

Universidade Federal da Grande Dourados – UFGD  
Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais – FCBA  
Curso de Biotecnologia

Wellington Henrique Botelho

**Efeito antioxidante *in vitro* e *in vivo* do extrato aquoso da casca do caule de *Tapirira guianensis***

Dourados – MS

2021

Wellington Henrique Botelho

**Efeito antioxidante *in vitro* e *in vivo* do extrato aquoso da casca do caule de *Tapirira guianensis***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Biotecnologia da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais (FCBA) da Universidade Federal da Grande Dourados – UFGD como pré-requisito para a obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Kely de Picoli Souza

Coorientador: Daniel Ferreira Leite

Dourados-MS

2021

**Wellington Henrique Botelho**

**Efeito antioxidante *in vitro* e *in vivo* do extrato aquoso da casca do caule de *Tapirira guianensis***

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado pela Banca Examinadora como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia, da Universidade Federal da Grande Dourados.

Orientadora: Prof. Dr<sup>a</sup> Kely de Picoli Sousa

Aprovado em: 26 de Novembro de 2021

**BANCA EXAMINADORA**



---

Dr<sup>a</sup> Kely de Picoli souza  
Presidente



---

Edson Lucas Dos Santos  
Membro



---

Ms Alex Santos Oliveira  
Membro



---

Dr<sup>a</sup> Tamaeh Monteiro Alfredo  
Membro

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

B748e Botelho, Wellington Henrique

Efeito antioxidante in vitro e in vivo do extrato aquoso da casca do caule de *Tapirira guianensis* [recurso eletrônico] / Wellington Henrique Botelho. -- 2021.

Arquivo em formato pdf.

Orientadora: Dr<sup>a</sup> Kely de Picoli Souza.

Coorientador: Daniel Ferreira Leite.

TCC (Graduação em Biotecnologia)-Universidade Federal da Grande Dourados, 2021.

Disponível no Repositório Institucional da UFGD em:

<https://portal.ufgd.edu.br/setor/biblioteca/repositorio>

1. DNA. 2. Proteína. 3. *C. elegans*. 4. Estresse oxidativo. 5. Toxicidade. I. Souza, Dr<sup>a</sup> Kely De Picoli. II. Leite, Daniel Ferreira. III. 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.

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha mãe Aparecida Rossini Botelho, ao meu pai Sebastião Benedito Botelho, por sempre me apoiarem e estarem ao meu lado.

Dedico também à professora Dr<sup>a</sup> Kely de Picoli Souza e ao professor Dr. Edson Lucas dos Santos, por todas as oportunidades proporcionadas.

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus, por toda força e proteção para que eu pudesse chegar até aqui.

Agradeço a minha orientadora professora Dr<sup>a</sup>. Kely de Picoli Souza, pela orientação maravilhosa, dedicação, carinho e confiança.

Agradeço também aos meus pais, Sebastião Benedito Botelho e Aparecida Rossini Botelho, por estarem ao meu lado em todos os momentos.

Agradeço a Dr<sup>a</sup> Debora da Silva Baldívia, pelo tempo dentro do laboratório, pela paciência e pelo aprendizado que me proporcionou.

Agradeço também aos meus amigos David Castro, Isamara Carvalho, Helder Freitas, Alex Castro, Kamila Arteman e a todos os membros do GEBBAM por sempre estarem presentes nesta caminhada.

Agradeço ao meu amigo e coorientador Daniel Ferreira Leite, por estar presente do início ao fim desta caminhada, por todo conhecimento que compartilhou comigo e por toda paciência e dedicação.

Agradeço ao professor Dr. Edson Lucas dos Santos, por me proporcionar a oportunidade de fazer parte do grupo GEBBAM, pelo apoio acadêmico, pessoal e profissional.

Por fim, agradeço à UFGD e aos órgãos de fomento, CNPq, CAPES, FINEP e FUNDECT pelo apoio financeiro.

“Creio firmemente em uma lei de compensação.

As verdadeiras recompensas são sempre  
proporcionais ao esforço e aos sacrifícios feitos”

**Nikola Tesla**

## Resumo

*Tapirira guianensis* é uma árvore de porte médio encontrada em toda a América Latina. Na medicina popular, é utilizada para tratar problemas como inflamações, feridas e doenças sexualmente transmissíveis como a sífilis, contudo, existem poucos registros na literatura sobre seus efeitos biológicos. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a composição química, a toxicidade descrita popularmente e a atividade antioxidante, *in vitro* e *in vivo*, da casca do caule de *T. guianensis*. Para isso, foi preparado o extrato aquoso da casca do caule de *T. guianensis* (EATg) utilizando 100 g de pó da casca em 1 litro de água por infusão. A quantificação dos compostos fenólicos foi realizada utilizando curva padrão de ácido gálico pelo método de Folin-Ciocalteu, e a quantificação de flavonoides foi realizada uma curva padrão de quercetina e avaliados pelo método de Cloreto de alumínio. A atividade antioxidante *in vitro* foi avaliada pelos ensaios de captura dos radicais livres 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH<sup>+</sup>); ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS) e proteção contra a degradação da proteína (BSA) induzida pelo agente oxidante 2,2'-Azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH); e proteção da degradação de DNA plasmidial de bactéria exposto ao peróxido de hidrogênio e luz ultravioleta. A toxicidade do EATg foi avaliada em nematoides *Canorhabditis elegans*, e a proteção ao estresse oxidativo *in vivo* foi avaliada através da indução ao estresse oxidativo pelo agente oxidante Juglone. A análise da composição química de EATg apresentou  $122.41 \pm 3.45$  EAG/g de compostos fenólicos e níveis não quantificáveis de flavonoides. A análise do potencial antioxidante revelou IC<sub>50</sub> de  $2,80 \pm 1,20$  µg/mL, com a inibição máxima de  $88,14\% \pm 1,47$  na concentração de 10 µg/mL para captura de radical DPPH<sup>+</sup> e IC<sub>50</sub> foi de  $5,41 \pm 0,07$  µg/mL, com a inibição máxima de  $99,64\% \pm 0,09$  na concentração de 25 µg/mL para a captura do radical ABTS<sup>+</sup>. O efeito protetor contra o estresse oxidativo induzido em BSA ocorreu em todas as concentrações (5 a 250 µg/mL), e a proteção contra a fragmentação de DNA ocorreu desde a concentração de 25 até 250 µg/mL. Os dados obtidos no ensaio de toxicidade comprovaram o uso seguro do extrato nas concentrações abaixo de 200 µg/mL, sendo que nestas concentrações o EATg também protegeu o nematoide contra o estresse oxidativo induzido pelo Juglone. Nossos dados revelaram que o EATg possui compostos fenólicos em sua composição química e apresenta efeito *antioxidante in vitro*, na captura de radicais livres e na proteção contra estresse oxidativo induzido em macromoléculas, e, *in vivo*, protegendo nematoides *C. elegans* contra o estresse oxidativo induzido por Juglone. Estes resultados abrem perspectivas para novos ensaios baseados na caracterização química e avaliação do potencial antioxidante do EATg.

**Palavras-chave:** DNA, Proteína, *C. elegans*, Estresse oxidativo, Toxicidade.



## Abstract

*Tapirira guianensis* is a medium-sized tree found throughout Latin America. In folk medicine, it is used to treat problems such as inflammation, wounds, and sexually transmitted diseases such as syphilis, however, there are few records in the literature about its biological effects. In this context, the aim of this study was to evaluate the chemical composition, the toxicity described popularly and the antioxidant activity, *in vitro* and *in vivo*, of the stem bark of *T. guianensis*. For this, an aqueous extract of the bark of *T. guianensis* stem (EATg) was prepared using 100g of bark powder in 1 liter of water per infusion. The quantification of phenolic compounds was performed using a standard curve of gallic acid by the Folin-Ciocalteu method, and the quantification of flavonoids was performed using a standard curve of quercetin, evaluated by the method of aluminum chloride. The *in vitro* antioxidant activity was evaluated by free radical scavenging assays 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH<sup>•+</sup>); 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) and protection against protein degradation (BSA) induced by the oxidizing agent 2,2'-Azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH); and the protection from plasmid DNA degradation of bacteria exposed to hydrogen peroxide and ultraviolet light. The toxicity of EATg was evaluated in nematodes *Canorhabditis elegans*, and protection from oxidative stress *in vivo* was evaluated through the induction of oxidative stress by the oxidizing agent Juglone. The chemical composition analysis of EATg showed  $122.41 \pm 3.45$  EAG/g of phenolic compounds and non-quantifiable levels of flavonoids. Antioxidant potential analysis revealed an IC<sub>50</sub> of  $2.80 \pm 1.20$  µg/mL, with a maximum inhibition of  $88.14\% \pm 1.47$  at a concentration of 10 µg/mL for DPPH<sup>•+</sup> radical capture and an IC<sub>50</sub> of  $5.41 \pm 0.07$  µg/mL, with a maximum inhibition of  $99.64\% \pm 0.09$  at a concentration of 25 µg/mL for ABTS<sup>•+</sup> radical capture. The protective effect against BSA-induced oxidative stress occurred at all concentrations (5 a 250 µg/mL), and protection against DNA fragmentation occurred from a concentration of 25 to 250 µg/mL. The data obtained in the toxicity test proved the safe use of the extract at concentrations below 200 µg/mL, at these concentrations the EATg also protected the nematode against the oxidative stress induced by Juglone. Our data revealed that EATg has phenolic compounds in its chemical composition, in addition to presenting an antioxidant effect *in vitro* in the capture of free radicals, and in protection against oxidative stress induced in macromolecules, and *in vivo*, it presented low acute toxicity and protection against Juglone-induced oxidative stress effect in *C. elegans* nematodes. These results open perspectives for new tests based on chemical characterization and evaluation of the antioxidant potential of EATg.

**Keywords:** DNA, Protein, *C. elegans*, oxidative stress, toxicity

## Lista de tabela

- <b>Tabela 1.</b> Atividade antioxidante do EATg na captura direta de radicais livres DPPH <sup>•</sup> e ABTS <sup>•</sup> .....	22
--	----

## Lista de figuras

- **Figura 1.** Efeito do EATg sobre a oxidação de proteína induzida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% e luz UV: (A) gel e (B) gráfico.....23
  
- **Figura 2.** Efeito do EATg sobre a fragmentação de DNA plasmidial induzida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% e luz UV: (A) gráfico e (B) gel.....25
  
- **Figura 3.** Toxicidade do EATg em *C. elegans*. (A) 24 h e (B) 48 h.....27
  
- **Figura 4.** Efeito do EATg sobre o estresse oxidativo induzido por juglone em *C. elegans* por 24h (A) e 48 h (B).....28

## Lista de Abreviaturas

AA= Ácido ascórbico

ABTS= ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico

BHA= butil-hidroxi-anisol

BHT= butil-hidroxi-tolueno

DDMS= Dourados Mato grosso do Sul

DL<sub>50</sub> = Dose Letal

DPPH= 2,2-difenil-1-picrilhidrazil

EATg= Extrato Aquoso de *Tapirira guianensis*

EROs= espécies reativas de oxigênio

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> = Peróxido de Hidrogênio

ICMBio= Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade

NGM= Meio de crescimento de Nematóides (*Nematode Growth Medium*)

ROOH = Hidroperóxidos orgânicos

RNS espécies reativas de Nitrogênio

SISBIO= Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade

TBHQ= terc-butil-hidroquinona

## Sumário

1	Introdução .....	12
1.	Revisão bibliográfica.....	13
1.1.	Espécies reativas e estresse oxidativo .....	13
1.2.	Substâncias antioxidantes .....	14
1.3.	Plantas medicinais .....	15
1.4.	<i>Tapirira guianensis</i> .....	16
1.5.	O modelo <i>Caenorhabditis elegans</i> .....	17
2.	Objetivos.....	18
2.1.	Objetivo geral .....	18
2.2.	Objetivos específicos: .....	18
3.	Material e métodos .....	19
3.1.	Obtenção do material vegetal .....	19
3.2.	Quantificação de compostos fenólicos e flavonoides.....	19
3.3.	Atividade antioxidante <i>in vitro</i> .....	20
3.3.1.	Sequestro de radical livre de 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH <sup>•+</sup> ).....	20
3.3.2.	Descoloração do ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolína-6-sulfônico (ABTS <sup>•+</sup> ).....	20
3.3.3.	Oxidação em proteína BSA.....	21
3.3.4.	Fragmentação de DNA .....	21
3.4.	Ensaio <i>In vivo</i> .....	22
3.4.1.	Cepa e manutenção de <i>Caenorhabditis elegans</i> .....	22
3.4.2.	Toxicidade.....	22
3.4.3.	Resistência ao estresse oxidativo .....	23
3.5.	Análise Estatística.....	23
4.	Resultados.....	24
4.1.	Caracterização química .....	24
4.2.	Atividade antioxidante <i>in vitro</i> .....	24
4.3.	Avaliação <i>in vivo</i> .....	27
4.3.1.	toxicidade.....	27
4.3.2.	Proteção contra estresse oxidativo .....	28
5.	Discussão .....	30
6.	Conclusão.....	32
7.	Referências.....	34

## 1 Introdução

O Brasil é o país que possui a maior biodiversidade vegetal do mundo, com cerca de 20% do total global (Leite et al., 2020). O bioma cerrado, também conhecido como savana brasileira, abriga aproximadamente 10.000 destas espécies vegetais. Nos últimos anos, a busca pela melhoria da qualidade de vida tem estimulado o consumo de produtos de origem natural, saudáveis e que apresentam benefícios ao nosso organismo. Esta mudança tem feito com que a biodiversidade brasileira se torne foco em diversos estudos com o objetivo de identificar espécies vegetais com propriedades nutracêuticas e farmacológicas (Leite et al., 2020; Baldivia et al., 2018). Estas propriedades têm sido atribuídas aos compostos fotoquímicos presentes nestes vegetais, como os produtos do metabolismo secundário, representados pelos compostos fenólicos, terpenos e alcaloides, que são produzidos para diversos fins nas plantas, como defesa a agentes químicos e físicos, bem como para atração de polinizadores (Hotwani, Baliga e Sharma, 2014). Dentre muitas funções, vários estudos têm demonstrado a capacidade desses metabólitos secundários de proteger macromoléculas, tais como células pancreáticas, e neurais contra danos oxidativos (Pereira et. Al., 2012).

O estresse oxidativo é causado pelo excesso de produção, ou da incapacidade do organismo em eliminar com eficiência as espécies reativas, especialmente de oxigênio (EROs) (Núñez-Musa et al., 2019). O aumento dessas espécies pode ocorrer por diversos fatores internos e externos, como estresse, má-alimentação, exposição a radiação solar, inflamações e incapacidade metabólica de eliminação de EROs . Uma vez em excesso, estas substâncias causam danos ao organismo alterando componentes celulares como DNA, proteínas e lipídios (Cruzat, Gupta e Tyagei, 2017).

Este processo de oxidações biológica ou eliminação de EROs é conhecido como um dos principais desencadeadores ou agravantes para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares e neurodegenerativas, câncer, diabetes, Parkinson além da do envelhecimento precoce (Engers et al., 2011). Embora o organismo possua várias ferramentas para neutralizar as EROs e combater o dano celular causado pelo estresse oxidativo formando um sistema de defesa antioxidante que em condições fisiológicas garantem um equilíbrio entre a produção e neutralização de EROs há

situações que ele não é suficiente e pode ser auxiliado pela ingestão de produtos naturais com propriedades antioxidantes (Cotinguiba et al.,2013).

Uma espécie vegetal de uso popular no Mato Grosso do Sul com potencial descrito pelo uso popular para auxiliar no combate do estresse oxidativo e que possui poucos relatos na literatura é a *Tapirira guianensis*, conhecida popularmente como pau-pombo, fruta-do-pombo, peito-de-pombo ou pombeiro, pertence a família *Anacardiaceae*. Suas folhas e cascas são utilizadas para produção de remédios naturais contra ulcerações e no tratamento de doenças como lepra e sífilis (Correia, David e David, 2008). Estudos científicos relacionam estes efeitos com a presença de compostos químicos do metabolismo secundário da planta identificados através de extratos etanolicos (Rodrigues et al., 2017). No entanto, não existem estudos que descrevam os constituintes químicos e as propriedades biológicas do extrato aquoso da casca da *Tapirira guianensis*. Neste sentido, o objetivo deste estudo foi investigar a composição química do extrato aquoso da casca do caule de *T. guianensis* (EATg), avaliar sua toxicidade e atividade antioxidante, *in vitro* e *in vivo*.

## 2 Revisão bibliográfica

### 2.1 Espécies reativas e estresse oxidativo

Em processos fisiológicos nosso organismo produz constantemente substâncias

conhecidas como espécies reativas (ER). Estas moléculas são geradas em processos biológicos relevantes, como a fertilização do óvulo, ativação de genes, participação no mecanismo de defesa durante o processo de infecção (Barbosa et al., 2010) diferenciação celular e apoptose durante o processo natural de envelhecimento e (Jakubczyk et al., 2020), principalmente, para a obtenção de energia na cadeia transportadora de elétrons mitocondrial (Andrieux et al., 2021). Durante essa fosforilação oxidativa, na mitocôndria é consumido em torno de 90% do oxigênio (O<sub>2</sub>) sanguíneo (Barbosa et al., 2010). Que também induz estas ER que podem ser derivadas de nitrogênio (ERN), enxofre (ERS) ou oxigênio (ERO), sendo as EROs são

as mais abundantes e, podem ser divididas em não radicalares e radicalares (Sies e Jones, 2020).

As EROS classificadas como não radicalares incluem peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), hidroperóxidos orgânicos (ROOH), oxigênio molecular singlet ( $^1O_2$ ), hidrocarbonetos eletronicamente excitados ( $R-C=O$ ), ozônio ( $O_3$ ), ácido hipocloroso (HOCl) e ácido hipobromoso (HOBr). Já as EROs classificadas como radicalares incluem ânion radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), radical hidroxila ( $\cdot OH$ ), radical peroxila ( $ROO\cdot$ ) e o radical alcoxil ( $RO\cdot$ ) (Andrieux et al., 2021). Estas substâncias podem se ligar de várias formas em moléculas presentes no organismo, como as macromoléculas: DNA, enzimas, lipídios de membrana, proteínas e, também a outras moléculas pequenas (Lobo et al., 2010).

O excesso de EROs não neutralizadas, conhecido como estresse oxidativo, causa oxidação em macromoléculas e, como consequência, pode levar a perda de suas funções biológicas e ao desequilíbrio homeostático, desencadeando ou agravando quadros de doenças crônicas não transmissíveis (Barbosa et al., 2010) como diabetes, doença de Alzheimer (Ahmad et al., 2017), obesidade (McMurray, Patten e Harper, 2016), transtornos neurodegenerativos (Islam, 2017) e câncer (Prasad et al., 2017). Além disso, podem causar mutações em DNA, aumentando a taxa de envelhecimento, caracterizado por um aumento dos danos genéticos e redução da capacidade de realizar reparos genômicos (SILVA, Ferrari e Bucalen, 2011). tendo algumas substancias capazes de realizar este processo sendo conhecidas como Substancias Antioxidantes

## 2.2 Substâncias antioxidantes

Um antioxidante é qualquer substância sintética ou natural que atrase ou iniba a oxidação promovida por EROs (Gupta, 2015). Uma das formas que os antioxidantes atuam é, por exemplo, quelando os metais Cu e Fe (Filipský ET AL., 2015), suprimindo assim a formação de EROs pela reação de Fenton (Simunkova et al., 2019). Os antioxidantes são capazes de neutralizar as EROs geradas sendo radicalares ou não radicalares, reduzindo sua ação sobre os lipídeos, as proteínas, e o DNA, impedido assim a formação de lesões, perda da integridade e funcionalidade celular. (Bianchi, Maria de Lourdes Pires; Antunes et al., 1999.)



Para neutralizar as EROs o organismo conta com sistemas de proteção antioxidantes, que pode ser endógeno ou exógeno. O sistema endógeno é dividido em enzimático e não enzimático, incluindo no enzimático: a enzima superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), a glutathione peroxidase (GPx) e a tioredoxina redutase (Trx) (He et al., 2017) e, nos não enzimáticos, moléculas que têm a capacidade de rápida neutralização das EROs (Mirończuk-Chodakowska, Witkowska e Zujko, 2018).

Os antioxidantes exógenos naturais são obtidos facilmente por meio de uma alimentação rica em compostos antioxidantes, principalmente de origem vegetal (Bouayed e Bohn, 2010). Estes compostos poder ser representados pelo ácido ascórbico, a vitamina E, compostos fenólicos, carotenoides, dentre outros. Já na classe dos antioxidantes exógenos sintéticos estão o butil-hidroxi-anisol (BHA), butil-hidroxi-tolueno (BHT), terc-butil-hidroquinona (TBHQ) e propil galato (PG) (OLIVEIRA et al., 2009).

### 2.3 Plantas medicinais

As plantas são utilizadas há muito tempo por apresentarem efeitos Fitoterápicos ao corpo humano. Estes compostos estão presentes em vários alimentos desde frutas, vegetais, ervas e chás possuem uma variada composição química, em especial os metabólitos secundários, que podem ser representados por compostos fenólicos, flavonoides, carotenoides, e terpenos, que são reconhecidos na literatura por suas propriedades antioxidantes que reduzem a oxidação no organismo (HEŞ et al., 2019). Em boa parte, estes compostos benéficos para a saúde humana são compostos produzidos pelo metabolismo vegetal secundário (Li et al., 2020). Decorrente do metabolismo primário, no qual são produzidos compostos envolvidos no crescimento e desenvolvimento vegetal, ocorre o metabolismo secundário que produz, a partir de metabólicos primários, substâncias especializadas, divididas em três principais classes: terpenos, compostos fenólicos e alcaloides que desempenham um papel indispensável na proteção contra estresses bióticos e abióticos, dentre outras funções (Vizzotto et al., 2010).

A busca por plantas medicinais ricas em compostos fotoquímicos com características terapêuticas, que podem auxiliar na manutenção e tratamento de

doenças é uma prática de tempos imemoráveis (Hotwani, Baliga e Sharma, 2014). Esta prática ainda é muito presente na atualidade, e pode ser exemplificada por exemplo pelo *Panax Ginseng*, empregado no tratamento de doenças cardiovasculares e diabetes (Silva et al., 2021), *Citrullus colocynthis* para doenças crônicas de respiratórias (Mourão et al., 2021), *Carapa guianensis Aubl* para inflamações (Leal et al., 2019), *Urtica dioica* para infecções (Lopes e Cechinel-Zanchett), *Curcuma longa* para câncer (Feitoza, Terra e Grasselli, 2021), *Mentha piperita* para diarreia e doenças gastrointestinais (Rawat, Singh e Kumar, 2017).

Adicionalmente, podem ser citadas outras plantas medicinais utilizada popularmente para o tratamento de diferentes condições, e que cientificamente têm sido investigadas, como o barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*), descrito por Baldivia e colaboradores (2018), apresentando sua atividade antioxidante e citotóxica contra células de melanoma e ainda, o fedegoso-do-cerrado (*Senna velutina*), descrito por Castro e colaboradores (2019) quanto a composição química, indicando a presença de flavonoides, uma classe dos compostos fenólicos descritos por sua potente capacidade antioxidante (Koch et al., 2014).

A mega biodiversidade brasileira associada aos vários dados que comprovam os benefícios terapêuticos das plantas, incentiva novos estudos para explorar as espécies ainda desconhecidas, ou, pouco conhecidas, como fonte de novas matérias-primas. Neste contexto, encontra-se a *Tapirira guianensis*, popularmente conhecida como pombeiro que, embora já seja utilizada para o tratamento de algumas condições, ainda necessita de estudos científicos sobre seus efeitos biológicos, bem como sua toxicidade.

#### 2.4 *Tapirira guianensis*

A *Tapirira gianensis* é uma árvore de porte médio, encontrada em toda a América Latina, e possui de 8 e 12 m de altura. Produz flores pequenas brancas em cachos, e sementes com forma oval. Seus frutos medem até 1 cm de tamanho, e quando maduros, tornam-se pretos e apresentam uma fina polpa branca de sabor adocicado. São árvores que florescem uma vez ao ano, em dezembro, com a maturação de seus frutos entre março e abril. Popularmente é conhecida como pau-pombo, fruto-do-pombo e pombeiro, sendo muito utilizada na medicina popular contra

inflamações cutâneas e sífilis, apesar de seu elevado grau de toxicidade (Costa et al., 2014).

A *T. guianensis* já foi descrita na literatura por apresentar atividade citotóxica em linhagem celular de câncer oral (Oliveira et al., 2019) e dois de seus compostos já foram isolados, também apresentando atividade citotóxica frente a células de câncer de próstata humano (David et al., 1998). Além disso, quatro compostos extraídos da casca do caule já foram identificados e associados com atividades anti-protozoário e anti-bacteriana (Roumy et al., 2009). Embora estes estudos descrevam a planta com considerável toxicidade, é ainda utilizada pela população para o tratamento de lepra, diarreia e sífilis (David et al., 1998). Desta forma, a *T. guianensis* torna-se um importante candidata a estudos que avaliem suas atividades terapêuticas e sua toxicidade.

#### 2.5 O modelo *Caenorhabditis elegans*

O nematoide *Caenorhabditis elegans* tem sido considerado atualmente uma ferramenta biotecnológica por sua praticidade e eficiência na obtenção de resultados experimentais, como modelo de estudos *in vivo*. O habitat natural deste nematoide é o solo, onde ele se alimenta de fungos, bactérias e frutos em decomposição. Em laboratório, eles são normalmente mantidos em placas de Petri contendo o meio *Nematode Growth Medium* (NGM), onde é semeado uma cobertura *Escherichia coli* (*E. coli*) e que serve de alimentação para os vermes. Suas larvas medem cerca de 0,25 mm e os adultos podem chegar até 1 mm de comprimento. São animais com duas formas sexuais, hermafroditas e machos, que devem ser mantidos na temperatura de  $20 \pm 5$  °C, sendo a temperatura ótima para cultivo e reprodução 20 °C (Park, Jung e Lee, 2017).

O ciclo de vida destes animais é constituído por um estágio embrionário, quatro estágios larvais (L1-L4) e a fase adulta, sendo que o ciclo completo de embrião a adulto ocorre em aproximadamente 48h. Outro atrativo para o uso deste modelo, é a expectativa de vida de 2-3 semanas, podendo variar caso as condições ambientais estejam desfavoráveis ao crescimento, como a ausência de comida, alta densidade populacional ou temperatura fora do intervalo natural de manutenção. Caso isso ocorra, os vermes que estiverem em L1, passarão para o estágio dauer, onde a

alimentação é interrompida indefinidamente e a movimentação reduzida até que as condições do ambiente voltem a ser favoráveis para o desenvolvimento normal dos animais, que, então, sairão do estágio dauer e em cerca de 10h se desenvolverão até o estágio L4 (Wormatlas, 2019).

Uma peculiaridade deste modelo, é a sua capacidade reprodutiva, gerando aproximadamente 300 progênies por fêmea hermafrodita (Hunt, 2017). Destaca-se que estes animais apresentam, inclusive um sistema nervoso, com neurotransmissores comuns como acetilcolina, glutamato, ácido  $\gamma$ -amino butírico (GABA), dopamina e serotonina (Eisenmann, 2005), possibilitando que seja um modelo experimental para os estudos celulares e moleculares de doenças humanas, como a doença de Alzheimer, a qual, inclusive, o estresse oxidativo tem sido associado à sua etiologia e progressão. Estima-se que haja em torno de 42% dos genes de doenças humanas apresentam ortólogos no genoma destes nematoides, o que permite ao pesquisador elucidar vias moleculares complexas envolvidas na patogênese de diversas doenças (Markaki e Tavernarakis, 2010).

### 3 Objetivos

#### 3.1 Objetivo geral

Avaliar a composição química, a toxicidade e a atividade antioxidante, *in vitro* e *in vivo*, de *Tapirira guianensis*.

#### 3.2 Objetivos específicos:

- Preparar o extrato aquoso da casca do caule de *T. guianensis* (EATg);
- Quantificar compostos fenólicos e flavonoides no EATg;
- Avaliar a capacidade do EATg de captura direta de radicais livres DPPH e ABTS<sup>•+</sup>
- Investigar o efeito do EATg sobre macromoléculas, proteína e DNA induzidas ao estresse oxidativo;

- Avaliar a toxicidade do EATg no modelo *in vivo* *C. elegans*.
- Investigar o efeito do EATg sobre *C. elegans* em condição de estresse oxidativo induzido por juglone.

## 4 Material e métodos

### 4.1 Obtenção do material vegetal

Cascas do caule de *T. guianensis*, foram coletadas no município de Itahum (S22° 05' 545" e W 055° 20'746), Mato Grosso do Sul, Brasil, sob autorização do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO) em conjunto com Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) licença número 81013.

O espécime foi identificado por um botânico da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais - FCBA, e uma exsicata foi depositada no herbário (DDMS-UFGD) da Universidade Federal da Grande Dourados - UFGD, sob o número de registro 6398.

A higienização das cascas foi realizada em água corrente para remoção de impurezas. Posteriormente foram secas em estufa de circulação forçada de ar por 10 dias. Após esse período, as cascas foram trituradas em moinho de facas do tipo Willye, e o pó obtido neste processo foi utilizado para o preparo da infusão com água em ebulição por 1 h, em uma proporção de 100 g/L. Após a extração, o extrato foi filtrado, alíquotado em frascos de vidro, congelado e posteriormente liofilizado. As amostras foram armazenadas em freezer a -20 °C e seu rendimento foi de 2,5%.

### 4.2 Quantificação de compostos fenólicos e flavonoides

A quantificação de compostos fenólicos foi realizada de acordo com o método descrito por Meda et al., 2005. Brevemente 2,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu (1:10 v/v, diluído em água destilada) foram adicionados a 500 µL de EATg (a uma concentração de 500 µg/mL), encubados no escuro por 5 min em temperatura ambiente. Posteriormente, 2 mL de carbonato de sódio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) aquoso 14% foram

adicionados à solução e incubado à temperatura ambiente durante 120 min, em ambiente protegido da luz. A absorbância foi medida a 760 nm com o auxílio de um espectrofotômetro T70 UV/Vis (PG Instruments Limited, Leicestershire, UK). A concentração de compostos fenólicos foi determinada utilizando-se uma curva padrão de ácido gálico.

A concentração total de flavonoides no EATg foi determinada de acordo com o descrito por Liberio et al., 2012. Brevemente, à 4,5mL da solução metanólica de cloreto de alumínio hexahidratado 2% (AlCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O) foram adicionados a 200 µL de EATg (200 µg/mL). A solução foi mantida em ambiente escuro por 30 min em temperatura ambiente. Após o período de incubação, mensurou-se a absorbância a 415 nm em um espectrofotômetro T70 UV/Vis (PG Instruments Limited, Leicestershire, UK). Para a curva padrão, utilizou-se o flavonoide Quercetina.

#### 4.3 Atividade antioxidante *in vitro*

##### 4.3.1 Sequestro de radical livre de 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH<sup>•</sup>)

A avaliação da atividade de sequestro do radical livre DPPH<sup>•</sup> foi realizada de acordo com o descrito por Gupta & Gupta, 2011 com algumas modificações. Brevemente, realizou-se uma curva de diluição do EATg e dos compostos ácido ascórbico e BHT (0,1–250µg/mL) em etanol 80%, sendo 200 µL de cada concentração das amostras adicionados a 1800µL de solução de DPPH<sup>•</sup> 0,11mM e incubados protegidos da luz por 30 min. Após este período a absorbância foi determinada a 517 nm, sendo o percentual de inibição obtido pela seguinte fórmula:

$$\text{Inibição do DPPH}^{\bullet} (\%) = \left( 1 - \frac{\text{Abscontrole}}{\text{Absamostra}} \right) * 100$$

##### 4.3.2 Descoloração do ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico (ABTS<sup>•+</sup>)

Para a avaliação do sequestro do radical ABTS<sup>•+</sup>, o ensaio foi realizado de acordo com o descrito por Re, et al.,1999. Obteve-se o radical ABTS<sup>•+</sup> a partir da reação de 5 mL da solução de ABTS<sup>•+</sup> (7 mM) e 88 µL de persulfato de potássio (140 mM), que foi previamente incubado por 12-16 h em temperatura ambiente protegido do contato com a luz. Após esse período, o radical ABTS<sup>•+</sup> foi diluído em etanol

absoluto até a absorbância de  $0,70 \pm 0,05$  a 734 nm. 20  $\mu\text{L}$  do EATg ou das substâncias padrão, ácido ascórbico ou BHT (0,1–250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), foram adicionados a 1980  $\mu\text{L}$  do radical  $\text{ABTS}^{\bullet+}$ . A mistura foi incubada à temperatura ambiente no escuro durante 6 min e a absorbância obtida em 734nm. O percentual de inibição foi obtido de acordo com a seguinte equação:

$$\text{Inibição de } \text{ABTS}^{\bullet+} (\%) = \left( \frac{\text{Abscontrole} - \text{Absamostra}}{\text{Abscontrole}} \right) * 100$$

#### 4.3.3 Oxidação em proteína BSA

Nesse ensaio investigamos se o EATg é capaz de proteger a albumina sérica bovina (BSA) da oxidação induzida por  $\alpha, \alpha'$ -Azodiisobutyramidine dihydrochloride AAPH conforme descrito por Mayo e colaboradores (2013) com modificações. Para isso, 15  $\mu\text{L}$  do EATG (5 - 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) foram incubados com 15  $\mu\text{L}$  de BSA (3 mg/mL, preparado em PBS) em microtubos de 200  $\mu\text{L}$ . Após 30 min a 37 °C, a mistura recebeu 15  $\mu\text{L}$  de AAPH a 75 mM (preparado em água). No controle negativo não foi adicionado AAPH e o controle positivo não recebeu adição do EATg, recebendo o volume equivalente de água.

As amostras foram incubadas a 37 °C durante 120 min. Após o tratamento, adicionou-se 75  $\mu\text{L}$  de tampão de amostra em cada um dos micros tubos, que foram aquecidos a 95 °C por 3 min. Alíquotas de 20  $\mu\text{L}$  de cada amostra foram carregadas em gel SDS-PAGE 12%, resolvido a 200 V durante 60 min. O gel foi corado, descorado e posteriormente digitalizado utilizando o fotodocumentador Gel Doc™ EZ System e analisado através do software Image Lab™. Os resultados foram expressos como porcentagem da oxidação da proteína BSA. Os dados relativos as digitalizações de 4 géis foram apresentadas como média  $\pm$  erro padrão da média.

#### 4.3.4 Fragmentação de DNA

O efeito protetor do EATg contra a oxidação da molécula de DNA foi avaliado através do ensaio de indução oxidativa ao DNA plasmidial, a partir do método descrito por Kumar & Chattopadhyay (2007) com modificações. Para isto, uma alíquota de 4

$\mu\text{L}$  de DNA plasmidial (50 ng/ $\mu\text{L}$ ) foi pré-incubado com 4  $\mu\text{L}$  de EATg em diferentes concentrações, diluído em PBS (5 - 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Em seguida, adicionou-se 4  $\mu\text{L}$  do agente oxidante peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 3% nos respectivos tratamentos. Foram utilizados como controle o plasmídeo (CT), o plasmídeo na presença de luz UV ( $\text{CT}^{\text{UV}}$ ), o plasmídeo na presença de extrato e luz UV (EATg) e o controle plasmídeo na presença de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . O efeito de um antioxidante de referência, ácido gálico - 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , sobre a proteção da fragmentação do DNA foi analisado. As amostras foram incubadas em um transiluminador UVT-312 a 302 nm em temperatura ambiente durante 5 min. Em seguida, as amostras foram aplicadas em gel de agarose a 2% contendo brometo de etídio (10 mg/mL) e submetidas a eletroforese. As imagens dos géis foram digitalizadas utilizando o fotodocumentador Gel Doc™ EZ Imager (Bio-Rad Laboratories) e analisado através do software Image Lab™. Os resultados de 2 géis foram expressos como porcentagem da fragmentação de DNA.

#### 4.4 Ensaio *In vivo*

##### 4.4.1 Cepa e manutenção de *C. elegans*.

Os ensaios *in vivo* foram realizados com a cepa selvagem de nematoide (N2). A cepa foi obtida do Laboratório de Fisiologia Integrativa da Universidade Federal de São Paulo, os nematoides foram mantidos em incubadoras a 20 °C, cultivados em placas de Petri contendo meio de crescimento NGM e cobertura de *E. coli* OP<sub>50</sub>, inativadas com o antibiótico Canamicina (10 mM). Para os experimentos, os animais foram sincronizados por lise alcalina, com hipoclorito de sódio 2% e hidróxido de sódio 5M. Os ovos foram coletados e depositados em placas de Petri contendo NGM e *E. coli* OP<sub>50</sub> e mantidas a 20 °C por 48 h até atingirem o estágio L4.

##### 4.4.2 Toxicidade

Para avaliar o ensaio de toxicidade, realizamos o procedimento de acordo com o descrito por Leite et al., 2020. Em média, 10 vermes da linhagem N2 sincronizados e no estágio L4, foram transferidos para microplacas de 96 poços contendo tampão M9 (100  $\mu\text{L}$ ). Após a transferência, foram adicionados ao tratamento controle 100  $\mu\text{L}$  de tampão M9, e, aos demais tratamentos, as diferentes concentrações (50 a 2000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) do EATg. Em seguida, a placa foi incubada a 20 °C por 24 e 48 h, e a viabilidade foi avaliada pela sensibilidade dos animais ao toque de um fio de platina



em cada um dos tempos. Os animais que não respondiam ao toque foram considerados mortos. Foram realizados três experimentos independentes em triplicata.

#### 4.4.3 Resistência ao estresse oxidativo

O ensaio de estresse oxidativo foi realizado expondo os nematoides ao agente oxidante juglone (5-hidroxi-1,4-naftoquinona) diluído em etanol 80% de acordo com o descrito por Tawfeek et al., 2019 com algumas modificações. Os animais foram sincronizados e incubados por 48 h até atingirem o estágio L4. Em seguida, foram transferidos para placas de 96 poços 10 animais por poço, contendo 100 µg/mL de tampão M9. Foram adicionados ao grupo controle não tratado e ao grupo controle-juglone 100 µL de M9, e aos grupos tratados com EATg foram adicionados 100 µL de cada concentração (5 – 150 µg/mL). Após 1 h do tratamento, os animais receberam 50 µL de M9 ao controle não tratado, e aos demais grupos foram adicionados 50 µL de juglone. A viabilidade foi avaliada nos tempos de 24 e 48 h após a adição do juglone (concentração final de 80µM) pela sensibilidade ao toque com fio de platina. Foi realizado um experimento em triplicata.

#### 4.5 Análise Estatística

Os dados são expressos como a média ± erro padrão da média (EPM). Para a obtenção do IC<sub>50</sub> foi utilizada regressão não linear e, para a comparação entre os grupos tratados e os grupos controle, foi utilizada análise de variância (ANOVA), seguida pelo pós-teste de Dunnett, com limite de confiança de 95%. A curva de sobrevivência foi construída por análise de teste de log-rank (Mantel-Cox). O software GraphPad Prism 8 (San Diego, CA, EUA) foi usado para a análise de todos os dados. Os resultados foram considerados significativos quando  $p < 0,001$ .

## 5 Resultados

### 5.1 Caracterização química

Os dados experimentais obtidos demonstraram que a média de compostos fenólicos totais foi de  $122,41 \pm 3,45$  mg EAG/g, enquanto os flavonoides totais não foram quantificáveis.

### 5.2 Atividade antioxidante *in vitro*

Os resultados obtidos nos ensaios de captura direta de radical livre e a concentração inibitória de 50% ( $IC_{50}$ ) de radicais livres 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS) e 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), bem como a atividade máxima do EATg estão descritas na tabela 1. Os resultados de  $IC_{50}$  foram semelhantes aos do controle antioxidante, ácido ascórbico, em ambos os ensaios. E as concentrações necessárias para atingir a inibição máxima dos radicais livres foi no EATg 10 $\mu$ g/mL para o ácido ascórbico foi de 5 $\mu$ g/mL e para o BHT foi 10  $\mu$ g/mL.

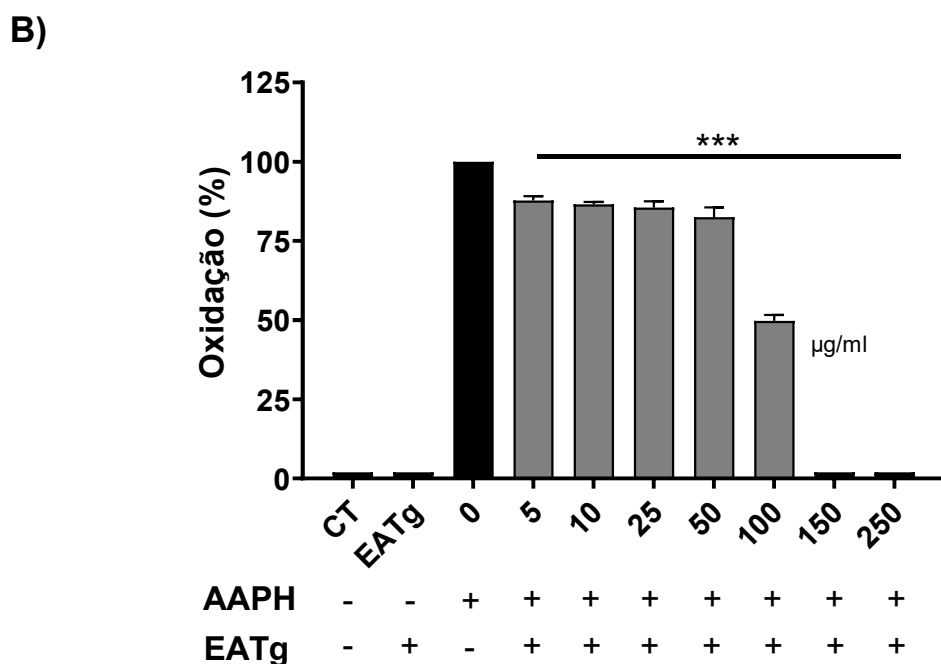
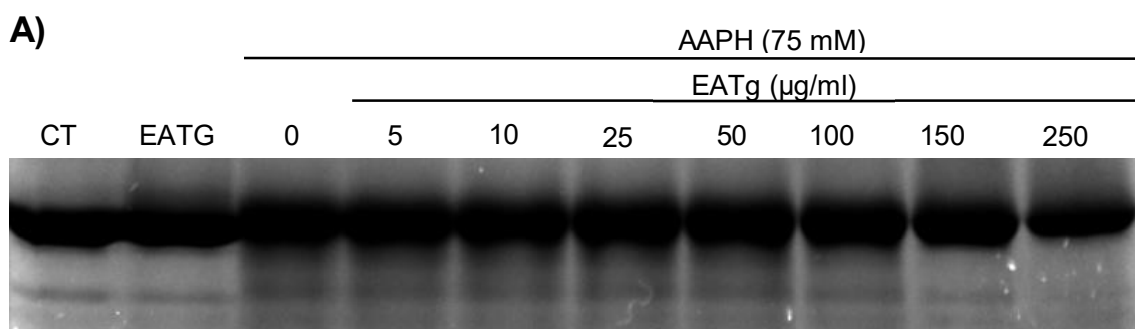
**Tabela 1.** Atividade antioxidante de captura direta de radicais livres de DPPH<sup>•+</sup> e ABTS<sup>•+</sup> expressa em  $IC_{50}$  e atividade máxima do extrato aquoso de cascas do caule de *Tapirira guianensis*.

Amostras	DPPH			ABTS		
	$IC_{50}$ ( $\mu$ g/ml)	Atividade Máxima %	Atividade Máxima $\mu$ g/ml	$IC_{50}$ ( $\mu$ g/ml)	Atividade Máxima %	Atividade Máxima $\mu$ g/ml
Ácido ascórbico	$2,57 \pm 1,06$	$83,41 \pm 0,52$	5	$1,62 \pm 0,29$	$99,08 \pm 0,58$	5
BHT	$37,12 \pm 6,50$	$81,39 \pm 5,03$	100	$4,59 \pm 0,01$	$78,89 \pm 0,21$	10
EATg	$2,80 \pm 1,20$	$88,14 \pm 1,97$	10	$5,41 \pm 0,07$	$99,64 \pm 0,09$	25

Os valores são a média de 2 experimentos realizados em triplicata, expressos na forma de média  $\pm$  SEM.

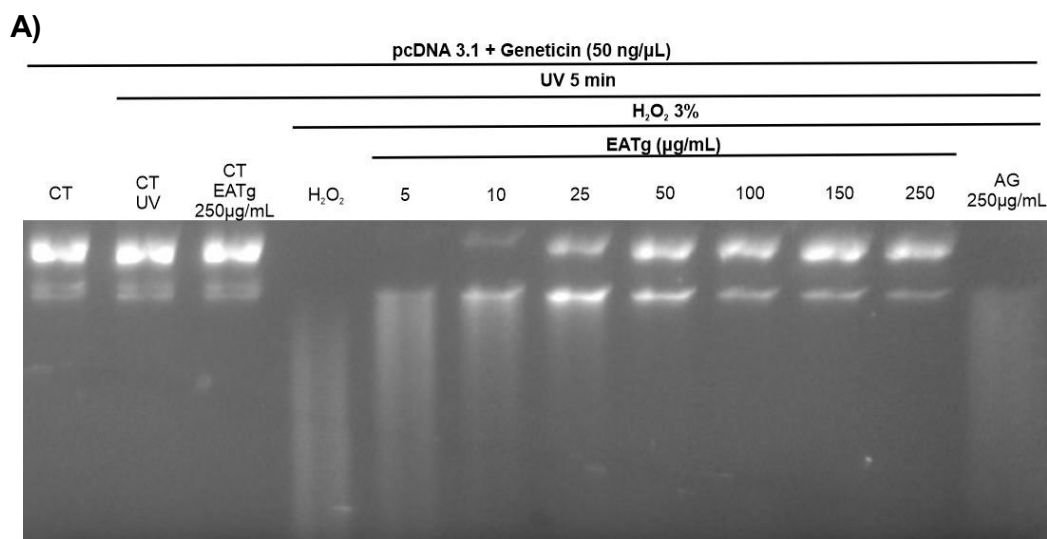
No ensaio de oxidação de BSA induzida por AAPH, observamos que o EATg foi capaz de proteger em todas as concentrações avaliadas (Figura 1A-B). A Figura 1A demonstra a imagem representativa do gel de poliacrilamida referente a proteção

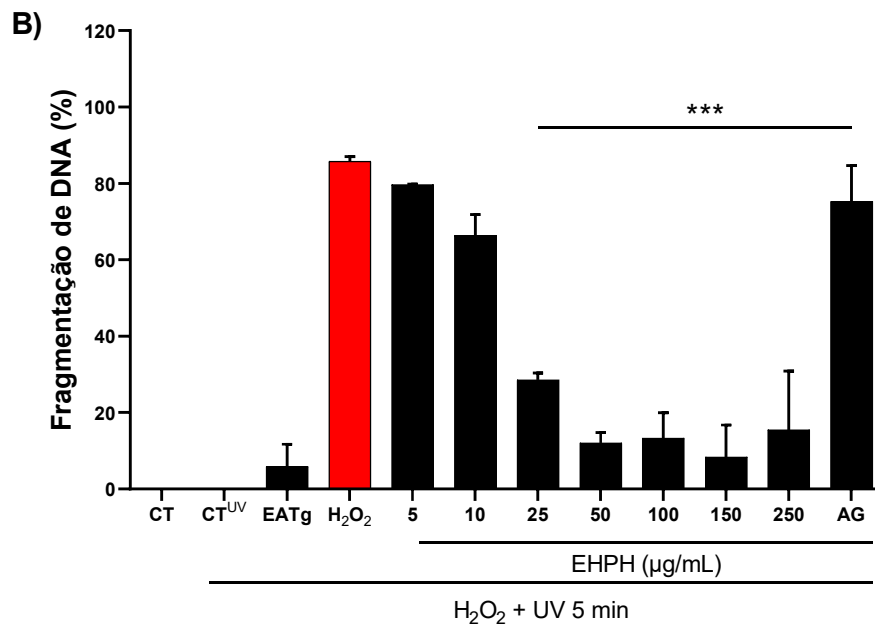
da proteína BSA contra a oxidação induzida, após os tratamentos com EATg. O extrato foi capaz de reduzir a difusão das bandas provocada pela fragmentação induzida pelo AAPH quando comparados com o controle positivo AAPH. A concentração de 100 µg/mL de EATg foi capaz de reduzir em 49,77% a fragmentação do DNA, enquanto na concentração de 150 e 250 µg/mL a redução foi de 100%.



**Figura 1.** Oxidação de proteína induzida por AAPH em amostras de BSA (75 mM) incubadas com EATg (5 – 250 µg/mL). E Efeito protetor do EATg sobre a oxidação de proteína induzida por AAPH. (A) Imagem representativa do experimento, onde diferentes concentrações do EATg (5 - 250 µg/ml) foram incubadas com BSA e 75 mM de AAPH durante 2 h a 37 °C. Em seguida, as amostras foram resolvidas em SDS-PAGE 12%. (B) Análise de quatro géis referentes a porcentagem de oxidação de BSA. Diferenças significativas entre o controle positivo AAPH e os demais tratamentos são apresentados como \*\*\* p<0,001. CT = controle.

A Figura 2 demonstra a atividade protetora do EATg frente ao estresse oxidativo induzido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% e luz UV ao DNA. Observa-se que no controle plasmídeo, onde não houve nenhum tipo de indução de estresse, não houve degradação no DNA o mesmo efeito foi observado quando o plasmídeo foi exposto apenas ao UV e, um efeito similar foi observado quando o plasmídeo foi exposto a maior concentração do extrato e UV simultaneamente (coluna 3) ocorrendo uma degradação de apenas 5,83%. Diferentemente, quando exposto simultaneamente aos estressores H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 3% e UV por 5 min, observa-se uma degradação de 85,76% do DNA. Quando tratado com o EATg, o percentual de degradação de DNA foi reduzido, conforme aumentou a concentração de extrato. Desde a concentração de 25 µg/mL foi observada uma redução de 57,27% em relação ao controle H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, chegando a reduzir na concentração de 150 µg/mL, 77,39% da fragmentação induzida pelos agentes causadores do estresse, enquanto que para o composto isolado ácido gálico na concentração de 250 µg/mL não houve proteção estatisticamente significativa da fragmentação quando comparados com o controle H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (**Figura 2A**).





**Figura 2.** Fragmentação de DNA plasmidial induzida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% e luz UV em amostras controle e incubadas com EATg em concentrações de 5 - 250 μg/ml. E Efeito protetor do extrato aquoso de *Tapirira guianensis* na inibição da fragmentação do DNA plasmidial induzida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e radiação UV. DNA plasmidial incubado com diferentes concentrações (5 - 250 μg/mL) de EATg após 5 minutos de exposição a luz UV. **(A)** Imagem representativa do ensaio. O gel de agarose mostra as bandas de DNA plasmidial após o tratamento com EATg e o antioxidante de referência Ácido gálico (AG). **(B)** Resultados expressos como porcentagem de fragmentação de DNA. CT: Controle plasmídeo; CT<sup>UV</sup>: Controle plasmídeo + UV; EATg: Plasmídeo + EATg 250 μg/mL; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: plasmídeo + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%; AG: Ácido gálico 250 μg/mL. Porcentagens expressas como média ± erro padrão da média. Diferenças significativas entre o controle positivo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e os demais tratamentos são apresentados como \*\*\*  $p < 0,001$ .

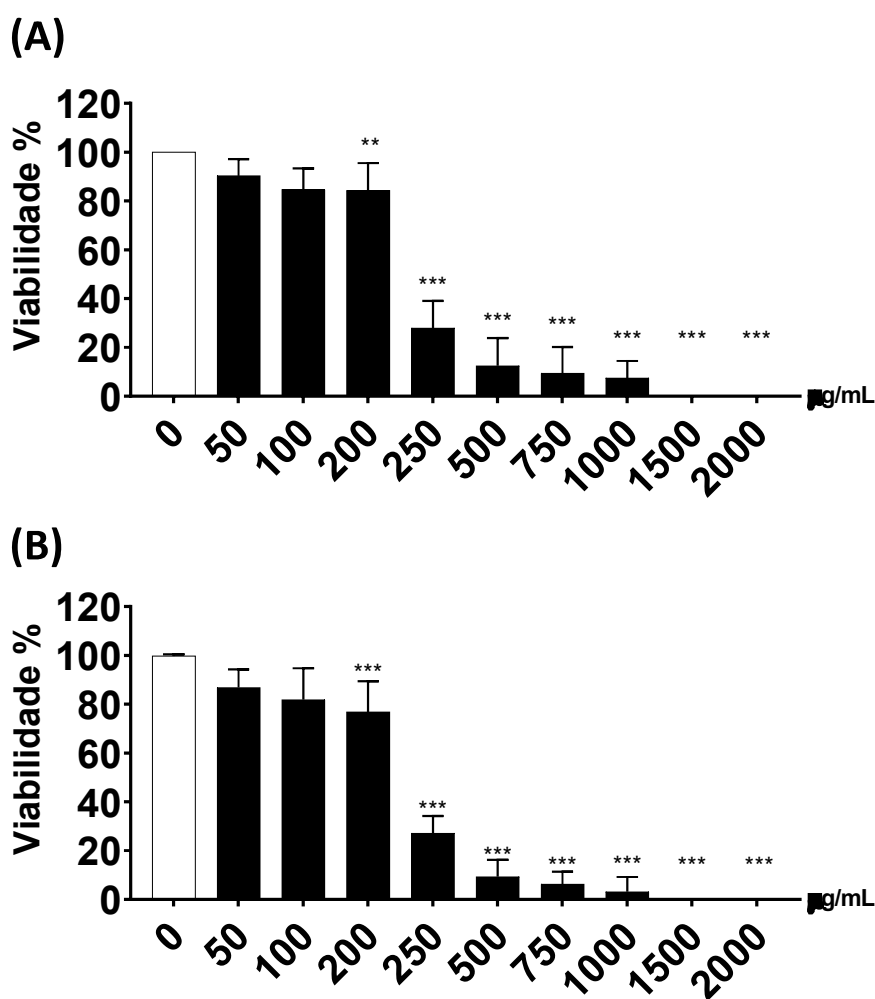
### 5.3 Avaliação *in vivo*

#### 5.3.1 toxicidade

Como resultado do experimento de toxicidade, demonstrado na **Figura 3**, observa-se que todos os animais do grupo que não recebeu o extrato (0 μg/mL) estavam viáveis e, que, no tempo de 24h, foi observada uma leve toxicidade a partir da concentração de 200 μg/mL, onde 84,31% dos animais estavam viáveis. Na concentração de 250 μg/mL o extrato ultrapassou a DL<sub>50</sub>, sendo observado uma viabilidade de 27,94%, chegando a 0% de viabilidade na concentração de 1500 μg/mL (**Figura 3A**).

Para o tempo de 48 h (**Figura 3B**) observa-se que o controle não tratado com o extrato apresentou 100% de viabilidade, enquanto os grupos tratados com o extrato

apresentaram uma redução na viabilidade em todas as concentrações, passando a ser uma redução, comparada com o controle não tratado, a partir da concentração de 200 µg/mL com uma viabilidade de 76,79%, chegando a eliminar toda a viabilidade na concentração de 1500 µg/mL.



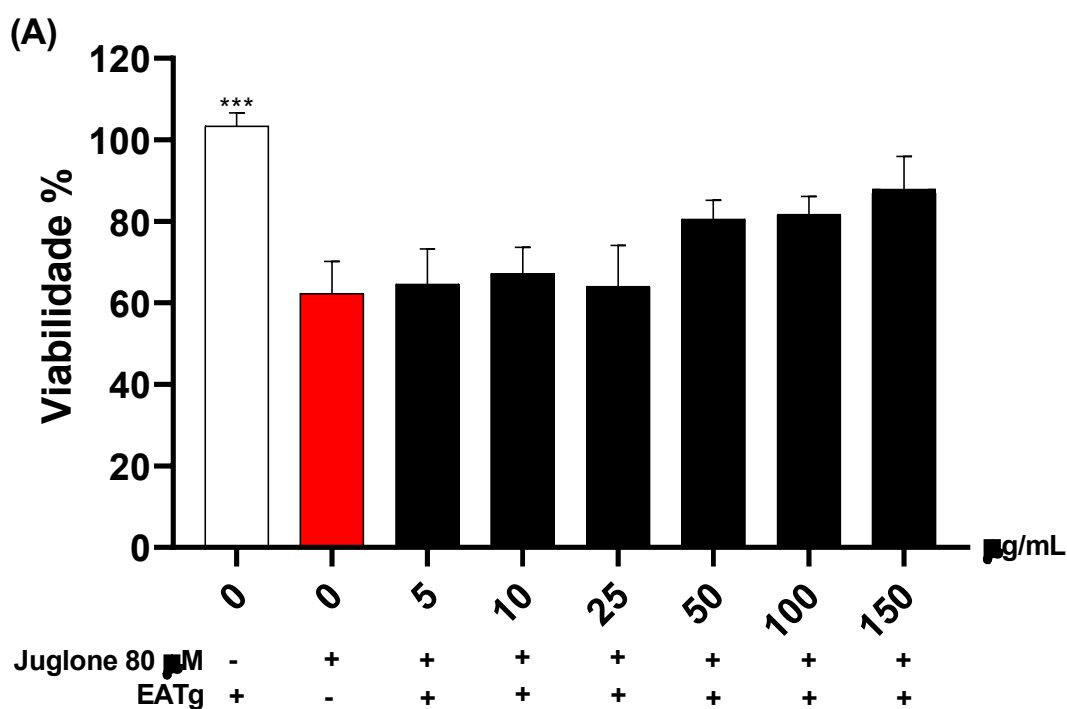
**Figura 3.** Toxicidade do EATg ao *C.elegans* após **(A)** 24h e **(B)** 48h de incubação. Valores expressos como média  $\pm$  erro padrão da média Valor de  $P < 0,001$ .

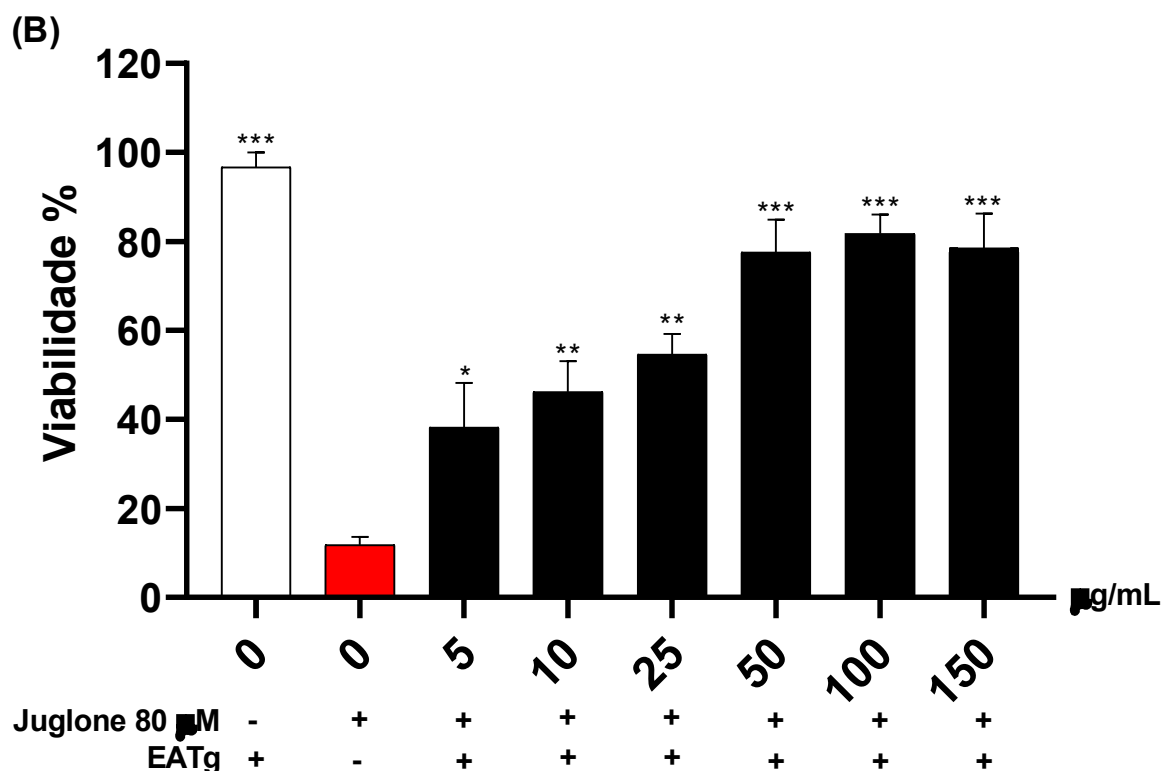
### 5.3.2 Proteção contra estresse oxidativo

Ao avaliarmos o experimento de estresse oxidativo induzido por juglone em *C. elegans* (**Figura 4 A-B**) observa-se que no tempo de 24h (**Figura 4A**), o controle não tratado com o extrato ou o estressor (primeira barra), apresentou 100% de viabilidade, enquanto o controle tratado apenas com o juglone (segunda barra) apresentou uma viabilidade de 62,31%. Os grupos tratados com o EATg, apresentam um aumento na

viabilidade quando comparados ao controle tratado com juglone, embora nenhuma das concentrações seja estatisticamente diferente deste tratamento.

Para o tempo de 48h (**Figura 4B**) também se observa que o controle não tratado com o estressor ou o extrato (primeira barra) apresentou 100% de viabilidade, enquanto o controle tratado apenas com o juglone reduziu a viabilidade média dos animais para 11,79%. Quando comparados com o controle juglone, todas as concentrações do EATg aumentaram a viabilidade dos animais, sendo que a concentração de 5 µg/ml aumentou a viabilidade em relação ao controle juglone em 26,39%, chegando a uma proteção de 65,72% na concentração de 50 µg/mL.





**Figura 4.** Estresse oxidativo em modelo experimental *in vivo* *C. elegans* tratados em estágio L4 por 1 h com extrato aquoso de cascas de *Tapirira guianensis* (5 – 150 µg/mL) após exposição a 80 µM de Juglone (concentração letal) por 24 h (A) e 48 h (B). Média de um ensaio expresso como média ± erro padrão da média. Análise de variância foi utilizada para comparação entre os tratamentos e o controle tratado apenas com o estressor Juglone. \*\*\* Valor de P < 0,001.

## 6 Discussão

O uso de antioxidantes naturais ganhou visibilidade nos últimos anos, devido a sua importância na manutenção da homeostase, prevenção e tratamento de doenças (Baldivia et al., 2018). Alguns destes compostos apresentam eficiência na eliminação das EROs que, quando em desequilíbrio, causam o estresse oxidativo, e podem acarretar várias doenças (Velloso et al., 2021). Na literatura científica, alguns dos componentes químicos da *T. guianensis* já foram descritos, entre eles, em diferentes frações do extrato das folhas foram identificados os compostos fenólicos prodelphinidinas e proantocianidinas que são conhecidos por terem uma alta capacidade antioxidante, e por sua capacidade na proteção de proteínas contra



oxidação e degradação destas por EROs (Furlan et al., 2019), os quais provavelmente estão presentes no EATg.

O EATg foi capaz de neutralizar de forma eficiente os radicais livres DPPH<sup>•</sup> e ABTS<sup>•+</sup>, mesmo sendo um extrato bruto, o EATg apresentou os resultados de IC<sub>50</sub> similares ao ácido ascórbico e BHT que são compostos isolados utilizados como antioxidantes de referência. Esses radicais são neutralizados pela doação de átomos de hidrogênio (Leite et al., 2020), esta atividade do extrato está ligada a presença dos compostos fenólicos, que são descritos como excelentes antioxidantes naturais (Hung, 2016), desempenhando um papel de agentes redutores, que podem doar hidrogênio impedindo o estresse oxidativo (Furlan et al., 2019).

O estresse oxidativo causado pelo desbalanço das espécies reativas, pode levar à oxidação das macromoléculas proteínas, DNA e lipídios (Irazabal e Torres, 2020). Em nosso organismo as proteínas desempenham um papel fundamental em todas as vias bioquímicas de manutenção do corpo. Quando a qualidade destas proteínas está comprometida, seja por processos de erro na síntese ou pela oxidação causada pelo estresse oxidativo, podem ocorrer diferentes doenças como por exemplo as doenças neurodegenerativas (Höhn, Tramutola e Cascella, 2020). Neste sentido, observa-se que o EATg foi capaz de, *in vitro*, reduzir a fragmentação induzida ao BSA, desde a menor concentração avaliada.

Quanto aos danos oxidativos causados ao DNA, alterações físicas e/ou químicas ocorridas no DNA que impeçam a interpretação e transferência de informação genética (Srinivas et al., 2018), estes podem ter algumas consequências como a ocorrência de câncer (Kryston et al., 2011) e, também, o aumento do risco de várias doenças associadas com o envelhecimento como diabetes, falha cardíaca e doenças neurodegenerativas (Juan et al., 2021). Por estes motivos, é essencial que estes danos sejam minimizados. O EATg foi capaz de *in vitro*, impedir a fragmentação de DNA plasmidial exposto ao estresse oxidativo causado pela associação da exposição ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e UV, tendo em algumas concentrações, uma atividade superior ao ácido gálico, que foi utilizado como um composto de referência.

Uma ferramenta biotecnológica amplamente utilizada para a avaliação da ação de produtos naturais, é o organismo *C. elegans*, sua utilização diminui o número de outras espécies de animais utilizadas para estudos farmacológicos. Sendo assim este

nematoide é um excelente modelo experimental *in vivo*, para comprovar os resultados obtidos *in vitro*, sendo utilizado em análises farmacológicas de produtos naturais por se tratar de um organismo completo (Hunt, 2016). O EATg apresentou toxicidade nas concentrações mais elevadas, no entanto, nas concentrações mais baixas não houve redução na viabilidade dos animais. Vale ressaltar que, nos experimentos seguintes ao de toxicidade, as concentrações escolhidas foram dentro da faixa de concentrações não tóxicas para o organismo *C. elegans*.

Após constatação de que em concentrações baixas o EATg não é tóxico, verificou-se se ele apresenta capacidade de proteger um organismo completo do estresse oxidativo causado por um estressor ambiental o juglone. O organismo *C. elegans* apresenta homologia com humanos, por isto é um organismo muito útil para estudos farmacológicos, uma vez que os resultados podem ser associados com estípes de doenças humanas (Naß e Efferth, 2021). Estes vermes são sensíveis ao estresse oxidativo causado por compostos indutores de estresse oxidativo pelo aumento da quantidade de EROs, como o paraquat e o juglone (Senchuk, Dues e Raamsdonk, 2017). Foi observado que o EATg apresenta uma capacidade de proteger os animais do estresse causado pelo juglone, um composto produzido por plantas da família Juglandaceae como metabólito secundário (Leite et al., 2020), que converte oxigênio em ânion radical superóxido ( $O_2^-$ ) no ciclo redox intracelular (Wang e Wink, 2016).

A proteção que o EATg conferiu aos nematoides possivelmente está associada a uma melhor qualidade de vida nos animais. Leite e colaboradores (2020) relatam que extrato da polpa de *Dipterix alata* (Baru) aumenta a expectativa de vida de *C. elegans*, e associam esta atividade a presença dos compostos do metabolismo secundários identificados neste extrato, dentre eles os compostos fenólicos. Considerando a presença de compostos fenólicos no EATg, em concentrações baixas é possível que a proteção ao estresse oxidativo induzido pelo juglone também esteja ligada ao aumento da expectativa de vida destes animais.

## 7 Conclusão

Os resultados descritos neste trabalho demonstraram que o extrato aquoso da casca do caule de *T. guianensis* possui compostos bioativos que apresentam uma

relevante atividade antioxidante *in vitro* nos ensaios de captura direta de radical livre, e também foi capaz de proteger proteínas e DNA do dano oxidativo induzido. EATg apresentou também efeito *in vivo*, em nematoides *C. elegans*, com baixa toxicidade e proteção contra o estresse oxidativo induzido por juglone. Assim, o EATg demonstrou potencial para ser explorado em novos estudos, principalmente relacionados ao desenvolvimento de novos produtos biotecnológicos ou farmacológicos, em condições que envolvam o estresse oxidativo ou ainda, o câncer.

## 8 Referências

AHMAD, W; IJAZ, B; SHABBIRI, K; AHMED, F; REHMAN, S. Oxidative toxicity in diabetes and Alzheimer's disease: mechanisms behind ROS/RNS generation. **Journal of Biomedical Science**, v. 24, n. 1, p. 1-10, 2017.

ANDRIEUX, P; CHEVILLARD, C; CUNHA-NETO, E; NUNES JPS. Mitochondria as a Cellular Hub in Infection and Inflammation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 21, p. 11338, 2021.

BALDIVIA, DS; LEITE, DF; CASTRO, DTH; CAMPO, JF; SANTOS, UP; PAREDES, GEJ; CAROLLO, CA; SILVA, DB; SOUZA, KP; SANTOS, EL. Evaluation of in vitro antioxidant and anticancer properties of the aqueous extract from the stem bark of *Stryphnodendron adstringens*. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 8, p. 2432, 2018.

BARBOSA, KBF; COSTA, NMB; ALFENAS, RCGP; MINIM, VPR; BRESSAN J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de nutrição**, v. 23, p. 629-643, 2010.

BIANCHI, PML; ANTUNES, LMG. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de nutrição**, v. 12, p. 123-130, 1999.

BOUAYED, J; BOHN, T. Exogenous antioxidants-Doubleedged swords in cellular redox state Oxid. **Med. Cell Longev**, v. 3, n. 4, p. 28-37, 2010.

CASTRO, DTH; CAMPOS, JFDAMIAO,MJ HERON, FVTGAMERO, EJP; CAROLLO CA; RODRIGUES, EG; SOUZA, KP et al. Ethanollic extract of Senna velutina roots: chemical composition, in vitro and in vivo antitumor effects, and B16F10-Nex2 melanoma cell death mechanisms. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2019, 2019.

CORREIA SJ., DAVID J P., DAVID J M., Flavonóides, norisoprenóides e outros terpenos das folhas de *Tapirira guianensis*. **Química Nova**, v. 31, p. 2056-2059, 2008.

COSTA, CC; FREITAS, LV; SOUSA, DMN; OLIVEIRA, LL; CHAGAS, ACMA; LOPES, MVO; DAMACENO, AKCI. Conhecendo espécies de plantas da Amazônia: Tatapiririca (Tapirira guianensis Aubl.-Anacardiaceae). **Embrapa Amazônia Oriental- Comunicado Técnico (INFOTECA-E)**, 2014.

COTINGUIBA, GG., SILVA JRN., AZEVEDO RRS., ROCHA TJM., SANTOS AFI. Método de avaliação da defesa antioxidante: uma revisão de literatura. **Journal of Health Sciences**, v. 15, n. 3, 2013.

CRUZAT VF., ROGERO MM., BORGES MC., TIRAPEGUI J. Aspectos atuais sobre estresse oxidativo, exercícios físicos e suplementação. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 13, p. 336-342, 2007.

DAVID JM; CHÁVEZ JP; CHAI HB; PEZZUTO JM; CORDELL GA. Two new cytotoxic compounds from Tapirira guianensis. **Journal of natural products**, v. 61, n. 2, p. 287-289, 1998.

EISENMANN, DM. WNT SIGNALING. WormBook, ed. The C. elegans Research Community, **WormBook**, June 25, 2005, doi/10.1895/wormbook.1.7.1, <http://www.wormbook.org>.

ENGERS VK., BEHLING, CS., FRIZZO, MN. A influência do estresse oxidativo no processo de envelhecimento celular. **Revista Contexto & Saúde**, v. 11, n. 20, p. 93-102, 2011.

FEITOZA, LQ; TERRA, FS; GRASSELLI, CSM. Plantas Medicinais e seus Compostos com Potencial Terapêutico no Tratamento do Câncer: Revisão Integrativa. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 67, n. 1, 2021.

Fitzgerald, j; Fitzgerald, m; Callum, j; McCluskey, AS; Srinivas, C; Rensburg, AV; Karkouti, K; ROS and the DNA damage response in cancer. **Redox Biol** 25: 101084. 2018.

FILIPSKÝ, T; ŘÍHA, M; MACÁKOVÁ, K; ANZENBACHEROVÁ, E; KARLÍČKOVÁ, J; MLADĚNKA P. Antioxidant effects of coumarins include direct radical scavenging,

metal chelation and inhibition of ROS-producing enzymes. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 15, n. 5, p. 415-431, 2015.

FURLAN CM., RESENDE MF., FERREIRA MJ., CLAUSEN MH ROSSI MI. Phoradendron perrottetii (visco) altera os níveis de polifenóis de *Tapirira guianensis* (planta hospedeira)?. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 136, p. 222-229, 2019.

GUPTA, D. Methods for determination of antioxidant capacity: A review. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 6, n. 2, p. 546, 2015.

GUPTA D.; GUPTA RK. Bioprotective properties of Dragon's blood resin: In vitro evaluation of antioxidant activity and antimicrobial activity. **BMC Complement. Altern. Med.** 2011, 13.

HE L., HE T., FARRAR S JIL., LIU T., MA X. Os antioxidantes mantêm a homeostase redox celular por meio da eliminação de espécies reativas de oxigênio. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 44, n. 2, pág. 532-553, 2017.

HEŚ, M., DZIEDZIC K., GORECKA D., GOLINSKA A J., GUJSKA E. Aloe vera (L.) Webb.: fontes naturais de antioxidantes - uma revisão. **Alimentos Vegetais para Nutrição Humana**, v. 74, n. 3, pág. 255-265, 2019.

HÖHN, A; TRAMUTOLA, A; CASCELLA, R. Proteostasis failure in neurodegenerative diseases: Focus on oxidative stress. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2020, 2020.

HOTWANI, K; BALIGA, S; SHARMA, K. Phytodentistry: use of medicinal plants. **Journal of Complementary and Integrative Medicine**, v. 11, n. 4, p. 233-251, 2014.

HUNG, PV. Phenolic compounds of cereals and their antioxidant capacity. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 56, n. 1, p. 25-35, 2016.

HUNT PR. The C. elegans model in toxicity testing. **Journal of Applied Toxicology**, v. 37, n. 1, p. 50-59, 2017.

IRAZABAL, MV; TORRES, VE. Reactive oxygen species and redox signaling in chronic kidney disease. **Cells**, v. 9, n. 6, p. 1342, 2020.

ISLAM, T. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction-linked neurodegenerative disorders. **Neurological research**, v. 39, n. 1, p. 73-82, 2017.

JAKUBCZYK, K; DEC, K; KAWCZUGA, D; KOCHMAN, J; JANDA, K. Reactive oxygen species-sources, functions, oxidative damage. **Polski merkurusz lekarski: organ Polskiego Towarzystwa Lekarskiego**, v. 48, n. 284, p. 124-127, 2020.

JUAN, CA; LASTRA, JMP, PLOU, SJ; LEBEÑA, EP. et al. The Chemistry of Reactive Oxygen Species (ROS) Revisited: Outlining Their Role in Biological Macromolecules (DNA, Lipids and Proteins) and Induced Pathologies. **Int J Mol Sci**. 22(9): 4642. 2021.

KOCH, K; HAVERMANN, S; BÜCHTER, C; WÄTJEN, W. *Caenorhabditis elegans* as model system in pharmacology and toxicology: Effects of flavonoids on redox-sensitive signalling pathways and ageing. **The Scientific World Journal**, v. 2014, 2014.

KUMAR A, CHATTOPADHYAY S. DNA damage protecting activity and antioxidant potential of pudina extract. **Food Chemistry**, v. 100, n. 4, p. 1377-1384, 2007.

.Kryston, TB; Georgiev, AB; Pissis, P; Georgakila, AG. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis. **Mutat. Res., Fundam. Mol. Mech. Mutagen**, v. 711, n. 1-2, p. 193-201, 2011.

LEITE, NR; COSTA, LAA; ROCHA, PS; AGARRYUA, DA; ÁVILA, DS; CAROLLO C A; SILVA, DB; ESTEVINHO, LM; SOUZA, K P; SANTOS, EL. Baru Pulp (*Dipteryx alata* Vogel): Fruit from the Brazilian Savanna Protects against Oxidative Stress and Increases the Life Expectancy of *Caenorhabditis elegans* via SOD-3 and DAF-16. **Biomolecules**, v. 10, n. 8, p. 1106, 2020.

LEAL, JB; SILVA, MM; COSTA, JM; ALBUQUERQUE, LCS; PEREIRA, MGS; SOUZA, RL. Etnobotânica de plantas medicinais com potencial anti-inflamatório utilizadas pelos moradores de duas comunidades no município de Abaetetuba, Pará. **Biodiversidade**, v. 18, n. 3, 2019.

LI, Y; KONG, D; FU, Y; SUSSMAN, MR; WU, H. The effect of developmental and environmental factors on secondary metabolites in medicinal plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 148, p. 80-89, 2020.

LIBERIO, SA; PEREIRA, AL; DUTRA, RP; REIS, AS; ARAUJO, MJ; MATTAR, NS; SILVA, LA; RIBEIRO, MN; NASCIMENTO, FR; GUERRA, RN; MONTEIRO N V. Antimicrobial activity against oral pathogens and immunomodulatory effects and toxicity of geopropolis produced by the stingless bee *Melipona fasciculata* Smith. **BMC Complement. Altern. Med.** 2011, 11, 108.

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.

LOPES, M; CECHINEL-ZANCHETT, CC. Infecções do trato urinário: uma revisão sobre as evidências científicas das principais plantas medicinais utilizadas na prática clínica. **Femina**, p. 824-830, 2019.

MAYCO, JC; TAN, DX; SAINZ, RMS, LOPEZ, B; REITER, RJ. "Oxidative damage to catalase induced by peroxy radicals: Functional protection by melatonin and other antioxidants," **Free Radic. Res.**, vol. 37, no. 5, pp. 543–553, 2003.

MARKAKI, M; TAVERNARAKIS, N. Modeling human diseases in *Caenorhabditis elegans*. **Biotechnology journal**, v. 5, n. 12, p. 1261-1276, 2010.

MCMURRAY, F; PATTEN, DA; HARPER, M. Reactive oxygen species and oxidative stress in obesity—recent findings and empirical approaches. **Obesity**, v. 24, n. 11, p. 2301-2310, 2016.

MEDA, A; LAMIEN, CE; ROMITO, M; MILLOGO, J; NACOULMA, OG. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. **Food Chem.** 2005, 91, 571–577.

MIROŃCZUK-CHODAKOWSKA, I; WITKOWSKA, AM; ZUJKO, ME. Endogenous non-enzymatic antioxidants in the human body. **Advances in medical sciences**, v. 63, n. 1, p. 68-78, 2018.

MOURÃO, PS; SILVA, MLS; GOMES, RO; MAIA FILHO, ALM; ALVES, WS; UCHÔA, VT. Plantas medicinais utilizadas no tratamento de doenças respiratórias crônicas:



Período de 2010 a 2020. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 8, p. e29710817179-e29710817179, 2021.

NAß J; ABDELFAH, S; EFFERTH TH. Ursolic acid enhances stress resistance, reduces ROS accumulation and prolongs life span in *C. elegans* serotonin-deficient mutants. **Food & Function**, v. 12, n. 5, p. 2242-2256, 2021.

NUNEZ, MR; NUNES, SAJ; ROSSI, WM; Marmolejos, R M; Sanches, R M. Correlación entre el grado de hipertensión arterial y el índice de estrés oxidativo. Estudio de corte en una colectividad de pacientes hipertensos sistêmicos na República Dominicana. **Ciencia y Salud**, v. 3, n. 2, pág. 17-33, 2019

OLIVEIRA, AC; VALENTIM, LB; GOULART, MOF; SILVA, CA; BECHARA EJH; TREVISAN, MTS. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**, v. 32, p. 689-702, 2009.

OLIVEIRA RJS; LOPES GF; CAMARGOS LF; RIBEIRO AM; SANTOS FV; SEVERINO RP; SEVERINO VGP; TEREZAN AP; Thomé RG; Santos HB; Reis RM; Ribeiro RIMA; *Tapirira guianensis* Aubl. Extracts inhibit proliferation and migration of oral cancer cells lines. **International journal of molecular sciences**, v. 17, n. 11, p. 1839, 2016.

Park, HEH; Jung Y; Lee, SJV. Survival assays using *Caenorhabditis elegans*. **Molecules and cells**, v. 40, n. 2, p. 90, 2017.

PEREIRA, RJ; CARDOSO, GM. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **Journal of biotechnology and biodiversity**, v. 3, n. 4, 2012.

PRASAD, S; GUPTA, SC; TYAGI, AK. Reactive oxygen species (ROS) and cancer: Role of antioxidative nutraceuticals. **Cancer letters**, v. 387, p. 95-105, 2017.

RAWAT, P; SINGH, PK; KUMAR, V. Evidence based traditional anti-diarrheal medicinal plants and their phytochemicals. **Biomedicine & pharmacotherapy**, v. 96, p. 1453-1464, 2017.

RE, R; PELLEGRINI, N; PROTEGGENT A, PANNALA, A; YANG, M; RICE, EC. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* 1999, 26, 1231–

RODRIGUES, AMG; GUIMARAES, D; KONNO, TUP; TINOCO, LW; BHART, T; AGUIAR, F; LOPES, NP; LEAL, ICR; RAIMUNDO, JM; MUZITANO, MF. Estudo fitoquímico de folhas de Tapirira guianensis orientado por atividades vasodilatadoras e antioxidantes. *Molecules* , v. 22, n. 2, pág. 304, 2017.

ROUMY, V; FABRE, N; PORTET, B; BOURDY, G; ACEBEY, L; VIGOR, C; VALENTIN, A; MOULIS, C; Four anti-protozoal and anti-bacterial compounds from Tapirira guianensis. *Phytochemistry*, v. 70, n. 2, p. 305-311, 2009.

SENUCHUK, MM; DUES, DJ; RAAMSDONK V, Jeremy M. Measuring oxidative stress in Caenorhabditis elegans: paraquat and juglone sensitivity assays. *Bio-protocol*, v. 7, n. 1, 2017.

SIES, H; JONES, DP. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nature reviews Molecular cell biology*, v. 21, n. 7, p. 363-383, 2020.

SILVA W J; FERRARI M; BUCALEN CK. Metabolismo mitocondrial, radicais livres e envelhecimento. *Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia*, v. 14, p. 441-451, 2011.

SILVA, ÁDF; FERREIRA, GL; DIAS, AJA; BARROS, NB; SILVA, ZPN. Uso e eficácia de plantas medicinais com ações em doenças cardiovasculares e em Diabetes Tipo 2: Panax Ginseng, Curcuma Longa, Adonis Vernalis. *Brazilian Journal of Development*, v. 7, n. 9, p. 86526-86549, 2021.

SIMUNKOVA, M; ALWASEL, SH; ALHAZZA, IM; JOMOVA, K; KOLLAR, V; RUSKO, M; VALKO, M. Management of oxidative stress and other pathologies in Alzheimer's disease. *Archives of toxicology*, v. 93, n. 9, p. 2491-2513, 2019

LING, BT; NORHAIZAN, ME; LIEW, WPP. Nutrientes e estresse oxidativo: amigos ou inimigos ?. **Medicina oxidativa e longevidade celular** , v. 2018, 2018.

TAWFEEK, N; SOBEH, M; HAMDAN, DI; FARRAG1, N; ROXO, M; EI-SHAZLY, AM; WINK, M. Phenolic compounds from *Populus alba* L. and *Salix subserrata* Willd.(Salicaceae) counteract oxidative stress in *Caenorhabditis elegans*. **Molecules**, v. 24, n. 10, p. 1999, 2019.

VELLOSA, JCR; BIAVATTI, M; FRANÇÓIA, PCO; MELLO, BJ; ALMEIDA,ACA; BUENO, GE. Estresse oxidativo: uma introdução ao estado da arte. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 1, p. 10152-10168, 2021.

VIZZOTTO, M; KROLOW, ACR; WEBER, G; BRUCH, E. Metabólitos secundários encontrados em plantas e sua importância. **Embrapa Clima Temperado- Documentos (INFOTECA-E)**, 2010.

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

Wormatlas, Introduction to *C. elegans* anatomy. A database featuring behavioral and structural anatomy of *Caenorhabditis elegans*. Disponível em: <<https://www.wormatlas.org/hermaphrodite/introduction/Introframeset.html>> acesso: 17/11/2021