



**Karina Schulz Borges**

**POTENCIAL ANTIOXIDANTE E EMBRIOTOXICIDADE DE  
FRUTOS E FOLHAS DE *Solanum betaceum* Cav. EM MODELO  
ZEBRAFISH (*Danio rerio*)**

**Lavras-MG**

**2021**

**KARINA SCHULZ BORGES**

**POTENCIAL ANTIOXIDANTE E EMBRIOTOXICIDADE DE FRUTOS E FOLHAS  
DE *Solanum betaceum* Cav. EM MODELO ZEBRAFISH (*Danio rerio*)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares, para obtenção do título de Doutora.

**Orientadora**

**Profa. Dra. Luciane Vilela Resende**

**Co-orientadora**

**Profa. Dra. Suzan Kelly Vilela Bertolucci**

**Lavras-MG**

**2021**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Borges, Karina Schulz.

Potencial antioxidante e embriotoxicidade de frutos e folhas de *Solanum betaceum* cav. em modelo zebrafish (*Danio rerio*) / Karina Schulz Borges. - 2020.

52 p.

Orientador(a): Luciane Vilela Resende.

Coorientador(a): Suzan Kelly Vilela Bertolucci, Luís David Solis Murgas.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2020.

Bibliografia.

1. Tomate de árvore. 2. Radicais livres. 3. Teratogênese. I. Resende, Luciane Vilela. II. Vilela Bertolucci, Suzan Kelly. III. Murgas, Luís David Solis. IV. Título.

**KARINA SCHULZ BORGES**

**POTENCIAL ANTIOXIDANTE E EMBRIOTOXICIDADE DE FRUTOS E FOLHAS DE *Solanum betaceum* Cav. EM MODELO ZEBRAFISH (*Danio rerio*)**

**ANTIOXIDANT POTENTIAL AND EMBRYOTOXICITY OF FRUITS AND LEAVES OF *Solanum betaceum* Cav. IN ZEBRAFISH MODEL (*Danio rerio*)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares, para obtenção do título de Doutora.

APROVADA em 28 de fevereiro de 2020.

Dr. Luís David Solis Murgas

Dra. Elisângela Elena Nunes Carvalho

Dr. Wilson Magela

Dr. Luís Felipe Lima e Silva

Profa. Dra. Luciane Vilela Resende

Orientadora

**LAVRAS-MG**

**2021**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à minha família, amigas e amigos por todo o apoio.

À Profa. Dra. Luciane Vilela Resende pela paciência, compreensão e orientação neste trabalho.

À minha co-orientadora Profa. Dra. Suzan Kelly Vilela Bertolucci pelos conhecimentos transmitidos e pela confiança na realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Luís David Solis Murgas pela orientação no desenvolvimento do segundo artigo e por ter disponibilizado o laboratório da Ala de Peixes do Biotério Central do Departamento de Medicina Veterinária.

Ao Dr. Alexandre Alves de Carvalho e ao Prof. Dr. Marcos Ferrante pelo auxílio com as análises estatísticas.

Aos avaliadores das bancas de qualificação e defesa pela disponibilidade e contribuições.

Aos coordenadores do programa de pós graduação em Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares por possibilitarem minha experiência com o doutorado.

À toda a turma com quem convivi nas disciplinas e no laboratório pela amizade e companheirismo, em especial à Krisnanda Castro por todo o auxílio.

Ao Setor de Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares e ao Laboratório de Fitoquímica e Controle de Qualidade pela estrutura oferecida para a realização de grande parte desta pesquisa.

À Universidade Federal de Lavras por proporcionar a existência dos programas de pós graduação.

À CAPES, FAPEMIG e CNPq pela concessão da bolsa de doutorado e apoio financeiro

# POTENCIAL ANTIOXIDANTE E EMBRIOTOXICIDADE DE FRUTOS E FOLHAS DE *Solanum betaceum* Cav. EM MODELO ZEBRAFISH (*Danio rerio*)

## RESUMO GERAL

O tomate de árvore é um importante recurso andino para alimentação e uso medicinal e com grande potencial de cultivo e aceitação no Brasil. É um fruto muito versátil, que pode ser consumido *in natura* ou processado em diversos produtos alimentícios. Para um bom aproveitamento da espécie *Solanum betaceum* no Brasil, são necessários estudos tanto da composição fitoquímica dos frutos produzidos localmente, como de técnicas de cultivo e adaptação da espécie ao clima tropical. Foram avaliados os teores de compostos fenólicos e o potencial antioxidante de três diferentes acessos de plantas de tomate de árvore cultivadas no Brasil, com frutos de cor amarela, vermelha e roxa, que se diferenciaram fitoquimicamente em relação aos mecanismos de ação antioxidante, o que indica a importância da conservação do germoplasma dos diferentes acessos. De acordo com os testes realizados, os frutos de polpa roxa e amarela apresentaram os melhores potenciais antioxidantes, devendo ser incentivado seu consumo pela população, uma vez que o vermelho é o mais tradicional. Entre os solventes utilizados, a água não foi um extrator com bom rendimento, entretanto pode ser que em um organismo vivo a água apresente melhor biodisponibilidade dos compostos fenólicos. Foram avaliados também o potencial antioxidante e os efeitos toxicológicos em embriões de *zebrafish* dos extratos folhas e frutos de *S. betaceum*. As folhas de *S. betaceum* possuem elevado potencial antioxidante e, ao mesmo tempo, alta toxicidade no desenvolvimento de embriões de *zebrafish*. O uso das folhas pela medicina popular é feito de forma tópica, assim, provavelmente, os efeitos terapêuticos antiinflamatórios dos compostos fenólicos podem ser obtidos de forma mais segura do que com a ingestão da mesma. Os frutos, que compõe a alimentação tradicional da população andina, apresentaram menor atividade antioxidante e efeitos deletérios mais baixos nos embriões. Este trabalho se configura como uma base inicial de estudos farmacológicos da espécie *S. betaceum* em modelo animal, possibilitando o planejamento de um estudo futuro sobre o efeito terapêutico do tomate de árvore.

**Palavras-chave:** Tomate de árvore. Tamarillo. Radicais livres. Espectrofotometria. Índice teratogênico.

**PHENOLIC COMPOSITION, ANTIOXIDANT ACTIVITY AND  
EMBRYOTOXICITY OF FRUITS AND LEAVES OF *Solanum betaceum* Cav.  
(TREE TOMATO)**

**ABSTRACT**

The tree tomato is an important Andean resource for food and medicinal use and has great potential for cultivation and acceptance in Brazil. It is a very versatile fruit, which can be consumed fresh or processed into various food products. For a good use of the species *Solanum betaceum* in Brazil, are studies both of the phytochemical composition of the fruits obtained locally, as well as of cultivation techniques and adaptation of the species to the tropical climate. The contents of phenolic compounds and the antioxidant potential of three different accessions of tree tomato plants grown in Brazil were obtained, with yellow, red and purple fruits, which differed phytochemically in relation to the mechanisms of antioxidant action, which indicates the importance of conserving the germplasm of the different accessions. According to the tests carried out, the purple and yellow pulp fruits have the best potential antioxidants, and their consumption should be encouraged by the population, since red is the most traditional. Among the solvents used, water was not a good extractor, however it may be that in a living organism the water presents better bioavailability of phenolic compounds. Also taken were the antioxidant potential and toxicological effects in zebrafish embryos of the leaf and fruit extracts of *S. betaceum*. Like *S. betaceum* leaves they have high antioxidant potential and, at the same time, high toxicity in the development of zebrafish embryos. The use of leaves by folk medicine is done topically, probably, the therapeutic anti-inflammatory effects of phenolic compounds can be obtained more safely than with their ingestion. The fruits, which make up the traditional diet of the eina population, have less antioxidant activity and lower harmful effects on embryos. This work is configured as an initial basis for pharmacological studies of the species *S. betaceum* in an animal model, allowing the planning of a future study on the therapeutic effect of tree tomatoes.

**Keywords:** Tree tomato. Tamarillo. Free radicals. Spectrophotometry. Teratogenic index.

## SUMÁRIO

<b>PRIMEIRA PARTE .....</b>	<b>8</b>
<b>1 Introdução .....</b>	<b>8</b>
<b>2 Referencial teórico .....</b>	<b>10</b>
2.1 <i>Solanum betaceum</i> Cav. ....	10
2.2 Metabolismo Secundário .....	11
2.3 Compostos fenólicos .....	13
2.4 Atividade antioxidante.....	13
2.5 Toxicidade do tomate de árvore .....	15
2.6 Fitotoxicidade .....	15
2.7 <i>Zebrafish</i> como modelo experimental .....	16
2.8 Considerações finais .....	18
Referências .....	19
<b>SEGUNDA PARTE - ARTIGOS .....</b>	<b>22</b>
<b>Artigo 1: Potencial antioxidante de frutos de <i>Solanum betaceum</i> Cav. com polpas amarela, vermelha e roxa .....</b>	<b>22</b>
1 INTRODUÇÃO .....	24
2 MATERIAL E MÉTODOS .....	26
2.1 Equipamentos e reagentes .....	26
2.2 Obtenção do material vegetal.....	26
2.3 Preparo dos extratos .....	26
2.4 Determinação dos fenóis totais .....	27
2.5 Quantificação de flavonoides .....	27
2.6 Capacidade antioxidante total .....	27
2.7 Atividade de captura de radicais livres DPPH .....	28
2.8 Atividade de captura de radicais livres ABTS .....	28
2.9 Capacidade de captura do radical oxigênio (ORAC).....	29
2.10 Determinação do poder redutor.....	29
2.11 Análise estatística.....	30
3 RESULTADOS .....	31
4 DISCUSSÃO .....	36
5 CONCLUSÃO .....	37
REFERÊNCIAS .....	38
<b>Artigo 2: Potencial antioxidante e embriotoxicidade de <i>Solanum betaceum</i> Cav. em modelos <i>zebrafish</i> (<i>Danio rerio</i>) .....</b>	<b>41</b>
1 INTRODUÇÃO .....	43
2 MATERIAL E MÉTODOS .....	45

2.1 Material vegetal.....	45
2.2 Ensaio antioxidante .....	45
2.2.1 Preparo dos extratos.....	45
2.2.2 Determinação dos fenóis totais.....	46
2.2.3 Quantificação de flavonoides.....	46
2.2.4 Capacidade antioxidante total.....	46
2.2.5 Atividade de captura de radicais livres DPPH.....	47
2.2.6 Atividade de captura de radicais livres ABTS .....	47
2.3 Ensaio de embriotoxicidade .....	48
2.3.1 Manejo das matrizes zebrafish e instalações .....	48
2.3.2 Obtenção dos embriões .....	48
2.3.3 Teste de toxicidade aguda em embriões.....	49
2.3.4 Avaliações do índice teratogênico .....	49
2.3.5 Avaliação da curva dose-resposta .....	50
2.4 Análise estatística.....	51
3 RESULTADOS.....	52
3.1 Compostos fenólicos e atividade antioxidante.....	52
3.2 Teste de toxicidade aguda .....	52
4 DISCUSSÃO .....	56
5 CONCLUSÃO .....	57
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58

## 1 INTRODUÇÃO

*Solanum betaceum* Cav. (sin. *Cyphomandra betacea* Sendt.) é uma espécie nativa dos Andes tradicionalmente cultivada para produção de frutos destinados ao consumo *in natura* em alguns países da América latina, como Peru, Bolívia, Colômbia, Equador e Venezuela. Os frutos de sabor agridoce são conhecidos como tomate de árvore ou ‘tamarillo’ e, além de serem consumidos frescos, são muito versáteis e podem ser transformados em sucos, geleias, doces, saladas, picles, molhos e podem ser cozidos, assados ou grelhados (Acosta-Quezada et al., 2015; Kinupp & Lorenzi, 2014).

O suco dos frutos maduros de tomate de árvore possui uso pela medicina popular no Equador, em casos de amigdalite, colesterol alto e dor estomacal (Tene et al., 2007). Na Colômbia, a polpa dos frutos, depois de cozida em brasas, pode ser usada como cataplasma para amígdalas inflamadas. Na Costa Rica, os frutos frescos são consumidos em jejum em casos de gripe e também são usados como remédio para problemas hepáticos. As folhas de *S. betaceum* também são consideradas medicinais, sendo aquecidas para uso tópico no pescoço, envolvendo a garganta em casos de inflamações das amígdalas, e no peito, para dores anginas (Bohs, 1989; INTA, 2009).

No Brasil, o tomate de árvore possui um caráter exótico e é geralmente cultivado em quintais sem fins comerciais, caracterizando-se como uma hortaliça não convencional, e suas qualidades medicinais, nutricionais e tecnológicas são pouco conhecidas (Pantoja et al., 2009; Kinupp & Lorenzi, 2014). Neste trabalho foram avaliados pela primeira vez o potencial antioxidante e fitotoxicidade de diferentes cultivares de frutos e folhas de *S. betaceum* cultivados no Brasil. O tomate de árvore apresenta variações em sua composição fitoquímica devido à diferenças nas condições geográficas e ambientais (Acosta-Quezada et al., 2015), o que torna importante avaliar plantas cultivadas no país.

Além disso, não foi encontrado nenhum trabalho científico que avalie o efeito terapêutico das folhas e, apesar do largo consumo dos frutos e uso medicinal externo das folhas por diversas populações, estudos sobre a toxicidade do tomate de árvore são raros. Dessa forma, foram feitos dois estudos com a espécie *S. betaceum*: um que avalia o potencial antioxidante de três tipos de frutos com polpas de diferentes cores, provenientes de plantas cultivadas no Brasil, e outro que avalia o potencial antioxidante das folhas e frutos de polpa vermelha e seu efeito de toxicidade em embriões de *zebrafish*.

O potencial antioxidante foi avaliado através de diversos ensaios a fim de se ter uma melhor representatividade do que ocorre nas células do organismo vivo, onde diferentes

mecanismos de ação protegem do efeito dos radicais livres. O teste de fitotoxicidade foi realizado com o modelo animal *zebrafish* (*Danio rerio*), uma vez que o teste *in vivo* está mais intimamente correlacionado com a toxicidade em humanos e, de forma mais fidedigna, incorpora farmacocinética, absorção, distribuição e metabolismo. Além disso, o *zebrafish* apresenta diversas vantagens que favorecem estudos sobre os efeitos farmacológicos de plantas: tamanho pequeno, ciclo de vida curto, rápido desenvolvimento, fecundidade, transparência dos ovos e embriões que permite observar os órgãos internos, são animais de fácil manutenção e comportamento facilmente observável (Zon et al., 2005).

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 *Solanum betaceum* Cav.

*Solanum betaceum* Cav. pertence à família Solanaceae e se caracteriza como um arbusto ereto, perene, sublenhoso, com poucas ramificações, altura entre 2,5 a 4,5 m. Possui folhas simples, alternas, inteiras ou lobadas, de 20-35 cm de comprimento. As flores são andróginas, perfumadas, cor de rosa, reunidas em racemos axilares pedunculados. Os frutos (figura 1) são do tipo baga ovalada, de casca lisa, vermelho-vinácea ou alaranjada, com comprimento de 8-12 cm, com uma polpa amarela suculenta e muitas sementes (Kinupp & Lorenzi, 2014).

Figura 1. Frutos de tomate de árvore. Fonte: do autor.



*S. betaceum* é uma espécie nativa dos Andes, de clima subtropical, sendo a faixa de temperatura ideal para seu cultivo entre 14 e 20°C. Frequentemente é cultivado em zonas de grande altitude e clima seco (se desenvolvem melhor entre 1000 a 3000 m acima do nível do mar). Em altitudes inferiores a 1000 m a frutificação é menor porque a temperatura durante a noite não é suficientemente baixa e, apesar da altitude, não tolera ventos fortes pois podem ocasionar a queda das flores. O arbusto do tomate de árvore se desenvolve melhor em solos de textura média, com boa drenagem e presença de matéria orgânica. A frutificação começa com cerca de 2 anos após a sementeira, se tornando intensa por volta dos 4 a 5 anos e pode produzir por até 12 anos (INTA, 2009).

Tradicionalmente, o tomate de árvore é cultivado há séculos para produção de frutos destinados ao consumo *in natura* em alguns países da América latina, como Peru, Bolívia, Colômbia, Equador e Venezuela. No Brasil, possui um caráter exótico e é cultivado em quintais sem fins comerciais, caracterizando-se como uma hortaliça não convencional, e suas qualidades medicinais, nutricionais e tecnológicas são pouco conhecidas no país (Pantoja et

al., 2009; Kinupp & Lorenzi, 2014). Assim como diversas hortaliças não convencionais, os frutos de tomate de árvore podem ser comercializados sazonalmente em feiras e mercados locais por pequenos agricultores (MAPA, 2010).

Além de ser consumido fresco como fruta, o tomate de árvore pode ser transformado em sucos, geleias, doces, saladas, picles, molhos e pode ser cozido, assado ou grelhado (Kinupp & Lorenzi, 2014). O suco dos frutos maduros também possui uso pela medicina popular no Equador, em casos de amigdalite, colesterol alto e dor estomacal (Tene et al., 2007). Na Colômbia, a polpa dos frutos, depois de cozida em brasas, pode ser usada como cataplasma para amígdalas inflamadas. Na Costa Rica, os frutos frescos são consumidos em jejum em casos de gripe e também são usados como remédio para problemas hepáticos. As folhas de *S. betaceum* também são aquecidas para uso tópico no pescoço, envolvendo a garganta externamente em casos de inflamações das amígdalas, e em cataplasmas no peito para dores anginas (Bohs, 1989; INTA, 2009).

O tomate de árvore possui variedades que podem ser classificadas de acordo com a cor dos frutos e sua polpa, variando entre amarelo, alaranjado, vermelho e roxo. A escolha da variedade está relacionada à preferência do mercado, dos consumidores e o lugar onde será vendido o produto (INIAP, 2008). Estudos científicos demonstram que há uma grande variação na composição fitoquímica do tomate de árvore relacionada às diferenças de variedades/cores de fruto, além de outros aspectos como maturidade do fruto, partes dos frutos (casca, polpa, mucilagem, sementes), genética, condições geográficas e ambientais (Wang et al., 2020; Espin et al., 2016; Acosta-Quezada et al., 2015; Vasco et al., 2009).

O tomate de árvore possui baixo teor de calorias e possui um teor mínimo de gordura. O fruto é uma fonte de fibras alimentares, minerais (por exemplo, potássio, fósforo, magnésio, cálcio, cobre, ferro e zinco), vitaminas, proteínas, carboidratos solúveis (glicose, frutose e sacarose), ácidos orgânicos (como ácidos málico e cítrico), carotenoides, antocianinas e outros compostos fenólicos (Giuffrida et al., 2018; Espin et al., 2016; Acosta-Quezada et al., 2015; Nascimento et al., 2015; Osorio et al., 2012; Mertz et al., 2010; Hurtado et al., 2009).

## **2.2 Metabolismo Secundário**

O metabolismo é o conjunto de reações químicas que estão continuamente ocorrendo nas células. Sendo o metabolismo secundário derivado das rotas bioquímicas da fotossíntese, este é um processo exclusivo do Reino Vegetal. Estes compostos, denominados metabólitos secundários, são os princípios ativos vegetais de grande importância para a saúde humana e justificam os usos terapêuticos das plantas medicinais. Dentre os metabólitos secundários

conhecidos estão os alcaloides, lignanas, ligninas, cumarinas, antraquinonas, taninos hidrolisáveis e condensados, flavonoides, ácidos fenólicos, óleos voláteis, saponinas, heterosídeos cardiotônicos, ácidos graxos (Simões et al., 2003).

No organismo vegetal já foram reconhecidas várias funções dos metabólitos secundários: defesa contra herbívoros e microorganismos, proteção contra raios UV, atração de animais polinizadores e dispersores de sementes, alelopatia (Simões et al., 2003). Os metabólitos secundários representam, pois, uma interface química entre as plantas e o ambiente, sendo sua síntese frequentemente afetada por fatores ambientais. Há evidências científicas de diversos fatores que influenciam a composição fitoquímica de espécies vegetais, tais como: sazonalidade (o teor do princípio ativo pode variar de acordo com as estações do ano), ritmo circadiano (o acúmulo dos metabólitos secundários pode variar durante o ciclo dia/noite), idade e desenvolvimento da planta, diferentes órgãos vegetais, temperatura (considerando variações anuais, mensais e diárias), disponibilidade hídrica (a ocorrência de estresse hídrico pode levar a um aumento momentâneo na concentração dos metabólitos, enquanto a chuva contínua pode resultar na perda de substâncias hidrossolúveis das folhas e raízes por lixiviação), intensidade da radiação ultravioleta, disponibilidade de nutrientes no solo, altitude, composição atmosférica, ataque de patógenos ou herbívoros (Gobbo-Neto & Lopes, 2007).

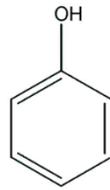
Especificamente sobre os compostos fenólicos, existe uma correlação positiva entre intensidade de radiação solar e produção destes princípios ativos, como flavonoides, taninos e antocianinas. Estes compostos são pigmentos vegetais que absorvem determinados espectros de luz e conferem proteção contra a foto-destruição através da absorção e dissipação da energia solar, reduzindo os danos nos tecidos mais internos causados pela radiação UV. Os flavonoides, por exemplo, são acumulados principalmente em tecidos superficiais - como epiderme, pelos e cutícula - e funcionam como filtros UV, uma vez que absorvem radiação UV-B sem alterar a radiação fotossinteticamente ativa, além de atuarem como antioxidantes e captadores de radicais livres (Gobbo-Neto & Lopes, 2007).

### **2.3 Compostos fenólicos**

Os compostos fenólicos ou fenois são os antioxidantes mais abundantes presentes na natureza e compõe uma classe de substâncias que possui no mínimo um anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos (figura 2). Dentro da classificação, os compostos fenólicos dividem-se entre ácidos fenólicos e flavonoides e são produzidos pelo metabolismo secundário das plantas. São sintetizados através de duas rotas bioquímicas: via do ácido

chiquímico a partir de carboidratos ou via do acetato-polimalato, que inicia pela acetil-coenzima A e malonil-coenzima A. Estão amplamente distribuídos no reino vegetal, sendo essenciais para o crescimento e reprodução das plantas, compondo as moléculas de ácidos fenólicos, derivados de cumarina, pigmentos hidrossolúveis de flores, frutos e folhas, ligninas e taninos (Boroski et al., 2015; Simões et al., 2003).

Figura 2. Representação da estrutura química do fenol, grupamento básico para formação dos compostos fenólicos. Fonte: Boroski et al. (2015).



Evidências sugerem que doenças causadas pelas reações oxidativas em sistemas biológicos podem ser retardadas pela ingestão de antioxidantes naturais encontrados na dieta, principalmente os compostos fenólicos (Simões et al., 2003). Dessa forma, os fenóis são responsáveis por parte dos benefícios para a saúde adquiridos pela ingestão de frutas e hortaliças, por exemplo, devido ao fato de que o stress oxidativo induzido pelos radicais livres estão envolvidos nas causas de várias doenças crônicas e são reduzidos por tais compostos bioativos (Boroski et al., 2015).

O tomate de árvore tem demonstrado uma alta capacidade antioxidante relacionada à presença de compostos fenólicos, que conferem a este fruto atividades biológicas como antinociceptivo, anti-inflamatório, anticâncer e anti-obesidade (Wang et al., 2020). Acosta-Quezada et al. (2015) estudaram cinco grupos de *S. betaceum* com cores de polpa entre laranja, vermelha e roxa de plantas cultivadas em países latino-americanos. O conteúdo total de fenóis detectado pelo ensaio de Folin-Ciocalteu variou de 2,4 a 6,2 g equivalentes de ácido clorogênico 100g<sup>-1</sup> de peso seco e a diferença dos teores de fenóis totais entre os frutos de diferentes cores de polpa foi significativa. Outra pesquisa com frutos de tomate de árvore nas cores amarelo-dourado e vermelho-púrpura provenientes do Equador encontrou um teor de fenóis totais entre 125 e 187 mg equivalentes de ácido gálico 100 g<sup>-1</sup> de peso fresco, respectivamente (Vasco et al., 2008).

#### 2.4 Atividade Antioxidante

Os antioxidantes em alimentos são caracterizados como substâncias que podem retardar ou inibir as reações de oxidação provocadas pelas espécies reativas de oxigênio

(EROs), que são resultantes da ativação ou redução do oxigênio molecular. As principais espécies reativas de oxigênio são: ânion superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), radical peroxila ( $ROO^\cdot$ ), radical hidroxila ( $OH^\cdot$ ), oxigênio singleto ( $^1O_2$ ) e radical peroxinitrito ( $ONOO^\cdot$ ). As reações de oxidação são de natureza radicalar com propagação em cadeia envolvendo o oxigênio e outras substâncias, como lipídios e proteínas, resultando na formação de radicais livres (Boroski et al., 2015).

Algumas EROs exercem funções metabólicas vitais para o corpo humano, como mediar processos neurotransmissores ou ativar uma resposta imunológica anti-inflamatória (Boroski et al., 2015). Porém, se houver produção excessiva de radicais de oxigênio durante os processos fisiológicos ou devido a fatores ambientais adversos e não existirem antioxidantes disponíveis no sistema biológico, ocorre o estresse oxidativo e pode haver danos nos tecidos, o que também está ligado aos processos de envelhecimento do organismo. Há uma série de doenças entre as quais câncer, aterosclerose, diabetes, artrite, malária, AIDS, doenças do coração, que podem estar ligadas aos danos causados pelas EROs (Angelo & Jorge, 2007; Lajolo et al., 2006; Waszczynskyj & Degspári, 2004).

Nos organismos vivos, os antioxidantes estão presentes em baixas concentrações, se comparadas ao substrato oxidável, e atuam na prevenção da oxidação. Em nível molecular os antioxidantes podem atuar inibindo a formação, capturando as EROs ou inibindo as enzimas oxidativas (Boroski et al., 2015). A ação dos compostos fenólicos como antioxidantes ocorre por meio do mecanismo de doação de hidrogênio e/ou transferência de elétrons para o radical livre, sendo assim chamados de sequestradores de radicais livres. O número de hidroxilas presentes nos compostos fenólicos, bem como a sua localização, tem influência direta na sua atuação como antioxidante (Angelo & Jorge, 2007).

Estudos realizados com plantas cultivadas na Colômbia, Equador e outros países latino americanos avaliaram o potencial antioxidante de frutos de tomate de árvore por diferentes ensaios fitoquímicos, a fim de se determinar os diferentes mecanismos de ação. Os resultados mostraram que o tomate de árvore apresentou um amplo espectro de potencial antioxidante (Wang et al., 2020). Dentre os testes realizados, os ensaios de captura dos radicais DPPH e ABTS avaliam o mesmo mecanismo de transferência eletrônica, no qual os compostos antioxidantes doam um átomo de hidrogênio para o radical oxidado (Ozgen et al., 2006). O teste ORAC avalia a capacidade de absorção de radicais peroxila pelos compostos da amostra e tem como vantagem o fato de usar uma espécie reativa de oxigênio presentes nos organismos vivos, conferindo maior significado biológico ao ensaio. O teste de Capacidade Antioxidante Total quantifica os compostos com poder antioxidante equivalente ao ácido

ascórbico presentes na amostra. O ácido ascórbico é um sequestrador muito eficaz de radicais, tais como o ânion superóxido, o radical hidroxila, o peróxido de hidrogênio e o oxigênio singlete (Sucupira, 2012). O método denominado Poder Redutor, analisa o poder de redução dos antioxidantes na presença de íons de ferro (Boroski et al., 2015).

Ao realizar os ensaios antioxidantes, alguns fatores podem alterar os resultados. Um deles é a natureza do solvente empregado para a extração da amostra, que influencia o tipo dos compostos químicos extraídos em função da solubilidade. Devido à polaridade dos compostos fenólicos, utilizam-se comumente em um mesmo ensaio diferentes solventes hidrofílicos, como o metanol e o etanol, e misturas destes a diferentes proporções com água. Como a extração em meio aquoso reflete a maneira mais real de consumo do alimento do que a utilização de outros solventes orgânicos, a água como líquido extrator tem sido um dos tratamentos considerados nos estudos fitoquímicos (Boroski et al., 2015).

## 2.5 Toxicidade do tomate de árvore

Apesar do largo consumo dos frutos e uso medicinal das folhas por diversas populações, estudos sobre a toxicidade do tomate de árvore são raros e não foi encontrada nenhuma pesquisa com as folhas. Há um caso de alergia relatado que mostrou que o consumo de frutos de tomate de árvore desencadeou urticária em 24 horas. As proteínas de ligação IgE possivelmente representam as proteínas alergênicas do tomate de árvore (Tiwari & Wolber, 2011). Para o nível de toxicidade em linhas celulares normais, os extratos do fruto foram em grande parte não citotóxicos para as células normais com um  $IC_{50}$  de  $> 200,00 \mu\text{g mL}^{-1}$  (Mutalib et al., 2017). Em um teste com animais, o tratamento diário de ratos *Sprague Dawley* machos com extrato dos frutos na dose de  $300 \text{ mg kg}^{-1}$  por 7 semanas não mostrou toxicidade (Abdul Kadir et al., 2015).

## 2.6 Fitotoxicidade

O consumo de muitas plantas alimentícias e medicinais possui sua segurança comprovada pelo seu tempo de uso tradicional pelas populações. A avaliação toxicológica, entretanto, é importante para identificar possíveis efeitos adversos em seres humanos e facilitará também o desenvolvimento de fitoterápicos derivados da espécie vegetal estudada. Nas últimas décadas, a consideração ética do uso de vertebrados superiores para testes de toxicidade levou à busca de modelos alternativos envolvendo vertebrados inferiores, como o *zebrafish*. O modelo animal *zebrafish* já foi aplicado em diversos estudos de toxicologia fitoterápica cujos tratamentos foram realizados com fórmulas poliherbais, extratos brutos,

compostos farmacêuticos e constituintes isolados, sendo reconhecido como um modelo eficaz para estudos toxicológicos de plantas (Jaysinghe & Jayawardena, 2019).

Modelos animais em testes de toxicologia tem uma enorme vantagem em relação aos testes *in vitro*, uma vez que o animal está mais intimamente correlacionado com a toxicidade em humanos e, de forma mais fidedigna, incorpora farmacocinética, absorção, distribuição e metabolismo. Dentre eles, o modelo de toxicidade embrionária do *zebrafish*, devido à alta conservação genética com os humanos (87% de semelhança), tem sido amplamente utilizado em triagens do efeito tóxico de compostos bioativos e, mais recentemente, em avaliações toxicológica de fitoterápicos (Jaysinghe & Jayawardena, 2019).

O embrião em desenvolvimento é geralmente considerado o estágio mais sensível do ciclo de vida de um peixe. Os ensaios de embriotoxicidade com *zebrafish* são geralmente realizados por meio da exposição direta de embriões a substâncias tóxicas (Hallare et al., 2006). Estudos prévios revelam que a sensibilidade de embriões e larvas a agentes químicos é muito maior que para adultos (Luckenbach et al., 2001). Devido a sua imobilidade, os embriões são mais afetados que os adultos e por apresentarem uma imaturidade fisiológica possuem baixos níveis de enzimas necessárias para a desintoxicação.

O teste FET (*Fish Embryonic Toxicity*) (OECD, 2013), realizado com o *zebrafish*, apresenta diversas vantagens que favorecem estudos sobre os efeitos farmacológicos de plantas: tamanho pequeno, ciclo de vida curto, rápido desenvolvimento, fecundidade, transparência dos ovos e embriões que permite observar os órgãos internos, são animais de fácil manutenção e comportamento facilmente observável (Zon et al., 2005).

## **2.7 *Zebrafish* como modelo experimental**

O peixe *Danio rerio* (*zebrafish* ou paulistinha) tornou-se um modelo experimental amplamente utilizado em diversas áreas de pesquisa devido a sua similaridade morfológica e fisiológica com os mamíferos e pelas vantagens que apresenta: um genoma completamente sequenciado, rápido desenvolvimento embrionário extrauterino, desenvolvimento dos órgãos nos seus estágios iniciais que em outros modelos experimentais são inacessíveis, transparência da larva que torna possível visualizar uma grande variedade de fenótipos e processos da embriogênese. Além disso, os indivíduos adultos são de pequeno porte, fácil manutenção, possuem um comportamento facilmente observável e quantificável e uma alta taxa reprodutiva, proporcionando que até mesmo uma pequena instalação de *zebrafish* possa

gerar milhares de embriões por dia, facilitando os trabalhos com análises genéticas ou químicas baseadas em fenótipos em larga escala (Zon et al., 2005).

O *zebrafish* é considerado modelo experimental para humanos por apresentar 70% de homologia genética com os mamíferos e apresentar 85% dos genes que estão associados a causas de doenças no homem. Este peixe se estabeleceu com uma fisiologia complexa e comparável em muitos casos com a dos humanos adultos, como a notável homologia fisiológica e farmacológica que foi demonstrada não apenas para parâmetros simples, como frequência cardíaca, contratilidade e fluxo sanguíneo, mas também para um repertório de fenótipos de maior resolução, como despolarização, repolarização, manipulação de  $Ca^{2+}$  em diferentes compartimentos subcelulares, bem como respostas transcricionais clássicas, como a dos peptídeos natriuréticos em hipertrofia ou insuficiência cardíaca (Deo et al., 2011).

O desenvolvimento embrionário em teleósteos é um processo que se inicia na fertilização e finaliza na eclosão, envolvendo os períodos de zigoto, clivagem, blástula, gástrula, segmentação e organogênese. Trata-se de um fenômeno complexo que permite estudar a ontogenia das espécies e pode se utilizar em processos biotecnológicos, em bioindicação e em experimentos toxicológicos (Botero, 2004). Na maioria dos casos, os resultados obtidos em um ensaio de fase de vida precoce é capaz de refletir os efeitos que seriam obtidos em um ciclo de vida.

### 3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O tomate de árvore é um importante recurso andino para alimentação e uso medicinal e com grande potencial de cultivo e aceitação no Brasil. É um fruto muito versátil, que pode ser consumido *in natura* ou processado em diversos produtos alimentícios, como geleias, molhos, sucos e sorvetes. No entanto, ainda é uma espécie pouco estudada, tanto fitoquimicamente quanto em aspectos agronômicos. Para um bom aproveitamento da espécie *S. betaceum* no Brasil, são necessários estudos tanto da composição fitoquímica dos frutos produzidos localmente, como de técnicas de cultivo e adaptação da espécie ao clima tropical.

O uso de embriões e larvas de *Zebrafish* oferece uma alternativa barata e eficaz ao estudo de fitotoxicidade, pois são organismos que ainda não se alimentam e, quando utilizados em testes de toxicidade, requerem pequena quantidade da substância teste, o que é particularmente importante quando estão disponíveis apenas uma quantidade limitada de amostra. Além disso, os resultados dos testes de embriotoxicidade são de grande importância como estudos pré clínicos uma vez que indicam a concentração dos extratos vegetais que podem ser aplicados em estudos com seres humanos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDUL KADIR, N. A. A.; RAHMAT, A.; JAAFAR, H. Z. E. Protective effects of tamarillo (*Cyphomandra betacea*) extract against high fat diet induced obesity in sprague-dawley rats. **Journal of Obesity**, v. 2015, 2015.
- ACOSTA-QUEZADA, P. G.; RAIGÓN, M.D.; RIOFRIO-CUENCA, T.; GARCIA-MARTINEZ, M.D.; PLAZAS, M.; BURNEO, J.I.; FIGUEROA, J.G.; VILANOVA, S.; PROHENS, J. Diversity for chemical composition in a collection of different varietal types of tree tomato (*Solanum betaceum* Cav.), an Andean exotic fruit. **Food Chemistry**, v. 169, p. 327–335, 2015.
- ANGELO, P.M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 1-9, 2007.
- BOHS, L. Ethnobotany of the genus *Cyphomandra* (Solanaceae). **Economic Botany**, v.43, p. 143-163, 1989.
- BOTERO, M. A. Comportamiento de los peces en la búsqueda y la captura del alimento. **Rev. Col. Cienc. Pec.**, v. 17, n.1, 2004.
- BOROSKI, M.; VISENTAINER, J.V.; COTTICA, S.M.; MORAIS, D.R. **Antioxidantes: princípios e métodos analíticos**. 1 ed. Ed. Appris, Curitiba-PR, 2015.
- DEO, R. C.; MACRAE, C. A. The zebrafish: scalable *in vivo* modeling for systems biology. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine**, v. 3, n. 3, p. 335-346, 2011.
- ESPIN, S.; GONZALEZ-MANZANO, S.; TACO, V.; POVEDA, C.; AYUDA-DURÁN, B.; GONZALEZ-PARAMAS, A.M.; SANTOS-BUELGA, C. Phenolic composition and antioxidant capacity of yellow and purple-red Ecuadorian cultivars of tree tomato (*Solanum betaceum* Cav.). **Food Chemistry**, v. 194, p. 1073-1080, 2016.
- GIUFFRIDA, D.; ZOCCALI, M.; ARIGÓ, A.; CACCIOLA, F.; ROA, C.O.; DUGO, P.; MONDELLO, L. Comparison of different analytical techniques for the analysis of carotenoids in tamarillo (*Solanum betaceum* Cav.). **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 646, p. 161-167, 2018.
- GOBBO-NETO, L.; LOPES, N.P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Quim. Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.
- HALLARE, A.; NAGEL, K.; KOHLER, H-R.; TRIEBSKORN, R. Comparative embryotoxicity and proteotoxicity of three carrier solvents to zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 63, n. 3, p. 378-388, 2006.
- HURTADO, N. H.; MORALES, A.L.; GONZALEZ-MIRET, M.L.; ESCUDERO-GILETE, L.; HEREDIA, F.J. Colour, pH stability and antioxidant activity of anthocyanin rutosides isolated from tamarillo fruit (*Solanum betaceum* Cav.). **Food Chemistry**, v. 117, n. 1, p. 88-93, 2009.

INIAP (Instituto Nacional Autonomo de Investigaciones Agropecuarias). **Estudio de las posibilidades agroindustriales del tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav.)**. Quito, Ecuador, 2008.

INTA (Instituto Nacional de Innovación y Transferencia en Tecnología Agropecuaria). **Cultivo de Tomate de Árbol (*Cyphomandra betacea*) – Area: manejo integrado de cultivo/frutales de altura**. San José, Costa Rica, 2009.

KINUPP, V. F.; LORENZI, H. Plantas alimentícias não convencionais (PANC) no Brasil. São Paulo: **Instituto Plantarum de Estudos da Flora**, 2014.

LAJOLO, F. M.; DUARTE-ALMEIDA, J.M.; SANTOS, R.J.; GENOVESE, M.I. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais dpph<sup>1</sup>. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 26, p. 446-452, 2006.

LUCKENBACH, T.; KILIAN, M.; TRIEBSKORN, R.; OBEREMM, A. Fish early life stage tests as a tool to assess embryotoxic potentials in small streams. **Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery**, v. 8, p. 355–370, 2001.

MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). **Manual de Hortaliças Não-Convencionais**. Brasília, 2010.

MERTZ, C.; BRAT, P.; CARIS-VEYRAT, C.; GUNATA, Z. Characterization and thermal lability of carotenoids and vitamin C of tamarillo fruit (*Solanum betaceum* Cav.). **Food Chemistry**, v. 119, n. 2, p. 653-659, 2010.

MUTALIB, M. A.; RAHMAT, A.; ALI, F.; OTHMAN, F.; RAMASAMY, R. Nutritional compositions and antiproliferative activities of different solvent fractions from ethanol extract of *Cyphomandra betacea* (Tamarillo) fruit. **Malays J Med Sci.**, v. 24, n.5, p. 19–32, 2017.

NASCIMENTO, G. E.; CORSO, C.R.; WERNER, M.F.P.; BAGGIO, C.H.; IACOMINI, M.; CORDEIRO, L.M.C. Structure of an arabinogalactan from the edible tropical fruit tamarillo (*Solanum betaceum*) and its antinociceptive activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 116, p. 300-306, 2015.

OSORIO, C.; HURTADO, N.; DAWID, C.; HOFMANN, T.; HEREDIA-MIRA, F.J.; MORALES, A.L. Chemical characterisation of anthocyanins in tamarillo (*Solanum betaceum* Cav.) and Andes berry (*Rubus glaucus* Benth.) fruits. **Food Chemistry**, v. 132, n. 4, p. 1915-1921, 2012.

PANTOJA, L.; PINTO, N.A.V.D.; LOPES, C.; GANDRA, R.; SANTOS, A.S. Caracterização física e físico-química de frutos de duas variedades de tamarilho oriundas do norte de Minas Gerais. **Rev. Bras. Frutic.**, v. 31, p. 916-919, 2009.

PETERSON, R. T.; MACRAE, C. A. Changing the scale and efficiency of chemical warfare countermeasure discovery using the zebrafish. **Drug Discovery Today: Disease Models**, v. 10, n. 1, p. e37-e42, 2013.

- PICHLER, F. B.; LAURENSEN, S.; WILLIAMS, L.C.; DODD, A.; COPP, B.R., LOVE, D.R. Chemical discovery and global gene expression analysis in zebrafish. **Nat Biotechnol.**, v. 21, n. 8, p. 879-83, 2003.
- SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F. J.; TERRY, M.I.; FELIZARDO, V.O.; VERA, L.M. Daily rhythms of toxicity and effectiveness of anesthetics (MS222 and eugenol) in zebrafish (*Danio Rerio*). **Chronobiology International**, v. 28, n. 2, p. 109–117, 2011.
- SIMÕES, C. M. O. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5 ed. Ed. UFRGS/UFSC, 2003.
- SUCUPIRA, N.R.; SILVA, A.B.; PEREIRA, G.; COSTA, J.N. Métodos para determinação da atividade antioxidante de frutos. **Unopar, Cient. Ciênc. Biol. Saúde**, v. 14, n. 4, p. 263-269, 2012.
- TENE, V.; MALAGÓN, O.; FINZI, P.V.; VIDARI, G.; ARMIJOS, C.; ZARAGOZA, T. An ethnobotanical survey of medicinal plants used in Loja and Zamora-Chinchipe, Ecuador. **J. Ethnopharmacol.**, v. 111, p. 63-81, 2007.
- TIWARI, R.; WOLBER, F. M. Identification of tamarillo (*Cyphomandra betacea*) allergens. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 127, n. 2, p. AB110, 2011.
- VASCO, C.; RUALESA, J.; KAMAL-ELDIN, A. Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador. **Food Chemistry**, v. 111, p. 816–823, 2008.
- WASZCZYNSKYJ, N.; DEGÁSPARI, C. H. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. **Visão Acadêmica**, v. 5, n. 1, p. 33-40, 2004.
- WANG, S.; ZHUB, F. Tamarillo (*Solanum betaceum*): Chemical composition, biological properties, and product innovation. **Trends in Food Science & Technology**, v. 95, p. 45-58, 2020.
- WIENHOLDS, E.; WIENHOLDS, E.; KLOOSTERMAN, W.P.; MISKA, E.; ALVAREZ-SAAVEDA, E.; BEREZIKOV, E.; BRUJIN, E.; HORVITZ, H.R.; KAUPPINEN, S.; PLASTERK, R.H.A. MicroRNA expression in zebrafish embryonic development. **Science**, v. 309, n. 5732, p. 310-311, 2005.
- ZON, L. I.; PETERSON, R. T. *In vivo* drug discovery in the zebrafish. **Nature reviews Drug discovery**, v. 4, n. 1, p. 35, 2005.

## POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE FRUTOS DE *Solanum betaceum* Cav. COM POLPAS AMARELA, VERMELHA E ROXA

### RESUMO

*Solanum betaceum* é uma espécie tradicionalmente cultivada nos Andes para produção de frutos destinados ao consumo *in natura*, além do uso medicinal em casos de gripe, inflamações, dor estomacal e colesterol alto. O objetivo deste estudo foi avaliar o teor de compostos fenólicos e o potencial antioxidante de três diferentes acessos de plantas de tomate de árvore cultivados no Brasil, com frutos de cor amarela, vermelha e roxa. Os extratos da polpa dos três diferentes frutos foram preparados com três tipos de solventes (água, álcool e metanol), devido à diferença de extração pela polaridade dos compostos. Foram quantificados os teores de fenóis totais e flavonoides por espectrofotometria de absorção molecular no ultravioleta. O potencial antioxidante foi avaliado utilizando cinco metodologias de ensaios *in vitro*: teste de Capacidade Antioxidante Total (CAT); sequestro de radicais DPPH e ABTS; Capacidade de absorbância do radical oxigênio (ORAC) e Poder Redutor. Os teores de fenóis totais variaram entre 0,58 e 2,59 mg EAG g<sup>-1</sup> e foram maiores nos frutos roxos e amarelos. O teor de flavonoides encontrado foi baixo e não se diferenciou entre as amostras (0,01 a 0,03 mg EQ g<sup>-1</sup>). A capacidade antioxidante total medida foi de 1,02 a 2,36 EAC g<sup>-1</sup> e foi maior para os frutos vermelhos. Para o teste com o radical DPPH o IC<sub>50</sub> variou entre 1,76 e 5,68 mg mL<sup>-1</sup> e para o teste com o radical ABTS entre 2,07 e 6,79 mg mL<sup>-1</sup>. Em ambos os frutos amarelos alcançaram a melhor capacidade de captura dos radicais livres. O teste ORAC apresentou valores entre 9,24 e 48,70 umol de trolox g<sup>-1</sup> e o teste de poder redutor obteve absorbâncias entre 0,13 e 1,50. Nestes dois últimos testes as melhores atividades foram observadas para os frutos roxos. Os frutos de tomate de árvore de diferentes cores de polpa (roxa, amarela e vermelha) se diferenciaram fitoquimicamente em relação aos mecanismos de ação antioxidante, o que indica a importância da conservação do germoplasma dos diferentes acessos. De acordo com os testes realizados, os frutos de polpa roxa e amarela apresentaram os melhores potenciais antioxidantes, devendo ser incentivado seu consumo pela população, uma vez que o vermelho é o mais tradicional. Entre os solventes utilizados, a água não foi um extrator com bom rendimento, entretanto pode ser que em um organismo vivo a água apresente melhor biodisponibilidade dos compostos fenólicos.

**Palavras-chave:** tomate de árvore, tamarillo, radicais livres, espectrofotometria.

## ANTIOXIDANT POTENTIAL OF FRUITS FROM *Solanum betaceum* Cav. WITH YELLOW, RED AND PURPLE PULP

*Solanum betaceum* is a species traditionally cultivated in the Andes to produce fruits intended for fresh consumption, in addition to medicinal use in cases of flu, inflammation, stomach pain and high cholesterol. The aim of this study was to evaluate the content of phenolic compounds and the antioxidant potential of three different accessions of tree tomato plants grown in Brazil, with yellow, red and purple fruits. The pulp extracts of the three different fruits were prepared with three types of solvents (water, alcohol and methanol), due to the difference in extraction due to the polarity of the compounds. The contents of total phenols and flavonoids were quantified by ultraviolet molecular absorption spectrophotometry. The antioxidant potential was assessed using five in vitro assay methodologies: Total Antioxidant Capacity (CAT) test; kidnapping of DPPH and ABTS radicals; Absorption capacity of the oxygen radical (ORAC) and Reducing Power. The contents of total phenols varied between 0.58 and 2.59 mg EAG g<sup>-1</sup> and were higher in purple and yellow fruits. The flavonoid content found was low and did not differ between samples (0.01 to 0.03 mg EQ g<sup>-1</sup>). The total antioxidant capacity measured was 1.02 to 2.36 EAC g<sup>-1</sup> and was higher for red fruits. For the test with the DPPH radical the IC<sub>50</sub> varied between 1.76 and 5.68 mg mL<sup>-1</sup> and for the test with the ABTS radical between 2.07 and 6.79 mg mL<sup>-1</sup>. In both yellow fruits, they achieved the best ability to capture free radicals. The ORAC test showed values between 9.24 and 48.70 μmol of trolox g<sup>-1</sup> and the reducing power test obtained absorbances between 0.13 and 1.50. In these last two tests, the best activities were observed for purple fruits. The tree tomato fruits of different pulp colors (purple, yellow and red) differed phytochemically in relation to the mechanisms of antioxidant action, which indicates the importance of conserving the germplasm of the different accessions. According to the tests carried out, the fruits of purple and yellow pulp showed the best potential antioxidants, and their consumption should be encouraged by the population, since red is the most traditional. Among the solvents used, water was not a good extractor, however it may be that in a living organism the water presents better bioavailability of phenolic compounds.

**Keywords:** tree tomato, tamarillo, free radicals, spectrophotometry

## 1 INTRODUÇÃO

*Solanum betaceum* Cav. (sin. *Cyphomandra betacea* Sendt.) é uma espécie nativa dos Andes tradicionalmente cultivada para produção de frutos destinados ao consumo *in natura* em alguns países da América latina, como Peru, Bolívia, Colômbia, Equador e Venezuela. Os frutos de sabor agridoce, conhecidos como tomate de árvore ou ‘tamarillo’, também podem ser transformados em sucos, geleias, doces, saladas, picles, molhos e podem ser cozidos, assados ou grelhados (Acosta-Quezada et al., 2015; Kinupp & Lorenzi, 2014). O suco dos frutos maduros também possui um uso pela medicina popular no Equador, em casos de amigdalite, colesterol alto e dor estomacal (Tene et al., 2007). Na Costa Rica, os frutos frescos são consumidos em jejum em casos de gripe e também são usados como remédio para problemas hepáticos (Bohs, 1989; INTA, 2009). No Brasil, a espécie *S. betaceum* possui um caráter exótico e é cultivada em quintais sem fins comerciais (Pantoja et al., 2009), caracterizando-se como uma hortaliça não convencional, e suas qualidades nutricionais, terapêuticas e tecnológicas são pouco conhecidas no país.

O tomate de árvore possui frutos que são classificados de acordo com a cor da casca e polpa, variando entre amarelo, alaranjado, vermelho e roxo. A escolha da cor do fruto a ser cultivado está relacionada à preferência do mercado, dos consumidores e o lugar onde será vendido o produto (INIAP, 2008). Estudos científicos demonstram que há diferenças fitoquímicas entre as diversas cores de frutos (Espin et al., 2016; Acosta-Quezada et al., 2015; Vasco et al., 2009). Há também uma variação na composição química dos frutos de tomate de árvore devido às condições geográficas e ambientais (Acosta-Quezada et al., 2015), o que torna necessário investigar as propriedades das plantas cultivadas no Brasil uma vez que foi encontrado apenas um trabalho mais recente que avaliou a composição centesimal de dois tipos de frutos de tomate de árvore no país (Pantoja et al., 2009).

Os compostos fenólicos são metabólitos secundários amplamente distribuídos no reino vegetal, compondo a estrutura de ácidos fenólicos, flavonoides, antocianinas e taninos, por exemplo. Estes compostos contribuem para o sabor, odor e coloração de diversos vegetais. Evidências sugerem que doenças causadas pelas reações oxidativas em sistemas biológicos podem ser prevenidas pela ingestão de antioxidantes naturais encontrados na dieta (Alves et al., 2010; Muñoz & Ramos, 2007). Antioxidantes são compostos que podem retardar ou inibir a oxidação de lipídios ou outras moléculas, evitando o início ou a propagação das reações em cadeia de oxidação (Waszczyński & Degaspári, 2004). Dessa forma, o consumo de

substâncias antioxidantes na alimentação diária pode produzir uma ação protetora efetiva contra os processos oxidativos que naturalmente ocorrem no organismo.

O tomate de árvore tem demonstrado uma alta capacidade antioxidante relacionada à presença de compostos fenólicos e carotenoides, que conferem a este fruto atividades biológicas como antinociceptivo, anti-inflamatório, anticâncer e anti-obesidade (Wang et al., 2020). O objetivo deste estudo, portanto, foi avaliar o teor de compostos fenólicos extraídos por diferentes tipos de solventes e o potencial antioxidante de três diferentes acessos de plantas de tomate de árvore cultivadas no Brasil, com frutos de polpa amarela, vermelha e roxa. O potencial antioxidante foi avaliado por cinco ensaios fitoquímicos, a fim de se determinar os diferentes mecanismos de ação dos compostos da amostra (captura de radicais livres por transferência eletrônica, absorção de radicais peroxila, poder de redução).

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Equipamentos e reagentes

Leitor de microplacas TECAN Infinity<sup>®</sup> M200 PRO usando o software Icontrol<sup>®</sup> versão 3.37.1. Extractor Turratec modelo MA 102.

Todos os produtos químicos eram de grau analítico. Solução Folin-Ciocalteu; carbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ); ácido gálico ( $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_5$ ); cloreto de alumínio ( $\text{AlCl}_3$ ); quercetina; fosfato de sódio monobásico ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ); ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ); molibdato de amônio ( $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ ); ácido ascórbico 99,7-100,5% de pureza; DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil); BHT (3,5-di-tert-4-butilhidroxitolueno); ABTS (Ácido 2,2'-azino-bis (3-metilbenzotiazolina-6-sulfônico)); persulfato de potássio ( $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ ); Trolox (ácido 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic); sulfato ferroso ( $\text{FeSO}_4$ ); peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ); ácido salicílico ( $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_3$ ); ferrocianeto de sódio ( $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ); ácido tricloroacético ( $\text{C}_2\text{HCl}_3\text{O}_2$ ); Cloreto de ferro (II) ( $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ); AAPH (2,2'-azobis-2-methyl-propanimidamide, dihydrochloride); fluoresceína ( $\text{C}_{20}\text{H}_{12}\text{O}_5$ ).

### 2.2 Obtenção do material vegetal

Foram coletadas amostras de frutos frescos e maduros de *S. betaceum* de três diferentes acessos, cada um com frutos de cores específicas: amarelos, vermelhos ou roxos. A coleta foi feita em Dezembro de 2015, de plantas da Coleção de Germoplasma de Hortaliças não Convencionais do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras (UFLA) (latitude 21°13'44" S, longitude 44°58'33" O, 912 m de altitude), localizada em Lavras-MG. Segundo a classificação de Sá Júnior et al. (2012) o clima regional é do tipo Cwa, de acordo com a metodologia proposta por Köppen, sendo caracterizado por um clima temperado úmido com verão quente e inverno seco. As amostras foram analisadas no Laboratório de Fitoquímica do Horto de Plantas Medicinais da UFLA.

### 2.3 Preparo dos extratos

Os frutos foram lavados, descascados com uma faca, cortados longitudinalmente e as sementes foram retiradas manualmente para obtenção da polpa (mesocarpo). Para cada uma das três variedades os extratos dos frutos foram feitos com três diferentes solventes: água destilada, álcool 70% e metanol, totalizando nove amostras.

Os extratos foram preparados por turboextração utilizando 10 g do material vegetal (polpa fresca) e 100 mL do solvente. A amostra vegetal foi colocada em um béquer de

plástico sob banho de gelo e foi extraída no turboextrator por três ciclos de 10 minutos cada, fazendo um intervalo de um minuto entre os ciclos. Após estes procedimentos, os extratos foram filtrados à vácuo e armazenados a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### **2.4 Determinação dos fenóis totais**

Os compostos fenólicos totais foram determinados pelo método colorimétrico utilizando o reagente Folin-Ciocalteu descrito por Slinkard & Singleton (1977). As reações foram realizadas em placas de microtitulação, utilizando 20  $\mu\text{L}$  dos extratos, 125  $\mu\text{L}$  de Carbonato de Sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) a 7% e 100  $\mu\text{L}$  de solução etanólica de Folin-Ciocalteu a 10%. A placa foi armazenada por 2 horas no escuro à temperatura ambiente e, após estes procedimentos, a leitura foi realizada em espectrofotômetro (Leitor de microplacas TECAN Infinity<sup>®</sup> M200 PRO) a 760 nm. Os testes foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos em miligrama equivalentes em ácido gálico por g de matéria fresca da amostra ( $\text{mg EAG g}^{-1}$ ). A curva de calibração foi realizada com ácido gálico com oito pontos de concentração (1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,062; 0,0312; 0,0156; 0,0078  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) e os resultados foram calculados de acordo com a equação da reta ( $Y=3,887x - 0,154$ , em que y é a absorbância e x é a concentração;  $R^2 = 0,994$ ).

#### **2.5 Quantificação de flavonoides**

A quantificação de flavonoides nos extratos foi determinada pelo método de Ahn et al. (2007). Foram utilizados 100  $\mu\text{L}$  de solução de cloreto de alumínio ( $\text{AlCl}_3$ ) a 10% (preparado com etanol 70%) e misturados em 100  $\mu\text{L}$  de cada extrato. Após 60 minutos no escuro e à temperatura ambiente, as absorbâncias das amostras foram lidas em espectrofotômetro a 420 nm, contra um branco de 100  $\mu\text{L}$  de solvente + 100  $\mu\text{L}$  solução de Cloreto de Alumínio ( $\text{AlCl}_3$ ). Os testes foram realizados em triplicata e o conteúdo total de flavonoides foi expresso como miligramas equivalentes de quercetina por grama de peso fresco da amostra ( $\text{mg EQ g}^{-1}$ ). A curva de calibração foi realizada com quercetina com oito pontos de concentrações (1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,062; 0,0312; 0,0156 e 0,0078  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) e os resultados foram calculados de acordo com a equação da reta ( $Y=12,T + 0,065$ ; em que y é a absorbância e x é a concentração;  $R^2 = 0,999$ ).

#### **2.6 Capacidade antioxidante total**

A capacidade antioxidante total (CAT) foi estabelecida de acordo com o método de redução do molibdato de amônio descrito por Prieto et al. (1999). Para este ensaio foram

utilizados 20  $\mu\text{L}$  dos extratos misturados em 1,5 mL de solução reagente (fosfato de sódio 28 mM, molibdato de amônio 4 mM e ácido sulfúrico 0,6 M). A solução reagiu por 90 minutos à temperatura de 90° C e logo após arrefecimento à temperatura ambiente, foram aplicados 100  $\mu\text{L}$  de cada solução em placas de microtitulação e suas absorvâncias mensuradas a 695 nm em espectrofotômetro. A análise foi realizada em triplicata e os resultados expressos em miligrama equivalentes em ácido ascórbico por g de peso fresco da amostra ( $\text{mg EAC g}^{-1}$ ).

## 2.7 Atividade de captura de radicais livres DPPH

A atividade de captura de radicais livres DPPH foi realizada de acordo com Brand-Williams et al. (1995). Nas placas de microtitulação foram adicionadas 50  $\mu\text{L}$  das amostras em diferentes concentrações (100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125 e 1,5625  $\text{mg mL}^{-1}$ ) com 250  $\mu\text{L}$  de solução metanólica de 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) 0,2 mM. Em seguida, as soluções foram colocadas no escuro sob temperatura ambiente por 60 minutos e as leituras espectrofotométricas realizadas a 517 nm. O BHT (3,5-di-tert-4-butilhidroxitolueno) foi utilizado como controle positivo, enquanto o metanol como controle negativo. A atividade de eliminação de radicais livres foi expressa em  $\text{IC}_{50}$  ( $\text{mg mL}^{-1}$ ), equivalente à concentração do extrato com capacidade de inibir 50% dos radicais DPPH, calculada pela fórmula:  $(\%) = (A_0 - A_1) / A_0 * 100$ , em que  $A_0$  é a absorvância do controle negativo e  $A_1$  a absorvância das amostras.

## 2.8 Atividade de captura de radicais livres ABTS

A eliminação de radicais livres pelo ensaio de descoloração catiônica do radical ABTS foi realizada utilizando o método descrito por Ling et al. (2009) e Re et al. (1999), com poucas modificações. A solução de Ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) ABTS ( $\text{ABTS}^{\bullet+}$ ), produzida pela adição de 0,0768 g de sal de ABTS e 0,0132 g de persulfato de potássio em 20 mL de água destilada, foi mantida em repouso à temperatura ambiente e no escuro por 16h antes da utilização. A solução de  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  foi diluída em etanol até alcançar a absorvância de  $0,7 \pm 0,02$  em 734 nm. O etanol foi utilizado como controle negativo, enquanto que o Trolox foi usado como controle positivo. Foram aplicados 30  $\mu\text{L}$  de extrato das amostras sob diferentes concentrações (100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125 e 1,5625  $\text{mg mL}^{-1}$ ) com 270  $\mu\text{L}$  de solução diluída de ABTS em placas de microtitulação. A solução reagiu por 6 minutos à temperatura ambiente e depois a absorvância foi medida a 734 nm. A atividade de eliminação de radicais livres foi expressa em  $\text{IC}_{50}$  ( $\text{mg mL}^{-1}$ ), equivalente à concentração de extrato com capacidade de inibir 50% dos radicais ABTS, calculada pela

fórmula: (%) =  $(A_0 - A_1) / A_0 * 100$ , em que  $A_0$  é a absorbância do controle negativo e  $A_1$  a absorbância das amostras.

## 2.9 Capacidade de captura do radical oxigênio (ORAC)

O ensaio ORAC é baseado na capacidade dos antioxidantes em uma amostra sequestrarem os radicais peroxila gerados pela decomposição térmica do AAPH (2,2'-azobis-2-methyl-propan-imidamide, dihydrochloride). A fluoresceína (FL) foi utilizada como um indicativo fluorescente segundo o método de Ou et al. (2001). A reação foi preparada em placa de microtitulação escura com a adição de 30 uL de amostra (diluídas 20 vezes) e 150 uL de solução de FL. A microplaca foi então coberta com uma tampa e incubada a 37° C por 10 minutos no TECAN. Depois, em cada poço, foi acrescentado 30 uL de solução contendo o radical AAPH. A microplaca foi agitada por 10 segundos e depois a fluorescência foi lida em espectrofotômetro, a cada minuto, por 4 horas em uma escala de absorbância de 485 nm até 527 nm. Trolox foi utilizado como padrão na concentração inicial de 1 mM, seguida de mais sete diluições.

Para obtenção dos resultados foi calculada a área abaixo da curva (AAC) do padrão e amostras. Uma curva padrão foi obtida ao se plotar as concentrações de Trolox em relação à média das AAC para três leituras de cada concentração. Finalmente, os valores do ORAC foram calculados usando uma equação de regressão entre as concentrações de Trolox e das AAC, e foram expressos em umol de Trolox por grama de polpa fresca.

## 2.10 Determinação do Poder Redutor

O método descrito por Oyaizu (1986) foi utilizado para determinar o poder redutor dos extratos dos diferentes frutos. A reação foi preparada em microtubos, onde foram adicionados 50 uL de amostra em diferentes concentrações, 100 uL de tampão fosfato de sódio (pH 6) e 100 uL de solução aquosa de ferrocianeto de sódio a 1% ( $K_3Fe(CN)_6$ ) e esta mistura foi incubada em banho maria a 50° C por 20 minutos. Depois, acrescentou-se 100 uL de Ácido Tricloroacético a 10% (p/v), 300 uL de água e 60 uL de solução aquosa de cloreto férrico 0,1%. Aplicou-se na placa de microtitulação 250 uL desta mistura final. O ensaio foi realizado em triplicata e o ácido ascórbico foi utilizado como controle positivo. O poder redutor foi expresso pelo valor da intensidade da cor azul/verde mensurada com a absorbância a 700 nm.

### **2.11 Análise estatística**

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, em um arranjo fatorial 3x3, sendo três tipos de cores de fruto (amarelo, vermelho e roxo) e três tipos de solventes (água, etanol e metanol). Todos os ensaios foram realizados em triplicata. As médias entre os tratamentos foram submetidas à análise de variância, pelo teste F, e comparadas pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade. Os resultados dos testes também foram submetidos à análise de componentes principais (PCA). As análises estatísticas foram realizadas com o programa R.

As curvas do ensaio ORAC foram geradas através do *GraphPad Prism* versão 8.

## RESULTADOS

O teor de compostos fenólicos foi determinado pelo método com o reagente Folin-Ciocalteu (Slinkard & Singleton, 1977), que detecta a presença de todos os fenóis presentes na amostra através de reações de oxirredução, não sendo específico para um grupo dentro desta classe de compostos. O conteúdo total de fenóis no tomate de árvore variou entre 0,58 a 2,59 mg EAC g<sup>-1</sup> (tabela 1). A água não foi um solvente eficaz para a extração dos fenóis e os extratos aquosos apresentaram os menores teores. As maiores concentrações de fenóis totais foram encontradas nos frutos amarelos, não diferenciando entre os solventes etanol e metanol.

Os flavonoides são um grupo fitoquímico pertencente à classe dos compostos fenólicos, cuja quantificação foi feita baseada na reação de complexação com o metal alumínio (Ahn et al., 2007). A quantificação de flavonoides detectou baixas concentrações destes compostos nos extratos analisado (entre de 0,01 a 0,03 mg EQ g<sup>-1</sup>; expresso em mg equivalente de quercetina por 1 g de matéria fresca), não apresentando diferenças entre os frutos de tomate de árvore.

Tabela 1. Valores médios dos compostos fenólicos dos frutos de *S. betaceum* com três diferentes cores de polpa.

Polpa	Fenóis totais (mg EAG g <sup>-1</sup> )		
	Água	Etanol	Metanol
Roxa	0,58 bB	2,13 bA	2,14 bA
Amarela	0,62 bB	2,57 aA	2,59 aA
Vermelha	0,89 aC	1,25 cB	1,80 cA

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si de acordo com o teste Scott-Knott ( $p < 0,05$ ). **Fenóis totais:** expresso em mg equivalente de ácido gálico por 1 g de matéria fresca.

Os resultados do teste CAT para as amostras de tomate de árvore variaram entre 1,02 a 2,36 mg EAC g<sup>-1</sup>. Os extratos com o solvente etanol apresentaram a maior atividade através deste método e, dentre eles, o fruto vermelho apresentou a maior capacidade antioxidante total, igual a 2,36 mg EAC g<sup>-1</sup>.

Os extratos dos frutos de tomate de árvore nos quais se utilizou a água como solvente apresentaram capacidade de redução dos radicais livres menor que 50% para os métodos

DPPH e ABTS, independente da cor do fruto, não sendo possível, portanto, o cálculo do IC<sub>50</sub>. Estes extratos exibiram capacidade em reduzir 27,5 a 30,0% dos radicais DPPH e 12,6 a 17,6% dos radicais ABTS, mesmo nas maiores concentrações testadas. O IC<sub>50</sub> para os tratamentos com etanol e metanol no teste com o radical DPPH variou entre 1,76 a 5,68 mg mL<sup>-1</sup> e para o teste de atividade de captura do radical ABTS, o IC<sub>50</sub> foi de 2,07 a 6,79 mg mL<sup>-1</sup>.

O fruto de tomate de árvore de cor amarela obteve o melhor resultado nos testes DPPH e ABTS, ou seja, apresentou as menores concentrações de extrato capazes de reduzir 50% dos radicais livres. Para o teste com o radical DPPH a concentração do IC<sub>50</sub> do fruto amarelo variou entre 1,76 a 1,79 mg de polpa fresca mL<sup>-1</sup>, sendo maior, porém, que o apresentado pelo padrão BHT, cuja concentração para o IC<sub>50</sub> é igual a 0,095 mg mL<sup>-1</sup>. Para o teste ABTS, o resultado para o fruto amarelo foi quase tão eficaz quanto à do padrão Trolox. Enquanto a concentração dos frutos para o IC<sub>50</sub> variou entre 2,07 a 2,90 mg de polpa fresca mL<sup>-1</sup>, a do Trolox foi de 2,03 mg mL<sup>-1</sup>.

Tabela 2. Atividades antioxidantes dos frutos de *S. betaceum* com três diferentes cores de polpa.

Polpa	CAT (mg EAC g <sup>-1</sup> )			DPPH (IC <sub>50</sub> =mg mL <sup>-1</sup> )		
	Água	Etanol	Metanol	Água	Etanol	Metanol
Roxa	1,53 aB	1,91 bA	1,31 bB	-	4,04 bA	2,98 bB
Amarela	1,02 bB	1,92 bA	1,78 aA	-	1,79 cA	1,76 cA
Vermelha	1,33 aC	2,36 aA	1,57 aB	-	5,68 aA	4,88 aB
Polpa	ABTS (IC <sub>50</sub> =mg mL <sup>-1</sup> )			ORAC (umol de Trolox g <sup>-1</sup> )		
	Água	Etanol	Metanol	Água	Etanol	Metanol
Roxa	-	3,72 bA	3,22 bB	9,20 Bb	48,70 Aa	44,26 Aa
Amarela	-	2,90 cA	2,07 cB	9,67 Cb	18,01 Ab	14,24 Bb
Vermelha	-	6,79 aA	5,49 aB	10,52 Ba	13,70 Ab	12,34 Ab

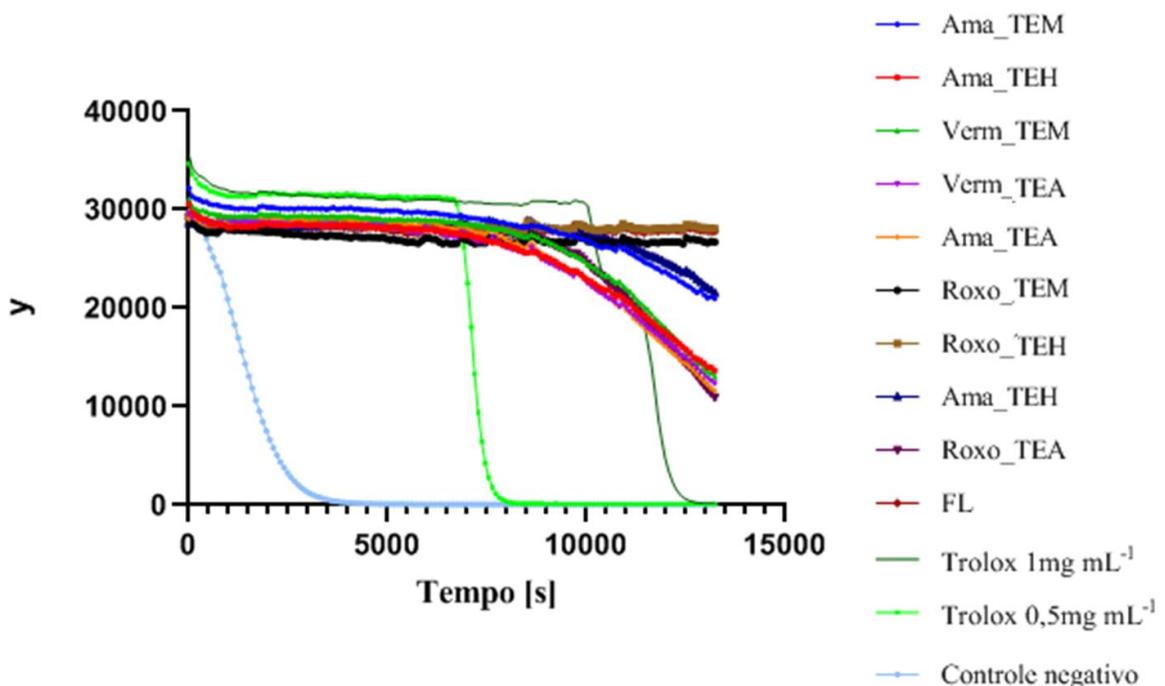
Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si de acordo com o teste Scott-Knott ( $p < 0,05$ ). **CAT**: capacidade antioxidante total equivalente em mg de ácido ascórbico por 1 g de matéria fresca. **DPPH**: capacidade de captura de radicais livres DPPH expressa em IC<sub>50</sub>. **ABTS**: capacidade de captura de radicais livres ABTS expressa em IC<sub>50</sub>. **ORAC**: capacidade de captura do radical oxigênio expressa em equivalente em umol de Trolox por g de matéria fresca.

No teste de captura do radical oxigênio (ORAC), quanto maior a fluorescência, melhor a atividade antioxidante. Os extratos aquosos foram os menos eficazes, com atividade de 9,24

a 10,52  $\mu\text{mol}$  de Trolox  $\text{g}^{-1}$ . Os frutos roxos apresentaram a maior capacidade de captura do radical oxigênio, variando entre 44,26 a 48,70  $\mu\text{mol}$  de Trolox  $\text{g}^{-1}$ . Estes resultados podem ser observados na figura 1, cujo gráfico apresenta o padrão de fluorescência das amostras ao longo do tempo em relação à substância padrão (Trolox) utilizada como controle positivo, à fluoresceína (FL) e ao controle negativo (radical AAPH sem a fluoresceína). As amostras dos frutos apresentaram um padrão de fluorescência mais prolongado que o Trolox nas concentrações testadas.

O ensaio ORAC foi utilizado, pois, para medir a capacidade das amostras de frutos de tomate de árvore em absorver os radicais de oxigênio. Este teste possui os radicais peroxila ( $\text{ROO}^\cdot$ ) como pró-oxidantes, gerados a partir do AAPH, e as substâncias antioxidantes presentes no extrato protegem a fluoresceína da oxidação provocada por estes radicais através da doação de átomos de hidrogênio, evitando o decréscimo da fluorescência (Boroski et al., 2015).

Figura 1. Curvas de fluorescência (Y) ao longo do tempo resultantes do ensaio ORAC para as amostras de frutos amarelos (Ama), vermelhos (Verm) e roxos de *S. betaceum* extraídas em diferentes solventes: Água (TEA), Etanol 70% (TEH) e metanol (TEM); fluoresceína (FL); padrão antioxidante Trolox nas concentrações de 1 e 0,5  $\text{mg mL}^{-1}$ ; e controle negativo.



No teste para determinar o poder redutor das amostras, avaliou-se a capacidade do extrato vegetal em reduzir íons de  $\text{Fe}^{3+}$  (ferro III) para  $\text{Fe}^{2+}$  (ferro II) através da absorbância obtida para cada tratamento com a leitura a 700 nm. Para a maior concentração testada das

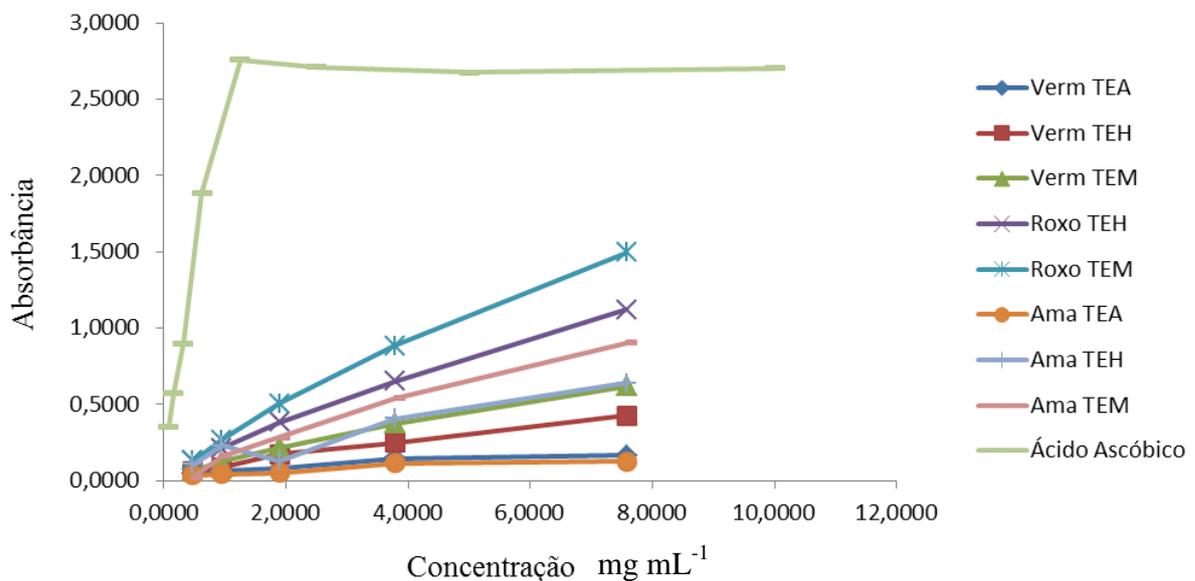
amostras, igual a  $100 \text{ mg mL}^{-1}$ , os valores das absorvâncias variaram entre 0,13 a 1,50. Estes valores foram baixos nas diferentes concentrações quando comparadas ao padrão utilizado (ácido ascórbico), cuja absorvância foi igual a 2,70 (figura 2). O extrato aquoso do fruto roxo não apresentou atividade, enquanto os extratos aquosos dos frutos amarelo e vermelho apresentaram as menores absorvâncias encontradas (0,13 a 0,17). O fruto roxo, extraído com o solvente metanol, apresentou o resultado mais eficaz para o teste de poder redutor (absorvância igual a 1,50).

Tabela 3. Resultados do teste de poder redutor para os frutos de *S. betaceum* com três diferentes cores de polpa, em valores de absorvância mensurada a 700 nm.

Polpa	Água	Etanol	Metanol
Roxo	-	1,12 aB	1,50 aA
Amarelo	0,13 bC	0,64 bB	0,91 bA
Vermelho	0,17 aC	0,43 cB	0,62 cA

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si de acordo com o teste Scott-Knott ( $p < 0,05$ ).

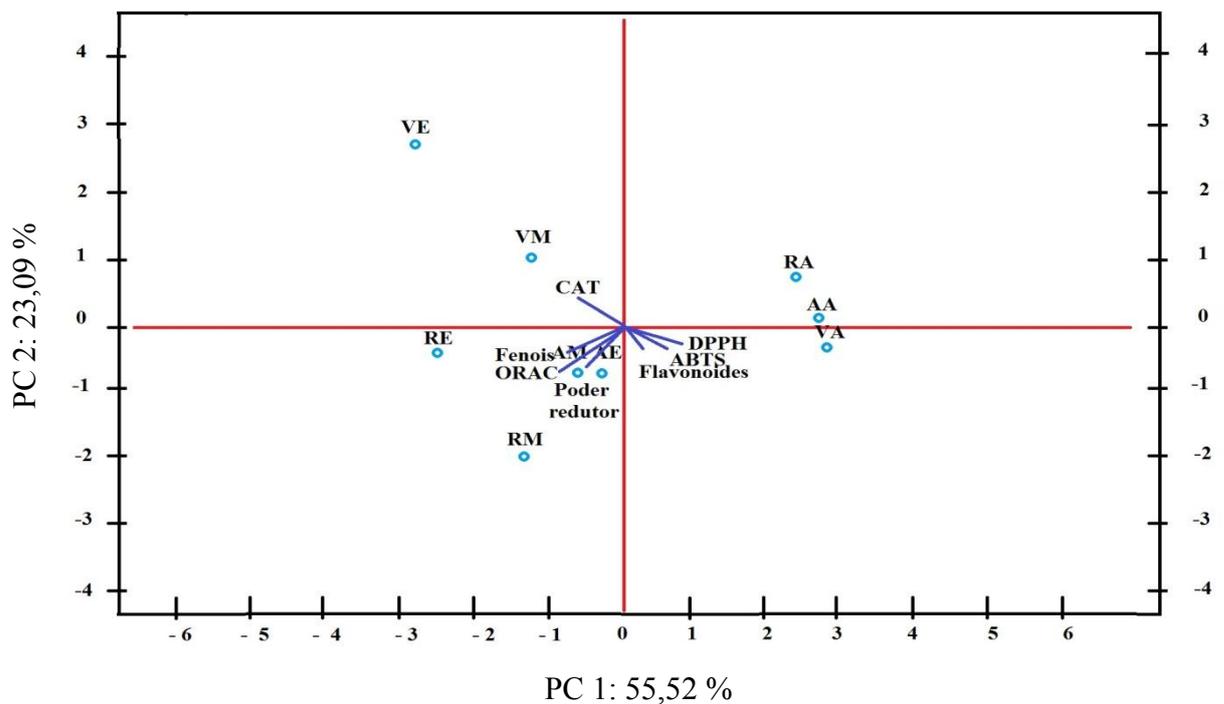
Figura 2. Determinação do poder redutor de amostras de frutos amarelos (Ama), vermelhos (Verm) e roxos de *S. betaceum* extraídas em diferentes solventes: Água (TEA), Etanol 70% (TEH) e metanol (TEM).



O resultado da análise de componentes principais (PCA) pode ser observado na figura 3. A primeira e segunda componente da análise de PCA realizada obtiveram os valores de 55,52 % e 23,09 %, respectivamente, o que explica 78,61 % da variação total dos dados. Os extratos aquosos dos três frutos se agruparam e estão pouco relacionados com as variáveis dos

testes. Os extratos metanólico e etanólico do fruto vermelho se associaram com o teste CAT. Os extratos metanólico e etanólico dos frutos amarelo e roxo se associaram aos resultados dos testes de quantificação de fenóis, ORAC e poder redutor. As variáveis DPPH, ABTS e flavonoides também demonstraram estar correlacionadas.

Figura 3. Análise de componentes principais dos teores de compostos fenólicos (fenóis totais e flavonoides) e atividades antioxidantes (CAT, DPPH, ABTS, ORAC, poder redutor) dos frutos (vermelho, amarelo e roxo) de tomates de árvore submetidos a três solventes extratores (água, etanol e metanol). Legenda: VE - vermelho etanol; VM - vermelho metanol; VA - vermelho água; RE - roxo etanol; RM - roxo metanol; RA - roxo água; AE - amarelo etanol; AM - amarelo metanol; AA - amarelo água.



#### 4 DISCUSSÃO

Para a extração de compostos fenólicos em materiais vegetais, utiliza-se comumente solventes hidrofílicos com diferentes proporções de água, como etanol e metanol. Devido à polaridade dos fenóis, a natureza do solvente pode influenciar a extração. Neste trabalho, foram utilizados três solventes (água destilada, etanol 70% e metanol) para extração dos compostos fenólicos da polpa do tomate de árvore.

Apesar da extração em água apresentar a forma como é mais consumido tradicionalmente, na forma de sucos, os extratos aquosos apresentaram os menores teores de fenóis e baixa atividade antioxidante em relação aos extratos em etanol e metanol, que são solventes com menor polaridade. Na análise de componentes principais – PCA (figura 3), os extratos aquosos dos três diferentes frutos não se associaram com os resultados dos testes antioxidantes, indicando que a água foi um solvente pouco eficaz pelo método de turboextração.

Embora existam alguns estudos que indicam a presença de compostos fenólicos e ação antioxidante do tomate de árvore (Wang et al., 2020), é difícil a comparação dos resultados entre diferentes pesquisas devido à grande variação metodológica, por exemplo, em relação à forma de preparo e concentração dos extratos, substâncias utilizadas como padrão, procedimentos do ensaio e cálculos realizados.

Os teores de flavonoides detectados (entre 0,01 a 0,03 mg EQ g<sup>-1</sup>) foram até mais de 200 vezes menores em relação à quantificação de fenóis totais (0,58 a 2,59 mg EAG g<sup>-1</sup>) (tabela 1). A presença de flavonoides foi identificada por Vasco et al. (2009) apenas na casca dos frutos de tomate de árvore. Espin et al. (2016), detectaram que os compostos fenólicos majoritários no tomate de árvore são ácidos fenólicos derivados do ácido cinâmico, o que explica o baixo teor de flavonoides encontrado na polpa dos frutos.

Os extratos dos frutos amarelos e roxos apresentaram maiores teores de fenóis totais e maior atividade antioxidante em quase todos os testes (tabela 2). Os frutos amarelos obtiveram os melhores resultados nos testes de captura dos radicais DPPH e ABTS, os quais estão associados (figura 3), o que se justifica pelo fato de utilizarem o mesmo mecanismo de transferência eletrônica em que os compostos antioxidantes doam um átomo de hidrogênio para o radical oxidado (Ozgen et al., 2006). Estes resultados corroboram com o trabalho de Acosta-Quezada et al. (2015), no qual observou-se um alto valor de correlação entre o teor de compostos fenólicos e a atividade antioxidante medida pelo teste de captura do radical DPPH e concluiu-se que os fenóis são os principais antioxidantes na polpa dos frutos de tomate de árvore.

Os frutos roxos, por sua vez, apresentaram um poder antioxidante maior nos ensaios ORAC e Poder Redutor. Estes resultados indicam que, enquanto os frutos amarelos possuem compostos que são bons doadores de átomos de hidrogênio para os radicais livres, os frutos roxos possuem um diferente mecanismo antioxidante derivado do seu poder de redução e absorção do oxigênio.

Os frutos vermelhos, apesar de conterem menores teores de fenóis totais, alcançaram o maior valor no teste de Capacidade Antioxidante Total (extratos etanólicos e metanólicos), que quantifica os compostos com poder antioxidante equivalente ao ácido ascórbico.

## **5 CONCLUSÃO**

Os frutos de tomate de árvore de diferentes cores de polpa (roxa, amarela e vermelha) se diferenciaram fitoquimicamente em relação aos mecanismos de ação antioxidante, o que indica a importância da conservação do germoplasma dos diferentes acessos. De acordo com os testes realizados, os frutos de polpa roxa e amarela apresentaram os melhores potenciais antioxidantes, devendo ser incentivado seu consumo pela população, uma vez que o vermelho é o mais tradicional. Entre os solventes utilizados, a água não foi um extrator com bom rendimento, entretanto pode ser que em um organismo vivo a água apresente melhor biodisponibilidade dos compostos fenólicos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACOSTA-QUEZADA, P. G.; RAIGÓN, M.D.; RIOFRIO-CUENCA, T.; GARCÍA-MARTÍNEZ, M.D.; PLAZAS, M.; BURNEO, J.I.; FIGUEROA, J.G.; VILANOVA, S.; PROHENS, J. Diversity for chemical composition in a collection of different varietal types of tree tomato (*Solanum betaceum* Cav.), an Andean exotic fruit. **Food Chemistry**, v. 169, p. 327–335, 2015.
- AHN, M. R.; KUMAZAWA, S.; USUI, Y.; NAKAMURA, J.; MATSUKA, M.; ZHU, F.; NAKAYAMA, T. Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of China. **Food Chemistry**, v. 101, p. 1383-1392, 2007.
- ALVES, C. Q.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P.; BAHIA, M.V.; AGUIAR, R.M. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Quim. Nova**, v. 33, n. 10, p. 2202-2210, 2010.
- BOBBIO, F. O.; BOBBIO, P. A.; RODRÍGUEZ-AMAYA, D. B. Anthocyanins of the Brazilian fruit *Cyphomandra betaceae*. **Food Chem.**, v.12, p. 189–195, 1983.
- BOHS, L. Ethnobotany of the genus *Cyphomandra* (Solanaceae). **Economic Botany**, v. 43, p. 143-163, 1989.
- BOROSKI, M. VISENTAINER, J.V.; COTTICA, S.M.; MORAIS, D.R. **Antioxidantes: princípios e métodos analíticos**. 1 ed. Ed. Appris, Curitiba-PR, 2015.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science Technology**, London, v. 28, n. 1, p. 25–30, 1995.
- CLARK, C. J.; RICHARDSON, A. C. Biomass and mineral nutrient partitioning in a developing tamarillo (*Cyphomandra betacea*) crop. **Sci. Hortic.**, v. 94, p. 41–51, 2002.
- ESPIN, S.; GONZALEZ-MANZANO, S.; TACO, V.; POVEDA, C.; AYUDA-DURÁN, B.; GONZALEZ-PARAMAS, A.M.; SANTOS-BUELGA, C. Phenolic composition and antioxidant capacity of yellow and purple-red Ecuadorian cultivars of tree tomato (*Solanum betaceum* Cav.). **Food Chemistry**, v. 194, p. 1073-1080, 2016.
- GARDNER, P.T.; WHITE, T.A.C.; MCPHAIL, D.B. The relative contributions of vitamin C, carotenoids and phenolics to the antioxidant potential of fruit juices. **Food Chemistry**, v. 68, p. 471-474, 2000.
- HASSAN, S. H. A.; BAKAR, M. F. A. Antioxidative and anticholinesterase activity of *Cyphomandra betacea* fruit. **The Scientific World Journal**, 2013.
- INIAP (Instituto Nacional Autonomo de Investigaciones Agropecuarias). **Estudio de las posibilidades agroindustriales del tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav.)**. Quito, Ecuador, 2008.
- INTA (Instituto Nacional de Innovación y Transferencia en Tecnología Agropecuaria). **Cultivo de Tomate de Árbol (*Cyphomandra betacea*) – Area: manejo integrado de cultivo/frutales de altura**. San José, Costa Rica, 2009.

KINUPP, V.F.; LORENZI, H. **Plantas alimentícias não convencionais (PANC) no Brasil**. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2014.

LAJOLO, F. M.; DUARTE-ALMEIDA, J.M.; SANTOS, R.J.; GENOVESE, M.I. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais dpph<sup>•1</sup>. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 26, p. 446-452, 2006.

LING, L. T. et al. Standardised *Mangifera indica* extract is an ideal antioxidant. **Food Chemistry**, London, v. 113, p. 1154-1159, 2009.

MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). **Manual de Hortaliças Não-Convencionais**. Brasília, 2010.

MUÑOZ, J. A. M.; RAMOS, E. F. Componentes fenólicos de la dieta y sus propiedades biomedicinales. **Revista Horizonte Médico**, v. 7, 2007.

OU, B.; HAMPSCH-WOODILL, M.; PRIOR, R. L. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 10, p. 4619–4626, 2001.

OYAIZU, M. Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. **Japanese Journal of Nutrition**, v. 44, p. 307-315, 1986.

OZGEN, M.; REESE, R.N.; TULIO-JR, A.Z.; SCHEERENS, J.C.; MILLER, A.R. Modified 2,2-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (abts) method to measure antioxidant capacity of Selected small fruits and comparison to ferric reducing antioxidant power (FRAP) and 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) methods. **J. Agric. Food. Chem.**, v. 54, n. 4, p. 1151-1157, 2006.

PANTOJA, L.; PINTO, N.A.V.D.; LOPES, C.; GANDRA, R.; SANTOS, A.S. Caracterização física e físico-química de frutos de duas variedades de tamarilho oriundas do norte de Minas Gerais. **Rev. Bras. Frutic.**, Jaboticabal - SP, v. 31, p. 916-919, 2009.

PRIETO, P., PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. **Analysis Biochemistry**, v. 269, p. 337-341, 1999.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 26, n. 10, p. 1231-1237, 1999.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; BOBBIO, P. A.; BOBBIO, F. A. Carotenoid composition and vitamin A value of the Brazilian fruits *Cyphomandra betacea*. **Food Chem.**, v. 12, p. 61–65, 1983.

SÁ-JÚNIOR, A.; CARVALHO, L.G.; SILVA, F.F.; ALVES, M.C. Application of the Koppen classification for climatic zoning in the state of Minas Gerais, Brazil. **Theoretical and Applied Climatology**, v. 108, p. 1-7, 2012.

SANCHES, G. M.; TRUEBA, G. P. Los flavonoides como antioxidantes naturales. **Acta. Farm. Bonaerense**, v. 20, p. 297-306, 2001.

SLINKARD, K.; SINGLETON, V. Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 28, p. 49-55, 1977.

TENE, V.; MALAGÓN, O.; FINZI, P.V.; VIDARI, G.; ARMIJOS, C.; ZARAGOSA, T. An ethnobotanical survey of medicinal plants used in Loja and Zamora-Chinchi, Ecuador. **J. Ethnopharmacol.**, v. 111, p. 63-81, 2007.

VASCO, C.; AVILA, J.; RUALES, J.; SVANBERG, U.; KAMAL-ELDIN, A. Physical and chemical characteristics of golden-yellow and purple-red varieties of tamarillo fruit (*Solanum betaceum* Cav.). **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 60, p. 278-288, 2009.

WANG, S.; ZHUB, F. Tamarillo (*Solanum betaceum*): Chemical composition, biological properties, and product innovation. **Trends in Food Science & Technology**, v. 95, p. 45-58, 2020.

WASZCZYNSKYJ, N.; DEGÁSPARI, C. H. Propiedades antioxidantes de compostos fenólicos. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v. 5, n. 1, p. 33-40, 2004.

## POTENCIAL ANTIOXIDANTE E EMBRIOTOXICIDADE DE *Solanum betaceum* Cav. EM MODELOS ZEBRAFISH (*Danio rerio*)

### RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial antioxidante e os efeitos toxicológicos em embriões de *zebrafish* dos folhas e frutos de *Solanum betaceum* cultivado no Brasil. Foram quantificados os teores de fenóis totais e flavonoides por espectrofotometria de absorção molecular no ultravioleta. O potencial antioxidante foi avaliado utilizando as seguintes metodologias de ensaios *in vitro*: teste de Capacidade Antioxidante Total e dois testes de sequestro de radicais livres (DPPH e ABTS). Os efeitos tóxicos da espécie *S. betaceum* foram avaliados com o teste de toxicidade aguda dos embriões de *zebrafish* expostos a extratos das folhas e polpa dos frutos. As folhas de *S. betaceum* possuem elevado potencial antioxidante e, ao mesmo tempo, alta toxicidade no desenvolvimento de embriões de *zebrafish*, com o Índice Teratogênico (IT) igual a 17,65, LC<sub>50</sub> (efeitos letais) de 1,27 mg mL<sup>-1</sup> e EC<sub>50</sub> (efeitos teratogênicos) entre 0,07 a 0,29 mg mL<sup>-1</sup>. O uso das folhas pela medicina popular é feito de forma tópica, assim, provavelmente, os efeitos terapêuticos antiinflamatórios dos compostos fenólicos podem ser obtidos de forma mais segura do que com a ingestão da mesma. Os frutos, que compõe a alimentação tradicional da população andina, apresentaram menor atividade antioxidante e efeitos deletérios mais baixos nos embriões. O IT variou entre 2,10 a 2,40, LC<sub>50</sub> entre 1,09 e 1,43 mg mL<sup>-1</sup> e EC<sub>50</sub> entre 0,45 e 0,68 mg mL<sup>-1</sup>. Este trabalho se configura como uma base inicial de estudos farmacológicos da espécie *S. betaceum* em modelo animal, possibilitando o planejamento de um estudo futuro sobre o efeito terapêutico do tomate de árvore.

**Palavras-chave:** tomate de árvore, tamarillo, fenóis, radicais livres, índice teratogênico

## ANTIOXIDANT POTENTIAL AND EMBRYOTOXICITY OF *Solanum betaceum* Cav. IN ZEBRAFISH MODELS (*Danio rerio*)

### ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate the antioxidant potential and toxicological effects in zebrafish embryos of the leaves and fruits of *Solanum betaceum* grown in Brazil. The contents of total phenols and flavonoids were quantified by ultraviolet molecular absorption spectrophotometry. The antioxidant potential was evaluated using the following methodologies of *in vitro* tests: Total Antioxidant Capacity test and two free radical scavenging tests (DPPH and ABTS). The toxic effects of the species *S. betaceum* were evaluated with the acute toxicity test of zebrafish embryos exposed to leaf extracts and fruit pulp. The leaves of *S. betaceum* have a high antioxidant potential and, at the same time, high toxicity in the development of zebrafish embryos, with the Teratogenic Index (IT) equal to 17.65, LC<sub>50</sub> (lethal effects) of 1.27 mg mL<sup>-1</sup> and EC<sub>50</sub> (teratogenic effects) between 0.07 to 0.29 mg mL<sup>-1</sup>. The use of leaves by folk medicine is done topically, so, probably, the therapeutic antiinflammatory effects of phenolic compounds can be obtained more safely than with their ingestion. The fruits, which make up the traditional diet of the Andean population, showed less antioxidant activity and lower harmful effects on embryos. The TI varied between 2.10 to 2.40, LC<sub>50</sub> between 1.09 and 1.43 mg mL<sup>-1</sup> and EC<sub>50</sub> between 0.45 and 0.68 mg mL<sup>-1</sup>. This work is configured as an initial basis for pharmacological studies of the species *S. betaceum* in an animal model, allowing the planning of a future study on the therapeutic effect of tree tomatoes.

Key words: tree tomatoes, tamarillo, phenols, free radicals, teratogenic index

## 1 INTRODUÇÃO

*Solanum betaceum* Cav. (sin. *Cyphomandra betacea* Sendt.) é uma espécie nativa dos Andes, conhecida como tomate de árvore ou ‘tamarillo’, tradicionalmente cultivada para produção de frutos destinados ao consumo *in natura* em alguns países da América do Sul, como Peru, Bolívia, Colômbia, Equador e Venezuela. No Brasil, possui um caráter exótico e é cultivada em quintais sem fins comerciais, caracterizando-se como uma hortaliça não convencional, e suas qualidades medicinais, nutricionais e tecnológicas são pouco conhecidas no país (Pantoja et al., 2009; Kinupp & Lorenzi, 2014).

Os frutos de sabor agridoce são usados em diversas receitas culinárias. O suco dos frutos maduros possui também uso pela medicina popular no Equador, em casos de amigdalite, colesterol alto e dor estomacal (Tene et al., 2007). Na Colômbia, a polpa dos frutos, depois de cozida em brasas, pode ser usada como cataplasma para amígdalas inflamadas. Na Costa Rica, os frutos frescos são consumidos em jejum em casos de gripe e também são usados como remédio para problemas hepáticos. As folhas de *S. betaceum* também são aquecidas para uso tópico no pescoço, envolvendo a garganta em casos de inflamações das amígdalas, e no peito para dores anginas (Bohs, 1989; INTA, 2009).

Não foi encontrado nenhum trabalho científico que avalie o efeito das folhas. Para o fruto do tomate de árvore, porém, já foram demonstradas atividades biológicas *in vivo* e *in vitro*, como antioxidante, antinociceptivo, anti-inflamatório, anticâncer e anti-obesidade. Entretanto, há uma variação na composição química dos frutos de tomate de árvore devido à cor dos frutos, maturidade, parte do fruto (polpa, mucilagem, sementes), genética, condições geográficas e ambientais (Wang et al., 2020), o que torna necessário investigar as propriedades das plantas cultivadas no Brasil.

Devido ao uso tradicional do tomate de árvore como planta medicinal, é importante avaliar também sua toxicidade a fim de se comprovar sua segurança para a saúde humana, uma vez que há casos relatados na literatura de interações medicamentosas adversas, efeitos mutagênicos, carcinogênicos e teratogênicos em relação ao uso de fitoterápicos em geral (Jaysinghe & Jayawardena, 2019). Entretanto, estudos sobre a toxicidade e segurança do uso do tomate de árvore são raros. Para o nível de toxicidade em linhas celulares normais, os extratos de frutos de tomate de árvore foram em grande parte não citotóxicos para as células normais com um  $IC_{50}$  de  $>200,00 \mu\text{g mL}^{-1}$  (Mutalib et al., 2017). Em um teste com animais, o tratamento diário de ratos *Sprague Dawley* machos com extrato dos frutos na dose de  $300 \text{ mg kg}^{-1}$  por 7 semanas não mostrou toxicidade (Abdul Kadir et al., 2015).

Modelos animais em testes de toxicologia tem uma enorme vantagem em relação à testes *in vitro*, uma vez que o animal está mais intimamente correlacionado com a toxicidade em humanos e, de forma mais fidedigna, incorpora farmacocinética, absorção, distribuição e metabolismo. Dentre eles, o modelo de toxicidade embrionária do *zebrafish*, devido à alta conservação genética com os humanos (87% de semelhança), tem sido amplamente utilizado em triagens do efeito tóxico de compostos bioativos e, mais recentemente, em avaliações toxicológica de fitoterápicos (Jaysinghe & Jayawardena, 2019).

O teste FET (*Fish Embryonic Toxicity*) (OECD, 2013), realizado com esta espécie de peixe tropical de água doce nativa da Ásia, conhecida popularmente como *zebrafish* (*Danio rerio*), apresenta diversas vantagens que favorecem estudos sobre os efeitos farmacológicos de plantas: tamanho pequeno, ciclo de vida curto, rápido desenvolvimento, fecundidade, transparência dos ovos e embriões que permite observar os órgãos internos, são animais de fácil manutenção e comportamento facilmente observável (Zon et al., 2005).

O objetivo deste trabalho, portanto, foi avaliar o potencial antioxidante e os efeitos toxicológicos em embriões de *zebrafish* de extratos de polpa de frutos e folhas de plantas de *S. betaceum* cultivadas no Brasil.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 MATERIAL VEGETAL

#### 2.1.1 Obtenção

Foram coletadas amostras de folhas e frutos frescos e maduros de *S. betaceum* (frutos de polpa de cor vermelha) de plantas da Coleção de Germoplasma de Hortaliças não Convencionais do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras (UFLA) (latitude 21°13'21" S, longitude 44°58'12" O, 922 m de altitude), localizada em Lavras-MG. Segundo a classificação de Sá Júnior et al. (2012) o clima regional é do tipo Cwa, de acordo com a metodologia proposta por Köppen, sendo caracterizado por um clima temperado úmido com verão quente e inverno seco.

#### 2.1.2 Extração

Foram feitos quatro extratos, sendo dois das folhas e dois dos frutos com dois diferentes solventes: água e metanol. As folhas frescas foram lavadas em água corrente e picadas. Os frutos foram lavados, descascados com uma faca, cortados longitudinalmente e as sementes foram retiradas manualmente para obtenção da polpa (mesocarpo).

Os extratos foram preparados por turboextração utilizando 10 g do material vegetal (folhas ou polpa do fruto) e 100 mL do solvente (água destilado ou metanol). A amostra vegetal foi colocada em um béquer de plástico sob banho de gelo e foi extraída no turboextrator por três ciclos de 10 minutos cada, fazendo um intervalo de um minuto entre os ciclos. Após estes procedimentos, os extratos foram filtrados à vácuo e armazenados a -20° C.

### 2.2 ENSAIOS ANTIOXIDANTES

#### 2.2.1 Preparo dos extratos

Uma alíquota de cada extrato de *Solanum betaceum* foi centrifugada e, a partir do sobrenadante, preparou-se as diluições seriadas para cada teste. Os ensaios antioxidantes foram realizados no Laboratório de Fitoquímica do Horto de Plantas Medicinais da UFLA.

### 2.2.2 Determinação dos fenois totais

Os compostos fenólicos totais foram determinados pelo método colorimétrico utilizando o reagente Folin-Ciocalteu descrito por Slinkard & Singleton (1977). As reações foram realizadas em placas de microtitulação, utilizando 20  $\mu\text{L}$  dos extratos, 125  $\mu\text{L}$  de Carbonato de Sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) a 7% e 100  $\mu\text{L}$  de solução etanólica de Folin-Ciocalteu a 10%. A placa foi armazenada por 2 horas no escuro à temperatura ambiente e, após estes procedimentos, a leitura foi realizada em espectrofotômetro (Leitor de microplacas TECAN Infinity<sup>®</sup> M200 PRO) a 760 nm. Os testes foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos em miligrama equivalentes em ácido gálico por g de matéria fresca da amostra ( $\text{mg EAG g}^{-1}$ ). A curva de calibração foi realizada com ácido gálico com oito pontos de concentração (1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,062; 0,0312; 0,0156; 0,0078  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) e os resultados foram calculados de acordo com a equação da reta ( $Y=3,887x - 0,1545$ , em que y é a absorbância e x é a concentração;  $R^2 = 0,9943$ ).

### 2.2.3 Quantificação de flavonoides

A quantificação de flavonoides nos extratos foi determinada pelo método de Ahn et al. (2007). Foram utilizados 100  $\mu\text{L}$  de solução de cloreto de alumínio ( $\text{AlCl}_3$ ) a 10% (preparado com etanol 70%) e misturados em 100  $\mu\text{L}$  de cada extrato. Após 60 minutos no escuro e à temperatura ambiente, as absorbâncias das amostras foram lidas em espectrofotômetro a 420 nm, contra um branco de 100  $\mu\text{L}$  de solvente + 100  $\mu\text{L}$  solução de Cloreto de Alumínio ( $\text{AlCl}_3$ ). Os testes foram realizados em triplicata e o conteúdo total de flavonoides foi expresso como miligramas equivalentes de quercetina por grama de peso fresco da amostra ( $\text{mg EQ g}^{-1}$ ). A curva de calibração foi realizada com quercetina com oito pontos de concentração (1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,062; 0,0312; 0,0156 e 0,0078  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) e os resultados foram calculados de acordo com a equação da reta ( $Y=12,7x + 0,0648$ ; em que y é a absorbância e x é a concentração;  $R^2 = 0,999$ ).

### 2.2.4 Capacidade antioxidante total

A capacidade antioxidante total (CAT) foi estabelecida de acordo com o método de redução do molibdato de amônio descrito por Prieto et al. (1999). Para este ensaio foram utilizados 20  $\mu\text{L}$  dos extratos misturados em 1,5 mL de solução reagente (fosfato de sódio 28 mM, molibdato de amônio 4 mM e ácido sulfúrico 0,6 M). A solução reagiu por 90 minutos à temperatura de 90° C e logo após arrefecimento à temperatura ambiente, foram aplicados 100  $\mu\text{L}$  de cada solução em placas de microtitulação e suas absorbâncias mensuradas a 695 nm em

espectrofotômetro. A análise foi realizada em triplicata e os resultados expressos em miligrama equivalentes em ácido ascórbico por g de peso fresco da amostra (mg EAC g<sup>-1</sup>).

### **2.2.5 Atividade de captura de radicais livres DPPH**

A atividade de captura de radicais livres DPPH foi realizada de acordo com Brand-Williams et al. (1995). Nas placas de microtitulação foram adicionadas 50 µl das amostras em diferentes concentrações (100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125 e 1,5625 mg mL<sup>-1</sup>) com 250 µL de solução metanólica de 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) 0,2 mM. Em seguida, as soluções foram colocadas no escuro sob temperatura ambiente por 60 minutos e as leituras espectrofotométricas realizadas a 517 nm. O BHT (3,5-di-tert-4-butilhidroxitolueno) foi utilizado como controle positivo, enquanto o metanol como controle negativo. A atividade de eliminação de radicais livres foi expressa em IC<sub>50</sub> (mg mL<sup>-1</sup>), equivalente à concentração do extrato com capacidade de inibir 50% dos radicais DPPH, calculada pela fórmula: (%) = (A0 - A1) / A0 \* 100, em que A0 é a absorvância do controle negativo e A1 a absorvância das amostras.

### **2.2.6 Atividade de captura de radicais livres ABTS**

A eliminação de radicais livres pelo ensaio de descoloração catiônica do radical ABTS foi realizada utilizando o método descrito por Ling et al. (2009) e Re et al. (1999), com poucas modificações. A solução de Ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) ABTS (ABTS•+), produzida pela adição de 0,0768 g de sal de ABTS e 0,0132 g de persulfato de potássio em 20 mL de água destilada, foi mantida em repouso à temperatura ambiente e no escuro por 16 h antes da utilização. A solução de ABTS•+ foi diluída em etanol até alcançar a absorvância de 0,7 ± 0,02 em 734 nm. O etanol foi utilizado como controle negativo, enquanto o Trolox foi utilizado como controle positivo. Foram aplicados 30 µL de extrato das amostras sob diferentes concentrações (100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125 e 1,5625 mg mL<sup>-1</sup>) com 270 µL de solução diluída de ABTS em placas de microtitulação. A solução reagiu por 6 minutos à temperatura ambiente e depois a absorvância foi medida a 734 nm. A atividade de eliminação de radicais livres foi expressa em IC<sub>50</sub> (mg mL<sup>-1</sup>), equivalente à concentração do extrato com capacidade de inibir 50% dos radicais ABTS, calculada pela fórmula: (%) = (A0 - A1) / A0 \* 100, em que A0 é a absorvância do controle negativo e A1 a absorvância das amostras.

## 2.3 ENSAIOS DE EMBRIOTOXICIDADE

### 2.3.1 Manejo das matrizes *zebrafish* e instalações

Todos os procedimentos experimentais deste estudo foram realizados em estrita conformidade com as normas institucionais do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, MG, Brasil, sob o nº 014/19 e atendendo às diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) para manutenção e uso de animais de laboratório e das normas das diretrizes da OECD (2013).

O experimento foi realizado na Ala de Peixes do Biotério Central do Departamento de Medicina Veterinária da UFLA.

As matrizes de *zebrafish* (*Danio rerio*), de aproximadamente cinco meses, foram mantidas em uma raque (Hydrus-Alesco) específica para a espécie, em sistema de recirculação, a qual possui sessenta aquários de 3 L cada, sendo acondicionados dez animais por aquário. Todos os animais permaneceram em fotoperíodo com 14:10 (luz:escuro) (Dammski et al., 2011) e temperatura de 28 °C, alimentadas (Nutrifish-Floculada) duas vezes ao dia. A limpeza dos aquários foi feita pelo sistema automatizado da raque.

Parâmetros relacionados à qualidade da água como temperatura, teor de oxigênio dissolvido, concentração de amônia e pH foram aferidos diariamente.

### 2.3.2 Obtenção dos embriões

Os adultos de *zebrafish* foram separados de acordo com o sexo (80 machos e 80 fêmeas) no dia anterior a cada reprodução, em pequenas criadeiras. As criadeiras foram mantidas em aquários de 40 L com sistema de oxigenação constante e temperatura controlada a 28° C, com manutenção do fotoperíodo de 14 horas luz/ 10 horas escuro. No dia seguinte pela manhã, os machos foram acondicionados na criadeira das fêmeas (2 machos/ 1 fêmeas) uma ou duas horas antes do término do período de escuro. Estas mudanças estimulam o comportamento de acasalamento e a liberação dos gametas no ciclo de luz seguinte. Foram utilizadas criadeiras com um fundo gradeado para que os ovos passem pelo fundo.

Os embriões foram coletados por meio de um sifão e mantidos em meio E3, o qual permite a padronização do desenvolvimento embrionário do *zebrafish* (5 mM NaCl, 0,17 mM KCl, 0,33 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,33 mM MgSO<sub>4</sub>, e 0,1% de azul de metileno (Di Prinzio et al., 2010).

### 2.3.3 Teste de toxicidade aguda em embriões (FET)

O extrato de cada amostra de *Solanum betaceum* foi rotavaporado e o extrato seco foi pesado em balança de precisão e diluído em meio E3 em um tubo *falcon* com o auxílio de um sonicador, em diluições seriadas. Em seguida, a amostra diluída foi centrifugada e utilizou-se o sobrenadante.

A exposição de embriões e larvas de *zebrafish* ao extrato foi realizada em placas de 96 poços, de acordo com o método descrito pela OECD, 2013 (teste nº 236). Foram selecionados 40 ovos fertilizados para cada tratamento, colocados em placa de Petri e tratados com 15 mL de extrato nas diferentes diluições. O grupo controle foi exposto ao meio E3. Os embriões foram mantidos nas placas de Petri em estufa a 28° C por 24 horas. Após este período, foram selecionados 20 embriões saudáveis (n=20) de cada tratamento, que foram colocados em placas de 96 poços, com um embrião por poço e 200 uL de extrato diluído ou meio E3.

Tabela 1. Características morfológicas avaliadas como medidas para o potencial teratogênico de *S. betaceum* ao longo de 120 horas.

Estágio de vida	Embriotoxicidade	Características	HPF				
			24	48	72	96	120
Ovo	Coagulação do ovo		V	V	V	V	V
		Somitos	V	V	V	V	V
		Destacamento de cauda	V	V	V	V	V
		Olhos	V	V	V	V	V
		Pigmentação	X	V	V	V	V
Eclosão (Larva)	Larva viva	Lordose	X	X	V	V	V
		Edema	X	V	V	V	V

HPF: Horas pós fertilização. V: característica que foi avaliada em determinado tempo. X: característica que não foi avaliada em determinado tempo.

Os embriões foram analisados, um a um, a cada 24 horas até completar 120 horas pós fertilização (hpf). Os parâmetros de desenvolvimento avaliados em embriões e larvas durante a exposição de 120 horas foram: coagulação, eclosão das lavras, mortalidade de embriões e larvas, formação dos somitos, destacamento de cauda, formação de olhos, presença de pigmentação e deformidades morfológicas (lordose e edema) (tabela 1). Os embriões e as larvas foram examinados subseqüentemente com o auxílio de um microscópio invertido (Olympus CX22LED) e de uma lupa (Motic BA310) para verificar o desenvolvimento do corpo em cada concentração de extrato por um período de exposição de 120 horas. Foram

feitos dois ensaios nos quais foram testadas as seguintes concentrações de extratos de *S. Betaceum* quanto aos efeitos embriotóxicos e teratogênicos no desenvolvimento de embriões e larvas de *zebrafish*: 10; 5; 2,5; 1,25; 0,625 mg mL<sup>-1</sup> e 2; 1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,062; 0,031 mg mL<sup>-1</sup>.

### 2.3.4 Avaliações do Índice Teratogênico (IT)

O método descrito por Selderslaghs et al. (2009) foi utilizado para a avaliação dos dados. Nos tempos de 24, 48, 72, 96 e 120 hpf, a mortalidade/embriotoxicidade e as alterações morfológicas dos embriões foram avaliadas utilizando um microscópio invertido (Olympus CX22LED). As pontuações foram atribuídas para cada característica de maneira binominal ('1' foi atribuído para características anormais e '0' foi atribuído para normal). Com base na pontuação atribuída a determinadas características, uma pontuação geral para o efeito percentual foi criada para cada tratamento no experimento. Além disso, os efeitos foram avaliados em função do tempo.

A cada indivíduo no experimento foram atribuídas pontuações para malformação (deformidades morfológicas) e mortalidade a cada 24 horas, o que levou à determinação da porcentagem efetiva de cada concentração em cada momento. A porcentagem de toxicidade do extrato foi determinada como a proporção de embriões e/ou larvas mortas sobre o número total de embriões iniciais (20 ovos fertilizados). A porcentagem de malformação para 24, 48, 72, 96 e 120 hpf foi determinada como a proporção de embriões/larvas malformados (presença de edema, lordose ou não eclosão às 120 hpf) sobre o número total de embriões iniciais (n=20).

### 2.3.5 Avaliação da curva dose-resposta

A análise de dose-resposta foi calculada de acordo com procedimentos descritos por Alafiatayo et al., 2019. Utilizou-se o programa *Graph Pad Prisma*, versão 8.0, para a criação de curvas de concentração-resposta para os dados de malformação e mortalidade para cada tratamento, cada um com 20 réplicas por concentração, para o tempo de 120 hpf. Os dados foram apresentados em forma de curvas sigmoidais. As curvas inferior e superior foram definidas em 0 e 100, respectivamente, com o requisito de que a porcentagem próxima de 0 e 100 para efeitos se enquadre na faixa de concentração. Essa curva de concentração-resposta foi utilizada na determinação dos valores de LC<sub>50</sub> (efeitos letais/embriotóxicos) e EC<sub>50</sub> (efeito teratogênico).

Usando os valores calculados de  $LC_{50}$  e  $EC_{50}$ , um índice teratogênico (IT) foi calculado como a razão de  $LC_{50} / EC_{50}$  para o tempo de 120 hpf. Quanto mais altos os valores de IT, maior é o efeito teratogênico do extrato testado, em comparação com a embriotoxicidade geral, medida pela mortalidade de organismos.

#### 2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para os testes antioxidantes, o delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, em um arranjo fatorial 2x2, sendo duas partes da planta (folha e fruto) e dois tipos de solventes (água e metanol). Todos os ensaios foram realizados em triplicata e para as análises estatísticas dos dados utilizou-se o programa R. As médias entre os tratamentos foram submetidas à análise de variância, pelo teste F, e comparadas pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

Para o teste de embriotoxicidade, as curvas de dose-resposta foram geradas através do *GraphPad Prism* versão 8.

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Compostos fenólicos e atividade antioxidante dos extratos de *S. betaceum*

Os resultados revelaram a presença de fenois e flavonoides e atividade antioxidante nos extratos de folhas e polpa de frutos de *S. betaceum* (tabela 2). A folha apresentou teores de fenois totais e flavonoides maiores que o fruto. A extração em metanol para as folhas apresentou o maior teor de fenois totais e a extração em água das folhas obteve o maior teor de flavonoides. A diferença de polaridade entre os solventes água (mais polar) e metanol (menos polar), pode implicar em diferentes poderes de extração dos componentes da amostra.

No teste de Capacidade antioxidante total (CAT), o extrato metanólico da folha apresentou a melhor atividade. Nos testes de captura de radicais livres ABTS e DPPH, os extratos aquosos da polpa dos frutos apresentaram capacidade de redução destes radicais menor que 50%, não sendo possível, portanto, o cálculo do IC<sub>50</sub>. Para o extrato metanólico da polpa dos frutos foi possível o cálculo, porém o IC<sub>50</sub> foi até 24 vezes maior que o encontrado para a folha. O extrato metanólico das folhas apresentou, pois, a melhor atividade, ou seja, as menores concentrações capazes de capturar 50% dos radicais livres DPPH e ABTS presentes na amostra.

Tabela 2. Constituintes fenólicos e atividade antioxidante dos extratos de folhas e polpa de frutos de *S. betaceum*.

	Fenois (mg EAG g <sup>-1</sup> )		Flavonoides (mg EQ g <sup>-1</sup> )		CAT (mg EAC g <sup>-1</sup> )		ABTS (IC <sub>50</sub> =mg mL <sup>-1</sup> )		DPPH (IC <sub>50</sub> =mg mL <sup>-1</sup> )	
	Água	Metanol	Água	Metanol	Água	Metanol	Água	Metanol	Água	Metanol
Folha	2,64 Ab	3,03 Aa	1,20 Aa	0,73 Ab	1,67Ab	2,04 Aa	0,64 a	0,22 Bb	3,65 a	0,74 Bb
Fruto	0,89 Bb	1,80 Ba	0,03 Ba	0,02 Ba	1,33 Bb	1,57 Ba	-	5,49 A	-	4,88 A

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem entre si de acordo com o teste Scott-Knott ( $p < 0,05$ ). **Fenois totais:** expresso em mg de ácido gálico equivalente a 1 g de matéria fresca. **Flavonoides:** expresso em mg de quercetina equivalente a 1 g de matéria fresca. **CAT:** capacidade antioxidante total em mg de ácido ascórbico equivalente a 1 g de matéria fresca. **DPPH:** capacidade de captura de radicais livres DPPH expressa em IC<sub>50</sub>. **ABTS:** capacidade de captura de radicais livres ABTS expressa em IC<sub>50</sub>.

#### 3.2 Teste de toxicidade aguda dos embriões de *zebrafish* expostos a extratos de *S. betaceum*

No ensaio inicial (extratos de folhas e frutos de *S. betaceum* nas concentrações entre 0,625 a 10 mg mL<sup>-1</sup>) houve 100% de mortalidade às 24 horas de pós-fertilização (hpf) para as concentrações entre 2,5 e 10 mg mL<sup>-1</sup> para os quatro extratos testados. Dessa forma, realizou-se um segundo ensaio com menores concentrações (0,031 a 2 mg mL<sup>-1</sup>) para melhor observação do desenvolvimento dos embriões e cálculo do índice teratogênico. Na

concentração de  $2 \text{ mg mL}^{-1}$  ainda houve 100% de mortalidade para os extratos das folhas às 24 hpf e 100% de mortalidade para os extratos dos frutos até as 72 hpf.

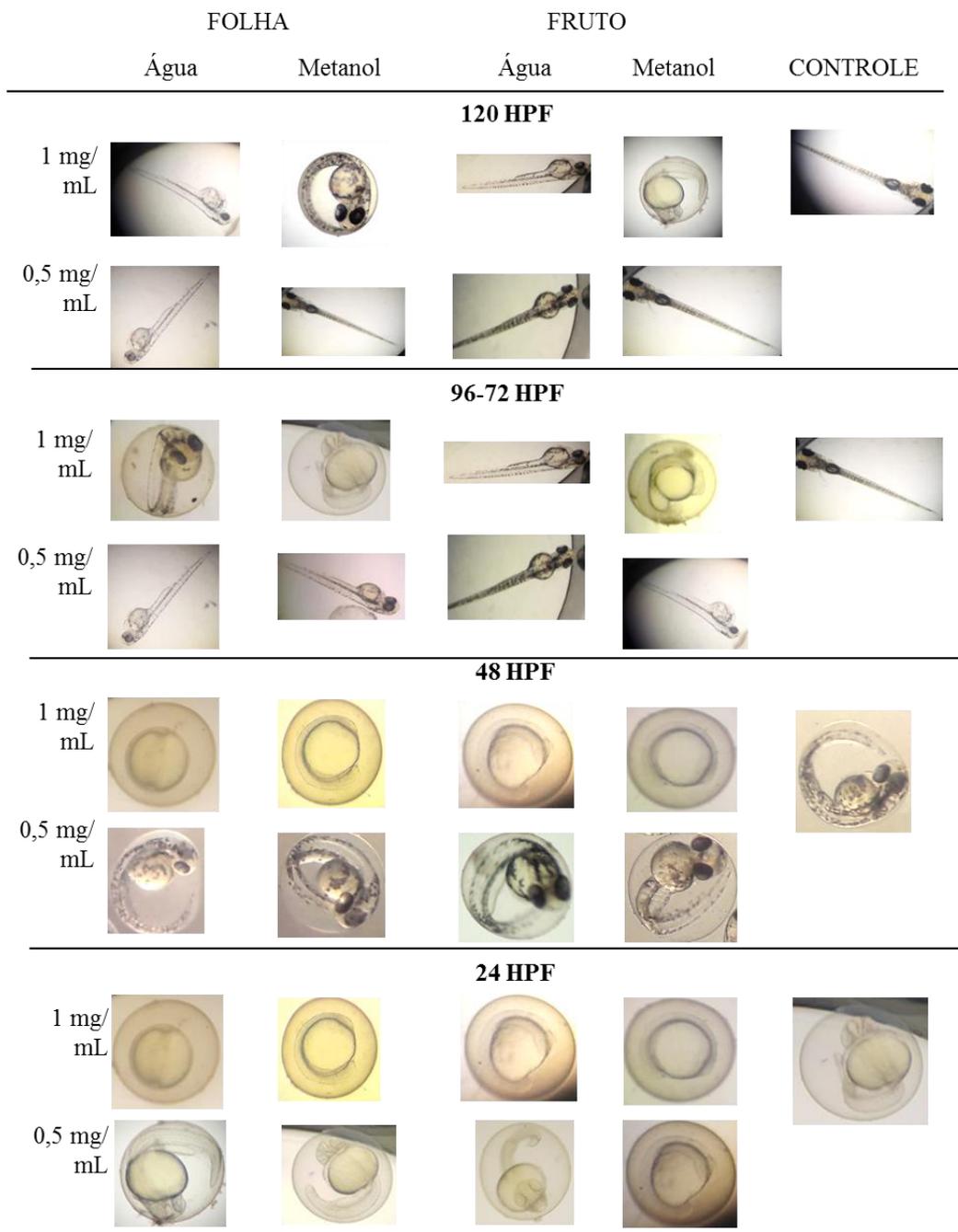
Os embriões incubados com extratos de *S. betaceum* nas concentrações inferiores a  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  foram observados às 24 hpf (figura 1). Não houve eclosão neste momento e foi possível observar algumas alterações no desenvolvimento dos embriões. Na concentração de  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  para os quatro extratos testados, houve um atraso no desenvolvimento dos embriões, sendo que a maioria não apresentou destacamento de cauda ou formação de somitos e olhos (características dos embriões do grupo controle entre as 11 e 14 hpf).

Às 48 hpf, também não houve eclosão e os embriões incubados com a concentração mais alta dos extratos ( $1 \text{ mg mL}^{-1}$ ) ainda apresentaram um desenvolvimento atrasado. Nas concentrações inferiores a  $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$  os embriões já se encontraram idênticos aos do grupo controle (meio E3), com formação de somitos, destacamento de cauda, olhos formados e presença de pigmentação.

Às 72 e 96 hpf, a maioria das larvas incubadas na concentração de  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  ainda não haviam eclodido e encontravam-se sem ou com baixa pigmentação, como pode ser observado na figura 1. Porém, exceto para o extrato metanólico do fruto, os olhos e cauda haviam se desenvolvido. Na concentração de  $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$  as larvas eclodiram com pigmentação e desenvolvimento esperados, porém algumas apresentaram edema no saco vitelínico ou pericárdio. Abaixo de  $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$  os embriões encontraram-se idênticos ao grupo controle, sem alterações morfológicas.

Às 120 hpf, na maior concentração de  $1 \text{ mg mL}^{-1}$ , as larvas dos extratos metanólicos da folha e polpa do fruto não eclodiram, sendo que as do fruto, além disso, não apresentaram pigmentação. Ainda para a concentração de  $1 \text{ mg mL}^{-1}$ , para ambos os extratos aquosos as larvas eclodiram e apresentavam edema no saco vitelínico ou pericárdio. Na concentração de  $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$  algumas larvas também apresentaram edema. Abaixo de  $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$  as larvas apresentaram desenvolvimento esperado e sem alterações às 120 hpf, idênticas ao grupo controle.

Figura 1. Quadro representativo das características morfológicas das larvas de *zebrafish* expostas aos quatro diferentes extratos de *S. betaceum* das 24 às 120 horas pós fertilização (hpf). Na concentração de  $1 \text{ mg mL}^{-1}$ , não houve rompimento do córion para os extratos em metanol de folha e fruto até as 120 hpf. Nas concentrações abaixo de  $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$  as larvas apresentaram aspecto semelhante ao do controle às 120 hpf.



Para todas as concentrações de extrato testadas, o efeito de toxicidade em cada indivíduo foi dependente da concentração (dose-dependente). As curvas concentração-resposta foram produzidas para o tempo de 120 hpf utilizando-se a porcentagem de embriões afetados (letalidade ou malformação para as características observadas) para cada concentração (Figuras 2 e 3). Os dados para  $LC_{50}$  (efeitos embriotóxicos / letalidade) e  $EC_{50}$

(efeitos teratogênicos específicos) foram obtidos das curvas de concentração-resposta no tempo de 120 hpf (tabela 3). Não foi possível calcular, porém, o  $LC_{50}$  para o extrato aquoso da folha nas concentrações avaliadas. A partir dos resultados de  $LC_{50}$  e  $EC_{50}$  às 120 hpf também foi calculado o índice teratogênico (IT), demonstrado na tabela 3.

Figura 2. Curva de concentração-resposta para mortalidade em larvas de *zebrafish* às 120 horas pós fertilização (hpf) expostas à extratos de *S. betaceum* em diferentes concentrações (10; 5; 2,5; 2; 1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,062 e 0,031  $mg mL^{-1}$ ). Não foi possível calcular o  $LC_{50}$  para o extrato aquoso da folha nas concentrações avaliadas.

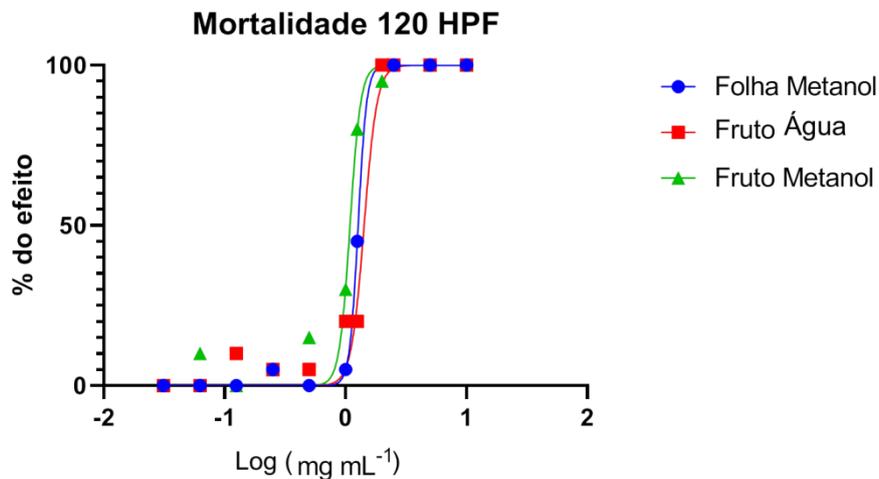
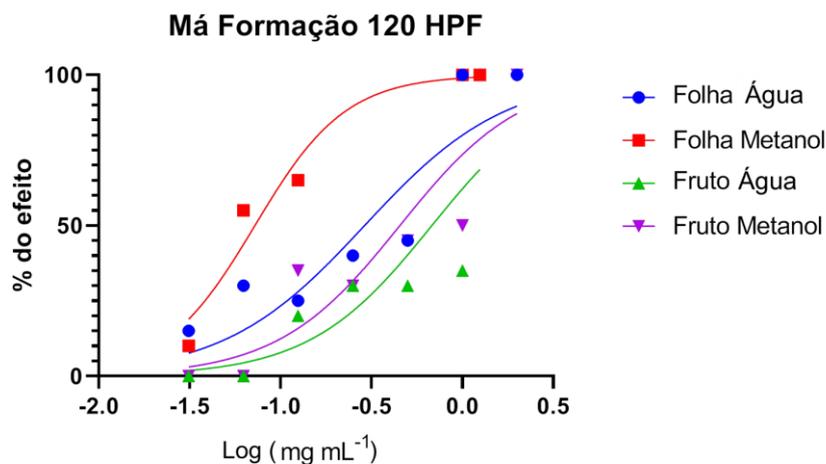


Figura 3. Curva de concentração-resposta para má formação em larvas de *zebrafish* às 120 horas pós fertilização (hpf) expostas à extratos de *S. betaceum* em diferentes concentrações (1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,062 e 0,031  $mg mL^{-1}$ ).



A má formação foi mais dependente da concentração dos extratos do que a letalidade, o que pode ser verificado nos gráficos das figuras 2 e 3. Às 120 hpf, os embriões expostos à todas as concentrações maiores que 1  $mg mL^{-1}$  apresentaram 100% de mortalidade. Nas concentrações menores que 1  $mg mL^{-1}$ , porém, houve pouca ou nenhuma letalidade mas foi

possível observar que a porcentagem de má formação aumentou gradualmente de acordo com o aumento da dose do extrato em que os embriões se encontravam.

Tabela 3. LC<sub>50</sub>, EC<sub>50</sub>, IC (Intervalo de Confiança) e IT (Índice Teratogênico) às 120 horas pós-fertilização expressos em mg mL<sup>-1</sup>.

Tratamento	LC <sub>50</sub>	IC LC <sub>50</sub>	EC <sub>50</sub>	IC EC <sub>50</sub>	IT (LC <sub>50</sub> /EC <sub>50</sub> )
Folha H <sub>2</sub> O	-	-	0,290	0,114 - 0,630	-
Folha Metanol	1,271	1,254 - 1,294	0,072	0,043 - 0,135	17,653
Fruto H <sub>2</sub> O	1,425	1,310 - 1,580	0,680	0,251 - 8,110	2,096
Fruto Metanol	1,088	1,027 - 1,151	0,453	0,209 - 0,884	2,402

As concentrações de extratos de *S. betaceum* necessárias para causar a morte de 50% dos embriões de *zebrafish* (LC<sub>50</sub>) variaram entre 1,088 a 1,425 mg mL<sup>-1</sup> (tabela 3). O extrato metanólico do fruto obteve a menor concentração que apresentou a maior letalidade às 120 hpf, com LC<sub>50</sub> igual a 1,088 mg mL<sup>-1</sup>. O extrato aquoso do fruto, por sua vez, foi o menos tóxico (LC<sub>50</sub> igual a 1,425 mg mL<sup>-1</sup>).

Os efeitos de má formação (EC<sub>50</sub>) às 120 hpf foram observáveis nos extratos com concentrações iguais ou inferiores a 1 mg mL<sup>-1</sup>, uma vez que acima deste valor a letalidade foi de 100% (figura 1). Os valores de EC<sub>50</sub> variaram entre 0,072 a 0,68 mg mL<sup>-1</sup>. A menor concentração capaz de causar alterações morfológicas em 50% dos embriões de *zebrafish* pertence ao extrato da folha em metanol (EC<sub>50</sub> igual a 0,072 mg mL<sup>-1</sup>). Estudos prévios indicam que o metanol na concentração de até 1% não é tóxico para a larva do *zebrafish* e, uma vez que o metanol está presente nos extratos rotavaporados em uma concentração inferior a 1%, os efeitos de má formação se devem aos fitocompostos presentes na folha.

O extrato dos frutos em água apresentou o menor EC<sub>50</sub>, assim como o menor LC<sub>50</sub>.

#### 4 DISCUSSÃO

A avaliação da toxicidade de plantas medicinais no desenvolvimento embrionário é importante pois muitas vezes produtos derivados destas plantas que alegam ter efeitos farmacológicos podem ganhar popularidade no mercado sem informações sobre seu perfil toxicológico e efeitos na saúde (Alafiatayo et al., 2019).

As folhas de *S. betaceum* foram estudadas e apresentaram teores de fenóis, flavonoides e atividade antioxidante superiores aos dos frutos. As folhas são aplicadas em uso tópico para inflamações das amígdalas e dores anginas pela população de alguns países andinos (Bohs, 1989; INTA, 2009) e, por possuírem propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, os compostos fenólicos presentes nas amostras podem contribuir para seu efeito terapêutico

tradicional. Entretanto, o extrato das folhas revelou um índice teratogênico (IT) até 7 vezes maior que o do fruto, ou seja, foi o tratamento que causou a maior porcentagem de má formação nos embriões de *zebrafish* em desenvolvimento.

Os valores de IT foram calculados pela proporção de  $LC_{50}/EC_{50}$  para cada tratamento às 120 hpf. Este índice é utilizado para classificar os efeitos teratogênicos de qualquer composto tóxico; isto é, quanto maior o valor de IT, maior o potencial teratogênico que a substância apresentará (Selderslaghs et al., 2009). O IT para os frutos variou entre 2,096 a 2,402, enquanto para a folha foi igual a 17,653, comprovando que a folha possui potencial de toxicidade para humanos e não deve ser ingerida, mas são necessários mais estudos para verificar se seu uso tópico é seguro.

O gênero *Solanum* destaca-se por ser rico em compostos bioativos na forma de esteroides e alcaloides, que podem possuir tanto aplicações terapêuticas como efeitos tóxicos. A batata, *S. tuberosum*, possui glicoalcaloides capazes de produzir vômito, diarreia e dor abdominal. Outras espécies da família Solanaceae possuem alcaloides com ação sobre o sistema nervoso central que podem levar a diversos efeitos colaterais e até ao envenenamento letal dependendo da dosagem (Campos et. al, 2016). Não foram encontrados trabalhos sobre a presença de alcaloides em *S. betaceum* e a identificação destes compostos pode ser um importante estudo para a determinação do potencial toxicológico da espécie.

## 5 CONCLUSÃO

Para todas as concentrações de extrato de folhas e frutos testadas, o efeito de toxicidade no modelo *zebrafish* foi dependente da concentração (dose-dependente). As folhas de *S. betaceum* possuem elevado potencial antioxidante e, ao mesmo tempo, alta toxicidade no desenvolvimento de embriões de *zebrafish*. Provavelmente devido à esta toxicidade, o uso das folhas pela medicina popular é feito de forma tópica, assim os efeitos terapêuticos antiinflamatórios dos compostos fenólicos podem ser obtidos de forma mais segura do que com a ingestão da mesma. Os frutos, que são largamente consumidos pela população andina, apresentaram atividade antioxidante e menores efeitos deletérios nos embriões. Este trabalho se configura como uma base inicial de estudos farmacológicos da espécie *S. betaceum* em modelo animal, possibilitando o planejamento de um estudo futuro sobre o efeito terapêutico do tomate de árvore.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDUL KADIR, N. A. A.; RAHMAT, A.; JAAFAR, H. Z. E. Protective Effects of Tamarillo (*Cyphomandra betacea*) Extract against High Fat Diet Induced Obesity in Sprague-Dawley Rats. **Journal of Obesity**, v. 2015, 2015.

AHN, M. R.; KUMAZAWA, S.; USUI, Y.; NAKAMURA, J.; MATSUKA, M.; ZHU, F.; NAKAYAMA, T. Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of China. **Food Chemistry**, v. 101, p. 1383-1392, 2007.

ALAFIATAYO, A.A.; LAI, K.; SYAHIDA, A.; MAHMOOD, M.; SHAHARUDDIN, N.A. Phytochemical evaluation, embryotoxicity, and teratogenic effects of *Curcuma longa* extract on zebrafish (*Danio rerio*). **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2019, 2020.

BOHS, L. Ethnobotany of the genus *Cyphomandra* (Solanaceae). **Economic Botany**, v.43, p. 143-163, 1989.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science Technology**, London, v. 28, n. 1, p. 25–30, 1995.

CAMPOS, S.C.; SILVA, C.G.; CAMPANA, P.R.V.; ALMEIDA, V.L. Toxicidade de Espécies vegetais. **Rev. bras. plantas med.**, v.18, n.1, Botucatu, 2016.

DAMMSKI, A. P., MULLER, B.R.; GAYA, C.; REGONATO, D. **Zebrafish. Manual de Criação em Biotério**. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

DI PRINZO, C. M.; BOTTA, P.E.; BARRIGA, E.H.; RÍOS, E.A.; REYES, A.E.; ARRANZ, S.E. Growth hormone receptors in zebrafish (*Danio rerio*): adult and embryonic expression patterns. **Gene Expression Patterns**, v. 10, n. 4-5, p. 214-225, 2010.

INTA (Instituto Nacional de Innovación y Transferencia en Tecnología Agropecuaria). **Cultivo de Tomate de Árbol (*Cyphomandra betacea*) – Área: manejo integrado de cultivo/frutales de altura**. San José, Costa Rica, 2009.

JAYASINGHE, C.D. & JAYAWARDENA, U.A. Toxicity assessment of herbal medicine using zebrafish embryos: a systematic review. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, V. 2019, 2019.

KINUPP, V. F.; LORENZI, H. Plantas alimentícias não convencionais (PANC) no Brasil. São Paulo: **Instituto Plantarum de Estudos da Flora**, 2014.

LING, L. T.; YAP, S.; RADHAKRISHNAN, A.K.; SUBRAMANIAM, T.; CHENG, H.M.; PALANISAMY, U.D. Standardised *Mangifera indica* extract is an ideal antioxidant. **Food Chemistry**, London, v. 113, p. 1154-1159, 2009.

MUTALIB, M. A.; RAHMAT, A.; ALI, F.; OTHMAN, F.; RAMASAMY, R. Nutritional compositions and antiproliferative activities of different solvent fractions from ethanol extract of *Cyphomandra betacea* (Tamarillo) Fruit. **Malays J Med Sci.**, v. 24, n.5, p. 19–32, 2017.

OECD. **Fish embryo toxicity test**. Organization for Economic Co-Operation and Development, Paris, 2013.

PANTOJA, L.; PINTO, N.A.V.D.; LOPES, C.; GANDRA, R.; SANTOS, A.S. Caracterização física e físico-química de frutos de duas variedades de tamarilho oriundas do norte de Minas Gerais. **Rev. Bras. Frutic.**, Jaboticabal - SP, v. 31, p. 916-919, 2009.

PRIETO, P., PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. **Analysis Biochemistry**, v. 269, p. 337-341, 1999.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 26, n. 10, p. 1231-1237, 1999.

SÁ-JÚNIOR, A.; CARVALHO, L.G.; SILVA, F.F.; ALVES, M.C. Application of the Koppen classification for climatic zoning in the state of Minas Gerais, Brazil. **Theoretical and Applied Climatology**, v. 108, p. 1-7, 2012.

SELDERSLAGHS, I. W. T.; ROMPAY, A.R.V.; COEN, W.; WITTERS, H.E. Development of a screening assay to identify teratogenic and embryotoxic chemicals using the zebrafish embryo. **Reproductive Toxicology**, vol. 28, n. 3, p. 308–320, 2009.

SLINKARD, K. & SINGLETON, V. Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 28, p. 49-55, 1977.

TENE, V.; MALAGÓN, O.; FINZI, P.V.; VIDARI, G.; ARMIJOS, C.; ZARAGOSA, T. An ethnobotanical survey of medicinal plants used in Loja and Zamora-Chinchi, Ecuador. **J. Ethnopharmacol.**, v. 111, p. 63-81, 2007.

WANG, S. & ZHUB, F. Tamarillo (*Solanum betaceum*): Chemical composition, biological properties, and product innovation. **Trends in Food Science & Technology**, v. 95, p. 45-58, 2020.

ZON, L. I. & PETERSON, R. T. *In vivo* drug discovery in the zebrafish. **Nature reviews Drug discovery**, v. 4, n. 1, p. 35, 2005.