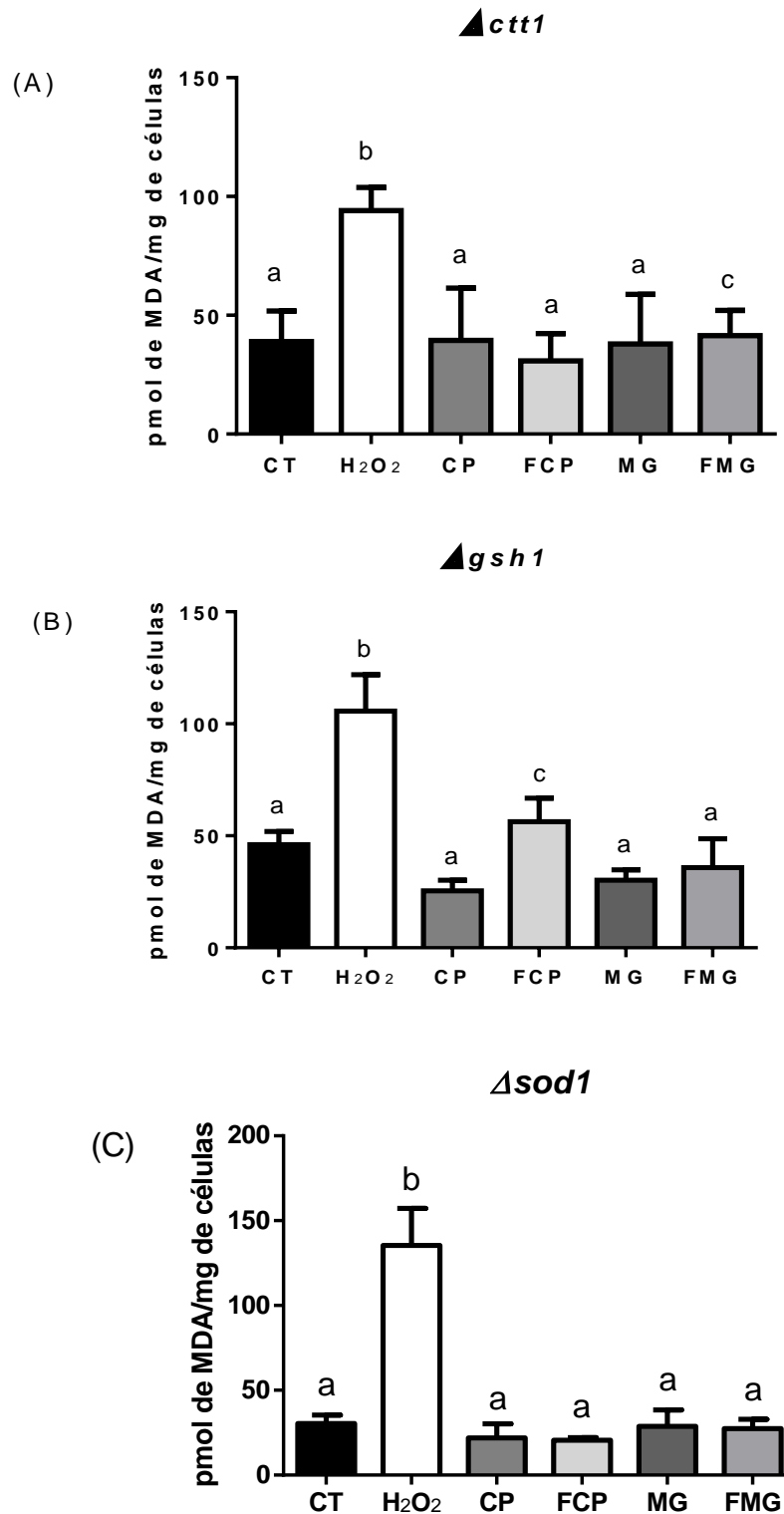


Figura 29. Peroxidação lipídica nas cepas mutantes: (A) cepa $\Delta ctt1$, (B) cepa $\Delta gsh1$ e (C) cepa $\Delta sod1$. As células foram tratadas com CAPE a 0,1 mM (CP) e CAPE 0,1 mM após 168 h de fermentação microbiana (FCP); mangiferina 0,1 mM (MF) e mangiferina a 0,1 mM após 168 h de fermentação microbiana (FMG). Todos os tratamentos foram submetidos por 1 h peróxido de

hidrogênio (2,0 mM) e comparados com células não estressadas - controle (CT). Os resultados representam a média de pelo menos três experimentos independentes. Letras diferentes mostram resultados estatisticamente distintos ($p < 0,05$) na análise de ANOVA *one way* seguida de pós teste de Tukey.

A parede celular de *S. cerevisiae* é composta por uma camada interna de proteínas (40% em peso seco), polissacarídeos 1,3/1,6- β -glicanos (até 55%) e quitina (1-2%) (KLIS et al., 2002). A maioria das proteínas ancoradas às moléculas de β -1,3-glicana contém várias ligações fosfodiéster, resultando em numerosas cargas negativas responsáveis pelas propriedades hidrofílicas da parede celular. Estes grupos funcionais na superfície celular, principalmente os grupos carboxil, hidroxil, sulfidril, fosforil e amino, podem estar envolvidos na retenção de grupamentos fenol; portanto, a maioria dos polifenóis é capaz de ocupar simultaneamente e não especificamente diferentes locais de ligação na superfície da parede celular (VON STASZEWSKI et al., 2012).

Com isso, é possível supor que compostos fenólicos poderiam agir diretamente nos lipídeos da membrana e não somente via mecanismos de indução de sistemas de defesa antioxidante, como parece ocorrer no ensaio de viabilidade. Isso pode explicar os resultados obtidos semelhantes em todos os tratamentos e em todas as cepas. Em um estudo com polifenóis extraídos de linhaça e lipossomas verificou-se que a atividade direta de substâncias fenólicas na membrana está diretamente relacionada a afinidade dos polifenóis aos lipídeos da membrana, e que após esta interação podem reduzir a formação de alquil radicais de forma direta (SOCRIER et al., 2019).

Entretanto, com relação às células estressadas com peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em comparação ao ensaio controle (CT), a dosagem de peroxidação lipídica teve aumento de 90% na cepa $\Delta gsh1$, 141% na cepa $\Delta ctt1$, e 344% na cepa $\Delta sod1$; indicando que o peróxido de hidrogênio é altamente agressivo aos lipídios de membrana. A proteção exercida pelos fenólicos parece ser mais preponderante nos lipídios da membrana, comparados aos outros ensaios antioxidantes. O aumento muito mais expressivo na cepa $\Delta sod1$ indica que a dismutação do ânion superóxido é relevante para a proteção dos lipídeos de membrana, que podem ser alvos principais do radical hidroxila formado por meio da reação de Harber-Weiss. O que indica que nesta cepa os fenólicos tiveram atividade antioxidante ainda mais elevada, uma vez que mantiveram os níveis de peroxidação lipídica a nível de controle apesar do elevado nível de estresse.

6.4 Considerações sobre as propriedades antioxidantes das substâncias fenólicas sobre *S. cerevisiae*

O estresse oxidativo define uma condição na qual o equilíbrio pró-oxidante-antioxidante na célula é perturbado, resultando em hidroxilação do DNA, desnaturação de proteínas, peroxidação lipídica e apoptose; comprometendo, finalmente, a viabilidade das células (WANG et al., 2017). Estes danos estão relacionados a etiologia de muitas doenças crônicas, como câncer, doenças respiratórias e também a neurodegeneração (PEÑA-BAUTISTA et al., 2019). Neste contexto mostram-se muito relevantes substâncias com atividade antioxidante, visto que podem interferir de forma positiva prevenindo e combatendo a propagação de

algumas patologias. Neste estudo, em todos os ensaios antioxidantes tanto o CAPE quanto a mangiferina mostraram-se substâncias promissoras quanto à capacidade de diminuir os efeitos danosos causados pelas EROs.

A ação *in vivo* de substâncias fenólicas deve ser considerada de acordo com sua interação com micro-organismos visto que estes modulam diretamente suas biodisponibilidade e bioatividade (SÁNCHEZ-PATÁN et al., 2012). Levando este fato em consideração, observou-se no ensaio de oxidação intracelular que o CAPE, antes e após a fermentação, possui capacidade de diminuir a oxidação intracelular inclusive nas leveduras deficientes em catalase e glutathione. Já o contato do sobrenadante fermentado (MMF) nas cepas de levedura BY4741, $\Delta gsh1$ e $\Delta sod1$ sob estresse por peróxido de hidrogênio, elevou significativamente o nível de oxidação intracelular.

Transpondo esta observação para células intestinais, a presença de substâncias oxidantes na alimentação ou ainda decorrente de patologias pode aumentar a formação de espécies reativas de oxigênio que, combinadas com metabólitos oriundos dos micro-organismos (como os contidos em MMF), podem ter um efeito negativo quanto ao aumento das espécies radiculares ou das EROs e, conseqüentemente, dos danos intracelulares. Entretanto, a presença de compostos fenólicos, biotransformados ou não pela microbiota, é efetiva em reduzir os níveis de oxidação intracelular, mostrando ser um recurso preventivo em doenças relacionadas a danos oxidativos. De fato, diversos estudos têm correlacionado uma alimentação rica em compostos fenólicos com uma menor incidência de doenças crônicas.

A ação de CAPE e mangiferina, antes e após a fermentação, mostram-se especialmente relevantes no combate à peroxidação lipídica. Este processo consiste em uma reação em cadeia trifásica (iniciação, propagação, terminação), na qual os radicais gerados alteram a estrutura e a função das membranas, bem como a eficiência dos receptores de membrana. Os mecanismos moleculares apontam a peroxidação lipídica como um fator importante no desenvolvimento de distúrbios neurodegenerativos, como as doenças de Alzheimer, Parkinson e Huntington (PEÑA-BAUTISTA et al., 2019). Adutos da degradação de lipídios como o 4-hidróxil-2-nonenal (HNE) e o malonaldeído são encontrados nos corpos de Lewy em neurônios neocorticais e do tronco cerebral de pacientes portadores de Parkinson. Estudos apontam que o HNE pode alterar o transporte de dopamina que é fundamental para a patogênese da doença (PEÑA-BAUTISTA et al., 2019), além disso a formação de lipídios peroxidados vem sendo estudada inclusive como um biomarcador precoce do desenvolvimento desta doença (DE FARIAS et al., 2016).

Os compostos que possuem caráter lipofílico suficiente são capazes de atravessar a barreira hematoencefálica (BHE) e, portanto, agir como potenciais agentes de eliminação de radicais para a proteção contra o estresse oxidativo no sistema nervoso central (RAZZAGHI-ASL et al., 2013). Nesse caso, pode-se elencar que o CAPE, o CAPE fermentado e a mangiferina têm relevância em estudos de mecanismos e formas de prevenir e até combater doenças neurodegenerativas.

6.5 Influência da fermentação microbiana sobre a cepa contendo α -sinucleína

Uma das grandes limitações na área da investigação da DP tem sido a inexistência de um modelo animal que mimetize todas as características da doença, desde a agregação proteica até os sintomas motores. Assim, o estudo em levedura é uma estratégia usando um modelo celular que visa investigar alguns fatores envolvidos na DP, sistemas de controle na produção de proteínas, tráfico e secreção vesicular, mecanismos antioxidantes, metabolismo mitocondrial, dentre outros.

Embora o gene subjacente à DP seja ausente na levedura, a cepa denominada aqui por α -sin possui plasmídeos contendo o gene que codifica para a proteína α -sinucleína através da expressão heteróloga do gene humano em *S. cerevisiae* (MENEZES et al., 2015; MILLER-FLEMING; GIORGINI; OUTEIRO, 2008). Assim, informações sobre agregação, localização e impacto na sobrevivência celular, por exemplo, podem ser focos de estudos neste modelo biológico. Para o ensaio de atividade dos fenólicos sobre proteína α -sin foi utilizada a levedura transformada com plasmídeo p426GAL-aSyn-GFP (cepa α -sin), contendo o gene SNCA humano. A levedura contendo o plasmídeo vazio pRS426GAL (cepa P426) foi utilizada como controle nestes ensaios.

6.5.1 Curva de crescimento e plaqueamento spot

As curvas de crescimento na fase exponencial nos meios sintéticos com galactose como fonte de carbono (SGAL) e sintético com glicose como fonte de carbono (SGLI) foram realizadas em três experimentos independentes. As células de levedura transformadas com os plasmídeos, contendo ou não o gene α -sin, tiveram os valores de absorvância monitorados nos tempos de 0, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 e 35 h, sendo que as leituras de 0 a 20 horas, em fase exponencial de crescimento, foram utilizadas para a determinação da velocidade específica de crescimento. A leitura da absorvância em 35 h foi utilizada para comparar o crescimento máximo da cultura celular obtido próximo à fase estacionária do crescimento.

Na cepa P426 em meio SGLI (Figura 30A), a avaliação da densidade óptica atingida no tempo de 35 h (Tabela 3) mostra que o tratamento com MMF apresentou um aumento de 31% em relação ao controle, enquanto nos tratamentos com FCP, MG e FMG os valores foram estatisticamente semelhantes ao ensaio controle (CT). Entretanto, tanto FCP quanto FMG também foram significativamente semelhantes aos resultados do tratamento com MMF com $p < 0,05$, que é surpreendente visto que o tratamento com CAPE não-fermentado (CP) foi altamente tóxico às células. Uma possível explicação para esta reversão pode ter sido o fato de a fermentação ter convertido CAPE em ácido cafeico e outros metabólitos com menor toxicidade, reduzindo a ação tóxica do sobrenadante oriundo da fermentação com CAPE (Figura 14). De fato, o ensaio de citotoxicidade aponta que a cepa α -sin, avaliada no meio SGLI, apresenta manutenção da atividade metabólica a partir da concentração de $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (Figura 17). Observa-se por meio do ensaio qualitativo no *spot test* (Figura 30B) que houve confirmação da reversão da alta toxidez de CAPE com a fermentação. Os resultados convergiram com o encontrado nas curvas de crescimento, onde o tratamento com CAPE foi altamente tóxico enquanto a fermentação restaurou as

condições de crescimento. Entretanto, não foi observado diferenciação entre os demais tratamentos.

Já com relação às velocidades específicas de crescimento, CT, MMF, FCP, MG e FMG foram semelhantes entre si (Tabela 3), com valores próximos a $0,15 \text{ h}^{-1}$. Outros autores encontraram velocidade específica semelhante em cepa de *S. cerevisiae* em meio quimicamente definido. A cepa com vetor vazio, P426, apresentou velocidade específica de crescimento variando entre $0,14$ e $0,18 \text{ h}^{-1}$ (VAMVACA; VOLLES; JR, 2009; VOLLES; JR, 2007).

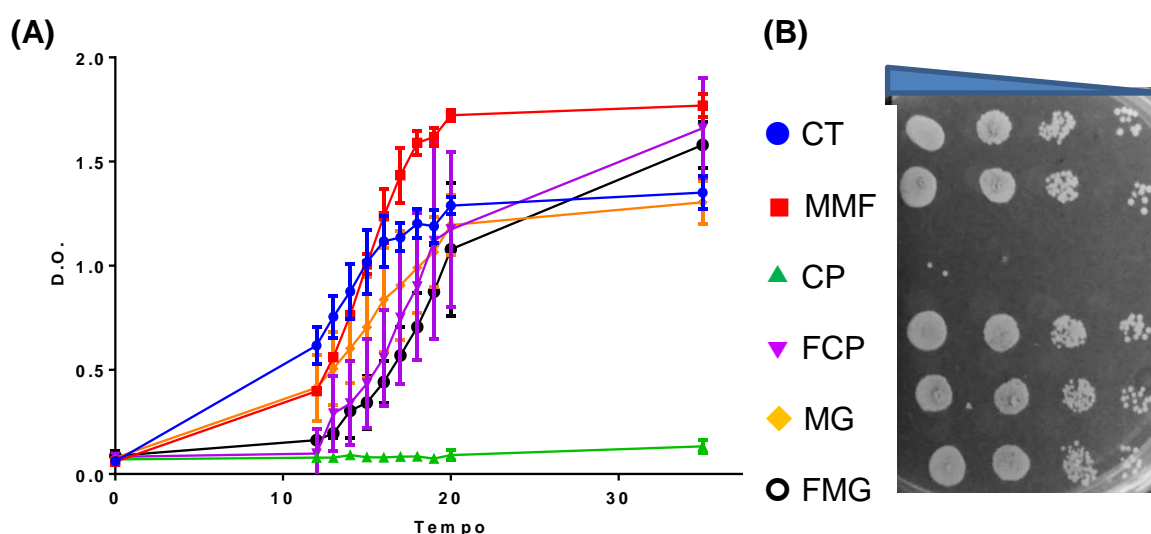


Figura 30. (A) Curvas de crescimento da cepa P426 em meio SGLI: Controle (CT); Meio mínimo fermentado por 168 h (MMF); CAPE 0,1 mM (CP); CAPE 0,1 mM após 168 h de fermentação microbiana (FCP); mangiferina 0,1 mM (MG) e mangiferina 0,1 mM após 168 h de fermentação microbiana (FMG). (B) Plaqueamento spot da cepa P426 em meio SGAL após 20 h com os mesmos tratamentos. Os resultados representam a média de pelo menos três experimentos independentes.

Tabela 3. Densidade óptica da suspensão celular da cepa P426 em meio de cultivo SGLI. Os resultados representam a média de pelo menos três experimentos independentes.

	CT	MMF	CP	FCP	MG	FMG
Abs (35 h)	$1,35 \pm 0,0785^a$	$1,77 \pm 0,0536^b$	$0,133 \pm 0,0300^c$	$1,66 \pm 0,241^{ab}$	$1,30 \pm 0,103^a$	$1,58 \pm 0,108^{ab}$
Velocidade específica (h^{-1})	$0,15800 \pm 0,00684^a$	$0,1780 \pm 0,0219^a$	$2,60 \times 10^{-3} \pm 1,11 \times 10^{-3}^b$	$0,13700 \pm 0,00226^a$	$0,13800 \pm 0,00742^a$	$0,1230 \pm 0,0188^a$

Quando a cepa P426 foi avaliada em meio SGAL, observou-se que a toxidez no tratamento com CAPE foi também revertida com a fermentação (Figura 31A), confirmada no plaqueamento spot (Figura 31B). O tratamento com MMF apresentou a maior taxa de crescimento e maior densidade óptica máxima (35 h), cerca de 38% e 41%, respectivamente, superiores ao controle. Os demais tratamentos fermentados foram estatisticamente semelhantes a MMF, enquanto MG foi semelhante a CT (Tabela 4).

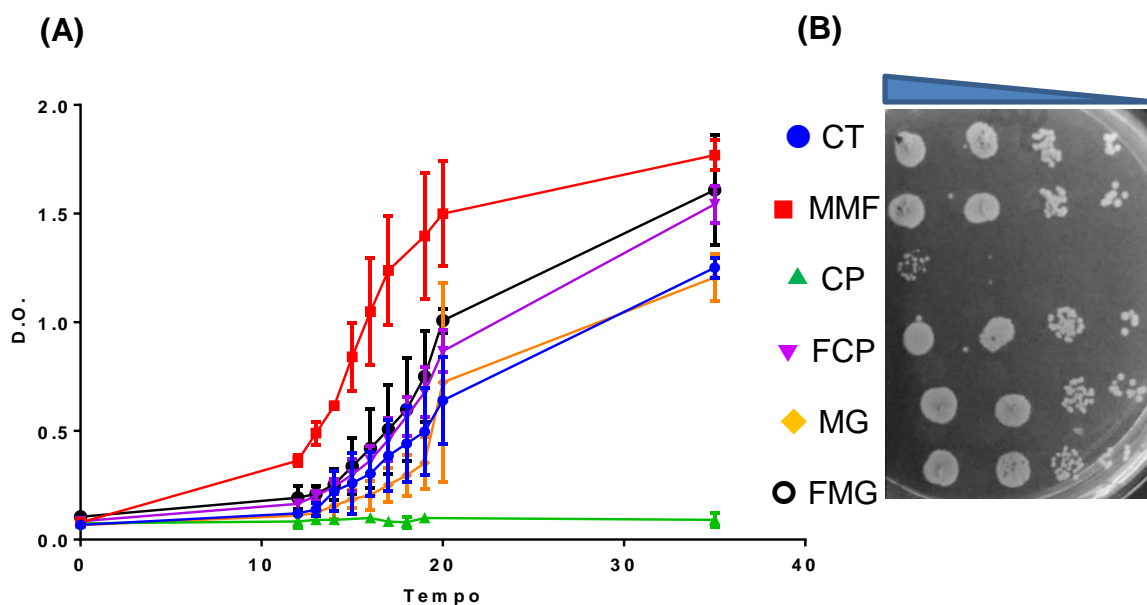


Figura 31. (A) Curvas de crescimento da cepa P426 em meio SGAL: Controle (CT); Meio mínimo fermentado por 168 h (MMF); CAPE 0,1 mM (CP); CAPE 0,1 mM após 168 h de fermentação microbiana (FCP); mangiferina 0,1 mM (MG) e mangiferina 0,1 mM após 168 h de fermentação microbiana (FMG). (B) Plaqueamento spot da cepa P426 em meio SGAL após 20 h com os mesmos tratamentos. Os resultados representam a média de pelo menos três experimentos independentes.

Tabela 4. Densidade óptica da suspensão celular da cepa P426 em meio de cultivo SGAL. Os resultados representam a média de pelo menos três experimentos independentes.

	CT	MMF	CP	FCP	MG	FMG
Abs (35 h)	1,25 ± 0,0471 ^a	1,77 ± 0,0975 ^b	0,0907 ± 0,0300 ^c	1,540 ± 0,0860 ^{ab}	1,210 ± 0,109 ^a	1,610 ± 0,251 ^{ab}
Velocidade específica (h⁻¹)	0,104 ± 0,00223 ^a	0,144 ± 0,0221 ^b	1,33x10 ⁻³ ± 6,11x10 ⁻⁴ ^c	0,115 ± 0,00551 ^a	0,0879 ± 0,00221 ^a	0,103 ± 0,0217 ^a

Comparando-se a cepa P426 nos dois meios de cultivo, as velocidades específicas de crescimento apresentaram valores mais baixos em SGAL (Tabela 4) do que em SGLI (Tabela 3). Esta velocidade mais lenta em meio de galactose pode estar associada a um maior período necessário para que as células sintetizem proteínas, enzimas e intermediários relacionados à captação e metabolização de galactose como fonte de carbono para a proliferação das células. Genes metabólicos envolvidos no metabolismo da galactose são induzidos em um grau significativo somente após a repressão do metabolismo relacionado ao aproveitamento da glicose como fonte de carbono, resultando em um atraso no crescimento no ponto de exaustão de glicose, enquanto as proteínas da via de metabolização da galactose são produzidas (ESCALANTE-CHONG et al., 2015).

Quando a cepa α -sin foi avaliada em meio sem indução por galactose (SGLI) o perfil da curva (Figura 32) foi semelhante a cepa P426 em SGLI (Figura 30). Esta semelhança é esperada visto que se trata da mesma cepa quando na ausência da expressão de α -sin. A toxidez de CAPE foi revertida pela fermentação e confirmada no ensaio spot.

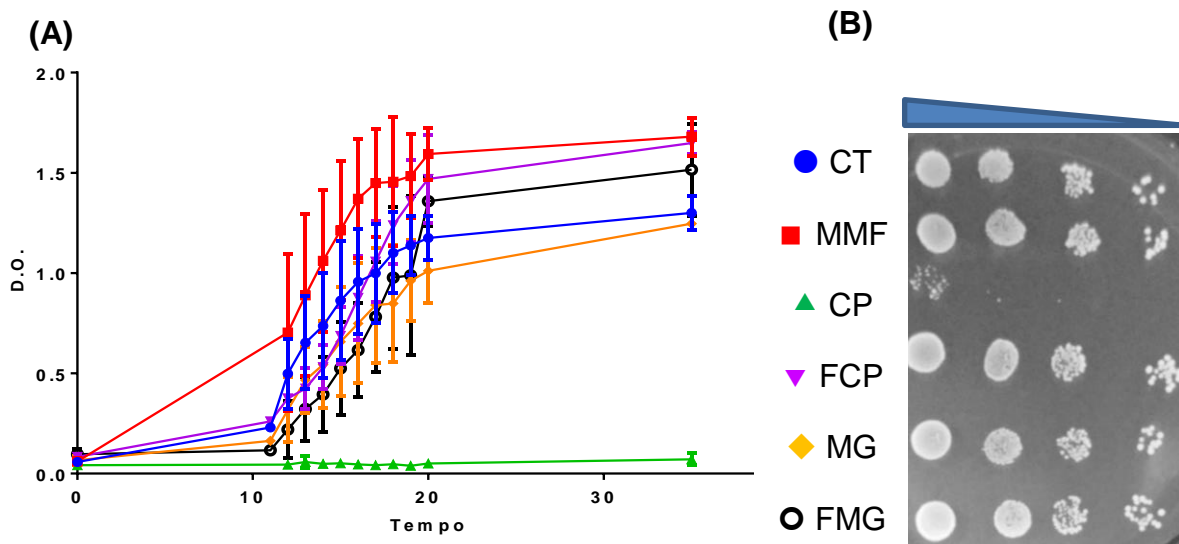


Figura 32. (A) Curvas de crescimento da cepa α -sin em meio SGLI: Controle (CT); Meio mínimo fermentado por 168 h (MMF); CAPE 0,1 mM (CP); CAPE 0,1 mM após 168 h de fermentação microbiana (FCP); mangiferina 0,1 mM (MG) e mangiferina 0,1 mM após 168 h de fermentação microbiana (FMG). (B) Plaqueamento spot da cepa α -sin em meio SGLI após 20 h com os mesmos tratamentos. Os resultados representam a média de pelo menos três experimentos independentes.

Tabela 5. Densidade óptica da suspensão celular da cepa α -sin em meio de cultivo SGLI. Os resultados representam a média de pelo menos três experimentos independentes.

	CT	MMF	CP	FCP	MG	FMG
Abs (35 h)	1,30 ± 0,0850 ^a	1,68 ± 0,0936 ^b	0,0710 ± 0,0289 ^c	1,65 ± 0,0545 ^b	1,25 ± 0,0148 ^a	1,51 ± 0,229 ^a
Velocidade específica (h⁻¹)	0,155 ± 0,0092 ^a	0,173 ± 0,00983 ^a	6,67x10 ⁻⁴ ± 3,79x10 ⁻⁴ ^b	0,15 ± 0,0017 ^a	0,143 ± 0,0283 ^a	0,127 ± 0,0111 ^a

As velocidades específicas de todos os tratamentos, exceto CP, foram semelhantes ao controle, enquanto a densidade óptica máxima do MMF foi superior a CT em 29% (Tabela 5).

Na cepa α -sin em meio SGAL, ou seja, com expressão de α -sin (Figura 33A), após 35 h o ensaio controle apresentou DO₆₀₀ média de 1,148 ± 0,17; enquanto os tratamentos com MMF (DO₆₀₀ média de 1,512 ± 0,018) e FMG (DO₆₀₀ média de 1,54 ± 0,194) promoveram uma maior taxa de crescimento celular, com 31,7% e 34% superiores a CT, respectivamente. Comparando-se as densidades ópticas durante a proliferação celular nas cepas P426 e α -sin em galactose, observa-se que a partir de 14 horas começa a haver uma modificação no perfil das curvas. Na cepa α -sin os tratamentos fermentados MMF, FCP e FMG se distanciam dos tratamentos com CT e MG a partir do aumento das densidades ópticas; enquanto para P426 os tratamentos FCP e FMG aproximam-se mais da curva de CT e MMF com densidades ópticas mais baixas.

Com relação à velocidade específica, os tratamentos na α -sin (Tabela 6) apresentaram valores semelhantes ao observado na cepa P426 em SGAL (Tabela 4). As densidades ópticas mais altas no tempo de 35 h foram alcançadas nos tratamentos fermentados (MMF, FMG e FCP), atingindo valores cerca de 30% superiores ao controle (Tabela 6).

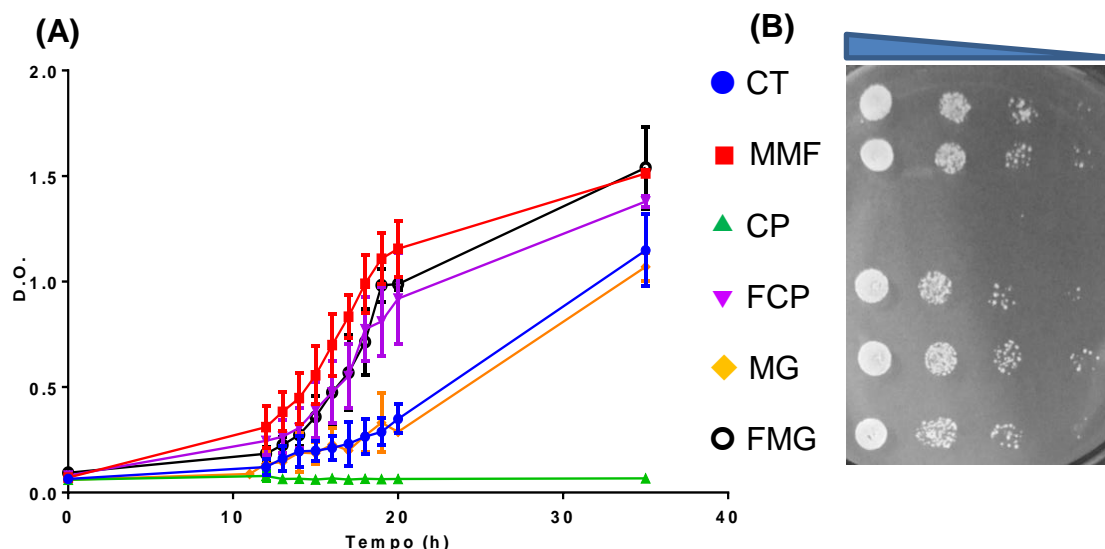


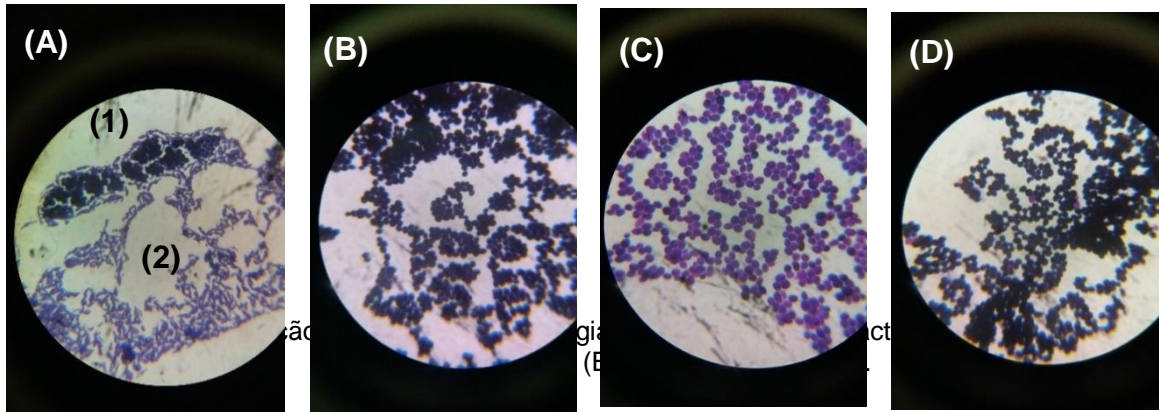
Figura 33. (A) Curvas de crescimento da cepa α -sin em meio SGAL: Controle (CT); Meio mínimo fermentado por 168 h (MMF); CAPE 0,1 mM (CP); CAPE 0,1 mM após 168 h de fermentação microbiana (FCP); mangiferina 0,1 mM (MG) e mangiferina 0,1 mM após 168 h de fermentação microbiana (FMG). (B) Plaqueamento spot da cepa α -sin em meio SGAL após 20 h com os mesmos tratamentos. Os resultados representam a média de pelo menos três experimentos independentes.

Tabela 6. Densidade óptica da suspensão celular da cepa α -sin em meio de cultivo SGAL. Os resultados representam a média de pelo menos três experimentos independentes.

	CT	MMF	CP	FCP	MG	FMG
Abs (35 h)	1,15 ± 0,170 ^a	1,51 ± 0,0177 ^b	0,0670 ± 0,0147 ^c	1,38 ± 0,0266 ^a	1,07 ± 0,0678 ^a	1,54 ± 0,194 ^b
Velocidade específica (h⁻¹)	0,0832 ± 0,0223 ^a	0,144 ± 0,00984 ^b	4,67x10 ⁻⁴ ± 1,15x10 ⁻⁴ ^c	0,118 ± 0,012 ^a	0,0850 ± 0,0130 ^a	0,1250 ± 0,0188 ^a

Em estudo avaliando a influência de extratos vegetais ricos em fenólicos em curvas de crescimento de leveduras α -sin com indução por galactose, as células expostas ao fruto de *Rubus idaeus*, folha de *Ginkgo biloba*, fruto de *Arbustus unedo* e folha de *Corema album* se recuperaram e alcançaram taxas de crescimento semelhantes às das células controle (MACEDO et al., 2015). No presente trabalho, o fenólico isolado CAPE foi tóxico às células da levedura *S. cerevisiae* enquanto a mangiferina não influenciou num aumento ou diminuição das absorvâncias da curva de crescimento quando comparou-se seus resultados ao controle (CT).

Visto que os tratamentos oriundos da fermentação tiveram maior densidade óptica, houve a suspeita de que no meio de cultura pudessem estar presentes bactérias, influenciando diretamente as leituras das absorvâncias em 600 nm. A fim de investigar esta possibilidade, realizou-se a coloração de gram e a microscopia com lente de aumento de 1000X com óleo de imersão. Os resultados visualizados e fotografados no microscópio revelaram a ausência de bactérias em todos os meios oriundos de fermentação (Figura 34), visto que apresentavam apenas leveduras de formato arredondado e tamanho superior às bactérias do blend utilizado no processo fermentativo em todos os ensaios. Para fins de comparação, os micro-organismos presentes no blend probiótico apresentavam formato de bacilos curtos (Figura 34A).



O estudo das curvas de crescimento em leveduras possibilita a comparação entre os respectivos tempos relativos às fases de crescimento das cepas nos diferentes tratamentos, as cinéticas de crescimento, bem como as densidades ópticas máximas atingidas. Como não é possível distinguir células vivas das mortas por densidade ótica, este estudo é uma investigação preliminar do efeito das substâncias fenólicas nas diferentes cepas. Foi possível concluir que os tratamentos fermentados levaram à melhoria do metabolismo celular. De fato, muitos micro-organismos vivem em comunidades e dependem de metabólitos secretados por outros membros da comunidade para sobreviver (PONOMAROVA et al., 2017; WATANABE; TAKAGI, 2019); desta forma, é possível supor que metabólitos microbianos favoreceram o crescimento das leveduras.

Experimentos adicionais se fazem necessários para investigar quais mecanismos estariam relacionados com o aumento da sobrevivência e multiplicação celulares. Como forma de examinar mais especificamente a ação dos fenólicos e de seus fermentados na expressão do gene e na síntese da proteína α -sinucleína, realizou-se um ensaio de microscopia de fluorescência. Nele foi possível visualizar célula a célula o impacto dos tratamentos com fenólicos na sobrevivência das leveduras que expressam a proteína.

6.5.2 Microscopia de fluorescência

O plasmídeo inserido na levedura transformada contém fusão C-terminal com a proteína fluorescente GFP, onde a expressão de α -sin é proporcional a de GFP; o que permite o acompanhamento da localização intracelular da proteína α -sinucleína e o seu nível de agregação. A microscopia de fluorescência foi realizada em microscópio confocal com a visualização de pelo menos 200 células por tratamento. Com isso, foi possível observar as células de *Saccharomyces cerevisiae* transformadas de três formas diferentes: total de células (A), células que fluoresceram (B) e uma imagem com a sobreposição das duas imagens anteriores (C) (Figura 35).

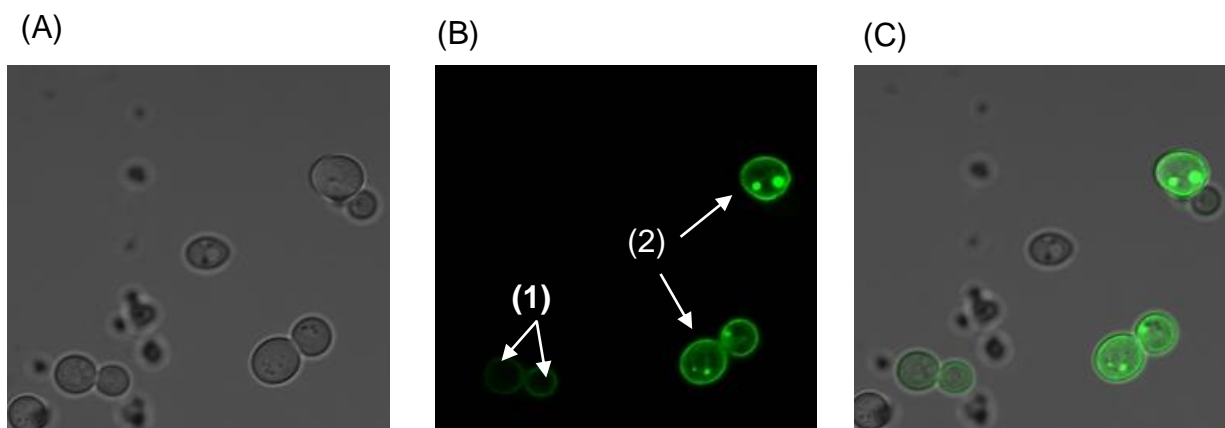


Figura 35. Imagens da microscopia de fluorescência: somente as células (A), imagem apenas com as células fluorescentes (B) e junção das duas imagens anteriores (C). Leveduras contabilizadas como fluorescendo na membrana (1) e como inclusões proteicas no citosol (2).

Pode-se observar que é bem pronunciada a existência de duas formas de fluorescência: uma localizada na membrana celular e outra na forma de inclusões proteicas no citosol (Figura 35B e Figura 35C). As células de levedura que estavam fora do plano da imagem não foram contabilizadas (Figura 35A), visto que o equipamento não captaria a fluorescência relativa a estas células. A fluorescência na membrana indica a forma não tóxica de α -sinucleína, enquanto pontos luminosos no citosol indicam agregação proteica. De acordo com os critérios estabelecidos a partir das imagens captadas pela câmera, as células foram contabilizadas uma a uma, transformando-se os valores absolutos em percentuais relativos ao total de células (Figura 36).

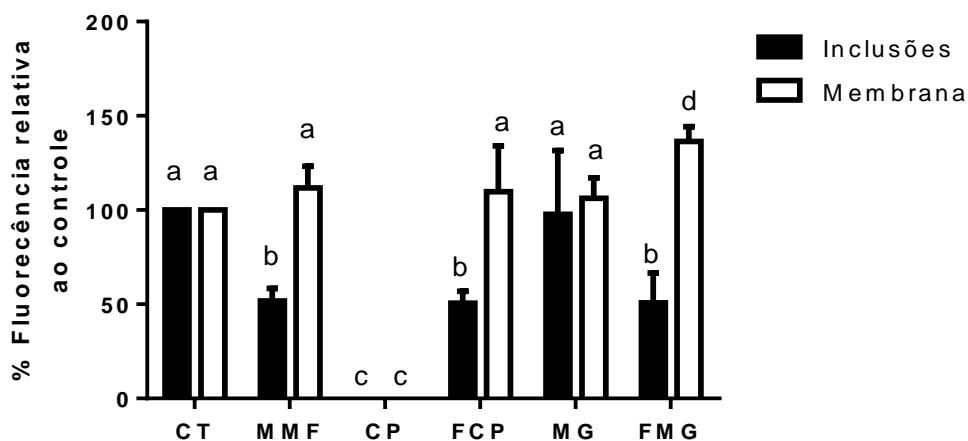


Figura 36. Percentual de fluorescência relativo ao ensaio controle (CT) da levedura α -sin induzida por 20 h com os respectivos tratamentos: Meio mínimo fermentado (MMF); CAPE a 0,1 mM (CP); CAPE 0,1 mM após 168 h de fermentação microbiana (FCP); mangiferina 0,1 mM (MG) e mangiferina 0,1 mM após 168 h de fermentação microbiana (FMG). Os resultados representam a média de pelo menos três experimentos independentes, contabilizando pelo menos 200 células cada um. Letras diferentes mostram resultados estatisticamente distintos ($p < 0,05$) na análise de ANOVA two way seguida de pós teste de Tukey.

Quando os tratamentos foram avaliados quanto à inclusão proteica no citosol, todos aqueles oriundos da fermentação microbiana, isto é, MMF, FMG e FCP reduziram em cerca de 50% os agregados da proteína α -sinucleína (Figura 36). Kardani; Sethi; Roy, (2017) também mostraram uma redução de 50% nas inclusões causadas pela α -sin quando trataram a levedura α -sin com 0,1 e 0,5 mM de nicotina. Macedo et al. (2015) avaliando a atividade neuroprotetora de extratos fenólicos de *Corema album* observaram redução de 25,2% na população celular com inclusões de α -sinucleína. Os mesmos autores, avaliando o efeito neuroprotetor da ficocianina, oriunda da microalga *Spirulina platensis*, obtiveram redução de 10% da fluorescência (MACEDO et al., 2017).

É importante destacar que a redução das inclusões ocorreu também no tratamento fermentado sem a presença dos fenólicos CAPE e mangiferina, indicando que a atividade de redução de agregados pode estar associada a metabólitos microbianos presentes nos três tratamentos. De fato, o tratamento com a mangiferina não influenciou na formação de inclusões na levedura, entretanto, no tratamento com FMG há a redução dessas inclusões, corroborando a hipótese de que apenas os produtos da fermentação microbiana foram suficientes para a atividade sobre a agregação da proteína α -sin observada.

A ausência de fluorescência nas células tratadas com o CAPE é esperada. Como CAPE teve efeito tóxico na concentração de 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ no ensaio de capacidade metabólica (Figura 17), é possível que tenha promovido a morte celular; e, naturalmente, não promovendo a expressão de proteínas. É provável que a conversão microbiana de CAPE esteja relacionada à redução da sua toxicidade, como também que metabólitos microbianos sejam favoráveis ao metabolismo da levedura, promovendo assim resultados melhores nos ensaios com o CAPE fermentado.

Com relação à fluorescência na membrana, todos os tratamentos foram semelhantes ao controle (MMF). Esta observação indica que o efeito dos tratamentos fermentados sobre a α -sin pode não estar associado à mudança de localização da α -sin no interior da célula, do citosol (forma tóxica) para a membrana (forma não tóxica), mas sim à redução na sua expressão ou ao favorecimento na formação de polímeros de α -sin que não levam a toxicidade intracelular. Macedo et al. (2015) avaliaram que o extrato da folha de *C. album* interfere diretamente na agregação da proteína e promove a formação de espécies não tóxicas por meio da restauração subcelular de α -sin na membrana. O mesmo autor em outro trabalho, utilizando análises de *western blot*, obteve que polifenóis de *Arbutus unedo* digeridos *in vitro* não alteraram os níveis de expressão da proteína α -sin e deduziram que o extrato tem efeito citoprotetor por meio da redução da formação de inclusões, melhorando a homeostase redox (MACEDO et al., 2018).

A atividade neuroprotetora do sobrenadante de bactérias já foi verificada por Ho et al. (2019). Utilizando camundongos com ausência da microbiota, verificaram diferenças na geração e na biodisponibilidade de metabólitos fenólicos de acordo com a microbiota adicionada nos animais. Os metabólitos possuíam bioatividade que interfeririam no desdobramento da proteína, isto é, diminuíam a agregação da α -sinucleína, confirmada também em modelo de *Drosophila*. Por fim, através de estudos de fermentação bacteriana *in vitro*, os mesmos autores identificaram bactérias selecionadas que foram capazes de promover a geração desses metabólitos em meio de cultura independente da adição de fenólicos para serem fermentados. Além disso, observaram que no fermentado do meio de cultivo sem fenólicos já eram encontrados

os metabólitos associados à atividade neuroprotetora, similar ao que foi verificado neste estudo.

A bioconversão de fenólicos, nesse modelo experimental, não se mostrou determinante na atividade neuroprotetora. Embora a mangiferina não tenha sido metabolizada de forma significativa (Figura 16), foi observada redução da atividade antioxidante no ensaio de viabilidade celular (Figura 19). Por outro lado, a metabolização de CAPE não alterou a atividade antioxidante na cepa BY4741 (Figura 19), mas foi determinante para a atividade do fermentado de CAPE (FCP) na cepa α -sin (Figura 33).

6.5.3 Oxidação intracelular

A formação de espécies reativas de oxigênio é uma convergência de diversas vias de toxicidade induzidas pela agregação patológica de α -sin (CHINTA et al., 2010; HWANG, 2013; PERFEITO et al., 2014; ROCHA; DE MIRANDA; SANDERS, 2018). Ou seja, os diversos mecanismos associados à progressão da doença como a disfunção mitocondrial, o impedimento das vias de degradação e o acúmulo de oligômeros no retículo endoplasmático levam à formação de estresse oxidativo, que contribui para a neurodegeneração (ROCHA; DE MIRANDA; SANDERS, 2018).

Devido a isto, a dosagem do nível de oxidação intracelular é uma forma de avaliar se a atividade do meio fermentado (MMF) encontrada no ensaio de microscopia pode estar associada à ação antioxidante na cepa α -sin (Figura 37).

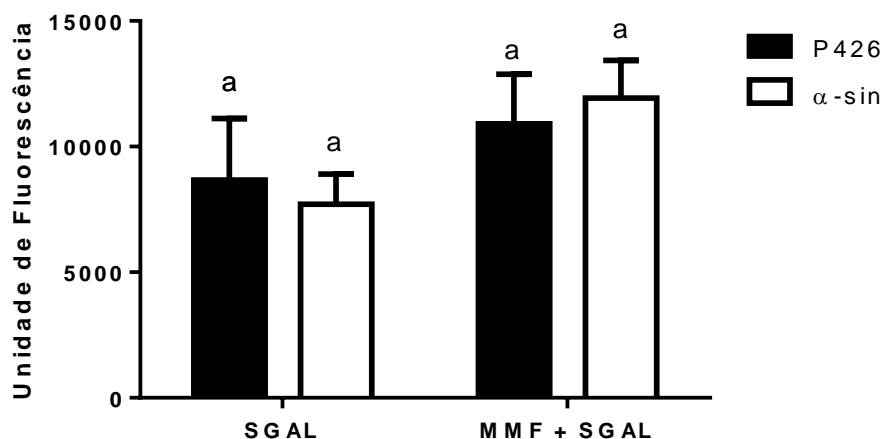


Figura 37. Avaliação da oxidação intracelular em células das cepas α -sin e P426 pré-tratadas com o Meio Mínimo Fermentado (MMF) e o Meio SGAL indutor da expressão de α -sin. Os resultados representam a média de pelo menos três experimentos independentes. Letras diferentes mostram resultados estatisticamente distintos ($p < 0,05$) na análise de ANOVA *two way* seguida de pós teste de Tukey.

Neste tratamento, diferente da cepa BY4741 e suas mutantes, não houve adição de peróxido antes da dosagem da fluorescência. Logo, esta análise visa verificar se o tratamento de 20 h com o MMF é capaz de reduzir a oxidação intracelular e, com isso, diminuir a toxicidade associada a agregação da proteína α -sinucleína. O que se observa é que a oxidação intracelular é mantida em níveis semelhantes tanto

no tratamento com MMF quanto em meio com galactose, logo os resultados verificados na redução da toxicidade não possuem correlação com a atividade antioxidante.

Este resultado vem de encontro com o que foi observado com a cepa BY4741 e suas mutantes, onde o MMF não apresentou atividade antioxidante nos ensaios de viabilidade celular e oxidação intracelular (Figura 18 e Figura 24) mas teve ação positiva nas curvas de crescimento da cepa α -sin (Figura 33 a Figura 36). Da mesma forma, CAPE apresentou ação antioxidante mas sem correspondência com os resultados de redução de agregados de α -sin.

Não foram encontrados outros trabalhos na literatura que tenham avaliado a oxidação intracelular causada por exposição a sobrenadantes de fermentação bacteriana, mas estudos de metaboloma apontam que o caldo extracelular apresenta diversas moléculas exsudadas oriundas dos mais variados metabolismos celulares, como ácidos orgânicos, açúcares e aminoácidos (LEE et al., 2017; PAN et al., 2019). Estas substâncias podem estar envolvidas na atividade do caldo fermentado oriundo da fermentação.

6.5.4 Metaboloma

Como primeira linha de raciocínio, acreditávamos que a redução da toxicidade de agregados de α -sinucleína estivesse relacionada à atividade antioxidante dos caldos fermentados, dada a sequência de efeitos oxidativos intracelulares decorrente da formação de agregados. Entretanto, os resultados do tratamento dos fermentados na cepa α -sin não se correlacionaram com a atividade antioxidante das substâncias fermentadas ou do meio fermentado (MMF).

Os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) são os principais produtos finais microbianos da fermentação bacteriana no intestino grosso, sendo derivados principalmente da decomposição de polissacarídeos complexos por bactérias anaeróbias (RATAJCZAK et al., 2019). Os ácidos acético, propanoico e butírico (Figura 38 a Figura 40) têm recebido especial atenção quanto à sua capacidade de modular mecanismos imunológicos e também neurofisiológicos (SAMPSON; MAZMANIAN, 2015), e podem estar relacionados com a redução da toxicidade de α -sin observada no modelo de levedura deste trabalho.

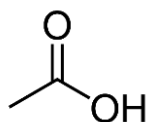


Figura 38. Ácido etanoico ou acético, massa molar 60,052 g.mol⁻¹.

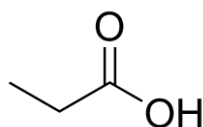


Figura 39. Ácido propanoico, massa molar 74,08 g.mol⁻¹.

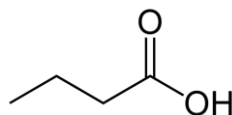


Figura 40. Ácido butírico, massa molar 88,11 g.mol⁻¹.

Além destes, estudos que avaliaram a atividade neuroprotetora de fenólicos produzidos por bactérias encontraram que o ácido 3-hidróxibenzoico (3-HBA) (Figura 41) e ácido 3-(3'-hidróxifenil) propiônico (3-HPPA) (Figura 42) produzidos pela metabolização microbiana de óleo de semente de uva em modelo de ratos eram encontrados no cérebro dos animais e interferiam na produção de aglomerados de peptídeos β -amiloide (A β) em agregados neurotóxicos; um dos principais fatores que desencadeia a patogenia na doença de Alzheimer (WANG et al., 2015). Ho et al. (2019) também demonstraram que esses ácidos fenólicos bioativos são eficazes na modulação do desenvolvimento e da progressão da disfunção motora em um modelo de α -sinucleinopatia de ratos e de *Drosophila*, sendo produzidos pelo metabolismo microbiano de compostos fenólicos oriundos de cacau. Neste trabalho, os ácidos 3-HBA, 3-HPPA e também o ácido 3,4-dihidroxibenzoico (3,4-diHBA) (Figura 43) foram associados à capacidade de reduzir a toxicidade de α -sin também em ensaios *in vitro*, onde a interação destas substâncias com os agregados foi avaliada por meio de espectroscopia com o reagente tioflavina T.

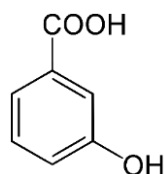


Figura 41. Ácido 3-hidróxibenzoico (3-HBA) (massa molecular 138,12 g.mol⁻¹).

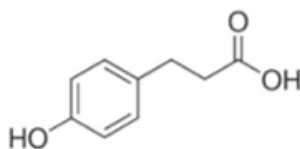


Figura 42. Ácido 3-(3-hidróxifenil) propiônico (3-HPPA) (massa molecular 166,17 g.mol⁻¹).

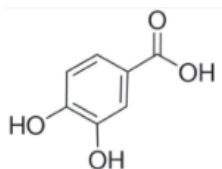


Figura 43. Ácido 3,4-di-hidróxibenzoico (3,4-diHBA) (massa molecular 154,12 g.mol⁻¹).

Devido a estas evidências, resolveu-se avaliar se estas seis substâncias oriundas do metabolismo microbiano (ácidos acético, propanoico, butírico, 3-hidróxibenzoico, 3-(3'-hidróxifenil) propiônico e 3,4-di-hidróxibenzoico) estariam presentes no sobrenadante fermentado (MMF); na tentativa de compreender sua atividade frente aos agregados de α -sinucleína observada no ensaio de microscopia de fluorescência (Figura 36).

As amostras contendo o sobrenadante do MMF foram avaliadas por meio de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas, onde obteve-se um cromatograma (TIC) muito complexo, com uma alta quantidade de picos (Figura 44).

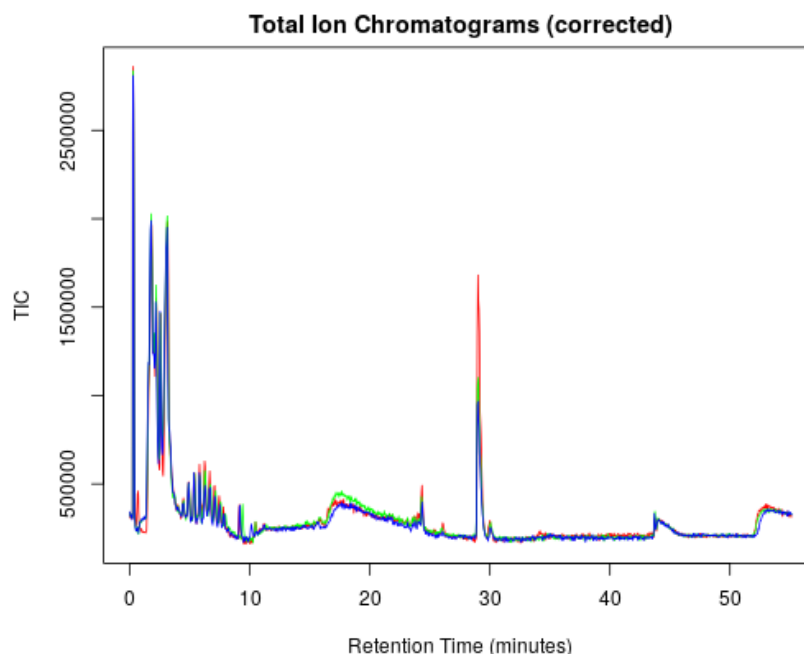


Figura 44. Cromatograma total do sobrenadante MMF. As diferentes cores representam os distintos cromatogramas das massas analisadas (m/z).

O crescimento de bactérias gera uma quantidade muito elevada de metabólitos no meio extracelular, Pan et al. (2019) avaliando o metabolismo de apenas uma cepa de *Lactobacillus casei* observaram a presença de mais de dez mil substâncias diferentes após o tempo de 4000 gerações de micro-organismos. De fato, o espectro de massas dos produtos de fermentação apresenta quantidade muito significativa de picos, tornando inviável determinar com exatidão quais compostos podem estar relacionados à atividade antioxidante ou citotóxica que os fermentados podem apresentar.

A análise dos cromatogramas e as fragmentações m/z obtidas na espectrometria de massas permite sugerir a ausência de ácidos acético e butírico, uma vez que não foram encontrados os fragmentos m/z 145 e 79 para o ácido acético, e 87 para o ácido butírico. O *blend* de micro-organismos utilizado continha bactérias do gênero *Lactobacillus*, do filo Firmicutes; e também do gênero *Bifidobacterium*, do filo Actinobacteria. Contudo, ambos os gêneros possuem vias metabólicas para a produção desses ácidos, o que torna este resultado inesperado (KOH et al., 2016). O íon propionato foi detectado nas três réplicas de MMF a partir da molécula desprotonada $m/z = 73$ $[M-H]^-$ no tempo de retenção de $1,845 \pm 0,05$ min. O perfil de fragmentação MS^2 apresentou perdas desconhecidas, pois devido ao fato do processo de ionização utilizado ter sido o *eletronspray*, uma ionização mais branda na formação de íons, estes íons não puderam ser observados (Figura 45). Apesar do não aparecimento destes íons, a análise em alta resolução permitiu confirmar a presença deste em $73,0294$ m/z .

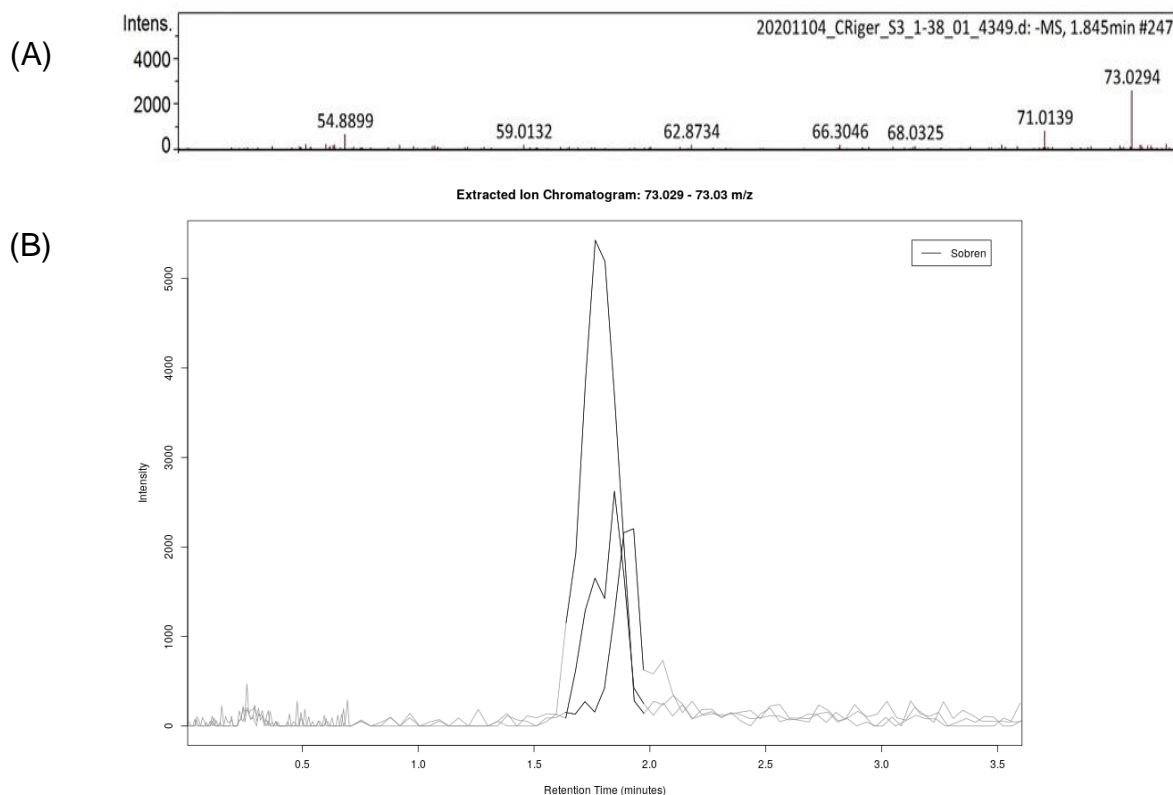


Figura 45. (A) Perfil de fragmentação associado ao íon propionato. (B) Cromatograma do íon propionato em $1,845 \pm 0,05$ min.

Tanto os *Lactobacillus* quanto as *Bifidobacterium* possuem rotas metabólicas para a sua produção (REICHARDT et al., 2014), onde o propionato é sintetizado através da via do succinato. Além disso, o propionato também é produzido pela via do acrilato a partir do lactato como precursor, com açúcares simples (pentoses e hexoses) como substratos nessas reações. O propionato também é sintetizado pela via do propanodiol com desoxihexoses como substratos (RATAJCZAK et al., 2019).

Quanto às moléculas oriundas do metabolismo de fenólicos, apenas o ácido 3-(3-hidróxifenil) propanoico (3-HPPA) foi detectado a partir da molécula desprotonada m/z 165,055 $[M-H]^-$ no tempo de retenção de $2,434 \pm 0,05$ min; e no perfil de fragmentação MS^2 apresentou perda característica de H_2O (-18 u) resultando no fragmento $m/z = 147,047 [M-H_2O-H]^-$ decorrente dos processos de desidratação (Figura 46). Os ácidos 3-HBA e 3,4-diHBA não foram detectados.

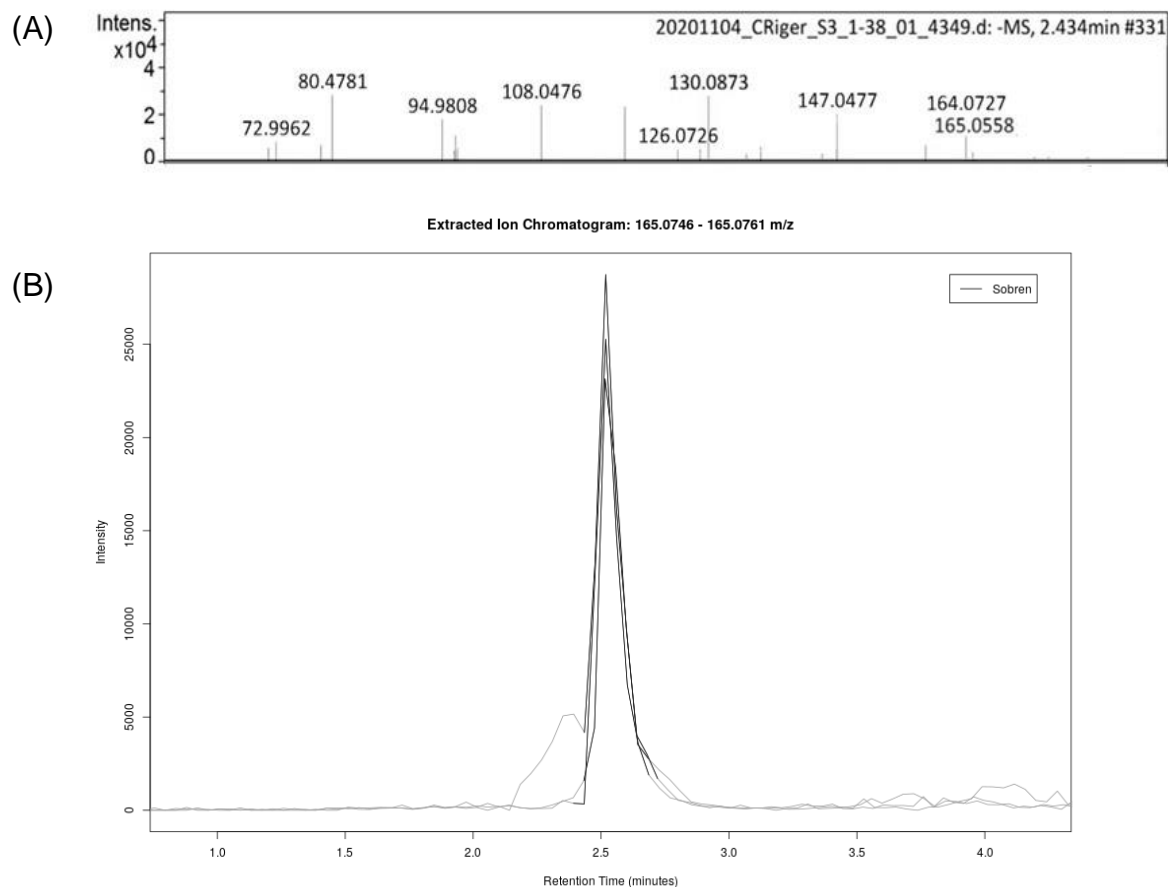


Figura 46. (A) Perfil de fragmentação associado ao íon -(3-hidróxi-fenil) propanoico. (B) Cromatograma do íon -(3-hidróxi-fenil) propanoico.

Vale ressaltar que os trabalhos que detectaram os ácidos 3-HBA, 3-HPPA e 3,4-diHBA, que tinham atividade frente aos agregados proteicos, partiram da fermentação de matrizes contendo fenólicos, o que à primeira vista não é o caso de MMF, mas não se pode excluir a possibilidade de haver pequenas concentrações de fenólicos em ingredientes do meio como peptona e extrato de levedura. A atividade do sobrenadante oriundo do meio mínimo fermentado (MMF) do metabolismo microbiano também sem adição de fenólicos foi relatada por Ho et al. (2019), que atribuiu a formação de 3-HBA, 4-HBA, 3,4-diHBA ou 3-HPPA à presença de precursores oriundos dos ingredientes dos meios de cultivo. Como a produção dos ácidos mostrou ser independente da adição de alguma substância fenólica precursora, é possível supor que os tratamentos FCP e FMG possuam os ácidos 3-HBA, 3,4-diHBA ou 3-HPPA oriundos do metabolismo das bactérias do *blend*. Os tratamentos com FCP e FMG diferem de MMF apenas nos fenólicos adicionados, porém foram suficientes para que os resultados demonstrassem uma redução na formação de agregados de α -sinucleína na avaliação por microscopia de fluorescência.

Um estudo mais recente investigou se as substâncias 3-HBA, 4-HBA, 3,4-diHBA ou 3-HPPA interferiram na propagação de α -sinucleína em um sistema baseado em células neuronais HEK293 que superexpressavam α -syn-A53T-GFP. Ao meio de cultivo foram adicionados agregados de α -sinucleína, oriundos de cérebro

pos mortem de pacientes diagnosticados com Parkinson, que possuem a propriedade de penetrar nas células e induzir a formação de mais agregados. A detecção e quantificação da agregação da α -sinucleína demonstrou que o 3-HPPA é mais efetivo em reduzir esta agregação (YAMASAKI et al., 2020). Cabe ressaltar, que esta foi a molécula encontrada no MMF e poderia estar associada à atividade verificada por este tratamento na redução da formação de agregados proteicos no ensaio da microscopia de fluorescência.

O mecanismo proposto por Yamasaki et al. (2020) para a atividade das substâncias 3-HBA, 4-HBA, 3,4-diHBA e principalmente 3-HPPA interfere no mecanismo de geração dos agregados de α -sinucleína. Na célula, o monômero da proteína pode se juntar a outros monômeros para formar agregados intermediários, tais como oligômeros, e em seguida fibrilas como os corpos de Lewy. Por outro lado, agregados pré-fibrilares de α -sinucleína atravessam a membrana celular e atuam como sementes para formar fibrilas de α -sinucleína dentro da célula. Os ácidos demonstraram a capacidade de inibir parcialmente a geração de formas propensas a agregados a partir do monômero da α -sinucleína, ou seja, inibiram a formação dos oligômeros. Com isso, estes ácidos foram capazes de diminuir a possibilidade de efeitos deletérios desta modificação. No caso do composto 3-HPPA houve prevenção não apenas relacionadas à penetração de sementes fibrilares de α -sinucleína nas células, mas também à agregação e às vias de agregação de α -sinucleína. Este mecanismo pode estar acontecendo no modelo de levedura, explicando a redução da formação dos agregados, verificada no ensaio de microscopia de fluorescência em todos os tratamentos oriundos de fermentação.

Embora não tenha sido possível estabelecer qual substância ou quais grupos de substâncias estariam relacionadas com a atividade de redução da agregação da α -sinucleína nos tratamentos com o MMF; a presença de 3-HPPA suscita a possibilidade de o metabolismo microbiano produzir substâncias potencialmente ativas na prevenção e redução do agravamento de doenças relacionadas a agregados proteicos, como as sinucleopatias, lançando luz para novas perspectivas de tratamento partindo de estratégias dietéticas e probióticas.

7. CONCLUSÕES

O *blend* de micro-organismos utilizado neste trabalho possibilitou a biotransformação dos fenólicos CAPE e mangiferina em subprodutos fenólicos, entretanto esta mudança não levou ao incremento de atividade antioxidante dos fenólicos originais. Pelo contrário, houve redução da atividade antioxidante no caso da mangiferina e manutenção em CAPE.

Quando avaliado no modelo parkinsoniano da levedura, de uma maneira geral, apenas os tratamentos oriundos da fermentação microbiana promoveram o crescimento da levedura e reduziram a toxicidade e a agregação de α -sin, com destaque para o tratamento MMF.

Com isso, conclui-se que a modulação na formação de agregados de α -sin não está associada diretamente à atividade antioxidante e que produtos do metabolismo microbiano estão relacionados a redução dos efeitos deletérios da expressão de α -sinucleína.

Através da análise de espectrometria de massas foi possível detectar a formação de 3-HPPA, metabólito microbiano associado a redução da toxicidade de α -sin. Esta observação converge com as teorias recentes de que a microbiota tem grande participação na etiologia da doença de Parkinson, entretanto estudos posteriores são necessários para determinar quais os produtos específicos do metabolismo estariam envolvidos com a atividade neuroprotetora e quais das cepas do *blend* produziriam estes metabólitos.

Os resultados de nossos estudos sugerem interações entre o microbioma e certos fatores dietéticos, fornecendo informações para formar a base científica utilizada futuramente em terapias eficazes capazes de modular a propagação patológica de α -sin; o que pode gerar descobertas que embasem terapias com probióticos ou substâncias que interagem com estes para modular o início e/ou a progressão de sinucleinopatias.

8. BIBLIOGRAFIA

ALBERDI, E. et al. Mangiferin and Morin Attenuate Oxidative Stress, Mitochondrial Dysfunction, and Neurocytotoxicity, Induced by Amyloid Beta Oligomers. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2018, p. 2856063, 2018.

ANHÊ, F. F. et al. Gut Microbiota Dysbiosis in Obesity-Linked Metabolic Diseases and Prebiotic Potential of Polyphenol-Rich Extracts. **Current obesity reports**, v. 4, n. 4, p. 389–400, 2015.

ARENDARSKI, P. et al. Sumoylation Protects Against β -Synuclein Toxicity in Yeast. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 11, n. March, p. 1–17, 2018.

ASCHERIO, A.; SCHWARZSCHILD, M. A. The epidemiology of Parkinson's disease: risk factors and prevention. **The Lancet Neurology**, v. 15, n. 12, p. 1257–1272, 2016.

AULUCK, P. K.; CARAVEO, G.; LINDQUIST, S. α -Synuclein: Membrane Interactions and Toxicity in Parkinson's Disease. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 26, n. 1, p. 211–233, 2010.

ÁVILA, M. et al. Bioconversion of anthocyanin glycosides by Bifidobacteria and Lactobacillus. **Food Research International**, v. 42, n. 10, p. 1453–1461, 2009.

AYALA, A.; MUÑOZ, M. F.; ARGÜELLES, S. Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2014, p. 1–31, 2014.

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

BARBUT, D.; STOLZENBERG, E.; ZASLOFF, M. Gastrointestinal Immunity and Alpha-Synuclein. **Journal of Parkinson's Disease**, v. 9, p. 1–10, 2019.

BAYLIAK, M. M.; BURDYLYUK, N. I.; LUSHCHAK, V. I. Quercetin increases stress resistance in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* not only as an antioxidant. **Annals of Microbiology**, v. 66, n. 2, p. 569–576, 2016.

BEL-RHLID, R. et al. Biotransformation of caffeoyl quinic acids from green coffee extracts by *Lactobacillus johnsonii* NCC 533. **AMB Express**, v. 3, n. 1, p. 28, 2013.

BELINHA, I. et al. Quercetin Increases Oxidative Stress Resistance and Longevity in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 2446–2451, 2007.

BIENERT, G. P.; SCHJOERRING, J. K.; JAHN, T. P. Membrane transport of hydrogen peroxide. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1758, n. 8, p. 994–1003, ago. 2006.

BIRBEN, E. et al. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. **WAO Journal**, v. 5, n. January, p. 9–19, 2012.

BRAAK, H. et al. Idiopathic Parkinson's disease: Possible routes by which vulnerable neuronal types may be subject to neuroinvasion by an unknown pathogen. **Journal of Neural Transmission**, v. 110, n. 5, p. 517–536, 2003.

BRÁS, I. C. et al. Yeast-based screens to target alpha-synuclein toxicity.

Methods in Molecular Biology, v. 1948, p. 145–156, 2019.

BREGER, J. et al. Antifungal chemical compounds identified using a *C. elegans* pathogenicity assay. **PLoS Pathogens**, v. 3, n. 2, p. 0168–0178, 2007.

CAKMAK, Y. O. Provitella-derived hydrogen sulfide, constipation, and neuroprotection in Parkinson's disease. **Movement Disorders**, v. 30, n. 8, p. 1151, 2015.

CANUTO, K. M. Propriedades Químicas e Farmacológicas de Mangiferina: Um Composto Bioativo de Manga (*Mangifera indica* L.). **Embrapa Semi-Árido Petrolina-PE**, p. 10–11, 2009.

CELIK, S.; ERDOGAN, S. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) protects brain against oxidative stress and inflammation induced by diabetes in rats. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 312, n. 1–2, p. 39–46, 2008.

CELLI, N. et al. In vitro and in vivo stability of caffeic acid phenethyl ester, a bioactive compound of propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 9, p. 3398–3407, 2007.

CHEN, F.; GONG, P. Caffeic acid phenethyl ester protect mice hepatic damage against Cadmium exposure. **Procedia Environmental Sciences**, v. 8, p. 633–636, 2011.

CHEN, J. L.; STEELE, T. W. J.; STUCKEY, D. C. Metabolic reduction of resazurin; location within the cell for cytotoxicity assays. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 115, n. 2, p. 351–358, 2018.

CHINTA, S. J. et al. Mitochondrial alpha-synuclein accumulation impairs complex I function in dopaminergic neurons and results in increased mitophagy in vivo. **Neuroscience Letters**, v. 486, n. 3, p. 235–239, 2010.

CURIEL, J. A. et al. Ability of *Lactobacillus brevis* strains to degrade food phenolic acids. **Food Chemistry**, v. 120, n. 1, p. 225–229, 2010.

DA SILVA, C. G. et al. Protective effects of flavonoids and extract from *Vellozia kolbekii* Alves against oxidative stress induced by hydrogen peroxide in yeast. **Journal of Natural Medicines**, v. 66, n. 2, p. 367–372, 2012.

DAVANI-DAVARI, D. et al. Prebiotics: Definition, types, sources, mechanisms, and clinical applications. **Foods**, v. 8, n. 3, p. 1–27, 2019.

DE FARIAS, C. C. et al. Highly specific changes in antioxidant levels and lipid peroxidation in Parkinson's disease and its progression: Disease and staging biomarkers and new drug targets. **Neuroscience Letters**, v. 617, p. 66–71, 2016.

DI MAIO, R. et al. α -synuclein binds to TOM20 and inhibits mitochondrial protein import in Parkinson's disease. **Science Translational Medicine**, v. 8, n. 342, p. 1–15, 2016.

DONG, J. et al. Current Pharmaceutical Treatments and Alternative Therapies of Parkinson's Disease. **Current Neuropharmacology**, v. 14, n. 4, p. 339–355, 2016.

DU, S. et al. Mangiferin: An effective therapeutic agent against several disorders (Review). p. 4775–4786, 2018.

EL-SEEDI, H. et al. Recent Insights into the Biosynthesis and Biological Activities of Natural Xanthenes. **Current Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 9, p. 854–

901, 2010.

ESCALANTE-CHONG, R. et al. Galactose metabolic genes in yeast respond to a ratio of galactose and glucose. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 5, p. 1636–1641, 2015.

FELICE, V. D. et al. Microbiota-gut-brain signalling in Parkinson's disease: Implications for non-motor symptoms. **Parkinsonism and Related Disorders**, v. 27, p. 1–8, 2016.

FENG, S. et al. Mangiferin: A multipotent natural product preventing neurodegeneration in Alzheimer's and Parkinson's disease models. **Pharmacological Research**, v. 146, n. July, p. 104336, 2019.

FERNANDES, P. N. et al. Oxidative stress response in eukaryotes: effect of glutathione, superoxide dismutase and catalase on adaptation to peroxide and menadione stresses in *Saccharomyces cerevisiae*. **Redox report: communications in free radical research**, v. 12, n. 5, p. 236–244, 2007.

FILANNINO, P. et al. Metabolism of phenolic compounds by *Lactobacillus* spp. during fermentation of cherry juice and broccoli puree. **Food Microbiology**, v. 46, p. 272–279, 2015.

FILOSA, S.; DI MEO, F.; CRISPI, S. Polyphenols-gut microbiota interplay and brain neuromodulation. **Neural Regeneration Research**, v. 13, n. 12, p. 2055–2059, 2018.

FLEMING, T.; LINDQUIST, S. Yeast Cells Provide Insight into Alpha-Synuclein Biology and Pathobiology. **Science**, v. 302, n. 5651, p. 1772–1775, 2003.

FRANÇA, M. B.; PANEK, A. D.; ELEUTHERIO, E. C. A. The role of cytoplasmic catalase in dehydration tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. **Cell Stress and Chaperones**, v. 10, n. 3, p. 167–170, 2005.

FRASSINETTI, S. et al. Antimutagenic and antioxidant activity of Lisosan G in *Saccharomyces cerevisiae*. **Food Chemistry**, v. 135, n. 3, p. 2029–2034, 2012.

FRITSCH, C. et al. Phenolic acid degradation potential and growth behavior of lactic acid bacteria in sunflower substrates. **Food Microbiology**, v. 57, p. 178–186, 2016.

GALLEGOS, S. et al. Features of alpha-synuclein that could explain the progression and irreversibility of Parkinson's disease. **Frontiers in Neuroscience**, v. 9, n. FEB, p. 1–11, 2015.

GAO, Y. et al. Antioxidant activity evaluation of dietary flavonoid hyperoside using *Saccharomyces cerevisiae* as a model. **Molecules**, v. 24, n. 4, 2019.

GARDANA, C. et al. Biotransformation strategy to reduce allergens in propolis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 13, p. 4654–4658, 2012.

GERSHANIK, O. S. Does Parkinson's disease start in the gut? A doença de Parkinson começa no intestino? **Arq Neuropsiatr**, n. November, p. 67–70, 2018.

GÖÇER, H.; GÜLÇİN, I. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE): correlation of structure and antioxidant properties. **International journal of food sciences and nutrition**, v. 62, n. 8, p. 821–5, 2011.

GOLOMIDOV, I. M. et al. Yeast red pigment modifies cloned human α -synuclein

pathogenesis in Parkinson disease models in *Saccharomyces cerevisiae* and *Drosophila melanogaster*. **Neurochemistry International**, v. 120, p. 172–181, 2018.

GUPTA, A. et al. The yeast stress inducible Ssa Hsp70 reduces α -synuclein toxicity by promoting its degradation through autophagy. **PLoS Genetics**, v. 14, n. 10, p. 1–27, 2018.

HILL, C. et al. Expert consensus document: The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 11, n. 8, p. 506–514, 2014.

HO, L. et al. Heterogeneity in gut microbiota drive polyphenol metabolism that influences α -synuclein misfolding and toxicity. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 64, p. 170–181, 2019.

HOLMQVIST, S. et al. Direct evidence of Parkinson pathology spread from the gastrointestinal tract to the brain in rats. **Acta Neuropathologica**, v. 128, n. 6, p. 805–820, 2014.

HU, L. F. et al. Neuroprotective effects of hydrogen sulfide on Parkinson's disease rat models. **Aging Cell**, v. 9, n. 2, p. 135–146, 2010.

HUR, S. J. et al. Effect of fermentation on the antioxidant activity in plant-based foods. **Food Chemistry**, v. 160, p. 346–356, 2014.

HWANG, O. Role of Oxidative Stress in Parkinson's Disease. **Experimental Neurobiology**, v. 22, n. 1, p. 11, 2013.

INGELSSON, M. Alpha-synuclein oligomers-neurotoxic molecules in Parkinson's disease and other lewy body disorders. **Frontiers in Neuroscience**, v. 10, n. SEP, p. 1–10, 2016.

JAKUBOWSKI, W.; BARTOSZ, G. Estimation of oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae* with fluorescent probes. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 29, n. 11, p. 1297–1301, 1997.

JANDA, E. et al. Defective autophagy in Parkinson's disease: Role of oxidative stress. **Molecular Neurobiology**, v. 46, n. 3, p. 639–661, 2012.

JARDIM, C. et al. (Poly)phenol metabolites from *Arbutus unedo* leaves protect yeast from oxidative injury by activation of antioxidant and protein clearance pathways. **Journal of Functional Foods**, v. 32, n. 29, p. 333–346, 2017.

JILANI, H. et al. Biosorption of green and black tea polyphenols into *Saccharomyces cerevisiae* improves their bioaccessibility. **Journal of Functional Foods**, v. 17, p. 11–21, 2015.

JILANI, H. et al. Improved bioaccessibility and antioxidant capacity of olive leaf (*Olea europaea* L.) polyphenols through biosorption on *Saccharomyces cerevisiae*. **Industrial Crops and Products**, v. 84, p. 131–138, 2016.

JUNG, J. et al. Fermentation of red ginseng extract by the probiotic *Lactobacillus plantarum* KCCM 11613P: Ginsenoside conversion and antioxidant effects. **Journal of Ginseng Research**, p. 1–7, 2017.

KALKAN YILDIRIM, H. et al. Biotransformation of propolis phenols by *L. plantarum* as a strategy for reduction of allergens. **Food Science and Biotechnology**,

v. 27, n. 6, p. 1727–1733, 2018.

KARDANI, J.; ROY, I. Understanding Caffeine's Role in Attenuating the Toxicity of α -Synuclein Aggregates: Implications for Risk of Parkinson's Disease. **ACS Chemical Neuroscience**, v. 6, n. 9, p. 1613–1625, 2015.

KARDANI, J.; SETHI, R.; ROY, I. Nicotine slows down oligomerisation of α -synuclein and ameliorates cytotoxicity in a yeast model of Parkinson's disease. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, v. 1863, n. 6, p. 1454–1463, 2017.

KASBE, P.; JANGRA, A.; LAHKAR, M. Mangiferin ameliorates aluminium chloride-induced cognitive dysfunction via alleviation of hippocampal oxido-nitrosative stress, proinflammatory cytokines and acetylcholinesterase level. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 31, 2015.

KAVITHA, M. et al. Mangiferin attenuates MPTP induced dopaminergic neurodegeneration and improves motor impairment, redox balance and Bcl-2/Bax expression in experimental Parkinson's disease mice. **Chemico-Biological Interactions**, v. 206, n. 2, p. 239–247, 2013.

KAVITHA, M. et al. Mangiferin antagonizes rotenone: Induced apoptosis through attenuating mitochondrial dysfunction and oxidative stress in SK-N-SH neuroblastoma cells. **Neurochemical Research**, v. 39, n. 4, p. 668–676, 2014.

KHANAM, H. et al. Neurodegenerative diseases linked to misfolded proteins and their therapeutic approaches: A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 124, p. 1121–1141, 2016.

KIDA, K. et al. Inhaled hydrogen sulfide prevents neurodegeneration and movement disorder in a mouse model of Parkinson's disease. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 15, n. 2, p. 343–352, 2011.

KLIS, F. M. et al. Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 26, n. 3, p. 239–256, 2002.

LEE, S. B. et al. Mass-based metabolomic analysis of *Lactobacillus sakei* and its growth media at different growth phases. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 5, p. 925–932, 2017.

LEE, Y. J. et al. Defects in very long chain fatty acid synthesis enhance α -synuclein toxicity in a yeast model of Parkinson's disease. **PLoS ONE**, v. 6, n. 1, 2011.

LEI, G. et al. Fast quantification of phenylethyl alcohol in rose water and chemical profiles of rose water and oil of *Rosa damascena* and *Rosa rugosa* from southeast China. **Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies**, v. 38, n. 7, p. 823–832, 2015.

LIDDLE, R. A. Parkinson's disease from the gut. **Brain Research**, v. 1693, p. 201–206, 2018.

LIMA, É. S.; SAES, D.; ABDALLA, P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 37, n. 3, p. 293–303, 2001.

LIU, B. et al. Vagotomy and Parkinson disease. **Neurology**, v. 88, p. 1996–2002, 2017.

LUSHCHAK, V. I. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. **Chemico-Biological Interactions**, v. 224, p. 164–175, 2014.

MACEDO, D. et al. (Poly)phenols protect from α -synuclein toxicity by reducing oxidative stress and promoting autophagy. **Human Molecular Genetics**, v. 24, n. 6, p. 1717–1732, 2015.

MACEDO, D. et al. Phycocyanin protects against Alpha-Synuclein toxicity in yeast. **Journal of Functional Foods**, v. 38, p. 553–560, 2017.

MACEDO, D. et al. (Poly)phenol-digested metabolites modulate alpha-synuclein toxicity by regulating proteostasis. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–15, 2018.

MANDALARI, G. et al. Antimicrobial activity of flavonoids extracted from bergamot (*Citrus bergamia* Risso) peel, a byproduct of the essential oil industry. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, n. 6, p. 2056–2064, 2007.

MANFREDINI, V. et al. Glutathione peroxidase induction protects *Saccharomyces cerevisiae* sod1 Δ sod2 Δ double mutants against oxidative damage. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, n. 2, p. 159–165, 2004.

MARAZZA, J. A. et al. Enhancement of the antioxidant capacity of soymilk by fermentation with *Lactobacillus rhamnosus*. **Journal of Functional Foods**, v. 4, n. 3, p. 594–601, 2012.

MARIS, A. F. et al. Diauxic shift-induced stress resistance against hydroperoxides in *Saccharomyces cerevisiae* is not an adaptive stress response and does not depend on functional mitochondria. **Current Genetics**, v. 39, n. 3, p. 137–149, 2001.

MELO, T. Q.; COPRAY, S. J. C. V. M.; FERRARI, M. F. R. Alpha-Synuclein Toxicity on Protein Quality Control, Mitochondria and Endoplasmic Reticulum. **Neurochemical Research**, v. 43, n. 12, p. 2212–2223, 2018.

MENDES, V. et al. Effect of myricetin, pyrogallol, and phloroglucinol on yeast resistance to oxidative stress. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2015, 2015.

MENEZES, R. et al. From the baker to the bedside: yeast models of Parkinson's disease. **Microbial Cell**, v. 2, n. 8, p. 262–279, 2015.

MENG, D. et al. Antioxidant activity evaluation of dietary phytochemicals using *Saccharomyces cerevisiae* as a model. **Journal of Functional Foods**, v. 38, p. 36–44, 2017.

MENSOR, L. L. et al. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **PHYTOTHERAPY RESEARCH**, v. 15, p. 127–130, 2001.

MICHIELS, C. et al. Importance of se-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 17, n. 3, p. 235–248, 1994.

MILLER-FLEMING, L.; GIORGINI, F.; OUTEIRO, T. F. Yeast as a model for studying human neurodegenerative disorders. **Biotechnology Journal**, v. 3, n. 3, p. 325–338, 2008.

MOOSAVI, F. et al. Derivatives of caffeic acid, a natural antioxidant, as the basis for the discovery of novel nonpeptidic neurotrophic agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 25, n. 12, p. 3235–3246, 15 jun. 2017.

MORAIS, T. C. et al. Mangiferin ameliorates the intestinal inflammatory response and the impaired gastrointestinal motility in mouse model of postoperative ileus. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 388, n. 5, p. 531–538, 2015.

MULAK, A.; BONAZ, B. Brain-gut-microbiota axis in Parkinson's disease. **World Journal of Gastroenterology**, v. 21, n. 37, p. 10609–10620, 2015.

MURTAZA, G.; KARIM, S.; AKRAM, M. Caffeic Acid Phenethyl Ester and Therapeutic Potentials. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1–9, 2014.

O'MAHONY, S. M. et al. Serotonin, tryptophan metabolism and the brain-gut-microbiome axis. **Behavioural Brain Research**, v. 277, p. 32–48, 2015.

PAN-MONTOJO, F. et al. Progression of Parkinson's disease pathology is reproduced by intragastric administration of rotenone in mice. **PLoS ONE**, v. 5, n. 1, 2010.

PAN, L. et al. Metabolomic analysis of significant changes in *Lactobacillus casei* Zhang during culturing to generation 4,000 under conditions of glucose restriction. **Journal of Dairy Science**, v. 102, n. 5, p. 3851–3867, 2019.

PARIHAR, A. et al. Alpha synuclein and parkinson's disease. **Pathology, Prevention and Therapeutics of Neurodegenerative Disease**, p. 1–14, 2018.

PARKINSON, J. "An essay on the shaking palsy" 200 years old. **The Journal of neuropsychiatry and clinical neurosciences**, v. 14, n. 2, p. 223–236, 2002.

PEÑA-BAUTISTA, C. et al. Lipid peroxidation in neurodegeneration. **Clinica Chimica Acta**, v. 497, n. May, p. 178–188, 2019.

PENG, S. et al. Neuroprotection of mangiferin against oxidative damage via arousing Nrf2 signaling pathway in PC12 cells. **BioFactors**, v. 45, n. 3, p. 381–392, 2019.

PEREIRA, M. D.; ELEUTHERIO, E. C.; PANEK, A. D. Acquisition of tolerance against oxidative damage in *Saccharomyces cerevisiae*. **BMC microbiology**, v. 1, p. 11, 2001.

PEREZ-PARDO, P. et al. The gut-brain axis in Parkinson's disease: Possibilities for food-based therapies. **European Journal of Pharmacology**, v. 817, n. November 2016, p. 86–95, 2017.

PERFEITO, R. et al. Linking alpha-synuclein phosphorylation to reactive oxygen species formation and mitochondrial dysfunction in SH-SY5Y cells. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 62, p. 51–59, 2014.

PIOVEZAN-BORGES, A. C. et al. Potencial antioxidante de extratos de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) em *Saccharomyces cerevisiae* deficientes para genes de defesa oxidante. **Brazilian Journal of Biology**, v. 76, n. 2, p. 539–544, 2016.

POEWE, W. et al. Parkinson disease. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, p. 1–21, 2017.

PONOMAROVA, O. et al. Yeast Creates a Niche for Symbiotic Lactic Acid Bacteria through Nitrogen Overflow. **Cell Systems**, v. 5, n. 4, p. 345- 357.e6, 2017.

POPOVA, B.; KLEINKNECHT, A.; BRAUS, G. H. Posttranslational modifications and clearing of α -synuclein aggregates in yeast. **Biomolecules**, v. 5, n. 2, p. 617–634, 2015.

POURRAMEZAN, Z. et al. In vitro study of antioxidant and antibacterial activities of Lactobacillus probiotic spp. **Folia Microbiologica**, 2017.

PROCHÁZKOVÁ, D.; BOUŠOVÁ, I.; WILHELMOVÁ, N. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. **Fitoterapia**, v. 82, n. 4, p. 513–523, 2011.

RATAJCZAK, E.; MURPHY, S.; MARTINSON, H. A. Alpha-synuclein pathology and the role of the microbiota in Parkinson's disease. **Frontiers in Neuroscience**, v. 13, n. APR, p. 1–13, 2019.

RATAJCZAK, W. et al. Immunomodulatory potential of gut microbiome-derived shortchain fatty acids (SCFAs). **Acta Biochimica Polonica**, v. 66, n. 1, p. 1–12, 2019.

RAZZAGHI-ASL, N. et al. Antioxidant properties of hydroxycinnamic acids: a review of structure- activity relationships. **Current Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 36, p. 4436–4450, 2013.

REICHARDT, N. et al. Phylogenetic distribution of three pathways for propionate production within the human gut microbiota. **ISME Journal**, v. 8, n. 6, p. 1323–1335, 2014.

RENCUS-LAZAR, S. et al. Yeast models for the study of amyloid-associated disorders and development of future therapy. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 6, n. MAR, p. 1–10, 2019.

ROCHA, E. M.; DE MIRANDA, B.; SANDERS, L. H. Alpha-synuclein: Pathology, mitochondrial dysfunction and neuroinflammation in Parkinson's disease. **Neurobiology of Disease**, v. 109, p. 249–257, 2018.

ROEHRS, R. et al. Effect of vitamin A treatment on superoxide dismutase-deficient yeast strains. **Archives of Microbiology**, v. 192, n. 3, p. 221–228, 2010.

SÁ, R. A. DE et al. Brazilian propolis protects *Saccharomyces cerevisiae* cells against oxidative stress. **Brazilian journal of microbiology**, v. 44, n. 3, p. 993–1000, 2013.

SADOWSKA-BARTOSZ, I. et al. Dimethyl sulfoxide induces oxidative stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS yeast research**, v. 13, n. 8, p. 820–30, 2013.

SAHA, S.; SADHUKHAN, P.; SIL, P. C. Mangiferin: A xanthonoid with multipotent anti-inflammatory potential. **BioFactors**, v. 42, n. 5, p. 459–474, 2016.

SAMPSON, T. The impact of indigenous microbes on Parkinson's disease. **Neurobiology of Disease**, 2019.

SAMPSON, T. R.; MAZMANIAN, S. K. Control of brain development, function, and behavior by the microbiome. **Cell Host and Microbe**, v. 17, n. 5, p. 565–576, 2015.

SANCENON, V. et al. Suppression of α -synuclein toxicity and vesicle trafficking defects by phosphorylation at S129 in yeast depends on genetic context. **Human**

Molecular Genetics, v. 21, n. 11, p. 2432–2449, 2012.

SÁNCHEZ-PATÁN, F. et al. Capability of lactobacillus plantarum IFPL935 to catabolize flavan-3-ol compounds and complex phenolic extracts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 29, p. 7142–7151, 2012.

SANDOVAL-ACUÑA, C.; FERREIRA, J.; SPEISKY, H. Polyphenols and mitochondria: an update on their increasingly emerging ROS-scavenging independent actions. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 559, p. 75–90, 1 out. 2014.

SANTOS, N. A. G. DOS et al. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) protects PC12 cells from MPP+ toxicity by inducing the expression of neuron-typical proteins. **NeuroToxicology**, v. 45, p. 131–138, 2014.

SANUGUL, K. et al. Isolation of a human intestinal bacterium that transforms mangiferin to norathyriol and inducibility of the enzyme that cleaves a C-glucosyl bond. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 28, n. 9, p. 1672–1678, 2005.

SCHEPERJANS, F. et al. Gut microbiota are related to Parkinson's disease and clinical phenotype. **Movement Disorders**, v. 30, n. 3, p. 350–358, 2015.

SCHMID, F.-X. Biological Macromolecules: Spectrophotometry Concentrations. In: **Encyclopedia of life sciences**. [s.l.] Macmillan Publishers Ltd, Nature Publishing Group, 2001. p. 1–4.

SETHIYA, N. K.; MISHRA, S. H. Investigation of Mangiferin, as a Promising Natural Polyphenol Xanthone on Multiple Targets of Alzheimer's Disease. **Journal of Biologically Active Products from Nature**, v. 4, n. 2, p. 111–119, 2014.

SHAHIDI, F.; AMBIGAIPALAN, P. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects - A review. **Journal of Functional Foods**, v. 18, p. 820–897, 2015.

SILVA, J. A. et al. Aplicação da metodologia de planejamento fatorial e análise de superfícies de resposta para otimização da fermentação alcoólica. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1073–1077, 2008.

SINGAB, R. et al. Biotransformation of caffeic acid into a promising biologically active metabolite by *Candida albicans* isolate CI-24. **Archives of Pharmaceutical Sciences Ain Shams University**, v. 2, n. 1, p. 37–46, 2018.

SISWANTO, S. et al. The Effect of Mangiferin Against Brain Damage Caused by Oxidative Stress and Inflammation Induced by Doxorubicin. **HAYATI Journal of Biosciences**, v. 23, n. 2, p. 51–55, 2016.

SOCRIER, L. et al. Flax phenolic compounds as inhibitors of lipid oxidation: Elucidation of their mechanisms of action. **Food Chemistry**, v. 274, p. 651–658, 2019.

SOMMER, F.; BÄCKHED, F. The gut microbiota-masters of host development and physiology. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, n. 4, p. 227–238, 2013.

SOPER, J. H. et al. alpha-Synuclein-induced Aggregation of Cytoplasmic Vesicles in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular Biology of the Cell**, v. 19, n. March, p. 1093–1103, 2008.

SOUSA, C. M. D. M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 351–355, 2007.

SPIELMAN, L. J.; GIBSON, D. L.; KLEGERIS, A. Unhealthy gut, unhealthy

brain: The role of the intestinal microbiota in neurodegenerative diseases. **Neurochemistry International**, v. 120, p. 149–163, 2018.

STEELS, E. L.; LEARMONTH, R. P.; WATSON, K. Stress tolerance and membrane lipid unsaturation in *Saccharomyces cerevisiae* grown aerobically or anaerobically. **Microbiology**, v. 140, n. 1994, p. 569–76, 1994.

STOLZENBERG, E. et al. A Role for Neuronal Alpha-Synuclein in Gastrointestinal Immunity. **Journal of Innate Immunity**, v. 9, n. 5, p. 456–463, 2017.

SUBHASWARAJ, P. et al. Determination of antioxidant activity of *Hibiscus sabdariffa* and *Croton caudatus* in *Saccharomyces cerevisiae* model system. **Journal of Food Science and Technology**, v. 54, n. 9, p. 2728–2736, 2017.

SUN, M. F. OF GUT MICROBIOTA AND MICROBIAL METABOLITES IN P. D.; SHEN, Y. Q. Dysbiosis of gut microbiota and microbial metabolites in Parkinson's Disease. **Ageing Research Reviews**, v. 45, n. April, p. 53–61, 2018.

SVENSSON, E. et al. Vagotomy and subsequent risk of Parkinson's disease. **Annals of Neurology**, v. 78, n. 4, p. 522–529, 2015.

SWINNEN, E. et al. Rim15 and the crossroads of nutrient signalling pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. **Cell Division**, v. 1, p. 1–8, 2006.

SZWAJGIER, D.; JAKUBCZYK, A. Biotransformation of ferulic acid by *Lactobacillus acidophilus* K1 and selected *Bifidobacterium* strains. **Acta Sci. Pol., Technol. Aliment.**, v. 9, n. 1, p. 45–59, 2010.

TARDIFF, D. F. et al. Yeast reveal a “druggable” Rsp5/Nedd4 network that ameliorates α -synuclein toxicity in neurons. **Science**, v. 342, n. 6161, p. 979–83, 2013.

TENREIRO, S.; ECKERMANN, K.; OUTEIRO, T. F. **Protein phosphorylation in neurodegeneration: Friend or foe?** **Frontiers in Molecular Neuroscience**, 2014.

TENREIRO, S.; OUTEIRO, T. F. A levedura como modelo para estudar as bases moleculares da doença de Parkinson. **Revista Brasileira de Ciências do Envelhecimento Humano**, v. 12, n. 3, p. 288–298, 2016.

TOLEDANO, M. B. et al. Oxidative stress responses in yeast. **Yeast Stress Responses**, v. 1, p. 242–87, 2003.

TOMASIK, P.; TOMASIK, P. Probiotics, non-dairy prebiotics and postbiotics in nutrition. **Applied Sciences (Switzerland)**, v. 10, n. 4, 2020.

TOMIYAMA, R. et al. 3, 4-dihydroxybenzalacetone and caffeic acid phenethyl ester induce preconditioning ER stress and autophagy in SH-SY5Y cells. **Journal of cellular physiology**, v. 233, n. 2, p. 1671–1684, 2018.

TORRES, A. R. et al. Chemical characterization, antioxidant and antimicrobial activity of propolis obtained from *Melipona quadrifasciata quadrifasciata* and *Tetragonisca angustula* stingless bees. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 51, n. 6, p. 1–10, 2018.

VALDÉS, L. et al. The relationship between phenolic compounds from diet and microbiota: Impact on human health. **Food and Function**, v. 6, n. 8, p. 2424–2439, 2015.

VALERO-CASES, E.; NUNCIO-JÁUREGUI, N.; FRUTOS, M. J. Influence of Fermentation with Different Lactic Acid Bacteria and in Vitro Digestion on the

Biotransformation of Phenolic Compounds in Fermented Pomegranate Juices. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, p. acs.jafc.6b04854, 2017.

VAMVACA, K.; VOLLES, M. J.; JR, P. T. L. The First N-terminal Amino Acids of α -Synuclein Are Essential for α -Helical Structure Formation In Vitro and Membrane Binding in Yeast. **Journal of Molecular Biology**, v. 389, n. 2, p. 413–424, 2009.

VOLLES, M. J.; JR, P. T. L. Relationships between the Sequence of α -Synuclein and its Membrane Affinity, Fibrillization Propensity, and Yeast Toxicity. p. 1510–1522, 2007.

VON STASZEWSKI, M. et al. Nanocomplex formation between β -lactoglobulin or caseinomacropptide and green tea polyphenols: Impact on protein gelation and polyphenols antiproliferative activity. **Journal of Functional Foods**, v. 4, n. 4, p. 800–809, 2012.

WANCHAQ, S. et al. Protective effect and mechanism of lactobacillus on cerebral ischemia reperfusion injury in rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 51, n. 7, p. 1–7, 2018.

WANG, J. et al. Gene expression profile of probiotic Lactobacillus casei Zhang during the late stage of milk fermentation. **Food Control**, v. 25, n. 1, p. 321–327, 2012.

WANG, K. et al. Antifungal activity of phenolic monoterpenes and structure-related compounds against plant pathogenic fungi. **Natural Product Research**, v. 33, n. 10, p. 1423–1430, 2019.

WANG, L. I. Y. A. N.; TANG, Z. H. I. J. U. N.; HAN, Y. U. Z. Neuroprotective effects of caffeic acid phenethyl ester against sevoflurane-induced neuronal degeneration in the hippocampus of neonatal rats involve MAPK and PI3K / Akt signaling pathways. **Molecular Medicine Reports**, n. 14, p. 3403–3412, 2016.

WANG, M. et al. Antioxidant Protection of Nobiletin, 5-Demethylnobiletin, Tangeretin, and 5-Demethyltangeretin from Citrus Peel in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, n. 12, p. 3155–3160, 2018.

WANG, Y. et al. Antioxidant properties of probiotic bacteria. **Nutrients**, v. 9, n. 5, 2017.

WANG, Y. Q. et al. Comparative study of eight strains of Lactic Acid Bacteria in vitro Antioxidant Activity. **Advanced Materials Research**, v. 1073–1076, p. 183–188, 2014.

WATANABE, D.; TAKAGI, H. Yeast prion-based metabolic reprogramming induced by bacteria in fermented foods. **FEMS Yeast Research**, v. 19, n. 6, p. 1–6, 2019.

WINDERICKX, J. et al. SNCA (α -synuclein)-induced toxicity in yeast cells is dependent on Sir2-mediated mitophagy. **Autophagy**, v. 8, n. 10, p. 1494–1509, 2012.

WONG, Y. C.; KRAINIC, D. α -synuclein toxicity in neurodegeneration: Mechanism and therapeutic strategies. **Nature Medicine**, v. 23, n. 2, p. 1–13, 2017.

WU, B. et al. Structure elucidation of in vivo and in vitro metabolites of mangiferin. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 55, n. 5, p. 1075–1082, 2011.

WU, W. M. et al. Free radical scavenging and antioxidative activities of caffeic

acid phenethyl ester (CAPE) and its related compounds in solution and membranes: A structure-activity insight. **Food Chemistry**, v. 105, n. 1, p. 107–115, 2007.

YAMASAKI, T. R. et al. Gut Microbiome-Modified Polyphenolic Compounds Inhibit α -Synuclein Seeding and Spreading in α -Synucleinopathies. **Frontiers in Neuroscience**, v. 14, n. May, p. 1–9, 2020.

YUNES, R. A. et al. GABA production and structure of gadB/gadC genes in Lactobacillus and Bifidobacterium strains from human microbiota. **Anaerobe**, v. 42, p. 197–204, 2016.

ZABKA, M.; PAVELA, R. Antifungal efficacy of some natural phenolic compounds against significant pathogenic and toxinogenic filamentous fungi. **Chemosphere**, v. 93, n. 6, p. 1051–1056, 2013.

ZAIA, D. A. M.; ZAIA, C. T. B. V.; LICHTIG, J. DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS VIA ESPECTROFOMETRIA: VANTAGENS E DESVANTAGENS DOS MÉTODOS EXISTENTES. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 21, n. 6, 1998.

ZAITONE, S. A. et al. Caffeic acid improves locomotor activity and lessens inflammatory burden in a mouse model of rotenone-induced nigral neurodegeneration: Relevance to Parkinson's disease therapy. **Pharmacological Reports**, v. 71, n. 1, p. 32–41, 2019.

ZALÁN, Z. et al. Production of organic acids by Lactobacillus strains in three different media. **European Food Research and Technology**, v. 230, n. 3, p. 395–404, 2010.

ZAMPOL, M. A.; BARROS, M. H. Melatonin improves survival and respiratory activity of yeast cells challenged by alpha-synuclein and menadione. **Yeast**, v. 35, n. 3, p. 281–290, 2018.

ZHANG, H.; TSAO, R. Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant and anti-inflammatory effects. **Current Opinion in Food Science**, v. 8, p. 33–42, 1 abr. 2016.

ZHANG, Z. et al. Examining the neuroprotective effects of protocatechuic acid and chrysin on in vitro and in vivo models of Parkinson disease. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 84, 2015.

ZHENG, J. et al. A taxonomic note on the genus Lactobacillus: Description of 23 novel genera, emended description of the genus Lactobacillus beijerinck 1901, and union of Lactobacillaceae and Leuconostocaceae. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 70, n. 4, p. 2782–2858, 2020.