

Capacidade antioxidante da microalga *Spirulina platensis* em células da levedura *Saccharomyces cerevisiae* submetidas ao estressor paraquat

Antioxidant capacity of the *Spirulina platensis* microalgae on *Saccharomyces cerevisiae* yeast cells exposed to paraquat stressor

RIALA6/1263

Cíntia GUARIENTI^{1*}, Telma Elita BERTOLIN², Jorge Alberto Vieira COSTA¹

*Endereço para correspondência: *BR 285, km 171, Bairro São José, Caixa Postal 611, CEP 99001-970, Passo Fundo, RS. Fone: (54) 3316 – 8490. e-mail: cguarienti@yahoo.com.br

¹Laboratório de Engenharia Bioquímica - Universidade Federal do Rio Grande

²Laboratório de Fermentações - Universidade de Passo Fundo

Recebido: 17.09.2009 – Aceito para publicação: 15.03.2010

RESUMO

Em virtude de várias publicações terem mostrado a alta associação entre a geração de radicais livres e as doenças crônico-degenerativas, tem havido grande interesse por alimentos funcionais antioxidantes. O excesso de espécies reativas no organismo resulta em estresse oxidativo que provoca danos celulares e teciduais. A microalga *Spirulina* tem sido pesquisada em função de suas propriedades nutricionais e antioxidantes. O objetivo desse trabalho foi de avaliar a atividade antioxidante da microalga *Spirulina*, utilizando-se a levedura *Saccharomyces cerevisiae* como modelo biológico. A levedura foi submetida ao estressor 1,1'- dimetil - 4,4'- bipyridílio (paraquat), nas concentrações 0, 10 e 15 mM. O potencial antioxidante foi avaliado pela técnica de sobrevivência celular (plaqueamento) e pelo ensaio de lipoperoxidação (valores de TBA). Observou-se aumento significativo de sobrevivência celular ($p \leq 0,05$), quando submetidos aos tratamentos com paraquat e *Spirulina*, em comparação com o experimento em que foi utilizado somente o paraquat. O agente estressor gerou aumento significativo ($p \leq 0,05$) na lipoperoxidação (valores de TBA), o qual foi atenuado pelo tratamento com *Spirulina*, não diferindo do tratamento controle ($p > 0,05$). A microalga *Spirulina* apresentou capacidade antioxidante, que protege as células da levedura contra os danos oxidantes provocados pelo paraquat.

Palavras-chave. antioxidante, estresse oxidativo, *Saccharomyces cerevisiae*, *Spirulina*.

ABSTRACT

Because of some studies that have shown the occurrence of high correlation between free radicals generation and chronic degenerative diseases, the option for consuming antioxidant functional foods has been increasing. The excess of reactive species in the organism results in an oxidative stress that causes cellular and tissues damages. The microalgae *Spirulina* has been investigated due to its nutritional and antioxidant properties. The present study assessed the antioxidant capacity of microalgae *Spirulina* on *Saccharomyces cerevisiae* yeast, as a biological model, which has been exposed to stressor 1,1' - dimethyl - 4,4' - bipyridyl (paraquat) at 0.10 and 15 mM concentrations. The antioxidant potential was evaluated on cellular survival by plaque assay and on lipoperoxidation technique (values of TBA). The cellular survival rate increased significantly ($p \leq 0.05$) when treated with both paraquat and *Spirulina*, in comparison to those treated only with paraquat. The stressor agent caused a significant increase ($p \leq 0.05$) in lipoperoxidation values (TBA), which was attenuated by treating with *Spirulina*, not differing from the control treatment ($p > 0.05$). Therefore, the microalgae *Spirulina* shows antioxidant capacity, which protects yeast cells against the oxidative damages caused by paraquat.

Key words. antioxidant, oxidative stress, *Saccharomyces cerevisiae*, *Spirulina*.

INTRODUÇÃO

O interesse de diferentes segmentos, dentre eles a indústria de alimentos, por componentes bioquímicos ativos, também denominados alimentos funcionais, tem sido fundamentado nas questões qualidade de vida, longevidade e saúde. O termo funcional aplicado aos alimentos tem assumido diferente conotação que é a de proporcionar um benefício fisiológico adicional, além daquele de satisfazer as necessidades nutricionais básicas¹. Um dos fatores que pode caracterizar um alimento como funcional é seu potencial como antioxidante.

Os antioxidantes atuam como varredores de radicais livres (RL) e espécies reativas de oxigênio (ERO). A produção destas espécies reativas é parte integrante do metabolismo humano, sendo observada em diversas condições fisiológicas e desempenhando papel fundamental no metabolismo celular. O excesso de radicais livres pode gerar o estresse oxidativo, o que pode provocar alterações teciduais responsáveis por diversas patologias². O estresse oxidativo resulta do desequilíbrio entre o sistema pró e antioxidante³, sendo o sistema oxidante predominante e responsável por citotoxicidade em vários tipos de células. Entre os diversos agentes oxidantes existentes, encontra-se o herbicida paraquat (1,1 - dimetil - 4,4' biperidílio), que é uma fonte exógena de radicais livres⁴. O paraquat em presença de NADPH (fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo) gera o radical paraquat, superóxido e hidroxila^{4,5}. O paraquat reage com o NADPH sofrendo uma redução por ação da enzima NADPH-citocromo P₄₅₀ redutase, o que resulta na geração de um radical paraquat. Entretanto, sob condições aeróbicas, esse elétron é transferido ao oxigênio, que se transforma em ânion superóxido (O₂•⁻)^{6,7}.

Embora o organismo disponha de efetivas defesas antioxidantes para neutralizar os radicais livres, dentre elas as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutatona (GX), existem situações fisiológicas promotoras de estresse oxidativo, onde a suplementação com antioxidantes exógenos apresenta relevante importância para manter o equilíbrio entre pró e antioxidantes. A crescente busca por produtos com atividade antioxidante em terapias preventivas relacionadas ao estresse oxidativo, confere atenção especial aos produtos naturais⁴.

A *Spirulina* é uma cianobactéria consumida a milhares de anos por Astecas e Maias como fonte de alimentação primária, que contém elevados níveis de antioxidante, como por exemplo, carotenoides⁸, especialmente beta-caroteno⁹ e ficocianina, que é seu pigmento principal¹⁰.

A microalga *Spirulina* apresenta características que sugerem aplicações clínicas que lhe conferem efeitos terapêuticos em pacientes acometidos de diversas patologias¹¹. A *Spirulina* vem sendo fonte de pesquisa devido a evidências de seu potencial terapêutico na prevenção e diminuição dos danos causados por dislipidemias e sua atuação como composto com atividade antioxidante¹².

A avaliação da capacidade antioxidante empregando animais de laboratório é, em geral, de difícil execução e necessita de um número elevado de animais para assegurar resultados significativos. Os ensaios realizados com microrganismos são fáceis, rápidos e podem utilizar um grande número de células com as mesmas características genéticas. A levedura *Saccharomyces cerevisiae*, sob o ponto de vista genético e metabólico, é um dos organismos mais utilizados em testes biológicos¹³. Várias razões tornam a levedura *Saccharomyces cerevisiae* um modelo de sistema eucariótico unicelular para estudos de estresse oxidativo. Seu metabolismo é semelhante ao de eucariotos superiores, com mecanismos próprios de ativação metabólica (citocromo P₄₅₀) e de detoxificação, que não estão presentes em bactérias^{13,14}. A avaliação da capacidade antioxidante pode ser realizada pela medida da sobrevivência de células tratadas com o antioxidante e agentes estressores, como por exemplo, a apomorfina, o paraquat^{14,15,16} e o glutamato monossódico^{17,18}.

Neste contexto, objetivou-se avaliar a capacidade antioxidante da microalga *Spirulina platensis*, na viabilidade celular e na lipoperoxidação (valores de TBA) da levedura *Saccharomyces cerevisiae* frente ao estresse oxidativo gerado pela adição de 1,1' - dimetil - 4,4' - biperidílio (paraquat).

MATERIAL E MÉTODOS

Antioxidante

Foi analisada como substância antioxidante a biomassa da microalga *Spirulina*, Cepa LEB-18. A concentração de *Spirulina* utilizada nos ensaios foi 0,025 mM, maior concentração não citotóxica de antioxidante para a levedura *Saccharomyces cerevisiae*¹⁹. A medida da concentração de *Spirulina* foi realizada indiretamente, utilizando o peso molecular de seu principal pigmento (ficocianina) e considerando que este representa 20% da microalga.

Agente estressor

Como agente estressor foi utilizado o 1,1' - dimetil - 4,4' - biperidílio (paraquat), nas concentrações 0 mM, 10 mM e 15 mM.

Cultivos e tratamentos

Os cultivos foram realizados em erlenmeyers de 250 mL, contendo 160 mL de meio de cultivo e 16 mL do inóculo (10 % do volume inicial). Os cultivos foram submetidos a agitação orbital termostaticada (150 rpm, 30°C), para o crescimento da levedura em aerobiose. Para os tratamentos, aproximadamente 2×10^6 células/mL proveniente da fase exponencial de crescimento foram tratadas com as soluções do antioxidante e do agente estressor.

Foram realizados cinco tratamentos: tratamento controle (sem adição de estressor e de antioxidante); tratamento com paraquat 10 mM e tratamento com paraquat 15 mM (somente adição de paraquat nas concentrações 10 mM e 15 mM, respectivamente); tratamento com paraquat 10 mM + *Spirulina* e tratamento com paraquat 15 mM + *Spirulina* (com adição de *Spirulina* e com paraquat nas concentrações 10 mM e 15 mM, respectivamente).

Após a adição do agente estressor e do antioxidante, os tratamentos foram incubados por 21 h a 28°C para posterior análises.

Sobrevivência celular

Para a determinação da sobrevivência celular, procedeu-se o plaqueamento das células em meio contendo 2% de glicose, 1% de extrato de malte, 0,5% de extrato de levedura, 0,02% de fosfato de sódio monobásico e 2% de agar. Após a semeadura, as placas foram incubadas a 28°C por 48h. Procedeu-se a contagem das colônias em cada placa e determinou-se a sobrevivência celular em logaritmo de unidades formadoras de colônia (Log UFC).

Lipoperoxidação

Para a quantificação da lipoperoxidação, foi realizada a análise de TBA (ácido tiobarbitúrico). Para a análise foram retirados 5 mL do tratamento e procedeu-se a sonificação por 20 min. Adicionou-se 2,5 mL de tricloroacético (TCA) 15% e submeteu-se a mistura a centrifugação por 15 min a 3000 rpm. Adicionou-se 2,5 mL de TBA (0,28% em 90% de ácido acético) a 2,5 mL do sobrenadante. Submeteu-se a mistura a banho maria (95°C) por 30 min. A leitura em espectrofotômetro foi realizada a 532 nm. A quantificação das proteínas foi realizada pelo método de Lowry²⁰. O valor de TBA foi quantificado em nmol de malonaldeído por miligrama de proteína (nmol malonaldeído/mg proteína).

Análise Estatística

Os resultados foram submetidos a tratamento estatístico por análise de variância e pós-teste de Tukey a 5% de significância ($p \leq 0,05$) utilizando o Programa R v. 2.10.1 (Development Core Team)²¹.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise estatística dos resultados referentes à Tabela 1 mostra diferença significativa entre os tratamentos ($p \leq 0,05$). Os grupos tratados com estressor (paraquat 10 mM e paraquat 15 mM) apresentaram níveis de sobrevivência celular estatisticamente inferiores ao controle, indicando morte celular causada pelo estressor. Este resultado mostra que concentrações de paraquat 10 mM e 15 mM exercem efeito citotóxico sobre células da levedura. Quando se analisa a adição da microalga *Spirulina* com o agente estressor paraquat (10 e 15 mM) verifica-se que a sobrevivência celular aumenta, chegando a valores estatísticos iguais ao tratamento controle.

Tabela 1. Sobrevivência celular para os diferentes tratamentos das células da levedura *Saccharomyces cerevisiae*

TRATAMENTOS	SOBREVIVÊNCIA CELULAR (Log UFC)
Controle	8,53 ± 0,06 ^a
Paraquat 10 mM	8,04 ± 0,05 ^b
Paraquat 15 mM	7,78 ± 0,16 ^b
Paraquat 10 mM + <i>Spirulina</i>	8,38 ± 0,09 ^a
Paraquat 15 mM + <i>Spirulina</i>	8,37 ± 0,06 ^a

*Letras diferentes indicam diferença estatística pelo teste de Tukey a 5% de significância

Os resultados de sobrevivência celular também foram analisados pela comparação dos valores percentuais de sobrevivência da levedura tratada somente com o paraquat, e tratada com esse agente estressor adicionado de *Spirulina*, como agente antioxidante. A contagem das Unidades Formadoras de Colônia (UFC) do tratamento controle representa 100% de sobrevivência, uma vez que não teve influência dos agentes

estressor e antioxidante. A sobrevivência celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae* tratada com paraquat foi de 39,4% e 17,1% quando usadas as concentrações 10 mM e 15 mM, respectivamente. A adição da *Spirulina* aos tratamentos elevou a sobrevivência para 54,8% e 57,8%, respectivamente, mostrando aumento 15,3% para a concentração 10 mM de paraquat e 40,8% para a concentração 15 mM (Figura 1).

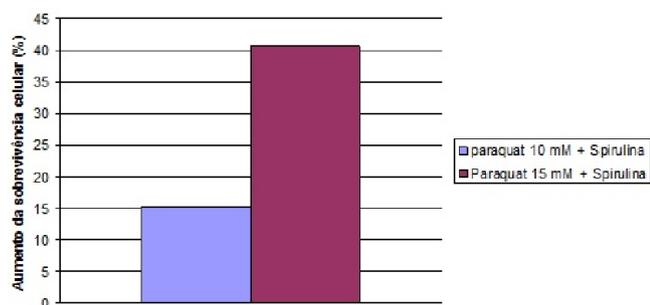


Figura 1. Aumento do percentual de sobrevivência da levedura *Saccharomyces cerevisiae* tratada com *Spirulina* em presença de paraquat

Resultados semelhantes, de aumento no percentual de sobrevivência da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, foram encontrados por Soares et al²² utilizando o estressor paraquat nas concentrações 10 mM e 15 mM e o BHT (butilhidroxitolueno) como agente antioxidante, sendo o aumento de 19,95% e 20,92% quando usadas as concentrações 10 e 15 mM, respectivamente.

O tratamento da levedura *Saccharomyces cerevisiae* com *Spirulina* e paraquat na concentração de 15 mM, mostrou aumento do percentual de sobrevivência (40,8%) superior ao valor experimental encontrados por Soares et al¹⁹ (32%), que testaram naringinina como antioxidante frente a apomorfina como agente estressor.

A *Spirulina* foi capaz de proteger as células da levedura dos danos oxidativos causados pelo paraquat em ambas as concentrações testadas, porém a atividade da *Spirulina* foi mais pronunciada quando se utilizou a concentração 15 mM de paraquat.

Os grupos que receberam o agente estressor (paraquat), em ambas as concentrações, apresentaram valores de TBA significativamente superiores aos tratamentos com *Spirulina platensis* (Tabela 2). Considerando que o TBA reflete a quantidade de malonaldeído, o aldeído individual mais abundante resultante da peroxidação lipídica²³, estes resultados indicam que o herbicida paraquat promove a peroxidação e a *Spirulina* atua minimizando este efeito deletério nas células da levedura.

Tabela 2. Índice de TBA da levedura *Saccharomyces cerevisiae* para os tratamentos com paraquat em presença e ausência de *Spirulina*

TRATAMENTOS	TBA* (nmol malonaldeído/mg de proteína)
Controle	6,64 ± 0,14 ^a
Paraquat 10 mM	9,58 ± 0,27 ^b
Paraquat 15 mM	9,86 ± 0,98 ^b
Paraquat 10 mM + <i>Spirulina</i>	5,35 ± 0,22 ^a
Paraquat 15 mM + <i>Spirulina</i>	5,81 ± 1,35 ^a

*Letras diferentes indicam diferença estatística pelo teste de Tukey, $p \leq 0,05$

O estresse oxidativo como componente do processo metabólico e a excitocidade são responsáveis pelo desenvolvimento de neurodegenerações^{24,25,26,27}. Estes eventos refletem um desequilíbrio entre espécies reativas de oxigênio (ERO) e sua degradação pelo sistema antioxidante^{28,29}. Este desequilíbrio pode ser originário de uma superprodução de ERO e/ou uma redução nas defesas antioxidantes^{30,31,32}.

A atuação da microalga *Spirulina* na manutenção dos parâmetros avaliados mostra uma atenuação dos radicais livres e dos danos gerados. Essa proteção antioxidante reforça a teoria de Pompella³³, que ressalta a importante relação entre a inclusão de antioxidantes na dieta e a diminuição do risco do desenvolvimento de doenças associadas ao acúmulo de radicais livres.

Estes resultados reforçam a ideia dos benefícios da utilização de antioxidantes em alimentos, cosméticos e medicamentos, que foram comprovados em diversas pesquisas^{4,34,35,36,37}, por este motivo existe a busca crescente em pesquisas relacionados com a capacidade antioxidante de compostos naturais, a fim de que possam vir a substituir os antioxidantes sintéticos como o BHT, sem prejuízo da capacidade antioxidante e sem os efeitos indesejáveis relatados para os mesmos³⁸.

CONCLUSÃO

O uso da *Spirulina* em células de levedura *Saccharomyces cerevisiae* tratadas com paraquat 10 e

15 mM aumentou a sobrevivência celular em 15,3% e 40,8%, respectivamente.

Os valores de TBA (medida de lipoperoxidação) encontrados para o tratamento com 10 mM de paraquat + *Spirulina* e 15 mM de paraquat + *Spirulina* foram significativamente inferiores aos tratados com paraquat 10 e 15 Mm e não diferiram do controle.

Os resultados de atenuação do estresse oxidativo da levedura *Saccharomyces cerevisiae* frente ao estressor 1,1'- dimetil - 4,4'- biperidílio (paraquat), pela *Spirulina*, corroboram com os resultados já existentes de seu potencial antioxidante.

REFERÊNCIAS

1. Hasler CM. Functional Foods for Health Program. Department of Food Science and Human Nutrition da University of Illinois. *Food Technol*. 1998; 52: 57-62.
2. Drodge W. Free radical in the physiological control of cell function. *Phys. Rev*. 2002; 41: 47-95.
3. Finkel T, Holbrook. *N J Nature* (London, U.K.) 2000; 408: 239-41.
4. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Rad. in Biol. and Med.* 3 ed. Clarendon. Oxford, 2000.
5. Bulkley GB. Free radicals and other reactive oxygen metabolites: clinical relevance and the therapeutic efficacy of antioxidant therapy. *Surgery*. 1993; 113: 479-483.
6. Smith P, Heath D. Paraquat. *CRC Crit. Rev. Toxicol*. 1976; 4: 411-45.
7. Farrington JA. Bipyridylum quaternary salts and related compounds. V. Pulse radiolysis studies of the reaction of paraquat radical with oxygen. Implications for the mode of action of bipyridyl herbicides. *Biochem. Biophys. Acta*. 1973; 314: 372-81.
8. Annapura VV, Deosthale Y G, Bamji M S. *Spirulina* as a source of vitamin A. *Plant Foods Hum. Nutr*. 1991; 41: 125-34.
9. Careri M, Furlattini L, Mangia A, Musc M, Anklam E, Theobald A et al. Supercritical fluid extraction for liquid chromatographic determination of carotenoids in *Spirulina* Pacifica algae: a chemometric approach. *J. Chromat*. 2001; 912: 61-71.
10. Reddy CM, Bhat VB, Kiranmai G, Reddy MN, Reddanna P, Madyastha KM. Selective inhibition of cyclooxygenase-2 by C-phycoyanin, a biliprotein from *Spirulina platensis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2000; 277: 599-603.
11. Richmond A. *Handbook of Microalgal Mass Culture*. Boston: CRC Press. ISBN 0-84933240-0. 1990.
12. Belay A. The potential application of *Spirulina* (*Arthrospira*) as a nutritional and therapeutic supplement in health management. *J. of the American Nutraceutical Assoc*. 2002; 5 (2): 27-48.
13. Henriques JAP, Dafré AL, Picada JN, Marisa AF, Salvador M. Espécies reativas de oxigênio e avaliação de antioxidante em sistemas biológicos. In: Serafini LA, Barros NM, Azevedo JL. *Biotecnol. na Agricult. e na Agroind. Guaíba: Agropecuária*. 2001; 1: 227-52.
14. Soares DG, Andrezza AC, Salvador M. Sequestering ability of butylated hydroxytoluene, propyl gallate, resveratrol, and vitamins C and E against ABTS, DPPH, and hydroxyl free radicals in chemical and biological systems. *J. Agric. Food Chem*. 2003; 51: 1077-80.
15. Espín JC, Soler-Rivas C, Wichers HJ. Characterization of the total free scavenger capacity of vegetable oils and oil fractions using 2,2 diphenyl- 1-picrylhydrazyl radical. *J. Agric. Food Chem*. 2000; 48: 648-56.
16. Benzie IFF, Szeto YT. Total antioxidant capacity of teas by the ferric reducing/ antioxidant power assay. *J. Agric. Food Chem*. 1999; 47: 633-6.
17. Farombi EO, Onyema OO. Monosodium glutamate-induced oxidative damage and genotoxicity in the rat: modulatory role of vitamin C, vitamin E and quercetin. *Hum. Exp. Toxicol*. 2006; 25: 251-9.
18. Diniz YS. Toxicity of hipercaloric diet and monosodium glutamate: oxidative stress and metabolic shifting in hepatic tissue. *Food Chemical Toxicol*. 2004; 42: 313-9.
19. Soares DG, Andrezza AC, Salvador M. Avaliação de compostos antioxidantes em células da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. *Brazilian J. of Pharm. Sci*. 2005; 41.
20. Lowry HO, Rosenbrough N J, Farr A L, Randall R J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem*. 1951; 193: 265-75.
21. Montgomery DC, Runger GC. *Applied statistics and probability for engineers*. Wiley.
22. Soares DG, Andrezza AC, Salvador M. *Saccharomyces cerevisiae* como modelo biológico para avaliação da capacidade antioxidante de compostos. *Rev. Bras. Farm*. 2004; 85: 45-7.
23. Esterbauer H, Cheeseman K. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynoneal. *Method. Enzymol*. 1990; 186: 407-8.
24. Rodrigues CM, Spellman SR, Sola S, Grande AW, Linehan-Stieers C, Low WC et al. Neuroprotection by a bile acid in an acute stroke model in the rat. *J. Cereb. Blood Flow Metab*. 2002; 22: 463-71.
25. Alexi T, Borlongan CV, Faull RL, Williams CE, Clark RG, Gluckman PD et al. Neuroprotective strategies for basal ganglia degeneration: Parkinson's and Huntington's diseases. *Prog. Neurobiol*. 2000; 60: 409-70.
26. Bruce-Keller AJ, Umberger G, Mcfall R, Mattson MP. Food restriction reduces brain damage and improves behavioral outcome following excitotoxic and metabolic insults. *Ann. Neurol*. 1999; 45: 8-15.
27. Mattson MP, Pedersen WA, Duan W, Culmsee C, Camandola S. Cellular and molecular mechanisms underlying perturbed energy metabolism and neuronal degeneration in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Ann. N.Y. Acad. Sci*. 1999; 893: 154-75.
28. Halliwell B, Gutteridge JM. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J*. 1984; 219: 1-14.
29. Freeman BA, Crapo JD. Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab. Invest*. 1982; 47: 412-26.
30. Ahmad M, Yousuf S, Khan MB, Hoda MN, Ahmad AS, Ansari MA et al. Attenuation by Nardostachys jatamansi of 6-hydroxydopamine-induced parkinsonism in rats: behavioral, neurochemical, and immunohistochemical studies. *Pharmacol. Biochem. Behav*. 2006; 83: 150-60.

31. Butterfield DA, Koppal T, Subramaniam R, Yatin S. Vitamin E as an antioxidant/free radical scavenger against amyloid beta-peptide-induced oxidative stress in neocortical synaptosomal membranes and hippocampal neurons in culture: insights into Alzheimer's disease. *Rev. Neurosci.* 1999; 10: 141-9.
32. Jenner P, Olanow CW. Oxidative stress and the pathogenesis of Parkinson's disease. *Neurol.* 1996; 47: 161-70.
33. Pompella A. Biochemistry and histochemistry of oxidant stress and lipid peroxidation. *Intern. J. Vitamin Nutrit. Res.* 1997. 67: 289-97.
34. Dalla Corte CL. Avaliação dos efeitos do tratamento crônico com neurolépticos e sua interação com substâncias potencialmente antioxidantes sobre parâmetros de estresse oxidativo no fígado e rim de ratos. [Dissertação de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Bioquímica Toxicológica]. Santa Maria – RS. Universidade Federal de Santa Maria. 2008.
35. Dani C, Pasquali MAB, Oliveira MR, Umezu FM, Salvador M, Henriques JAP et al. Protective effects of purple grape juice on carbon tetrachloride-induced oxidative stress in brain of adult wistar rats. *J. Med. Food.* 2008; 11: 55-61.
36. Wagner C, Fachineto R, Dalla Corte CL, Brito VB, Severo D, Dias GOC et al. Quercitrin, a glycoside form of quercetin, prevents lipid peroxidation in vitro. *Brain Res.* 2006; 192-8.
37. Ko SH, Choi SW, Ye SK, Cho BL, Kim HS, Chung MH. Comparison of the antioxidant activities of nine different fruits in human plasma. *J. Medic. Food.* 2005; 8: 41-6.
38. Zeiger E. Mutagenicity of chemicals added to food. *Mutation Res.* 1999; 250: 53-61.