

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

Composição química e efeitos de frutos do Cerrado sobre o estresse oxidativo, longevidade e doença de Alzheimer em *Caenorhabditis elegans*

NATASHA RIOS LEITE

**Dourados – MS
2018**

NATASHA RIOS LEITE

Composição química e efeitos de frutos do Cerrado sobre o estresse oxidativo, longevidade e doença de Alzheimer em *Caenorhabditis elegans*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde

Área de concentração: Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Edson Lucas dos Santos

Dourados - MS
2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

L533c	Leite, Natsha Rios Composição química e efeitos de frutos do Cerrado sobre o estresse oxidativo, longevidade e doença de Alzheimer em <i>Caenorhabditis elegans</i> / Natsha Rios Leite -- Dourados: UFGD, 2018. 87f. : il. : 30 cm. Orientador: Edson Lucas dos Santos Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Grande Dourados. Inclui bibliografia 1. Polpa de frutos. 2. Estresse oxidativo. 3. Expectativa de vida saudável. 4. β -amiloide. I. Título.
-------	--

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

©Direitos reservados. Permitido a reprodução parcial desde que citada a fonte.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO APRESENTADA POR NATASHA RIOS LEITE, ALUNA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM CIÊNCIAS DA SAÚDE, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO "FARMACOLOGIA", REALIZADA NO DIA 31 DE AGOSTO DE 2018.

Ao trigésimo primeiro dia do mês de agosto do ano de dois mil e dezoito (31/08/2018), às 14h, em sessão pública, realizou-se, na sala 41 da Faculdade de Administração, Ciências Contábeis e Economia (FACE), da Universidade Federal da Grande Dourados, a Defesa de Dissertação de Mestrado intitulada "Composição química e efeitos de frutos do Cerrado sobre o estresse oxidativo, longevidade e doença de Alzheimer em *Caenorhabditis elegans*" apresentada pela mestranda NATASHA RIOS LEITE, do Programa de Pós-Graduação Mestrado em Ciências da Saúde, à Banca Examinadora constituída pelos professores **Dr. Edson Lucas dos Santos** (Presidente/orientador), **Dra. Jaqueline Ferreira Campos** (membro interno), **Dr. Uilson Pereira dos Santos** (membro externo) e **Dra. Paola dos Santos da Rocha** (membro interno). Iniciada sessão, a presidência deu a conhecer ao candidato e aos integrantes da Banca as normas a serem observadas na apresentação da Dissertação. Após o candidato ter apresentado a sua Dissertação, no tempo previsto de 30 até 40 minutos, os componentes da Banca Examinadora fizeram suas arguições, que foram intercaladas pela defesa do candidato, no tempo previsto de até 240 minutos. Terminadas as arguições, a Banca Examinadora, em sessão secreta, passou ao julgamento, tendo sido o candidato considerado **APROVADO**, fazendo jus ao título de **MESTRE EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**. Nada mais havendo a tratar, lavrou-se a presente ata, que vai assinada pelos membros da Banca Examinadora.

Dourados, 31 de agosto de 2018.

Dr. Edson Lucas dos Santos _____

Dra. Jaqueline Ferreira Campos _____

Dr. Uilson Pereira dos Santos _____

Dra. Paola dos Santos da Rocha _____

ATA HOMOLOGADA EM: 05/09/18, PELA PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA / UFGD.

Dedico este trabalho a todos
aqueles que contribuíram para
sua realização.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que fizeram parte deste trabalho, de forma direta ou indireta e, contribuíram para que este se concretizasse:

A Deus, por conceder força e perseverança suficiente para trilhar meu caminho;

A minha família, por sempre estarem ao meu lado e me apoiarem;

A meu namorado, pelo companheirismo e por cuidar sempre de mim;

Ao meu orientador Edson Lucas dos Santos, pela chance de realizar este projeto e pela relação de confiança que construímos ao longo deste tempo;

A professora Kely de Picoli Souza, pelos ensinamentos e por ser um modelo de mulher e profissional a seguir;

A minha parceira no laboratório, Laura Costa Alves de Araujo, por sempre estar ao meu lado e por realizar nossos estudos sempre com o apoio (e mãos) uma da outra;

Aos meus companheiros do grupo GEBBAM, pelas dúvidas sanadas, pelo conhecimento compartilhado nos nossos seminários, pelos cafés e risadas ao longo destes anos;

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, sua equipe de funcionários e professores, pela competência na formação deste curso;

A Universidade Federal da Grande Dourados, pela possibilidade de formação acadêmica;

A Fundect e a Capes, pela concessão de bolsa e apoio financeiro para realização deste estudo;

E a todos que não foram citados, mas auxiliaram na construção deste projeto.

É preciso paciência para regar
sonhos. E dedicação para um
dia colher frutos.

LISTA DE FIGURAS

Revisão de Literatura

Figura 1 – Figura 1. Folhas e fruto de <i>Annona crassiflora</i> Mart.	22
Figura 2 – Folhas e fruto de <i>Dipteryx alata</i> Vogel.	24
Figura 3 – Folhas e fruto de <i>Psidium guineense</i> Sw.	26
Figura 4 – Ciclo de vida do <i>C. elegans</i>	35

Artigo

Figura 1 – Toxicidade da polpa de <i>Annona crassiflora</i> (marolo) em <i>Caenorhabditis elegans</i> , por (A) 24 horas e (B) 48 horas. Os valores são expressos como média \pm EPM.	65
Figura 2 – Toxicidade da polpa de <i>Dipteryx alata</i> (baru) em <i>Caenorhabditis elegans</i> , por (A) 24 horas e (B) 48 horas. Os valores são expressos como média \pm EPM.	65
Figura 3 – Toxicidade da polpa de <i>Psidium guineense</i> (araçá) em <i>Caenorhabditis elegans</i> , por (A) 24 horas e (B) 48 horas. Os valores são expressos como média \pm EPM.	66
Figura 4 – Número de progênie em <i>Caenorhabditis elegans</i> tratados com a polpa de <i>A. crassiflora</i> . (A) Quantificação diária da progênie e (B) total dos 5 dias de progênie. Os valores são expressos como média \pm EPM.	66
Figura 5 – Número de progênie em <i>Caenorhabditis elegans</i> tratados com a polpa de <i>D. alata</i> . (A) Quantificação diária da progênie e (B) total dos 5 dias de progênie. Os valores são expressos como média \pm EPM.	67
Figura 6 – Número de progênie em <i>Caenorhabditis elegans</i> tratados com a polpa de <i>P. guineense</i> . (A) Quantificação diária da progênie e (B) total dos 5 dias de progênie. Os valores são expressos como média \pm EPM.	67

Figura 7 – Estresse térmico no modelo experimental *in vivo* *C. elegans* submetidos ao tratamento com a polpa de *A. crassiflora*. * Representa resultados estatisticamente significativos ($P < 0,05$) quando o grupo tratado foi comparado com o grupo controle. Os valores são expressos como média \pm EPM. 68

Figura 8 – Estresse térmico no modelo experimental *in vivo* *C. elegans* submetidos ao tratamento com a polpa de *D. alata*. * Representa resultados estatisticamente significativos ($P < 0,05$) quando o grupo tratado foi comparado com o grupo controle. Os valores são expressos como média \pm EPM. 68

Figura 9 – Estresse térmico no modelo experimental *in vivo* *C. elegans* submetidos ao tratamento com a polpa de *P. guineense*. * Representa resultados estatisticamente significativos ($P < 0,05$) quando o grupo tratado foi comparado com o grupo controle. Os valores são expressos como média \pm EPM. 69

Figura 10 – Estresse oxidativo no modelo experimental *in vivo* *C. elegans* submetidos aos tratamentos com a polpa de *A. crassiflora*. * Representa resultados estatisticamente significativos ($P < 0,05$) quando o grupo tratado foi comparado com o grupo controle. Os valores são expressos como média \pm EPM. 70

Figura 11 – Estresse oxidativo no modelo experimental *in vivo* *C. elegans* submetidos aos tratamentos com a polpa de *D. alata*. * Representa resultados estatisticamente significativos ($P < 0,05$) quando o grupo tratado foi comparado com o grupo controle. Os valores são expressos como média \pm EPM. 70

Figura 12 – Estresse oxidativo no modelo experimental *in vivo* *C. elegans* submetidos aos tratamentos com a polpa de *P. guineense*. * Representa resultados estatisticamente significativos ($P < 0,05$) quando o grupo tratado foi comparado com o grupo controle. Os valores são expressos como média \pm EPM. 71

Figura 13 – Ensaio de longevidade no modelo experimental *in vivo* *C. elegans* submetidos aos tratamentos com a polpa de *A. crassiflora*. 71

Figura 14 – Ensaio de longevidade no modelo experimental *in vivo* *C. elegans* submetidos aos tratamentos com a polpa de *D.alata*. 72

Figura 15 – Ensaio de longevidade no modelo experimental *in vivo* *C. elegans* submetidos aos tratamentos com a polpa de *p. guineense*. 72

Figura 16 – Ensaio de paralisia induzida em *C. elegans* (CL2006), submetidos ao tratamento com a polpa de *A. crassiflora*. * Representa resultados estatisticamente significativos ($P<0,05$) quando o grupo tratado foi comparado com o grupo controle. Os valores são expressos como média \pm EPM. 73

Figura 17 – Ensaio de paralisia induzida em *C. elegans* (CL2006), submetidos ao tratamento com a polpa de *D. alata*. * Representa resultados estatisticamente significativos ($P<0,05$) quando o grupo tratado foi comparado com o grupo controle. Os valores são expressos como média \pm EPM. 74

Figura 18 – Ensaio de paralisia induzida em *C. elegans* (CL2006), submetidos ao tratamento com a polpa de *P. guineense*. * Representa resultados estatisticamente significativos ($P<0,05$) quando o grupo tratado foi comparado com o grupo controle. Os valores são expressos como média \pm EPM. 74

LISTA DE TABELAS

Revisão de Literatura

Tabela 1 – Atividades biológicas de espécies frutíferas do bioma Cerrado	19
Tabela 2 – Composição nutricional da polpa dos frutos de <i>A. crassiflora</i>	22
Tabela 3 – Composição nutricional da polpa e casca dos frutos de <i>D. alata</i>	24
Tabela 4 – Composição nutricional da polpa dos frutos de <i>P. guineense</i>	26

Artigo

Tabela 1 – Composição química dos frutos de <i>A. crassiflora</i> , <i>D. alata</i> e <i>P. guineense</i> .	63
Tabela 2 – Atividade antioxidante dos frutos de <i>A. crassiflora</i> , <i>D. alata</i> e <i>P. guineense</i> pelos métodos de captura dos radicais DPPH e ABTS ^{•+} .	64
Tabela 3 – Efeitos dos tratamentos das polpas de frutos do Cerrado na sobrevivência de animais selvagens em condições padrões.	73

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ABTS	2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)
<i>A. crassiflora</i>	<i>Annona crassiflora</i>
AlCl ₃ .6H ₂ O	Cloreto de alumínio hexahidratado
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
BHA	Hidroxianisol butilado
BHT	Hidroxitolueno butilado
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
CAT	Enzima catalase
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CGC	<i>Caenorhabditis</i> Genetics Center
DA	Doença de Alzheimer
DAF-16	Abnormal DAuer Formation
<i>D. alata</i>	<i>Dipteryx alata</i>
DCFH	2,6 – diclorofonolindofenol – sódio
DPPH	2,2- Diphenyl-1-picrylhydrazil
EAG	Equivalente ao ácido gálico
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EPM	Erro padrão da média
EQ	Equivalente de quercetina
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
g	grama
GPx	Enzima glutaciona peroxidase
GR	Enzima glutaciona redutase
GSH	Glutaciona
GSSG	Glutaciona oxidada
GST	Glutaciona-S-transferase
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
IC ₅₀	Concentração necessária para inibir 50 % dos radicais livres
IGF	Fator de crescimento semelhante à insulina
KH ₂ PO	Fosfato de potássio monobásico
KPO ₄	Tampão fosfato

L	Litro
LB	Meio Luria-Bertani
M	Molar
mg	Miligrama
MgSO ₄	Sulfato de magnésio
mL	Mililitro
mm	Milimetro
mM	Milimolar
mmHg	Milímetros de mercúrio
NaCl	Cloreto de sódio
Na ₂ CO ₃	Carbonato de sódio
NADPH	Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina
Na ₂ HPO ₄	Fosfato de sódio dibásico
NGM	Nematode Growth Medium
nm	Nanômetro
NaOH	Hidróxido de sódio
O ₂ ^{•-}	Ânion superóxido
P.A.	Para análise
<i>P. guineense</i>	<i>Psidium guineense</i>
PPA	Proteína precursora da amiloide
Prxs	Enzimas peroxiredoxinas
Rpm	Rotação por minuto
SOD	Enzima superóxido dismutase
SOD 1	Enzima superóxido dismutase com cobre e zinco
SOD 2	Enzima superóxido dismutase com manganês
SOD 3	Enzima superóxido dismutase com cobre e zinco extracelular
µg	Micrograma
µl	Microlitro
α	Alfa
β	Beta
βA	Beta-amiloide
γ	Gama

Composição química e efeitos de frutos do Cerrado sobre o estresse oxidativo, longevidade e doença de Alzheimer em *Caenorhabditis elegans*

RESUMO

O bioma Cerrado é composto por uma vasta biodiversidade, apresentando diversas espécies vegetais endêmicas. A conservação de sua flora é imprescindível para que se possa estudá-la, bioprospectar moléculas ativas e investigar seus efeitos biológicos, no qual a atividade antioxidante tem recebido grande destaque. Nos últimos anos, tem sido descrito que agentes oxidantes estão entre os grandes responsáveis pelo envelhecimento e, pelo desencadeamento e/ou agravamento de inúmeras doenças, como o câncer, aterosclerose, doenças cardiovasculares, doenças autoimunes e doenças neurodegenerativas. Diante do exposto, o presente estudo busca identificar constituintes químicos, avaliar a atividade antioxidante, efeitos sobre a longevidade e sobre os sintomas da Doença Alzheimer de três espécies de frutos do Cerrado, sendo eles *Annona crassiflora*, *Dipteryx alata* e *Psidium guineense*. Para isso, os compostos químicos foram identificados através de reações colorimétricas quantitativas, dentre eles os compostos fenólicos, flavonoides, β -caroteno, licopeno, clorofilas a e b e ácido ascórbico. A atividade antioxidante *in vitro* dos frutos foi avaliada através dos métodos de captura dos radicais livres DPPH e ABTS. Nos estudos *in vivo* foi utilizada a estirpe selvagem (N2) e uma cepa transgênica (CL2006) do nematoide *Caenorhabditis elegans*. Inicialmente avaliou-se que as polpas dos frutos não apresentaram toxicidade, nem interferiram na capacidade reprodutora dos animais. Quando submetidos ao estresse térmico, a polpa de *A. crassiflora* promoveu proteção aos nematoides na segunda hora de avaliação. As três polpas dos frutos foram capazes de reduzir os danos oxidativos gerados por juglone, porém apenas a polpa de *A. crassiflora* foi efetiva em todos os períodos avaliados. A polpa de *D. alata* promoveu o aumento da expectativa de vida dos animais e *A. crassiflora* proporcionou um atraso da paralisia induzida nos animais transgênicos. Em conjunto, os frutos apresentaram concentrações significativas de compostos bioativos e obtiveram um desempenho promissor na investigação da atividade antioxidante, evidenciando seu potencial uso para uma melhora na qualidade e aumento da expectativa de vida e até mesmo como nutracêuticos atuando sobre os sintomas de algumas doenças.

Palavras-chave: Polpa de frutos. Estresse oxidativo. Expectativa de vida saudável. β -amiloide.

Chemical composition and effects of Cerrado fruits on oxidative stress, longevity and Alzheimer's disease in *Caenorhabditis elegans*

ABSTRACT

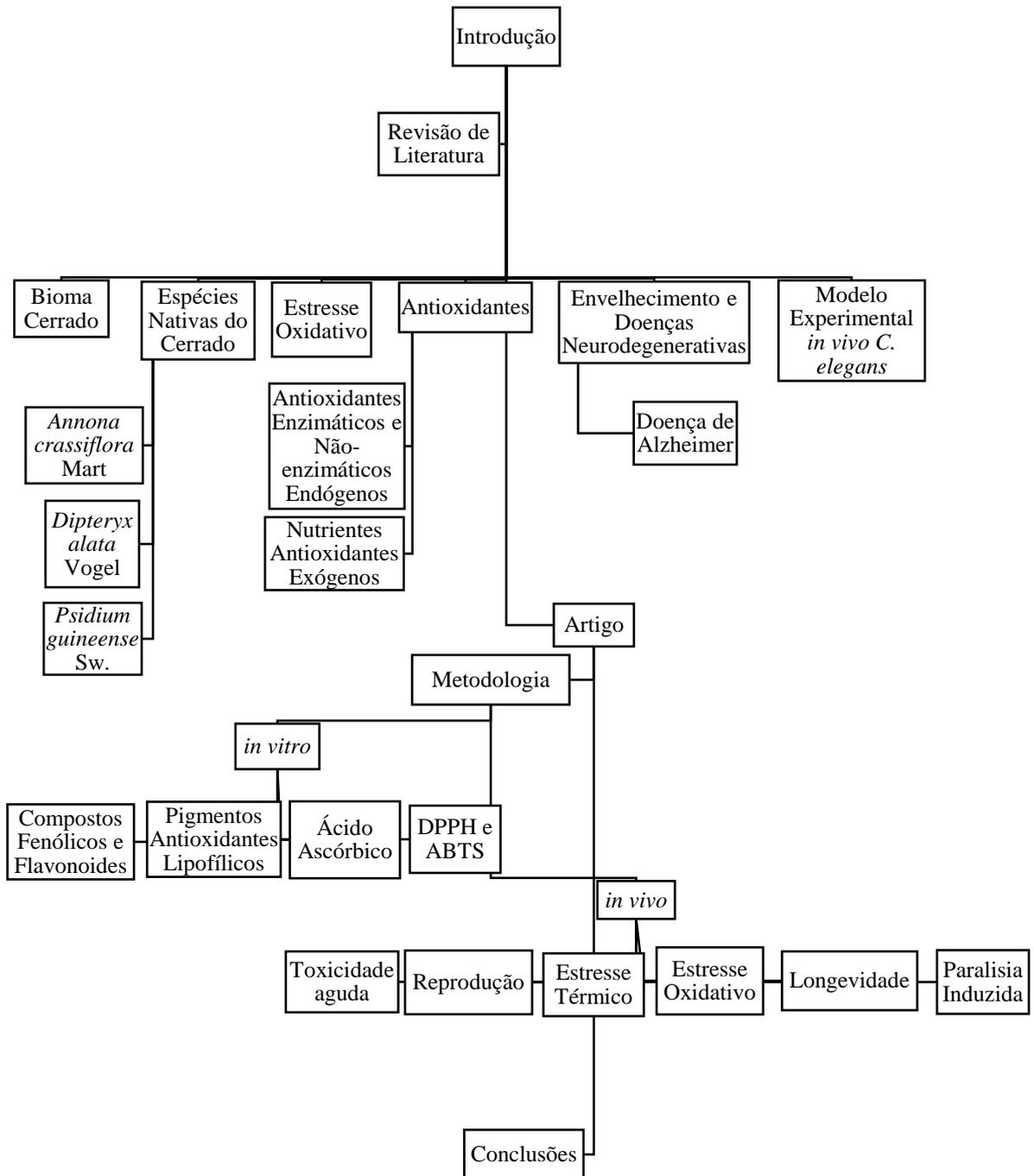
The Cerrado biome is composed of a vast biodiversity, presenting several endemic plant species. The conservation of its flora is essential so that it can be studied, bioprospecting active molecules and investigating its biological effects, in which the antioxidant activity has received great prominence. In recent years, it has been described that oxidizing agents are among the major responsible for aging, and by the triggering and/or aggravation of numerous diseases, such as cancer, atherosclerosis, cardiovascular diseases, autoimmune diseases and neurodegenerative diseases. In view of the above, the present study aims to identify chemical constituents, antioxidant activity, longevity effects and Alzheimer's disease symptoms of three species of Cerrado fruits, such as *Annona crassiflora*, *Dipteryx alata* and *Psidium guineense*. For this, the chemical compounds were identified through quantitative colorimetric reactions, among them the phenolic compounds, flavonoids, β -carotene, lycopene, chlorophyll a and b and ascorbic acid. The in vitro antioxidant activity of the fruits was evaluated by the DPPH and ABTS free radical capture methods. In vivo studies the wild type (N2) and a transgenic strain (CL2006) of the nematode *Caenorhabditis elegans* were used. Initially it was evaluated that the fruit pulps presented no toxicity, nor interfered in the reproductive capacity of the animals. When submitted to thermal stress, the *A. crassiflora* pulp promoted nematode protection in the second hour of evaluation. The three fruit pulps were able to reduce the oxidative damages generated by juglone, but only *A. crassiflora* pulp was effective in all evaluated periods. *D. alata* pulp promoted increased life expectancy of animals and *A. crassiflora* provided delayed induced paralysis in transgenic animals. Together, the fruits presented significant concentrations of bioactive compounds and obtained a promising performance in the investigation of antioxidant activity, evidencing their potential use for an improvement in quality and increase of life expectancy and even as nutraceuticals acting on the symptoms of some diseases.

Key words: Fruit pulp. Oxidative stress. Healthspan. β -amyloid

SUMÁRIO

Fluxograma estrutural da dissertação	12
1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 O bioma Cerrado	16
2.2 Espécies nativas do Cerrado	16
2.2.1 <i>Annona crassiflora</i> Mart.	18
2.2.2 <i>Dipteryx alata</i> Vogel	21
2.2.3 <i>Psidium guineense</i> Sw.	23
2.3 Estresse oxidativo	25
2.4 Antioxidantes	26
2.4.1 Antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos endógenos	26
2.4.2 Antioxidantes exógenos	28
2.5 Envelhecimento e doenças neurodegenerativas	30
2.5.1 Doença de Alzheimer	31
2.6 Modelo experimental <i>in vivo</i> <i>Caenorhabditis elegans</i>	32
3 OBJETIVOS	35
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36
5 APÊNDICES	48
5.1 Artigo: Composição química e efeitos de frutos do Cerrado sobre o estresse oxidativo, longevidade e doença de Alzheimer em <i>Caenorhabditis elegans</i>	49

Fluxograma estrutural da dissertação:



1 INTRODUÇÃO

O Brasil é considerado um dos países que abriga a maior biodiversidade da flora terrestre, cerca de 45.000 espécies, aproximadamente 20% do total mundial (DUTRA et al., 2016). Esta riqueza ambiental está dividida em biomas, sendo o Cerrado o segundo maior bioma do país, apresentando formas de vegetação como florestas, savanas e campos (RIBEIRO; WALTER, 2008).

No entanto, o conhecimento escasso e negligenciado, em conjunto com a subutilização das espécies, contribui, mesmo que indiretamente, para a extinção da megabiodiversidade do Brasil. Conseqüentemente, a população deixa de se beneficiar dos componentes nutricionais e possíveis efeitos medicinais deste ecossistema. VIEIRA, CAMILLO e CORADIN, 2016, afirmam que: “Não há como valorizar o que não se conhece e, não raras vezes, acabamos perdendo aquilo que não conhecemos ou que ainda não é conhecido da ciência”, uma reflexão a ser considerada pela população, pesquisadores e gestores públicos.

Inúmeras são as possibilidades de uso do patrimônio vegetal, como produção de fibras, madeira, pigmentos, condimentos, aromas, energia e principalmente medicamentos à base de seus princípios ativos. Neste sentido, começam a existir iniciativas como o Programa Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos, criado em 2009 e a publicação da Farmacopeia Popular do Cerrado em 2010. Estes eventos, somados às pesquisas científicas, valorizam e incentivam o emprego de recursos naturais nativos, não só pela população, mas pelas indústrias e comércios, podendo constituir uma fonte de renda alternativa (CORADIN, SIMINSKI, & REIS, 2011; FARMACOPEIA POPULAR DO CERRADO, 2009; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

Destacam-se assim as espécies frutíferas, que juntamente aos vegetais e ervas, são as principais fontes de nutrientes, como vitaminas e minerais, e metabólitos secundários, como compostos fenólicos, carotenoides, esteróis e saponinas. Estes compostos são conhecidos por exercerem várias atividades biológicas: antioxidante, anti-inflamatória, antitumoral, antiproliferativa, antimicrobiana, anti-neurodegenerativa, cardioprotetora, neuroprotetoras e diversas outras (DEMBITSKY et al., 2011; NERI-NUMA et al., 2017).

Almejando o desempenho benéfico que exercem no funcionamento do organismo, gerando saúde e bem-estar, é notável o aumento progressivo no consumo de frutas e hortaliças nos últimos anos, grande parte em razão da sensibilização dos consumidores para os benefícios gerados por estes alimentos (OMAR et al., 2017). Estas fontes naturais, ricas em antioxidantes e outros compostos bioativos, estão associadas à proteção contra espécies reativas de oxigênio

e nitrogênio, como ânion superóxido, radical hidroxila e hidroperóxido. As espécies reativas, por sua vez, estão envolvidas em um processo denominado estresse oxidativo, vinculado ao desenvolvimento e/ou agravamento de muitas doenças como câncer, disfunções cardiovasculares, aterosclerose, diabetes e doenças neurodegenerativas (AGUIAR et al., 2016; IGHODARO; AKINLOYE, 2017; LOSADA-BARREIRO; BRAVO-DÍAZ, 2017).

O cérebro, devido ao alto consumo de energia, cerca de 20 % do oxigênio e glicose total do organismo, passa a ser o órgão mais vulnerável ao estresse oxidativo (CHEN & ZHONG, 2014; NELSON et al., 2016). Torna-se suscetível às lesões oxidativas e inflamatórias, danos no metabolismo energético, alterações sinápticas e neuroquímicas, comprometendo neurotransmissores como a acetilcolina e a serotonina, sendo o estresse oxidativo parte crucial no processo patológico da Doença de Alzheimer (QUERFURTH; LAFERLA, 2010; VASCOCELOS et al., 2015).

Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2018), no ano de 2017 a população de idosos ultrapassou 30,2 milhões de pessoas e, em 2060 representará um quarto da população nacional. Associado ao processo de envelhecimento há uma redução no desempenho das atividades fisiológicas, ocasionando um aumento considerável à suscetibilidade de diversas doenças, principalmente as neurodegenerativas como a Doença de Alzheimer, que tem a demência como principal aspecto (OMAR et al., 2017). De acordo com World Alzheimer Report 2016, divulgado pela fundação Alzheimer's Disease International, hoje há 47 milhões de pessoas com demência no mundo e em 2050 estes casos chegarão a mais de 131 milhões.

Neste sentido, algumas espécies vegetais encontradas no Brasil já são alvos de estudos bioprospectivos de compostos e atividades biológicas. Exemplos são a *Eugenia dysenterica* DC. (cagaita), fonte de vitamina C, A e folatos (CARDOSO et al., 2011), apresentando efeito citotóxico contra linhagem celular de neuroblastoma humano a partir do extrato de suas folhas (GASCA et al., 2017); *Campomanesia velutina* O. Berg, uma espécie de guavira, com atividade anti-inflamatória e antinociceptiva para o extrato de suas folhas (MICHEL et al., 2013); o extrato da folha de *Campomanesia xanthocarpa* Berg, possui atividade antioxidante e antimicrobiana (CAPELETTO et al., 2016); extratos de folhas e raízes de *Campomanesia adamantium*, outra espécie de guavira, com ação citotóxica em células leucêmicas e baixa citotoxicidade para células mononucleares do sangue (CAMPOS et al., 2017); *Hancornia speciosa* Gomes, popularmente chamada de mangaba, exibiu efeito antimutagênico (LIMA et al., 2015) e atividade antioxidante, antimicrobiana e citotóxica frente a células leucêmicas (SANTOS et al., 2016); o extrato hidroetanólico de folhas de *Jacaranda decurrens*, também

conhecida como carobinha, mostrou atividade antioxidante e citotóxica contra células leucêmicas (CASAGRANDE et al., 2014); *Myrciaria dubia* HBK McVaugh, popularmente conhecido como camu-camu, utilizando o resíduo de seu fruto, exibiu maior resistência ao estresse oxidativo, aumento da expectativa de vida, e efeito neuroprotetor em *Caenorhabditis elegans* (AZEVEDO et al., 2015).

O nematoide *Caenorhabditis elegans* foi utilizado pela primeira vez, em 1965, por Sydney Brenner, e foi descrito como um organismo experimental apropriado para estudos genéticos, no qual se podia determinar a estrutura completa do sistema nervoso. É utilizado nos mais variados âmbitos da pesquisa, e tem como vantagens o tamanho pequeno, tempo de vida curto, anatomia predeterminada e, genoma inteiramente sequenciado (BRENNER, 1974; SIN et al., 2014). Estas características permitem que este animal seja um excelente aliado na investigação farmacológica de novos compostos e extratos naturais com potencial terapêutico.

Embora os frutos tenham recebido destaque nos últimos anos, observa-se que ainda são insuficientes suas informações nutricionais, constituições físico-químicas e possíveis atividades biológicas. Por esta razão, o objetivo deste estudo foi investigar a atividade antioxidante *in vitro* e possíveis efeitos benéficos de três espécies de frutos nativos do Cerrado, *Annona crassiflora*, *Dipteryx alata* e *Psidium guineense*, no modelo experimental *in vivo* *Caenorhabditis elegans*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Bioma Cerrado

O Brasil é um país com grande extensão territorial e de rica biodiversidade, dividido em seis biomas. O bioma Cerrado, também denominado de savana brasileira, compreende cerca de 2 milhões de km² do território nacional, sendo o segundo maior bioma em área terrestre, atrás apenas da floresta Amazônica (BEUCHLE et al., 2015). Estima-se que o Brasil abrigue aproximadamente 40.000 a 50.000 espécies vegetais, representando 20 % da flora mundial existente (RIBEIRO et al., 2014), onde aproximadamente 11.000 espécies estão presentes no Cerrado, muitas delas endêmicas (DEUS, 2011; MYERS et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2012; RATTER et al., 1997).

Neste cenário, as espécies frutíferas se destacam, pois exercem um papel importante na alimentação humana como fonte de nutrientes e componentes para elaboração de outros alimentos. Embora sejam crescentes os estudos realizados sobre frutos, evidenciando uma enorme quantidade de compostos bioativos com potencial nutracêutico e terapêutico, ainda são limitadas as pesquisas com frutos nativos e exóticos e até mesmo o conhecimento destas espécies por populações de outras regiões, restringindo o cultivo e venda em poucas localidades (DEVALARAJA et al., 2011; RUFINO et al., 2010; BOEING et al., 2012).

As espécies frutíferas do Cerrado são contempladas com características sensoriais únicas, cores atrativas, sabor e aroma peculiares. São consumidas *in natura* e muito utilizadas em receitas culinárias. Os frutos do Cerrado representam um elevado potencial agroindustrial e considerável fonte de renda para a população local, também apresentam forte atrativo comercial para os consumidores, que tem se preocupado mais com a relação entre dieta e saúde (ALMEIDA et al., 2011; ALVES et al., 2008; CARDOSO et al., 2011).

Desta maneira, é necessária a ampliação de pesquisas científicas sobre a vegetação nativa do Cerrado, contribuindo para a conservação do bioma, o uso sustentável de seus recursos naturais na economia e principalmente, divulgação dos benefícios destas espécies para a sociedade (VERA et al., 2009).

2.2 Espécies nativas do Cerrado

Os países de clima tropical, como o Brasil, possuem uma variedade de plantas nativas e exóticas, das quais as espécies frutíferas, utilizadas tradicionalmente por populações locais, apresentam destaque e enorme interesse para a indústria alimentícia, mercados nacionais e internacionais. Os frutos do Cerrado, como por exemplo a atemoya, marolo, fruta de lobo,

mangaba, pequi, dentre outras, apresentam um rico valor nutricional, pois são fontes de carboidratos, sais minerais, vitaminas e água e potencial terapêutico devido a presença de compostos bioativos (CLERICI; CARVALHO-SILVA, 2011; COSTA et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2012).

São apresentadas algumas espécies vegetais nativas do Cerrado e suas respectivas atividades biológicas na tabela 1.

Tabela 1. Atividades biológicas de espécies vegetais do bioma Cerrado.

Nome científico e popular	Atividades biológicas
<i>Byrsonima verbascifolia</i> (murici)	Atividade antigenotóxica e antimutagênica <i>in vivo</i> do extrato etanólico do fruto inteiro (MALTA et al., 2012).
<i>Campomanesia adamantium</i> (guavira)	Atividade antioxidante e anti-hiperlipidêmica do extrato aquoso da raiz (<i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>) (ESPÍNDOLA et al., 2016), atividade anti-leucêmica do extrato aquoso da raiz e folhas (CAMPOS et al., 2017).
<i>Campomanesia velutina</i> (guavira)	Atividade anti-inflamatória (<i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>) e antinociceptiva (<i>in vivo</i>) do extrato etanólico das folhas (MICHEL et al., 2013);
<i>Campomanesia xanthocarpa</i> (guavirova)	Atividade antioxidante e antimicrobiana do extrato de sementes obtido de extração por CO ₂ supercrítico e n-butano comprimido (CAPELETTO et al., 2016).
<i>Caryocar brasiliense</i> (pequi)	Avaliação dos efeitos embriotóxicos e teratogênicos do óleo da polpa (TRAESEL et al., 2017); atividade antioxidante da farinha do exocarpo e mesocarpo (LEÃO et al., 2017).
<i>Caryocar coriaceum</i> (pequi)	Efeito leishmanicida de extratos das folhas (TOMIOTTO-PELLISSIER et al., 2018).
<i>Eugenia calycina</i> (cereja-do-cerrado)	Atividade antimicrobiana do óleo essencial das folhas (SOUSA et al., 2015) e dos extratos de folhas e cascas (FERREIRA et al., 2014).
<i>Eugenia dysenterica</i>	Atividade citotóxica e anticolinesterásica do extrato aquoso

(cagaita)	das folhas (GASCA et al., 2017); atividade antioxidante e antimicrobiana, inibição de enzimas α -amilase e α -glucosidade do extrato hidroetanólico da polpa (DAZA et al., 2017); prevenção da obesidade e anormalidades associadas <i>in vivo</i> (diminuição do peso corporal, hiperglicemia, hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia em jejum em camundongos) do extrato hidrometanólico da polpa (DONADO-PESTANA et al., 2015).
<i>Hancornia speciosa</i> (mangaba)	Atividade antioxidante (<i>in vitro</i>) e antimutagênica (<i>in vivo</i>) da polpa (DE LIMA et al., 2015); atividade antioxidante, antimicrobiana e citotóxica (SANTOS et al., 2016) e atividade antioxidante, antimutagênica, anti-inflamatória, anti-Alzheimer, anti-Parkinson, anti-obesidade e anti-hiperglicêmica do extrato etanólico das folhas (SANTOS et al., 2018).
<i>Jacaranda decurrens</i> (carobinha)	Atividade antioxidante e citotóxica do extrato hidroetanólico das folhas (<i>in vitro</i>) (2014) e efeitos anti-obesidade (<i>in vivo</i>) (ANTUNES et al., 2016).
<i>Mauritia flexuosa</i> (buriti)	Capacidade antioxidante da polpa (CÂNDIDO et al., 2015).

2.2.1 *Annona crassiflora* Mart.

A espécie *Annona crassiflora* (figura 1), pertence à família das *Annonaceae*, possui fruto popularmente conhecido como marolo, araticum grande, pinha-do-cerrado e cabeça de negro. Na língua guarani, araticum quer dizer “fruto mole”, pois quando maduros deixam de ter a aparência áspera e rude e desmancham facilmente. Tem ocorrência no Cerradão, Cerrado, Cerrado Denso, Cerrado Ralo, Campo Rupestre e é encontrada em muitos estados brasileiros: Pará, Tocantins, Maranhão, Bahia, Mato Grosso, Goiás, Distrito Federal, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, São Paulo, Paraná e Piauí (MEDEIROS, 2011; OLIVEIRA, 2011).

A árvore de *A. crassiflora* pode alcançar de 4 a 8 metros de altura, as flores são carnosas, apresentam pigmentação esverdeada ou branco-amarelada. Seus frutos são ovais arredondado, podendo pesar até 5 quilos. A polpa creme amarelada possui muitas sementes e é envolta por uma casca de coloração amarelo amarronzada coberta de escamas. Frutifica no período de dezembro a abril (AVIDOS; FERREIRA, 2003; VIEIRA et al., 2006). Alguns estudos já descreveram os valores nutricionais da polpa dos frutos, conforme descrito na tabela 2.

Estudos sobre a toxicidade desta espécie já foram descritos, Vilar et al. (2008) avaliaram as atividades mutagênica, antimutagênica e citotóxica do extrato etanólico das folhas de *A. crassiflora* em camundongos. Os resultados mostraram que o extrato não apresentou efeitos mutagênicos nos eritrócitos policromáticos ou efeitos de genotoxicidade, mas foi capaz de diminuir a mutagenicidade do agente alquilante mitomicina C. Na dose mais alta do extrato (100 mg/kg) foi evidenciado efeito citotóxico, o que pode contribuir no estudo de uma possível atividade antitumoral. Nesta mesma linha, a atividade mutagênica e antimutagênica da polpa de *A. crassiflora* foi avaliada por Dragano et al. (2010). Seus resultados também não demonstraram efeito mutagênico em eritrócitos policromáticos de camundongos, porém foi verificado que os animais tratados com maiores concentrações da polpa apresentaram atividade potencializada do agente alquilante ciclofosfamida, evidenciada através do aumento de eritrócitos policromáticos micronucleados. Níveis de malondialdeído e proteína carbonil não foram alterados, comprovando que a polpa não foi capaz de induzir danos oxidativos.

Neste sentido, Formagio et al., (2015) selecionaram plantas da família *Annonaceae*, dentre elas a *A. crassiflora*, e avaliaram sua atividade antiproliferativa e anticolinesterásica. O extrato metanólico das folhas e sementes demonstraram uma potente atividade antitumoral, apresentando concentrações de inibição de 50 % do crescimento das células tumorais avaliadas inferiores a 10 µg/mL. O extrato da semente de *A. crassiflora* apresentou inibição de 45 % da acetilcolinesterase, enzima que está presente no sistema nervoso central e envolvida na Doença de Alzheimer.

Roesler et al., (2007) utilizando a técnica de espectrometria de massa de ionização por eletrospray, caracterizaram quimicamente a casca, polpa e sementes de *A. crassiflora* através de extração etanólica. Os principais componentes identificados na polpa foram açúcares e íons de ácidos orgânicos. As cascas e sementes compartilharam compostos como: ácido ascórbico, ácido cafeico, ácido quínico, ácido ferúlico, xantoxilina e rutina. Ácido cafeoil tartárico, glicosídeo-cafeoil e quercetina estavam presentes apenas na semente, o que pode ter garantido maior atividade antioxidante quando comparado à casca e polpa.

Com grande potencial para o processo industrial e também como fonte de nutrientes e compostos bioativos, outro estudo avaliou a fração lipídica da semente de *A. crassiflora*. Foram identificados três fitoesteróis majoritários, o campesterol, estigmasterol e β -sitosterol, além de carotenoides como o γ -tocoferol, ácidos graxos saturados como o palmítico e o esteárico, e insaturados como o ácido oleico e linoleico (LUZIA; JORGE, 2013).

Todos os estudos realizados com esta espécie vegetal são promissores, agregam valor e incentivam novas investigações deste fruto do Cerrado e seus constituintes no envolvimento de

outras atividades biológicas, podendo ainda ser destinado à produção de nutracêuticos, aditivos alimentares, novos produtos alimentares e farmacêuticos (JUSTINO et al., 2016).

Tabela 2. Composição nutricional da polpa dos frutos de *A. crassiflora*.

Componentes	Polpa <i>in natura</i> (%) (Damiani, 2009)	Polpa fresca (g/100g) (Corrêa et al., 2011)
Umidade	70,56 ± 0,33	72,21 ± 0,42
Proteínas	1,99 ± 0,78	12,51 ± 0,60
Lipídios Totais	2,36 ± 0,2	8,44 ± 0,64
Fibras	4,46 ± 0,8	22,78
Cinzas	0,54 ± 0,65	3,38 ± 0,22
Carboidratos	24,55 ± 0,11	75,68 ± 2,61
Valor energético (kcal)	127,40 ± 0,56	-

- Não descrito



Figura 1. Folhas e fruto de *Annona crassiflora* Mart. (Fonte: arquivo pessoal).

2.2.2 *Dipteryx alata* Vogel

A espécie *Dipteryx alata*, pertence à família das *Fabaceae*, ocorre em mata de galeria, mata seca semidecídua, cerradão, Cerrado. É distribuído pelos estados de Tocantins, Maranhão, Piauí, Ceará, Bahia, Mato Grosso, Goiás, Distrito Federal, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais e São Paulo (MEDEIROS, 2011).

Esta espécie conhecida como baruzeiro pode chegar a 10 metros de altura, possuindo flores pequenas, com cores alva e esverdeada. O fruto (figura 2), chamado popularmente de baru ou cumbaru, é do tipo drupa, levemente achatado, de cor marrom e não apresenta mudança de cor com o estágio de maturação, o qual ocorre de setembro a outubro. O fruto apresenta uma única semente ou amêndoa. Tanto o fruto (figura 3) como a amêndoa são comestíveis (VIEIRA et al., 2006). A composição nutricional da polpa do fruto já foi descrita por alguns autores (tabela 3).

Na medicina popular, suas cascas maceradas são usadas como antidiarreico e no processo de cicatrização e, o óleo da semente é utilizado no tratamento de reumatismo e apresenta atividade sudorífera, tônica e reguladora da menstruação (MOREIRA; GUARIMNETO, 2009; SANO et al., 2004).

Vários estudos com as sementes já vêm sendo realizados. Marques et al. (2015) realizaram a composição química do óleo da semente de baru e identificaram os seguintes compostos: limoneno, β -elemene, γ -elemene, α -cariofileno, β -cariofileno, campesterol, estigmasterol, β -sitosterol, cicloartenol, α e γ -tocoferol. Estes compostos apresentam diversas atividades biológicas, como antioxidante, anti-inflamatória, antibiótica, antitumoral, estrogênica, dentre outras. Um outro estudo sobre o óleo da semente propôs o desenvolvimento de uma emulsão alcançando resultados satisfatórios, o que os faz sugerirem a possibilidade de uso desta emulsão como um sistema de entrega de drogas para aplicação cutânea ou criação de produtos de cuidados com a pele, como cosméticos (MORAES et al., 2017).

Almeida Siqueira et al. (2012) em seu estudo trataram ratos com uma dieta contendo as castanhas de baru moídas e comprovaram uma redução no nível de estresse oxidativo induzido por ferro. Os autores observaram uma redução significativa dos níveis de proteínas carbonil, um marcador de dano oxidativo às proteínas, no coração dos animais tratados, além de evidenciar uma proteção contra peroxidação lipídica no baço e fígado destes ratos. Estes resultados sugerem que a semente de baru, apresentando em sua constituição ácido fítico, pode agir como quelante de metais, e que possui outros compostos capazes de eliminarem radicais livres, visto que o ácido fítico por si só não foi capaz de reduzir a oxidação proteica.

No entanto, estudos utilizando a polpa ainda são escassos e sabendo que a população local já emprega este produto em sua alimentação, é extremamente importante a investigação de seus constituintes bioativos, e conseqüentemente suas atividades biológicas, podendo garantir o consumo seguro e potencializar o desenvolvimento de produtos oriundos deste fruto.

Tabela 3. Composição nutricional da polpa e casca dos frutos de *D. alata*.

Componentes (g/100g)	Polpa <i>in natura</i> (Medeiros Alves et al., 2010)	Polpa e Casca (Rocha & Santiago, 2009)
Umidade	13,76 ± 0,57	21,05 ± 0,05
Proteínas	4,17 ± 0,70	4,45 ± 0,06
Lipídios Totais	3,73 ± 0,14	3,30 ± 0,26
Fibras	19,10 ± 0,20	4,39 ± 0,16
Cinzas	4,34 ± 0,30	1,79 ± 0,01
Carboidratos	54,90	65,01 ± 0,19
Valor energético (kcal)	269,85	-

- Não descrito



Figura 2. Folhas e fruto de *Dipteryx alata* Vogel. (Fonte: arquivo pessoal).

2.2.3 *Psidium guineense* Sw.

A espécie *Psidium guineense*, pertencente à família das *Myrtaceae*, popularmente conhecido como araçazeiro, é um arbusto ou árvore pequena de até 6 metros de altura. Durante o crescimento inicial suas inflorescências são cobertas com pelos marrom-avermelhados, variando para cinza-amarelados. Seus frutos conhecidos como araçá, araçá-comum, araçá-verdadeiro, araçá-azedo e araçá-mirim são subglobosos, com polpa amarela e contendo de 22 a 100 sementes. Os araçazeiros estão distribuídos em praticamente todos os estados do Brasil (VIEIRA et al., 2006).

Do araçazeiro utiliza-se a madeira e consome-se o fruto (figura 4), o qual é empregado na fabricação de sorvetes, geleias, sucos, doces e outras receitas, além da casca, entrecasca e folhas serem utilizadas na medicina popular como anti-inflamatório (FRANZON et al., 2009). A composição nutricional é descrita na tabela 4.

Há poucos estudos sobre a espécie *P. guineense*. Um deles analisa a glicemia pós-prandial em indivíduos saudáveis que consumiram suco de araçá clarificado. Este estudo comprovou em efeito significativo de $43 \pm 28\%$ de redução na curva de glicose dos indivíduos que ingeriram o suco em relação aos indivíduos que beberam água, além do atraso na concentração sanguínea máxima de glicose, uma estratégia usada no controle de diabetes e doenças cardiovasculares (BALISTEIRO et al., 2013).

Nascimento et al. (2017) investigaram a atividade antioxidante, anti-inflamatória, antiproliferativa e antimicrobiana do óleo essencial de *P. guineense*. Foram identificados 38 compostos, sendo o spathulenol o constituinte majoritário. O óleo apresentou IC_{50} de 63,08 $\mu\text{g/mL}$ na eliminação do radical DPPH, 780,13 $\mu\text{g/mL}$ na eliminação do radical ABTS e 37,91 $\mu\text{g/mL}$ para reduzir a geração de malondialdeído, um marcador da lipoperoxidação nas células, resultados significativos quando comparados ao controle BHT, um antioxidante sintético. Na sua maior concentração administrada a camundongos, de 300 mg/kg, foi capaz de reduzir edemas induzidos por carragenina em até $59,46 \pm 3\%$. Na inibição de 50% do crescimento de células tumorais foi necessário apenas 9,84 $\mu\text{g/mL}$ do óleo para todas as linhagens tumorais testadas. Estes resultados são promissores e estimulam a realização de outras pesquisas sobre esta espécie.

Outras pesquisas comprovaram atividade antimicrobiana das folhas (FERNANDES et al., 2012; VIEIRA et al., 2012) e atividade antibacteriana da casca e polpa do araçá (NEIRA GONZÁLEZ et al., 2005). Contudo, é necessária a realização de outros estudos que investiguem outras atividades biológicas de *P. guineense*, principalmente de sua polpa, visto

que são escassas as publicações sobre esta parte do fruto, além de sugerir grande potencial para bioprospecção.

Tabela 4. Composição nutricional da polpa dos frutos de *P. guineense*.

Componentes	Polpa <i>in natura</i> (%) (Damiani et al., 2011)	Casca, polpa e sementes (g/100g) (Caldeira et al., 2004)
Umidade	80,41 ± 0,35	85,12 ± 1,41
Proteínas	1,87 ± 0,65	1,00 ± 0,21
Lipídios Totais	0,33 ± 0,11	-
Fibras	4,82 ± 0,04	4,28 ± 1,18
Cinzas	0,44 ± 0,02	-
Carboidratos	16,95 ± 0,15	-
Glicose	-	4,74 ± 0,25
Sacarose	-	0,29 ± 0,13
Amido	-	2,80 ± 0,24
Valor energético (kcal)	78,25 ± 0,08	44,50

- Não descrito



Figura 3. Folhas e fruto de *Psidium guineense* Sw. (Fonte: arquivo pessoal).

2.3 Estresse oxidativo

O oxigênio é um elemento vital para as espécies animais, porém constituindo outras formas pode causar efeitos negativos. A geração de espécies reativas contendo oxigênio é resultante de várias reações bioquímicas essenciais no organismo. Quando estas estruturas contêm um ou mais elétrons não pareados na camada de valência são denominadas radicais livres. Esta característica os torna altamente instáveis e reativos, tendo uma afinidade maior para lipídios, proteínas e DNA, construindo assim uma cadeia contínua de produção de novos radicais. Porém existem espécies não radicalares, que compartilham esse caráter reativo, e também estão inclusas no grupo de espécies reativas de oxigênio (EROs) (LICHTENBERG; PINCHUK, 2015; LOBO et al., 2010; MACHLIN; BENDICH, 1987; SIVANANDHAM, 2011; WOJTUNIK-KULESZA et al., 2016).

As EROs exercem um papel duplo de benefício *versus* prejuízo. Elas participam de vários processos fisiológicos e metabólicos como sinalização e resposta celular a agentes nocivos, influenciam processos de apoptose, autofagia e senescência, dentre outros. A eficácia destas atividades é garantida pelo equilíbrio da “homeostase redox”. Entretanto, quando há a produção em excesso dessas espécies reativas e uma redução dos mecanismos endógenos de defesa antioxidante podem ocorrer danos a componentes celulares, ocasionando o chamado estresse oxidativo (LOSADA-BARREIRO; BRAVO-DÍAZ, 2017; PISOSCHI; POP, 2015. SHARMA, 2014; SIVANANDHAM, 2011; YE et al., 2015).

O estresse oxidativo tem sido evidenciado como o agente desencadeante e/ou agravante de muitas doenças, como câncer, aterosclerose, doenças cardíacas, doenças neurodegenerativas como o Alzheimer e o processo de envelhecimento (LOBO et al.; 2010; SHARMA, 2014).

2.4 Antioxidantes

A proteção das células contra os danos causados pelas EROs é fornecida por meio do sistema de defesa antioxidante altamente eficiente, o que proporciona o equilíbrio entre compostos pró e antioxidantes. Estes sistemas são formados por componentes moleculares e enzimáticos de origem endógena, que irão diferir em teor de concentração e localização, e antioxidantes naturais exógenos, presentes em frutas e vegetais (ASLANI; GHOBADI, 2016; MENG et al., 2017; SERAFINI, 2006).

É definido como antioxidante os compostos ou substâncias que, em baixas concentrações, são capazes de inibir ou retardar expressivamente o processo de estresse oxidativo (PISOSCHI; POP, 2015, RAJENDRAN et al., 2014). São descritos vários mecanismos de ação dos antioxidantes no controle das EROs, como sistemas catalíticos de

neutralização ou desvio de espécies reativas, ligação ou inativação de íons metálicos impedindo sua produção pela reação de Fenton e Haber-Weiss, podem agir como antioxidantes “suicidas”, absorver energia, elétrons e eliminar as EROs, dentre outros (RAJENDRAN et al., 2014).

2.4.1 Antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos endógenos

A neutralização de radicais livres, EROs e outras espécies reativas como a de nitrogênio (ERNs) depende do sistema antioxidantes endógeno, o qual atua na proteção contra lesões teciduais, causadoras de muitas doenças (SEN et al., 2010). A principal linha de defesa antioxidante enzimática inclui as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR) e peroxiredoxinas (Prxs) (ASLANI; GHOBADI, 2016; FANG et al., 2002; PHAM-HUY et al., 2008; SEN et al., 2010).

A SOD é a primeira defesa do organismo contra os oxidantes, ela age cataliticamente na dismutação do radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (RAO et al., 2011; SEN et al., 2010; PHAM-HUY et al., 2008). A SOD apresenta três isoformas contendo metais em tecidos de mamíferos: SOD1 (SOD com cobre e zinco) presente no citosol, núcleo e membrana plasmática, SOD2 (SOD com manganês) encontrada principalmente nas mitocôndrias e, SOD3 (SOD com cobre e zinco extracelular), especificamente para remoção de ânion radical superóxido, oriundos da cascata inflamatória, no ambiente extracelular (PISOSCHI; POP, 2015; YE et al., 2015).

O peróxido de hidrogênio formado na reação com SOD é catalisado pelas enzimas CAT ou GPx, que o transformam em água e oxigênio (PHAM-HUY et al., 2008; RAO et al., 2011). A CAT está presente em quase todos os organismos vivos que requerem oxigênio: plantas, animais e bactérias aeróbicas. É encontrada em quase todas as células, mas em concentrações elevadas no citoplasma de eritrócitos e em peroxissomos das células do fígado. A atividade da CAT pode modificar aproximadamente 6 milhões de moléculas de H_2O_2 em água e oxigênio por minuto (LOBO et al.; 2010; PISOSCHI; POP, 2015; SERAFINI, 2006; VALKO et al., 2006).

A glutathione peroxidase está presente no citoplasma das células, pode ser dependente de selênio (GPx) ou independente (glutathione-S-transferase, GST). Ela catalisa não somente H_2O_2 , como também hidroperóxidos lipídicos ou não, decompondo-os em água ou álcool correspondente, enquanto simultaneamente oxida glutathione (GSH) em glutathione oxidada (GSSG) (PHAM-HUY et al., 2008; RAO et al., 2011; SEN et al., 2010; VALKO et al., 2006). Oposta à catalase, contém uma afinidade superior ao H_2O_2 , o que a permite removê-lo mesmo quando está presente em concentrações inferiores (RAJENDRAN et al., 2014).

Adicionalmente, glutathione redutase é uma flavoproteína que regenera GSH a partir de GSSG na presença de NADPH (PHAM-HUY et al., 2008; SEN et al., 2010). A GR não age diretamente sobre os radicais livres, porém atuam como suporte a outros antioxidantes endógenos (ASLANI; GHOBADI, 2016).

As peroxiredoxinas são enzimas que operam neutralizando baixas quantidade de peróxidos. Ao contrário de SOD e CAT, elas não dependem de cofatores para desempenhar sua função, utilizam resíduos internos de cisteína para redução de moléculas alvo no ambiente de oxidação (ASLANI; GHOBADI, 2016; YE et al., 2015).

Existem também os antioxidantes metabólicos, não enzimáticos, produzidos de maneira endógena, por exemplo os antioxidantes derivados do grupo tiol (como o ácido lipoico, tioredoxina, glutaredoxina e a glutathione), L-arginina, coenzima Q10, melatonina, bilirrubina, ácido úrico, transferrina, proteínas quelantes de metais, entre outros (ASLANI; GHOBADI, 2016; PHAM-HUY et al., 2008; RAO et al., 2011; SEN et al., 2010).

2.4.2 Antioxidantes exógenos

Estudos têm mostrado que antioxidantes sintéticos, como o hidroxianisol butilado (BHA) e o hidroxitolueno butilado (BHT), usados na indústria alimentar, podem ser desencadeadores de lesões no fígado e carcinogênese, e por isso, cada vez mais destaca-se a busca por antioxidantes naturais e novos fitoterapêuticos. Esta mudança tem sido despertada pelo crescente interesse da população em ter uma vida saudável e livre de doenças, além de numerosos estudos terem comprovado uma maior segurança com o uso de produtos naturais. As plantas são utilizadas há milhares de anos como a base de medicamentos e continuam promovendo a busca por novas fontes para a humanidade. Elas são melhores aceitas por motivos culturais e por menores efeitos colaterais (KRISHNAIAH et al., 2011; SIVANANDHAM, 2011; SEN et al., 2010).

Estima-se que uma dieta alimentar típica forneça mais de 25.000 constituintes bioativos, geralmente encontrados em vegetais e frutas, mas também em cereais de grãos, nozes e outros alimentos. Portanto, a nutrição pode exercer um papel essencial na proteção contra os danos causados pelo estresse oxidativo e diversas doenças (RAJENDRAN et al., 2014).

Estes compostos bioativos são primordiais para o crescimento normal, desenvolvimento e defesa da planta, são denominados metabólitos secundários e sua produção dependerá de como a planta irá enfrentar as situações adversas que causam estresse (KASOTE et al., 2015; SZYMAŃSKA et al., 2017). As principais classes de compostos com propriedade antioxidante são vitaminas, carotenoides e os compostos fenólicos (OROIAN; ESCRICHE, 2015).

O ácido ascórbico, também conhecido por vitamina C, apresenta carácter hidrossolúvel, considerada um dos mais importantes antioxidantes, encontrado em alimentos frescos como frutas ácidas, melancia, abacaxi, folhas verdes e tomate. É eficiente na eliminação de ânion radical superóxido, radical hidroxila, peróxido de hidrogênio, ERNs e oxigênio singlete (ASLANI; GHOBADI, 2016; OROIAN; ESCRICHE, 2015). Sua forma biologicamente ativa é o ácido L-ascórbico, em razão de sua capacidade em doar elétrons e instantânea conversão à sua forma reduzida ativa. Atua em conjunto com as enzimas antioxidantes, carotenoides e vitamina E, além de auxiliar a vitamina E na regeneração de α -tocoferol nas membranas e lipoproteínas (ASLANI; GHOBADI, 2016; VALKO et al., 2006). É fundamental para biossíntese de colágeno, carnitina e neurotransmissores, apresentando função antioxidante, antiaterogênica, anticarcinogênica e imunomoduladora (PHAM-HUY et al., 2008).

A vitamina E é lipossolúvel e apresenta oito estereoisômeros, quatro na forma de tocoferóis (α , β , γ , δ) e quatro tocotrienóis (α , β , γ , δ), sendo o α -tocoferol a forma mais bioativa no organismo. Algumas de suas fontes dietéticas são óleos vegetais, óleo de germe de trigo, grãos integrais, nozes e outras oleaginosas, orégano, cereais, abacate, ovos, carnes, entre outras (PHAM-HUY et al., 2008; BOCCARDI et al., 2016). Esta vitamina age principalmente na proteção contra a peroxidação lipídica, rompendo a reação em cadeia de oxidação de fosfolipídios de membrana e lipoproteínas plasmáticas através da remoção de radicais peroxil (AZZI, 2017; GALLI et al., 2017; LOBO et al., 2010).

Os carotenoides compõem um grupo com mais de 700 constituintes de natureza lipofílica. São pigmentos tetraterpenoides, de cores laranja, amarelo e vermelho, abundantemente encontrados em plantas, algas, fungos e bactérias. Estão separados em dois grupos centrais: as xantofilas, contendo oxigênio, como por exemplo zeaxantina, luteína, astaxantina e β -criptoxantina e, os carotenos, hidrocarbonetos puros sem oxigênio, como o α -caroteno, β -caroteno e licopeno (HUANG et al., 2017; KULCZYŃSKI et al., 2017; SUN et al., 2017). Em razão de sua estrutura de dupla ligação conjugada apresenta uma excelente capacidade de extinção do oxigênio singlete sem degradação (ASLANI; GHOBADI, 2016; VALKO et al., 2006). Atuam preventivamente no processo de carcinogênese, doenças cardiovasculares, diabetes, osteoporose, doenças oculares ligadas à idade e doença de Alzheimer (ROOHBAKHSH et al., 2017).

Os compostos fenólicos, um dos grupos mais conhecidos e estudados, está presente em todos os órgãos da planta, o que o torna um integrante possivelmente permanente na dieta humana. Já foram identificados mais de 8.000 compostos fenólicos no reino das plantas, sendo todos originados de um antecessor comum, a fenilalanina, ou um precursor próximo, o ácido

chiquímico. Estão diretamente envolvidos na defesa das plantas contra a radiação ultravioleta e ataque por patógenos. São encontrados em muitas frutas, vegetais, cereais e também nos produtos derivados destes alimentos, como o vinho tinto, café e chocolate (ASLANI; GHOBADI, 2016; OROIAN; ESCRICHE, 2015; PANDEY; RIZVI, 2009). Todos os compostos fenólicos compartilham a característica estrutural de conter um anel aromático com pelo menos um grupo hidroxila, o que os torna excelentes doadores de elétrons ou átomos de hidrogênio, capacitando-os na neutralização de EROs. Os compostos fenólicos encontrados nos alimentos vegetais podem ser divididos em ácidos fenólicos, flavonoides e não- flavonoides (LOSADA-BARREIRO; BRAVO-DÍAZ, 2017; ZHANG; TSAO, 2016).

2.5 Envelhecimento e doenças neurodegenerativas

O envelhecimento é um processo fisiológico vinculado ao tempo de vida, no qual ocorre uma série de eventos químicos e bioquímicos indesejados, levando a um declínio funcional de diversos componentes do organismo (FERNANDO et al., 2018). Diversas teorias foram propostas para explicar esse mecanismo complexo, incluindo o papel dos radicais livres e sua ação oxidante sobre macromoléculas, como o DNA, proteínas e lipídios, a relação entre senescência celular e um metabolismo energético deficiente, além do aumento no número de citocinas inflamatórias, resultando em patologias associadas à idade, como câncer, aterosclerose e doenças metabólicas. Essas modificações levam a uma diminuição da expectativa de vida (CĂTANĂ et al., 2018; DA COSTA et al., 2016; ZHANG et al., 2018).

O envelhecimento por si só está associado a uma queda da capacidade cognitiva, e com o passar da idade há um risco crescente para o aparecimento de doenças neurodegenerativas (BERSON et al., 2018). As doenças neurodegenerativas estão associadas a distúrbios do sistema nervoso, que incluem encéfalo, medula espinhal e nervos periféricos, e se originam da interação de fatores ambientais e genéticos. Esse grupo de doenças partilham de algumas características, como instabilidade da homeostase em relação ao controle da proteostase, níveis inflamatórios, metabólicos e de estresse oxidativo crônico (CUADRADO, 2016; LOSADA-BARREIRO; BRAVO-DIAZ, 2017; MAZON et al., 2017).

As espécies reativas de oxigênio desempenham muitas funções cerebrais importantes que garantem seu funcionamento normal, como a sinalização de cálcio, plasticidade sináptica, efeitos na memória e atuação como neurotransmissores desencadeando a ação de outros neurotransmissores (NEAL; RICHARDSON, 2018). Entretanto, em níveis elevados, essas espécies reativas agravam o processo de estresse oxidativo, que por sua vez encontra-se aumentado com a idade. Além disso, o sistema nervoso tem necessidade de altas taxas de

oxigênio e energia para realização de suas funções, em contrapartida possui baixa eficácia na regeneração celular, o que torna o cérebro e seus componentes mais suscetíveis aos impactos prejudiciais das EROs. Adicionalmente a diminuição da resposta do sistema antioxidante de defesa também é observada com o aumento da idade (BHAT et al., 2015; NEAL; RICHARDSON, 2018). Esta série de eventos que resultam no comprometimento neural, geram um cenário que tem a demência como principal causa de doenças como o Alzheimer e Parkinson (MAZON et al., 2107).

2.5.1 Doença de Alzheimer

A doença de Alzheimer (DA) foi descrita pela primeira vez em 1906 pelo neuropatologista Alois Alzheimer (ANAND et al., 2017). É a causa de demência mais comum durante a velhice. Calcula-se que a demência acometa cerca de 47 milhões de pessoas no mundo (KUMAR et al., 2018; SANTOS; FERREIRA, 2017). A DA é uma doença típica de idosos, oriunda da associação de fatores genéticos e ambientais, porém 5 % dos casos afetam pessoas com idade entre 40 e 50 anos, são as chamadas formas familiares, os outros 95 % representam os casos esporádicos da doença. Esta patologia está entre as cinco principais causas de morte na população dos Estados Unidos, e após seu início é fatal no período de 5 a 10 anos (ANAND et al., 2017; BISHT et al., 2018; COOPER; MA, 2017).

A DA é caracterizada por um declínio progressivo da memória e da capacidade cognitiva, além de perturbações no raciocínio, linguagem, na prática física, comportamental e emocional (BISHT et al., 2018; CHEIGNON et al., 2017; CHUNG et al., 2018; TRAMUTOLA et al., 2017).

Várias hipóteses foram descritas na tentativa de elucidação dessa proteinopatia, porém as bases moleculares envolvidas ainda não foram totalmente compreendidas. Na DA ocorrem modificações no metabolismo do cálcio e conseqüentemente excitotoxicidade, desajuste das vias de sinalização intracelular, estresse oxidativo, metabolismo energético anormal, neuroinflamação, distúrbios na síntese de neurotransmissores, formação de emaranhados neurofibrilares (intracelulares) a partir da proteína Tau e de placas senis (extracelulares) através da agregação do peptídeo β -amiloide (β A), o que gera perda sináptica e atrofia cerebral (COOPER; MA, 2017; SANTOS; FERREIRA, 2017; TRAMUTOLA et al., 2017).

O peptídeo β A é formado através da clivagem da proteína precursora da amiloide (PPA). Normalmente esta proteína é clivada por duas enzimas, a α -secretase e γ -secretase, no entanto em casos da DA, outra enzima, a β -secretase, acaba agindo antes da α -secretase, formando o peptídeo tóxico β A. O peptídeo β A tem uma predisposição a se autoassociar e acumular no

espaço extracelular, através de conformações β -folha, fibrilares, oligoméricas e por fim a formação de placas senis, encontradas principalmente na região do hipocampo (ANAND et al., 2017; CARUSO et al., 2018; TRAMUTOLA et al., 2017).

O peptídeo β A também pode induzir a uma fosforilação alterada da proteína Tau. Esta proteína tem a função de estabilizar os microtúbulos que formam os neurônios, garantindo o funcionamento do transporte neuronal. Quando a Tau se hiperfosforila, ela se desacopla e ocasiona uma dissociação dos microtúbulos. Essas proteínas se agregam e formam os emaranhados neurofibrilares dentro dos neurônios, contribuindo para sua consequente morte celular. A participação da proteína Tau também pode ser observada em outra patogênese: a doença de Parkinson (BISHT et al., 2018; CHEIGNON et al., 2017).

Estes dois agregados proteicos desregulam a proteostase, responsável por garantir a qualidade proteica. O sistema proteolítico deficiente, composto pelo sistema lisossômico autofágico e o sistema ubiquitina-proteassoma, não faz a degradação e descarte correto das proteínas anormais, agravando a evolução dos efeitos deletérios da DA (CHUNG et al., 2018).

Adicionalmente, fundamentando a hipótese colinérgica, existem evidências da diminuição nos níveis e da função do neurotransmissor acetilcolina em pacientes com DA. A acetilcolina está relacionada aos processos de aprendizagem, memória e funções cognitivas. Além da perda de neurônios colinérgicos, também ocorre disfunção dos neurônios serotoninérgicos, dopaminérgicos glutamatérgicos e adrenérgicos (ANAND et al., 2017; KUMAR et al., 2018).

2.6 Modelo experimental *in vivo* *Caenorhabditis elegans*

Nas últimas décadas o número de pesquisas utilizando o modelo *in vivo* *Caenorhabditis elegans* tem aumentado, evidenciando seu papel permanente como organismo modelo na ciência. Por obra de Sydney Brenner, que em 1963, essas conquistas foram alcançadas. O biólogo enumerou várias vantagens experimentais de seu uso na pesquisa biológica básica, mas também mostrou intenções de usá-lo em estudos de desenvolvimento e sistema nervoso. Este feito conquistou o Prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina em 2002, compartilhado com John Sulston e Robert H. Horvitz (MAGLION; VENTURA, 2016).

C. elegans é uma espécie de nematoide pertencente ao filo Nematoda e a família Rhabditidae. Foi o primeiro organismo multicelular a ter o genoma completamente sequenciado, e a incrível homologia de aproximadamente 70 % com o genoma humano. O domínio destas informações, somadas as facilidades do seu manuseio, permitiu a reprodução de diferentes alelos knockouts e cepas transgênicas, conservadas e fornecidas pelo

Caenorhabditis Genetics Center (CGC) na Universidade de Minnesota, EUA (AITLHADJ; STÜRZENBAUM, 2014; RODRIGUEZ et al., 2013).

Este nematoide de vida livre tem cerca de 1 - 1,5 mm de comprimento, pode ser encontrado em ambientes de clima temperado e se alimenta de diferentes bactérias, incluindo *Escherichia coli*. A maior parte da população apresenta a forma hermafrodita, porém, embora raros, aproximadamente 0,02 % dos indivíduos são machos. Um nematoide hermafrodita adulto apresenta 959 células somáticas e 302 neurônios (SIN et al., 2014).

A diversidade de aplicações na área científica tem sido atribuída às formidáveis características deste animal: tamanho pequeno, transparência corporal, manutenção e cultivo simples, ciclo de vida curta, aproximadamente 72 horas (Fig.5), autofertilização e grande número de progênie, aproximadamente 300 descendentes por nematoide. Além de facilmente ser aliado a tecnologia de RNA de interferência (RNAi), uma técnica de silenciamento gênico, na busca e identificação de novas drogas terapêuticas (LAPIERRE; HANSEN, 2012; MAGLIONI et al., 2016).

Múltiplas vias metabólicas e comportamentos complexos são conservadas entre *C. elegans* e os mamíferos, compreendendo síntese de lipídios, açúcares e aminoácidos, genes catabólicos, reguladores de lipogênese, complexos de quinases, apoptose, entre outros. Sendo mais passível de destaque a via de sinalização do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF), que inclui o fator de transcrição DAF-16, um mediador chave no tempo de vida em resposta aos estímulos ambientais e gonadais, como estresse oxidativo e térmico, restrição calórica e também tem relação com doenças como o câncer, diabetes mellitus e Alzheimer (HESP et al., 2015; LEMIEUX; ASHRAFI, 2016; RODRIGUEZ et al., 2013).

A cepa transgênica CL2006, utilizada neste estudo, mimetiza um modelo experimental da Doença de Alzheimer. Foi o primeiro modelo de *C. elegans* estabelecido para esta doença, em 1995. Estes animais apresentam um fenótipo de paralisia de início adulto, com formação constitutiva de β A nos músculos. Seus agregados proteicos podem ser corados com Tioflavina S e Vermelho do Congo, uma vantagem na hora de avaliação dos resultados. Contudo, seu fenótipo de paralisia vinculado a idade torna-se um limitante, pois torna-se difícil saber se a proteção mediada pelos compostos é em razão da modulação da toxicidade causada pelo peptídeo β A ou do envelhecimento, ou ambos. A taxa de paralisia da cepa CL2006 também pode ser variável de experimento para experimento e alguns nematoides podem não ficar paralisados (LUBLIN; LINK, 2013; MA et al., 2017).

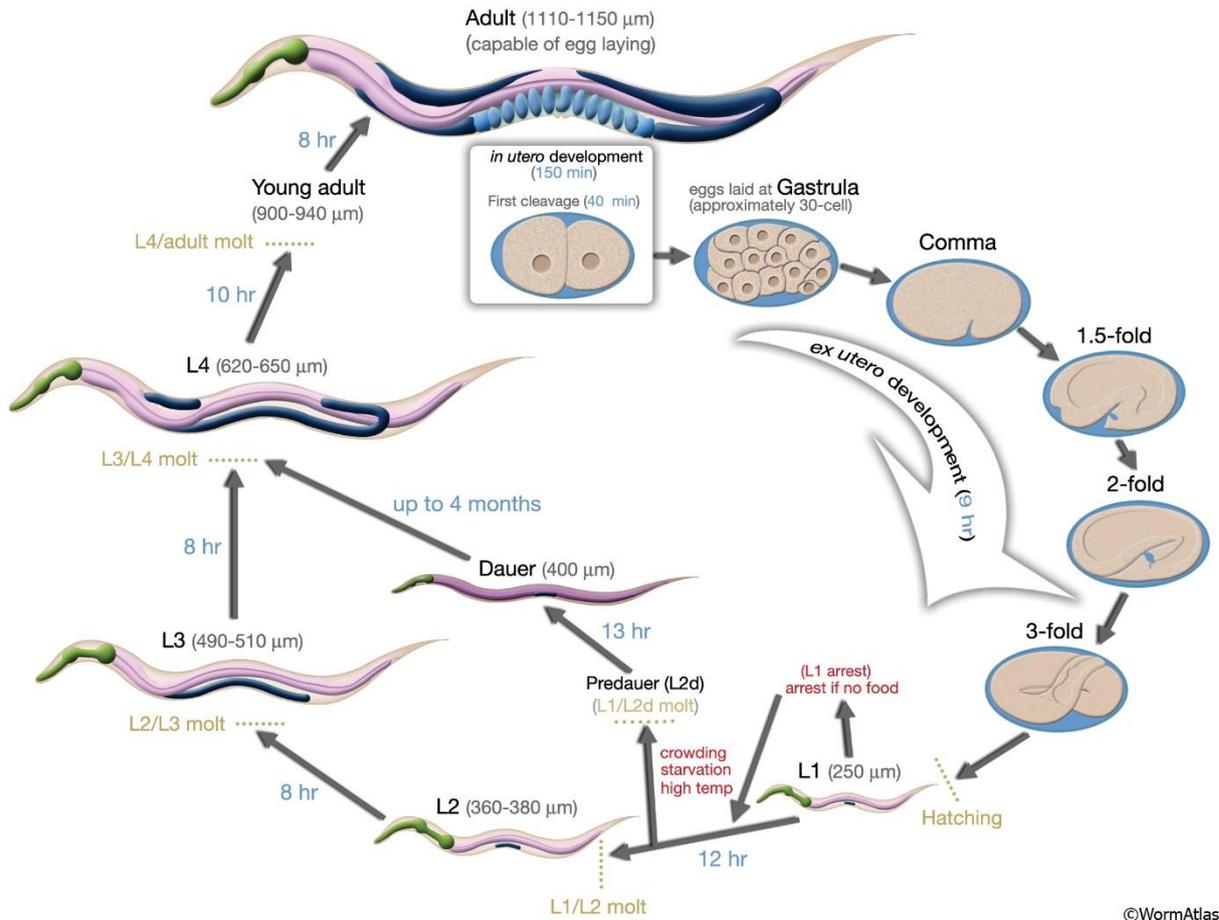


Figura 4. Ciclo de vida do *C. elegans*. Os números em azul na direção das setas mostram o período de tempo que o nematoide passa em cada fase. O comprimento do animal em cada estágio é indicado ao lado de cada fase em micrômetros (μm).

Fonte: Altun, Z.F. and Hall, D.H. (2009, WormAtlas).

3 OBJETIVOS

GERAL

Avaliar a composição química, atividade antioxidante e toxicidade dos frutos de *Annona crassiflora* Mart. (marolo), *Dipteryx alata* Vogel (baru) e *Psidium guineense* Sw. (araçá-do-cerrado) e investigar seus efeitos sobre o estresse oxidativo, longevidade e evolução do acúmulo de peptídeo β -amiloide no modelo experimental *in vivo* *Caenorhabditis elegans*.

ESPECÍFICOS

Avaliar a concentração de compostos fenólicos e flavonoides, pigmentos antioxidantes lipofílicos e ácido ascórbico.

Determinar a atividade antioxidante (*in vitro*) pelos métodos de captura dos radicais livres 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazil (DPPH) e 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS).

Avaliar a toxicidade dos frutos em *C. elegans*.

Investigar os efeitos dos frutos em *C. elegans* submetidos ao estresse térmico e oxidativo e, sobre expectativa de vida;

Avaliar os efeitos dos frutos sobre a paralisia induzida pelo acúmulo do peptídeo β -amiloide em mutantes de *C. elegans* (modelo *in vivo* para doença de Alzheimer).

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, J., ESTEVINHO, B. N., & SANTOS, L. Microencapsulation of natural antioxidants for food application—The specific case of coffee antioxidants—A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 58, p. 21-39, 2016.

AITLHADJ, L., & STÜRZENBAUM, S. R. *Caenorhabditis elegans* in regenerative medicine: a simple model for a complex discipline. **Drug discovery today**, v. 19, n. 6, p. 730-734, 2014.

ALMEIDA, M. M. B., DE SOUSA, P. H. M., ARRIAGA, Â. M. C., DO PRADO, G. M., DE CARVALHO MAGALHÃES, C. E., MAIA, G. A., & DE LEMOS, T. L. G. Bioactive compounds and antioxidant activity of fresh exotic fruits from northeastern Brazil. **Food Research International**, v. 44, n. 7, p. 2155-2159, 2011.

ALMEIDA SIQUEIRA, E. M., MARIN, A. M. F., DA CUNHA, M. D. S. B., FUSTINONI, A. M., DE SANT'ANA, L. P.; ARRUDA, S. F. Consumption of baru seeds [*Dipteryx alata* Vog.], a Brazilian savanna nut, prevents iron-induced oxidative stress in rats. **Food research international**, v. 45, n. 1, p. 427-433, 2012.

ALTUN, Z.F.; HALL, D.H. Introduction. In **WormAtlas**. 2009.

ALVES, R. E., DE BRITO, E. S., RUFINO, M. S. M., & SAMPAIO, C. G. Antioxidant activity measurement in tropical fruits: A case study with acerola. **Acta Horticulturae**, 2008.

ANAND, A., PATIENCE, A. A., SHARMA, N., & KHURANA, N. The present and future of pharmacotherapy of Alzheimer's disease: A comprehensive review. **European journal of pharmacology**, 2017.

ANTUNES, K. A., BALDIVIA, D. D. S., DA ROCHA, P. D. S., CASAGRANDE, J. C., ARGANDOÑA, E. J. S., VIEIRA, M. D. C., CARDOSO, C. A. L., DOS SANTOS, E. L. & DE PICOLI SOUZA, K. Antiobesity effects of hydroethanolic extract of *Jacaranda decurrens* Leaves. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2016, 2016.

ASLANI, B. A., & GHOBADI, S. Studies on oxidants and antioxidants with a brief glance at their relevance to the immune system. **Life sciences**, v. 146, p. 163-173, 2016.

AVIDOS, M. F. D., & FERREIRA, L. T. Frutos dos cerrados: preservação gera muitos frutos. 2003.

AZEVÊDO, J. C., BORGES, K. C., GENOVESE, M. I., CORREIA, R. T., & VATTEM, D. A. Neuroprotective effects of dried camu-camu (*Myrciaria dubia* HBK McVaugh) residue in *C. elegans*. **Food Research International**, v. 73, p. 135-141, 2015.

AZZI, A. Many tocopherols, one vitamin E. **Molecular Aspects of Medicine**, 2017.

BALISTEIRO, D. M., ALEZANDRO, M. R., & GENOVESE, M. I. Characterization and effect of clarified araçá (*Psidium guineenses* Sw.) juice on postprandial glycemia in healthy subjects. **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 33, p. 66-74, 2013.

BHAT, A. H., DAR, K. B., ANEES, S., ZARGAR, M. A., MASOOD, A., SOFI, M. A., & GANIE, S. A. Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and neurodegenerative diseases; a mechanistic insight. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 74, p. 101-110, 2015.

BERSON, A., NATIVIO, R., BERGER, S. L., & BONINI, N. M. Epigenetic Regulation in Neurodegenerative Diseases. **Trends in neurosciences**, 2018.

BEUCHLE, R., GRECCHI, R. C., SHIMABUKURO, Y. E., SELIGER, R., EVA, H. D., SANO, E., & ACHARD, F. Land cover changes in the Brazilian Cerrado and Caatinga biomes from 1990 to 2010 based on a systematic remote sensing sampling approach. **Applied Geography**, v. 58, p. 116-127, 2015.

BISHT, K., SHARMA, K., & TREMBLAY, M. È. Chronic stress as a risk factor for Alzheimer's disease: Roles of microglia-mediated synaptic remodeling, inflammation, and oxidative stress. **Neurobiology of Stress**, 2018.

BOCCARDI, V., BARONI, M., MANGIALASCHE, F., & MECOCCI, P. Vitamin E family: role in the pathogenesis and treatment of Alzheimer's disease. **Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions**, v. 2, n. 3, p. 182-191, 2016.

BOEING, H., BECHTHOLD, A., BUB, A., ELLINGER, S., HALLER, D., KROKE, A., LESCHIK-BONNET, E., MÜLLER, M. J., OBERRITTER, H., SCHULZE, M., STEHLE, P., & WATZL, B. Critical review: vegetables and fruit in the prevention of chronic diseases. **European journal of nutrition**, v. 51, n. 6, p. 637-663, 2012.

BRENNER, S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. **Genetics**, v. 77, n. 1, p. 71-94, 1974.

CASAGRANDE, J. C., MACORINI, L. F. B., ANTUNES, K. A., DOS SANTOS, U. P., CAMPOS, J. F., DIAS-JÚNIOR, N. M., SANGALLI, A., CARDOSO, C. A. L., VIEIRA, M. C., RABELO, L. A., PAREDES-GAMERO, E. J., DE PICOLI, K. S. & DOS SANTOS, E. L. Antioxidant and cytotoxic activity of hydroethanolic extract from *Jacaranda decurrens* leaves. **PLoS one**, v. 9, n. 11, p. e112748, 2014.

CALDEIRA, S. D., HIANE, P. A., RAMOS, M. I. L., & RAMOS FILHO, M. M. Caracterização físico-química do araçá (*Psidium guineense* Sw.) e do tarumã (*Vitex cymosa* Bert.) do estado de Mato Grosso do Sul. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 22, n. 1, 2004.

CAMPOS, J. F., ESPINDOLA, P. P. T., TORQUATO, H. F. V., VITAL, W. D., JUSTO, G. Z., SILVA, D. B., CAROLLO, C. A., DE PICOLI, K. S., PAREDES-GAMERO, E. J. & DOS SANTOS, E. L. Leaf and Root Extracts from *Campomanesia adamantium* (Myrtaceae) Promote Apoptotic Death of Leukemic Cells via Activation of Intracellular Calcium and Caspase-3. **Frontiers in pharmacology**, v. 8, p. 466, 2017.

CÂNDIDO, T. L. N., SILVA, M. R., & AGOSTINI-COSTA, T. S. Bioactive compounds and antioxidant capacity of buriti (*Mauritia flexuosa* Lf) from the Cerrado and Amazon biomes. **Food chemistry**, v. 177, p. 313-319, 2015.

CAPELETTO, C., CONTERATO, G., SCAPINELLO, J., RODRIGUES, F. S., COPINI, M. S., KUHN, F., TRES, M. V., MAGRO, J. D. & OLIVEIRA, J. V. Chemical composition,

antioxidant and antimicrobial activity of guavirova (*Campomanesia xanthocarpa* Berg) seed extracts obtained by supercritical CO₂ and compressed n-butane. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 110, p. 32-38, 2016.

CARDOSO, L. M., MARTINO, H. S. D., MOREIRA, A. V. B., RIBEIRO, S. M. R., & PINHEIRO-SANT'ANA, H. M. Cagaita (*Eugenia dysenterica* DC.) of the Cerrado of Minas Gerais, Brazil: Physical and chemical characterization, carotenoids and vitamins. **Food Research International**, v. 44, n. 7, p. 2151-2154, 2011.

CARUSO, A., NICOLETTI, F., MANGO, D., SAIDI, A., ORLANDO, R., & SCACCIANOCE, S. Stress as risk factor for Alzheimer's disease. **Pharmacological research**, 2018.

CĂȚANĂ, C. S., MEHTEROV, N., ATANASOV, A. G., & BERINDAN-NEAGOE, I. Natural products with anti-aging potential: Affected targets and molecular mechanisms. **Biotechnology advances**, 2018.

CHEIGNON, C., TOMAS, M., BONNEFONT-ROUSSELOT, D., FALLER, P., HUREAU, C., & COLLIN, F. Oxidative stress and the amyloid beta peptide in Alzheimer's disease. **Redox biology**, 2017.

CHEN, Z. & ZHONG, C. Oxidative stress in Alzheimer's disease. **Neuroscience bulletin**, v. 30, n. 2, p. 271-281, 2014.

CHUNG, K. M., HERNÁNDEZ, N., SPROUL, A. A., & YU, W. H. Alzheimer's disease and the autophagic-lysosomal system. **Neuroscience letters**, 2018.

CLERICI, M. T. P. S., & CARVALHO-SILVA, L. B. Nutritional bioactive compounds and technological aspects of minor fruits grown in Brazil. **Food Research International**, v. 44, n. 7, p. 1658-1670, 2011.

COOPER, E. L., & MA, M. J. Alzheimer Disease: Clues from traditional and complementary medicine. **Journal of traditional and complementary medicine**, 2017.

CORADIN, L., SIMINSKI, A., & REIS, A. Espécies Nativas da Flora Brasileira de Valor Econômico Atual ou Potencial. **Brasília: Ministério do Meio Ambiente**, 2011.

CORRÊA, S. C., CLERICI, M. T. P. S., GARCIA, J. S., FERREIRA, E. B., EBERLIN, M. N., & AZEVEDO, L. Evaluation of dehydrated marolo (*Annona crassiflora*) flour and carpels by freeze-drying and convective hot-air drying. **Food research international**, v. 44, n. 7, p. 2385-2390, 2011.

COSTA, A. G. V., GARCIA-DIAZ, D. F., JIMENEZ, P., & SILVA, P. I. Bioactive compounds and health benefits of exotic tropical red-black berries. **Journal of functional foods**, v. 5, n. 2, p. 539-549, 2013.

CUADRADO, A. NRF2 in neurodegenerative diseases. **Current Opinion in Toxicology**, v. 1, p. 46-53, 2016.

DA COSTA, J. P., VITORINO, R., SILVA, G. M., VOGEL, C., DUARTE, A. C., & ROCHA-SANTOS, T. A synopsis on aging—theories, mechanisms and future prospects. **Ageing research reviews**, v. 29, p. 90-112, 2016.

DAMIANI, C. Caracterização e agregação de valor aos frutos do cerrado: Araçá (*Psidium guineensis* Sw.) e Marolo (*Annona Crassiflora* Mart.). Tese. 2009.

DAMIANI, C., BOAS, E. V. B. V., ASQUIERI, E. R., LAGE, M. E., OLIVEIRA, R. A., SILVA, F. A., PINTO, D. M., RODRIGUES, L. J., SILVA, E. P. & PAULA, N. R. F. Characterization of fruits from the savanna: Araçá (*Psidium guineensis* Sw.) and Marolo (*Annona crassiflora* Mart.). **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 31, n. 3, p. 723-729, 2011.

DAZA, L. D., FUJITA, A., GRANATO, D., FÁVARO-TRINDADE, C. S., & GENOVESE, M. I. Functional properties of encapsulated Cagaita (*Eugenia dysenterica* DC.) fruit extract. **Food Bioscience**, v. 18, p. 15-21, 2017.

DE LIMA, J. P., AZEVEDO, L., DE SOUZA, N. J., NUNES, E. E., & BOAS, E. V. D. B. V. First evaluation of the antimutagenic effect of mangaba fruit in vivo and its phenolic profile identification. **Food Research International**, v. 75, p. 216-224, 2015.

DEMBITSKY, V. M., POOVARODOM, S., LEONTOWICZ, H., LEONTOWICZ, M., VEARASILP, S., TRAKHTENBERG, S., & GORINSTEIN, S. The multiple nutrition properties of some exotic fruits: Biological activity and active metabolites. **Food Research International**, v. 44, n. 7, p. 1671-1701, 2011.

DEUS, M.J. **Guia de campo: vegetação do Cerrado 500**. Brasília: MMA/SBF, 532p., 2011.

DEVALARAJA, S., JAIN, S., & YADAV, H. (2011). Exotic fruits as therapeutic complements for diabetes, obesity and metabolic syndrome. **Food Research International**, v. 44, n. 7, p. 1856-1865, 2011.

DONADO-PESTANA, C. M., BELCHIOR, T., & GENOVESE, M. I. Phenolic compounds from cagaita (*Eugenia dysenterica* DC.) fruit prevent body weight and fat mass gain induced by a high-fat, high-sucrose diet. **Food research international**, v. 77, p. 177-185, 2015.

DRAGANO, N. R. V., DE VENANCIO, V. P., DE ARAÚJO PAULA, F. B., DELLA LUCIA, F., DE OLIVEIRA FONSECA, M. J., & AZEVEDO, L. (2010). Influence of marolo (*Annona crassiflora* Mart.) pulp intake on the modulation of mutagenic/antimutagenic processes and its action on oxidative stress in vivo. **Plant foods for human nutrition**, v. 65, n. 4, p. 319-325, 2010.

DUTRA, R. C., CAMPOS, M. M., SANTOS, A. R., & CALIXTO, J. B. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological research**, v. 112, p. 4-29, 2016.

ESPINDOLA, P. P. D. T., ROCHA, P. D. S. D., CAROLLO, C. A., SCHMITZ, W. O., PEREIRA, Z. V., VIEIRA, M. D. C., DOS SANTOS, E. L. & DE PICOLI SOUZA, K. Antioxidant and antihyperlipidemic effects of *Campomanesia adamantium* O. Berg root. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2016, 2016.

FANG, Y. Z., YANG, S., & WU, G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. **Nutrition**, v. 18, n. 10, p. 872-879, 2002.

FARMACOPEIA POPULAR DO CERRADO. Farmacopeia Popular do Cerrado. Goiás/GO: **Articulação Pacari**, 347 p, 2009.

FERREIRA, F. P., MORAIS, S. R., BARA, M. T., CONCEIÇÃO, E. C., PAULA, J. R., CARVALHO, T. C., Vaz, B. G., COSTA, H. B., ROMÃO, W. R., & REZENDE, M. H. *Eugenia calycina* Cambess extracts and their fractions: Their antimicrobial activity and the identification of major polar compounds using electrospray ionization FT-ICR mass spectrometry. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 99, p. 89-96, 2014.

FERNANDES, T. G., DE MESQUITA, A. R. C., RANDAU, K. P., FRANCHITTI, A. A., & XIMENES, E. A. In vitro synergistic effect of *Psidium guineense* (Swartz) in combination with antimicrobial agents against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. **The Scientific World Journal**, v. 2012, 2012.

FORMAGIO, A. S. N., VIEIRA, M. C., VOLOBUFF, C. R. F., SILVA, M. S., MATOS, A. I., CARDOSO, C. A. L., FOGGIO, M. A. & CARVALHO, J. E. In vitro biological screening of the anticholinesterase and antiproliferative activities of medicinal plants belonging to Annonaceae. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 48, n. 4, p. 308-315, 2015.

FRANZON, R. C., CAMPOS, L. D. O., PROENÇA, C. E. B., & SOUSA-SILVA, J. C. Araças do Gênero *Psidium*: principais espécies, ocorrência, descrição e usos. **Embrapa Cerrados**, 2009.

GALLI, F., AZZI, A., BIRNINGER, M., COOK-MILLS, J. M., EGGERSDORFER, M., FRANK, J., CRUCIANI, G., LORKOWSKI, S. & ÖZER, N. K. Vitamin E: Emerging aspects and new directions. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 102, p. 16-36, 2017.

GASCA, C. A., CASTILLO, W. O., TAKAHASHI, C. S., FAGG, C. W., MAGALHÃES, P. O., FONSECA-BAZZO, Y. M., & SILVEIRA, D. Assessment of anti-cholinesterase activity and cytotoxicity of cagaita (*Eugenia dysenterica*) leaves. **Food and Chemical Toxicology**, 2017.

HESP, K., SMANT, G., & KAMMENGA, J. E. *Caenorhabditis elegans* DAF-16/FOXO transcription factor and its mammalian homologs associate with age-related disease. **Experimental gerontology**, v. 72, p. 1-7, 2015.

HUANG, J. J., LIN, S., XU, W., & CHEUNG, P. C. K. Occurrence and biosynthesis of carotenoids in phytoplankton. **Biotechnology Advances**, 2017.

IGHODARO, O. M., & AKINLOYE, O. A. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. **Alexandria Journal of Medicine**, 2017.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Disponível em: <<https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-noticias/2012-agencia-de-noticias/noticias/20980-numero-de-idosos-cresce-18-em-5-anos-e-ultrapassa-30-milhoes-em-2017.html>>, <<https://>

agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-sala-de-imprensa/2013-agencia-de-noticias/releases/21837-projecao-da-populacao-2018-numero-de-habitantes-do-pais-deve-parar-de-crescer-em-2047.html> . Acesso em: 29 jul. 2018.

JUSTINO, A. B., PEREIRA, M. N., VILELA, D. D., PEIXOTO, L. G., MARTINS, M. M., TEIXEIRA, R. R., MIRANDA, N. C., SILVA, N. M., SOUSA, R. M. F. & ESPINDOLA, F. S. Peel of araticum fruit (*Annona crassiflora* Mart.) as a source of antioxidant compounds with α -amylase, α -glucosidase and glycation inhibitory activities. **Bioorganic chemistry**, v. 69, p. 167-182, 2016.

KASOTE, D. M., KATYARE, S. S., HEGDE, M. V., & BAE, H. Significance of antioxidant potential of plants and its relevance to therapeutic applications. **International journal of biological sciences**, v. 11, n. 8, p. 982, 2015.

KRISHNAIAH, D., SARBATLY, R., & NITHYANANDAM, R. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. **Food and bioproducts processing**, v. 89, n. 3, p. 217-233, 2011.

KULCZYŃSKI, B., GRAMZA-MICHAŁOWSKA, A., KOBUS-CISOWSKA, J., & KMIĘCIK, D. The role of carotenoids in the prevention and treatment of cardiovascular disease—Current state of knowledge. **Journal of Functional Foods**, v. 38, p. 45-65, 2017.

KUMAR, K., KUMAR, A., KEEGAN, R. M., & DESHMUKH, R. Recent advances in the neurobiology and neuropharmacology of Alzheimer's disease. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 98, p. 297-307, 2018.

LAPIERRE, L. R., & HANSEN, M. Lessons from *C. elegans*: signaling pathways for longevity. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 23, n. 12, p. 637-644, 2012.

LEÃO, D. P., FRANCA, A. S., OLIVEIRA, L. S., BASTOS, R., & COIMBRA, M. A. Physicochemical characterization, antioxidant capacity, total phenolic and proanthocyanidin content of flours prepared from pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) fruit by-products. **Food chemistry**, v. 225, p. 146-153, 2017.

LEMIEUX, G. A., & ASHRAFI, K. Investigating connections between metabolism, longevity, and behavior in *Caenorhabditis elegans*. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 27, n. 8, p. 586-596, 2016.

LICHTENBERG, D. & PINCHUK, I. Oxidative stress, the term and the concept. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 461, n. 3, p. 441-444, 2015.

LIMA, J. P., AZEVEDO, L., DE SOUZA, N. J., NUNES, E. E., & BOAS, E. V. D. B. V. First evaluation of the antimutagenic effect of mangaba fruit in vivo and its phenolic profile identification. **Food Research International**, v. 75, p. 216-224, 2015.

LOBO, V., PATIL, A., PHATAK, A., & CHANDRA, N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. **Pharmacognosy reviews**, v. 4, n. 8, p. 118, 2010.

LOSADA-BARREIRO, S., & BRAVO-DÍAZ, C. Free radicals and polyphenols: The redox chemistry of neurodegenerative diseases. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 2017.

LUBLIN, A. L., & LINK, C. D. Alzheimer's disease drug discovery: in vivo screening using *Caenorhabditis elegans* as a model for β -amyloid peptide-induced toxicity. **Discovery Today: Technologies**, v. 10, n. 1, p. e115-e119, 2013.

LUZIA, D. M., & JORGE, N. Bioactive substance contents and antioxidant capacity of the lipid fraction of *Annona crassiflora* Mart. seeds. **Industrial crops and products**, v. 42, p. 231-235, 2013.

MA, L., ZHAO, Y., CHEN, Y., CHENG, B., PENG, A., & HUANG, K. *Caenorhabditis elegans* as a model system for target identification and drug screening against neurodegenerative diseases. **European journal of pharmacology**, 2017.

MACHLIN, L. J., & BENDICH, A. Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. **The FASEB Journal**, v. 1, n. 6, p. 441-445, 1987.

MAGLIONI, S., ARSALAN, N., & VENTURA, N. *C. elegans* screening strategies to identify pro-longevity interventions. **Mechanisms of ageing and development**, v. 157, p. 60-69, 2016.

MAGLIONI, S., & VENTURA, N. *C. elegans* as a model organism for human mitochondrial associated disorders. **Mitochondrion**, v. 30, p. 117-125, 2016.

MALTA, L. G., GHIRALDINI, F. G., REIS, R., DO VALE OLIVEIRA, M., SILVA, L. B., & PASTORE, G. M. *In vivo* analysis of antigenotoxic and antimutagenic properties of two Brazilian Cerrado fruits and the identification of phenolic phytochemicals. **Food research international**, v. 49, n. 1, p. 604-611, 2012.

MARQUES, F. G., DE OLIVEIRA NETO, J. R., DA CUNHA, L. C., DE PAULA, J. R., & BARA, M. T. F. Identification of terpenes and phytosterols in *Dipteryx alata* (baru) oil seeds obtained through pressing. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, n. 5, p. 522-525, 2015.

MAZON, J. N., DE MELLO, A. H., FERREIRA, G. K., & REZIN, G. T. The impact of obesity on neurodegenerative diseases. **Life sciences**, v. 182, p. 22-28, 2017.

MEDEIROS ALVES, A., MENDONÇA, A. L. D., CALIARI, M., & ANDRADE CARDOSO-SANTIAGO, R. D. Avaliação química e física de componentes do baru (*Dipteryx alata* Vog.) para estudo da vida de prateleira. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 40, n. 3, 2010.

MEDEIROS, J. D. D. Guia de campo. Vegetação do Cerrado: 500 espécies. 2011.

MENG, D., ZHANG, P., ZHANG, L., WANG, H., HO, C. T., LI, S., SHAHIDI, F. & ZHAO, H. Detection of cellular redox reactions and antioxidant activity assays. **Journal of Functional Foods**, v. 37, p. 467-479, 2017.

MICHEL, M. C., GUIMARÃES, A. G., PAULA, C. A., REZENDE, S. A., SOBRAL, M. E., & GUIMARÃES, D. A. S. Extracts from the leaves of *Campomanesia velutina* inhibits production of LPS/INF- γ induced inflammatory mediators in J774A. 1 cells and exerts anti-inflammatory and antinociceptive effects in vivo. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, n. 6, p. 927-936, 2013.

MORAES, C., ANJOS, J., MARUNO, M., ALONSO, A., & ROCHA-FILHO, P. Development of lamellar gel phase emulsion containing baru oil (*Dipteryx alata* vog.) as a prospective delivery system for cutaneous application. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, 2017.

MOREIRA, D. L., & GUARIM-NETO, G. Usos múltiplos de plantas do cerrado: um estudo etnobotânico na comunidade Sítio Pindura, Rosário Oeste, Mato Grosso, Brasil. **Polibotânica**, n. 27, p. 159-190, 2009.

MYERS, N., MITTERMEIER, R. A., MITTERMEIER, C. G., DA FONSECA, G. A., & KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, n. 6772, p. 853, 2000.

NASCIMENTO, K. F., MOREIRA, F. M. F., SANTOS, J. A., KASSUYA, C. A. L., CRODA, J. H. R., CARDOSO, C. A. L., VIEIRA, M. C., RUIZ, A. L. T. G., FOGLIO, M. A., CARVALHO, J. E. & FORMAGIO, A. S. N. Antioxidant, anti-inflammatory, antiproliferative and antimycobacterial activities of the essential oil of *Psidium guineense* Sw. and spathulenol. **Journal of Ethnopharmacology**, 2017.

NEAL, M., & RICHARDSON, J. R. Time to get Personal: A Framework for Personalized Targeting of Oxidative Stress in Neurotoxicity and Neurodegenerative Disease. **Current Opinion in Toxicology**, 2018.

NEIRA GONZÁLEZ, A. M., RAMÍREZ GONZÁLEZ, M. B., & SÁNCHEZ PINTO, N. L. Estudio fitoquímico y actividad antibacterial de *Psidium guineense* Sw (choba) frente a *Streptococcus mutans*, agente causal de caries dentales. **Revista cubana de plantas medicinales**, v. 10, n. 3-4, p. 0-0, 2005.

NELSON, A. R., SWEENEY, M. D., SAGARE, A. P., & ZLOKOVIC, B. V. Neurovascular dysfunction and neurodegeneration in dementia and Alzheimer's disease. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, v. 1862, n. 5, p. 887-900, 2016.

NERI-NUMA, I. A., SANCHO, R. A. S., PEREIRA, A. P. A., & PASTORE, G. M. Small Brazilian wild fruits: Nutrients, bioactive compounds, health-promotion properties and commercial interest. **Food Research International**, 2017.

OLIVEIRA, D. L. Viabilidade econômica de algumas espécies medicinais nativas do cerrado. **Estudos**, v. 38, n. 2, p. 301-332, 2011.

OLIVEIRA, V. B., YAMADA, L. T., FAGG, C. W., & BRANDÃO, M. G. L. Native foods from Brazilian biodiversity as a source of bioactive compounds. **Food Research International**, v. 48, n. 1, p. 170-179, 2012.

OMAR, S. H., SCOTT, C. J., HAMLIN, A. S., & OBIED, H. K. The protective role of plant biophenols in mechanisms of Alzheimer's disease. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, 2017.

OROIAN, M., & ESCRICHE, I. Antioxidants: characterization, natural sources, extraction and analysis. **Food Research International**, v. 74, p. 10-36, 2015.

PANDEY, K. B., & RIZVI, S. I. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2, n. 5, p. 270-278, 2009.

PHAM-HUY, L. A., HE, H., & PHAM-HUY, C. Free radicals, antioxidants in disease and health. **International journal of biomedical science: IJBS**, v. 4, n. 2, p. 89, 2008.

PISOSCHI, A. M., & POP, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. **European journal of medicinal chemistry**, v. 97, p. 55-74, 2015.

PRINCE, M., COMAS-HERRERA, A., KNAPP, M., GUERCHET, M., & KARAGIANNIDOU, M. World Alzheimer report 2016: improving healthcare for people living with dementia: coverage, quality and costs now and in the future. **Alzheimer's Disease International**, 2016. Disponível em: < <https://www.alz.co.uk/research/world-report>>. Acesso em: 06 dez. 2017.

PROGRAMA NACIONAL DE PLANTAS MEDICINAIS E FITOTERÁPICOS / Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. – Brasília: **Ministério da Saúde**, 2009. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/programa_nacional_plantas_medicinais_fitoterapicos.pdf>. Acesso em: 08 nov. 2017.

QUERFURTH, H. W. & LAFERLA, F. M. Alzheimer's Disease REPLY. **New England Journal of Medicine**, v. 362, n. 19, p. 1844-1845, 2010.

RAJENDRAN, P., NANDAKUMAR, N., RENGARAJAN, T., PALANISWAMI, R., GNANADHAS, E. N., LAKSHMINARASIAH, U., GOPAS, J. & NISHIGAKI, I. Antioxidants and human diseases. **Clinica chimica acta**, v. 436, p. 332-347, 2014.

RAO, P. S., KALVA, S., YERRAMILI, A., & MAMIDI, S. Free radicals and tissue damage: role of antioxidants. **Free radicals and antioxidants**, v. 1, n. 4, p. 2-7, 2011.

RATTER, J. A., RIBEIRO, J. F., & BRIDGEWATER, S. The Brazilian cerrado vegetation and threats to its biodiversity. **Annals of botany**, v. 80, n. 3, p. 223-230, 1997.

RIBEIRO, D. A., DE OLIVEIRA, L. G. S., DE MACÊDO, D. G., DE MENEZES, I. R. A., DA COSTA, J. G. M., DA SILVA, M. A. P., LACERDA, S. R. & DE ALMEIDA SOUZA, M. M. Promising medicinal plants for bioprospection in a Cerrado area of Chapada do Araripe, Northeastern Brazil. **Journal of ethnopharmacology**, v. 155, n. 3, p. 1522-1533, 2014.

RIBEIRO, J. F., & WALTER, B. M. T. As principais fitofisionomias do bioma cerrado in: Sano, SM; Almeida, SP; Ribeiro, JF Cerrado: Ecologia e flora. **Brasília: Embrapa Informação Tecnológica**, 2008.

ROCHA, L. S., & SANTIAGO, R. D. A. C. Implicações nutricionais e sensoriais da polpa e casca de baru (*Dipteryx alata* vog.) na elaboração de pães. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 4, p. 820-5, 2009.

RODRIGUEZ, M., SNOEK, L. B., DE BONO, M., & KAMMENGA, J. E. Worms under stress: *C. elegans* stress response and its relevance to complex human disease and aging. **Trends in Genetics**, v. 29, n. 6, p. 367-374, 2013.

ROESLER, R., CATHARINO, R. R., MALTA, L. G., EBERLIN, M. N., & PASTORE, G. Antioxidant activity of *Annona crassiflora*: Characterization of major components by electrospray ionization mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 104, n. 3, p. 1048-1054, 2007.

ROOHBAKHSH, A., KARIMI, G., & IRANSHAHI, M. Carotenoids in the treatment of diabetes mellitus and its complications: A mechanistic review. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 91, p. 31-42, 2017.

RUFINO, M. S. M., ALVES, R. E., DE BRITO, E. S., PÉREZ-JIMÉNEZ, J., SAURACALIXTO, F., & MANCINI-FILHO, J. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, v. 121, n. 4, p. 996-1002, 2010.

SANO, S. M., RIBEIRO, J. F., & DE BRITO, M. A. Baru: biologia e uso. **Embrapa Cerrados-Documentos (INFOTECA-E)**, 2004.

SANTOS, U. P., CAMPOS, J. F., TORQUATO, H. F. V., PAREDES-GAMERO, E. J., CAROLLO, C. A., ESTEVINHO, L. M., DE PICOLI, K. S. & DOS SANTOS, E. L. Antioxidant, antimicrobial and cytotoxic properties as well as the phenolic content of the extract from *Hancornia speciosa* Gomes. **PLoS one**, v. 11, n. 12, p. e0167531, 2016.

SANTOS, U. P., TOLENTINO, G. S., MORAIS, J. S., DE PICOLI SOUZA, K., ESTEVINHO, L. M., & DOS SANTOS, E. L. Physicochemical Characterization, Microbiological Quality and Safety, and Pharmacological Potential of *Hancornia speciosa* Gomes. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2018, 2018.

SANTOS, L. E., & FERREIRA, S. T. Crosstalk between endoplasmic reticulum stress and brain inflammation in Alzheimer's disease. **Neuropharmacology**, 2017.

SEN, S., CHAKRABORTY, R., SRIDHAR, C., REDDY, Y. S. R., & DE, B. Free radicals, antioxidants, diseases and phytomedicines: current status and future prospect. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v. 3, n. 1, p. 91-100, 2010.

SERAFINI, M. The role of antioxidants in disease prevention. **Medicine**, v. 34, n. 12, p. 533-535, 2006.

SHARMA, N. Free radicals, antioxidants and disease. **Biology and Medicine**, v. 6, n. 3, p. 1, 2014.

SIN, O., MICHELS, H., & NOLLEN, E. A. Genetic screens in *Caenorhabditis elegans* models for neurodegenerative diseases. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, v. 1842, n. 10, p. 1951-1959, 2014.

SIVANANDHAM, V. Free radicals in health and diseases - a mini review. **Pharmacologyonline**, v. 1, p. 1062-1077, 2011.

SOUSA, R. M. F., DE MORAIS, S. A., VIEIRA, R. B., NAPOLITANO, D. R., GUZMAN, V. B., MORAES, T. S., CUNHA, L. C. S., MARTINS, C. H. G., CHANG, R., AQUINO, F. J. T., NASCIMENTO, E. A., & OLIVEIRA, A. Chemical composition, cytotoxic, and antibacterial activity of the essential oil from *Eugenia calycina* Cambess. leaves against oral bacteria **Industrial Crops and Products**, v. 65, p. 71-78, 2015.

SUN, T., YUAN, H., CAO, H., YAZDANI, M., TADMOR, Y., & LI, L. Carotenoid Metabolism in Plants: The Role of Plastids. **Molecular Plant**, 2017.

SZYMAŃSKA, R., ŚLESIAK, I., ORZECZOWSKA, A., KRUK, J. Physiological and biochemical responses to high light and temperature stress in plants. **Environmental and Experimental Botany**, 2017.

TOMIOTTO-PELLISSIER, F., ALVES, D. R., MIRANDA-SAPLA, M. M., DE MORAIS, S. M., ASSOLINI, J. P., DA SILVA BORTOLETI, B. T., GONÇALVES, M. D., CATANEO, A. H. D., KIAN, D., MADEIRA, T. B., YAMAUCHI, L. M., NIXDORF, S. L., COSTA, I. N., CONCHON-COSTA, I., & YAMAUCHI, L. M. *Caryocar coriaceum* extracts exert leishmanicidal effect acting in promastigote forms by apoptosis-like mechanism and intracellular amastigotes by Nrf2/HO-1/ferritin dependent response and iron depletion: Leishmanicidal effect of *Caryocar coriaceum* leaf extracts. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 98, p. 662-672, 2018.

TRAESEL, G. K., DE LIMA, F. F., DOS SANTOS, A. C., SOUZA, R. I. C., CANTADORI, D. T., KRETSCHMER, C. R., NAVARINI, V. J. & OESTERREICH, S. A. Evaluation of embryotoxic and teratogenic effects of the oil extracted from *Caryocar brasiliense* Cambess pulp in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 110, p. 74-82, 2017.

TRAMUTOLA, A., LANZILLOTTA, C., PERLUIGI, M., & BUTTERFIELD, D. A. Oxidative stress, protein modification and Alzheimer disease. **Brain research bulletin**, v. 133, p. 88-96, 2017.

VALKO, M., RHODES, C., MONCOL, J., IZAKOVIC, M. M., & MAZUR, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-biological interactions**, v. 160, n. 1, p. 1-40, 2006.

VASCONCELOS FILHO, F. S. L., DA ROCHA-E-SILVA, R. C., PEIXOTO, D. S., DA COSTA, V. V., SOARES, P. M., & EVANGELISTA, J. S. A. M. Memory deficit in rats submitted to induction Alzheimer's disease in infusion of intracerebral β -amiloide₁₋₄₂. **Ciência Animal**, p. 23-26. Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária, 2015.

VERA, R., SOARES, M., NAVES, R. V., SOUZA, E. D., FERNANDES, E. P., CALIARI, M., & LEANDRO, W. M. Características químicas de amêndoas de barueiros (*Dipteryx alata* Vog.) de ocorrência natural no Cerrado do Estado de Goiás, Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 31, n. 01, p. 112-118, 2009.

VIEIRA, R. F., AGOSTINI-COSTA, T., SILVA, D. D., SANO, S. M., & FERREIRA, F. R. Frutas nativas da região Centro-Oeste do Brasil. **Embrapa Informação Tecnológica: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, 2006.

VIEIRA, R. F., CAMILLO, J., & CORADIN, L. Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas para o futuro: Região Centro-Oeste. **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia-Livro científico (ALICE)**. 2016.

VIEIRA, T. I., GONDIM, B. L. C., SANTIAGO, B. M., & VALENÇA, A. M. G. In vitro antibacterial and non-stick activity of extracts from leaves of *Psidium guineense* Sw. and *Syzygium cumini* (L.) Skeels on oral microorganisms. **Revista Gaúcha de Odontologia**, v. 60, n. 3, 2012.

VILAR, J. B., FERREIRA, F. L., FERRI, P. H., GUILLO, L. A., & CHEN CHEN, L. Assessment of the mutagenic, antimutagenic and cytotoxic activities of ethanolic extract of araticum (*Annona crassiflora* Mart. 1841) by micronucleus test in mice. **Brazilian Journal of Biology**, v. 68, n. 1, p. 141-147, 2008.

WOJTUNIK-KULESZA, K. A., ONISZCZUK, A., ONISZCZUK, T., & WAKSMUNDZKA-HAJNOS, M. The influence of common free radicals and antioxidants on development of Alzheimer's Disease. **Biomedicine & pharmacotherapy**, v. 78, p. 39-49, 2016.

YE, Z. W., ZHANG, J., TOWNSEND, D. M., & TEW, K. D. Oxidative stress, redox regulation and diseases of cellular differentiation. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1850, n. 8, p. 1607-1621, 2015.

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

ZHANG, L., ZENG, H., & CHENG, W. H. Beneficial and Paradoxical Roles of Selenium at Nutritional Levels of Intake in Healthspan and Longevity. **Free Radical Biology and Medicine**, 2018.

5 APÊNDICES

5.1 Artigo: Composição química e efeitos de frutos do Cerrado sobre o estresse oxidativo, longevidade e doença de Alzheimer em *Caenorhabditis elegans*

Natasha Rios Leite¹, Laura Costa Alves de Araujo², Edson Lucas dos Santos¹

¹Faculdade de Ciências da Saúde, ²Departamento de Biotecnologia e Biodiversidade, Universidade Federal da Grande Dourados, Rodovia Dourados Itahum, Km 12, 79.804-970 Dourados, MS, Brasil

A correspondência deve ser dirigida a Edson Lucas dos Santos; edson.lucas@pq.cnpq.br

Resumo: Os produtos naturais constituem fontes de bioativos responsáveis por diversas atividades biológicas. A atividade antioxidante é fator chave na proteção contra espécies reativas de oxigênio e consequente processo de estresse oxidativo. Neste contexto, este estudo teve como objetivo quantificar os compostos bioativos de três espécies de frutos do Cerrado: *Annona crassiflora*, *Dipteryx alata* e *Psidium guineense*, e avaliar sua respectiva atividade antioxidante *in vitro* e utilizando o nematoide *Caenorhabditis elegans*. Os compostos quantificados foram fenóis, carotenoides, clorofilas e ácido ascórbico. A atividade antioxidante *in vitro* foi analisada pelos métodos de captura dos radicais ABTS e DPPH. A toxicidade aguda e a capacidade reprodutora *in vivo* foram avaliadas e não foi verificado efeito nocivo. Os animais tratados com as polpas foram testados na resistência contra o estresse térmico, no qual a polpa de *A. crassiflora* mostrou proteção na 2ª hora de avaliação. Na investigação de resistência ao estresse oxidativo todos as polpas apresentaram proteção, *D. alata* foi mais eficaz nos últimos períodos de avaliação e *A. crassiflora* foi a mais promissora, na concentração de 1000 µg/mL protegeu em todos os tempos avaliados. A polpa de *D. alata* aumentou a expectativa de vida dos animais tratados com 1000 µg/mL e *A. crassiflora* apresentou um atraso na paralisia das cepas CL2006, que expressam o peptídeo β-amiloide, característico da Doença de Alzheimer. Em conjunto, os frutos do Cerrado avaliados apresentam compostos químicos e atividade antioxidante promissora, além de atenuarem os efeitos causados por uma doença neurodegenerativa, podendo ser explorados na pesquisa de outras atividades biológicas e na produção de nutracêuticos.

1. Introdução

O Brasil é considerado um dos países que abriga a maior biodiversidade de flora em todo o mundo, aproximadamente 20% do total mundial (DUTRA et al., 2016). Esta riqueza

ambiental está dividida em cinco biomas, sendo o Cerrado o segundo maior bioma do país, apresentando diferentes vegetações como florestas, savanas e campos (RIBEIRO; WALTER, 2008), abrigando cerca de 11.000 espécies, muitas delas endêmicas (DEUS, 2011; MYERS et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2012; RATTER et al., 1997).

Nesta perspectiva, nos últimos anos a busca por qualidade de vida tem estimulado o consumo de produtos naturais (OMAR et al., 2017). Destacam-se as espécies frutíferas, fontes de nutrientes, como vitaminas e minerais, e metabólitos secundários, como polifenóis, carotenoides, esteróis e saponinas. Estes compostos são conhecidos por exercerem diversas atividades biológicas, tais como antioxidante, anti-inflamatória, antitumoral, antiproliferativa, antimicrobiana, anti-neurodegenerativa, cardioprotetora, neuroprotetora, dentre outras (DEMBITSKY et al., 2011; NERI-NUMA et al., 2017).

Estes compostos bioativos estão associados à proteção contra espécies reativas de oxigênio, como ânion superóxido, radical hidroxila e hidropéroxil, e espécies reativas de nitrogênio. Estas espécies reativas, por sua vez, estão envolvidas em um processo denominado estresse oxidativo, vinculado ao desenvolvimento e/ou agravamento de inúmeras doenças como câncer, disfunções cardiovasculares, aterosclerose, diabetes e doenças neurodegenerativas (AGUIAR et al., 2016; IGHODARO; AKINLOYE, 2017; LOSADA-BARREIRO; BRAVO-DÍAZ, 2017).

O cérebro, devido ao alto consumo de energia, cerca de 20 % do oxigênio e glicose total do organismo, passa a ser o órgão mais vulnerável ao estresse oxidativo (CHEN; ZHONG, 2014; NELSON et al., 2016). Torna-se suscetível às lesões oxidativas e inflamatórias, danos no metabolismo energético, alterações sinápticas e neuroquímicas, comprometendo neurotransmissores como a acetilcolina e a serotonina, sendo o estresse oxidativo parte crucial no processo patológico da Doença de Alzheimer (QUERFURTH; LAFERLA, 2010; VASCOCELOS et al., 2015).

Um dos modelos animais que vem sendo utilizado é o nematoide *Caenorhabditis elegans*, um organismo experimental apropriado para estudos biológicos, no qual se pode determinar a estrutura completa do sistema nervoso e outros tecidos. É empregado nos mais variados âmbitos da pesquisa, e tem como vantagens o tamanho pequeno, tempo de vida curto, anatomia predeterminada e, genoma inteiramente sequenciado (BRENNER, 1974; SIN et al., 2014). Estas características permitem que este animal seja um excelente aliado na busca de novos compostos e extratos, principalmente os de origem natural e nos seus possíveis efeitos biológicos.

Embora o consumo de frutos tenha recebido atenção nos últimos anos, observa-se que ainda são insuficientes suas informações nutricionais, constituições físico-químicas e possíveis atividades biológicas. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi investigar a composição química, atividade antioxidante, os efeitos dos frutos *Annona crassiflora* (marolo), *Dipteryx alata* (baru) e *Psidium guineense* (araçá) sobre o estresse oxidativo, longevidade e doença de Alzheimer em *Caenorhabditis elegans*.

2. Material e Métodos

2.1. Material vegetal e preparo dos extratos aquosos das polpas

2.1.1. Coleta dos materiais vegetais

Os frutos das espécies *Annona crassiflora* Mart. (marolo), *Dipteryx alata* Vogel (baru) e *Psidium guineense* Sw (araçá) foram coletados no Cerrado, no município de Dourados (S 21° 59' 41,8" e W 55° 19' 24,9"), estado do Mato Grosso do Sul, Brasil, entre dezembro de 2015 a janeiro de 2016. As espécies vegetais foram identificadas pela botânica Prof^a. Dr.^a Zefa Valdivina Pereira e as exsiccatas foram depositadas sob respectivos registros (N° 4599; N° 5342 e N° 5413) no herbário da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), Brasil.

2.1.2. Seleção dos frutos

Para o estudo, foram selecionados apenas frutos em estágio de maturação ideal e sem aparentes danos nas cascas ou presença de insetos. Os frutos foram lavados em água corrente para eliminação de impurezas e sanitizados por imersão em solução Sumaveg® (3,3 g/L de água) durante 15 minutos, seguidos de lavagem com água potável. Os frutos sanitizados foram secos com papel toalha e devidamente embalados em sacos plásticos, os quais foram mantidos a 4° C até o momento do despulpamento. Os frutos foram despulpados manualmente utilizando utensílios de aço-inox (facas e peneiras). Ao final do processo, as amostras foram embaladas e mantidas congeladas a - 80° C para liofilização.

2.1.3. Liofilização e rendimento

As amostras congeladas (-80° C), foram submetidas ao processo de secagem em liofilizador (modelo Alpha 1-2 LDplus, Christ®) sob temperatura de -40° C, vácuo inferior a 0,5 mmHg, velocidade constante de liofilização de 1mm/h e pressão final de 0,050 mmHg. As amostras resultantes do processo de liofilização foram maceradas com auxílio do pistilo de

porcelana e tamisadas manualmente. Posteriormente, as amostras liofilizadas foram mantidas sob congelamento (-80° C) até as análises. Os rendimentos das amostras foram calculados de acordo com a equação a seguir.

$$R\% = (M_{\text{polpa}} \times 100) / (M_{\text{liofilizada}})$$

Onde R% representa a porcentagem de rendimento da polpa liofilizada, M_{polpa} representa a massa da amostra in natura (g) e $M_{\text{liofilizada}}$ a massa resultante do processo de liofilização (g).

2.1.4. Preparo das polpas

Para o preparo das polpas foram utilizados 0,005 g da amostra liofilizada e 5 mL de água ultrapura estéril. O material foi misturado e homogeneizado durante 5 minutos em vortex. Os homogeneizados foram acondicionados em recipientes protegidos da luz, identificados e mantidos refrigerados a 4° C por 24 horas. Para determinação dos pigmentos antioxidantes lipofílicos, ácido ascórbico e saponinas foram utilizadas as amostras liofilizadas. Para as análises de compostos fenólicos e flavonoides, e atividade antioxidante *in vitro*, as polpas líquidas foram obtidas pela centrifugação a 5000 rpm durante 10 minutos, sendo utilizado o sobrenadante.

2.2. Composição química

2.2.1. Determinação de compostos fenólicos e flavonoides

A concentração de compostos fenólicos foi determinada de acordo com o método colorimétrico Folin-Ciocalteu (Meda et al., 2005). Para isso, uma alíquota de 0,5 mL das polpas (500 µg/mL) foi misturada a 2,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu. A mistura foi mantida em repouso durante 5 minutos em temperatura ambiente, protegida da luz. Após esse período, foram adicionados 2 mL de carbonato de sódio (Na₂CO₃) 14 %, seguido por incubação durante 2 horas em temperatura ambiente e protegida da luz. A absorbância foi mensurada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 760 nm. O ácido gálico (0,0004 – 0,0217 mg/mL) foi utilizado como padrão para curva de calibração. O ensaio foi realizado em triplicata e os resultados foram expressos em mg equivalente ao ácido gálico (EAG) por 100 g de polpa.

A concentração de flavonoides foi determinada de acordo com o método colorimétrico com cloreto de alumínio (Libério et al., 2011). Para isso, uma alíquota de 0,5 mL das polpas (500 µg/mL) foi misturada com 4,5 mL de cloreto de alumínio hexahidratado (AlCl₃.6H₂O) 2

% preparado em etanol. A mistura foi incubada durante 30 minutos em temperatura ambiente e protegida da luz. A absorbância foi mensurada a 415 nm. A quercetina (0,0004 – 0,0217 mg/mL) foi utilizada como padrão para curva de calibração. O ensaio foi realizado em triplicata e os resultados foram expressos em mg equivalente a quercetina (EQ) por 100 g de polpa.

2.2.2. Determinação de pigmentos lipofílicos

A concentração dos pigmentos β -caroteno, licopeno e clorofilas a e b foram determinados de acordo com o método descrito por Nagata & Yamashita (1992). Para isso, as amostras liofilizadas (150 mg) foram misturadas a 10 mL de uma solução de acetona-hexano (4:6, v/v) e agitadas vigorosamente durante um minuto. Posteriormente as amostras foram filtradas utilizando papel filtro (Whatman nº 4). A absorbância dos filtrados foi mensurada a 453, 505, 645 e 663 nm. O ensaio foi realizado em triplicata. O conteúdo de β -caroteno, licopeno e clorofilas a e b foram calculados com base nas equações a seguir e expressos em mg por 100 g de amostra.

β -caroteno

$$= 0,216 \times \text{Abs}_{663} - 1,220 \times \text{Abs}_{645} - 0,304 \times \text{Abs}_{505} + 0,452 \times \text{Abs}_{453}$$

Licopeno

$$= -0,0458 \times \text{Abs}_{663} + 0,204 \times \text{Abs}_{645} + 0,304 \times \text{Abs}_{505} - 0,0452 \times \text{Abs}_{453}$$

Clorofila a

$$= 0,999 \times \text{Abs}_{663} - 0,0989 \times \text{Abs}_{645}$$

Clorofila b

$$= -0,328 \times \text{Abs}_{663} + 1,77 \times \text{Abs}_{645}$$

2.2.3. Determinação do teor de ácido ascórbico

A concentração de ácido ascórbico foi realizada de acordo com AOAC (1996) e Benassi et al. (1998). Inicialmente, 0,5 g das amostras liofilizadas foram homogeneizados vigorosamente em 50 mL de ácido oxálico. Na sequência, 20 mL desta solução foi transferida para um balão volumétrico de 50 mL e o volume foi completado com ácido oxálico. A mistura foi filtrada, utilizando papel filtro (Whatman nº 4). O filtrado foi utilizado para titular uma solução do indicador 2,6-diclorofonolindofenol-sódio (DCFI). A titulação foi finalizada pela

presença da coloração rosa persistente por 15 segundos. O ácido ascórbico foi utilizado como solução padrão. O experimento foi realizado em triplicata. Os resultados foram calculados com base na equação abaixo e expressos em mg de ácido ascórbico/100 g de amostra.

$$\frac{\text{mg Vit.C}}{100\text{g amostra}} = \frac{\text{DCFI}_{\text{amostra}}}{\text{DCFI}_{\text{padrão}}} \times \frac{100}{M_{\text{amostra}}} \times \frac{(M_{\text{solvente}} + M_{\text{amostra}})}{m_{\text{extrato}}} \times \frac{50\text{mL}}{10\text{mL}} \times F$$

$$F = \frac{M_{AA}}{50} \times \frac{1}{25} \times 10$$

Onde $\text{DCFI}_{\text{amostra}}$ e $\text{DCFI}_{\text{padrão}}$ são respectivamente o volume gasto na titulação da amostra e do padrão em mL, M_{amostra} , M_{solvente} e M_{extrato} são respectivamente a quantidade em massa de amostra, de solvente adicionado para a titulação da amostra e de alíquota da amostra (g), F é a quantidade de ácido ascórbico necessária para reduzir o DCFI (mg) e M_{AA} é a quantidade em massa de ácido ascórbico (mg).

2.2.4 Saponinas

A presença de saponinas foi determinada pelo método descrito por Tirloni et al. (2015). Para isso, 0,01 g da amostra liofilizada foi misturada a 2 mL de etanol absoluto. A solução foi agitada até total dissolução e posteriormente foi adicionado 5 mL de água fervente. Após o resfriamento em temperatura ambiente, a solução foi analisada pelo método descrito por Bente, $\text{am} = -0,328 \times \text{Abs}_{663} + 1,77 \times \text{Abs}_{645}$. A avaliação indicativa para presença de saponina foi determinada pela formação persistente de espuma na superfície da solução. O ensaio foi realizado em triplicata.

2.3. Atividade antioxidante *in vitro*

2.3.1 Captura do radical livre DPPH

A atividade de captura do radical livre 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) foi avaliada de acordo com o método descrito por Gupta e Gupta (2011), com modificações. Resumidamente, misturou-se 0,2 mL das polpas (0,1 – 1000 $\mu\text{g/mL}$) com 1,8 mL da solução de DPPH (0,11 mM) diluído em etanol 70 %. A mistura foi homogeneizada e incubada em temperatura ambiente durante 30 minutos e protegida da luz. A absorbância foi mensurada a 517 nm. O ácido ascórbico e o BHT (0,1 – 1000 $\mu\text{g/mL}$) foram utilizados como antioxidantes

de referência (controles positivos). Foram realizados três ensaios independentes em triplicata. A curva de inibição foi preparada e os valores de IC₅₀ (concentração necessária para inibir 50 % dos radicais livres) foram calculados. A porcentagem de eliminação do radical livre DPPH foi calculada a partir do controle (solução de DPPH 0,11 mM) utilizando a seguinte equação:

$$\text{Captura do radical livre DPPH (\%)} = 1 - \frac{\text{Abs amostra}}{\text{Abs controle}} \times 100$$

2.3.2. Captura do radical ABTS^{•+}

A capacidade de captura do radical 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS^{•+}) foi realizada conforme descrito por Re et al., (1999). O radical ABTS^{•+} foi preparado a partir da mistura 5 mL da solução de ABTS (7 mM) e 88 µL da solução de persulfato de potássio (140 mM). A mistura foi mantida durante 12-16 horas em temperatura ambiente, protegida da luz. Em seguida, a solução foi diluída em etanol absoluto até obter uma absorbância de 0,70 ± 0,05 a 734 nm. Posteriormente, 20 µL da amostra (0,1 – 1500 µg/mL) foi misturada com 1980 µL do radical ABTS^{•+}. A solução foi homogeneizada e incubada durante 6 minutos em temperatura ambiente e protegida da luz. A absorbância foi mensurada a 734 nm. O ácido ascórbico e o BHT foram utilizados como antioxidantes de referência (controles positivos). Foram realizados dois ensaios independentes em triplicata. A curva de inibição foi preparada e os valores de IC₅₀ foram calculados. A porcentagem de inibição do radical ABTS^{•+} foi determinada de acordo com a equação abaixo:

$$\text{Captura do radical ABTS}^{\bullet+} (\%) = \left(\frac{\text{Abs controle} - \text{Abs amostra}}{\text{Abs controle}} \right) \times 100$$

2.4. Ensaios *in vivo* utilizando o modelo experimental *Caenorhabditis elegans*

2.4.1. Cultura do nematoide *C. elegans*

Para a realização dos ensaios *in vivo*, foram utilizados os nematoides *C. elegans*, linhagem selvagem N2 e a cepa transgênica CL2006, obtidos do *Caenorhabditis* Genetics Center (CGC), Minnesota, EUA. Os nematoides foram mantidos em estufas incubadoras a 20° C ou 15° C, cultivados em placas de petri contendo meio de cultura para crescimento (*Nematode Growth Medium* - NGM) e alimentados com bactérias *Escherichia coli* (OP50), (BRENNER, 1974). Os nematoides foram avaliados no estéreo microscópio (BEL – STMDLX).

2.4.2. Manutenção do nematoide *C. elegans*

Para o preparo do NGM, 15 g de ágar, 1,5 g de cloreto de sódio (NaCl) e 1,25 g de peptona foram misturados a quantidade suficiente de água ultrapura para o volume final de 500 mL. A mistura foi autoclavada a 121° C por 20 minutos. Após o resfriamento em câmara de fluxo laminar, estabilizou-se a temperatura em banho-maria a 55° C durante 15 minutos. Em seguida, adicionou-se ao NGM, 250 µL de CaCl₂ (cloreto de cálcio) (1M); 0,1 mL de colesterol (5 mg/mL em etanol absoluto); 250 µL de MgSO₄ (sulfato de magnésio) (1M) e 6,25 mL de solução tampão fosfato (KPO₄) (1M, pH 6). O NGM foi homogeneizado e distribuído os volumes de 4 ou 10 mL em placas de petri de dimensões 35 x 10 mm ou 60 x 15 mm, respectivamente. As placas foram mantidas refrigeradas a 4° C e monitoradas diariamente para verificação de possível contaminação.

Para alimentação dos nematoides, uma alíquota de 10 µL da bactéria *Escherichia coli* (OP50) armazenada a -80° C e 250 µL de estreptomicina foi transferida em erlenmeyer contendo 250 mL de meio LB (Luria-Bertani) líquido (2,5 g de Bacto Triptone, 1,25 g de Bact Yeast Extract, 1,25 g de NaCl em 250 mL de água ultrapura, seguido de autoclavagem a 121° C durante 20 minutos). O erlenmeyer com a solução e um tubo de ensaio contendo apenas o meio LB (controle) foram incubados sob agitação (170 rpm, 37° C durante 12 - 16 horas) até atingir a densidade ótica igual a 1.0, mensurada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 600 nm. A partir deste caldo concentrado, alíquotas de 300 µL ou 500 µL de bactérias foram semeadas em placas de petri (35 x 10 mm e 60 x 15 mm), respectivamente, em fluxo laminar. Após a secagem, as placas foram vedadas e armazenadas a 4° C para o uso no período máximo de duas semanas. Em ensaios realizados com bactérias mortas, as placas com NGM foram semeadas com *E. coli* (OP50) e o antibiótico Canamicina (10 mM).

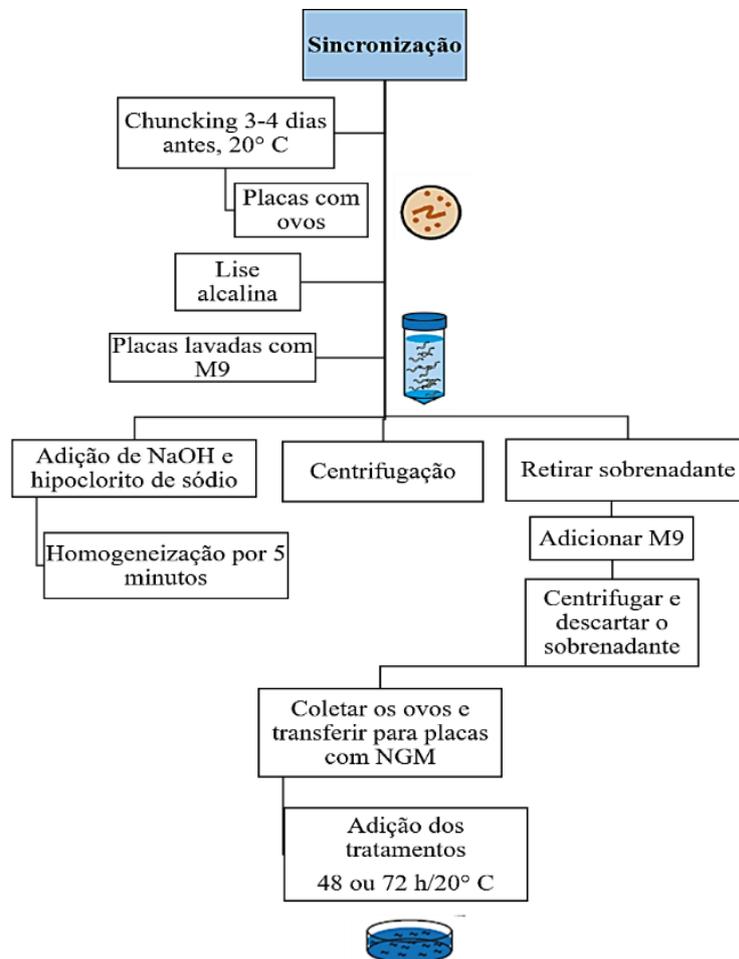
Para o preparo do meio de cultura líquido M9, 3 g de fosfato de potássio monobásico (KH₂PO₄); 6 g de fosfato de sódio dibásico (Na₂HPO₄); 5 g de NaCl e 1 mL de MgSO₄ (1 M) foram misturados a quantidade suficiente de água ultrapura para o volume final de 1000 mL. A mistura foi autoclavada a 121° C por 20 minutos. Após o resfriamento o meio M9 foi armazenado a 4° C.

A manutenção das estirpes dos nematoides foi realizada através da transferência semanal em diferentes estágios de desenvolvimento para novas placas contendo alimento.

2.4.3. Sincronização cronológica dos nematoides *C. elegans*

Previamente aos ensaios, foi realizada a sincronização dos nematoides através de lise alcalina, com o objetivo de obter nematoides com a mesma idade cronológica. Para isto, placas contendo nematoides adultos na fase L4 e ovos, foram lavadas com 3,5 mL de meio M9. A

solução resultante da lavagem foi dispensada em tubos contendo 500 μ L de NaOH (5M) e 1 mL de hipoclorito de sódio (2%). Posteriormente, os tubos foram homogeneizados durante 5 minutos e centrifugados a 1300 rpm durante 1 minuto. O sobrenadante foi retirado e repetiu-se o processo com a adição de 15 mL do meio M9. Ao final, o sobrenadante foi descartado e os ovos resistentes a lise alcalina foram coletados e transferidos para placas de petri contendo NGM e *E. coli* com das polpas ou, somente *E. coli* com o solvente (água) utilizado no preparo das polpas, correspondente ao controle. Os animais foram mantidos em incubadora a 20° C por 48 horas, exceto no experimento de paralisia, onde foram incubados por 72 horas, ambos na fase L4.



Esquema gráfico da sincronização de *C. elegans*.

2.4.4. Toxicidade aguda

O ensaio de toxicidade foi realizado conforme o método descrito por Bonamigo et al. (2017). Em média, 10 nematoides N2 sincronizados, foram transferidos para microplacas de 96 poços contendo meio de cultura M9 (100 μ L) e as polpas (100 μ L) em diferentes concentrações (10 a 1000 μ g/ mL). Posteriormente os nematoides foram incubados a 20° C por 24 e 48 horas. Como controle negativo, os nematoides foram incubados apenas com meio de cultura M9 (200 μ L). Após o período de incubação, a viabilidade dos nematoides foi avaliada pela sensibilidade ao toque com auxílio de um fio de platina. Os nematoides foram avaliados no estereomicroscópio (Motic SMZ-140 & W10X/23). Os resultados foram obtidos a pela média de três ensaios independentes em duplicata.

2.4.5. Número de progênie

Para avaliar a quantidade total de progênie, 5 nematoides N2 sincronizados com os tratamentos foram transferidos individualmente para novas placas contendo *E. coli*, com ou sem as polpas dos frutos. Os nematoides foram transferidos diariamente para novas placas durante 5 dias (período de postura de ovos). A progênie foi contabilizada após alcançar as fases larvais L3 ou L4. Os resultados foram obtidos pela média de três ensaios independentes.

2.4.6. Resistência ao estresse térmico

O ensaio de resistência ao estresse térmico foi realizado utilizando nematoides selvagens N2 sincronizados com as polpas (250, 500 e 1000 μ g/mL) ou somente com o solvente (controle). Em média 20 nematoides foram transferidos para novas placas contendo meio NGM/*E. coli* OP50 e os respectivos tratamentos. O estresse térmico foi induzido pelo aumento da temperatura de cultivo de 20° C para 37° C durante o período de 6 horas, com avaliação para cada hora. Após o período de incubação, os nematoides foram mantidos a 20° C em incubadora por no mínimo 16 horas. Este procedimento permite que os nematoides viáveis se recuperem. Os resultados foram obtidos pela média de três ensaios independentes em duplicatas.

2.4.7. Resistência ao estresse oxidativo

O ensaio de estresse oxidativo foi realizado utilizando Juglone (5-Hydroxy-1,4-naphthoquinone). Juglone é um composto sintético eletrofílico e redox de ciclagem, originalmente produzido por nozes pretas da família *Juglandacea*. Foram utilizados nematoides N2 sincronizados com os tratamentos. Destes, 10 nematoides foram transferidos para microplacas de 96 poços contendo meio de cultura M9 (200 μ L) e Juglone (50 μ L), e incubados

a 20° C por 6 horas. A avaliação foi realizada a cada hora de experimento. Foram utilizados como controle nematoides incubados apenas em meio de cultura M9 (250 µL) e com Juglone (200 µl M9 + 50 µl Juglone).

A viabilidade dos nematoides foi avaliada pela sensibilidade ao toque utilizando um fio de platina. Os nematoides foram avaliados no estéreo microscópio (BEL-STMDLX). Os resultados foram obtidos pela média de três ensaios independentes em triplicatas.

2.4.8. Longevidade

Foram utilizados nematoides N2 expostos aos tratamentos durante a fase ovo até a fase L4. No primeiro dia da fase adulta, 20 animais por grupo foram transferidos para novas placas com *E. coli* com ou sem as polpas, este foi considerado o dia 1 do experimento. Durante os seis primeiros dias os nematoides foram transferidos diariamente para novas placas do respectivo tratamento, período que os animais se encontram na fase de reprodução. A partir do 7° dia os animais foram transferidos a cada 2-3 dias. A avaliação da sobrevivência consistiu em classificar os nematoides como mortos/vivos diariamente, até que todos os animais morressem. Os animais eram considerados mortos quando não se movimentavam com ou sem estímulo. Os nematoides com ovos eclodidos internamente ou os que desapareceram foram censurados dos dados. Os resultados foram obtidos pela média de dois ensaios independentes, em triplicata.

2.4.9. Paralisia induzida

O ensaio de paralisia foi realizado com a cepa transgênica CL2006, mantida a 15° C até o momento dos experimentos. Os nematoides foram sincronizados com os tratamentos por 72 horas, a 20° C. Após esse período, foi realizado um novo tratamento em meio M9 com os extratos das polpas por um período de 1 hora a 20° C. Em seguida, 20 nematoides por placa, em triplicata, foram transferidos para novas placas contendo *E. coli* com ou sem as polpas e foram mantidos a 25° C por 22 horas. A avaliação foi realizada a cada 2 horas, por 10 horas. Os nematoides foram considerados paralisados quanto a incapacidade de mover seus corpos quando tocados com um fio de platina.

2.5. Análises estatísticas

Os dados são mostrados como a média \pm erro padrão da média (EPM). O teste *t* de *Student* foi empregado na comparação entre o controle e o tratamento, e a análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida do pós-teste *Dunnnett* foi utilizada na comparação entre dois grupos ou mais. A curva de sobrevivência foi construída através da análise do teste log-Rank

(Mantel-Cox). O software GraphPad Prism 5 foi utilizado na compilação e análise de todos os dados. Os resultados foram considerados significativos quando $P < 0,05$.

3. Resultados

3.1. Rendimento

O rendimento do material vegetal liofilizado foi de 21 %, 67 % e 20 %, para os frutos de *A. crassiflora*, *D. alata* e *P. guineense*, respectivamente.

3.2. Composição química

3.2.2. Compostos fenólicos e flavonoides

A concentração de compostos fenólicos foi maior para a polpa de *P. guineense*, aproximadamente 2 vezes maior a *A. crassiflora* e 3 vezes superior a *D. alata*. Da mesma maneira, *P. guineense* apresentou a maior concentração de flavonoides, 16 vezes mais elevada que em *A. crassiflora*. Não foi identificado flavonoides em *D. alata*. Os resultados estão apresentados na Tabela 1.

3.2.3. Pigmentos lipofílicos

De acordo com a Tabela 1, os pigmentos majoritários presentes nos frutos são β -caroteno e clorofila B. A polpa de *A. crassiflora* apresentou a maior concentração de β -caroteno, $0,366 \pm 0,05 \mu\text{g/g}$; a polpa de *P. guineense* a maior concentração de clorofila B com $0,108 \pm 0,018 \mu\text{g/g}$, seguido da polpa de *D. alata* com $0,090 \pm 0,05 \mu\text{g/g}$. Não foi verificada a presença de β -caroteno no extrato de *D. alata*.

3.2.4. Ácido ascórbico

Todos as polpas apresentaram quantidades significativas de ácido ascórbico. A polpa de *A. crassiflora* apresentou um teor 75 e 81 % mais alto de ácido ascórbico quando comparado as polpas de *P. guineense* e *D. alata*, respectivamente.

3.2.5. Saponinas

Os frutos de *A. crassiflora*, *D. alata* e *P. guineense* não apresentaram saponinas, resultado indicado pela ausência de espuma persistente.

3.3. Atividade antioxidante *in vitro*

Após investigação de compostos bioativos conhecidos por apresentarem propriedades antioxidantes, ensaios de capturas dos radicais DPPH e ABTS foram realizados. O IC₅₀ e a atividade máxima (%) de captura dos radicais pelas polpas e controles são apresentados na Tabela 2. A polpa de *P. guineense* apresentou melhor perfil antioxidante, quando comparado aos demais extratos em ambos os ensaios.

Tabela 1. Composição química dos frutos de *A. crassiflora*, *D. alata* e *P. guineense*.

Frutos	Fenóis Totais mg EAG/100g	Flavonoides mg EQ/100g	B-caroteno µg/g	Licopeno µg/g	Clorofila A µg/g	Clorofila B µg/g	Ácido Ascórbico mg/100g
<i>A. crassiflora</i>	382,277 ± 0,03	14,188 ± 0,29	0,366 ± 0,05	0,036 ± 0,003	0,051 ± 0,005	0,083 ± 0,009	205,61 ± 0,58
<i>D. alata</i>	262,089 ± 0,60	N D	N D	0,033 ± 0,001	0,082 ± 0,002	0,090 ± 0,005	113,48 ± 15,91
<i>P. guineense</i>	874,663 ± 0,17	227,008 ± 0,08	0,105 ± 0,01	0,050 ± 0,005	0,075 ± 0,011	0,108 ± 0,018	117,00 ± 32,63

ND. Não detectado.

Os valores são expressos como média ± EPM.

Tabela 2. Atividade antioxidante dos frutos de *A. crassiflora*, *D. alata* e *P. guineense* pelos métodos de captura dos radicais DPPH e ABTS^{•+}.

Amostras	DPPH			ABTS ^{•+}		
	IC ₅₀ (μg/mL)	Inibição máxima %	Inibição máxima μg/mL	IC ₅₀ (μg/mL)	Inibição máxima %	Inibição máxima μg/mL
Ácido ascórbico	2,65 ± 0,20	95,18 ± 0,17	10	1,43 ± 0,09	99,46 ± 0,19	5
BHT	14,58 ± 2,15	92,45 ± 0,92	100	10,15 ± 0,94	93,53 ± 1,30	25
<i>A. crassiflora</i>	2126,67 ± 195,63	82,79 ± 3,22	5000	1048,25 ± 55,7	85,53 ± 0,22	1500
<i>D. alata</i>	2306,33 ± 101,83	74,89 ± 0,42	5000	416,0 ± 28,0	86,80 ± 0,21	1500
<i>P. guineense</i>	262,36 ± 19,87	93,59 ± 0,99	1000	391,65 ± 36,65	85,58 ± 0,22	1500

Os valores são expressos como média ± EPM.

3.4. Ensaios *in vivo*

3.4.1. Toxicidade aguda

Ao avaliar a ação tóxica das polpas *in vivo* foi observado que nenhum fruto, nas concentrações avaliadas, apresentou toxicidade neste modelo biológico (figuras 1,2 e 3).

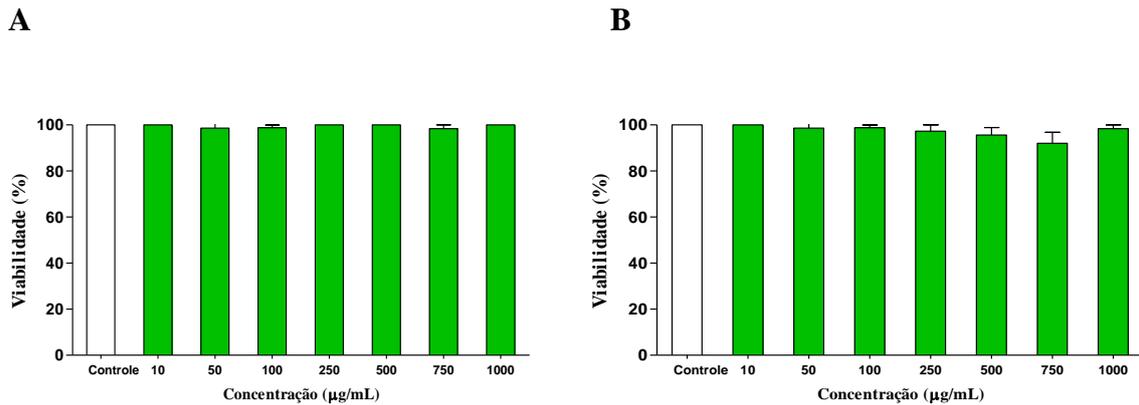


Figura 1. Toxicidade da polpa de *Annona crassiflora* (marolo) em *Caenorhabditis elegans*, por (A) 24 horas e (B) 48 horas. Os valores são expressos como média \pm EPM.

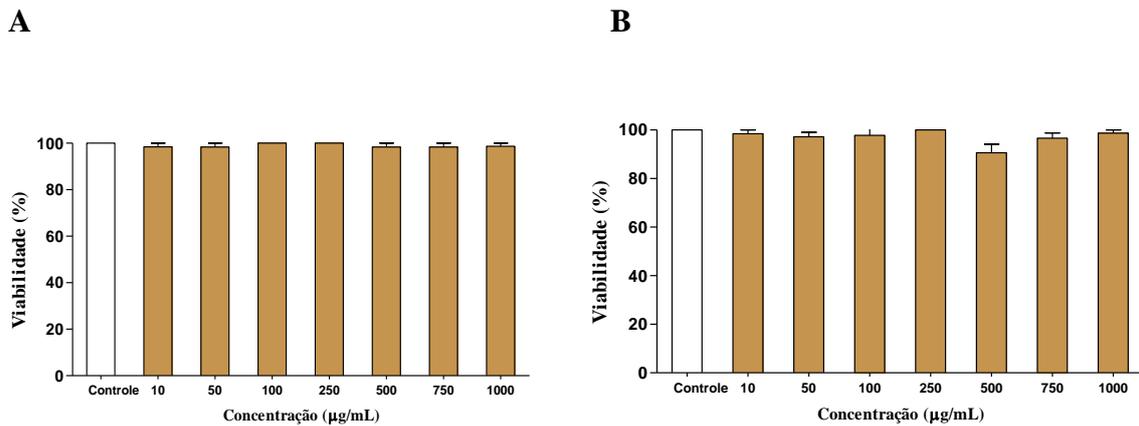
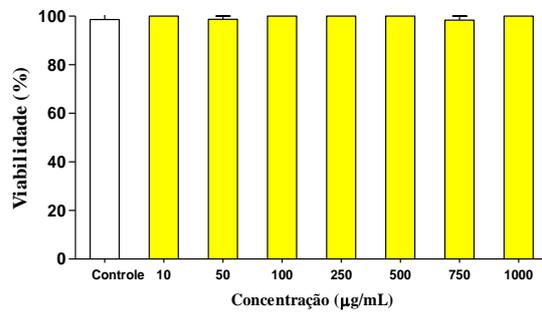


Figura 2. Toxicidade da polpa de *Dipteryx alata* (baru) em *Caenorhabditis elegans*, por (A) 24 horas e (B) 48 horas. Os valores são expressos como média \pm EPM.

A



B

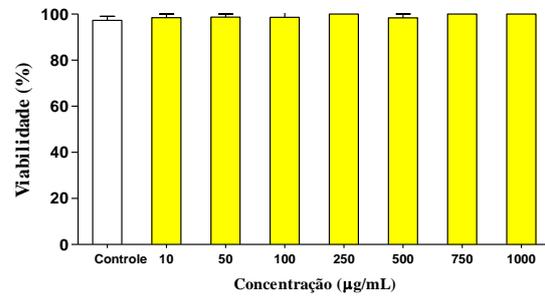
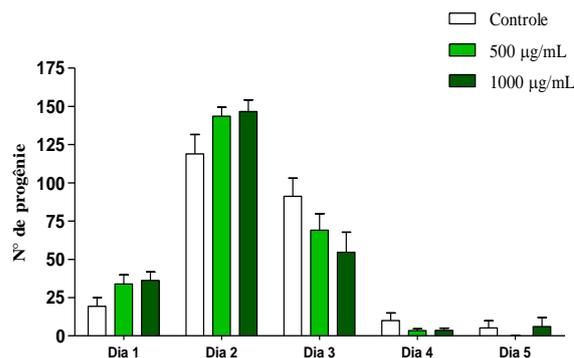


Figura 3. Toxicidade da polpa de *Psidium guineense* (araçá) em *Caenorhabditis elegans*, por (A) 24 horas e (B) 48 horas. Os valores são expressos como média \pm EPM.

3.4.2. Número de progênie

Para testar se as polpas seriam capazes de interferir na capacidade reprodutora dos nematoides, um outro marcador para possível atividade tóxica, avaliou-se o número de progênie destes nematoides. Não foi verificada nenhuma diferença estatística entre os nematoides tratados com os frutos em relação ao controle (figuras 4, 5 e 6).

A



B

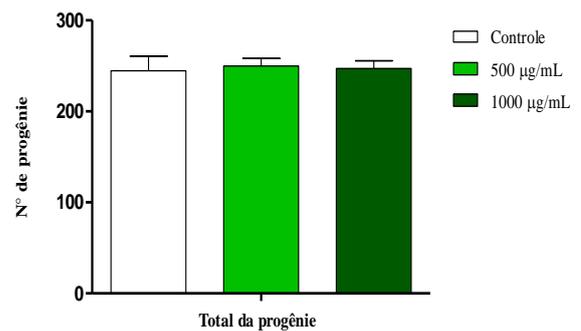
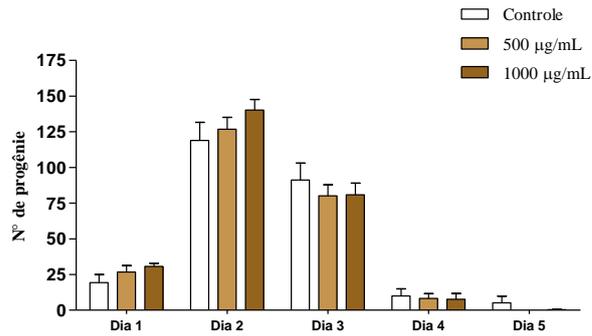


Figura 4. Número de progênie em *Caenorhabditis elegans* tratados com a polpa de *A. crassiflora*. (A) Quantificação diária da progênie e (B) total dos 5 dias de progênie. Os valores são expressos como média \pm EPM.

A



B

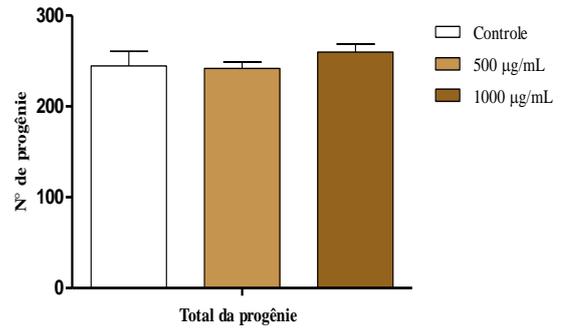
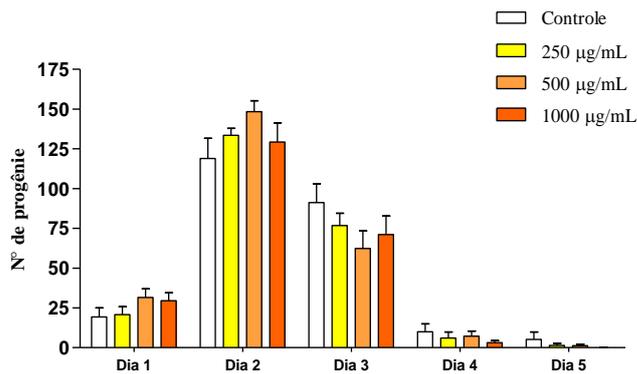


Figura 5. Número de progênie em *Caenorhabditis elegans* tratados com o a polpa de *D. alata*. (A) Quantificação diária da progênie e (B) total dos 5 dias de progênie. Os valores são expressos como média \pm EPM.

A



B

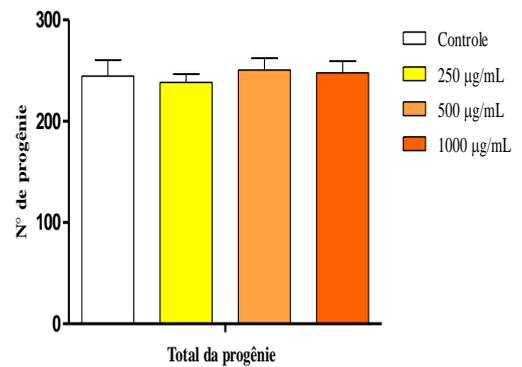


Figura 6. Número de progênie em *Caenorhabditis elegans* tratados com a polpa de *P. guineense*. (A) Quantificação diária da progênie e (B) total dos 5 dias de progênie. Os valores são expressos como média \pm EPM.

3.4.3. Resistência ao estresse térmico

Os nematoides foram submetidos ao estresse térmico, capaz de gerar danos proteicos, a 37° C por 6 horas. É possível observar proteção da polpa de *A. crassiflora* na 2ª hora de exposição à temperatura elevada, apenas na concentração de 500 µg/mL (figura 7). As polpas de *D. alata* e *P. guineense* não apresentaram estatística significativa (figuras 8 e 9).

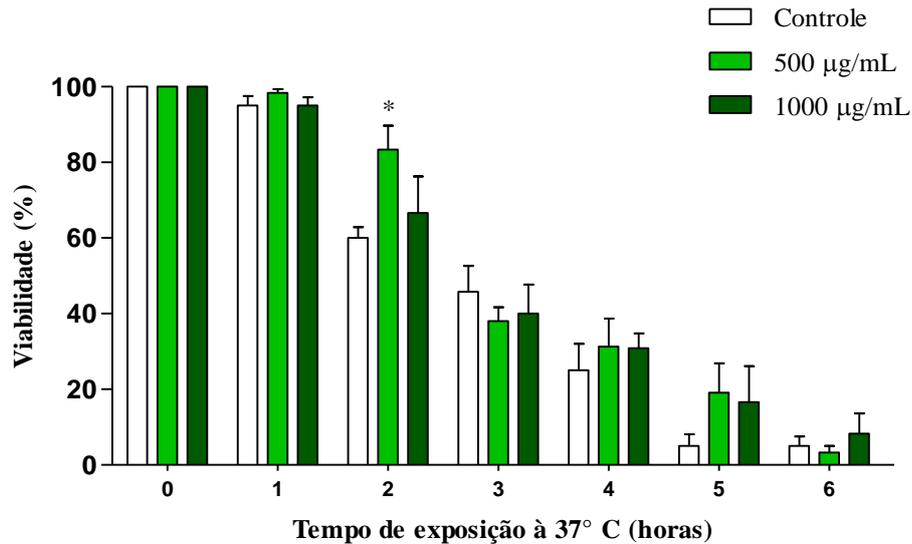


Figura 7. Estresse térmico no modelo experimental *in vivo* *C. elegans* submetidos ao tratamento com o a polpa de *A. crassiflora*. * Representa resultados estatisticamente significativos ($P < 0,05$) quando o grupo tratado foi comparado com o grupo controle. Os valores são expressos como média \pm EPM.

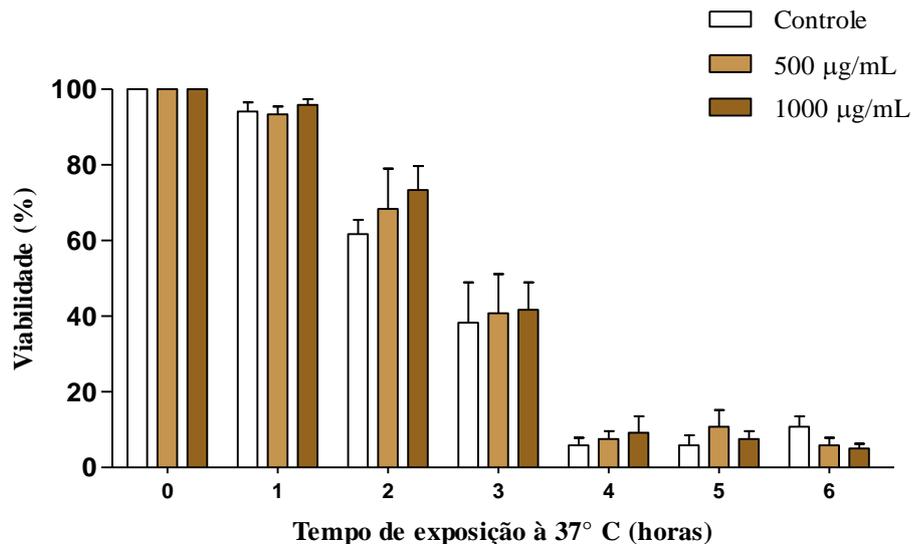


Figura 8. Estresse térmico no modelo experimental *in vivo* *C. elegans* submetidos ao tratamento com a polpa de *D. alata*. Os valores são expressos como média \pm EPM.

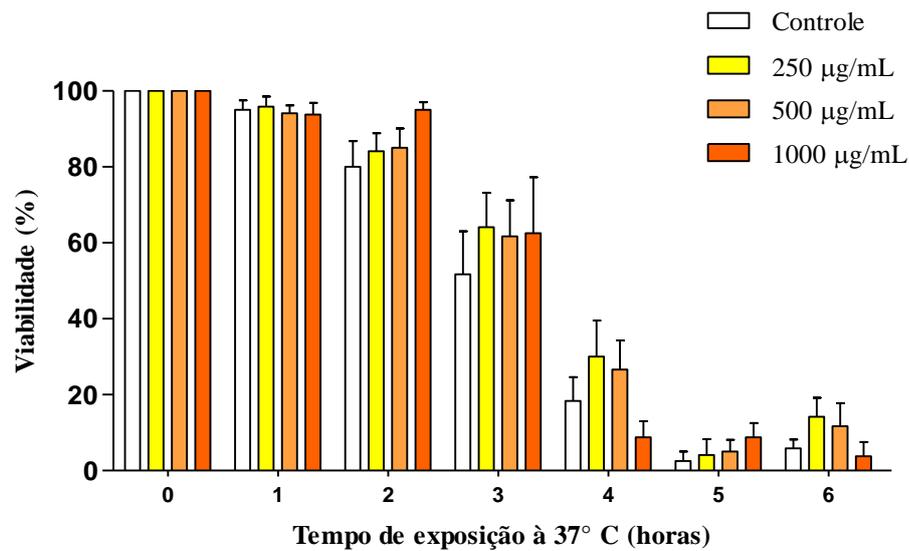


Figura 9. Estresse térmico no modelo experimental *in vivo* *C. elegans* submetidos ao tratamento com a polpa de *P. guineense*. Os valores são expressos como média \pm EPM.

3.4.5. Resistência ao estresse oxidativo

Neste experimento, os nematoides foram submetidos ao tratamento com juglone, um xenobiótico capaz de gerar espécies reativas, que é normalmente letal para nematoides. A polpa de *A. crassiflora*, na concentração de 1000 µg/mL, apresentou efeito protetor em todos os períodos avaliados (figura 10). A polpa de *D. alata*, também na concentração de 1000 µg/mL, apresentou aumento da resistência contra o estresse oxidativo, sendo eficaz nos períodos de 4, 5 e 6 horas de avaliação (figura 11). A polpa de *P. guineense* protegeu os nematoides contra o indutor de estresse oxidativo apenas na quinta hora de avaliação, na concentração de 250 µg/mL (figura 12).

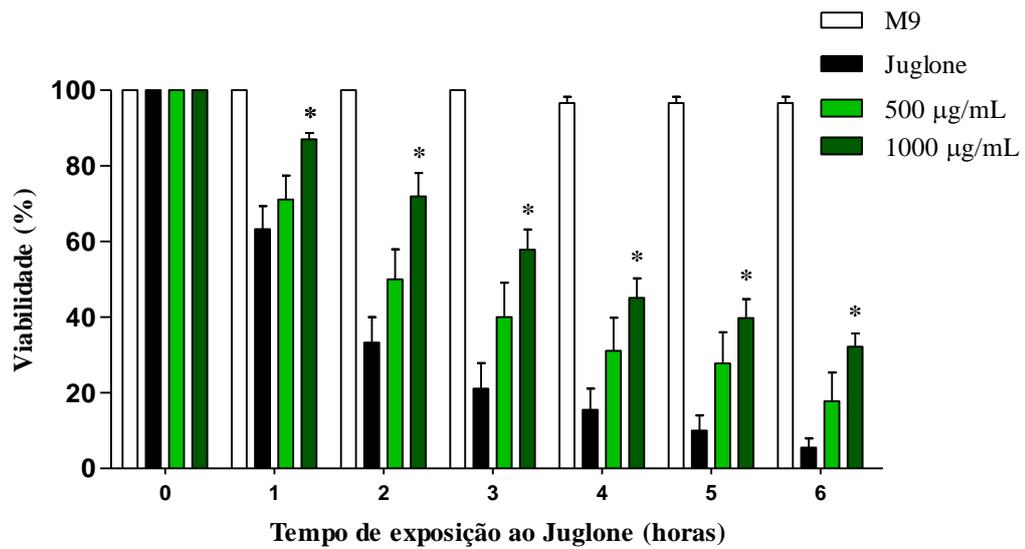


Figura 10. Estresse oxidativo no modelo experimental *in vivo* *C. elegans* submetidos aos tratamentos com a polpa de *A. crassiflora*. * Representa resultados estatisticamente significativos ($P < 0,05$) quando o grupo tratado foi comparado com o grupo controle. Os valores são expressos como média \pm EPM.

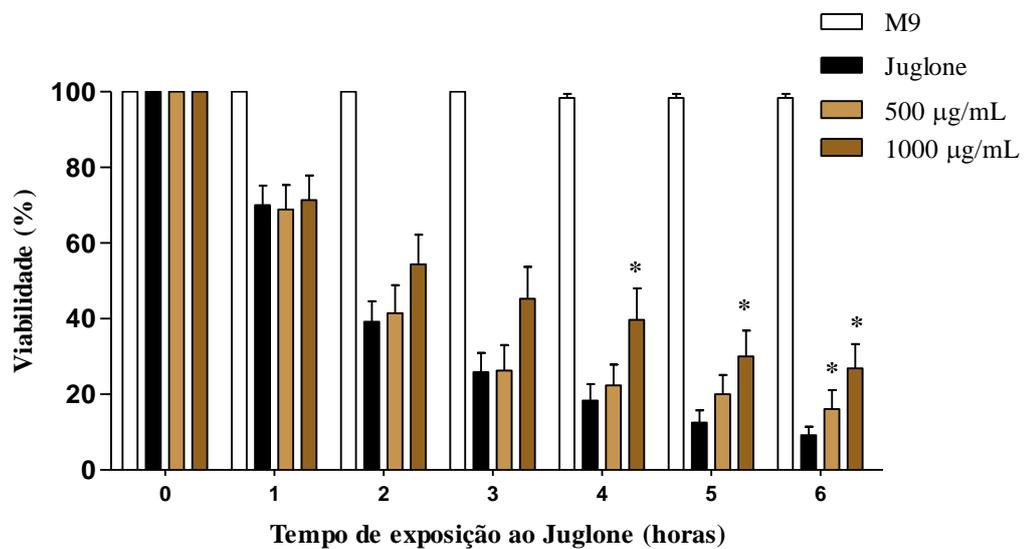


Figura 11. Estresse oxidativo no modelo experimental *in vivo* *C. elegans* submetidos aos tratamentos com a polpa de *D. alata*. * Representa resultados estatisticamente significativos ($P < 0,05$) quando o grupo tratado foi comparado com o grupo controle. Os valores são expressos como média \pm EPM.

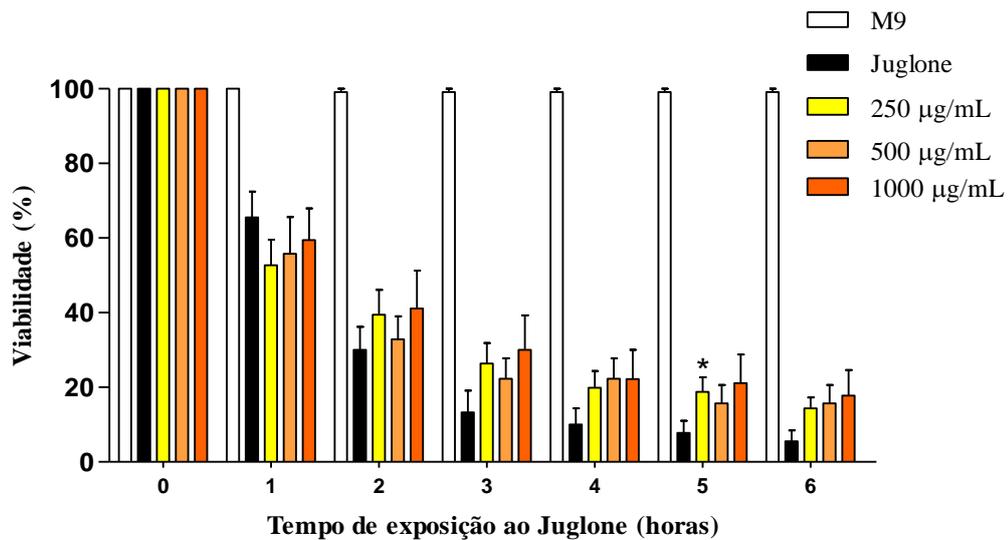


Figura 12. Estresse oxidativo no modelo experimental *in vivo* *C. elegans* submetidos aos tratamentos com a polpa de *P. guineense*. * Representa resultados estatisticamente significativos ($P < 0,05$) quando o grupo tratado foi comparado com o grupo controle. Os valores são expressos como média \pm EPM.

3.4.6. Longevidade

Neste ensaio foi possível observar uma extensão no tempo de vida dos nematoides tratados com a polpa de *D. alata* na concentração de 1000 µg/mL (figura 14, tabela 3), resultado que pode ser relacionado ao aumento de resistência ao estresse oxidativo. Não foi observado aumento da expectativa de vida para os nematoides tratados com a polpa de *A. crassiflora* e *P. guineense* (figuras 13 e 15).

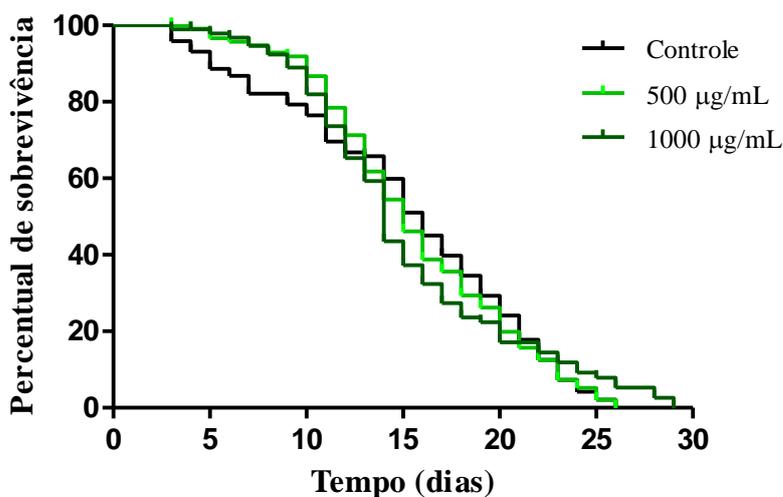


Figura 13. Ensaio de longevidade no modelo experimental *in vivo* *C. elegans* submetidos aos tratamentos com a polpa de *A. crassiflora*.

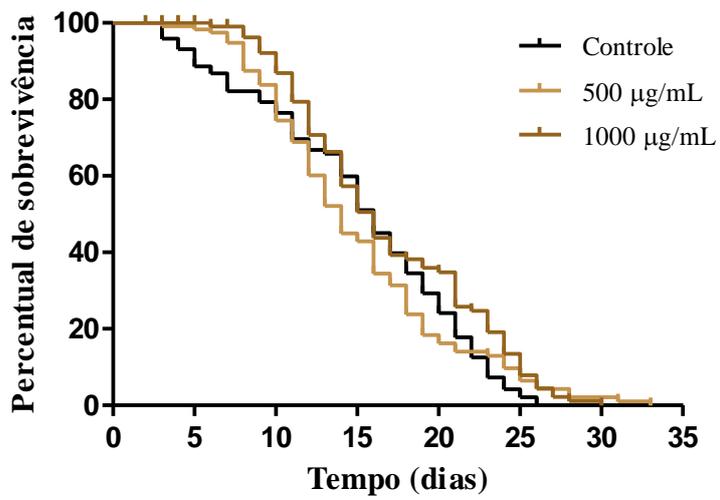


Figura 14. Ensaio de longevidade no modelo experimental *in vivo* *C. elegans* submetidos aos tratamentos com a polpa de *D. alata*.

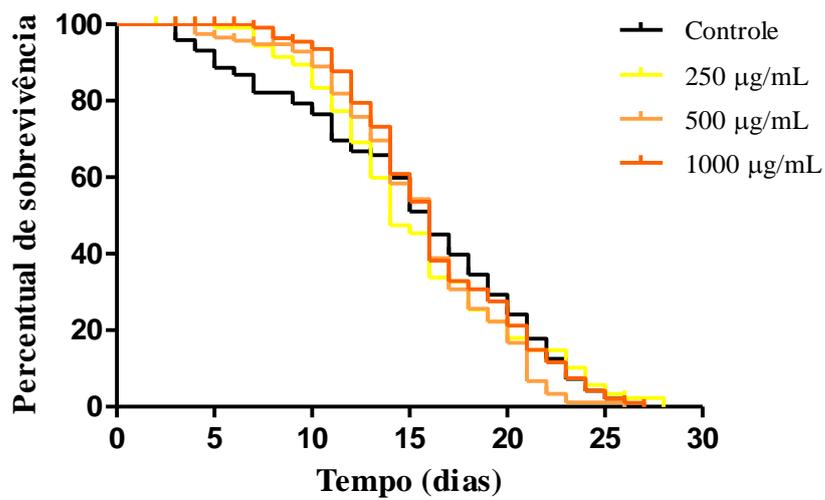


Figura 15. Ensaio de longevidade no modelo experimental *in vivo* *C. elegans* submetidos aos tratamentos com a polpa de *P. guineense*.

Tabela 3. Efeitos dos tratamentos das polpas de frutos do Cerrado na sobrevivência de animais selvagens em condições padrões.

Longevidade	Média de Sobrevivência ^a	P valor (log rank) vs. Controle ^b	N ^o ^c
Controle	16		120 (2)
<i>A. crassiflora</i> 500 µg/mL	15	0,9986	120 (2)
<i>A. crassiflora</i> 1000 µg/mL	14	0,9012	120 (2)
<i>D. alata</i> 500 µg/mL	14	0,9429	120 (2)
<i>D. alata</i> 1000 µg/mL	16	0,0266*	120 (2)
<i>P. guineense</i> 250 µg/mL	14	0,9797	120 (2)
<i>P. guineense</i> 500 µg/mL	16	0,2946	120 (2)
<i>P. guineense</i> 1000 µg/mL	16	0,6554	120 (2)

* Representa resultados estatisticamente significativos ($P < 0,05$) quando o grupo tratado foi comparado com o grupo controle.

^a Tempo de sobrevivência mensurado em dias

^b As comparações foram realizadas usando o teste log-rank (Mantel-Cox)

^c Número total de animais analisados, o número entre parênteses representa a quantidade de ensaios independentes

3.4.7. Paralisia induzida

A. crassiflora, na concentração de 1000 µg/mL, atrasou a taxa de paralisia em relação ao controle em aproximadamente 13,41 % no último período de avaliação (figura 16). As outras polpas não foram capazes de induzir o atraso na paralisia dos nematoides (figuras 17 e 18).

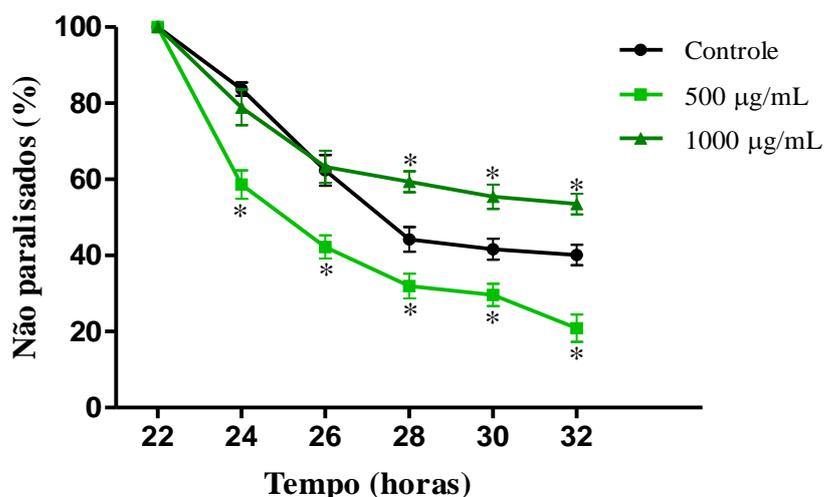


Figura 16. Ensaio de paralisia induzida em *C. elegans* (CL2006), submetidos ao tratamento com a polpa de *A. crassiflora*. * Representa resultados estatisticamente significativos ($P < 0,05$) quando o grupo tratado foi comparado com o grupo controle. Os valores são expressos como média \pm EPM.

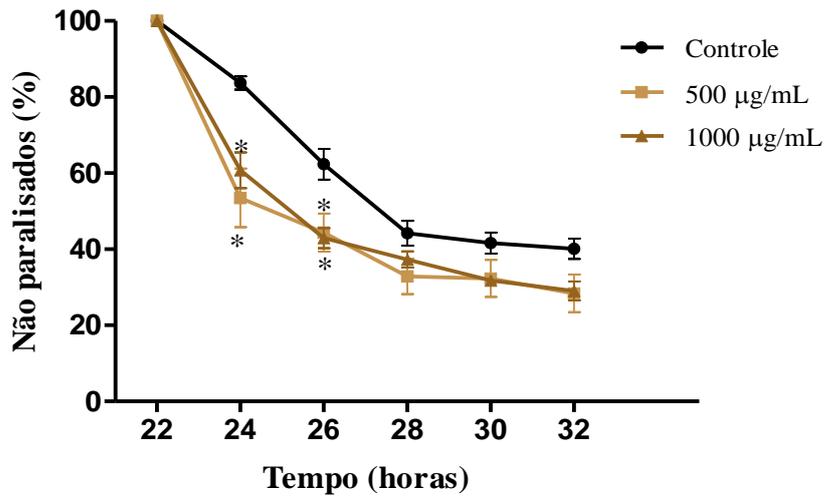


Figura 17. Ensaio de paralisia induzida em *C. elegans* (CL2006), submetidos ao tratamento com a polpa de *D. alata*. * Representa resultados estatisticamente significativos ($P < 0,05$) quando o grupo tratado foi comparado com o grupo controle. Os valores são expressos como média \pm EPM.

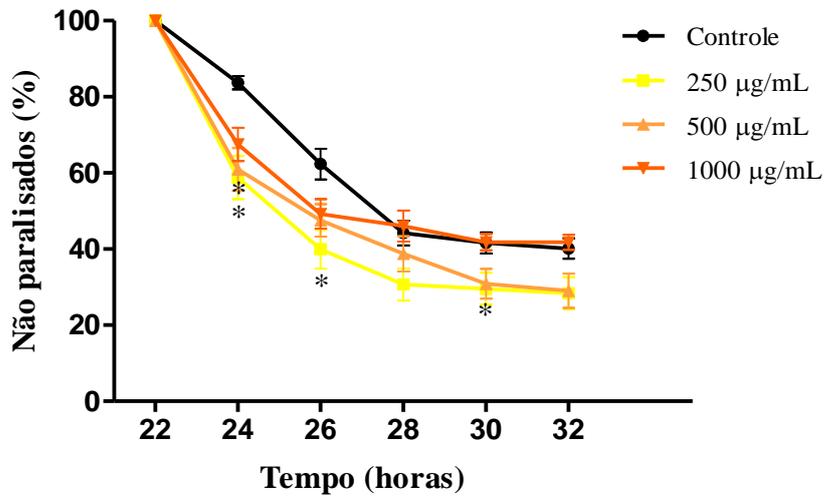


Figura 18. Ensaio de paralisia induzida em *C. elegans* (CL2006), submetidos ao tratamento com a polpa de *P. guineense*. * Representa resultados estatisticamente significativos ($P < 0,05$) quando o grupo tratado foi comparado com o grupo controle. Os valores são expressos como média \pm EPM.

4. Discussão

O consumo regular de frutas e vegetais, como constatado em estudos epidemiológicos, está associado a uma redução no desenvolvimento de doenças crônicas (HU et al., 2016; COSTA et al., 2017). Os efeitos benéficos dos frutos estão relacionados a presença de diversos compostos bioativos, como flavonoides, ácidos fenólicos, taninos, vitaminas, dentre outros, proporcionando ações antioxidantes, anti-inflamatórias, anti-carcinogênicas, efeitos anti-ateroescleróticos, reduzindo a incidência de doenças coronárias e também auxiliando no equilíbrio da microbiota intestinal (OROIAN; ESCRICHE, 2015). Entretanto, apesar da ampliação de estudos que investigam seus potenciais terapêuticos, os frutos ainda são considerados acessórios na alimentação. Em contrapartida, os frutos constituem a base da nutrição, podendo exercer atividades mais eficientes na promoção da saúde do que os próprios vegetais (CHANG et al., 2016).

Nesta perspectiva, investigamos o potencial biológico de três espécies de frutos nativos do Cerrado, popularmente conhecidos como marolo, baru e araçá, sobre a capacidade antioxidante *in vitro* e possíveis mecanismos de proteção contra o estresse celular associados ao processo de envelhecimento, utilizando como modelo experimental o nematoide *Caenorhabditis elegans*.

Inicialmente quantificamos alguns compostos bioativos nas polpas dos frutos avaliados. As polpas destes frutos apresentaram quantidades significativas de fenóis e flavonoides, exceto para a polpa de *D. alata*, que não apresentou flavonoides. A polpa com maior concentração de compostos fenólicos foi *P. guineense*, com 874,663 mg EAG/100g, resultado superior ao encontrado na literatura, de 113 mg EAG/100g (DAMIANI et al., 2011).

Os compostos fenólicos são metabólitos secundários reconhecidos por sua atividade antioxidante, proveniente de seu caráter eficiente na doação de hidrogênio, neutralizando espécies reativas radicalares e não radicalares (LOSADA-BARREIRO; BRAVO-DÍAZ, 2017). Também podem atuar como agentes de quelação de metais, na modulação de enzimas antioxidantes endógenas, em vias de sinalização celular e na expressão de genes (RODRIGO et al., 2011).

A concentração de flavonoides também foi mais elevada na polpa de *P. guineense*. Os flavonoides são uma subclasse de compostos fenólicos, com mais de 4000 exemplares. O consumo de flavonoides é associado a menores índices de mortalidade como resultado de doenças cardíacas e ao déficit cognitivo durante o envelhecimento (MATIAS et al., 2016). Suas ações também incluem atividades antiviral, antibacteriana, anti-inflamatória, cardioprotetora, antidiabética e anticancerígena (WANG et al., 2017).

Nas polpas avaliadas também foram identificados carotenoides, com exceção da polpa de *D. alata*, que não apresentou quantidades detectáveis de β -caroteno. Os carotenoides são os responsáveis pelos pigmentos amarelos, alaranjados e vermelhos de frutas e vegetais e, componentes essenciais na dieta humana, atuando como precursores na biossíntese de vitamina A. Os carotenoides são antioxidantes, podendo agir transferindo elétrons, adicionando e transferindo átomos de hidrogênio (LIU et al., 2015; KULCZYŃSKI et al., 2017). Estas características garantem o papel benéfico em muitas doenças, como câncer, doenças cardiovasculares, diabetes, osteoporose, Doença de Alzheimer e doenças dos olhos relacionada a idade (SAINI et al., 2015; ROOHBAKHSH et al., 2017).

O ácido ascórbico também é um excelente agente antioxidante, sendo encontrado em diversos tipos de frutos, mas também comercializado em cápsulas. Diferente dos compostos fenólicos, a polpa de *A. crassiflora* apresentou a maior quantidade de ácido ascórbico, valor superior ao encontrado por Damiani et al. (2009) em estudo com a polpa de *A. crassiflora*, já as polpas de *D. alata* e *P. guineense* apresentaram concentrações semelhantes entre si. O ácido ascórbico participa da síntese de colágeno, L-carnitina, da conversão de dopamina e do metabolismo de tirosina. Além disso, pode atuar como cofator em várias reações enzimáticas, reduzindo eficientemente radicais livres oriundos da respiração celular (LI; SCHELLHORN, 2007; UNLU et al., 2016).

A atividade antioxidante dos frutos foi avaliada *in vitro* através da captura do radical livre DPPH e ABTS. Estes radicais podem ser neutralizados através da doação de elétrons ou extintos por meio da doação de átomos de hidrogênio (KRISHNAIAH et al., 2011; SHAHIDI; ZHONG, 2015). A polpa de *P. guineense* apresentou melhor desempenho na captura de radicais DPPH, o resultado pode ser correlacionado a elevada concentração de compostos fenólicos, bioativos que possuem em sua estrutura grupos hidroxila, capazes de reduzir os oxidantes por meio da doação de átomos de hidrogênio ou elétrons (ZHANG; TSAO, 2016). Na captura do radical ABTS, a polpa de *P. guineense* também apresentou melhor atividade. O radical ABTS, possui tanto afinidade por meios hidrossolúveis quanto lipossolúveis, resultando em uma maior interação entre os bioativos presentes nas polpas (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005), o que pode explicar a melhor atividade obtida pelos frutos de *D. alata* e *P. guineense*, em relação a captura do radical DPPH.

Adicionalmente, as polpas foram testados em modelo *in vivo*. O nematoide *Caenorhabditis elegans* é um dos mais versáteis organismos modelos usados no estudo de vias moleculares relacionadas à diversas doenças e ao envelhecimento. É um animal hermafrodita, com desenvolvimento rápido, aproximadamente três dias, e ciclo de vida de três semanas, além

disso, seu fenótipo pode ser visualizado em nível de células ou tecido individual, o que é resultado de seu corpo transparente (GARCÍA-GONZÁLEZ; WALHOUT, 2017; GAO et al., 2017).

A toxicidade é um dos principais parâmetros avaliados quando há a pretensão de produção de agentes terapêuticos, nutracêuticos e fármacos. Essa avaliação garante o uso seguro pela população, embora muito raramente frutos já consumidos apresentem algum indício de efeito nocivo ao organismo humano. Neste estudo os frutos não apresentaram efeitos tóxicos aos nematoides nas concentrações testadas.

Sequencialmente a capacidade reprodutora de *C. elegans* foi avaliada, também investigada como um indicativo de possíveis efeitos tóxicos no estágio de desenvolvimento L4 e, de modo indireto, na atividade neuromuscular de postura de ovos (BOYD et al., 2010; PETERSON et al., 2008). Alterações ambientais desfavoráveis também podem interferir no desenvolvimento e reprodução de *C. elegans*, que pode ser modificado e levar ao desenvolvimento de larvas dauer, que tem seu desenvolvimento interrompido para garantia de sobrevivência (GAO et al., 2017). Não foram observadas quaisquer alterações no número de progênie dos animais tratados com os frutos em relação ao controle.

A atividade antioxidante utilizando *C. elegans* foi avaliada por meio dos ensaios de resistência ao estresse térmico e oxidativo. No ensaio de resistência ao estresse térmico os animais foram submetidos a um choque térmico e este procedimento faz com as células ativem uma resposta ao estresse térmico, através de um conjunto de genes induzíveis, controlados por chaperonas, que agem neste processo tentando evitar a degeneração celular e aumentar a proteção térmica (RODRIGUEZ et al., 2013). Apenas a polpa de *A. crassiflora* apresentou efeito protetor contra danos causados pelo estresse térmico no período de 2 horas. Este resultado pode estar associado a uma redução no conteúdo de energia necessária para recuperação dos efeitos negativos provocados por esta mudança de ambiente, acarretando na morte da maioria dos nematoides após a 2ª hora de exposição a elevada temperatura (ZHOU et al., 2011). Outros fatores podem ter contribuído para os resultados observados, como a hormese, fenômeno em que um organismo adquire maior resistência a um estresse, quando submetido a este mesmo estresse, porém em doses moderadas, diferente da situação avaliada neste experimento, em que os animais são diretamente expostos a um estresse de 37° C, quase o dobro da temperatura ideal de sobrevivência. A definição da temperatura também é um ponto crítico, pois estudos apontam que a temperatura de 37° C seria uma dose letal para a maioria das fases larvais de *C. elegans*, no período de até três horas. A fase larval também é uma variável, sendo os nematoides em fase

larval L4 mais sensíveis ao estresse térmico do que aqueles que estão em fase L1 (ZEVIAN; YANOWITZ, 2014).

A atividade antioxidante também foi investigada por meio da indução dos animais ao estresse oxidativo induzido por juglone (5-hidroxi-1,4-naftoquinona). Este composto pertence à família de plantas *Juglandaceae*, é um metabólito secundário da noz preta que apresenta efeito herbicida (SALUNKE-GAWALI et al., 2017), capaz de gerar ânion radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) no ciclo redox intracelular (DE CASTRO et al., 2004; WANG & WINK, 2016). As polpas de *D. alata* e *P. guineense* foram eficazes na proteção durante os últimos períodos de avaliação. De maneira surpreendente, a polpa de *A. crassiflora* apresentou valores significativos na concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$, em todos os períodos avaliados, embora tenha apresentado IC_{50} superior ao extrato de *P. guineense*.

Nossos resultados demonstraram que as polpas avaliadas apresentaram atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo*. Em resposta aos efeitos nocivos causados pelas espécies reativas, o mecanismo de defesa celular na qual o sistema antioxidante, incluindo compostos exógenos como vitaminas, carotenoides e flavonoides, e enzimas antioxidantes endógenas como SOD, CAT e GPX, é iniciado, protegendo ou reparando macromoléculas alvos desta ação nas células (POPRAC et al., 2017). Em *C. elegans* esta resposta celular também modifica e melhora a expressão de fatores de transcrição e outras moléculas como proteínas de choque térmico. Esta ação garante uma vida útil normal para os nematoides até o momento em que o estresse gerado pelas espécies reativas ultrapasse essa proteção adaptativa do sistema biológico, o que a torna limitada e explica a toxicidade aguda causada por compostos xenobióticos, como o juglone, e consequentemente a morte precoce dos nematoides (HARTWIG et al., 2009).

Estudos sugerem que o aumento da capacidade de resistência a diferentes tipos de estresse pode estar associado ao aumento da longevidade (VAN RAAMSDONK, 2017). Nesta perspectiva, os animais foram tratados diariamente com as polpas até que todos estivessem mortos. De forma inusitada a polpa de *D. alata* foi capaz de promover o aumento da expectativa de vida dos animais em cerca de 15,38 % em relação ao controle. Pode-se postular que o efeito da polpa de *D. alata* sobre a longevidade dos nematoides esteja associado à sua capacidade antioxidante exógena, evidenciada nos resultados obtidos nos ensaios *in vitro* de captura de radicais livres DPPH e ABTS. Os resultados observados também podem estar relacionados a modulação de genes associados ao processo de longevidade, como DAF-16 e SKN-1, homólogos aos genes humanos FOXO e NFR-2 respectivamente (BLACKWELL et al., 2015).

De fato, as polpas de *A. crassiflora* e *P. guineense* também contêm quantidades significantes de compostos antioxidantes e potencial captura de radicais livres, mas não demonstraram efeitos sobre a longevidade. Resultado semelhante pode ser observado no estudo de Grünz et al. (2011), onde foram avaliados quatro flavonoides, a miricetina, quercetina, kaempferol e naringenina sobre o tempo de vida em *C. elegans*. Em animais selvagens todos os flavonoides foram capazes de aumentar a longevidade, porém quando testados em mutantes *mev-1*, cepas sensíveis ao estresse oxidativo, apenas a mirecitina obteve o aumento da longevidade, sugerindo que apenas a propriedade antioxidante não é suficiente para a extensão do tempo de vida.

Outros estudos têm apontado uma forte relação entre longevidade e reprodução (PALMISANO; MELENDEZ, 2018) e que determinados alimentos ampliam o tempo de vida útil levando a um aceleração da reprodução (ALLEN et al., 2015), o que pode ser descartado nestes resultados, tendo em vista que a capacidade reprodutora dos animais tratados com os extratos das polpas não sofreu alterações.

O envelhecimento é um fenômeno caracterizado pelo declínio progressivo do sistema celular, e torna-se um fator de risco para o desenvolvimento de diferentes doenças crônicas como diabetes, obesidade, câncer, miopatias e distúrbios neurodegenerativos, (BEKTAS et al., 2017; CHATTOPADHYAY; THIRUMURUGAN, 2018). Estas doenças também estão associadas ao aumento do estresse oxidativo, sendo possível que um envelhecimento saudável e a própria longevidade estejam vinculadas a resistência contra o estresse oxidativo (SILVA-PALACIOS et al., 2018).

A doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurodegenerativas que acarreta em danos oxidativos ao cérebro (CHEIGNON et al., 2017), devido ao aumento na produção de espécies reativas de oxigênio geradas pela oligomerização do peptídeo β -amiloide, presente em pacientes portadores de DA (TRAMUTOLA et al., 2017). Dessa maneira, foi utilizada uma cepa transgênica, CL2006, que expressa constitutivamente o peptídeo β A nos músculos. Corroborando com o ensaio de resistência ao estresse oxidativo e térmico, a polpa de *A. crassiflora* retardou a paralisia dos animais tratados após 28 horas à 25° C, indicando ação protetora contra a toxicidade induzida pelo peptídeo β A. Os dados indicam que a polpa de *A. crassiflora* pode induzir a ativação de chaperonas, proteínas que desempenham um importante papel na homeostase proteica, auxiliando no enovelamento correto e direcionamento de proteínas enoveladas incorretamente para serem degradadas pelo sistema proteassoma-ubiquitina (COHEN-KAPLAN et al., 2016; VOTH; JAKOB, 2017) promovendo assim a degradação do peptídeo β A.

5. Conclusões

Os resultados observados neste estudo indicam que os frutos de *Annona crassiflora*, *Dipteryx alata* e *Psidium guineense* possuem diferentes compostos bioativos com atividade antioxidante promissora, confirmadas tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Em adição, é mostrado pela primeira vez que a polpa de *D. alata* foi capaz de aumentar a expectativa de vida dos nematoides e, a polpa de *A. crassiflora* de atenuar a toxicidade causada pelo peptídeo β -amiloide em uma cepa que mimetiza a Doença de Alzheimer. Assim, os resultados obtidos até o presente momento podem contribuir para o desenvolvimento de alimentos funcionais, nutracêuticos e aplicação na produção de fitoterápicos a partir destes três frutos.

Conflitos de Interesse

Os autores declaram que não têm interesses em conflito.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT), o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Edson Lucas dos Santos é receptor de bolsa do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brasil.

Referências

- AGUIAR, J., ESTEVINHO, B. N., & SANTOS, L. Microencapsulation of natural antioxidants for food application—The specific case of coffee antioxidants—A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 58, p. 21-39, 2016.
- ALLEN, E. N., REN, J., ZHANG, Y., & ALCEDO, J. Sensory systems: their impact on *C. elegans* survival. **Neuroscience**, v. 296, p. 15-25, 2015.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official methods of analysis of AOAC international. 16th ed. Gaithersburg: **AOAC International**, 1141p, 1996.
- BEKTAS, A., SCHURMAN, S. H., SEN, R., & FERRUCCI, L. Aging, inflammation and the environment. **Experimental gerontology**, 2017.
- BENASSI, M.T.; ANTUNES, A. J. A comparison of metaphosphoric and oxalic acids as extractants solutions for the determination of vitamin C in selected vegetables. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v.31, n. 4, p. 507-513, 1998.
- BLACKWELL, T. K., STEINBAUGH, M. J., HOURIHAN, J. M., EWALD, C. Y., & ISIK, M. SKN-1/Nrf, stress responses, and aging in *Caenorhabditis elegans*. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 88, p. 290-301, 2015.
- BONAMIGO, T., CAMPOS, J. F., ALFREDO, T. M., BALESTIERI, J. B. P., CARDOSO, C. A. L., PAREDES-GAMERO, E. J., SOUZA, K. P. & DOS SANTOS, E. L. Antioxidant, Cytotoxic, and Toxic Activities of Propolis from Two Native Bees in Brazil: *Scaptotrigona depilis* and *Melipona quadrifasciata anthidioides*. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, 2017.
- BOYD, W. A., SMITH, M. V., KISSLING, G. E., & FREEDMAN, J. H. Medium-and high-throughput screening of neurotoxicants using *C. elegans*. **Neurotoxicology and teratology**, v. 32, n. 1, p. 68-73, 2010.
- BRENNER, S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. **Genetics**, v. 77, n. 1, p. 71-94, 1974.
- CHANG, S. K., ALASALVAR, C., & SHAHIDI, F. Review of dried fruits: Phytochemicals, antioxidant efficacies, and health benefits. **Journal of Functional Foods**, v. 21, p. 113-132, 2016.
- CHATTOPADHYAY, D., & THIRUMURUGAN, K. Longevity promoting efficacies of different plant extracts in lower model organisms. **Mechanisms of ageing and development**, 2018.
- CHEIGNON, C., TOMAS, M., BONNEFONT-ROUSSELOT, D., FALLER, P., HUREAU, C., & COLLIN, F. Oxidative stress and the amyloid beta peptide in Alzheimer's disease. **Redox biology**, 2017.
- CHEN, Z. & ZHONG, C. Oxidative stress in Alzheimer's disease. **Neuroscience bulletin**, v. 30, n. 2, p. 271-281, 2014.

COHEN-KAPLAN, V., LIVNEH, I., AVNI, N., COHEN-ROSENZWEIG, C., & CIECHANOVER, A. The ubiquitin-proteasome system and autophagy: coordinated and independent activities. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 79, p. 403-418, 2016.

COSTA, C., TSATSAKIS, A., MAMOULAKIS, C., TEODORO, M., BRIGUGLIO, G., CARUSO, E., TSOUKALAS, D., MARGINA, D., DARDIOTIS, E., KOURETAS, D., & FENGA, C. Current evidence on the effect of dietary polyphenols intake on chronic diseases. **Food and Chemical Toxicology**, 2017.

CUNNIFF, P.; ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS. Official methods of analysis of AOAC international. **Association of Official Analytical Chemists**, p. 1141, 16. ed., Gaithersburg, Maryland, 1996.

DAMIANI, C. Caracterização e agregação de valor aos frutos do cerrado: Araçá (*Psidium guineensis* Sw.) e Marolo (*Annona Crassiflora* Mart.). Tese. 2009.

DAMIANI, C., BOAS, E. V. B. V., ASQUIERI, E. R., LAGE, M. E., OLIVEIRA, R. A., SILVA, F. A., PINTO, D. M., RODRIGUES, L. J., SILVA, E. P. & PAULA, N. R. F. Characterization of fruits from the savanna: Araçá (*Psidium guineensis* Sw.) and Marolo (*Annona crassiflora* Mart.). **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 31, n. 3, p. 723-729, 2011.

DE CASTRO, E., DE CASTRO, S. H., & JOHNSON, T. E. Isolation of long-lived mutants in *Caenorhabditis elegans* using selection for resistance to juglone. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 37, n. 2, p. 139-145, 2004.

DEMBITSKY, V. M., POOVARODOM, S., LEONTOWICZ, H., LEONTOWICZ, M., VEARASILP, S., TRAKHTENBERG, S., & GORINSTEIN, S. The multiple nutrition properties of some exotic fruits: Biological activity and active metabolites. **Food Research International**, v. 44, n. 7, p. 1671-1701, 2011.

DEUS, M.J. **Guia de campo: vegetação do Cerrado 500**. Brasília: MMA/SBF, 532p., 2011.

DUTRA, R. C., CAMPOS, M. M., SANTOS, A. R., & CALIXTO, J. B. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological research**, v. 112, p. 4-29, 2016.

FERNANDO, R., DRESCHER, C., NOWOTNY, K., GRUNE, T., & CASTRO, J. P. Impaired proteostasis during skeletal muscle aging. **Free Radical Biology and Medicine**, 2018.

GAO, A. W., UIT DE BOS, J., STERKEN, M. G., KAMMENGA, J. E., SMITH, R. L., & HOUTKOOPE, R. H. Forward and reverse genetics approaches to uncover metabolic aging pathways in *Caenorhabditis elegans*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, 2017.

GARCÍA-GONZÁLEZ, A. P., & WALHOUT, A. J. Worms, Bugs and Drugs: *C. elegans* as a Model for Host-Microbe-Drug Interactions. **Current Opinion in Systems Biology**, 2017.

GRÜNZ, G., HAAS, K., SOUKUP, S., KLINGENSPOR, M., KULLING, S. E., DANIEL, H., & SPANIER, B. Structural features and bioavailability of four flavonoids and their implications for lifespan-extending and antioxidant actions in *C. elegans*. **Mechanisms of ageing and development**, v. 133, n. 1, p. 1-10, 2012.

GUPTA, D., & GUPTA, R. K. Bioprotective properties of Dragon's blood resin: in vitro evaluation of antioxidant activity and antimicrobial activity. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 11, n. 1, p. 13, 2011.

HARTWIG, K., HEIDLER, T., MOCH, J., DANIEL, H., & WENZEL, U. Feeding a ROS-generator to *Caenorhabditis elegans* leads to increased expression of small heat shock protein HSP-16.2 and hormesis. **Genes & nutrition**, v. 4, n. 1, p. 59-67, 2009.

HU, B., LIU, X., ZHANG, C., & ZENG, X. Food macromolecule based nanodelivery systems for enhancing the bioavailability of polyphenols. **Journal of food and drug analysis**, 2016.

IGHODARO, O. M., & AKINLOYE, O. A. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. **Alexandria Journal of Medicine**, 2017.

KRISHNAIAH, D., SARBATLY, R., & NITHYANANDAM, R. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. **Food and bioproducts processing**, v. 89, n. 3, p. 217-233, 2011.

KULCZYŃSKI, B., GRAMZA-MICHAŁOWSKA, A., KOBUS-CISOWSKA, J., & KMIECIK, D. The role of carotenoids in the prevention and treatment of cardiovascular disease—Current state of knowledge. **Journal of Functional Foods**, v. 38, p. 45-65, 2017.

LI, Y., & SCHELLHORN, H. E. New developments and novel therapeutic perspectives for vitamin C. **The Journal of nutrition**, v. 137, n. 10, p. 2171-2184, 2007.

LIBERIO, S. A., PEREIRA, A. L. A., DUTRA, R. P., REIS, A. S., ARAÚJO, M. J. A. M., MATTAR, N. S., SILVA, L. A., RIBEIRO, M. N. S., NASCIMENTO, F. R. F., GUERRA, R. M. N. & MONTEIRO-NETO, V. Antimicrobial activity against oral pathogens and immunomodulatory effects and toxicity of geopropolis produced by the stingless bee *Melipona fasciculata* Smith. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 11, n. 1, p. 108, 2011.

LIU, L., SHAO, Z., ZHANG, M., & WANG, Q. Regulation of carotenoid metabolism in tomato. **Molecular plant**, v. 8, n. 1, p. 28-39, 2015.

LOSADA-BARREIRO, S., & BRAVO-DÍAZ, C. Free radicals and polyphenols: The redox chemistry of neurodegenerative diseases. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 2017.

MATIAS, I., BUOSI, A. S., & GOMES, F. C. A. Functions of flavonoids in the central nervous system: Astrocytes as targets for natural compounds. **Neurochemistry international**, v. 95, p. 85-91, 2016.

MEDA, A., LAMIEN, C. E., ROMITO, M., MILLOGO, J., & NACOUJMA, O. G. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. **Food chemistry**, v. 91, n. 3, p. 571-577, 2005.

MYERS, N., MITTERMEIER, R. A., MITTERMEIER, C. G., DA FONSECA, G. A., & KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, n. 6772, p. 853, 2000.

NAGATA, M.; YAMASHITA, I. Simple method for simultaneous determination of chlorophyll and carotenoids in tomato fruit. Nippon. **Shokuhin Kogyo Gakkaisk**, v.39, n.10, p.925-928, 1992.

NELSON, A. R., SWEENEY, M. D., SAGARE, A. P., & ZLOKOVIC, B. V. Neurovascular dysfunction and neurodegeneration in dementia and Alzheimer's disease. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, v. 1862, n. 5, p. 887-900, 2016.

NERI-NUMA, I. A., SANCHO, R. A. S., PEREIRA, A. P. A., & PASTORE, G. M. Small Brazilian wild fruits: Nutrients, bioactive compounds, health-promotion properties and commercial interest. **Food Research International**, 2017.

OLIVEIRA, V. B., YAMADA, L. T., FAGG, C. W., & BRANDÃO, M. G. L. Native foods from Brazilian biodiversity as a source of bioactive compounds. **Food Research International**, v. 48, n. 1, p. 170-179, 2012.

OMAR, S. H., SCOTT, C. J., HAMLIN, A. S., & OBIED, H. K. The protective role of plant biophenols in mechanisms of Alzheimer's disease. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, 2017.

OROIAN, M., & ESCRICHE, I. Antioxidants: characterization, natural sources, extraction and analysis. **Food Research International**, v. 74, p. 10-36, 2015.

PALMISANO, N. J., & MELÉNDEZ, A. Autophagy in *C. elegans* development. **Developmental biology**, 2018.

PETERSON, R. T., NASS, R., BOYD, W. A., FREEDMAN, J. H., DONG, K., & NARAHASHI, T. Use of non-mammalian alternative models for neurotoxicological study. **Neurotoxicology**, v. 29, n. 3, p. 546-555, 2008.

POPRAC, P., JOMOVA, K., SIMUNKOVA, M., KOLLAR, V., RHODES, C. J., & VALKO, M. Targeting Free Radicals in Oxidative Stress-Related Human Diseases. **Trends in Pharmacological Sciences**, 2017.

PRIOR, R. L., WU, X., & SCHAICH, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 53, n. 10, p. 4290-4302, 2005.

QUERFURTH, H. W. & LAFERLA, F. M. Alzheimer's Disease REPLY. **New England Journal of Medicine**, v. 362, n. 19, p. 1844-1845, 2010.

RATTER, J. A., RIBEIRO, J. F., & BRIDGEWATER, S. The Brazilian cerrado vegetation and threats to its biodiversity. **Annals of botany**, v. 80, n. 3, p. 223-230, 1997.

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 and medicine**, v. 26, n. 9, p. 1231-1237, 1999.

RIBEIRO, J. F., & WALTER, B. M. T. As principais fitofisionomias do bioma cerrado in: Sano, SM; Almeida, SP; Ribeiro, JF Cerrado: Ecologia e flora. **Brasília: Embrapa Informação Tecnológica**, 2008.

RODRIGO, R., MIRANDA, A., & VERGARA, L. Modulation of endogenous antioxidant system by wine polyphenols in human disease. **Clinica Chimica Acta**, v. 412, n. 5, p. 410-424, 2011.

RODRIGUEZ, M., SNOEK, L. B., DE BONO, M., & KAMMENGA, J. E. Worms under stress: *C. elegans* stress response and its relevance to complex human disease and aging. **Trends in Genetics**, v. 29, n. 6, p. 367-374, 2013.

ROOHBAKHSH, A., KARIMI, G., & IRANSHAHI, M. Carotenoids in the treatment of diabetes mellitus and its complications: A mechanistic review. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 91, p. 31-42, 2017.

SAINI, R. K., NILE, S. H., & PARK, S. W. Carotenoids from fruits and vegetables: chemistry, analysis, occurrence, bioavailability and biological activities. **Food Research International**, v. 76, p. 735-750, 2015.

SALUNKE-GAWALI, S., PEREIRA, E., DAR, U. A., & BHAND, S. Metal complexes of hydroxynaphthoquinones: Lawsone, bis-lawsone, lapachol, plumbagin and juglone. **Journal of Molecular Structure**, v. 1148, p. 435-458, 2017.

SHAHIDI, F., & ZHONG, Y. Measurement of antioxidant activity. **Journal of functional foods**, v. 18, p. 757-781, 2015.

SILVA-PALACIOS, A., OSTOLGA-CHAVARRÍA, M., ZAZUETA, C., & KÖNIGSBERG, M. Nrf2: Molecular and epigenetic regulation during aging. **Ageing research reviews**, v. 47, p. 31-40, 2018.

SIN, O., MICHELS, H., & NOLLEN, E. A. Genetic screens in *Caenorhabditis elegans* models for neurodegenerative diseases. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, v. 1842, n. 10, p. 1951-1959, 2014.

TIRLONI, C. A. S., MACORINI, L. F. B., SANTOS, U. P., ROCHA, P. S., BARROS, S. V., MELLO, A. M. M. F., VIEIRA, M. C., DE PICOLI, S., & SANTOS, E. L. Evaluation of the antioxidant activity, antimicrobial effect and acute toxicity from leaves of *Allophylus edulis* (A. St.-Hil., A. Juss. Cambess) Hieron. ex Niederl. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 9, n. 11, p. 353-362, 2015.

TRAMUTOLA, A., LANZILLOTTA, C., PERLUIGI, M., & BUTTERFIELD, D. A. Oxidative stress, protein modification and Alzheimer disease. **Brain research bulletin**, v. 133, p. 88-96, 2017.

UNLU, A., KIRCA, O., OZDOGAN, M., & NAYIR, E. High-dose vitamin C and cancer. **Journal of Oncological Science**, v. 1, p. 10-12, 2016.

VAN RAAMSDONK, J. M. Mechanisms underlying longevity: A genetic switch model of aging. **Experimental gerontology**, 2017.

VASCONCELOS FILHO, F. S. L., DA ROCHA-E-SILVA, R. C., PEIXOTO, D. S., DA COSTA, V. V., SOARES, P. M., & EVANGELISTA, J. S. A. M. Memory deficit in rats submitted to induction Alzheimer's disease in infusion of intracerebral β -amiloide₁₋₄₂. **Ciência Animal**, p. 23-26. Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária, 2015.

VOTH, W., & JAKOB, U. Stress-activated chaperones: a first line of defense. **Trends in biochemical sciences**, 2017.

WANG, E., & WINK, M. Chlorophyll enhances oxidative stress tolerance in *Caenorhabditis elegans* and extends its lifespan. **PeerJ**, v. 4, p. e1879, 2016.

ZEVIAN, S. C., & YANOWITZ, J. L. Methodological considerations for heat shock of the nematode *Caenorhabditis elegans*. **Methods**, v. 68, n. 3, p. 450-457, 2014.

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

ZHOU, K. I., PINCUS, Z., & SLACK, F. J. Longevity and stress in *Caenorhabditis elegans*. **Aging (Albany NY)**, v. 3, n. 8, p. 733, 2011.