

Universidade Federal da Grande Dourados - UFGD
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biodiversidade
Rede Pró-Centro-Oeste - PPGBB

Frutos do Bioma Cerrado:
Avaliação da atividade antioxidante *in vitro* e efeitos *in vivo*
em modelo experimental *Caenorhabditis elegans*

Laura Costa Alves de Araújo

DOURADOS - MS

Abril, 2020

Laura Costa Alves de Araújo

**FRUTOS DO BIOMA CERRADO:
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *in vitro* E
EFEITOS *in vivo* EM MODELO EXPERIMENTAL
*Caenorhabditis elegans***

Tese apresentada à Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de DOUTOR em BIOTECNOLOGIA E BIODIVERSIDADE.

Área de concentração: Biotecnologia e Biodiversidade.

Orientador: Prof. Dr. Edson Lucas dos Santos

DOURADOS - MS

Abril, 2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

A663f Araujo, Laura Costa Alves De

Frutos do Bioma Cerrado: Avaliação da atividade antioxidante in vitro e efeitos in vivo em modelo experimental *Caenorhabditis elegans* [recurso eletrônico] / Laura Costa Alves De Araujo. -- 2020.

Arquivo em formato pdf.

Orientador: Edson Lucas dos Santos.

Tese (Doutorado em Biotecnologia e Biodiversidade)-Universidade Federal da Grande Dourados, 2020.

Disponível no Repositório Institucional da UFGD em:
<https://portal.ufgd.edu.br/setor/biblioteca/repositorio>

I. Frutos do Cerrado. 2. Produtos naturais. 3. Antioxidante. 4. *C. elegans*. 5. Longevidade. I. Santos, Edson Lucas Dos. II. 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.

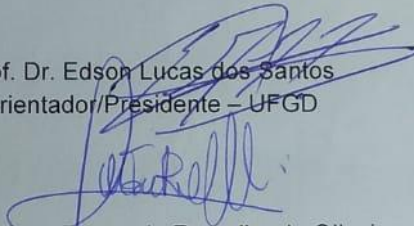
Ata de Defesa da Tese

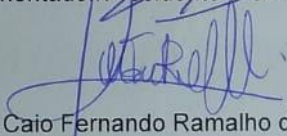
“FRUTOS DO BIOMA CERRADO: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO* E EFEITOS *IN VIVO* EM MODELO EXPERIMENTAL *CAENORHABDITIS ELEGANS*”

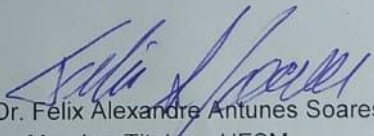
Por


LAURA COSTA ALVES DE ARAÚJO

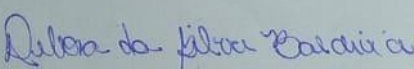
Tese apresentada à Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD),
como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de
DOUTORA EM BIOTECNOLOGIA E BIODIVERSIDADE
Área de Concentração: Biotecnologia e Biodiversidade


Prof. Dr. Edson Lucas dos Santos
Orientador/Presidente – UFGD


Prof. Dr. Caio Fernando Ramalho de Oliveira
Membro Titular – UFGD


Prof. Dr. Felix Alexandre Antunes Soares
Membro Titular – UFSM


Prof. Dr. Wilson Pereira dos Santos
Membro Titular – HEMOSUL


Prof.ª Dr.ª Debora da Silva Baldivia
Membro Titular – UFGD

Aprovada em: 29 de abril de 2020.

Dedicatória

Aos meus filhos, Pedro e Antônio, dedico-lhes o fruto mais doce deste trabalho: o Amor.

Agradecimentos

A Deus e a Jesus, meus guias espirituais, presentes em todos os momentos desta jornada.

A minha família, Nelson, Pedro e Antônio, que nestes últimos anos ressignificaram o sentido de união, perseverança, abnegação e superação em minha vida.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Edson Lucas dos Santos pela oportunidade, lealdade e respeito ao longo de todos esses anos. Agradeço pela confiança, pelos conselhos e ensinamentos que contribuíram imensamente para a construção de diversas habilidades e competências diferenciais caracterizadas pela maneira com que orienta seus alunos. Meus honrosos e sinceros agradecimentos.

À profa. Dra. Kely de Picoli Souza, pela oportunidade e confiança em mim depositada. Pela amizade e incentivo para o desenvolvimento deste trabalho. Gratidão, pelo exemplo de professora, pela força e perseverança, sua luz é capaz de iluminar a mente e o coração dos seus alunos.

Aos colaboradores e parceiros, Profa. Dra. Jaqueline Ferreira Campos, pelas grandes contribuições para o desenvolvimento e consolidação deste modelo de estudo. Profa. Daiana Silva Ávila e Danielle Agarrayua Araujo, vinculadas à Universidade Federal do Pampa, pela execução de ensaios com C. elegans e contribuições na redação científica. Profa. Dra. Denise Brentan da Silva e Prof. Dr. Carlos Alexandre Carollo, vinculados à Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, pela disponibilidade em realizar a caracterização química e contribuir com as discussões dos dados. Aos professores visitantes, Dr. José Tarcísio Giffoni de Carvalho Júnior e Dr. Caio Fernando Ramalho de Oliveira, pela forma generosa em transmitir seus conhecimentos.

Aos membros do Grupo de Estudos em Biotecnologia e Bioprospecção Aplicados ao Metabolismo (GEBBAM): Alex Santos Oliveira, André Durão de Lemos, Cintia Miranda dos Santos, Daniel Ferreira Leite, David Tsuyoshi Hiramatsu de Castro, Dra. Debora da Silvia Baldivia, Hélder Freitas dos Santos, Kátia Ávila Antunes, Kellen Natalice, Natã Vinicius da Silva Miranda, Natasha Rios Leite, Dra. Paola dos Santos Rocha, Priscilla Pereira de Toledo Espindola, Tamaeh Monteiro Alfredo, Dr. Uilson Pereira dos Santos, muitos foram os ensinamentos, serei eternamente grata pelo convívio de todos.

*Ao senhor **Adonias** e a senhora **Juci**, produtores rurais do Assentamento Lagoa Grande, pela autorização das coletas dos frutos e pela amizade que construímos. Como cidadã e pesquisadora, agradeço por zelar com afinco da biodiversidade brasileira.*

*À **Rosiane de Souza Silva**, secretária do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Biodiversidade, pela disponibilidade e competência demonstrada na execução de suas atividades.*

*Ao **Honorivaldo Rodrigo Albuquerque Silva**, Chefe da Divisão de Inovação e Propriedade Intelectual, vinculado à Universidade Federal da Grande Dourados, pela avaliação e contribuições para processamento do pedido e depósito da patente integrante desta Tese.*

*Às instituições e órgãos de fomento envolvidos no desenvolvimento, financiamento e execução desta tese, **Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD)**; **Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT)**; **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** e ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)**.*

Muito Obrigada!

Lista de siglas, símbolos e abreviaturas

- AA** – Ácido ascórbico
- A₀** – Absorbância do controle
- A₁** – Absorbância da amostra
- ABTS^{•†}** – 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico
- AlCl₃.6H₂O** – Cloreto de alumínio hexahidratado
- AUF** Unidades arbitrárias de fluorescência
- β A** – Beta amiloide
- BHT** – Hidroxitolueno butilado
- CaCl₂** – Cloreto de cálcio
- CAT** – Catalase
- C. elegans*** – *Caenorhabditis elegans*
- CYP** – Citocromo P450 monooxigenase
- DCFI** – 2,6 Diclorofenolindofenol-sódio
- DPPH** – 2,2-difenil-1-picrilhidrazil
- DRAs** – Doenças relacionadas à idade
- EAG** – Equivalente ao ácido gálico
- EAfs** – Extratos aquosos dos frutos
- CAFP** – Polpa do fruto *Campomanesia adamantium*
- CBPF** – Polpa do fruto *Caryocar brasiliense*
- HSFL** – Fruto liofilizado de *Hancornia speciosa*
- EPM** – Erro padrão da média
- EQ** – Equivalente de quercetina
- ERN** – Espécies reativas de nitrogênio
- ERO** – Espécies reativas de oxigênio
- GC-MS** – Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas
- GPx** – Glutaciona peroxidase
- GR** – Glutaciona redutase
- GSH** – Glutaciona resuzida
- GST-4** – Glutaciona-S-transferase
- H₂O₂** – Peróxido de hidrogênio
- HO₂[•]** – Radical hidroperoxila
- IC₅₀** – Concentração que provoca 50% da inibição máxima da atividade desejada

KH₂PO₄ – Di-hidrogênio fosfato de potássio

KPO₄ – Fosfato de potássio

L1, L2, L3, L4 – Fases de crescimento do nematoide *C. elegans*

N2 – Cepa selvagem

Na₂CO₃ – Carbonato de sódio

NaCl – Cloreto de sódio

NADPH – Nicotinamida adenina dinucleotiotídio fosfato

NaOH – Hidróxido de sódio

Na₂HPO₄ – Di-hidrogênio fosfato de sódio

NGM – Meio de crescimento para nematoides, do inglês “*Nematode Growth Medium*”

NO₂ – Dióxido de nitrogênio

O₂• – Radical ânion superóxido

OD – Densidade ótica

•OH – Radical hidroxila

RO₂• – Radical peroxila

rpm – Rotação por minuto

SOD₃ – Superóxido dismutase tipo 3

Ø – Diâmetro

RESUMO

ARAÚJO, Laura Costa Alves. [Tese]. Universidade Federal da Grande Dourados, abril de 2020. **Frutos do Bioma Cerrado: Avaliação da atividade antioxidante *in vitro* e efeitos *in vivo* em modelo experimental *Caenorhabditis elegans***. Orientador: Prof. Dr. Edson Lucas dos Santos.

No Bioma Cerrado são encontradas diversas espécies frutíferas que apresentam uma variedade de compostos bioativos considerados excelentes fontes de antioxidantes naturais com importantes propriedades benéficas à saúde humana. Este estudo teve como objetivos caracterizar e identificar constituintes químicos presentes nos frutos nativos *Campomanesia adamantium* O. Berg. (Cambess.), *Hancornia speciosa* Gomes e *Caryocar brasiliense* Cambess. Além disso, propomos investigar o potencial antioxidante *in vitro* dos frutos e seus efeitos biológicos em *Caenorhabditis elegans*. Os principais constituintes químicos identificados pertenceram às classes dos compostos fenólicos, incluindo os ácidos fenólicos e derivados, flavonoides, e ainda ácidos orgânicos e ácidos graxos. Além disso, quantificamos o ácido ascórbico e pigmentos lipofílicos, tais como, β -caroteno, licopeno e clorofilas. Na avaliação da atividade antioxidante, os frutos promoveram a captura direta dos radicais DPPH[•] e ABTS^{•+}. Os frutos não apresentaram toxicidade *in vivo*. Além disso, a exposição de nematoides aos tratamentos com os frutos, promoveu proteção contra os estresses térmico e oxidativo. Adicionalmente, ocorreu efeito pró-longevidade em nematoides (N2) e atraso da paralisia induzida em cepas transgênicas (*CL2006*) para Doença de Alzheimer. Demonstramos que os efeitos benéficos dos frutos podem estar associados à atividade antioxidante, modulação da expressão de enzimas antioxidantes (SOD-3 e GST-4) e ativação do fator transcricional DAF-16. Em conclusão, nosso estudo revela que os frutos nativos do Cerrado apresentam compostos bioativos antioxidantes promotores de efeitos benéficos *in vivo*. Por fim, este trabalho contribui para o desenvolvimento e inovação de produtos naturais com propriedades funcionais e nutracêuticas advindos da biodiversidade brasileira.

Palavras-chave: Guavira, Mangaba, Pequi, *C. elegans*, Estresse oxidativo, Longevidade, Alzheimer, Produtos naturais

ABSTRACT

In the Brazilian Cerrado Biome are found several fruit species that present a variety of bioactive compounds considered excellent sources of natural antioxidants with important beneficial properties for human health. This study aimed to characterize and identify chemical constituents present in the native fruits *Campomanesia adamantium* O. Berg. (Cambess.), *Hancornia speciosa* Gomes and *Caryocar brasiliense* Cambess. As well as investigating, the antioxidant potential *in vitro* and its biological effects on *Caenorhabditis elegans*. In this study, we identified chemical constituents belonging to the classes of phenolic compounds, including phenolic acids and derivatives, flavonoids, as well as organic acids and fatty acids. In addition, we quantify ascorbic acid and lipophilic pigments, such as β -carotene, lycopene and chlorophylls. In the evaluation of antioxidant activity, the fruits acted in the capture of the free radical DPPH[•] and discoloration of the ABTS^{•+} radical. The fruits did not present toxicity *in vivo*. The beneficial protective effects were observed in nematodes exposed to thermal and oxidative stress. In addition, there was a pro-longevity effect on nematodes (N2) and delayed paralysis induced in transgenic strains (*CL2006*) for Alzheimer's Disease. We demonstrated that the beneficial effects of fruits may be associated with antioxidant activity, modulation of the expression of antioxidant enzymes (SOD-3 and GST-4) and activation of the transcriptional factor DAF-16. In conclusion, our study reveals that native fruits have antioxidant bioactive compounds that promote beneficial effects *in vivo*. Finally, this work contributes to the development and innovation of natural products with functional and nutraceutical properties resulting from Brazilian biodiversity.

Keywords: Guavira, Mangaba, Pequi, Oxidative stress, Longevity, Alzheimer, Natural products

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	01
2 REVISÃO DE LITERATURA	03
2.1 Frutos nativos do Bioma Cerrado	03
2.1.1 <i>Campomanesia adamantium</i> (Cambess) O. Berg	08
2.1.2 <i>Hancornia speciosa</i> Gomes	10
2.1.3 <i>Caryocar brasiliense</i> Cambess.	12
2.2 Antioxidantes	14
2.2.1 Antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos	14
2.2.2 Antioxidantes naturais	15
2.3 Estresse oxidativo	17
2.4 Doença de Alzheimer	18
2.5 Envelhecimento e Longevidade	20
2.6 Modelo biológico: <i>Caenorhabditis elegans</i>	21
3 OBJETIVOS	24
3.1 Objetivos Gerais	24
3.1.1 Objetivos Específicos	24
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25
5 REGISTRO DE PATENTE E ARTIGOS CIENTIFICOS	44
5.1 Patente de Invenção: “Processo de produção de polpas de frutos do Cerrado”	44
5.2 <i>Campomanesia adamantium</i> O Berg.: um fruto nativo do Brasil capaz de proteger contra o estresse oxidativo e promover aumento da longevidade em <i>Caenorhabditis elegans</i> via SOD-3, GST-4 e fator transcricional DAF-16	76
5.3 Perfil químico do fruto brasileiro <i>Hancornia speciosa</i> Gomes e efeitos antioxidante e protetor contra toxicidade de β -amiloide em <i>Caenorhabditis elegans</i>	117
5.4 Propriedades antioxidantes do fruto nativo <i>Caryocar brasiliense</i> Camb. melhoram a qualidade de vida e promovem a longevidade em <i>Caenorhabditis elegans</i>	160
6 CONCLUSÃO GERAL	189

1. INTRODUÇÃO

O Cerrado é o segundo maior *hotspot* mundial de biodiversidade, reconhecido como a Savana mais rica do mundo, abriga aproximadamente 12 mil espécies de plantas nativas já catalogadas das quais várias têm forte impacto cultural e econômico nas comunidades locais (Peixoto et al., 2019). Destacam-se pela relevância regional, as espécies madeireiras, tintoriais, ornamentais, medicinais e alimentícias.

Os gêneros alimentícios apresentam diferentes espécies que produzem frutos comestíveis, com formas variadas, cores atrativas e sabor característico (RODRIGUEZ, 2001). Dentre as principais espécies frutíferas nativas do Cerrado brasileiro, estão a *Hancornia speciosa* Gomes (mangaba), *Alibertia edulis* (A. Rich.) L. Rich. (marmelinho), *Salacia crassifolia* Mart. Peyr. (bacupari), *Annona crassiflora* Mart. (marolo), *Mauritia flexuosa* Linn. (buriti), *Caryocar brasiliense* Cambess (pequi), *Anacardium humile* Mart. (cajuzinho), *Campomanesia adamantium* (Cambess) O. Berg. (guavira), *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne (jatobá), *Dipteryx alata* Vog. (baru) e a *Eugenia dysenterica* Mart. ex DC. (cagaita). Os frutos produzidos por estas espécies estão disponíveis por um curto período do ano, e geralmente são pouco conhecidos pela população, o que dificulta a sua produção e comercialização.

Diferentes técnicas de processamento são aplicadas aos frutos, com objetivo de garantir a preservação dos compostos bioativos, representando um importante recurso para conservação e diversificação das maneiras de consumo, aumentando a estabilidade físico, química e microbiológica. Assim estudos, científicos que demonstrem a preservação dos valores nutricional e funcional destes frutos, aliados a recursos tecnológicos, podem aumentar o apelo mercadológico e o valor comercial dos mesmos. Neste sentido, os frutos vêm sendo utilizados pela indústria como matérias primas para o desenvolvimento de suplementos alimentares funcionais e nutracêuticos. Os suplementos alimentares têm recebido considerável atenção nos últimos anos, pois quando incluídos na dieta na forma de suplemento nutricional apresentam propriedades benéficas para saúde (Borghi & Cicero, 2017). Os nutracêuticos são caracterizados como um alimento ou parte de um alimento que apresenta além do valor nutricional, propriedades medicinais, incluindo efeitos benéficos para a prevenção e/ou tratamento de doenças. Tais produtos podem abranger desde os nutrientes isolados, suplementos dietéticos na forma de cápsulas e dietas, além de produtos herbais e alimentos processados tais como cereais, sopas e bebidas (MORAES, 2006). Por sua vez, os

alimentos funcionais apresentam propriedades benéficas além das nutricionais básicas, sendo apresentados na forma de alimentos comuns. São definidos como alimentos e componentes alimentares que fornecem nutrientes essenciais, muitas vezes além das quantidades necessárias para manutenção, crescimento, e desenvolvimento e/ou outros compostos biologicamente ativos que conferem benefícios à saúde ou efeitos fisiológicos desejáveis (Sunkara, & Verghese, 2014).

Os frutos são considerados excelentes fontes de compostos que apresentam propriedades antioxidantes, um grupo heterogêneo de moléculas que possuem habilidade em doar hidrogênio ou elétrons, além de seus radicais intermediários estáveis impedirem a oxidação de moléculas no organismo (SOARES, 2002). Os benefícios advindos do consumo de frutos podem ser atribuídos à presença de minerais, fibras, vitaminas, compostos fenólicos e flavonoides. A ingestão diária de compostos antioxidantes, está intimamente relacionada à redução no risco de doenças cardiovasculares e neurodegenerativas como Alzheimer e Parkinson (Heffron et al., 2017; Perez-Cornago et al., 2017; Fernando et al., 2015; Williams (2015)).

A Doença de Alzheimer (DA) é uma patologia neurodegenerativa, relacionada com o envelhecimento e considerada a causa mais comum de demência em idosos. Os principais sinais histopatológicos são a formação de extracelular de placas senis compostas por agregados de peptídeo β -amiloide ($A\beta$) associadas a íons metálicos como cobre, ferro ou zinco e a presença de emaranhados neurofibrilares intracelulares compostos por proteína Tau hiperfosforilada associadas aos microtúbulos (Martins et al., 2018 e Cheignon et al., 2017). Este cenário conduz a uma disfunção e perda de sinapses e eventual morte neuronal, sendo o estresse oxidativo considerado “papel chave” na patogênese e na progressão da DA (Butterfield & Halliwell, 2019).

Estudos científicos, utilizando o nematoide *Caenorhabditis elegans* como modelo experimental, demonstraram que extratos ou compostos isolados de diferentes frutos, entre eles, maçã, açaí, camu-camu, cranberry e guaraná (Vayndorf et al., 2013; Bonomo et al., 2014; Azevêdo et al., 2015; Hong et al., 2016; Zamberlan et al., 2018), são capazes de aumentar a expectativa de vida, promover da qualidade de vida, e minimizar os danos causados pelo estresse oxidativo no organismo, incluindo danos associados as doenças neurodegenerativas, como Alzheimer e Parkinson.

O nematoide *C. elegans* é considerado um excelente modelo de experimentação *in vivo* e amplamente utilizado em pesquisas que investigam efeitos biológicos de

diferentes compostos. Trata-se de um organismo multicelular, de curto ciclo de vida (21 dias), fácil cultivo em condições laboratoriais, com grande número de descendentes por nematoide (300 ovos). Este nematoide apresenta elevada homologia genética com genes humanos (60 a 80%), demonstrando uma forte conservação de mecanismos celulares que envolvem patologias humanas, o que permite rápida identificação de compostos com propriedades biológicas (Corsi et al., 2015). Estes são alguns dos fatores, que tornam o nematoide *C. elegans* um modelo utilizado internacionalmente por vários grupos de pesquisa para estudos sobre mecanismos moleculares envolvidos nos processos de desenvolvimento, envelhecimento, longevidade.

Portanto, neste estudo inédito, buscamos investigar a atividade antioxidante *in vitro* de três frutos nativos do Bioma Cerrado, sendo eles, guavira (*Campomanesia adamantium* O. Berg), mangaba (*Hancornia speciosa* Gomez) e o pequi (*Caryocar brasiliense* Cambess). Bem como, avaliar os efeitos biológicos frente às condições de estresse oxidativo, longevidade e Doença de Alzheimer no modelo experimental *C. elegans*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Frutos nativos do Bioma Cerrado

O Cerrado é o segundo maior Bioma da América do Sul, ocorre predominantemente no Planalto Central do Brasil e ocupa aproximadamente 21% do território nacional, correspondendo aproximadamente 2 milhões de km² (Bonanomi et al., 2019). O Cerrado possui uma grande diversidade de espécies frutíferas importantes para sustentabilidade da fauna e flora, e também para a população da região. Uma das características marcantes do Cerrado é a adversidade climática, definida por um grande período de seca, aproximadamente dois a seis meses sem chuvas, seguido de período com intensa pluviosidade, a qual favorece a abundância e diversidade de plantas. Devido a estas adversidades, a flora nativa desenvolve adaptações biológicas de proteção contra condições diversas de estresses, o que conseqüentemente evita a extinção de determinadas espécies (Rosa, 2013). Contudo, as condições ambientais adversas, contribuem para o desenvolvimento de mecanismos de defesa das plantas contra agentes físicos, químicos e biológicos durante o processo evolutivo, e está associada a maior produção de compostos bioativos (Batle-Bayer et al., 2010).

As espécies frutíferas do Cerrado apresentam grande quantidade e diversidade de compostos bioativos, e estes podem ser benéficos para a saúde humana, representando potencial fonte de alimentos com propriedades funcionais a ser incorporada na alimentação da população, ou ainda, serem utilizados na indústria farmacêutica e de cosméticos (Rosa, 2013).

Dentre as espécies frutíferas nativas do Cerrado que são regularmente consumidas pela população da região Centro-Oeste, destacam-se os frutos da guavira (*C. adamantium*), mangaba (*H. speciosa*), pequi (*C. brasiliense*), araçá (*P. guinense*), marolo (*A. crassifolia*) e o baru (*D. alata*). Diferentes partes vegetais de espécies frutíferas do bioma Cerrado são utilizadas na medicina popular e descritas por suas propriedades biológicas (**Tabela 1**). Businaro et al. (2017), sugeriram que as atividades biológicas de um determinado alimento estão associadas às interações bioquímicas sinérgicas ou antagônicas entre nutrientes, promovendo respostas fisiológicas capazes de modular o metabolismo em processos de estresse oxidativo e inflamação e, conseqüentemente, atuar em vias de sinalização minimizando a progressão de doenças neurodegenerativas, como a DA.

No levantamento bibliográfico realizado por Bailão et al. (2015), sobre frutos nativos do Bioma Cerrado, incluindo o pequi; baru; cagaita; pitanga; jenipapo; mangaba; buriti; jabuticaba; goiaba; araçá; lobeira; cajá e o marolo, foram descritas estruturas químicas e o potencial farmacológico dos compostos funcionais. Os autores relataram que estes frutos, apresentam uma gama de nutrientes, como fibras, micronutrientes, vitaminas (E, A e C) e metabólitos secundários (taninos, fenóis simples, flavonoides e antocianinas).

Ainda que, sejam crescentes pesquisas científicas sobre as propriedades funcionais advindas do consumo de frutos nativos, são insuficientes os estudos que identifiquem seus constituintes fitoquímicos e comprovem as atividades biológicas e propriedades nutracêuticas.

Tabela 1. Estudos científicos sobre o potencial biológico de espécies frutíferas do Bioma Cerrado.

Nome popular e científico	Parte vegetal	Atividade biológica	Referência
<i>Guavira (Campomanesia adamantium</i> O. Berg)	Frutos	Antimicrobiana	Cardoso et al., 2010
	Polpa dos frutos	Anti-inflamatória e antinociceptiva	Viscardi et al., 2017
	Folhas	Antioxidante e antimicrobiana	Coutinho et al., 2009
		Anti-inflamatória e antinociceptiva	Ferreira et al., 2013
	Cascas dos frutos	Antidiarreica e anti-inflamatória	Lescano et al., 2016
	Raiz	Anti-inflamatória, anti-hiperalgésica e antidepressiva	Souza et al., 2017
		Antioxidante e anti-hiperlipidêmica	
	Raiz	Antiproliferativa	Espíndola et al., 2016
	Folha e raiz		Campos et al., 2017

Continuação Tabela 1

Nome popular e científico	Parte vegetal	Atividade biológica	Referência
Mangaba (<i>Hancornia speciosa</i> Gomes)	Folhas	Antissépticas e antimicrobiana	Costa et al., 2008
	Polpa do fruto	Anti-inflamatória	Torres-Rêgo et al., 2016
	Látex do tronco	Gastroprotetora e cicatrizante	De Mello Moraes et al., 2008
		Osteogênica	Dos Santos Neves et al., 2016
		Cicatrizante	Geller et al., 2015
		Antidiabético	Pereira et al., 2015
		Anti-hipertensiva	Silva et al., 2016
	Antioxidante, antimicrobiana e citotóxica	Santos et al., 2016	
	Antioxidante, antimutagênica, anti-inflamatória, anti-doença de Alzheimer e doença anti-Parkinson, antiobesidade e anti-hiperglicêmica.	Dos Santos et al., 2018	

Continuação Tabela 1

Nome popular e científico	Parte vegetal	Atividade biológica	Referência
Pequi (<i>Caryocar brasiliense</i> Cambess)	Polpa	Antioxidante	Roesler et al., 2008
	Casca, polpa e semente do fruto	Anti-inflamatória	Miranda-Vilela et al., 2009
	Óleo do fruto	Cardioprotetora	Oliveira et al., 2017
	Óleo da polpa	Anti-inflamatória	Roll et al., 2018
	Farinhas do fruto	Antioxidante	Leão et al., 2017
	Óleo de amêndoa	Antioxidante e anti-inflamatória	Torres et al., 2016
	Folhas	Antimicrobiana e antioxidante	Amaral et al., 2014
	Folhas	Anticolinesterásica e antioxidante	De Oliveira et al., 2018

2.1.1 *Campomanesia adamantium* (Cambess) O. Berg

A espécie *Campomanesia adamantium* pertence à família Myrtaceae, é conhecida popularmente como guavira, gabiroba, guabiroba, guariroba, guabiroba-do-campo, guabiroba-do-Cerrado, guabiroba-do-lisa, guabiroba-branca (Vieira et al., 2011). É uma espécie frutífera nativa de ampla distribuição geográfica, podendo ser encontrada nos Estados de Goiás, Minas Gerais e Mato Grosso do Sul até Santa Catarina, chegando às regiões adjacentes da Argentina, Paraguai e Uruguai (Durigan et al., 2004). Apresenta frutificação anual, floresce por um curto período de tempo, de agosto a setembro e o amadurecimento dos frutos acontece entre os meses de novembro a dezembro (Ajalla et al., 2014) (**Figura 1**). Os frutos da guavira são suculentos, ácidos e levemente adocicados e muito apreciados popularmente, sendo consumidos *in natura*, e também utilizados para produção de licores, sucos, geleias e sorvetes (Cardoso et al., 2010). Apresentam potenciais para serem utilizados, na indústria de alimentos, como flavorizantes na produção de bebidas, devido aos seus atributos sensoriais como: elevada acidez, ácido ascórbico (vitamina C), minerais, fibras alimentares e compostos fenólicos, presentes em maior quantidade no óleo volátil dos frutos, e que lhes conferem o aroma cítrico (Vallilo et al., 2006). Estudos anteriores avaliaram a composição proximal da polpa dos frutos da guavira conforme descritos na **Tabela 2**.



Figura 1. Espécime vegetal *Campomanesia adamantium* (Cambess) O. Berg. (Fonte: Arquivo pessoal).

Tabela 2. Composição proximal da polpa dos frutos da guavira (*Campomanesia adamantium*).

Componentes (g. 100 g ⁻¹)	Polpa <i>in natura</i>		Polpa liofilizada
	Vallilo et al., 2006	Breda et al., 2016	Breda et al., 2016
Umidade	75,0	85,26	3,14
Proteínas	1,60	0,87	3,01
Lipídeos	N.D.	0,13	1,23
Carboidratos	11,6	12,26	31,94
Fibra alimentar total	0,90	0,53	1,56
Cinzas	N.D.	0,28	2,00

N.D.: não determinado.

A utilização de folhas e frutos na medicina popular são relatados por apresentarem propriedades anti-inflamatória, antidiarreica e no tratamento de doenças urinárias (Vieira et al., 2011). Estudos científicos utilizando diferentes extratos dos frutos demonstraram atividades antimicrobianas (Pavan et al., 2009; Cardoso et al., 2010), antioxidantes (Coutinho et al., 2010), antinociceptivas e anti-inflamatórias (Ferreira et al., 2013), bem como atividades apoptóticas e antiproliferativas em células de carcinoma humano (Fernandes et al., 2015). A polpa microencapsulada de *C. adamantium* foi investigada quanto seus efeitos anti-inflamatórios e antinociceptivos em camundongos (Viscardi et al., 2017). Porém, ainda são escassos os estudos sobre a polpa do fruto e conseqüentemente insuficientes os estudos que elucidam mecanismos de ação e os compostos responsáveis por estas atividades em diferentes modelos biológicos. Diante do exposto, podemos observar o crescente interesse dos pesquisadores em investigar esta espécie frutífera, considerada como promissora para o desenvolvimento de produtos nutracêuticos.

2.1.2 *Hancornia speciosa* Gomes

Popularmente conhecida como "mangabeira", *H. speciosa* é uma árvore frutífera nativa brasileira, distribuída do norte ao sul do país e pertence à família Apocynaceae. Os domínios fitogeográficos são a Floresta Amazônica (principalmente Pará e Amapá), Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica (Almeida et al., 2016). O nome da fruta "mangaba" tem origem Tupi-guarani e significa "bom fruto para comer". A árvore é de porte médio (2 a 10 m de altura) com um dossel irregular e um tronco torcido e altamente ramificado. Os ramos são lisos e avermelhados, ocorre presença de látex por todo o seu comprimento (Epstein, 2004). O florescimento de *H. speciosa* ocorre entre os meses de agosto e setembro, e os frutos amadurecem entre outubro a novembro no Cerrado (Silva Júnior, 2006). Os frutos são do tipo baga, variando em tamanho, forma e cor, e geralmente são de cor amarelada ou esverdeada (**Figura 2**). Os frutos são considerados como fonte de vitamina C e são consumidos *in natura*, e também processados para produção de sorvetes, geleias e sucos (Ganga et al., 2009; Nabout et al., 2016 e Soares et al., 2016). A composição proximal da polpa dos frutos mangaba já foram descritos na literatura (**Tabela 3**).



Figura 2. Espécime vegetal *Hancornia speciosa* Gomes. (Fonte: Arquivo pessoal).

Tabela 3. Composição proximal e valor energético da polpa *in natura* e liofilizada dos frutos da mangabeira (*H. speciosa*).

Componentes (g. 100 g ⁻¹)	Polpa <i>in natura</i>		Polpa liofilizada
	Silva et al., 2008	Rocha, 2011	Santos et al., 2012
Umidade	82,40	82,8	20,69
Proteínas	1,20	1,40	2,73
Lipídeos	2,37	1,30	N.D.
Carboidratos	10,02	10,5	N.D.
Fibra alimentar total	3,40	N.D.	N.D.
Cinzas	0,58	0,60	0,60
VET (kcal.100 g ⁻¹)	66,21	71,4	N.D.

VET: Valor energético total; N.D.: Não determinado.

Torres-Rêgo et al. (2016), investigaram propriedades farmacológicas do extrato aquoso do fruto de *H. speciosa*, e evidenciaram atividades anti-inflamatória, utilizando o modelo de inflamação de peritonite induzida por carragenina em roedores. Os mecanismos de ação que os autores sugerem estão relacionadas as moléculas bioativas capazes de modular a histamina, serotonina, cininas e prostaglandinas, que são mediadores inflamatório envolvidos no processo de inflamação. Extratos vegetais obtidos a partir da *H. speciosa* apresentam atividades biológicas com propriedades antioxidante (Marques et al., 2015), cicatrizante (Geller et al., 2015), antimicrobiana (Santos et al., 2016) e antiviral (Brandão et al., 2010).

Apesar de ter sido alvo dos estudos mencionados, são necessários estudos pormemorizados sobre a composição química, em especial da polpa do fruto de *H. speciosa* correlacionando com o domínio fitogeográfico e as propriedades biológicas em diferentes modelos experimentais *in vivo* utilizados na pesquisa científica.

2.1.3 *Caryocar brasiliense* Cambess

O pequi é o fruto da espécie *Caryocar brasiliense*, pertencente à família Caryocaraceae, nativa do Bioma Cerrado (Bailão et al., 2015). O nome pequi tem origem Tupi, sendo *py* (casca, pele) e *qui* (espinho), com o significado de casca espinhosa, atribuído à característica espinhosa do endocarpo (Almeida & Silva, 1994). Os domínios fitogeográficos incluem os Estados da Bahia, Ceará, Pará, Maranhão, Piauí, Tocantins, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais e Goiás. Algumas espécies também são encontradas nas savanas da Costa Rica ao Paraguai (Almeida & Silva, 1994). Devido sua característica endêmica recebe outras denominações: pequiá, pequiá verdadeiro, pequiá-vermelho, pitiá, piqui, pequi-do-cerrado, saco-de-bode, amêndoa-de-espinho, pequerim e suari (Almeida et al., 1998).

O pequi é um fruto do tipo drupoide, globoso verde, composto por pericarpo (casca) acinzentado ou verde - amarelado, mesocarpo (polpa) amarelo claro, carnoso, aromático e endocarpo (envoltório do caroço). Sua florescência ocorre durante os meses de agosto a novembro, com a maturação dos frutos em meados de novembro, sendo encontrados até o início de fevereiro (Almeida et al., 1998) (**Figura 3**). A polpa e a amêndoa do pequi são comumente utilizadas na culinária, no preparo de licor e para extração de óleo, cuja utilização pela indústria alimentícia tem sido crescente (Borges, 2011). Estudos sobre o valor nutricional da polpa do pequi *in natura* e liofilizada apresentam variações na composição centesimal, observa-se que a polpa liofilizada apresentou valores superiores de proteínas, lipídeos e carboidratos, quando comparados aos valores descritos para a polpa *in natura* de acordo com a base úmida da polpa (**Tabela 4**).

Nos últimos anos, houve um aumento no número de pesquisas sobre as potencialidades biológicas de *C. brasiliense*, a atividade antioxidante foi avaliada por Leão et al. (2017), o óleo da polpa do fruto foi descrito por seu potencial quimiopreventivo contra o câncer hepático em ratos (Palmeira et al., 2016). Além disso, Traesel et al. (2016), demonstraram que o óleo da polpa do pequi apresenta baixa toxicidade aguda e subcrônica do em roedores, no entanto, os autores sugerem a necessidade de estudos adicionais relacionados à segurança alimentar.



Figura 3. Espécime vegetal do *Caryocar brasiliense* Cambess (Fonte: Arquivo pessoal).

Tabela 4. Composição centesimal e valor energético da polpa dos frutos de pequizeiros (*C. brasiliense*).

Componentes (g. 100 g ⁻¹)	Polpa <i>in natura</i>		Polpa liofilizada
	Lima et al., 2007	Cordeiro et al.,2013	Nascimento et al., 2017
Umidade	41,50	47,28	11,65
Proteínas	3,00	2,98	6,17
Lipídeos	33,40	27,06	48,87
Carboidratos	11,45	15,82	23,07
Fibra alimentar total	10,02	8,04	4,20
Cinzas	0,63	0,51	1,84
VET (kcal.100 g ⁻¹)	358,40	13,90	556,79

VET: Valor energético total; N.D.: Não detectado.

2.2 Antioxidantes

Antioxidante foi definido por Halliwell (1995), como uma substância que em baixas concentrações, retarda ou previne a oxidação de um substrato. Posteriormente, os antioxidantes foram classificados em moléculas naturais ou sintéticas que inibem a reação de espécies reativas com biomoléculas ou impedem a formação descontrolada destes radicais (Porth e Matfin, 2010). Ainda, são caracterizados quanto ao seu potencial antioxidante, por apresentar em suas estruturas substituintes doadores de elétrons ou de hidrogênio aos radicais, em função da sua capacidade de redução e remodelamento estrutural, por sua capacidade em quelar metais de transição implicados em processos oxidativos e quanto ao local de ação variando conforme sua lipofilia ou hidrofilia (Manach et al., 2004).

2.2.1 Antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos

Os antioxidantes enzimáticos são produzidos endogenamente e fazem parte de um complexo sistema de detoxificação de três fases, altamente conservado entre os organismos eucariotos. Segundo Sarkadi et al. 2006, as proteínas de detoxificação envolvidas neste processo são classificadas em Fase I, II e III, onde a citocromo P450 monooxigenase (CYP) é a principal enzima envolvida na Fase I do metabolismo xenobiótico. E ainda, uma rede de enzimas atuam no processo de detoxificação na Fase II, tais como, superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) e glutathione transferase (GST). A SOD atua transformando dois ânions radicais superóxidos em um peróxido de hidrogênio, podendo ocorrer de três isoformas dependendo do metal associado a ela, sendo cobre (Cu) e zinco (Zn) no citoplasma e o manganês (Mn) na matriz mitocondrial de eucariotos e o ferro (Fe) em bactérias (Pérez et al., 2009). A CAT tem a função de proteger as células catalisando a decomposição do peróxido de hidrogênio em oxigênio molecular e água sem produção de radicais livres (McCord, 1986; SIES, 1993; Ratnam et al., 2006). A GPx é uma enzima localizada no citosol e na matriz mitocondrial, que reduz o peróxido de hidrogênio e hidropeptídeos orgânicos utilizando a glutathione (GSH). A GSH atua como co-substrato da GPx, com propriedade doadora de elétrons, podendo ser regenerada através da glutathione reductase (GR) com transferência de hidrogênio do NADPH (Nunes, 2011). A GPx geralmente ocorre associada ao selênio (Se). Os principais locais de ação da GPx são o fígado e os eritrócitos, podendo ocorrer no coração, pulmões e músculos. Finalmente na Fase III de

detoxificação, os conjugados tóxicos são bombeados para fora da célula por transportadores cassetes de ligação de ATP (Transportador ABC) ou outros transportadores (Sarkadi et al., 2006). As GSTs são enzimas da fase III do processo de detoxificação metabólica, presentes em quase todos os seres vivos. Elas catalisam a conjugação de vários eletrófilos com a glutathione reduzida (GSH) e, conseqüentemente, detoxificam compostos tóxicos endógenos e exógenos (xenobióticos). Além disso, protegem os tecidos contra danos oxidativos e estão envolvidas no transporte intracelular de substratos hidrofóbicos específicos (Frova, 2006). Estas enzimas estão divididas em três principais grupos, de acordo com sua localização na célula: citosólicas, microsossomais e mitocondriais (Sheehan et al., 2001).

2.2.2 Antioxidantes naturais

Os antioxidantes naturais, também classificados como não enzimáticos, podem ser obtidos através de fontes dietéticas. São encontrados em alimentos de origem vegetal, representados em sua maioria pela classe de compostos fenólicos. As demais classes incluem, compostos organosulfurados, minerais (Cu, Zn, Mn e Se), cofatores, vitaminas (A e E) e carotenoides, que desempenham importantes papéis na manutenção da saúde humana (Barbosa et al., 2010).

Os compostos fenólicos e flavonoides, os carotenoides β -caroteno (pró - vitamina A) e licopeno, os pigmentos lipofílicos de clorofilas e o ácido ascórbico, estão entre os principais antioxidantes naturais de origem dietética, amplamente encontrados em fontes vegetais, incluindo as hortaliças e frutos.

Os compostos fenólicos são metabólitos secundários encontrados em frutos, possuem em sua estrutura pelo menos um anel aromático ligado a um ou mais agrupamentos hidroxilas (Haminiuk et al., 2012). Os flavonoides são substâncias fenólicas de baixo peso molecular e possuem em sua estrutura química anéis aromáticos, tendo como base o 2-fenil-benzopirano (C6-C3- C6) (Aherne & O'brien, 2002). Os flavonoides são encontrados em diversos alimentos de origem vegetal, como maçã, uva, cebola, repolho, brócolis, chicória, aipo, açaí, cacau, chá e vinho tinto sendo, portanto, constituintes da dieta humana (Youdim & Joseph, 2001).

Os carotenoides são pigmentos naturais, metabolizados por plantas, algas e bactérias fotossintéticas, sendo responsáveis pelas cores amarelas, laranja e vermelhas em várias frutas e vegetais (Namitha & Negi, 2010). Os carotenoides podem ser

classificados em dois grupos de acordo com os grupos funcionais: xantofilas, contendo oxigênio como grupo funcional, incluindo luteína e zeaxantina, e os carotenos, que contêm apenas uma cadeia hidrocarbonada sem qualquer grupo funcional, como o α -caroteno, o β -caroteno e o licopeno (Saini et al., 2015). Os carotenoides dietéticos, exercem atividades biológicas, como a atividade antioxidante e precursores da provitamina A (β -caroteno, α -caroteno, β -criptoxantina, etc.), apresentam propriedades quimiopreventivas, melhora da resposta imune e defesa celular contra as espécies reativas (Delgado-Pelayo et al., 2014). As clorofilas são pigmentos naturais, definidos como compostos lipofílicos e são sintetizados e acumulados em organelas especializadas (cloroplastos e cromoplastos) nas células vegetais (Delgado-Pelayo et al., 2014). A clorofila compreende uma família de moléculas semelhantes entre si, designadas de clorofila a, b, c e d. Estruturalmente são moléculas complexas, pertencentes à classe das porfirinas, formadas por quatro anéis pirrólicos e um quinto anel isocíclico (Lanfer-Marquez, 2003). A cor verde dos vegetais e da maioria dos frutos não maduros é devido à ocorrência conjunta de clorofilas e carotenoides, enquanto que a cor do fruto maduro é frequentemente devido à presença de carotenoides (Britton & Hornero-Méndez, 1997). Estudos demonstraram que os pigmentos de clorofila exibem uma série de propriedades biológicas, como atividades antioxidantes e antimutagênicas, modulação da atividade enzimática de metabolização xenobiótica e indução de eventos apoptóticos em linhagens celulares de câncer (Dashwood, 1997 e Ferruzzi & Blakeslee, 2007).

O ácido ascórbico atua estabilizando as EROs por transferência de elétrons, inibindo a peroxidação lipídica (Flora, 2009). Também atua na proteção contra a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade, reduzindo a progressão da aterosclerose (Frei, 1994). Em sistemas biológicos, o ácido ascórbico se encontra na forma de ascorbato, sendo que nesta configuração é capaz de atuar como antioxidante (Vasconcelos et al., 2007). Apesar da gama de benefícios, em altas concentrações o ácido ascórbico pode se tornar pró-oxidante, podendo ocasionar processos de oxidação e peroxidação lipídica nas células (Halliwell, 1994 e Ferreira & Matsubara, 1997).

Entre os minerais destacam-se o zinco, cobre, selênio e magnésio. As vitaminas, em especial o ácido ascórbico tem ação removedora de EROs e também regeneradora de vitamina E (tocoferol), os compostos carotenoides, podem participar em processos

fisiológicos, bioquímicos e celulares neutralizando ou prevenindo as reações químicas deflagradas pelos radicais livres (Sharoni et al., 2004 e Masella et al., 2005).

2.3 Estresse oxidativo

O estresse oxidativo é uma condição biológica marcada por um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas e sua capacidade dinâmica de neutralização por sistemas de defesa antioxidantes (Jiang et al., 2016).

A classe de espécies reativas mais representativas são as espécies reativas de oxigênio (EROs) e as espécies reativas de nitrogênio (ERNs). São consideradas EROs, o superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o radical hidroxila ($\bullet OH$), alcoxila (RO^\bullet), peroxila (ROO^\bullet), oxigênio singlete (1O_2) e o ácido hipocloroso (HOCl) (Girotti & Kriska, 2004). Já as principais classes de ERNs estão o óxido nítrico ($\bullet NO$) e o dióxido de nitrogênio (NO_2). Estas moléculas são denominadas radicais livres e possuem átomos ou grupos de átomos com elétrons desemparelhados na última camada de valência (Halliwell, 2007).

Contudo, o sistema de defesa antioxidante endógeno atua em mecanismos de desintoxicação e de combate as EROs, com o objetivo primordial de manter o processo oxidativo dentro dos limites fisiológicos e passíveis de regulação, impedindo que os danos oxidativos se amplifiquem e causem prejuízos sistêmicos irreparáveis (Kundu & Surh, 2010). Uma vez que, durante o metabolismo celular, os radicais livres são gerados de forma endógena, como os produtos da respiração celular, ou de forma exógena, decorrente da exposição à agentes pró-oxidantes, como radiação ultravioleta, produtos agrotóxicos e químicos carcinogênicos (Burke & Wei, 2009). Esses radicais danificam importantes biomoléculas celulares, tais como DNA, lipídeos, carboidratos e proteínas (Finkel & Holbrook, 2000), ocasionando o desenvolvimento de doenças crônicas e degenerativas, como a aterosclerose, diabetes tipo 2, câncer e doenças neurodegenerativas (Cooke et al., 2003 e Forsberg et al., 2001).

2.4 Doença de Alzheimer

A doença de Alzheimer (DA) é um dos mais importantes distúrbios neurodegenerativos do século XXI associada ao envelhecimento da população (Wojtunik-Kulesza et al., 2016). A DA é caracterizada pelo comprometimento funcional de células neuronais e declínio progressivo da memória e da capacidade cognitiva, refletindo em prejuízos para a linguagem, prática física, comportamental e emocional (Cheignon et al., 2018; Chung et al., 2018; Tramutola et al., 2017).

De acordo com o *World Alzheimer Report*, 46,8 milhões de pessoas sofriam de demência em todo o mundo em 2015; estima-se que a cada 20 anos este número duplique. A DA é a forma mais comum de demência, responsável por 50% a 75% de todas as demências. A maior prevalência é na Ásia (22,9 milhões de pessoas), enquanto a Europa e as Américas respondem por 10,5 e 9,4 milhões de pessoas, respectivamente (Cheignon et al., 2018). As mulheres são mais suscetíveis que os homens a sofrer de DA, devido à sua maior expectativa de vida, e diminuição dos níveis de estrogênio durante o período da menopausa (Janicki & Schupf, 2010).

Dentre os mecanismos descritos na literatura associados com a patogênese da DA, o estresse oxidativo (**Fig. 4**) é o mais elucidado, pois a oxidação de biomoléculas, entre elas os ácidos nucleicos, os lipídios e as proteínas, perturbam a integridade das células neuronais (Cheignon et al., 2017), desencadeando uma série de eventos tóxicos no sistema nervoso. As primeiras evidências sobre os danos do processo oxidativo na patogênese da DA foi relatada em 1984, por Glenner e Wong, que detectaram o peptídeo amiloide na forma agregada no cérebro de pacientes com DA.

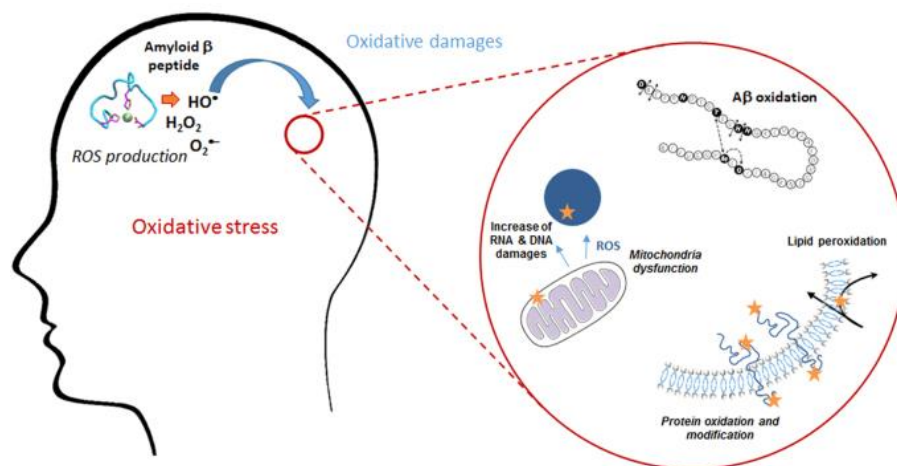


Figura 4. Estresse oxidativo e o peptídeo beta amiloide (β A) na doença de Alzheimer. (Fonte: Cheignon et al., 2018).

O peptídeo beta amiloide (β A) é formado por 38 a 43 aminoácidos, sua produção ocorre após a clivagem enzimática da proteína precursora amiloide (PPA), uma proteína transmembrana expressa em vários tecidos, especialmente no sistema nervoso central (SNC) (Cheignon et al., 2017). Normalmente a PPA é clivada por duas enzimas, a α -secretase e γ -secretase, no entanto na patogênese da DA, outra enzima, a β -secretase, acaba atuando antes da α -secretase, dando origem ao peptídeo tóxico β A. O peptídeo β A tem capacidade de se autoassociar e acumular-se no espaço extracelular, através de conformações β -folha, fibrilares, oligoméricas e por fim formar placas senis, encontradas principalmente na região do hipocampo (Caruso et al., 2018 e Tramutola et al., 2017).

Estudos sugerem que acúmulos de oligômeros causam toxicidade para células neuronais por sua capacidade de permeabilizar em membranas celulares, iniciando uma série de eventos, entre eles estresse oxidativo, que levam à disfunção e morte celular. Ainda com relação ao estresse oxidativo, os subprodutos gerados por este processo, especialmente moléculas reativas agregadas aos íons metálicos como zinco, ferro e cobre são moduladores e foram encontrados em placas amilóides (Lovell et al., 1998). Os íons Cu e Zn, foram descritos por supostamente desempenhar um papel modulador na agregação de peptídeos amiloides $A\beta$. Além disso, os peptídeos amiloides $A\beta$ unidos a íons metálicos, tais como íons de cobre, são considerados os mais tóxicos, pois podem produzir espécies reativas de oxigênio, deletérias para o próprio peptídeo $A\beta$ e para as biomoléculas circundantes (Cheignon et al., 2018).

Considerando os aspectos gerais da patogênese da DA, a identificação de compostos bioativos que desempenhem funções biológicas, em especial atividade antioxidante, apresentam grande relevância para o desenvolvimento de produtos nutracêuticos que possam atuar em tratamentos neuroprotetores.

2.5 Envelhecimento e Longevidade

Envelhecimento e longevidade são dois conceitos correlacionados, mas possuem significações diferentes. Neste sentido, envelhecimento é um processo que se opõe à longevidade, no qual ocorre uma série de eventos químicos e bioquímicos indesejados, levando a um declínio funcional e fisiológico do organismo (Yanase et al., 2019). Enquanto a longevidade é dependente de genes envolvidos no processo de senescência celular que controlam vias metabólicas e sistemas antioxidantes favorecendo a extensão do tempo de vida (Brooks-Wilson, 2013).

Diversas teorias foram propostas para explicar os complexos mecanismos envolvidos nos processos de envelhecimento e longevidade, contudo muitas permanecem pouco compreendidas. Entre os mecanismos moleculares mais elucidados, incluem o estresse oxidativo, caracterizado como processo em que espécies reativas desempenham ação oxidante em importantes macromoléculas, entre elas o DNA, proteínas e lipídios (Zhang et al., 2015).

A diminuição da eficiência do metabolismo leva as células ao processo de morte e/ou senescência. Além disso, o comprometimento de biomoléculas causado por danos oxidativos aumentam os níveis de citocinas pró-inflamatórias e resultam em patologias associadas ao envelhecimento (González-Reyes et al., 2015). As patologias associadas ao envelhecimento, também são conhecidas como DRAs (doenças relacionadas à idade), entre elas, são descritas o câncer, aterosclerose, doenças metabólicas e neurodegenerativas que em conjunto, conduzem alterações metabólicas que também podem levar a diminuição da expectativa de vida (Giorgi et al., 2019).

Diversos estudos têm demonstrado que alterações nutricionais e manipulações genéticas podem modular o envelhecimento e a longevidade (Katewa e Kapahi, 2010; Boccardi et al., 2016; Cătană et al., 2018). Acredita-se que a modulação da longevidade ocorra via mecanismos que envolvem hormeses através da regulação de processos que reduzem danos em biomoléculas sejam aqueles decorrentes do processo oxidativo ou do próprio envelhecimento. Assim, para entender os mecanismos moleculares que controlam o envelhecimento e a longevidade, pesquisadores utilizam ferramentas da genética e da farmacologia para manipular funções celulares específicas em organismos modelos.

2.6 Modelo biológico: *Caenorhabditis elegans*

O nematódeo *Caenorhabditis elegans* foi utilizado pela primeira vez por Sydney Brenner, e descrito como um organismo experimental apropriado para estudos genéticos, no qual se podia determinar a estrutura completa do sistema nervoso (Brenner, 1974 e Sin et al., 2014). O *C. elegans* se tornou um importante modelo de experimentação animal empregado em várias linhas de pesquisas, incluindo desenvolvimento, neurobiologia, genética, envelhecimento e aplicações farmacêuticas. *C. elegans* é um nematoide de vida livre, encontrado no solo e também em isolados de matéria vegetal em decomposição (Frézal & Félix, 2015). Muitos são os atributos experimentais que tornaram o *C. elegans* um modelo animal bem-sucedido e com um número cada vez maior de publicações científicas (Mota & Diogo, 2001). O nematoide apresenta pequeno comprimento de aproximadamente 1,3 mm e diâmetro de 80 µm, sendo possível realizar a manutenção de grandes quantidades de espécimes (10.000 nematoides/placa) em placas de Petri contendo o meio de cultivo NGM (*Nematode Growth Media*) e bactérias atenuadas *Escherichia coli* (fonte de alimento) (**Fig. 5**). A grande capacidade reprodutiva, pois um hermafrodita gera entre 200 a 300 descendentes (Nayak et al., 2004). A população de nematoides, em sua maioria, apresenta a forma sexual de 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). Curto ciclo de vida (**Fig. 6**), aproximadamente 21 dias, possibilitando a execução de estudos relacionados à longevidade em um espaço temporal impraticável em modelos clássicos de mamíferos.

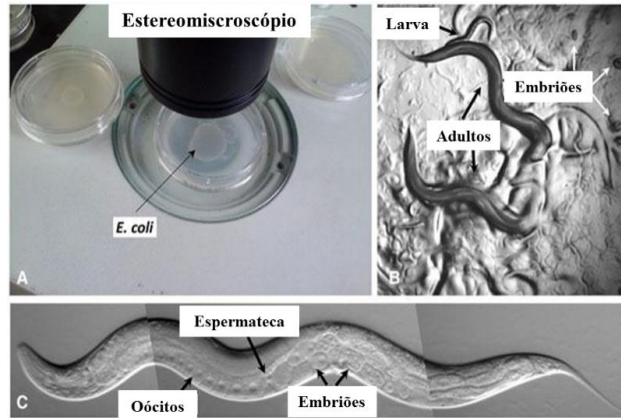


Figura 5. Observações sobre o *C. elegans*. (A) Placa de cultivo observada em lupa estereomicroscópica. (B) *C. elegans* N2 observados em estereoscópio. (C) Nematóide hermafrodita adulto observado em microscópio. Adaptado: Worm Book (2017).

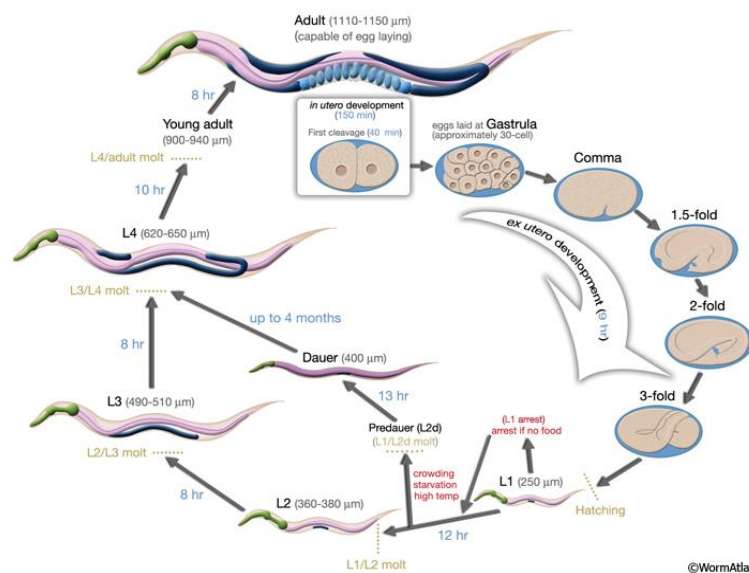


Figura 6. Ciclo de vida de *C. elegans* a 22°C. 0 min é o tempo de fertilização. Números em azul ao longo das setas indicam o tempo que o nematóide passa em um determinado estágio. A primeira mudança ocorre em cerca de 40 min. pós-fertilização (L1). O comprimento do nematóide (μm) em cada fase é indicado ao lado da descrição das fases larvais (L) e adulta. Fonte: WormAtlas.

A conservação de genes e vias de sinalizações, entre mamíferos e *C. elegans*, desperta o interesse por estudos que elucidam mecanismos celulares (Kaletta & Hengartner, 2006). Diversas vias metabólicas e comportamentos complexos são conservadas entre *C. elegans* e os mamíferos, compreendendo síntese de lipídios, carboidratos e proteínas, reguladores de lipogênese, complexos de quinases, autofagia,

entre outros. Na literatura, encontra-se consagrada 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, como estresse oxidativo e térmico, estímulos gonadais via restrição calórica e também se associa a doenças como o câncer, diabetes mellitus tipo II, Alzheimer e Huntington (Ihara et al., 2017; Keshet et al., 2017; Hesp et al., 2015).

Organismos modelos que mimetizam as respostas humanas oferecem enormes oportunidades para avaliar o papel potencial dos produtos naturais nas doenças neurodegenerativas (Sangha et al., 2012). Neste estudo, utilizamos a cepa transgênica *CL2006* (Fig. 7), que mimetiza modelo experimental da Doença de Alzheimer. Estas linhagens quando induzidas a temperatura permissiva (25 °C), apresentam um fenótipo de paralisia de início adulto, com formação constitutiva de peptídeos amiloides (β A) nas células musculares da parede do corpo (McColl et al., 2009).



Figura 7. *C. elegans* CL2006 modelo transgênico para doença de Alzheimer (Fonte: Yang et al., 2017).

Neste sentido, o nematoide *C. elegans* é considerado um importante modelo para estudos que envolvem o envelhecimento e doenças neurodegenerativas, que são facilitados por um grande número de linhagens transgênicas que expressam fenótipos relacionados aos processos oxidativos e degenerativos. Cabe ressaltar que nos últimos anos a consolidação deste modelo biológico na pesquisa foi viabilizada por colaborações entre os laboratórios nacionais e internacionais, aplicações de protocolos, ampliação de bases de dados virtuais (*WormAtlas*, *WormBase* e *WormBook*) e armazenamento e distribuição de cepas mutantes e/ou transgênicas, como o *Caenorhabditis Genetics Center* (CGC).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivos Gerais

Avaliar a composição química dos frutos *Campomanesia adamantium*, *Hancornia speciosa* e *Caryocar brasiliense* e investigar a atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo*, utilizando o modelo experimental *Caenorhabditis elegans*.

3.1.1 Objetivos Específicos

- Desenvolver um processo de produção de polpas de frutos do Cerrado capaz de preservar propriedades funcionais e nutraceuticas.

- Identificar a composição química e avaliar a atividade antioxidante *in vitro* das polpas dos frutos de *C. adamantium* (CAFP), *C. brasiliense* (CBFP) e do fruto de *H. speciosa* (HSFL).

- Avaliar os efeitos toxicológicos e parâmetros *in vivo* associados à qualidade de vida, entre eles, a capacidade reprodutiva, a locomoção e longevidade em *C. elegans* tratados com as polpas dos frutos de *C. adamantium* (CAFP), *C. brasiliense* (CBFP) e do fruto de *H. speciosa* (HSFL).

- Avaliar o efeito protetor das polpas dos frutos de *C. adamantium* (CAFP), *C. brasiliense* (CBFP) e do fruto de *H. speciosa* (HSFL) contra o estresse térmico e oxidativo e os possíveis mecanismos envolvidos.

- Investigar os efeitos das polpas dos frutos de *C. adamantium* (CAFP), *C. brasiliense* (CBFP) e do fruto de *H. speciosa* (HSFL) sobre a paralisia induzida por peptídeos A β em *C. elegans* transgênicos para Doença de Alzheimer.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHERNE, S.A. & O'BRIEN, N.M. Dietary flavonols: chemistry, food content and metabolism. *Nutrition*, v.18, p.75-81, 2002.

AJALLA, A. C. A., VIEIRA, M. C., VOLPE, E. D. I. M. I. L. S. O. N., & ZÁRATE, N. A. H. Crescimento de mudas de *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg (guavira), submetidas a três níveis de sombreamento e substratos. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 36(2), 449-458, 2014.

ALMEIDA, L., NOGUEIRA, C. A., BORGES, P. P., PRADO, A. D. L., & GONCALVES, P. J. State of the art of scientific literature on *Hancornia speciosa*: trends and gaps. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 38(4), 2016.

ALMEIDA, S. P. & SILVA, J. A. Piqui e buriti: importância alimentar à população dos Cerrados. Brasília: Documentos, v.1, p.1-38, 1994.

ALMEIDA, S. D., PROENÇA, C. E. B., SANO, S. M., & RIBEIRO, J. F. Cerrado: espécies vegetais úteis. Planaltina: Embrapa-CPAC, v.1, p.464, 1998.

AMARAL L. F., MORIEL P., FOGGIO M. A., MAZZOLA P. G. *Caryocar brasiliense* supercritical CO₂ extract possesses antimicrobial and antioxidant properties useful for personal care products. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, v.14, p.73, 2014.

AZEVÊDO, J.C.S., BORGES, K.C., GENOVESE, M.I., CORREIA, R.T. E 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.

BAILÃO E. F. L. C., DEVILLA I. A., DA CONCEIÇÃO E. C., BORGES L. L. Bioactive Compounds Found in Brazilian Cerrado Fruits. *International Journal of Molecular Sciences*, v.16(10), p.23760-23783, 2015.

BARBOSA, K. B. F., COSTA, N. M. B., ALFENAS, R. C. G., DE PAULA, S. O., MINIM, V. P. R., & BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. *Revista de Nutrição*, v.23 (4), p.629-643, 2010.

BATLE-BAYER, L.; BATJES, N. H.; BINDRABAN, P. S. Changes in organic carbon stocks upon land use conversion in the Brazilian Cerrado: A review. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, v. 137, p. 47-57, 2010.

BOCCARDI, V., PAOLISSO, G., & MECOCCI, P. Nutrition and lifestyle in healthy aging: the telomerase challenge. *Aging (Albany NY)*, 8(1), 12, 2016.

BONANOMI, J., TORTATO, F. R., RAPHAEL DE SOUZA, R. G., PENHA, J. M., BUENO, A. S., & PERES, C. A. Protecting forests at the expense of native grasslands: Land-use policy encourages open-habitat loss in the Brazilian Cerrado biome. *Perspectives in Ecology and Conservation*, 17(1), 26-31, 2019.

BONOMO L., SILVA D., BOASQUIVIS P., PAIVA F., GUERRA J., MARTINS T. Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) modulates oxidative stress resistance in *Caenorhabditis elegans* by direct and indirect mechanisms. *PLoS One*, v.9 (3), p. 89933, 2014.

BORGES, J. C. A. CARACTERÍSTICAS BOTÂNICAS, ASPECTOS NUTRICIONAIS E EFEITOS TERAPÊUTICOS DO PEQUI (*Caryocar brasiliense*). Seminário. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás. 2011.

BORGHI, C., & CICERO, A. F. Nutraceuticals with a clinically detectable blood pressure-lowering effect: a review of available randomized clinical trials and their meta-analyses. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 83(1), 163-171, 2017.

BRANDÃO, G. C., KROON, E. G., SANTOS, J. R. D., STEHMANN, J. R., LOMBARDI, J. A., & OLIVEIRA, A. B. D. Antiviral activities of plants occurring in the state of Minas Gerais, Brazil: Part 2. Screening *Bignoniaceae* species. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.20 (5), p.742-750, 2010.

BREDA, C. A., GASPERINI, A. M., GARCIA, V. L., MONTEIRO, K. M., BATAGLION, G. A., EBERLIN, M. N., & DUARTE, M. C. T. Phytochemical analysis and antifungal activity of extracts from leaves and fruit residues of Brazilian Savanna plants aiming its use as safe fungicides. *Natural Products and Bioprospecting*, v.6 (4), p.195-204, 2016

BRITTON, G. & HORNERO-MENDEZ, D. Carotenoids and colour in fruit and vegetables. OXFORD UNIVERSITY PRESS INC. In *Proceedings-Phytochemical Society of Europe*, v.41, p.11-28, 1997.

BURKE, K. E., & WEI, H. Synergistic damage by UVA radiation and pollutants. *Toxicology and Industrial Health*, v.25(4-5), p.219-224, 2009.

BUSINARO, R., CORSI, M., ASPRINO, R., DI LORENZO, C., LASKIN, D., CORBO, R. M., ... & PINTO, A. Modulation of inflammation as a way of delaying Alzheimer's Disease progression: The Diet's Role. *Current Alzheimer Research*, v.14, 2017.

BUTTERFIELD, D. A., & HALLIWELL, B. Oxidative stress, dysfunctional glucose metabolism and Alzheimer disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 1, 2019.

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

BROOKS-WILSON A. R. Genetics of healthy aging and longevity. *Human Genetics*, 132(12), 1323-38, 2013.

CAMPOS, J. F., ESPINDOLA, P. P., TORQUATO, H. F., VITAL, W. D., JUSTO, G. Z., SILVA, D. B., ... & 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*, 8, 466, 2017.

CARDOSO, C. A. L., SALMAZZO, G. R., HONDA, N. K., PRATES, C. B., VIEIRA, M. D. C., & COELHO, R. G. Antimicrobial activity of the extracts and fractions of hexanic fruits of *Campomanesia* species (Myrtaceae). *Journal of Medicinal Food*, v.13 (5), p.1273-1276, 2010.

CARUSO, A., NICOLETTI, F., MANGO, D., SAIDI, A., ORLANDO, R., & SCACCIANOCE, S. Stress as risk factor for Alzheimer's disease. *Pharmacological Research*, 132, 130-134, 2018.

CHANDA, S., TIWARI, R. K., KUMAR, A., & SINGH, K. Nutraceuticals Inspiring the Current Therapy for Lifestyle Diseases. *Advances in Pharmacological Sciences*, v2019.

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*, 14, 450-464, 2018.

CHEIGNON, C., JONES, M., ATRIÁN-BLASCO, E., KIEFFER, I., FALLER, P., COLLIN, F., & HUREAU, C. Identification of key structural features of the elusive Cu-A β complex that generates ROS in Alzheimer's disease. *Chemical Science*, 8(7), 5107-5118, 2017.

CHUNG, J., CHAU, S. A., HERRMANN, N., LANCTÔT, K. L., & EIZENMAN, M. Detection of Apathy in Alzheimer Patients by Analysing Visual Scanning Behaviour with RNNs. In *Proceedings of the 24th ACM SIGKDD International Conference on Knowledge Discovery & Data Mining* (pp. 149-157), 2018.

CORDEIRO, M. W. S., Cavallieri, A. L. F., FERRI, P. H., & NAVES, M. M. V. Características físicas, composição químico-nutricional e dos óleos essenciais da polpa de *Caryocar brasiliense* nativo do Estado de Mato Grosso. *Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal*, v.35 (4), p.1127-1139, 2013.

COOKE, M. S., EVANS, M. D., DIZDAROGLU, M., & LUNEC, J. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *The FASEB Journal*, v.17 (10), p.1195-1214, 2003.

CORSI, A. K., WIGHTMAN, B., & CHALFIE, M. A transparent window into biology: a primer on *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, v. 200(2), p.387-407, 2015.

COSTA, E. S., HIRUMA-LIMA, C. A., LIMA, E. O., SUCUPIRA, G. C., BERTOLIN, A. O., LOLIS, S. F., ... & SOUZA-BRITO, A. R. M. Antimicrobial activity of some medicinal plants of the Cerrado, Brazil. *Phytotherapy Research*, v. 22(5), p.705-707, 2008.

COUTINHO I.D., CARDOSO C.A.L., RÉ-POPPI N., MELO A.M., VIEIRA M.C., HONDA N.K. Cromatografia de gás - Espectrometria de massa (GC-MS) avaliação de atividades antioxidantes e antimicrobianas de óleo essencial de *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O Berg. (Guavira). *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v.45, p.767-776, 2009.

COUTINHO, I. D., KATAOKA, V. M., HONDA, N. K., COELHO, R. G., VIEIRA, M. C., & CARDOSO, C. A. Influência da variação sazonal nos teores de flavonóides e atividade antioxidante das folhas de *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg, Myrtaceae. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.20 (3), p.322-327, 2010.

DASHWOOD, R. Chlorophylls as anticarcinogens. *International Journal of Oncology*, v.10 (4), p.721-727, 1997.

DE MELLO MORAES, T., RODRIGUES, C. M., KUSHIMA, H., BAUAB, T. M., VILLEGAS, W., PELLIZZON, C. H., ... & HIRUMA-LIMA, C. A. *Hancornia speciosa*: Indications of gastroprotective, healing and anti-*Helicobacter pylori* actions. *Journal of Ethnopharmacology*, 120(2), 161-168, 2008.

DELGADO-PELAYO, R., GALLARDO-GUERRERO, L., & HORNERO-MÉNDEZ, D. Chlorophyll and carotenoid pigments in the peel and flesh of commercial apple fruit varieties. *Food Research International*, v.65, p.272-28, 2014.

DE OLIVEIRA, T. S., THOMAZ, D. V., DA SILVA NERI, H. F., CERQUEIRA, L. B., GARCIA, L. F., GIL, H. P. V., ... & DE SOUZA GIL, E. Neuroprotective Effect of *Caryocar brasiliense* Camb. Leaves Is Associated with Anticholinesterase and Antioxidant Properties. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018.

DOS SANTOS NEVES, J., FRANCHIN, M., ROSALEN, P. L., OMAR, N. F., DOS SANTOS, M. A., PASCHOAL, J. A. R., & NOVAES, P. D. Evaluation of the osteogenic potential of *Hancornia speciosa* latex in rat calvaria and its phytochemical profile. *Journal of Ethnopharmacology*, 183, 151-158, 2016.

DOS 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*, 2018.

DURIGAN, G., BAITELLO, J. B., FRANCO, G. A. D.; SIQUEIRA, M. F. Plantas do cerrado paulista: imagens de uma paisagem ameaçada. São Paulo: Páginas & Letras, v. (1), p.475, 2004.

EPSTEIN, L. Mangaba: “coisa boa de comer”. *Bahia Agrícola*. v.6 (2), p.19-22.

ESPINDOLA, P. P. D. T., ROCHA, P. D. S. D., CAROLLO, C. A., SCHMITZ, W. O., PEREIRA, Z. V., VIEIRA, M. D. C., ... & DE PICOLI SOUZA, K. Antioxidant and antihyperlipidemic effects of *Campomanesia adamantium* O. Berg root. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016.

FALLER P., HUREAU C., BERTHOUMIEU O. Role of metal ions in the self-assembly of the Alzheimer's amyloid- β peptide. *Inorganic Chemistry*, 52(21):12193–12206, 2013.

FERREIRA, A. L. A. & MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Revista da Associação Médica Brasileira*, v.43, p.61 – 68, 1997.

FERNANDES, T. O., ÁVILA, R. I., MOURA, S. S., RIBEIRO, G. A., NAVES, M. M. V., & VALADARES, M. C. *Campomanesia adamantium* (Myrtaceae) fruits protect HEPG2 cells against carbon tetrachloride-induced toxicity. *Toxicology Reports*, v.2, p.184-193, 2015.

FERNANDO, W. M. A. D. B., MARTINS, I. J., GOOZEE, K. G., BRENNAN, C. S., JAYASENA, V., & MARTINS, R. N. The role of dietary coconut for the prevention and treatment of Alzheimer's disease: potential mechanisms of action. *British Journal of Nutrition*, 114(1), 1-14, 2015.

FERREIRA, L. C., GRABE-GUIMARÃES, A., DE PAULA, C. A., MICHEL, M. C., GUIMARÃES, R. G., REZENDE, S. A., ... & SAÚDE-GUIMARÃES, D. A. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Campomanesia adamantium*. *Journal of Ethnopharmacology*, v.145(1), p.100-108, 2013.

FERRUZZI, M. G., & BLAKESLEE, J. Digestion, absorption, and cancer preventative activity of dietary chlorophyll derivatives. *Nutrition Research*, v.27 (1), p.1-12, 2007.

FINKEL, T., & HOLBROOK, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, v.408(6809), p.239-247, 2000.

FLORA, S. J. Structural, chemical and biological aspects of antioxidants for strategies against metal and metalloid exposure. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v.2 (4), p.191-206, 2009.

FORSBERG, H., GILSTRING, C. F., ZARGARI, A., MARTÍNEZ, P., & LJUNGDAHL, P. O. The role of the yeast plasma membrane SPS nutrient sensor in the metabolic response to extracellular amino acids. *Molecular Microbiology*, v.42 (1), p.215-228, 2001.

FREI, B. Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: Mechanisms of action. *The American Journal of Medicine*, v.97, p. 5-13, 1994.

FRÉZAL, L., & FÉLIX, M. A. The natural history of model organisms: *C. elegans* outside the Petri dish. *eLife*, v.4, e05849, 2015.

FROVA, C. Glutathione transferases in the genomics era: new insights and perspectives. *Biomolecular Engineering*, v. 23, n. 4, p. 149-169, 2006.

GANGA, R. M. D., CHAVES, L. J., & NAVES, R. V. Genetic parameters in *Hancornia speciosa* Gomes progenies from Cerrado. *Scientia Forestalis*, v. 37(84), p. 395-404, 2009.

GELLER, F. C., TEIXEIRA, M. R., PEREIRA, A. B. D., DOURADO, L. P. A., SOUZA, D. G., BRAGA, F. C., & SIMÕES, C. M. O. Evaluation of the wound healing properties of *Hancornia speciosa* leaves. *Phytotherapy Research*, v. 29 (12), p.1887-1893, 2015.

GIORGI, C., MARCHI, S., SIMOES, I. C., REN, Z., MORCIANO, G., PERRONE, M., ... & SZYMAŃSKI, J. Mitochondria and reactive oxygen species in aging and age-related diseases. In *International Review of cell and Molecular Biology*, 340, pp. 209-344. Academic Press., 2018.

GIROTTI, A. W., & KRISKA, T. Role of lipid hydroperoxides in photo-oxidative stress signaling. *Antioxidants and Redox Signaling*, v.6(2), p.301-310, 2004.

GLENNER G.G., WONG C.W. Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 120(3):885–890, 1984.

GONZÁLEZ-REYES, R. E., NAVA-MESA, M. O., VARGAS-SÁNCHEZ, K., ARIZA-SALAMANCA, D., & MORA-MUÑOZ, L. Involvement of astrocytes in Alzheimer's disease from a neuroinflammatory and oxidative stress perspective. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 10, 427, 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*, 72, 1-7, 2015.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutrition Reviews*, v.52, p.253 – 265, 1994.

HALLIWELL, B. Antioxidant characterization: methodology and mechanism. *Biochemical Pharmacology*, v.49, p.1341 – 1348, 1995.

HALLIWELL, B. Biochemistry of oxidative stress. *Biochemical Society Transactions*, v.35, p.1147-1150, 2007.

HAMINIUK, C. W., MACIEL, G. M., PLATA-OVIEDO, M. S., & PERALTA, R. M. Phenolic compounds in fruits—an overview. *International Journal of Food Science & Technology*, v.47 (10), p. 2023-2044, 2012.

HEFFRON, S. P., ROCKMAN, C. B., ADELMAN, M. A., GIANOS, E., GUO, Y., XU, J. F., & BERGER, J. S. Greater Frequency of Fruit and Vegetable Consumption Is Associated with Lower Prevalence of Peripheral Artery Disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, v. ATVBAHA-116, 2017.

HONG, G., YU-QING, D. O. N. G., & BO-PING, Y. Cranberry extract supplementation exerts preventive effects through alleviating A β toxicity in *Caenorhabditis elegans* model of Alzheimer's disease. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 14(6), 427-433, 2016.

IHARA, A., UNO, M., MIYATAKE, K., HONJOH, S., & NISHIDA, E. Cholesterol regulates DAF-16 nuclear localization and fasting-induced longevity in *C. elegans*. *Experimental Gerontology*, 87, 40-47, 2017.

JANICKI, S. C., & SCHUPF, N. Hormonal influences on cognition and risk for Alzheimer's disease. *Current Neurology and Neuroscience Reports*, 10(5), 359-366, 2010.

JIANG, T., SUN, Q., & CHEN, S. Oxidative stress: A major pathogenesis and potential therapeutic target of antioxidative agents in Parkinson's disease and Alzheimer's disease. *Progress in Neurobiology*, 147, 1-19, 2016.

KALETTA, T. & HENGARTNER, M. O. Finding function in novel targets: *C. elegans* as a model organism. *Nature Reviews Drug Discovery*, v.5 (5), p.387-398, 2006.

KATEWA, S. D., & KAPAHI, P. Dietary restriction and aging, *Aging Cell*, 9(2), 105-112, 2010.

KESHET, A., MERTENSKÖTTER, A., WINTER, S. A., BRINKMANN, V., DÖLLING, R., & PAUL, R. J. PMK-1 p38 MAPK promotes cadmium stress resistance, the expression of SKN-1/Nrf and DAF-16 target genes, and protein biosynthesis in *Caenorhabditis elegans*. *Molecular Genetics and Genomics*, 292(6), 1341-1361, 2017.

KUNDU, J. K. & SURH, Y. J. Nrf2-Keap1 signaling as a potential target for chemoprevention of inflammation-associated carcinogenesis. *Pharmaceutical Research*, v.27(6), p.999-1013, 2010.

LANFER-MARQUEZ U. M. O papel da clorofila na alimentação humana: uma revisão. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.39 (3), p.227-242, 2003.

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.

LESCANO, C. H., DE OLIVEIRA, I. P., ZAMINELLI, T., DA SILVA BALDIVIA, D., DA SILVA, L. R., NAPOLITANO, M., ... & SANJINEZ-ARGANDONA, E. J.

Campomanesia adamantium peel extract in antidiarrheal activity: the ability of inhibition of heat-stable enterotoxin by polyphenols. PloS One, 11(10), e0165208, 2016.

LIMA, A. D., SILVA, A. D. O., TRINDADE, R. A., TORRES, R. P., & MANCINI-FILHO, J. O. R. G. E. Composição química e compostos bioativos presentes na polpa e na amêndoa do pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.). Revista Brasileira de Fruticultura, v.29(3), p.695-698, 2007.

LOVELL, M. A., ROBERTSON, J. D., TEESDALE, W. J., CAMPBELL, J. L., & MARKESBERY, W. R. Copper, iron and zinc in Alzheimer's disease senile plaques. Journal of the Neurological Sciences, 158(1), 47-52, 1998.

MANACH, C.; SCALBERT A.; MORAND C.; REMESY C. & JIMENEZ, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. American Journal of Clinical Nutrition, v. 79, n.5, p. 727-747, 2004.

MARTINS, R. N., VILLEMAGNE, V., SOHRABI, H. R., CHATTERJEE, P., SHAH, T. M., VERDILE, G., ... & HONE, E. Alzheimer's disease: a journey from amyloid peptides and oxidative stress, to biomarker technologies and disease prevention strategies—gains from AIBL and DIAN cohort studies. Journal of Alzheimer's Disease, 62(3), 965-992, 2018.

MARQUES, S.P.D.; DE OLIVEIRA, I.R.; OWEN, R.W.; TREVISAN, M.T.S. Antioxidant capacity, angiotensin I converting enzyme (ACE) and acetylcholinesterase inhibition by extracts of the leaves and bark of *Hancornia speciosa* Gomes. Hum. Journal, v.4, p.171–183, 2015.

MASELLA, R., DI BENEDETTO, R., VARÌ, R., FILESI, C., & GIOVANNINI, C. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. The Journal of Nutritional Biochemistry, v.16 (10), p.577-586, 2005.

MCCOLL, G., ROBERTS, B. R., GUNN, A. P., PEREZ, K. A., TEW, D. J., MASTERS, C. L., ... & BUSH, A. I. The *Caenorhabditis elegans* A β 1–42 model of Alzheimer disease predominantly expresses A β 3–42. *Journal of Biological Chemistry*, 284(34), 22697-22702, 2009.

MCCORD, J. M. Superoxide dismutase: rationale for use in reperfusion injury and inflammation. *Journal of Free Radicals in Biology & Medicine*, v.2 (5-6), p.307-310, 1986.

MIRANDA-VILELA, A. L., PEREIRA, L. C., GONÇALVES, C. A., & GRISOLIA, C. K. Pequi fruit (*Caryocar brasiliense* Camb.) pulp oil reduces exercise-induced inflammatory markers and blood pressure of male and female runners. *Nutrition Research*, v.29 (12), p.850-858, 2008.

MORAES, F. P. ALIMENTOS FUNCIONAIS E NUTRACÊUTICOS: DEFINIÇÕES, LEGISLAÇÃO E BENEFÍCIOS À SAÚDE. *Revista Eletrônica de Farmácia*, 3(2), (2006).

MOTA, M. M. & DIOGO, A. *Caenorhabditis elegans*: modelo biológico para o século XXI. Laboratório de nematologia/ICAM. Departamento de Biologia- Universidade de Évora, 2001.

NABOUT, J. C., MAGALHÃES, M. R., DE AMORIM GOMES, M. A., DA CUNHA, H. F. The Impact of global climate change on the geographic distribution and sustainable harvest of *Hancornia speciosa* Gomes (Apocynaceae) in Brazil. *Environmental Management*, v.57 (4), p.814–821, 2016.

NAMITHA, K., & NEGI, P. S. Chemistry and biotechnology of carotenoids. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v.50 (8), p.728-760, 2010.

NASCIMENTO, N. R. R., ALVES, A. M., SILVA, M. R., NAVES, M., & VELOSO, M. Antioxidant capacity of pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) pulp is preserved by

freeze-drying and light-resistant packaging. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v.39 (1), 2017.

NAYAK, S., J. GOREE & T. SCHEDL, S; GOREE, J; SCHEDL, T. "Fog-2 and the Evolution of Self-Fertile Hermaphroditism in *Caenorhabditis*". *PLoS Biology*, v.3 (1): e6, 2004.

NUNES, D. S. Avaliação dos efeitos antioxidantes e pró-longevidade do extrato de açaí (*Euterpe oleraceae* Mart.) no organismo modelo *Caenorhabditis elegans*. Tese de Mestrado em Biotecnologia, 2011.

OLIVEIRA L. G., MORENO L. G., MELO D. S., COSTA-PEREIRA, L. V., CARVALHO, M. M. DE F., SILVA, P. H. E., ... ESTEVES, E. A. *Caryocar brasiliense* oil improves cardiac function by increasing Serca2a/PLB ratio despite no significant changes in cardiovascular risk factors in rats. *Lipids in Health and Disease*, v.16 (1), p.37, 2017.

PALMEIRA, S. M., SILVA, P. R., FERRÃO, J. S., LADD, A. A., DAGLI, M. L., GRISOLIA, C. K., & HERNANDEZ-BLAZQUEZ, F. J. Chemopreventive effects of pequi oil (*Caryocar brasiliense* Camb.) on preneoplastic lesions in a mouse model of hepatocarcinogenesis. *European Journal of Cancer Prevention*, v.25 (4), p.299-305, 2016.

PAVAN, F. R., LEITE, C. Q. F., COELHO, R. G., COUTINHO, I. D., HONDA, N. K., CARDOSO, C. A. L., ... & SATO, D. N. Evaluation of anti-Mycobacterium tuberculosis activity of *Campomanesia adamantium* (Myrtaceae). *Química Nova*, v.32 (5), p.1222-1226, 2009.

PEIXOTO, J. D. C., NEVES, B. J., VASCONCELOS, F. G., NAPOLITANO, H. B., BARBALHO, M. G. D. S., & ROSSETO, L. P. Flavonoids from Brazilian Cerrado: Biosynthesis, Chemical and Biological Profile. *Molecules*, 24(16), 2891, 2019.

PEREIRA, A. C., PEREIRA, A. B. D., MOREIRA, C. C., BOTION, L. M., LEMOS, V. S., BRAGA, F. C., & CORTES, S. F. *Hancornia speciosa* Gomes (Apocynaceae) as a potential anti-diabetic drug. *Journal of Ethnopharmacology*, 161, 30-35, 2015.

PÉREZ, V. I., BOKOV, A., VAN REMMEN, H., MELE, J., RAN, Q., IKENO, Y., & RICHARDSON, A. Is the oxidative stress theory of aging dead?. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, v.1790(10), p.1005-1014, 2009.

PEREZ-CORNAGO, A., TRAVIS, R. C., APPLEBY, P. N., TSILIDIS, K. K., TJONNELAND, A., OLSEN, A., ... & PEPPA, E. Fruit and vegetable intake and prostate cancer risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC). *International Journal of Cancer*, 2017.

PORTH, C. M. & MATFIN, G., 2010. *Fisiopatologia*. Rio de Janeiro. Editora Guanabara Koogan. 1, 1 – 911.

RATNAM, D. V., ANKOLA, D. D., BHARDWAJ, V., SAHANA, D. K., & KUMAR, M. R. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. *Journal of Controlled Release*, v.113 (3), p.189-207, 2006.

ROCHA. M. S. Compostos, bioativos e atividade antioxidante (*in vitro*) de frutos do cerrado piauiense. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição da Universidade Federal do Piauí-UFPI, 2011.

RODRIGUES, A. G. Buscando raízes. Editora Horizontes Antropológicos. v. 7 (16), p.131-144, 2001.

ROESLER, R., CATHARINO, R. R., MALTA, L. G., EBERLIN, M. N., & PASTORE, G. Antioxidant activity of *Caryocar brasiliense* (pequi) and characterization of components by electrospray ionization mass spectrometry. *Food Chemistry*, v.110 (3), p.711-717, 2008.

ROLL, M. M., MIRANDA-VILELA, A. L., LONGO, J. P. F., AGOSTINI-COSTA, T. D. S. & GRISOLIA, C. K. The pequi pulp oil (*Caryocar brasiliense* Camb.) provides protection against aging-related anemia, inflammation and oxidative stress in Swiss mice, especially in females. *Genetics and Biology Molecular*, 41 (4), 858-869, 2018.

ROSA, F. R. Atividade antioxidante de frutos do Cerrado e identificação de compostos em *Bactris setosa* Mart., *Palmae* (Tucum-do-Cerrado). Tese de Doutorado em Nutrição Humana. Universidade de Brasília, 2013

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.

SANGHA, J. S., SUN, X., WALLY, O. S., ZHANG, K., JI, X., WANG, Z., WANG, Y., ZIDICHOUSKI, J., PRITHIVIRAJ, B., ... ZHANG, J. Liuwei Dihuang (LWDH), a traditional Chinese medicinal formula, protects against β -amyloid toxicity in transgenic *Caenorhabditis elegans*. *PloS One*, 7(8), e43990, 2012.

SANTOS, J. T. S., COSTA, F. S. C., SOARES, D. S. C., CAMPOS, A. F. P., CARNELOSSI, M. A. G., NUNES, T. P., & JÚNIOR, A. M. O. Avaliação de mangaba liofilizada através de parâmetros físico-químicos. *Scientia Plena*, v.8, p.1-5, 2012.

SANTOS, U. P., CAMPOS, J. F., TORQUATO, H. F. V., PAREDES-GAMERO, E. J., CAROLLO, C. A., ESTEVINHO, L. M., ... & 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(12), p.0167531, 2016.

SARKADI, B., HOMOLYA, L., SZAKÁCS, G., & VÁRADI, A. Human multidrug resistance ABCB and ABCG transporters: participation in a chemoimmunity defense system. *Physiological Reviews*, v.86 (4), p.1179-1236, 2006.

SHARONI, Y., DANILENKO, M., DUBI, N., BEN-DOR, A., & LEVY, J. Carotenoids and transcription. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v.430 (1), p.89-96, 2004.

SHEEHAN, D., MEADE, G., FOLEY, V. M., & DOWD, C. A. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochemical Journal*, v. 360, pt. 1, p. 1-16, 2001.

SIES, H. Strategies of antioxidant defense. *The FEBS Journal*, v.215 (2), p. 213-219, 1993.

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. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.01.015>.

SILVA, G. C., BRAGA, F. C., LEMOS, V. S., & CORTES, S. F. Potent antihypertensive effect of *Hancornia speciosa* leaves extract. *Phytomedicine*, 23(2), 214-219, 2016.

SILVA, M. R.; CAVALCANTE, D. B. L. L.; SANTOS, G. G.; MARTINS, D. M. O. Caracterização química de frutos nativos do Cerrado. *Revista Ciência Rural*, v. 38 (6), p.1790-1793, 2008.

SOARES, A. N. R., VITÓRIA, M. F., NASCIMENTO, A. L. S., LEDO, A. S., RABBANI, A. R. C., & SILVA, A. V. C. Genetic diversity in natural populations of mangaba in Sergipe, the largest producer State in Brazil. *Genetics and Molecular Research*, v.15 (3), p.1503-8624, 2016.

SOARES, S. Ácidos fenólicos como antioxidantes. *Revista Nutrição*, v.15 (1), p. 71-81, 2002.

SOUZA, J. C., PICCINELLI, A. C., AQUINO, D. F., DE SOUZA, V. V., SCHMITZ, W. O., TRAESEL, G. K., ... & ARENA, A. C. Toxicological analysis and antihyperalgesic, antidepressant, and anti-inflammatory effects of *Campomanesia adamantium* fruit barks. *Nutritional Neuroscience*, v.20(1), p.23-31, 2017.

SUNKARA, R., & VERGHESE, M. (2014). Functional foods for obesity management. *Food and Nutrition Sciences*, v.5 (14), p.14-11, 2014.

TORRES-RÊGO, M., FURTADO, A. A., BITENCOURT, M. A. O., LIMA, M. C. J. S., ANDRADE, R. C. L. C., AZEVEDO, E. P., ... & FERNANDES-PEDROSA, M. F. Anti-inflammatory activity of aqueous extract and bioactive compounds identified from the fruits of *Hancornia speciosa* Gomes (Apocynaceae). *BMC Complementary and Alternative Medicine*, v.16, p. 275, 2016.

TRAESEL, G. K., MENEGATI, S. E. L. T., DOS SANTOS, A. C., SOUZA, R. I. C., BOAS, G. R. V., JUSTI, P. N., ... & OESTERREICH, S. A. Oral acute and subchronic toxicity studies of the oil extracted from pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) pulp in rats. *Food and Chemical Toxicology*, v.97, p.224-231, 2016.

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.

VALLILO, M. I., LAMARDO, L. C. A., GABERLOTTI, M. L., OLIVEIRA, E. D., & MORENO, P. R. H. Composição química dos frutos de *Campomanesia adamantium* (Cambess) O. Berg. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.26(4), p.725-955, 2006.

VASCONCELOS, S. M. L., GOULART, M. O. F., MOURA, J. B. F., MANFREDINI, V., BENFATO, M. S., KUBOTA, L. T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. *Química Nova*, v.30, p.1323 – 1338, 2007.

VAYNDORF, E. M., LEE, S. S., & LIU, R. H. Whole apple extracts increase lifespan, healthspan and resistance to stress in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Functional Foods*, v. 5 (3), p. 1235-1243, 2013.

VIEIRA, M.C.; PEREZ, V.B.; HEREDIA, Z.N.A.; SANTOS, M.C.; PELLOSO, I.A.O.; PESSOA, S.M. Effect of nitrogen and phosphorus supply on initial development of guavira [*Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg] cultivated in pots. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 13, p. 542-549, 2011.

VISCARDI, D. Z., DE OLIVEIRA, V. S., ARRIGO, J. D. S., PICCINELLI, A. C., CARDOSO, C. A., MALDONADE, I. R., ... & SANJINEZ-ARGANDOÑA, E. J. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of *Campomanesia adamantium* microencapsulated pulp. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.27 (2), p. 220-227, 2017.

WILLIAMS, P. T. Lower risk of Alzheimer's disease mortality with exercise, statin, and fruit intake. *Journal of Alzheimer's Disease*, 44(4), 1121-1129, 2015.

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*, 78, 39-49, 2016.

YANASE, S., ISHII, T., YASUDA, K., & ISHII, N. Metabolic Biomarkers in Nematode *C. elegans* During Aging. In *Reviews on Biomarker Studies of Metabolic and Metabolism-Related Disorders* (pp. 163-175). Springer, Cham., 2019.

YANG, J., HUANG, X. B., WAN, Q. L., DING, A. J., YANG, Z. L., QIU, M. H., ... & LUO, H. R. Otophyllouside B protects against A β toxicity in *Caenorhabditis elegans* models of Alzheimer's Disease. *Natural products and Bioprospecting*, 7(2), 207-214, 2017.

YOU DIM, K.A. & JOSEPH, J.A. A possible emerging role of phytochemicals in improving age-related neurological dysfunctions: a multiplicity of effects. *Free Radical Biology and Medicine*, v.30 (6), p. 583-594, 2001.

ZAMBERLAN, D. C., ARANTES, L. P., MACHADO, M. L., DA SILVEIRA, T. L., DA SILVA, A. F., DA CRUZ, I. B. M., ... & SOARES, F. A. A. Guarana (*Paullinia cupana* Mart.) protects against amyloid- β toxicity in *Caenorhabditis elegans* through heat shock protein response activation. *Nutritional Neuroscience*, 1-11, 2018.

ZHANG, H., DAVIES, K. J., & FORMAN, H. J. Oxidative stress response and Nrf2 signaling in aging. *Free Radical Biology and Medicine*, 88, 314-336, 2015.

5. REGISTRO DE PATENTE E ARTIGOS CIENTIFICOS

5.1 Registro de patente: BR 10 2019 023140 8 “Processo de produção de polpas de frutos do Cerrado”.



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA ECONOMIA
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

EXAME PRELIMINAR

N.º do Pedido: BR102019023140-8 **N.º de Depósito PCT:**
Data de Depósito: 04/11/2019

O pedido atende formalmente as disposições legais, especialmente quanto ao Art. 19 da LPI e o Instrução Normativa nº 31/2013, estando apto a ser protocolado.

Condições do Pedido	S	N
Requerimento de depósito com os campos obrigatórios preenchidos	X	
Idioma Português	X	
Relatório Descritivo	X	
Reivindicações	X	
PI e C – Apresenta desenhos citados ou não cita nem apresenta desenhos. MU – Apresenta desenhos.	X	
Resumo	X	
Formatado no padrão exigido	X	
Valor correto de Recolhimento	X	

Rio de Janeiro, 20 de fevereiro de 2020.

Armando dos Santos Alvarez
Mat. Nº 1535475
DIRPA / COSAP/SEFOR

PROCESSO DE PRODUÇÃO DE POLPAS LIOFILIZADAS DE FRUTOS DO CERRADO

[001] A presente invenção refere-se ao processo para obtenção de polpas de frutos nativos do Cerrado caracterizado pela capacidade de preservar suas propriedades funcionais e nutracêuticas. As etapas de processamento para obtenção da polpa passam pelas técnicas de seleção, primeira lavagem, sanitização, segunda lavagem, despulpamento, congelamento, liofilização, maceração, tamisação até armazenamento da polpa processada. As análises realizadas com as polpas obtidas a partir deste processo, garantem a preservação de diferentes compostos bioativos, e ainda, suas atividades antioxidantes *in vitro*. Assim, polpas de diferentes frutos obtidas por este processo podem ser aplicadas na indústria alimentícia em formulações de diversos produtos (sucos, biscoitos, bolos, geleias, sorvetes e outras sobremesas) e na indústria farmacêutica para o desenvolvimento de produtos nutracêuticos e ou fitoterápicos (saches, xaropes e capsulas). As polpas obtidas por este processo atenderão diferentes nichos de mercado atentos às propriedades funcionais e nutracêuticas de frutos do Cerrado.

ESTADO DA TÉCNICA

[002] O Cerrado é o segundo maior *hotspot* mundial de biodiversidade, reconhecido como a Savana mais rica do mundo, abrigando aproximadamente 11 mil espécies de plantas nativas já catalogadas (MMA – Ministério do Meio Ambiente. O Bioma Cerrado. Brasília, DF: 2014. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/biomas/cerrado>>. Acesso em: 02 out., 2019). Destacam-se pela relevância regional, as espécies madeireiras, tintoriais, ornamentais, medicinais e alimentícias. Os gêneros alimentícios apresentam diferentes espécies que produzem

frutos comestíveis, com formas variadas, cores atrativas e sabor característico (PEREIRA, M. E., & PASQUALETO, A. Desenvolvimento sustentável com ênfase em frutíferas do Cerrado. *Estudos*, 38(2), 333-363, 2011). Dentre as principais espécies frutíferas nativas do Bioma Cerrado brasileiro, estão a *Hancornia speciosa* Gomez (mangaba), *Psidium guineense* Swartz (araçá do Cerrado), *Salacia crassifolia* Mart. Peyr. (bacupari), *Annona crassiflora* Mart. (marolo), *Mauritia flexuosa* Linn. (buriti), *Caryocar brasiliense* Cambess (pequi), *Anacardium humile* Mart. (cajuzinho), *Campomanesia adamantium* Cambes O. Berg. (guavira), *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne (jatobá), *Dipteryx alata* Vogel (baru) e a *Eugenia dysenterica* Mart. ex DC. (cagaita).

[003] As plantas do Cerrado crescem em condições ambientais adversas, com períodos longos de seca, e outro de chuvas intensas, solos pobres, incêndios periódicos e radiação UV intensa. Esses fatores contribuem para o desenvolvimento de mecanismos de defesa contra agentes físicos, químicos e biológicos durante o processo evolutivo, fatores que estão associados a maior produção de compostos bioativos por essas plantas (BATLE-BAYER, L.; BATJES, N. H.; BINDRABAN, P. S. Changes in organic carbon stocks upon land use conversion in the Brazilian Cerrado: A review. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, v. 137, p. 47-57, 2010). Além disso, os frutos produzidos por estas espécies estão disponíveis por um curto período do ano, e geralmente são pouco conhecidos pela população, o que dificulta a sua produção e comercialização.

[004] A importância econômica e alimentar para comunidades que vivem em áreas com predominância ou fragmentos do Bioma Cerrado aliadas ao conhecimento tradicional, tornam estes frutos nativos potenciais produtos alimentícios geradores de renda.

[005] Atualmente, diferentes técnicas de processamento são aplicadas aos frutos, com objetivo de garantir a preservação dos compostos bioativos, representando um importante recurso para conservação e diversificação das maneiras de consumo, aumentando sua estabilidade físico-química e microbiológica. Assim técnicas capazes de demonstrar os valores nutricional e funcional destes frutos, aliados a recursos tecnológicos, podem aumentar seu apelo mercadológico e valor comercial dos mesmos.

[006] Os frutos apresentam potenciais para serem utilizados, na indústria de alimentos, como flavorizantes na produção de bebidas e néctares, por seus atributos de qualidade como: elevada acidez, ácido ascórbico (vitamina C), minerais, fibras alimentares e compostos fenólicos, que lhes conferem o aroma cítrico (VALLILO, M. I., LAMARDO, L. C. A., GABERLOTTI, M. L., OLIVEIRA, E. D., & MORENO, P. R. H. Composição química dos frutos de *Campomanesia adamantium* (Cambess) O. Berg. Ciência e Tecnologia de Alimentos: v.26(4), p.725-955, 2006). Assim, representam relevante potencial agroindustrial e considerável fonte de renda econômica para a população local (ALMEIDA, S. D., PROENÇA, C. E. B., SANO, S. M., & RIBEIRO, J. F. Cerrado: espécies vegetais úteis. Planaltina: Embrapa-CPAC: v.1, p.464, 1998), também sendo um forte atrativo comercial para o grupo de consumidores que tem se preocupado com a relação entre dieta e saúde.

[007] A inclusão na dieta de frutas e hortaliças tem sido relacionada com a promoção de efeitos benéficos, pois os compostos presentes nestes alimentos atuam minimizando os danos causados pelo estresse oxidativo no organismo humano (PEREZ-CORNAGO, A., TRAVIS, R. C., APPLEBY, P. N., TSILIDIS, K. K., TJONNELAND, A., OLSEN, A., ... & PEPPA, E. Fruit and vegetable intake and prostate cancer risk in the European

Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC). *International Journal of Cancer*, 2017).

[008] Os produtos naturais apresentam diversos compostos bioativos, que estão associados à proteção celular contra espécies reativas de oxigênio, como por exemplo, os radicais livres. As espécies reativas, estão envolvidas no processo de estresse oxidativo, vinculado ao desenvolvimento e/ou agravamento de inúmeras doenças como câncer (CHIKARA, S., NAGAPRASHANTHA, L. D., SINGHAL, J., HORNE, D., AWASTHI, S., & SINGHAL, S. S. Oxidative stress and dietary phytochemicals: role in cancer chemoprevention and treatment. *Cancer Letters*: 413, 122-134, 2018), diabetes (REHMAN, K., & AKASH, M. S. H. Mechanism of generation of oxidative stress and pathophysiology of type 2 diabetes mellitus: how are they interlinked?. *Journal of Cellular Biochemistry*: 118(11), 3577-3585, 2017) e disfunções cardiovasculares (ZENG, J., ZHAO, J., DONG, B., CAI, X., JIANG, J., XUE, R., ... & LIU, C. Lycopene protects against pressure overload-induced cardiac hypertrophy by attenuating oxidative stress. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 2019), e também doenças neurodegenerativas (LINDHOLM, D., WOOTZ, H., & KORHONEN, L. ER stress and neurodegenerative diseases. *Cell Death and Differentiation*: 13(3), 385, 2006).

[009] Neste contexto, as espécies frutíferas são relatadas na medicina popular e em estudos científicos por suas propriedades biológicas, como exemplo, a espécie *Caryocar brasiliense* Cambess, que produz frutos popularmente conhecidos como pequi, foi descrita pelo potencial quimiopreventivo contra o câncer hepático em ratos (PALMEIRA, S. M., SILVA, P. R., FERRÃO, J. S., LADD, A. A., DAGLI, M. L., GRISOLIA, C. K., & HERNANDEZ-BLAZQUEZ, F. J. Chemopreventive effects of pequi oil (*Caryocar brasiliense* Camb.) on preneoplastic lesions in a mouse model of

hepatocarcinogenesis. *European Journal of Cancer Prevention*, 25(4), 299-305, 2016). A farinha obtida da polpa desidratada do fruto pequi apresentou compostos fenólicos e antocianinas e exibiu atividade antioxidante (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*, 225, 146-153, 2017). Além disso, o óleo da polpa do pequi apresenta baixa toxicidade aguda e subcrônica em roedores, no entanto, os autores sugerem a necessidade de estudos adicionais relacionados à segurança alimentar (TRAESEL, G. K., MENEGATI, S. E. L. T., DOS SANTOS, A. C., SOUZA, R. I. C., BOAS, G. R. V., JUSTI, P. N., ... & OESTERREICH, S. A. Oral acute and subchronic toxicity studies of the oil extracted from pequi (*Caryocar brasiliense*, Camb.) pulp in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 97, 224-231, 2016).

[010] A espécie *Annona crassiflora* Mart., produz frutos popularmente conhecidos como marolo, suas cascas apresentaram propriedades hepatoprotetoras e antioxidantes (JUSTINO, A. B., PEREIRA, M. N., PEIXOTO, L. G., VILELA, D. D., CAIXETA, D. C., DE SOUZA, A. V., ... & ESPINDOLA, F. S. Hepatoprotective properties of a polyphenol-enriched fraction from *Annona crassiflora* Mart. fruit peel against diabetes-induced oxidative and nitrosative stress. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(22), 4428-4438, 2017), a polpa, casca e sementes dos frutos apresentaram relevantes quantidades de compostos fenólicos, já descritos por suas propriedades antioxidantes (ARRUDA, H. S., PEREIRA, G. A., DE MORAIS, D. R., EBERLIN, M. N., & PASTORE, G. M. Determination of free, esterified, glycosylated and insoluble-bound phenolics composition in the edible part of araticum fruit (*Annona*

crassiflora Mart.) and its by-products by HPLC-ESI-MS/MS. Food Chemistry, 245, 738-749, 2018).

[011] A espécie *Hancornia speciosa* Gomes comumente conhecida por mangabeira, apresentou propriedades biológicas advindas de diferentes partes da planta, os frutos chamados de mangaba, são consumidos *in natura e* demonstram atividade anti-inflamatória (TORRES-RÊGO, M., FURTADO, A. A., BITENCOURT, M. A. O., DE SOUZA LIMA, M. C. J., DE ANDRADE, R. C. L. C., DE AZEVEDO, E. P., ... & ZUCOLOTTI, S. M. Anti-inflammatory activity of aqueous extract and bioactive compounds identified from the fruits of *Hancornia speciosa* Gomes (Apocynaceae). BMC Complementary and Alternative Medicine, 16(1), 275, 2016); a casca possui atividades antimicrobiana e gastroprotetora, (DE MELLO MORAES, T., RODRIGUES, C. M., KUSHIMA, H., BAUAB, T. M., VILLEGAS, W., PELLIZZON, C. H., ... & HIRUMA-LIMA, C. A. *Hancornia speciosa*: Indications of gastroprotective, healing and anti-*Helicobacter pylori* actions. Journal of ethnopharmacology, 120(2), 161-168, 2008); o látex apresenta atividade anti-inflamatória (MARINHO D.G., ALVIANO D.S., MATHEUS M.E., ALVIANO C.S., FERNANDES P.D. The latex obtained from *Hancornia speciosa* Gomes possesses anti-inflammatory activity. Journal Ethnopharmacol, 135: 530-7, 2011) e as folhas atividades anti-hipertensiva (SILVA, G. C., BRAGA, F. C., LEMOS, V. S., & CORTES, S. F. Potent antihypertensive effect of *Hancornia speciosa* leaves extract. Phytomedicine, 23(2), 214-219, 2016), anti-inflamatória (GELLER F.C., TEIXEIRA M.R., PEREIRA A.B., DOURADO L.P., SOUZA D.G., BRAGA F.C., et al. Evaluation of the Wound Healing Properties of *Hancornia speciosa* Leaves. Phytother Res.; 12: 1887-93, 2015), antimicrobiana e antioxidante (SANTOS, U. P., CAMPOS, J. F., TORQUATO, H. F., PAREDES-GAMERO, E. J.,

CAROLLO, C. A., ESTEVINHO, L. M., DE PICOLI SOUZA, K., ... DOS SANTOS, E. L. Antioxidant, Antimicrobial and Cytotoxic Properties as Well as the Phenolic Content of the Extract from *Hancornia speciosa* Gomes. PloS One, 11(12), 2016). Recentemente, outro estudo revelou que as folhas demonstraram efeitos antimutagênico, anti-inflamatório, anti-Parkinson, antiobesidade, anti-hiperglicêmica, antioxidante e anti-doença de Alzheimer (DOS 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, 2018).

[012] A espécie frutífera, *Campomanesia adamantium* popularmente conhecida como guavira, é utilizada para o tratamento de doenças reumáticas, diarreicas e processos inflamatórios (RAMOS, D. D., & CARDOSO, C. A. L. Avaliação do potencial citotóxico e atividade antioxidante em *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg (Myrtaceae). Revista Brasileira de Biociências: v.5 (S2), p.774, 2008) e no tratamento de cistite e uretrite (PASCOAL, A. C., EHRENFRIED, C. A., EBERLINE, M. N., STEFANELLO, M. E., & SALVADOR, M. J. Free radical scavenging activity, determination of phenolic compounds and HPLC-DAD/ESI-MS profile of *Campomanesia adamantium* leaves. Natural Product Communications: 6(7), 969-972, 2011). Estudos científicos utilizando as cascas dos frutos da guavira demonstraram efeitos antihiperálgico, antidepressivo e anti-inflamatório (DE SOUZA, J. C., PICCINELLI, A. C., AQUINO, D. F., DE SOUZA, V. V., SCHMITZ, W. O., TRAESEL, G. K., ...& ARENA, A. C. Toxicological analysis and antihyperalgesic, antidepressant, and anti-inflammatory effects of *Campomanesia adamantium* fruit barks. Nutritional Neuroscience: 20(1), 23-31, 2017). O extrato da polpa micro

encapsulada do fruto da guavira demonstrou efeitos anti-inflamatório e antinociceptivo em camundongos (VISCARDI, D. Z., DE OLIVEIRA, V. S., ARRIGO, J. D. S., PICCINELLI, A. C., CARDOSO, C. A., MALDONADE, I. R., ... & SANJINEZ-ARGANDOÑA, E. J. Anti-inflammatory, and antinociceptive effects of *Campomanesia adamantium* microencapsulated pulp. *Revista Brasileira de Farmacognosia*: v.27 (2), p. 220-227, 2017).

[013] São escassos os estudos publicados sobre a utilização polpa da espécie *Dipteryx alata* Vogel popularmente conhecida como barueiro, na medicina popular é relatada a utilização das cascas maceradas como antidiarreico e cicatrizante, o óleo da amêndoa do fruto, popularmente conhecido como baru, é utilizado no tratamento de reumatismo e apresenta atividade sudorífera, tônica e reguladora da menstruação (SANO, S. M., RIBEIRO, J. F., & DE BRITO, M. A. Baru: biologia e uso. Embrapa Cerrados- Documentos (INFOTECA-E), 2004). A amêndoa do fruto é comestível e descrita por sua capacidade de melhorar do perfil lipídico, promovendo a redução de triglicerídeos, VLDL-c, LDL-c e aumento de HDL-c, sem interferir no percentual de ganho de peso, gordura visceral e níveis de colesterol em ratos (RAGASSI FIORINI, A. M., BARBALHO, S. M., GUIGUER, É. L., OSHIWA, M., MENDES, C. G., VIEITES, R. L., ... & NICOLAU, C. C. T. *Dipteryx alata* Vogel may improve lipid profile and atherogenic indices in Wistar rats *Dipteryx alata* and atherogenic indices. *Journal of Medicinal Food*, 20(11), 1121-1126, 2017).

[014] O óleo essencial das folhas da espécie frutífera *Psidium guineense* Swartz, conhecido popularmente como araçá, apresentou atividade antioxidante, anti-inflamatória, antiproliferativa e antimicobacteriana (DO NASCIMENTO, K. F., MOREIRA, F. M. F., SANTOS, J. A., KASSUYA, C. A. L., CRODA, J. H. R.,

CARDOSO, C. A. L., ... & FORMAGIO, A. S. N. Antioxidant, anti-inflammatory, antiproliferative and antimycobacterial activities of the essential oil of *Psidium guineense* Sw. and spathulenol. *Journal of Ethnopharmacology*, 210, 351-358, 2018). O extrato aquoso das folhas do araçá demonstrou atividade antimicrobiana (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*, 2012).

[015] Diante do exposto, pode ser observado o crescente número de estudos que investigam e demonstram diversas propriedades biológicas de diferentes frutos do Bioma Cerrado brasileiro. Assim, o processo descrito na presente patente viabiliza a obtenção de polpas capazes de manter seus constituintes químicos e suas propriedades biológicas e pode ser considerado inovador para o desenvolvimento de produtos funcionais e/ou nutracêuticos que possam vir a contribuir na nutrição e saúde humana e/ou animal.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[016] A seguir estão listados antecedentes da invenção:

[017] **A INFLUÊNCIA DA LIOFILIZAÇÃO SOBRE OS CAROTENOIDES DE FRUTOS DO CERRADO E COMPORTAMENTO HIGRÓSCOPICO DOS PRODUTOS LIOFILIZADOS.** (DUARTE, E. L., CARLOS, L. A., GONÇALVES, C. R., DE ANDRADE, R. M., & DE OLIVEIRA, K. G. (2017). Influência da liofilização sobre os carotenoides de frutos do cerrado e comportamento higroscópico

dos pós-lioofilizados. *Biológicas & Saúde*, 7(23)). Este artigo científico descreve a influência do processo de liofilização na obtenção do pó comestível a partir das polpas de marolo e cagaita. Durante as fases do processo, a descrição da fase de sanitização se diferencia do proposto em nosso processo, pois utilizamos o dicloroisocianurato de sódio dihidratado 6,25%, reagente químico diferente do cloro ativo 150 ppm utilizado neste artigo. Além disso, o processo de lavagem não é descrito. Dentre as etapas descritas, o tipo e o período de congelamento do material obtido se diferenciam, sendo descrito o congelamento por ar estático sob a temperatura de -80°C durante 48 horas, apesar de usarmos a mesma temperatura, a etapa de congelamento foi realizada em ultra freezer por 24 horas (período 50% menor) o que demonstra melhor eficiência. Quanto à etapa de liofilização, os autores não descrevem os valores utilizados como parâmetros diferenciais, tais como, temperatura, vácuo, velocidade, pressão e período total do processo. Este artigo científico diferencia-se da nossa patente, pois os autores buscam a obtenção de um pó comestível obtido através de um processo de liofilização, com higroscopicidade mitigada e conteúdo total de carotenoides reduzido em relação a polpa *in natura*.

[018] **SECAGEM DA POLPA DE PEQUI POR LIOFILIZAÇÃO.** (SOARES, C. T. (2018) Disponível em: <http://repositorio.unicamp.br/handle/REPOSIP/332599>). Secagem da polpa de pequi por liofilização. O processo de secagem descrito na referida Tese, refere-se ao processo de liofilização da polpa do fruto com adição de água e encapsulantes (maltodextrina e proteína de soro de leite), procedimento que se diferencia do proposto em nossa patente. Além disso, o período de congelamento do material obtido foi sob a temperatura de -60°C durante 8 horas, já em nossa descrição a temperatura utilizada é -80°C durante o período de 24 horas. Sobre o processo de liofilização os autores não descrevem os valores utilizados como parâmetros

diferenciais: temperatura, vácuo, velocidade, pressão, e apenas o período total do processo foi mencionado, sendo de 72 horas. Contudo nossa patente descreve o período total do processo de 48 horas. Este estudo, não se assemelha com o proposto em nossa patente, pois tem como objetivo descrever o potencial nutricional da polpa do fruto processada com agentes encapsulantes, completamente diferente do descrito em nossa patente, pois utilizamos a polpa *in natura* para demonstrar suas propriedades funcionais e nutracêuticas.

[019] BR 10 2016 027709 4 LIOFILIZAÇÃO DE MANGABA PARA A PRODUÇÃO DE SUCO E USO COMO INGREDIENTE NA FORMULAÇÃO DE PRODUTOS ALIMENTÍCIOS. Se diferencia do proposto em nossa patente,

pois apresenta etapas distintas do processo de obtenção do pó do fruto (apenas mangaba) com adição de maltodextrina um agente encapsulante, diferente do descrito em nossa patente, pois utilizamos apenas a polpa *in natura* no processamento para demonstrar as propriedades funcionais e nutracêuticas em diferentes frutos. Sobre a descrição do processo, as etapas de lavagem e sanitização se diferenciam do proposto em nossa invenção, pois realizamos etapas adicionais utilizando produto sanitizante específico para este fim. Neste processo de patente, o processo de congelamento da polpa ocorre em freezer por período não inferior a 72 horas sob a temperatura de -18°C . Contudo, em nossa descrição utilizamos o Ultrafreezer que mantém a polpa sob a temperatura de -80°C durante 24 horas. Na referida patente, os inventores não descrevem todos os valores utilizados como parâmetros diferenciais, entre eles, vácuo, velocidade e pressão. São mencionados apenas os valores de temperatura ($-50 \pm 3^{\circ}\text{C}$) e período de total de liofilização (72 horas). Porém em nossa patente, os valores se diferenciam, sendo para temperatura -40°C e período total de liofilização 48 horas. Assim, nosso processo diferencia-se desta patente, pois utilizamos polpas *in natura*,

sem uso de aditivos e apresentando fases distintas de processamento. Além disso, o objetivo da referida patente é a obtenção do pó do fruto como base de ingrediente para elaboração de suco e outros fins alimentícios, enquanto nossa proposta é descrever um processo de produção de diferentes polpas capazes de preservar suas propriedades funcionais e nutracêuticas.

[020] **BR 10 2015 029767 0. ELABORAÇÃO DE MANGABA EM PÓ DESIDRATADA POR SECAGEM EM LIOFILIZADOR.** A patente refere-se ao produto em pó obtido a partir da polpa de mangaba liofilizada, cujo objetivo é de conservação e preservação das características organolépticas do produto, assim não se assemelha com o proposto em nossa patente, que descreve o processo de produção de polpas capazes de preservar as propriedades funcionais e nutracêuticas. Outra diferença está na utilização de aditivos (maltodextrina com dextrose equivalente 20), enquanto que em nossa patente propomos o uso *in natura* da polpa de frutos. Além disso, os inventores não descrevem os valores utilizados como parâmetros diferenciais do processo de liofilização, tais como, vácuo, velocidade e pressão. São mencionados apenas os valores de temperatura (-59° C) e período de total de liofilização (24 horas), já em nossa invenção os valores se diferenciam, sendo para temperatura -40°C e período total de liofilização 48 horas.

[021] **BR 10 2016 018194 1. MIX DE EXTRATO PÓ DE AMENDOIM E MANGABA.** Esta patente descreve o processo de produção de um mix elaborado a partir do extrato aquoso de amendoim e polpa de mangaba com adição de maltodextrina. As etapas para obtenção das matérias primas (extrato de amendoim e polpa do fruto com maltodextrina) e o processo de liofilização não assemelham ao apresentado em nossa patente. Além disso, não são descritas as etapas de seleção e

sanitização das matérias primas. Na etapa de congelamento os autores utilizaram freezer sob a temperatura de -18°C por 72 horas, diferente ao descrito em nossa patente (-80°C por 24 horas em Ultrafreezer). Os inventores não descrevem os valores utilizados como parâmetros diferenciais do processo de liofilização: vácuo, velocidade e pressão. São mencionados apenas valores de temperatura ($-50\pm 3^{\circ}\text{C}$) e período de total de liofilização (72 horas). Contudo, em nossa patente os valores se diferenciam, sendo utilizada a temperatura de -40°C e período total de liofilização de 48 horas. Assim a referida patente, não se assemelha com a nossa, pois visa ampliar o aproveitamento nutricional destes alimentos utilizando etapas distintas para obtenção das matérias primas processadas, enquanto que em nossa patente utilizamos a polpa *in natura* de frutos com objetivo de preservar suas propriedades funcionais e nutracêuticas.

[022] **BR 10 2015 011035 9. PROCESSO DE ELABORAÇÃO DE TABLETE DE FRUTA DE MACAÚBA E RESPECTIVO PRODUTO.** Esta patente descreve o processo de elaboração de um produto caracterizado como tablete, que tem como base ingredientes a polpa do fruto da macaúba e aditivos (maltodextrina e água). Sobre as etapas do processo, os inventores não descrevem as etapas e seleção e sanitização da fruta, na etapa de congelamento, apenas citam a temperatura em freezer -18°C , já em nossa patente esta etapa compreende a temperatura de -80°C em Ultrafreezer durante 24 horas. Além disso, nesta patente, são descritas etapas adicionais no processamento da polpa e seus aditivos, diferente do descrito em nossa invenção, pois utilizamos a polpa *in natura* de frutos. Ainda, sobre as etapas do processo, o produto obtido pelos inventores é novamente congelado em Ultrafreezer sob temperatura de -40°C por 24 horas, seguido da etapa de liofilização. Sobre a etapa de liofilização os inventores não citam os valores utilizados como parâmetros diferenciais no processo: temperatura, vácuo, velocidade, pressão e período total do processo. Os inventores descrevem apenas

as especificações técnicas do equipamento utilizado para a liofilização. Sobre a reivindicação 32, os inventores descrevem o processo de modelagem do produto final, congelamento e liofilização. Em nossa invenção não estamos propondo a modelagem de produto final. Desta maneira, a referida patente, não se assemelha com o proposto em nossa invenção, pois os inventores descrevem o processo de elaboração de um tablete de fruto e aditivos com reduzida umidade, enquanto que em nossa invenção descrevemos o processo obtenção de polpas de frutos processadas capaz de preservar suas propriedades funcionais e nutracêuticas. Adicionalmente, o fruto apresentado nesta patente é a macaúba, fruto que não está relatado em nossa invenção.

[023] **PI 0801101-0. PROCESSO DE OBTENÇÃO DE FARINHA DE BAGAÇO DE UVA E PRODUTO RESULTANTE.** No conteúdo da PI 0801101-0, encontra-se a descrição da etapa de liofilização do processo de obtenção de uma farinha de bagaço de uva processado. A matéria prima utilizada neste processo é um subproduto da indústria, composto por diferentes partes vegetais com características variadas, neste sentido não se assemelha com o proposto em nossa patente, pois utilizamos apenas polpa *in natura* de frutos selecionados, o que permite uma melhor padronização para utilização no processo proposto. No processamento descrito nesta patente, a matéria prima utilizada é previamente congelada, porém os inventores não citam o valor de temperatura e o período de congelamento. Em seguida, o material é liofilizado sob a temperatura de $-60^{\circ}\text{C} \pm 10^{\circ}\text{C}$ durante 72 horas. Este processo não se assemelha ao proposto em nossa patente, pois utilizamos diferentes valores de temperatura e tempo de exposição (-80°C durante 24 horas). E ainda, propomos etapas distintas durante o processamento das polpas, entre elas, a seleção, sanitização e despulpamento. Além disso, os inventores não descrevem os valores utilizados como parâmetros diferenciais da etapa de liofilização: vácuo, velocidade e pressão.

[024] **PI 9403296-3. PROCESSO DE LIOFILIZAÇÃO DO SUCO DE LIMÃO E KIT CAIPIRINHA INSTANTÂNEA.** A referida PI 9403296-3, encontra-se arquivada desde 08/03/2000, e o prazo de pedido para desarquivamento foi expirado desde 08/05/2000. Desta forma, considera-se arquivamento definitivo. Para obtenção do suco liofilizado de limão, o inventor descreve a etapa de liofilização e cita os valores de temperatura, vácuo e período de exposição. Neste sentido, apenas o valor de temperatura negativa se assemelha (página 3) ao descrito em nossa patente, porém na página 4, os inventores descrevem novamente a etapa, entretanto com o valor de temperatura positiva. Esta ambiguidade nos valores não garante a eficiência do processo e caracterizam um ponto crítico na referida patente. O valor de vácuo descrito pelo inventor foi de 4×10^{-1} mili Bar e o período de exposição foi de 94 horas, o que não se assemelha ao descrito em nossa invenção. Além disso, o inventor não descreve os demais valores utilizados como parâmetros diferenciais do processo de liofilização, tais como velocidade e pressão. Por fim, esta patente diferencia-se do proposto em nossa invenção, pois trata-se de um processo de liofilização obsoleto para obtenção de um suco em pó com adição de açúcar e água ardente para fins de comercialização agregado a um kit. Assim não se assemelha com o objetivo proposto em nossa patente, descrito como processo capaz de preservar propriedades funcionais e nutracêuticas de polpas processadas.

[025] **PI 0602691-5. PROCESSO DE LIOFILIZAÇÃO DA LARANJA, COMPOSIÇÃO ALIMENTÍCIA E FARMACÊUTICA CONTENDO LARANJA LIOFILIZADA.** Nesta patente é descrito o processo de liofilização do suco de laranja, já em nossa patente descrevemos a obtenção de polpas processadas. Além disso, especificamos as etapas de congelamento com temperatura e período padronizados, o

que se diferencia da referida patente, que utiliza congelamento em nitrogênio líquido. Outra diferença esta na etapa de liofilização, pois a referida patente utiliza a faixa de pressão de 1 a 3×10^{-2} mBar e não descreve o período de exposição. Os inventores não descrevem os demais valores utilizados como parâmetros diferenciais do processo de liofilização, tais como velocidade, vácuo e período de exposição. Nesta patente, é apresentado o suco de laranja liofilizado como produto final para ser utilizado na indústria farmacêutica, porém não foi demonstrado ou descrito suas propriedades farmacológicas. Neste sentido, a referida patente não se assemelha com o proposto em nossa invenção, que descreve o processo para obtenção de polpas de frutos e demonstra através de ensaios *in vitro* a capacidade de preservar suas propriedades funcionais e nutracêutica.

[026] **LIOFILIZAÇÃO DE FRUTAS TROPICAIS.** (MARQUES, L. G. (2008).

Liofilização de frutas tropicais. Disponível em: <https://repositorio.ufscar.br/handle/ufscar/3870>). A referida Tese analisa o processo de liofilização de frutas tropicais como o abacaxi, acerola, goiaba, mamão papaya e manga. Os frutos analisados na Tese são distintos aos descritos em nossa invenção “frutos do Cerrado” (pequi, guavira, marolo, baru, araçá e mangaba). Na descrição metodológica da Tese, as etapas envolvidas no processo de liofilização, inicia-se com três tipos congelamentos (nitrogênio líquido, vapor de nitrogênio e freezer convencional), em nosso processo utilizamos apenas o equipamento Ultrafreezer. Somente a temperatura em freezer convencional foi descrita pelo autor, sendo de $-16\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 horas, em nossa invenção descrevemos a temperatura de $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 horas em Ultrafreezer. Com relação à etapa de liofilização, o autor descreve os parâmetros de pressão total $1,3 \times 10^{-1}$ mbar e temperatura da câmara de secagem de $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$, estes parâmetros são insuficientes e não se assemelham com os descritos em nossa invenção ($0,050\text{ mmHg}$ de pressão total

e - 40°C para temperatura da câmara de secagem). Cabe ressaltar, que os frutos analisados na referida Tese, são utilizados integralmente (casca, polpa e sementes) a fim de se obter parâmetros que envolvem a determinação das propriedades físicas, térmicas e cinética de secagem, e ainda como conclusão o desenvolvimento de um modelo matemático do processo liofilização. Neste contexto, os objetivos da referida Tese não se assemelham com processo de produção proposto em nossa invenção, pois apresentamos etapas de obtenção das polpas de frutos como parte integrante do processo capaz de preservar as propriedades funcionais e nutracêuticas.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[027] **Descrição metodológica sobre as fases de obtenção das polpas processadas dos frutos nativos do Bioma Cerrado:**

[028] Os frutos foram adquiridos no comércio local e selecionados de acordo com as condições ideais de maturação e sem danos aparentes. Toda a manipulação dos frutos e processamentos das polpas dos frutos, produto de origem vegetal *in natura*, foi realizada no Laboratório de Pesquisa da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambiental (LPCBA) da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD) em Dourados, MS.

[029] A FIGURA 1 representa as etapas para obtenção das polpas processadas.

[030] A Figura 2 apresenta as polpas processadas apresentam colorações características, aromas e sabores preservados.

[031] As Figuras 3; 4; 5; 6; 7 e 8 apresentam a comprovação *in vitro* da atividade antioxidante promovida pelos frutos via captura do radical livre DPPH

[032] As etapas são descritas, como exemplo, pelas seguintes fases:

- 1. Fase de lavagens:** Na primeira lavagem dos frutos deve ser utilizada água potável corrente para retirada de resíduos.
- 2. Fase de sanitização:** Os frutos previamente lavados são imersos durante 15 minutos com dicloroisocianurato de sódio dihidratado (6,25%), equivalente a 3,5% de cloro ativo;
- 3. Fase de lavagens:** Os frutos sanitizados passam pela segunda lavagem com água potável para garantir a qualidade do processo;
- 4. Fase de despulpamento:** Os frutos são despulpados manualmente com auxílio de peneiras de inox para retirada das sementes e ao final toda polpa é coletada, inclusive o conteúdo que fica retido na peneira. Para o fruto pequi, a polpa é retirada do mesocarpo interno com auxílio de lâminas inoxidáveis;
- 5. Fase de congelamento:** As polpas obtidas devem sofrer um congelamento abrupto sob a temperatura de -80°C durante 24 horas;
- 6. Fase de liofilização:** As polpas devem ser submetidas ao processo de secagem em liofilizador (modelo Alpha 1-2 LDplus, Christ®) sob a temperatura de -40°C , vácuo inferior a 0,5 mmHg, velocidade constante de liofilização de 1mm/h e pressão final de 0,050 mmHg durante 48 horas;
- 7. Fase de maceração:** As polpas resultantes do processo de liofilização devem ser maceradas com auxílio do pistilo de porcelana ou outro método mecânico de maceração;
- 8. Fase de tamisação:** As polpas maceradas são tamisadas com peneiras com orifícios de 48 *mesh* (0,300 mm);
- 9. Fase de armazenamento:** polpas liofilizadas, maceradas e tamisadas devem ser armazenadas protegida da luz, umidade e mantida sob congelamento (-80°C) até o momento do uso.

[033] Posteriormente, as polpas liofilizadas devem ser armazenadas protegida da luz, umidade e mantida sob congelamento (-80° C) até o momento do uso. O rendimento da polpa liofilizada foi calculado de acordo com a equação a seguir:

$$R\% = \frac{M \text{ polpa}}{M \text{ liofilizada}}$$

[034] Onde, R% representa a porcentagem de rendimento da polpa processada, M polpa a massa da amostra *in natura* (g) e M liofilizada resultante do processo de liofilização (g).

[035] Os rendimentos das polpas processadas foram expressos em percentuais, a polpa de *Caryocar brasiliense* (pequi) apresentou rendimento de 43,73%, isto é, em 100g de polpa *in natura*, tem-se 43,73g de polpa processada. Para a polpa de *Annona crassiflora* (marolo), o rendimento foi de 21%, isto é, em 100g de polpa *in natura*, tem-se 21g de polpa processada. Para a polpa de *Hancornia speciosa* (mangaba) foi de 28,41%, isto é, em 100g de polpa *in natura*, tem-se 28,41g de polpa processada. A polpa de *Campomanesia adamantium* (guavira) apresentou rendimento de 12,09%, isto é, em 100g de polpa *in natura*, tem-se 12,09g de polpa processada. O rendimento da polpa de *Psidium guineense* (araçá) foi de 20%, isto é, em 100g de polpa *in natura*, tem-se 20g de polpa processada. Notavelmente a polpa de *Dipteryx alata* (baru) apresentou rendimento de 67%, isto é, em 100g de polpa *in natura*, tem-se 67g de polpa processada.

[036] As polpas processadas apresentam colorações características, aromas e sabores preservados (Figura 2).

[037] **Descrição metodológica para determinar a presença de compostos antioxidantes nas polpas dos frutos nativos do Bioma Cerrado:**

[038] Para detectar a presença de compostos antioxidantes realizamos ensaios colorimétricos a partir das polpas processadas dos frutos (NAGATA, M. & YAMASHITA, I. Simple method for simultaneous determination of chlorophyll and carotenoids in tomato fruit. *Journal of The Japanese Society for Food Science and Technology*, v.39 (10), p.925-928,1992). Na determinação dos compostos antioxidantes lipofílicos β -caroteno e licopeno, foram utilizados (150 mg) de polpa processada, vigorosamente agitadas em 10 mL de uma mistura acetona-hexano (4:6, v/v) por 1 min. e filtrada utilizando papel de filtro qualitativo Whatman® Grau 4. As absorvâncias do filtrado foram mensuradas em espectrofotômetro em 453, 505, 645 e 663 nm. Os conteúdos de β -caroteno e licopeno foram calculados de acordo com equações matemáticas: β -caroteno = $0,216 \times \text{Abs}663 - 1,220 \times \text{Abs}645 - 0,304 \times \text{Abs}505 + 0,452 \times \text{Abs}453$ e Licopeno = $-0,0458 \times \text{Abs}663 + 0,204 \times \text{Abs}645 + 0,304 \times \text{Abs}505 - 0,0452 \times \text{Abs}453$. Os resultados foram expressos em mg/100 g de polpa processada.

[039] A concentração de ácido ascórbico foi determinada através do método titulométrico de acordo com (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. *Official methods of analysis of AOAC international*. 16th ed. Gaithersburg: AOAC International, v.1 p. 1141, 1996.) e (BENASSI, M. D. 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 (4), p.507-13, 1988). Inicialmente, 0,5 g de polpa processada foi homogeneizada 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 de

filtro qualitativo Whatman® Grau 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 controle padrão. Os resultados foram calculados com base na seguinte equação e expressos em mg de ácido ascórbico/100 g de polpa processada:

$$\frac{mgVit.C}{100g_{amostra}} = \frac{DCFI_{amostra}}{DCFI_{padrão}} \times \frac{100}{M_{amostra}} \times \frac{(M_{solvente} + M_{amostra})}{m_{polpa\ processada}} \times \frac{50mL}{10mL} \times F$$

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

[040] Onde, DCFI_{amostra} e DCFI_{padrão} são respectivamente o volume gasto na titulação da amostra e do padrão em mL, M_{amostra}, M_{solvente} e M_{polpa processada} 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). Foram realizados três ensaios independentes em triplicatas.

[041] Na Tabela 1, são apresentados os resultados obtidos de conteúdo de pigmentos lipofílicos antioxidantes e ácido ascórbico. Estes compostos são descritos na literatura pela capacidade de atuar contra o estresse oxidativo neutralizando radicais livres através de doação de átomos de hidrogênio e/ou sequestro de elétrons. Determinados radicais livres podem ser neutralizados na presença de compostos antioxidantes doadores de elétrons ou átomos de hidrogênio (CELEP, E., AYDIN, A., & YESILADA, E. A comparative study on the in vitro antioxidant potentials of three edible fruits: cornelian cherry, Japanese persimmon and cherry laurel. Food and Chemical Toxicology: 50(9), 3329-3335, 2012).

Tabela 1 - Resultados obtidos de conteúdo de pigmentos lipofílicos antioxidantes e ácido ascórbico

Polpa processada	β -caroteno mg/g	Licopeno mg/g	Ácido ascórbico mg/100g
<i>C. brasiliense</i> (pequi)	N.D.	1,870±0,192	600,22±6,54
<i>A. crassiflora</i> (marolo)	0,366 ±0,05 0,026±0,00	0,036 ± 0,003	205,61 ± 0,58
<i>H. speciosa</i> (mangaba)	7 0,062±0,01	0,120±0,002	809,29±28,84
<i>C. adamantium</i> (guavira)	4	0,029±0,010	1454,46±27,17
<i>D. alata</i> (baru)	N. D. 0,105 ±	0,033 ±0,001	113,48 ± 15,91
<i>P. guinense</i> (araçá)	0,01	0,050 ± 0,005	117,00 ± 32,63

N.D. = Não detectável na metodologia utilizada.

[042] Descrição metodológica da atividade antioxidante das polpas processadas dos frutos nativos do Bioma Cerrado:

[043] A atividade antioxidante das polpas processadas dos frutos foi determinada *in vitro* através do método de captura de radical livre 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH). A atividade de captura do (DPPH•) foi avaliada conforme descrito por 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). Inicialmente as polpas processadas de cada fruto foram preparadas para os ensaios, para isto 0,005 g das polpas processadas, foram ressuspensas em 5 mL de água ultrapura estéril. As polpas em solução foram homogêneas durante 5 minutos em vortex. Em seguida, acondicionadas em tubos protegidos da luz e mantidos refrigerados a 4° C por 24 horas. Posteriormente, misturou-se 0,2 mL das polpas em solução (0,1 – 5000 µg/mL) com 1,8 mL da solução de DPPH• (0,11 mM) diluído em etanol 70 %. Cada mistura foi homogênea e

incubada em temperatura ambiente durante 30 minutos e protegida da luz. A absorbância foi mensurada a 517 nm. O ácido ascórbico (0,1 – 1000 µg/mL) foi utilizado como antioxidante de referência (controle positivo). 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:

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

[044] Nossos resultados demonstraram as concentrações capazes de inibir 50 % dos radicais livres (IC₅₀ em µg/mL). A concentração apresentada para o *Caryocar brasiliense* Cambess (pequi) foi de 394,7±25,9; para *Annona crassiflora* Mart (marolo) foi de 2126,67±195,63; a *Hancornia speciosa* Gomes (mangaba) apresentou em 1555,10±16,60; a *Campomanesia adamantium* (guavira) foi de 210,5±28,0; a *Dypterix alata* (baru) foi de 2306,33±101,83 e a *Psidium guineense* (araçá) apresentou em 262,36±19,8. Foi possível comprovar *in vitro* a atividade antioxidante promovida pelos frutos via captura do radical livre DPPH (FIGURAS 3; 4; 5; 6; 7 e 8).

[045] Os conteúdos de ácido ascórbico e pigmentos lipofílicos estão entre os compostos responsáveis pelas atividades antioxidantes observadas, e agregam valor nutricional e biológico das polpas processadas dos frutos *Caryocar brasiliense* (pequi); *Annona crassiflora* (marolo); *Hancornia speciosa* (mangaba); *Campomanesia adamantium* (guavira); *Dypterix alata* (baru) e *Psidium guineense* (araçá).

[043] Em conclusão, as polpas obtidas por este processo apresentam qualidade superior, pois são capazes de conservar a maioria das propriedades funcionais dos frutos, como nutrientes, cor, aroma e sabor. Com este processo as polpas possuem maior estabilidade, esterilidade e facilidade de reconstituição em solventes orgânicos e inorgânicos. Além

disso, este processo reduz a umidade das polpas, tornando possível seu armazenamento por longos períodos de tempo.

[046] As polpas obtidas por este processo são capazes de preservar os constituintes químicos, propriedades nutricionais e atividades biológicas inerentes aos frutos, pois este processo ocorre à baixa temperatura na ausência de oxigênio, inativando enzimas de degradação e imobilizando moléculas reativas, bem como promovendo a estabilidade de moléculas antioxidantes.

REIVINDICAÇÕES

1. Processo de produção de polpas liofilizadas de frutos do cerrado, **caracterizado por** processar polpas de frutos utilizando pelo menos uma das seguintes etapas:
 - Seleção dos frutos de acordo com a integridade e maturação;
 - Primeira lavagem;
 - Sanitização;
 - Segunda lavagem;
 - Despoldamento;
 - Congelamento;
 - Liofilização;
 - Maceração;
 - Tamização, e;
 - Armazenamento.

2. Processo de produção de polpas liofilizadas de frutos do cerrado, conforme reivindicação 1, **caracterizado por** preservar propriedades funcionais e nutracêuticas dos frutos.

3. Processo de produção de polpas liofilizadas de frutos do cerrado, conforme reivindicação 1, **caracterizado por** produzir polpas para reconstituição em solventes orgânicos e inorgânicos, aumentar tempo de armazenamento, estabilidade e esterilidade.

4. Processo de produção de polpas liofilizadas de frutos do cerrado, conforme reivindicação 1 e 2, **caracterizado por** selecionar um dos seguintes frutos *Caryocar*

brasiliense Cambess (pequi); *Annona crassiflora* Mart (marolo); *Hancornia speciosa* Gomes (mangaba); *Campomanesia adamantium* O. Berg (guavira); *Dypterx alata* Vogel (baru) e *Psidium guineense* Swartz (araçá), para uso individual ou por combinação.

5. Processo de produção de polpas liofilizadas de frutos do cerrado, conforme reivindicação 1 e 2, **caracterizado por** rendimento da polpa a partir de 12,09% até 67%.

6. Processo de produção de polpas liofilizadas de frutos do cerrado, conforme reivindicação 1, **caracterizado por** conter pelo menos um dos compostos de β -caroteno, Licopeno e/ou Ácido ascórbico.

7. Uso do Processo de produção de polpas liofilizadas de frutos do cerrado, conforme reivindicação 1, **caracterizado por** preparar extratos aquosos para suplementos alimentares e/ou composição de produtos funcionais e/ou nutracêuticos e/ou fitoterápicos com propriedades antioxidantes.

8. Uso do processo de produção de polpas liofilizadas de frutos do cerrado, de acordo com as reivindicações 1 a 4, **caracterizado por** compostos bioativos para suplementos alimentares e/ou composição de produtos funcionais e/ou nutracêuticos e/ou fitoterápicos para o consumo humano e/ou animal.

FIGURAS

FIGURA 1

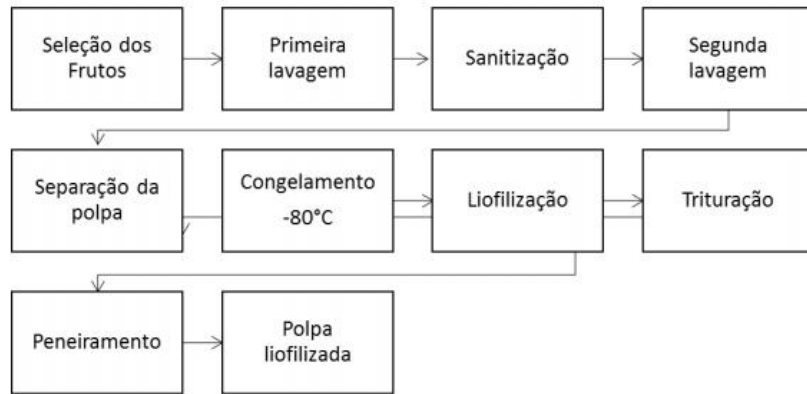


FIGURA 2



FIGURA 3

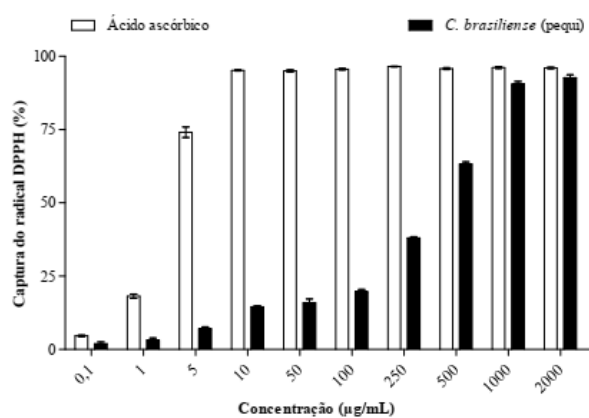


FIGURA 4

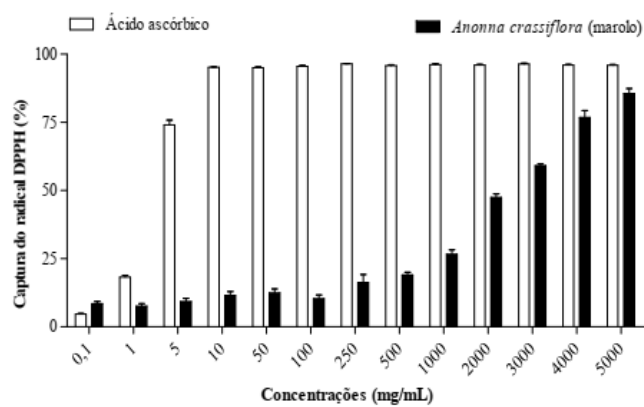


FIGURA 5

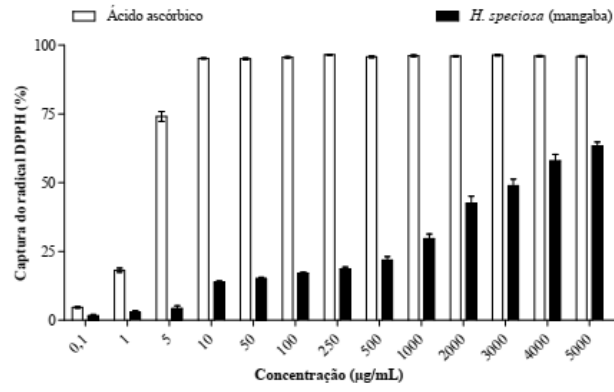


FIGURA 6

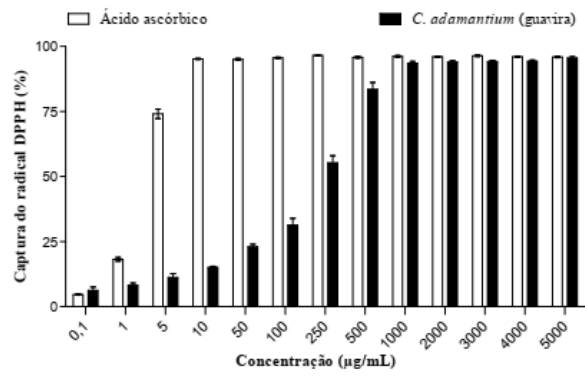


FIGURA 7

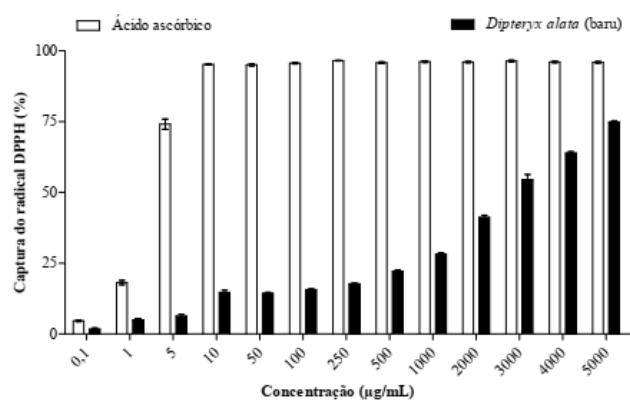
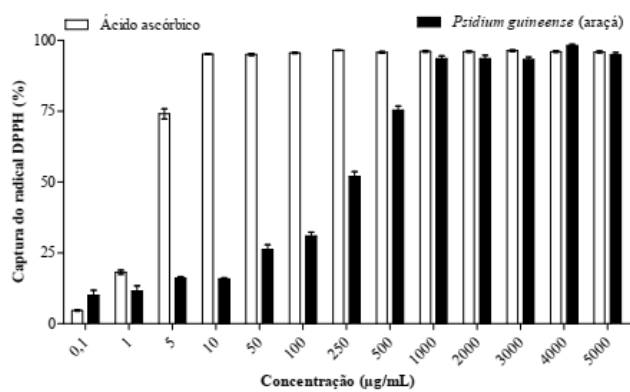


FIGURA 8



RESUMO

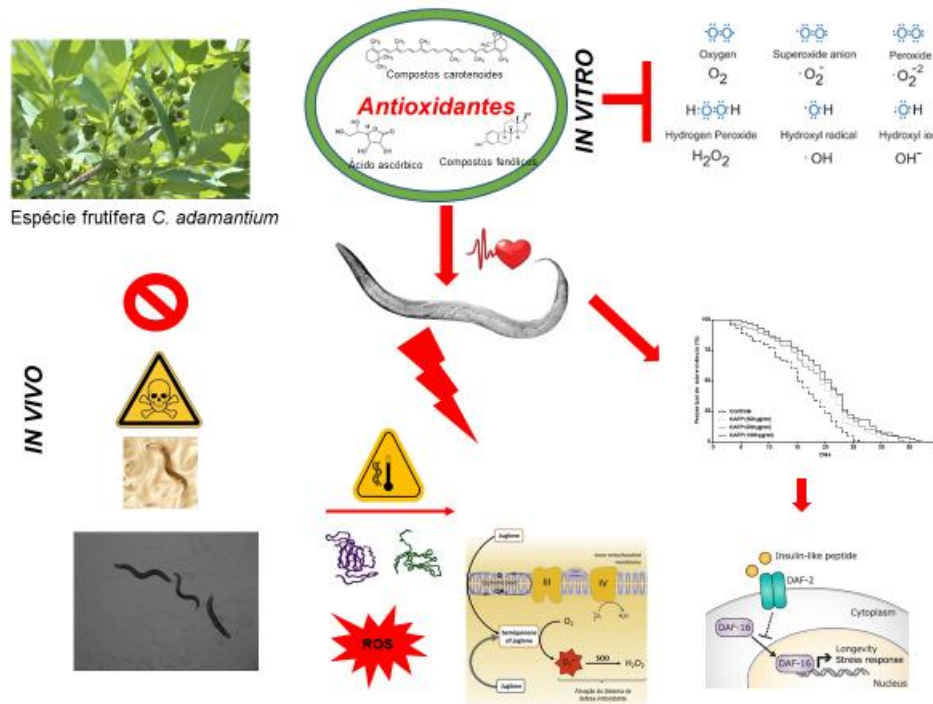
PROCESSO DE PRODUÇÃO DE POLPAS LIOFILIZADAS DE FRUTOS DO CERRADO, a presente invenção refere-se ao processo para obtenção de polpas processadas de frutos nativos do Cerrado capaz de preservar suas propriedades funcionais e nutracêuticas, as etapas de processamento para obtenção da polpa passam pelas técnicas de primeira lavagem, seleção, sanitização, segunda lavagem, despulpamento, congelamento, liofilização, maceração, tamisação até armazenamento da polpa processada, as análises realizadas com as polpas obtidas a partir deste processo, demonstram a preservação de diferentes compostos bioativos, e ainda, suas atividades antioxidantes *in vitro*, assim, polpas de diferentes frutos obtidas por este processo podem ser utilizadas pela indústria alimentícia em formulações de diversos produtos (sucos, biscoitos, bolos, geleias, sorvetes e outras sobremesas) e na indústria farmacêutica para o desenvolvimento de produtos nutracêuticos e/ou fitoterápicos (saches, xaropes e capsulas), as polpas obtidas por este processo atenderão diferentes nichos de mercado atentos às propriedades funcionais e nutracêuticas de frutos do Cerrado.

5.2 *Campomanesia adamantium* O Berg.: um fruto nativo do Brasil capaz de proteger contra o estresse oxidativo e promover aumento da longevidade em *Caenorhabditis elegans* via SOD-3, GST-4 e fator transcricional DAF-16

Destaques:

- O fruto guavira é nativo do Bioma Cerrado originário do Brasil.
- Perfil fitoquímico identificou compostos bioativos antioxidantes.
- *In vitro*, CAFP demonstrou atividade antioxidante.
- *In vivo*, CAFP exibe efeito protetor contra o estresse térmico e oxidativo.
- *In vivo*, CAFP promove longevidade via translocação de DAF-16, expressão de SOD-3 e GST-4.

Resumo gráfico:



Resumo

Campomanesia adamantium O. Berg. é uma espécie frutífera nativa do bioma brasileiro Cerrado, seus frutos são consumidos *in natura* pela população. O presente estudo caracterizou a composição química da polpa dos frutos (CAFP), investigou o potencial antioxidante *in vitro* e *in vivo*, bem como os parâmetros toxicológicos e seus efeitos biológicos em *Caenorhabditis elegans*. O perfil dos constituintes químicos obtido por LC-DAD-MS identificou 27 compostos, entre eles, compostos fenólicos, flavonoides e ácidos carboxílicos orgânicos. Além de pigmentos lipofílicos e ácido ascórbico. A atividade antioxidante *in vitro* foi analisada pelo método de captura de radicais. *In vivo*, CAFP não demonstrou efeitos de toxicidade aguda, reprodutiva e locomotora. Promoveu proteção contra o estresse térmico, oxidativo, e aumento da expectativa de vida em *C. elegans*. Aumento da expressão das enzimas antioxidantes superóxido dismutase e glutatona s transferase e ativou o fator transcricional DAF-16. Em suma, estes dados demonstram o potencial funcional e nutracêutico da espécie frutífera *C. adamantium* nativa do Cerrado brasileiro.

Palavras-chave: Guavira; Antioxidante; *C. elegans*; Estresse oxidativo; Expectativa de vida; Nutracêutico

1. Introdução

O Cerrado é um dos *hotspots* mundiais de biodiversidade, reconhecido como a Savana tropical mais rica do mundo, abrigando aproximadamente 12 mil espécies de plantas nativas já catalogadas das quais várias têm forte impacto cultural e econômico nas comunidades locais (Peixoto et al., 2019). Destacam-se pela relevância regional, as espécies madeireiras, tintoriais, ornamentais, medicinais e alimentícias. Os gêneros alimentícios apresentam diferentes espécies que produzem frutos comestíveis, com formas variadas, cores atrativas e sabor característico (Rodrigues, 2001).

As espécies frutíferas do Cerrado apresentam grande quantidade e diversidade de compostos bioativos, e estes podem ser benéficos para a saúde humana, representando uma potencial fonte de alimentos com propriedades funcionais a ser incorporada na alimentação, ou ainda, serem utilizados nas indústrias cosmética e farmacêutica (Siqueira et al., 2013).

Os frutos são considerados excelentes fontes de compostos antioxidantes naturais que compõe a dieta humana, sendo estes, um grupo heterogêneo de moléculas que possuem habilidade em doar hidrogênio ou elétrons, além de seus radicais intermediários estáveis impedirem a oxidação de moléculas no organismo (Zou et al., 2017). Os benefícios advindos do consumo de frutos podem ser atribuídos à presença de compostos específicos, tais como, minerais, fibras, vitaminas, compostos fenólicos e flavonoides. Todos nutrientes intimamente relacionados à redução no risco de doenças cardiovasculares e doenças crônicas (Heffron et al., 2017; Perez-Cornago et al., 2017). As atividades biológicas de um determinado alimento estão associadas às interações bioquímicas sinérgicas ou antagônicas entre nutrientes, promovendo respostas fisiológicas capazes de modular o metabolismo em processos de estresse oxidativo (Businaro et al., 2018). Desta forma, alimentos que atuam em vias de sinalização capazes de minimizar o estresse oxidativo podem modular e retardar a progressão do envelhecimento (Vauzour, 2012).

Dentre estes frutos nativos, está a *Campomanesia adamantium* O. Berg (Myrtaceae), uma espécie frutífera distribuída em regiões com predomínio do Bioma Cerrado, também conhecida popularmente como guavira ou gabioba. Os frutos produzidos por esta espécie estão disponíveis por um curto período de tempo durante o ano, o que dificulta a sua produção e comercialização.

Na medicina popular, as folhas e frutos da *C. adamantium* são utilizados como antirreumático, antidiarreico, hipocolesterolêmico e anti-inflamatório (Viscardi et al., 2017a). Cientificamente, diferentes partes desta planta já foram descritas por apresentarem propriedades farmacológicas diversas. As folhas e raízes demonstram atividade anti-leucêmica via ativação de cálcio intracelular, caspase-3 e indução de apoptose (Campos et al., 2017). Além disso, as raízes apresentam atividades antioxidantes *in vitro* e *in vivo*, e efeitos redutores de colesterol e triglicerídeos séricos (Espíndola et al., 2016). O óleo essencial dos frutos demonstra atividades anti-inflamatória e antinociceptiva (Viscardi et al., 2017a). As cascas dos frutos apresentam efeitos antihiperálgico, antidepressivo e anti-inflamatório (De Souza et al., 2016), sendo ainda capaz de inibir as ciclooxigenases 1 e 2 e a agregação plaquetária (Lescano et al., 2018). A polpa dos frutos são descritas por sua ação antiproliferativa contra células de melanoma murino (Lima e Silva et al., 2018) e atividade antioxidante *in vitro* capaz de proteger contra agente indutor de estresse oxidativo em modelo celular de hepatotoxicidade (De Oliveira Fernandes et al., 2015).

Apesar da existência de estudos científicos que demonstram propriedades funcionais de diferentes partes vegetais da *C. adamantium*, ainda são escassos os estudos relacionados às propriedades biológicas e nutracêuticas dos frutos, a parte vegetal diretamente consumida pela população.

Desta forma, os objetivos deste estudo foram determinar a composição química, caracterizar compostos antioxidantes, avaliar a atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo* da polpa do fruto *C. adamantium*, bem como investigar parâmetros toxicológicos e efeitos na expectativa de vida em *Caenorhabditis elegans*.

2. Material e métodos

2.1. Coleta do material vegetal e preparação da polpa de C. adamantium

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, foi cadastrada no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento tradicional associado (SisGen), cadastro número AA6FADF). Os frutos da espécie *C. adamantium* foram coletados em fragmentos do Bioma Cerrado, localizado no município de Dourados (S 21° 59' 41,8" e W 55° 19' 24,9"), estado do Mato Grosso do Sul, Brasil.

Para obtenção da polpa do fruto *C. adamantium* (CAFP), os frutos foram lavados em água corrente para eliminação de impurezas, sanitizados por imersão em solução Sumaveg® (3,3 g/L de água) durante 15 min, lavados com água potável, despulpados, seguido liofilização e acondicionados a - 80 °C. O rendimento da polpa liofilizada foi calculado pela seguinte equação:

$$\text{Polpa liofilizada (\%)} = \frac{\text{peso da polpa fresca (g)} \times 100}{\text{peso resultante do processo de liofilização (g)}}$$

Para os ensaios experimentais, 0,005 g de CAFP foi ressuspensa em 5 mL de água ultrapura estéril e homogeneizada por agitação constante por 5 min. Em seguida, acondicionado em tubos protegidos da luz e mantidos refrigerados a 4 °C por 24 h, buscando obter uma maior dissolução da polpa e seus constituintes químicos. Somente, após este período a CAFP foi utilizada nas análises experimentais.

2.3. Identificação dos constituintes por LC-DAD-MS

A amostra de CAFP (40 mg) foi macerada com metanol, água desionizada e ácido fórmico a 0,1% (7: 3, v/v) (3 mL) por 15 min no banho ultra-sônico. Posteriormente, a amostra foi centrifugada, o sobrenadante filtrado em *Millex*® (membrana de PTFE, 0,22 µm) para injeção no sistema cromatográfico (volume de injeção 5 µL). A amostra foi injetada em um UFLC *Prominence Shimadzu* acoplado ao detector de díodos (DAD) e um espectrômetro de massa (*MicroTOF-Q III, Bruker Daltonics, Billerica, MA, EUA*). A coluna *Kinetex C18* (2,6 µm, 150 ± 2,1 mm, *Phenomenex*) foi utilizada para análises e aplicação de vazão de 0,3 mL/min, temperatura do forno de 50 °C. A fase móvel foi composta por água deionizada (solvente A) e acetonitrila (solvente B), ambos adicionaram ácido fórmico a 0,1% (v/v) e o seguinte perfil de eluição com gradiente foi aplicado: 0-2 min 3% B, 2- 25 min 3-25% B, 25-40 min 25-80% B e 40-43 min a 80% B. Para as análises de MS, o nitrogênio foi utilizado como gás nebulizador a 4 Bar, gás seco a 9 L/min e gás de colisão. As análises foram adquiridas nos modos iônico negativo.

2.4. Determinação dos compostos fenólicos e flavonoides totais

Para determinação dos teores de compostos fenólicos e flavonoides a CAFP foi centrifugada a 5000 rpm durante 10 min e o sobrenadante utilizado nas análises.

2.5. Compostos fenólicos

Os teores de compostos fenólicos presentes na CAFP, foi determinado através do método colorimétrico de Folin-Ciocalteu. Para isso, 2,5 mL de reagente de Folin-Ciocalteu (1:10 v/v, diluído em água destilada) foram adicionados a 0,5 mL de CAFP (na concentração de 500 µg/mL). Esta solução foi incubada no escuro durante 5 min. Subsequentemente, 2,0 mL de carbonato de sódio aquoso a 14% (Na₂CO₃) foram adicionados e incubados à temperatura ambiente, durante 120 min, protegidos da luz. A absorbância foi mensurada a 760 nm utilizando um espectrofotômetro T70 UV/Vis (PG Instruments Limited, Leicestershire, UK). O ácido gálico (0,0004 – 0,0217 mg/mL) foi utilizado para construção da curva padrão de calibração. O teor de compostos fenólicos presentes na CAFP foi expresso em mg equivalente ao ácido gálico (GAE)/g de polpa. Foram realizados três ensaios independentes em triplicatas.

2.6. Flavonoides totais

Para determinação dos teores de flavonoides na CAFP uma solução etanólica de hexa-hidrato de cloreto de alumínio a 2% (AlCl₃.6H₂O) (4,5 mL) foi adicionada a 0,5 mL de polpa (na concentração de 500 µg/mL) e esta solução foi mantida no escuro durante 30 min em temperatura ambiente. Subsequentemente, as absorbâncias foram mensuradas a 415 nm (espectrofotômetro T70 UV/Vis, PG *Instruments Limited*, Leicestershire, Reino Unido). Foi utilizada na preparação da curva de calibração o composto padrão quercetina (0,0004 – 0,0217 mg/mL). O conteúdo total de flavonoides na CAFP foi expresso em mg equivalente de quercetina (QE)/g de polpa. Foram realizados três ensaios independentes em triplicatas.

2.7. Determinação de compostos lipofílicos

Para a determinação dos compostos antioxidantes lipofílicos β-caroteno, licopeno e clorofila a e b foram utilizados (150 mg) da CAFP vigorosamente agitada em 10 mL de uma mistura acetona-hexano (4:6, v/v) durante 1 min, posteriormente filtrada utilizando papel de filtro qualitativo *Whatman*® Grau 4. As absorbâncias do filtrado

foram mensuradas a 453, 505, 645 e 663 nm. Os teores de β -caroteno, licopeno e clorofila a e b foram calculados de acordo com equações matemáticas: 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 = $0,999 \times \text{Abs}663 - 0,0989 \times \text{Abs}645$ e Clorofila b = $-0,328 \times \text{Abs}663 + 1,77 \times \text{Abs}645$. Os resultados foram expressos em mg/100 g de CAFP. Foram realizados três ensaios independentes em triplicatas.

2.8. Determinação do ácido ascórbico

Para determinação da concentração de ácido ascórbico, 0,5 g de CAFP foi homogeneizada vigorosamente em 50 mL de ácido oxálico (2%). 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 de filtro qualitativo *Whatman*® Grau 4. O filtrado foi utilizado para titular uma solução do indicador (DCFI) 2,6-diclorofonolindofenol-sódio. A titulação foi finalizada pela viragem da coloração rosa persistente por 15 s. O ácido ascórbico foi utilizado como controle padrão. Os resultados foram calculados com base na seguinte equação e expressos em mg de ácido ascórbico/100 g de CAFP:

$$\frac{\text{mgVit. C}}{100g_{\text{amostra}}} = \frac{\text{DCFI}_{\text{amostra}}}{\text{DCFI}_{\text{padrão}}} \times \frac{100}{M_{\text{amostra}}} \times \frac{(M_{\text{solvente}} + M_{\text{amostra}})}{m_{\text{polpa}}} \times \frac{50\text{mL}}{10\text{mL}} \times F$$

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

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_{polpa} 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). Foram realizados três experimentos independentes em triplicatas.

2.9. Atividade antioxidante *in vitro*

2.9.1. Atividade de captura do radical livre DPPH*

Para avaliar a atividade de captura do radical livre DPPH* (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), misturou-se 0,2 mL da CAFP (0,1 – 1000 µg/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 min e protegida da luz. A absorbância foi mensurada a 517 nm. O ácido ascórbico e o BHT hidroxitolueno butilato (0,1 – 1000 µg/mL) foram utilizados como antioxidantes de referência (controles positivos). Foram realizados três ensaios independentes em triplicatas. 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 equação a seguir:

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

2.9.2. Ensaio de descoloração do radical ABTS^{•+}

A capacidade de captura do radical ABTS^{•+} (2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) foi realizada 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 h 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 CAFP (0,1 – 1500 µg/mL) foi misturada com 1980 µL do radical ABTS^{•+}. A solução foi homogeneizada e incubada durante 6 min. 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 triplicatas. A curva de inibição foi preparada e os valores de IC₅₀ foram calculados. A porcentagem de inibição do ABTS^{•+} foi determinada de acordo com a seguinte equação:

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

2.10. Ensaios *in vivo*

2.10.1. Cepas e condições de manutenção de *Caenorhabditis elegans*

Para a realização dos ensaios *in vivo*, foram utilizados nematoides tipo selvagem N2 Bristol e as cepas transgênicas TJ356 ([daf-16p:daf-16a / b:GFP + rol-6(su1006)]); CF1553 (muIs84 [(pAD76) sod-3p:GFP+rol-6(su1006)]) e CL2166 (dvIs19 [(pAF15) gst-4p::GFP::NLS] III), obtidas do *Caenorhabditis* Genetics Center (CGC), Minnesota, EUA. Os nematoides foram mantidos em estufas incubadoras a 16 °C ou 20 °C, cultivados em placas de Petri contendo meio de cultura para crescimento *Nematode Growth Medium* (NGM) e alimentados com bactérias *Escherichia coli* (OP50). As bactérias utilizadas como alimento para os nematoides foram inativadas com o antibiótico Canamicina (10mM).

A cultura dos nematoides foi sincronizada com hipoclorito de sódio a 2% e hidróxido de sódio 5M. Nos ensaios de toxicidade aguda, os ovos resistentes à lise alcalina foram coletados e transferidos para placas contendo apenas meio de cultivo NGM e *E. coli* (OP50) até atingirem a fase L4. Para os ensaios de toxicidade reprodutiva; toxicidade locomotora; estresses; expectativa de vida; expressão de superóxido dismutase; glutathione-S-transferase e fator transcricional DAF-16, os ovos resistentes à lise alcalina foram coletados e transferidos para placas de Petri contendo meio de cultivo NGM, *E. coli* (OP50) ou concentrações da CAFP (250, 500 ou 1000 µg/mL) até atingirem a fase L4.

2.10.2. Toxicidade aguda

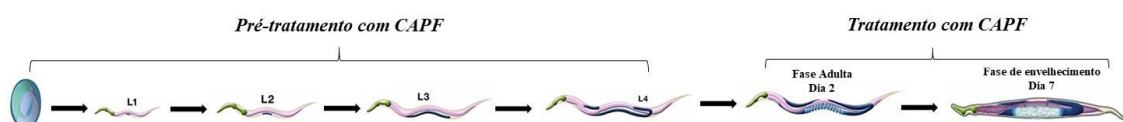
Neste ensaio, avaliamos o efeito tóxico da exposição aguda da CAFP aos nematoides N2. Para isto, em média 10 nematoides por poço, sincronizados em fase L4, foram transferidos para microplacas de 96 poços contendo meio de cultura M9 (100 µL) e a CAFP (100 µL) em diferentes concentrações (0,01 – 1 mg/mL). Posteriormente, os nematoides foram incubados a 20 °C por 24 e 48 h. Como controle negativo, os nematoides foram incubados apenas com meio de cultura M9 (200 µL). Após o período de incubação, a viabilidade dos nematoides foi avaliada pela sensibilidade ao toque com auxílio de um fio de platina. Foram realizados três experimentos independentes em triplicatas.

2.10.3. Toxicidade reprodutiva

Para avaliar a toxicidade reprodutiva analisamos os efeitos da CAFP sobre a capacidade reprodutiva de nematoides. Para isto, foi quantificado número de progênes viáveis durante o período reprodutivo de cinco dias. Neste ensaio, após a sincronização, cinco nematoides na fase L4 foram transferidos diariamente para novas placas contendo com água (controle negativo) ou concentrações da CAFP (250, 500 ou 1000 µg/mL). O número de progênie foi avaliado em cada placa após alcançar a fase larval L3 ou L4. Os resultados foram expressos pela média de três ensaios independentes.

2.10.4. Toxicidade locomotora

A avaliação do efeito da CAFP sobre a toxicidade locomotora dos nematoides N2 foi realizada em duas fases do ciclo de vida dos nematoides (**SFig. 1**), sendo a primeira fase adulta correspondente ao período de ovo até o segundo dia em L4 e a segunda fase de envelhecimento que compreende a fase L4 até o sétimo dia de vida. Para isto, após a sincronização, em média 10 nematoides na fase L4 foram transferidos diariamente para novas placas contendo os tratamentos com água (controle negativo) ou concentrações da CAFP (250, 500 ou 1000 µg/mL) até atingirem as fases adulta e de envelhecimento. Após estes períodos, os nematoides foram transferidos para novas placas contendo apenas meio de cultivo NGM, seguido da aclimação durante 1 min e posterior avaliação. Nas avaliações, foram quantificadas o número de curvaturas sinusoidais realizadas no período 30 s de locomoção. Foram realizados três ensaios independentes com 10 nematoides por grupo em triplicatas.



SFig. 1. Esquema representativo dos tratamentos com a polpa do fruto de *C. adamantium* (CAFP) durante as fases distintas do ciclo de vida de *C. elegans*.

2.10.5. Proteção contra o estresse térmico

Nos ensaios de proteção contra o estresse térmico, em média 20 nematoides na fase L4 foram pré-tratados por 30 min com água (controle negativo) ou concentrações da CAFP (250, 500 ou 1000 µg/mL). Em seguida foram transferidos respectivamente, para novas placas contendo meio NGM/*E. coli* (OP50) e água ou CAFP (250, 500 ou 1000 µg/mL). O estresse térmico foi induzido pelo aumento da temperatura de cultivo de 20 °C para 37 °C, e avaliado a cada hora de exposição pelo período experimental de 6 h. A viabilidade dos nematoides expostos a 37 °C nos diferentes períodos de incubação foi confirmada após o período de recuperação de 16 h sob 20 °C, pela sensibilidade ao toque utilizando um fio de platina. Foram realizados três ensaios independentes em triplicatas.

2.10.6. Proteção contra o estresse oxidativo

O ensaio de proteção contra o estresse oxidativo foi realizado por exposição dos nematoides ao agente oxidante Juglone (5-hydroxy-1,4-naphtho-quinone) na concentração letal de 250 µM. Após a sincronização, em média 10 nematoides na fase L4 foram pré-tratados por 30 min com água (controle) ou concentrações experimentais da CAFP (250, 500 ou 1000 µg/mL). Posteriormente, foram transferidos para microplacas de 96 poços contendo 100 µL de meio de cultura M9, 100 µL da CAFP (250, 500 ou 1000 µg/mL) e 50 µL de Juglone. Como controles, os nematoides previamente incubados com água, foram expostos a 250 µL meio de cultura M9 (controle negativo) ou 200 µL de meio M9 mais 50 µl Juglone (controle positivo). Todas as microplacas foram incubadas a 20 °C e a viabilidade dos nematoides avaliada a cada hora pelo período experimental de 6 h. A viabilidade dos nematoides foi confirmada pela sensibilidade ao toque utilizando um fio de platina. Foram realizados três ensaios independentes em triplicatas.

2.10.7. Expectativa de vida

Nos ensaios de expectativa de vida foram utilizados nematoides N2 na fase L4. No primeiro dia da fase L4 (dia 1), 20 nematoides por grupo foram transferidos para novas placas de NGM + *E. coli* OP50 contendo água (controle negativo) ou CAFP (250, 500 ou 1000 µg/mL). Durante os seis primeiros dias, correspondentes ao período de reprodução, os nematoides foram transferidos diariamente para novas placas NGM

contendo os respectivos tratamentos. A partir do sétimo dia (Dia 7), as transferências para novas placas ocorreram a cada dois dias. As avaliações consistiram em classificar os nematoides como mortos ou vivos até o dia de registro de morte do último nematoides. Os nematoides eram considerados mortos quando não se movimentavam com ou sem estímulo ao toque com um fio de platina. Os nematoides com ovos eclodidos internamente ou não visualizados nas placas tiveram seus dados excluídos. Foram realizados dois ensaios independentes em triplicatas.

2.10.8. Expressão de SOD-3 e GST-4

Para analisar a expressão das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD-3) e glutathione-S-transferase (GST-4), foram utilizadas as cepas CF1553 e CL2166 marcadas com GFP. Após a sincronização, cinco nematoides na fase L4 foram pré-tratados por 30 min com água (controle negativo) ou concentrações da CAFP (250, 500 ou 1000 µg/mL), foram imediatamente transferidos para lâminas de microscópio contendo levamisol 1mM como anestésico. Em seguida, foram realizadas as capturas das imagens de nematoides individuais utilizando um microscópio de epifluorescência (Nikon Eclipse 50i) conectado a câmera digital (Samsung ST64). Imagens de cinco nematoides por grupo foram expressas como média de pixels e a fluorescência relativa de todo o corpo foi determinada usando o software ImageJ. Foram realizados três ensaios independentes em triplicatas.

2.10.9. Translocação de DAF-16

Para avaliar a translocação do fator transcricional DAF-16, utilizamos a linhagem transgênica TJ356 com fusão do gene repórter *daf-16::GFP*, o qual permite a visualização da localização celular de DAF-16. Neste ensaio, após a sincronização, 30 nematoides na fase L4 foram pré-tratados por 30 min com água (controle negativo) ou concentrações da CAFP (250, 500 ou 1000 µg/mL). Posteriormente transferidos para lâminas de microscópio. Para monitorar a translocação nuclear de DAF-16-GFP, foram capturadas imagens dos nematoides utilizando um microscópio de epifluorescência (Nikon Eclipse 50i) conectado a câmera digital (Samsung ST64). As imagens dos nematoides foram classificadas de acordo com a localização do GFP. Foram analisados 30 nematoides por grupo, sendo realizados três ensaios independentes.

2.11. Análise estatística

Utilizamos o software GraphPad Prism 5.1 (San Diego, CA, EUA) para realizar as análises estatísticas. Os dados foram expressos como a média \pm erro padrão da média (EPM). Diferenças significativas entre os grupos foram determinadas usando o teste *t* de Student para comparação entre dois grupos e análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Dunnett para comparação de dois ou mais grupos. Os ensaios de expectativa de vida estão representados pela curva de Kaplan-Meier e os valores de *P* foram calculados pelo teste Log-rank. Os resultados foram considerados significativos quando $P < 0.05$.

3. Resultados

3.1. Identificação dos constituintes por LC-DAD-MS

Os constituintes químicos da polpa de frutos de *C. adamantium* (CAFP) foram identificados por LC-DAD-MS, utilizando UV, massa exata e dados de MS/MS. Os dados espectrais foram comparados aos dados relatados na literatura e alguns compostos foram confirmados por injeção de padrões autênticos (**Fig. 1** e **Tabela 1**).

Os picos **1** e **2** revelaram os íons desprotonados em m/z 165.0415, 179.0574 e 191.0212, que são potencialmente identificados como ácido pentônico, hexose e ácido cítrico. Os compostos **3** e **4** mostraram uma banda próxima a 280 nm nos espectros de UV. Seus íons desprotonados (m/z 289.0739 e 577.1389) confirmaram as fórmulas moleculares $C_{15}H_{14}O_6$ e $C_{30}H_{26}O_{12}$, e esses dados sugeriram compostos flavan-3-ol e **4** um dimérico (Nocchi et al., 2017). A partir de m/z 577, os íons do produto m/z 407 e 289 confirmaram a ligação de duas unidades de procianidina (tipo B). O fragmento m/z 407 é produzido a partir da fissão retro de Diels-Alder e subsequentemente perda de uma molécula de água, confirmando dois substituintes hidroxila no anel B da procianidina (catequina/ epicatequina) (Campos et al., 2017) e, portanto, foi identificado como dímero de procianidina. Além disso, o composto **3** foi identificado e confirmado por injeção de padrão como catequina. Os compostos **3** e **4** já foram descritos em folhas de *C. adamantium* (Campos et al., 2017).

O composto **5** revelou um íon intenso em m/z 453.1063 indicando $C_{20}H_{22}O_{12}$. O íon fragmento m/z 313 é produzido pela perda de um hidroxí-metoxi fenil, enquanto m/z 169 é relativo ao ácido gálico devido às perdas de um hidroxí-metoxi fenil e uma

hexose. Esses dados são compatíveis com o ácido hidroximetoxifenil O-hexosil-gálico (Santos et al., 2017).

Os compostos **11-14**, **18**, **20-21** e **24** apresentaram espectros de UV semelhantes ao ácido elágico ($\lambda_{\max} \approx 260$ e 360 nm). O composto **12** revelou dados espectrais compatíveis com o ácido elágico (Reichert et al., 2018), que também foram confirmados por injeção de padrão autêntico.

O íon fragmento em m/z 301 é relativo à molécula de ácido elágico, que foi produzido a partir de perdas de 132 e 146 u indicando os substituintes pentosil e desoxihexosil (Campos et al., 2017 e Reichert, et al., 2018). Assim, o ácido O-pentosil elágico (**11** e **13**) e o ácido O-desoxihexosil elágico (**14**) podem ser identificados. Esses compostos foram identificados a partir de raízes de *C. adamantium* (Campos et al., 2017). Os compostos **15-17**, **19** e **22** apresentaram espectros de UV de flavonóis ($\lambda_{\max} \sim 260$ e 350 nm) (Markham, 1982). Esses metabólitos apresentaram a mesma aglicona (m/z 300), que é relativa à quercetina e são produzidos por perdas radicais de hexose, pentose e desoxihexose (**15-17** e **19**). Portanto, **15-17** e **19** foram identificados como O-hexosil quercetina, O-pentosil quercetina, O-pentosil quercetina e O-desoxihexosil quercetina, esses compostos foram descritos a partir de folhas de *C. adamantium* (Campos et al., 2017).

Os picos **18**, **20**, **21** e **24** revelaram íons fragmentos gerados por perdas de 15 u (CH_3^\bullet) da molécula de ácido elágico, como os íons m/z 300 [ácido O-metil elágico - CH_3^\bullet] - (por **18** e **20**), 328 [O-trimetil elágico- CH_3^\bullet] - (para **21**), 313 [O-trimetil elágico- 2CH_3^\bullet] - (para **21** e **24**) e 298 [O-trimetil elágico- 3CH_3^\bullet] - (para **21** e **24**). Assim, os compostos **18**, **20**, **21** e **24** foram identificados como ácido O-pentosil-O-metil-elágico, O-desoxi-hexosil-O-metil-elágico, derivado do ácido tri-O-metil-elágico e ácido O-trimetil-elágico (Campos et al., 2017, Reichert et al., 2018).

Além disso, **25** e **26** revelaram as bandas de absorção a 290 e 335 nm, que indicavam flavanonas (Markham, 1982). Os íons desprotonados (m/z 269.0821 e 269.0827) caracterizaram a fórmula molecular $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}_4$ e o produto íon m/z 165, produzido pela fissão retro de Diels-Alder, confirmou a presença de substituinte metil no anel A. Assim, os dados espectrais e o perfil de eluição são compatíveis com os metabólitos 5,7-di-hidroxi 6-metilflavanona (**25**) e 5,7-di-hidroxi 8-metilflavanona (**26**) (Coutinho, Kataoka, Honda, Coelho, Vieira, & Cardoso, 2010, Campos et al., 2017).

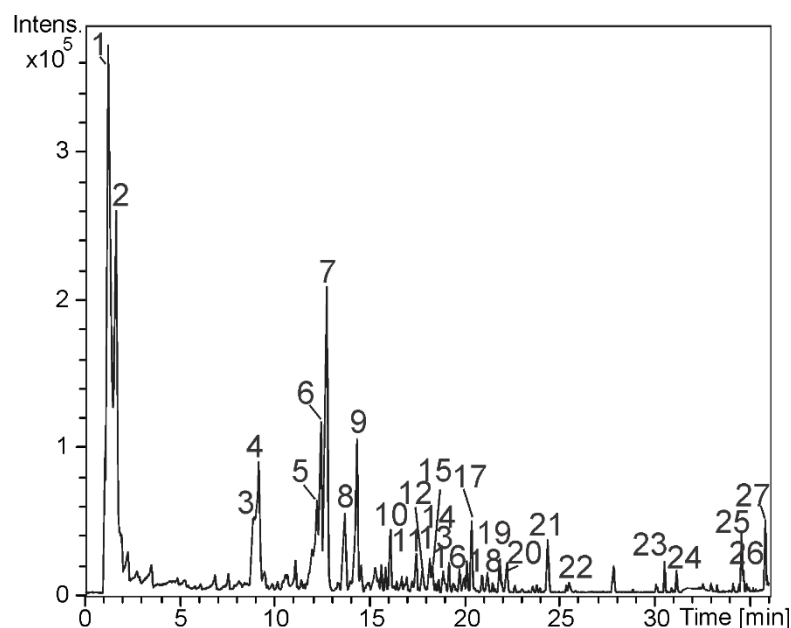


Fig. 1. Cromatograma do pico de base no modo de ionização negativa de *C. adamantium* (CAFP). Os picos 1-27 foram identificados na Tabela 1.

Tabela 1. Constituintes identificados em *C. adamantium* (CAFP) por LC-DAD-MS.

Pico	TR (min)	Composto	UV (nm)	Fórmula molecular	MS [M-H] ⁻ (m/z)	MS/MS (m/z) ⁻
1	1.2	Ácido pentônico	-	C ₅ H ₁₀ O ₆	165.0415	-
					179.0574	-
2	1.6	Hexose	-	C ₆ H ₈ O ₇	191.0212	-
3	9.0	Ácido Cítrico	282	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	289.0739	245, 203, 179
4	9.2	Catequina ^{sh}	281	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	577.1389	407, 289, 245, 203
5	12.2	Dímero de procianidina	282	C ₂₀ H ₂₂ O ₁₂	453.1063	313, 183, 169
6	12.3	Ácido hidroximetoxi-fenil O-hexosil-gálico	280	C ₁₈ H ₂₆ O ₁₀	401.1471	245, 221, 203, 191, 177, 164
7	12.7	NI	283	C ₂₀ H ₁₈ O ₉	401.0905	301, 289, 245
8	13.5	NI	-	C ₂₀ H ₃₂ O ₁₀	431.1948	153
9	14.2	NI	284, 302 ^{sh}	C ₂₅ H ₂₂ O ₁₂	513.1067	401, 301,

							289, 245, 215
10	15.9	NI	282	C ₁₇ H ₃₀ O ₁₀	393.1798	-	
11	17.4	NI	255, 358	C ₁₉ H ₁₄ O ₁₂	433.0438		301, 245, 229
12	17.7	Ácido O-pentosil elágico	250, 360	C ₁₄ H ₆ O ₈	300.9999		283, 245, 229, 201, 173
13	18.1	Ácido elágico	252, 360	C ₁₉ H ₁₄ O ₁₂	433.0436		301, 229
14	18.3	Ácido O-pentosil elágico	272, 360	C ₂₀ H ₁₆ O ₁₂	447.0594		301, 245, 229
15	18.9	Ácido O-desoxihexosil elágico	265, 348	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	463.0900		300, 271, 255, 243
16	19.7	O-hexosil quercetina	265, 355	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₁	433.0808		300, 271, 255, 243
17	20.3	O-pentosil quercetina	260, 350	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₁	433.0798		300, 271, 255, 243, 179
18	20.9	O-pentosil quercetina	251, 352	C ₂₀ H ₁₆ O ₁₂	447.0585		315, 300, 271
19	21.1	Ácido O-pentosil O-metil-elágico	251, 352	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	447.0938		300, 271, 255, 243, 179
20	22.2	O-desoxihexosil quercetina	255, 360	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₂	461.0745		315, 300
21	24.3	Ácido O-desoxi-hexosil O-metil-elágico	270, 360	C ₂₄ H ₂₄ O ₁₅	551.1073		343, 328, 313, 298
22	25.5	Derivado do ácido tri-O-metil-elágico	265, 357	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	301.0355		271, 255, 243, 179, 151
23	30.5	Quercetina ^{sh}	-	C ₁₈ H ₃₂ O ₅	327.2191		221, 211, 183, 171
24	31.1	NI	285, 357	C ₁₇ H ₁₂ O ₈	343.0466		313, 298, 270
25	34.5	Ácido O-trimetil elágico	290, 333 ^{sh}	C ₁₆ H ₁₄ O ₄	269.0821		227, 199, 183, 171, 165

26	34.6	5,7-di-hidroxi 6-metilflavanona	-294, 336 ^{sh}	C ₁₆ H ₁₄ O ₄	269.0827	227, 199, 165
27	35.8	5,7-di-hidroxi 8-metilflavanona	-	C ₁₄ H ₂₀ O ₄	251.1288	233, 218, 207, 193, 167

TR: tempo de retenção; NI: não identificado; st: confirmado por injeção de padrão autêntico. Todas as fórmulas moleculares foram determinadas por massa precisa considerando erro e mSigma até 10 e 30, respectivamente.

3.2. *Rendimento e quantificação de compostos bioativos*

O rendimento obtido da polpa *in natura* após o processo de liofilização foi de 12,09%. As concentrações dos compostos bioativos presentes na CAFP estão apresentadas na **Tabela 2**.

Tabela 2. Compostos bioativos quantificados na polpa do fruto *C. adamantium*.

Compostos	Resultados
Compostos fenólicos	3972,42 ± 0,93 mg EAG/100g
Flavonoides	85,13 ± 0,37 mg QE/100g
β-caroteno	0,062 ± 0,014 mg/g
Licopeno	0,029 ± 0,010 mg/g
Clorofila a	0,113 ± 0,02 µg/g
Clorofila b	0,077 ± 0,031 µg/g
Ácido ascórbico	1454,46 ± 27,17 mg/100g

Valores expressos como média ± EPM.

3.3. Atividade antioxidante *in vitro*

A avaliação da atividade antioxidante *in vitro* da CAFP, representada pela concentração capaz de inibir 50% (IC₅₀) dos radicais DPPH[•] e ABTS^{•+}, está apresentada na **Tabela 3**. A CAFP foi mais eficiente na captura do radical ABTS^{•+} em relação ao radical DPPH[•], apresentando um IC₅₀ aproximadamente 2,36 vezes menor.

Tabela 3. Atividades antioxidantes da polpa do fruto de *C. adamantium* (CAFP).

Amostras	DPPH [•]	ABTS ^{•+}
	IC ₅₀ (μg/mL)	IC ₅₀ (μg/mL)
Ácido ascórbico	2,65 ± 0,20	1,43 ± 0,09
BHT	14,58 ± 2,15	10,15 ± 0,94
CAFP	210,5 ± 28,0	89,12 ± 0,03

Valores expressos como média ± EPM.

3.4. Ensaios *in vivo*

3.4.1. Toxicidade aguda

Inicialmente avaliamos *in vivo* o parâmetro toxicidade aguda de diferentes concentrações da CAFP (0,01 – 1 mg/mL). As **Fig. 2A** e **B** respectivamente demonstram que em nenhuma das concentrações avaliadas a CAFP promoveu alterações toxicológicas, representada pela viabilidade dos nematoides durante os períodos de 24 e 48 h. A partir destes resultados definimos com segurança as concentrações para os próximos ensaios.

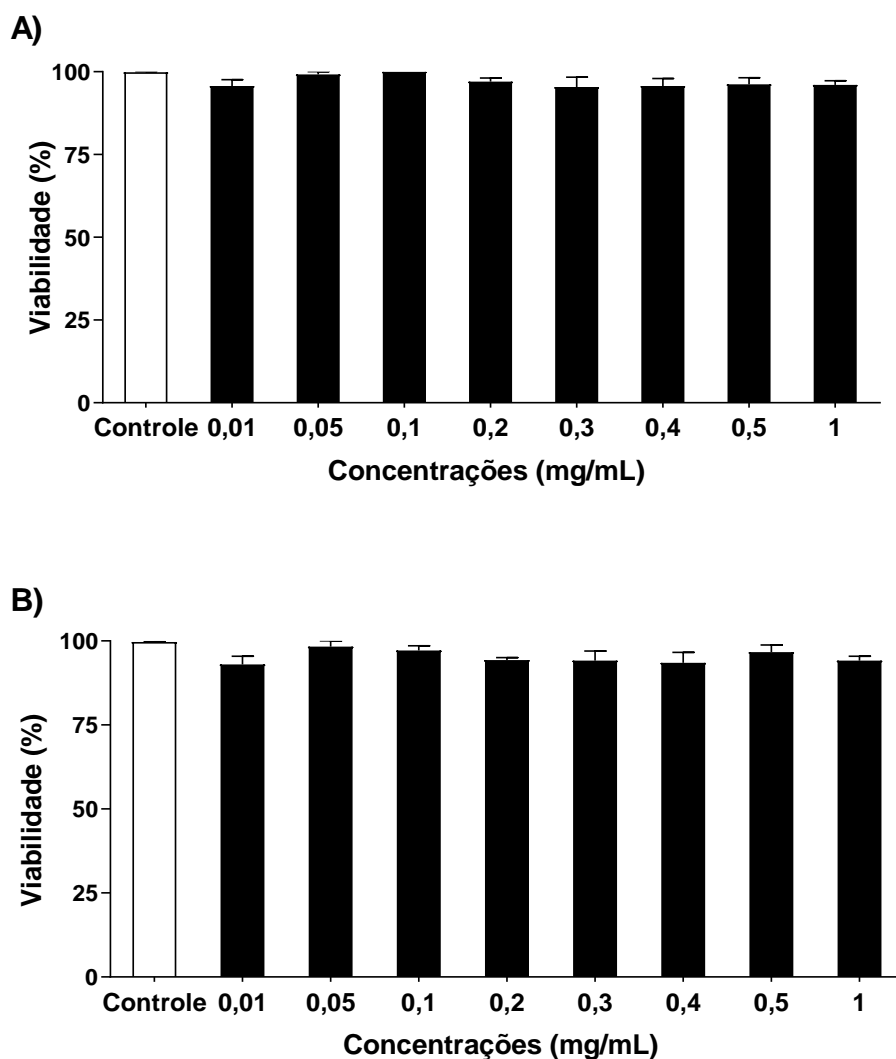


Fig. 2. Toxicidade aguda da polpa do fruto de *C. adamantium* (CAFP) em *C. elegans* N2 nos períodos de (A) 24 h e (B) 48 h. Os valores são expressos como média \pm EPM ($n = 3$). * $p < 0.05$ quando o grupo tratado foi comparado com o grupo controle (M9).

3.4.2. Toxicidade reprodutiva

A avaliação do efeito da CAFP sobre o número de progênes viáveis dos nematoides N2 representa um indicador de toxicidade reprodutiva. A **Fig. 3A**, mostra que nenhuma das concentrações avaliadas da CAFP promoveu alterações no número diário ou total de progênes viáveis (**Fig. 3B**). Estes resultados indicam que os tratamentos com as diferentes concentrações de CAFP não promovem efeitos tóxicos que interfiram nos padrões fisiológicos da capacidade reprodutiva dos nematoides.

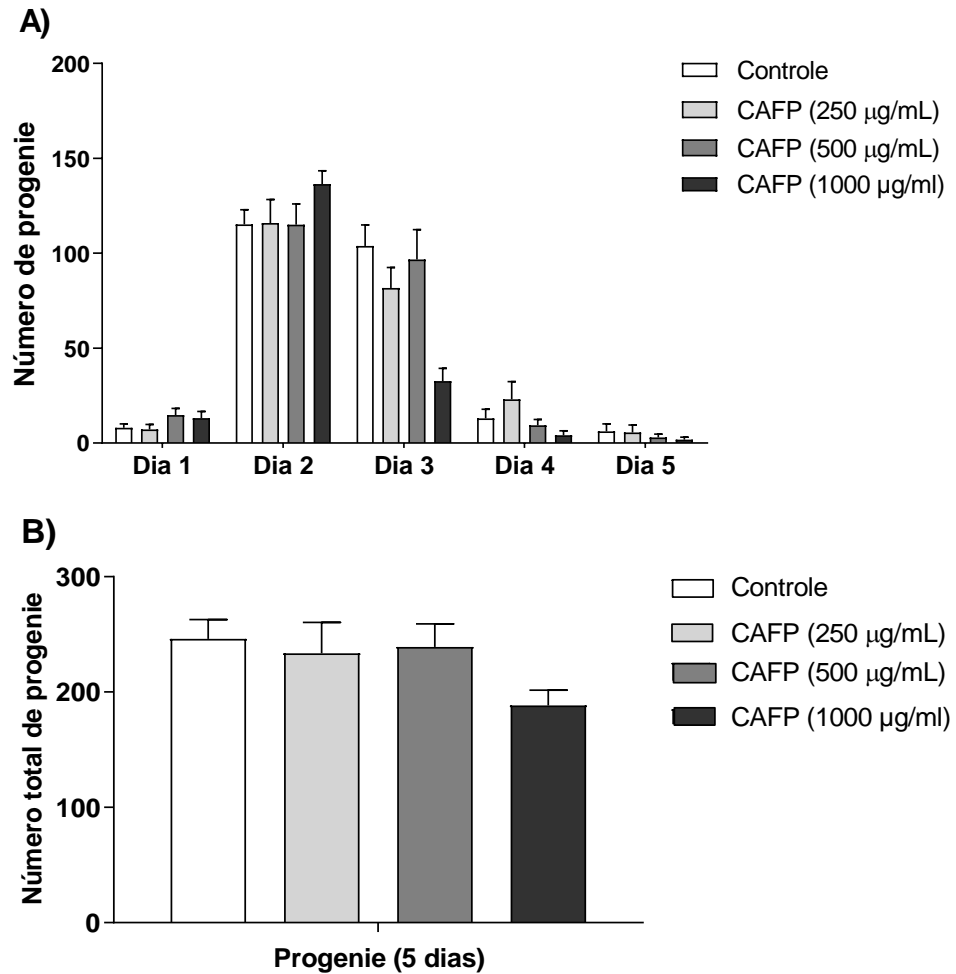


Fig. 3. Efeito da polpa do fruto de *C. adamantium* (CAFP) sobre a capacidade reprodutiva em *C. elegans* N2. **(A)** número diário de progênie e **(B)** número total de progênie em 5 dias. Os valores são expressos como média \pm EPM. * $p < 0.05$ quando o grupo tratado foi comparado com o grupo controle.

3.4.3. Toxicidade Locomotora

O efeito da CAFP sobre a capacidade locomotora dos nematoides até as fases adulto jovem e envelhecimento, representa um parâmetro de toxicidade importante em fases distintas do ciclo de vida. Os resultados demonstram que a CAFP, não promove declínio ou melhora na motilidade dos nematoides na fase jovem adulto (**Fig. 4A**). Por outro lado, durante a fase de envelhecimento, pôde ser observada uma melhora expressiva na motilidade dos nematoides tratados com as diferentes concentrações da CAFP (**Fig. 4B**). Nesta fase do ciclo de vida, a frequência de curvaturas corporais dos nematoides no grupo controle foi de $9,95 \pm 0,45$, enquanto que dos nematoides tratados

com a CAFP foram $11,30 \pm 0,27$ (250 $\mu\text{g}/\text{mL}$), $12,05 \pm 0,35$ (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e $13,50 \pm 0,40$ (1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Respectivamente, estes resultados expressam melhora de 13,56%, 21,10% e 35,67% no número de curvaturas corporais em comparação ao grupo controle.

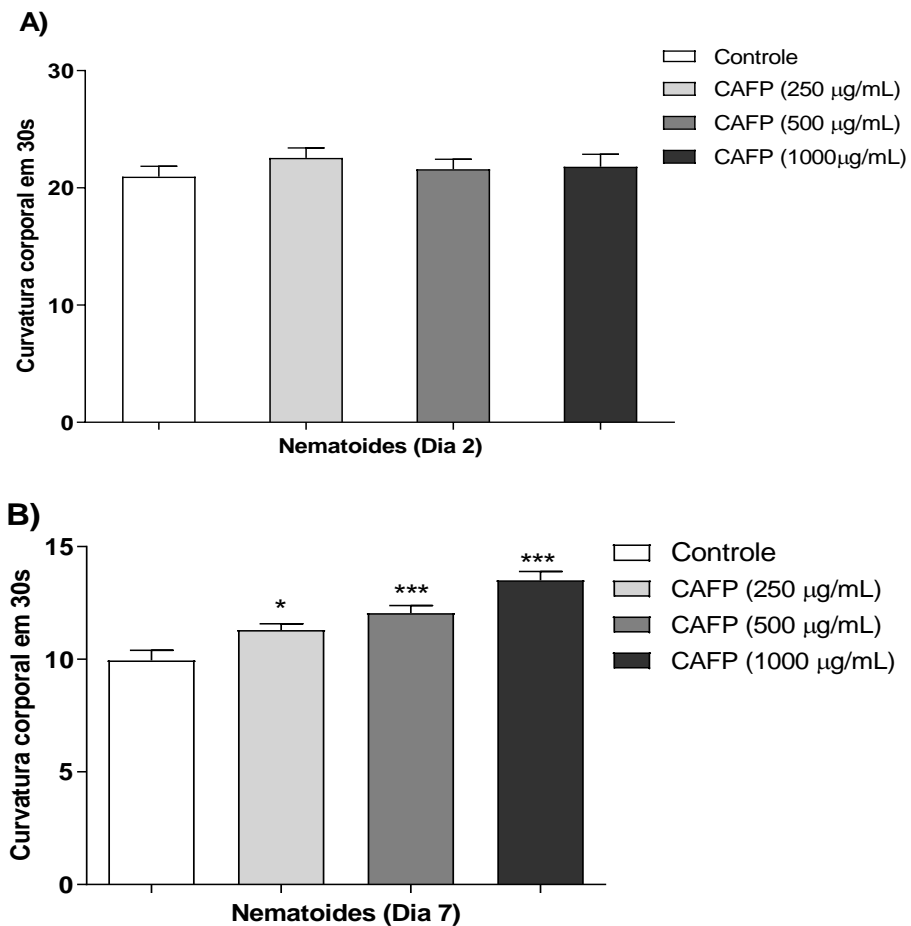


Fig. 4. Efeitos da polpa do fruto de *C. adamantium* (CAFP) sobre a locomoção de *C. elegans* N (A) fase jovem adulto e (B) fase de envelhecimento. Os valores são expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ quando o grupo tratado foi comparado com o grupo controle.

3.4.4. Proteção contra o estresse térmico

No ensaio de proteção contra o estresse térmico, é possível observar o efeito protetor da CAFP sobre a viabilidade dos nematoides durante o período de 6 horas (**Fig. 5**). Na primeira hora de exposição ao estresse térmico, o grupo controle apresentou $76,32 \pm 3,89\%$ de nematoides viáveis, enquanto os nematoides tratados com CAFP 250, 500 e 1000 $\mu\text{g/mL}$, apresentaram respectivamente a viabilidade de $93,75 \pm 1,83\%$; $89,46 \pm 3,57\%$ e $90,00 \pm 5,00\%$, respectivamente. Já ao final do período experimental (6h), o grupo controle apresentou apenas $2,50 \pm 1,33\%$ de nematoides viáveis, enquanto os nematoides tratados com CAFP 250; 500 e 1000 $\mu\text{g/mL}$ a viabilidade foi respectivamente de $13,89 \pm 1,62\%$, $13,42 \pm 4,40\%$ e $23,33 \pm 1,66\%$.

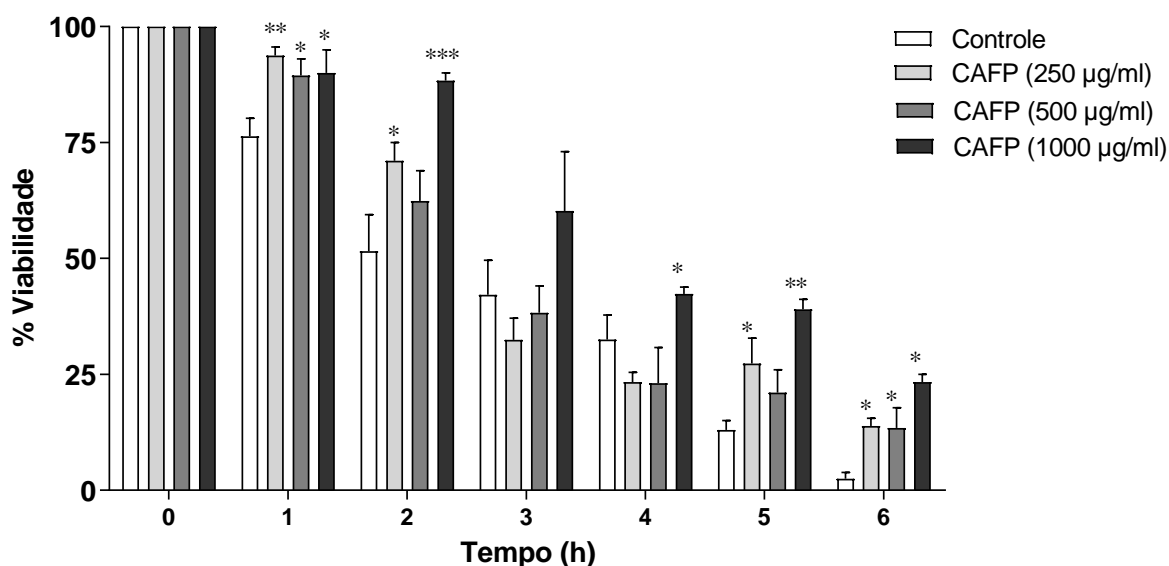


Fig. 5. Efeito protetor da polpa do fruto de *C. adamantium* (CAFP) em *C. elegans* N2 expostos ao estresse térmico. Os valores são expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ quando o grupo tratado foi comparado com o grupo controle (Juglone).

3.4.5. Proteção contra o estresse oxidativo

O aumento da resistência ao estresse oxidativo demonstra um efeito protetor benéfico frente ao agente estressor Juglone um potente gerador de espécies reativas de oxigênio. No ensaio de proteção contra o estresse oxidativo os nematoides tratados com a CAFP, foram capazes de resistir à ação do agente químico oxidante durante todo o período de avaliação (Fig. 6).

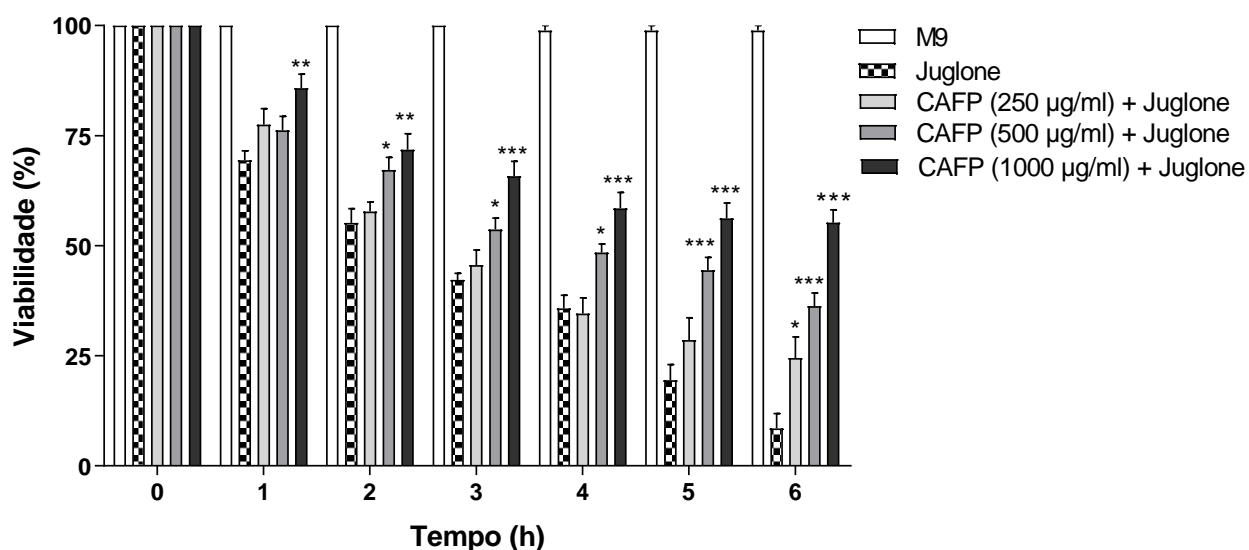


Fig. 6. Efeito protetor da polpa do fruto de *C. adamantium* (CAFP) em *C. elegans* N2 expostos ao estresse oxidativo induzido por Juglone. Os valores são expressos como média \pm EPM. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ quando o grupo tratado foi comparado com o grupo controle.

3.4.5. Expectativa de vida

Buscando demonstrar a capacidade da CAFP em prolongar a vida, avaliamos os efeitos da polpa sobre a expectativa de vida média e máxima de nematoides selvagens N2. Os resultados demonstram que a CAFP aumentou a expectativa de vida média e máxima dos nematoides de maneira dose-dependente (**Fig. 7** e **Tab. 4**). A expectativa de vida média dos nematoides tratados com a CAFP foi prolongada em 3,5 dias (250 $\mu\text{g/mL}$), 4,5 dias (500 $\mu\text{g/mL}$) e 4,5 dias (1000 $\mu\text{g/mL}$). Já os efeitos da CAFP sobre expectativa máxima de vida foram ainda maiores, prolongando a vida dos nematoides em 5,5 dias (250 $\mu\text{g/mL}$), 7,5 dias (500 $\mu\text{g/mL}$) e 8,5 dias (1000 $\mu\text{g/mL}$).

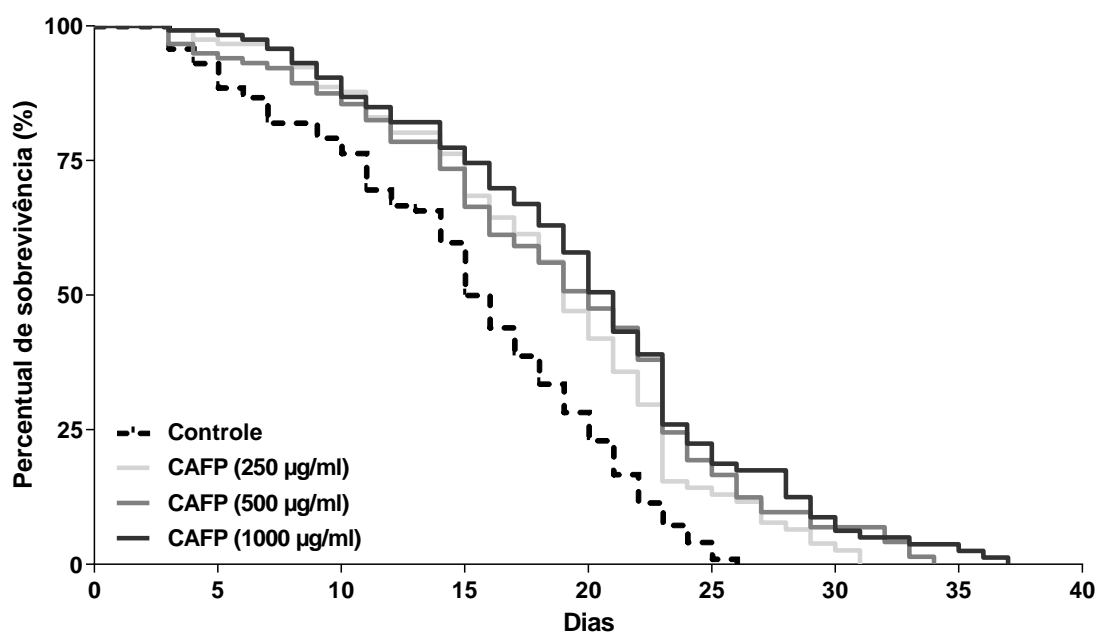


Fig. 7. Expectativa de vida em *C. elegans* N2 tratados com a polpa do fruto de *C. adamantium* (CAFP). Foram realizados dois ensaios em triplicatas. Os valores de *p* calculados pelo teste Log-rank.

Tabela 4. Efeitos dos tratamentos com a CAFP sobre a expectativa de vida de nematoides N2.

Tratamento	Expectativa de vida média	Extensão de vida média	Expectativa de vida máxima	Extensão de vida máxima	Log-rank Test vs. Controle	Nº de nematoides total
(µg/mL)	(Dias)	(%)	(Dias)	(%)		
Controle	16,00 ± 1,00	-	25,50 ± 0,05	-	-	120
CAFP (250)	19,50 ± 1,50	21,87	31,00 ± 0,00	21,56	<0.0001***	120
CAFP (500)	20,50 ± 1,50	28,12	33,00 ± 1,00	29,41	<0.0001***	120
CAFP (1000)	20,50 ± 0,50	28,12	34,00 ± 3,00	33,33	<0.0001***	120

3.4.6. Expressão de SOD-3 e GST-4

A capacidade da CAFP em modular genes alvos relacionados ao sistema de defesa antioxidante endógeno foi observada nas linhagens transgênicas CF1553 (SOD-3::GFP) e CL2166 (GST-4::GFP). Os resultados demonstram aumentos significativos na fluorescência de SOD-3 em 6,33; 49,33 e 54,67% em nematoides tratados com a CAFP (250, 500 e 1000 µg/mL), respectivamente (**Fig. 8**). Além disso, a CAFP (1000 µg/ml) também foi capaz de aumentar a expressão de GST-4 em 48,66% (**Fig. 9**).

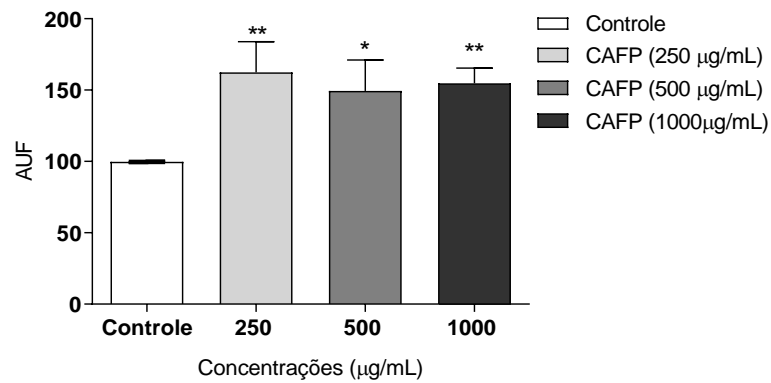
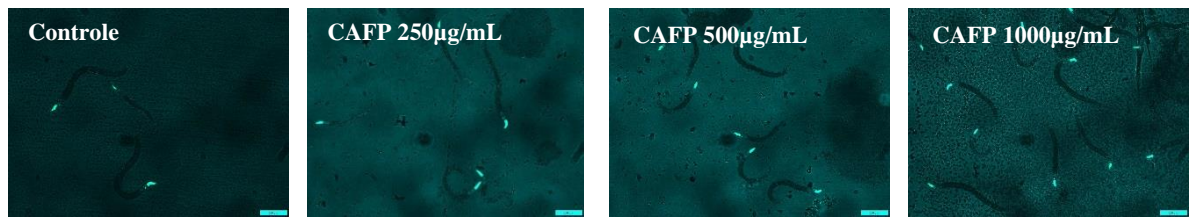


Fig. 8. Expressão de SOD-3::GFP em nematoides (CF1553 [*sod-3p*:GFP]) tratados com a polpa do fruto de *C. adamantium* (CAFP). Os valores são expressos como média ± EPM. * $p < 0.05$ e ** $p < 0.01$, quando o grupo tratado foi comparado com o grupo controle.

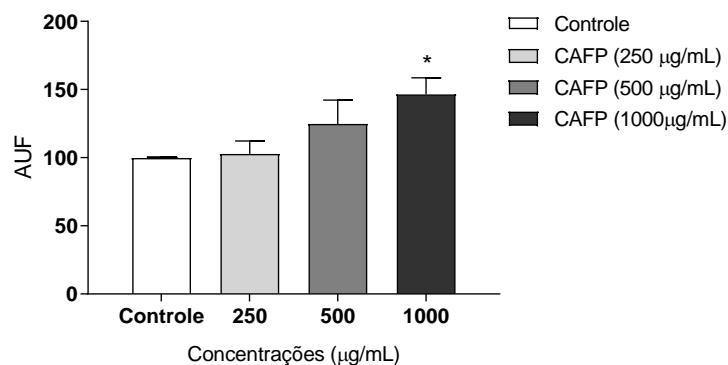
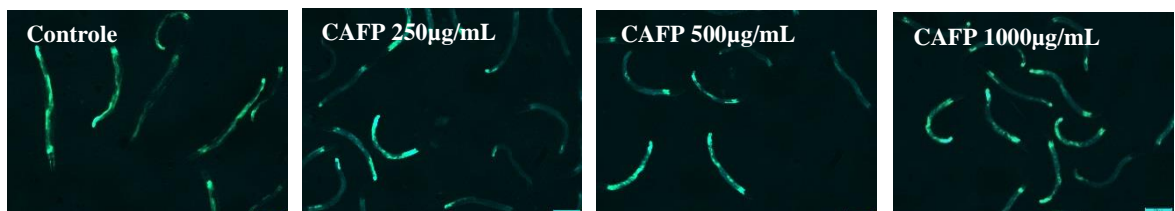
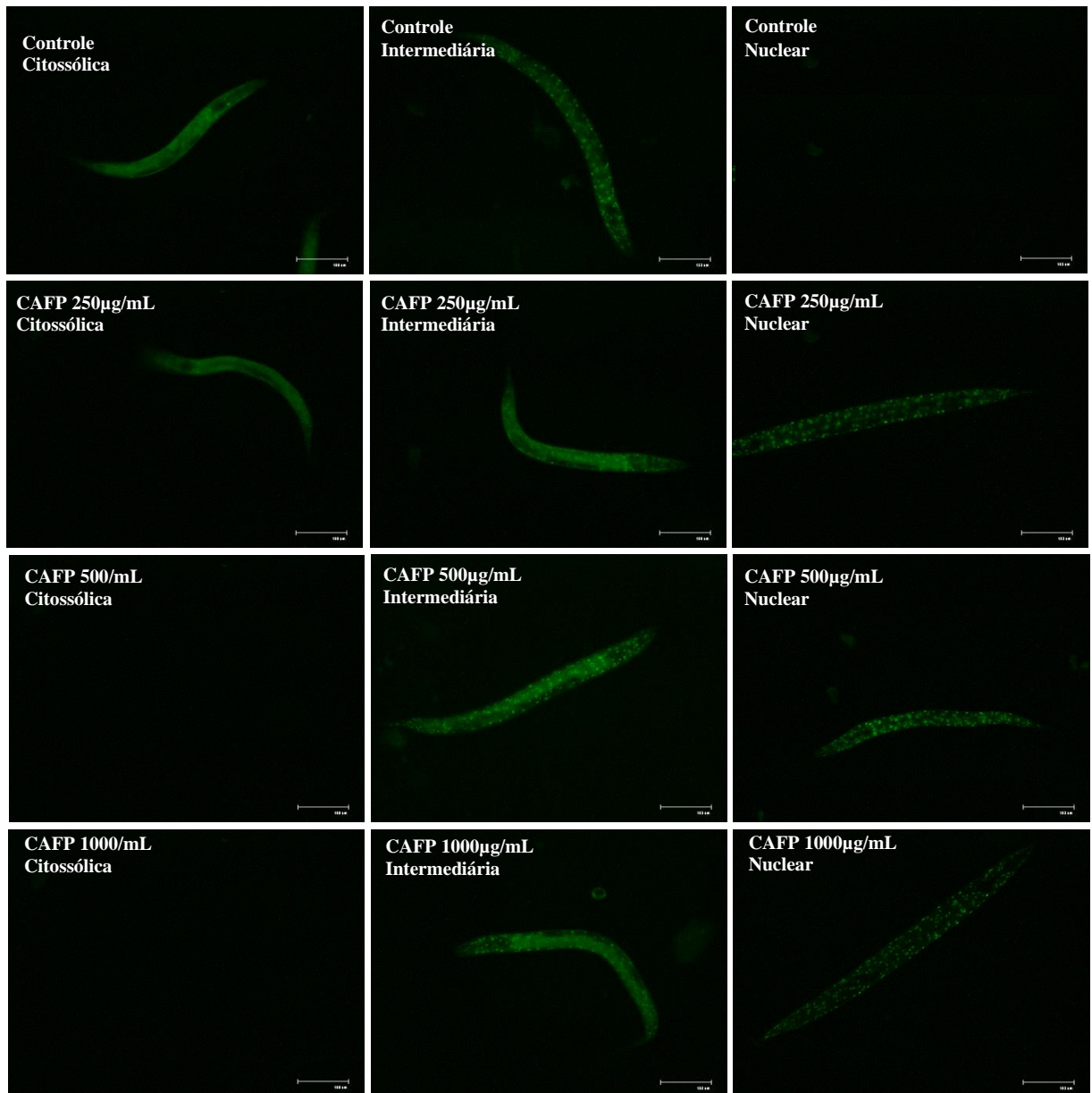


Fig. 9. Expressão de GST-4::GFP em nematoides (CL 2166 [*gst-4p*:GFP]) tratados com a polpa do fruto de *C. adamantium* (CAFP). Os valores são expressos como média ± EPM. * $p < 0.05$ quando o grupo tratado foi comparado com o grupo controle.

3.4.7. Localização subcelular do fator transcricional DAF-16

DAF-16/FOXO é um dos principais fatores de transcrição envolvidos na regulação de genes relacionados ao sistema de defesa antioxidante e a longevidade. Nas células sob condições de estresse basal, o DAF-16/FOXO permanece inativo na região citossólica. Para demonstrar o envolvimento da CAFP com ativação desta via, avaliamos a localização subcelular do fator de transcrição DAF-16. Os resultados demonstram que todas as concentrações da CAFP foram capazes de induzir a translocação de DAF-16 para as regiões intermediária e nuclear das células (**Fig. 10A e B**). A CAFP induziu maiores translocações para a região intermediária das células, desta forma os nematoides tratados com a CAFP (250, 500 e 1000 µg/mL) apresentaram translocação intermediária de $91,67 \pm 4,91$; $84,50 \pm 0,87$ e $79,50 \pm 2,02\%$, enquanto o grupo controle apresentou $55,00 \pm 8,66\%$. Já a translocação para a região nuclear, ocorreu somente nos nematoides tratados com a CAFP, correspondente ao aumento de $4,67 \pm 2,40\%$ (250 µg/mL); $14,17 \pm 0,93\%$ (500 µg/mL) e $16,50 \pm 3,62\%$ (1000 µg/mL).

A)



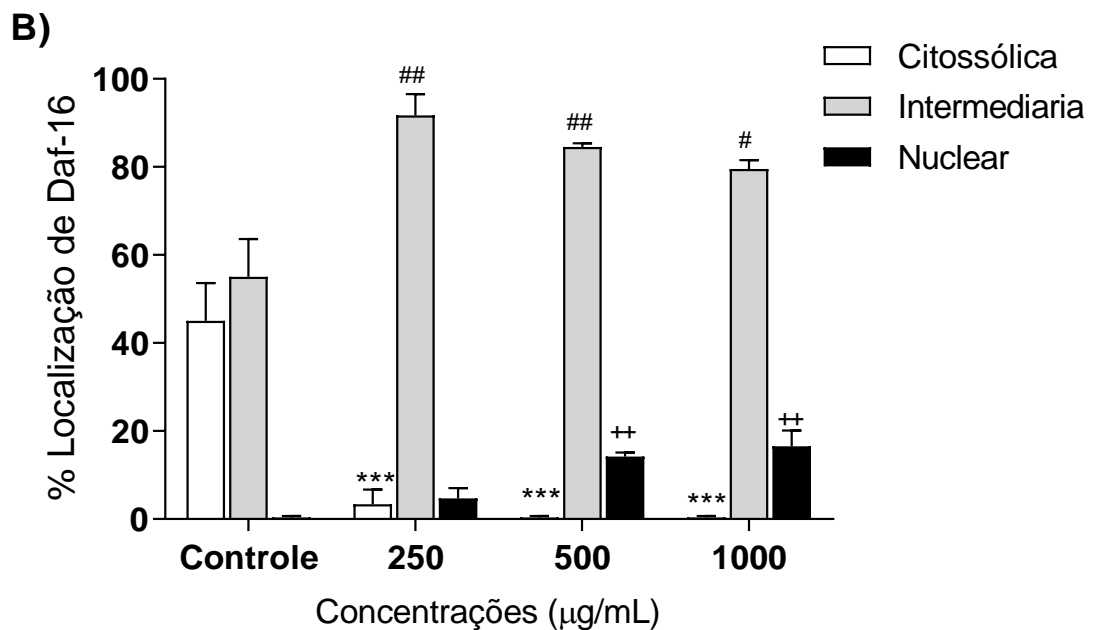


Fig. 10. (A) Expressão e (B) localização subcelular de DAF-16 em nematoides (TJ356 [daf-16p: daf-16a / b: GFP + rol-6 (su1006)]) tratados com a polpa do fruto de *C. adamantium* (CAF). Os valores são expressos como média \pm EPM. *** $p < 0.001$, localização citossólica quando comparado com o grupo controle. # $p < 0.05$ e ## $p < 0.01$, localização intermediária quando comparado com o grupo controle. ++ $p < 0.01$, localização nuclear quando comparado com o grupo controle.

4. Discussão

No Bioma brasileiro Cerrado são encontradas diferentes espécies frutíferas com características organolépticas únicas, refletindo a diversidade de compostos bioativos e seu potencial para o desenvolvimento de alimentos nutracêuticos.

Nesse contexto, os frutos nativos se destacam, pois são considerados fontes naturais de substâncias bioativas advindas de metabólitos secundários, tais como os alcaloides, glicosídeos, ácidos graxos, terpenóides e polifenóis (Biazotto et al., 2019). As propriedades benéficas de diferentes frutos nativos estão associadas aos seus constituintes químicos que desempenham relevantes atividades biológicas, tais como, antimicrobiana (Cardoso et al., 2010), anti-proliferativa (Alves et al., 2019), anti-inflamatória (Roll et al., 2018) e antioxidante (Schiassi et al., 2018). Entre as espécies

frutíferas nativas, investigamos os constituintes químicos e as propriedades biológicas da polpa do fruto de *Campomanesia adamantium* (CAFP).

Neste estudo, identificamos na CAFP constituintes químicos pertencentes à classe de compostos fenólicos, incluindo os ácidos fenólicos (ácido gálico e ácido elágico), os flavonoides (catequina, epicatequina, quercetina e methylflanona). E ainda, os ácidos carboxílicos orgânicos (ácido pentanóico e ácido cítrico) e o monossacarídeo hexose. Além disso, quantificamos o ácido ascórbico e pigmentos lipofílicos, tais como, β -caroteno, licopeno, as clorofilas a e b. Os compostos fenólicos são descritos como os principais compostos bioativos antioxidantes presentes em plantas, com capacidade de eliminar radicais livres e proteger constituintes celulares contra danos oxidativos (Qin et al., 2019). Dentre estes, os flavonoides atuam por diferentes mecanismos, tais como, via eliminação direta de ROS; quelação de metais e ativação de enzimas antioxidantes (Procházková et al., 2011). Compostos intermediários do ácido pentanóico são capazes de atuar em mecanismos de defesa celular, inativando a enzima óxido nítrico sintetase neuronal via desmetilação oxidativa, impedindo que o óxido nítrico reaja com o radical ânion superóxido e forme peroxinitrito, que em altos níveis está associado a patogênese de doenças neurodegenerativas (Tang et al., 2015). O ácido cítrico, além de ser um agente intermediário do ciclo dos ácidos tricarboxílicos no metabolismo de organismos aeróbicos, é amplamente utilizado na indústria de alimentos e farmacêutica por suas propriedades tamponantes, anticoagulante, anti-inflamatória e antioxidante (Zhao et al., 2019).

Já o ácido ascórbico, conhecido como vitamina C, é considerado micronutriente essencial e está presente em vegetais e frutos (Fang et al., 2017). Este composto desempenha relevantes funções em numerosos processos fisiológicos, atuando como agente redutor na maioria das reações que envolvem espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, também atua como cofator enzimático das principais enzimas antioxidantes superóxido dismutase, catalase e glutathione (Carr & Maggini, 2017). A ingestão do ácido ascórbico em concentrações fisiológicas está associada à prevenção de doenças cardíacas, atividade anti-inflamatória, biossíntese de colágeno, proteção antioxidante contra raios UV (Carr & Maggini, 2017) e aumento da expectativa de vida em camundongos (Aumailley et al., 2018) e em *C. elegans* (Dallaire et al., 2014). Outros estudos também identificaram compostos fenólicos, flavonoides e ácido ascórbico no

extrato de frutos de *C. adamantium* e os relacionaram às suas propriedades antimicrobiana e antioxidante (Cardoso et al., 2010 e Alves et al., 2017).

Os carotenoides e os pigmentos de clorofila são descritos por suas propriedades antioxidantes e associados à prevenção de doenças crônicas (Schröter et al., 2018). Embora os seres humanos e outros animais não sejam capazes de sintetizar carotenoides, estes compostos desempenham importantes atividades biológicas, na reprodução, no desenvolvimento embrionário, na modulação imunológica e na manutenção dos tecidos oculares (Müller-Maatsch et al., 2017). A clorofila é o principal pigmento de origem vegetal com característica lipofílica, anteriormente descrita por suas propriedades antimutagênica e antioxidante (Lanfer-Marquez et al., 2005). Assim a atividade antioxidante da CAFP demonstrada pela captura direta de radicais, pode ser atribuída ao efeito isolado e/ou somatório de seus compostos químicos, uma vez que são capazes de atuar por diferentes mecanismos antioxidantes, inclusive promovendo a neutralização de radicais livres através de doação átomos de hidrogênio e/ou sequestrando elétrons de moléculas instáveis.

Nas últimas décadas, ocorreu um crescente interesse por compostos antioxidantes naturais com efeitos benéficos, capazes de promover uma melhor qualidade de vida e envelhecimento saudável (Hooper & Cassidy, 2006; Shahidi & Zhong, 2010; Gurău et al., 2018). Neste sentido, os frutos se destacam uma vez que já fazem parte da dieta humana, contudo, para garantir sua eficácia e o consumo seguro são necessárias avaliações toxicológicas e comprovação das propriedades biológicas.

Nesta perspectiva, o modelo experimental *in vivo* *C. elegans* é uma importante ferramenta utilizada na pesquisa científica para investigar as propriedades biológicas, efeitos toxicológicos, bem como os mecanismos moleculares resultantes da ação de compostos isolados e/ou produtos naturais (Guerrero-Rubio et al., 2019).

Os parâmetros toxicológicos avaliados demonstram que os nematoides expostos a CAFP não apresentaram quaisquer comprometimentos de seus parâmetros fisiológicos ou de viabilidade. Pelo contrário, nos parâmetros de toxicidade locomotora em nematoides adultos de meia idade, foi demonstrado o efeito protetor da CAFP. Em *C. elegans*, as células musculares perdem gradualmente a vitalidade causando declínios na mobilidade e alterações fisiológicas que estão intimamente relacionadas aos efeitos do

envelhecimento (Yang et al., 2018). Os movimentos corporais tornam-se esporádicos a partir do sexto ao décimo dia de vida, entretanto, nematoides adultos que apresentam declínio locomotor mais acelerado apresentam maior probabilidade de redução da expectativa de vida (Herndon et al., 2018). Além disso, a ausência de alterações observadas neste estudo, corrobora com o estudo de Viscardi et al. (2017b), que demonstraram que as cascas e sementes do fruto de *C. adamantium* não promovem efeitos tóxicos em camundongos.

Os efeitos benéficos da CAFP foram demonstrados *in vivo* nos ensaios antioxidantes, frente ao estresse térmico e oxidativo. Quando organismos vivos são expostos a agentes estressores, como a alta temperatura, inicia-se o processo de desnaturação proteica que afeta inúmeras biomoléculas e conseqüentemente suas funções estruturais e metabólicas (Lima et al., 2015). Neste estudo, a atividade protetora demonstrada frente ao estresse térmico pode estar relacionada à presença dos constituintes químicos identificados na CAFP, entre eles, os flavonoides epicatequina, catequina e seus oligômeros, as procianidinas, descritos por suas propriedades antioxidantes e sequestradoras de radicais livres com efeitos protetores contra o estresse térmico em *C. elegans* (Ayuda-Durán et al., 2019).

O estresse oxidativo está entre os principais fatores que acelera o processo de envelhecimento e limita a expectativa de vida tanto em seres humanos quanto em outros animais (Arantes et al., 2018). Este estudo mostra que os nematoides quando tratados com CAFP e expostos ao agente pró-oxidante Juglone, um agente químico indutor de espécies reativas (Wang & Wink, 2016), são mais resistentes ao estresse oxidativo, demonstrado pela maior viabilidade dos nematoides. Estes dados demonstraram o efeito protetor da CAFP contra o estresse oxidativo, podendo ser relacionado a sua capacidade antioxidante, envolvendo a ativação de mecanismos diretos, como a remoção de radicais livres, e mecanismos indiretos como a modulação do sistema antioxidante endógeno, através da expressão de enzimas antioxidantes que atuam controlando os níveis de espécies reativas de oxigênio e espécies reativas de nitrogênio (Azevedo et al., 2019). No entanto, vale ressaltar que outras vias de sinalização podem estar envolvidas neste processo, considerando a grande variedade de constituintes químicos identificados na CAFP que podem atuar tanto de forma isolada quanto sinérgica.

Em *C. elegans* a resistência a diferentes estresses é relacionada ao aumento da expectativa de vida (Jattujan et al., 2018). Essa relação também pôde ser observada neste estudo, pois além de promover efeitos protetores contra agentes estressores, a CAFP também foi capaz de aumentar a expectativa média de vida e prolongar a vida útil em *C. elegans*. O mirtilo, outro fruto rico em compostos fitoquímicos bioativos como as protocianidinas também foi capaz de promover efeitos benéficos contra o estresse oxidativo, melhorar a locomoção e aumentar a expectativa de vida em nematoides via modulação de DAF-16 e regulação positiva da expressão de genes antioxidantes (Wang et al., 2018). Já o cranberry, fruto rico em compostos fenólicos foi capaz de aumentar a expectativa de vida e promover resistência ao estresse térmico através da modulação das vias envolvidas nos sistemas antioxidantes DAF-16/FOXO e SKN-1/Nrf-2 (Guha et al., 2013).

Dentre os mecanismos avaliados que podem auxiliar no entendimento das respostas benéficas promovidas pela CAFP, está a modulação da expressão de genes antioxidantes alvos, tais como a superóxido dismutase (SOD-3) e glutathione-S-transferase (GST-4) e ativação do fator transcricional DAF-16 (Wang et al., 2012). De acordo com os nossos resultados, a CAFP foi capaz de ativar e translocar DAF-16 para o núcleo das células e modular a expressão de SOD-3 e GST-4. A ativação de vias antioxidantes endógenas é importante para a desintoxicação em *C. elegans* o que favorece os mecanismos de proteção contra os danos causados por estresse e ainda, promover a longevidade (Salgueiro et al., 2017). Em humanos, o processo de envelhecimento, representa fator crítico e está relacionado com alterações funcionais e morfológicas que levam ao declínio progressivo das funções biológicas. Intervenções, principalmente alimentares, que promovam efeitos benéficos e impactem positivamente durante a fase de envelhecimento podem prolongar a expectativa de vida e promover saúde.

Em conjunto, nossos resultados demonstram que a CAFP, apresentou uma grande variedade de compostos químicos, ausência de toxicidade. Promoveu efeito protetor contra os estresses térmico e oxidativo, e aumentou a expectativa de vida em *C. elegans* via captura direta de radicais livres, aumento da expressão das enzimas antioxidantes superóxido dismutase e glutathione transferase e ativação do fator transcricional DAF-16. Demonstrando assim, o potencial funcional e nutracêutico da espécie frutífera *C. adamantium* nativa do Bioma Cerrado brasileiro.

Referências Bibliográficas

Alves, A. M., Dias, T., Hassimotto, N. M. A., & Naves, M. M. V. (2017). Ascorbic acid and phenolic contents, antioxidant capacity and flavonoids composition of Brazilian Savannah native fruits. *Food Science and Technology*, 37(4), 564-569. <http://dx.doi.org/10.1590/1678-457x.26716>.

Alves, C. C. F., Oliveira, J. D., Estevam, E. B. B., Xavier, M. N., Nicolella, H. D., Furtado, R. A., Tavares, D. C., & Miranda, M. L. D. (2019). Antiproliferative activity of essential oils from three plants of the Brazilian Cerrado: *Campomanesia adamantium* (Myrtaceae), *Protium ovatum* (Burseraceae) and *Cardiopetalum calophyllum* (Annonaceae). *Brazilian Journal of Biology*, *Epub April 18*, 2019. <https://dx.doi.org/10.1590/1519-6984.192643>.

Arantes, L. P., Machado, M. L., Zamberlan, D. C., Da Silveira, T. L., da Silva, T. C., da Cruz, I. B. M., ... & Soares, F. A. A. (2018). Mechanisms involved in anti-aging effects of guarana (*Paullinia cupana*) in *Caenorhabditis elegans*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 51(9). <http://dx.doi.org/10.1590/1414-431x20187552>.

Aumailley, L., Dubois, M. J., Brennan, T. A., Garand, C., Paquet, E. R., Pignolo, R. J., ... & Lebel, M. (2018). Serum vitamin C levels modulate the lifespan and endoplasmic reticulum stress response pathways in mice synthesizing a nonfunctional mutant WRN protein. *The FASEB Journal*, 32(7), 3623-3640. <https://doi.org/10.1096/fj.201701176R>.

Ayuda-Durán, B., González-Manzano, S., Miranda-Vizueté, A., Dueñas, M., Santos-Buelga, C., & González-Paramás, A. M. (2019). Epicatechin modulates stress-resistance in *C. elegans* via insulin/IGF-1 signaling pathway. *PloS One*, 14(1): e0199483. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199483>.

Azevedo B. C., Roxo M., Borges, M. C., Peixoto, H., Crevelin, E. J., Bertoni, B. W., ... & Winck, M. (2019). Antioxidant activity of an aqueous leaf extract from *Uncaria tomentosa* and its major alkaloids mitraphylline and isomitraphylline in *Caenorhabditis elegans*. *Molecules*, 24(18), 3299. <https://doi.org/10.3390/molecules24183299>.

Biazotto, K. R., Mesquita, L. M. D. S., Neves, B. V., Braga, A. R. C., Tangerina, M., Vilegas, W., ... & De Rosso, V. V. (2019). Brazilian biodiversity fruits: discovering bioactive compounds from underexplored sources. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *67*(7), 1860-1876. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b05815>.

Businaro, R., Corsi, M., Asprino, R., Di Lorenzo, C., Laskin, D., Corbo, R. M., Ricci S., Pinto, A. (2018). Modulation of inflammation as a way of delaying Alzheimer's disease progression: the diet's role. *Current Alzheimer Research*, *15*(4), 363-380. <https://doi.org/10.2174/1567205014666170829100100>.

Campos, J. F., Espindola, P. P., Torquato, H. F., Vital, W. D., Justo, G. Z., Silva, D. B., ... & dos Santos, E. L. (2017a). 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*, *8*, 466. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00466>.

Cardoso, C. A. L., Salmazzo, G. R., Honda, N. K., Prates, C. B., Vieira, M. D. C. & Coelho, R. G. (2010). Antimicrobial activity of the extracts and fractions of hexanic fruits of *Campomanesia* species (*Myrtaceae*). *Journal of Medicinal Food*, *13*(5), 1273-1276. <https://doi.org/10.1089/jmf.2009.0047>.

Carr, A. & Maggini, S. (2017). Vitamin C and immune function. *Nutrients*, *9*(11), 1211. <https://doi.org/10.3390/nu9111211>.

Crowe-White, K., Parrott, J. S., Stote, K. S., Gutschall, M., Benson-Davies, S., Droke, E., O'Neil C.E., Wolfram T. & Ziegler, P. (2017). Metabolic impact of 100% fruit juice consumption on antioxidant/oxidant status and lipid profiles of adults: an evidence-based review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *57*(1), 152-162. <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1102861>.

Dallaire, A., Proulx, S., Simard, M. J., & Lebel, M. (2014). Expression profile of *Caenorhabditis elegans* mutant for the Werner syndrome gene ortholog reveals the

impact of vitamin C on development to increase life span. *BMC Genomics*, *15*(1), 940. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-940>.

De Souza, J. C., Piccinelli, A. C., Aquino, D. F., de Souza, V. V., Schmitz, W. O., Traesel, G. K., ... & Arena, A. C. (2016). Toxicological analysis and antihyperalgesic, antidepressant, and anti-inflammatory effects of *Campomanesia adamantium* fruit barks. *Nutritional Neuroscience*, *20*(1), 23-31. <https://doi.org/10.1179/1476830514Y.00000000145>.

De Oliveira Fernandes, T., de Ávila, R. I., de Moura, S. S., de Almeida Ribeiro, G., Naves, M. M. V., & Valadares, M. C. (2015). *Campomanesia adamantium* (Myrtaceae) fruits protect HEPG2 cells against carbon tetrachloride-induced toxicity. *Toxicology Reports*, *2*, 184-193. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2014.11.018>.

Espíndola, P. P., da Rocha, P., Carollo, C. A., Schmitz, W. O., Pereira, Z. V., Vieira, M., Dos Santos, E. L., ... & de Picoli Souza, K. (2016). Antioxidant and Antihyperlipidemic Effects of *Campomanesia adamantium* O. Berg root. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2016*. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/7910340>.

Fang, T., Zhen, Q., Liao, L., Owiti, A., Zhao, L., Korban, S. S., & Han, Y. (2017). Variation of ascorbic acid concentration in fruits of cultivated and wild apples. *Food Chemistry*, *225*, 132-137. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.01.014>.

Guerrero-Rubio, M. A., Hernández-García, S., García-Carmona, F., & Gandía-Herrero, F. (2019). Extension of life-span using a RNAi model and *in vivo* antioxidant effect of *Opuntia* fruit extracts and pure betalains in *Caenorhabditis elegans*. *Food Chemistry*, *274*, 840-847. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.09.067>.

Guha, S., Cao, M., Kane, R. M., Savino, A. M., Zou, S., & Dong, Y. (2013). The longevity effect of cranberry extract in *Caenorhabditis elegans* is modulated by *daf-16* and *osr-1*. *Age*, *35*(5), 1559-1574. <https://doi.org/10.1007/s11357-012-9459-x>.

Gurău, F., Baldoni, S., Prattichizzo, F., Espinosa, E., Amenta, F., Procopio, A. D., ... & Olivieri, F. (2018). Anti-senescence compounds: a potential nutraceutical approach to healthy aging. *Ageing Research Reviews*, *46*, 14-31. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2018.05.001>.

Heffron, S. P., Rockman, C. B., Adelman, M. A., Gianos, E., Guo, Y., Xu, J. F., & Berger, J. S. (2017). Greater frequency of fruit and vegetable consumption is associated with lower prevalence of peripheral artery disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *37*(6), 1234-1240. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.116.308474>.

Herndon, L. A., Wolkow, C. A., Driscoll, M. & Hall, D. H. (2018). Introduction to Aging in *C. elegans*. In *Worm Atlas*. <https://www.wormatlas.org/aging/introduction/AIntroframeset.html>

Hooper, L., & Cassidy, A. (2006). A review of the health care potential of bioactive compounds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *86*(12), 1805-1813. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2599>.

Jattujan, P., Chalorak, P., Siangcham, T., Sangpairoj, K., Nobsathian, S., Poomtong, T., ... & Meemon, K. (2018). *Holothuria scabra* extracts possess anti-oxidant activity and promote stress resistance and lifespan extension in *Caenorhabditis elegans*. *Experimental Gerontology*, *110*, 158-171. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2018.06.006>.

Lanfer-Marquez, U. M., Barros, R. M., & Sinnecker, P. (2005). Antioxidant activity of chlorophylls and their derivatives. *Food Research International*, *38*(8-9), 885-891. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2005.02.012>.

Lescano, C. H., Freitas de Lima, F., Mendes-Silvério, C. B., Justo, A., da Silva Baldivia, D., Vieira, C. P., Sanjinez-Argandoña, E. J., Cardoso, C., Mónica, F. Z., ... Pires de Oliveira, I. (2018). Effect of polyphenols from *Campomanesia adamantium* on Platelet Aggregation and Inhibition of Cyclooxygenases: Molecular Docking and *in*

Vitro Analysis. *Frontiers in Pharmacology*, 9, 617. [https://doi.org/10.3389 / fphar.2018.00617](https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00617).

Lima e Silva, M. C., Bogo, D., Alexandrino, C. A., Perdomo, R. T., Figueiredo, P. D. O., do Prado, P. R., ... & Sarmiento, U. C. (2018). Antiproliferative activity of extracts of *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg and isolated compound dimethylchalcone against B16-F10 murine melanoma. *Journal of Medicinal Food*, 21(10), 1024-1034. <https://doi.org/10.1089/jmf.2018.0001>.

Lim, J. Y., Kim, N. A., Lim, D. G., Kim, K. H., & Jeong, S. H. (2015). Effects of thermal and mechanical stress on the physical stability of human growth hormone and epidermal growth factor. *Archives of Pharmacal Research*, 38(8), 1488-1498. <https://doi.org/10.1007/s12272-014-0521-3>.

Markham, K. R. (1982). *Techniques of Flavonoids Identification*. New York, NY: Academic Press Inc. (London) LTD.

Müller-Maatsch, J., Sprenger, J., Hempel, J., Kreiser, F., Carle, R., & Schweiggert, R. M. (2017). Carotenoids from gac fruit aril (*Momordica cochinchinensis* [Lour.] Spreng.) are more bioaccessible than those from carrot root and tomato fruit. *Food Research International*, 99, 928-935. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.10.053>.

Nocchi S. R., Companhoni M. V., de Mello J. C., Dias Filho B. P., Nakamura C. V., Carollo C. A., Silva D. B., Ueda-Nakamura T. (2017). Antiviral Activity of Crude Hydroethanolic Extract from *Schinus terebinthifolia* against *Herpes simplex* Virus Type 1. *Planta Medica*, 83(6):509-518. <https://doi.org/10.1055/s-0042-117774>.

Peixoto, J. D. C., Neves, B. J., Vasconcelos, F. G., Napolitano, H. B., Barbalho, M. G. D. S., & Rosseto, L. P. (2019). Flavonoids from Brazilian Cerrado: Biosynthesis, Chemical and Biological Profile. *Molecules*, 24(16), 2891. <https://doi.org/10.3390/molecules24162891>.

Perez-Cornago, A., Travis, R. C., Appleby, P. N., Tsilidis, K. K., Tjønneland, A., Olsen, A., ... & Peppas, E. (2017). Fruit and vegetable intake and prostate cancer risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC). *International Journal of Cancer*, *141*(2), 287-297. <https://doi.org/10.1002/ijc.30741>.

Procházková, D., Boušová, I., & Wilhelmová, N. (2011). Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia*, *82*(4), 513-523. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2011.01.018>.

Qin, F., Yao, L., Lu, C., Li, C., Zhou, Y., Su, C., ... & Shen, Y. (2019). Phenolic composition, antioxidant and antibacterial properties, and in vitro anti-HepG2 cell activities of wild apricot (*Armeniaca Sibirica* L. Lam) kernel skins. *Food and Chemical Toxicology*, *129*, 354-364. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.05.007>.

Reichert C. L., Silva D. B., Carollo C. A., Weffort-Santos A. M., Santos C. A. M. (2018). Metabolic profiling and correlation analysis for the determination of killer compounds of proliferating and clonogenic HRT-18 colon cancer cells from *Lafoensia pacari*. *Journal of Ethnopharmacology*, *5*(224), 541-552. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.06.021>.

Rodrigues, A. G. (2001). Buscando raíces. *Horizontes Antropológicos*, *7*(16), 131-144. <https://dx.doi.org/10.1590/S0104-71832001000200007>.

Salgueiro, W. G., Goldani, B. S., Peres, T. V., Miranda-Vizuete, A., Aschner, M., da Rocha, J. B. T., ... & Ávila, D. S. (2017). Insights into the differential toxicological and antioxidant effects of 4-phenylchalcogenil-7-chloroquinolines in *Caenorhabditis elegans*. *Free Radical Biology and Medicine*, *110*, 133-141. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.05.020>.

Santos C. C. S, Masullo M., Cerulli A., Mari A., Estevam C. D. S., Pizza C., Piacente S. (2017). Isolation of antioxidant phenolics from *Schinopsis brasiliensis* based on a preliminary LC-MS profiling. *Phytochemistry*, *140*, 45-51. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2017.04.008>.

Schiassi, M. C. E. V., de Souza, V. R., Lago, A. M. T., Campos, L. G., & Queiroz, F. (2018). Fruits from the Brazilian Cerrado region: physico-chemical characterization, bioactive compounds, antioxidant activities, and sensory evaluation. *Food Chemistry*, *245*, 305-311. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.10.104>.

Schröter, D., Baldermann, S., Schreiner, M., Witzel, K., Maul, R., Rohn, S., & Neugart, S. (2018). Natural diversity of hydroxycinnamic acid derivatives, flavonoid glycosides, carotenoids and chlorophylls in leaves of six different amaranth species. *Food Chemistry*, *267*, 376-386. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.11.043>.

Shahidi, F., & Zhong, Y. (2010). Novel antioxidants in food quality preservation and health promotion. *European Journal of Lipid Science and Technology*, *112*(9), 930-940. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201000044>.

Siqueira E. M. A., Rosa F. R., Fustinoni A. M., De Sant'Ana L. P., Arruda S. F. (2013) Brazilian Savanna Fruits Contain Higher Bioactive Compounds Content and Higher Antioxidant Activity Relative to the Conventional Red Delicious Apple. *PloS One*, *8*(8): e72826. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072826>.

Tang, W., Li, H., Doud, E. H., Chen, Y., Choing, S., Plaza, C., ... & Silverman, R. B. (2015). Mechanism of Inactivation of Neuronal Nitric Oxide Synthase by (S)-2-amino-5-(2-(methylthio) acetimidamido) pentanoic Acid. *Journal of the American Chemical Society*, *137*(18), 5980-5989. <https://doi.org/10.1021/jacs.5b01202>.

Vauzour, D. (2012). Dietary polyphenols as modulators of brain functions: biological actions and molecular mechanisms underpinning their beneficial effects. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2012*. <https://doi.org/10.1155/2012/914273>.

Viscardi, D. Z., Oliveira, V. S. D., Arrigo, J. D. S., Piccinelli, A. C., Cardoso, C. A., Maldonade, I. R., ... & Sanjinez-Argandoña, E. J. (2017a). Anti-inflammatory, and antinociceptive effects of *Campomanesia adamantium* microencapsulated pulp. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, *27*(2), 220-227. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjp.2016.09.007>.

Viscardi, D. Z., da Silva Arrigo, J., Correia, C. D. A. C., Kassuya, C. A. L., Cardoso, C. A. L., Maldonade, I. R., ... & Argandoña, E. J. S. (2017b). Seed and peel essential oils obtained from *Campomanesia adamantium* fruit inhibit inflammatory and pain parameters in rodents. *PloS One*, *12*(2), e0157107. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157107>.

Wang, E., & Wink, M. (2016). Chlorophyll enhances oxidative stress tolerance in *Caenorhabditis elegans* and extends its lifespan. *Peer J*, *4* e1879. <https://doi.org/10.7717/peerj.1879>.

Wang, H., Liu, J., Li, T., & Liu, R. H. (2018). Blueberry extract promotes longevity and stress tolerance via DAF-16 in *Caenorhabditis elegans*. *Food & Function*, *9*(10), 5273-5282. <https://doi.org/10.1039/C8FO01680A>.

Wang, Y., Jian, F., Wu, J., & Wang, S. (2012). Stress-response protein expression and DAF-16 translocation were induced in tributyltin-exposed *Caenorhabditis elegans*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, *89*(4), 704-711. <https://doi.org/10.1007/s00128-012-0760-2>.

Yang, Z. Z., Yu, Y. T., Lin, H. R., Liao, D. C., Cui, X. H., & Wang, H. B. (2018). *Lonicera japonica* extends lifespan and healthspan in *Caenorhabditis elegans*. *Free Radical Biology and Medicine*, *129*, 310-322. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.09.035>.

Zhao, S., Chen, Z., Zheng, J., Dai, J., Ou, W., Xu, W., ... & Zhang, Y. (2019). Citric acid mitigates soybean meal induced inflammatory response and tight junction disruption by altering TLR signal transduction in the intestine of turbot, *Scophthalmus maximus* L. *Fish & Shellfish Immunology*. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.06.004>.

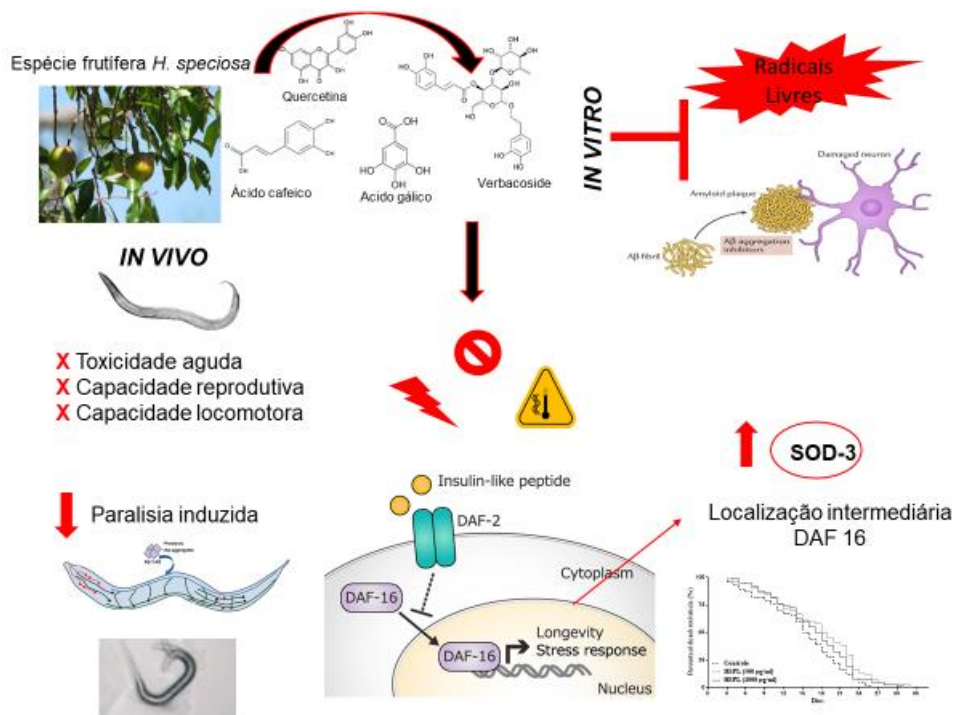
Zou, Z., Xi, W., Hu, Y., Nie, C., & Zhou, Z. (2016). Antioxidant activity of *Citrus* fruits. *Food Chemistry*, *196*, 885-896. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.09.072>.

5.3 Perfil químico do fruto brasileiro *Hancornia speciosa* Gomes e efeitos antioxidante e protetor contra toxicidade de β -amiloide em *Caenorhabditis elegans*

Destaques:

- Perfil fitoquímico e atividade antioxidante *in vitro* do fruto de *H. speciosa* (HSFL).
- *In vivo*, HSFL não altera parâmetros de toxicidade em *C. elegans*.
- *In vivo*, HSFL aumentou a expectativa de vida via expressão de SOD-3 e ativação de DAF-16.
- *In vivo*, HSFL reduziu a toxicidade de β -amiloide e reverteu da paralisia induzida em cepa transgênica para Doença de Alzheimer.

Resumo gráfico:



Resumo

O estresse oxidativo e a neurotoxicidade induzida por β -amiloide (β A) são os principais fatores associados a degeneração neuronal em pacientes portadores de Doença de Alzheimer (DA). Tratamentos estratégicos com foco no combate ao estresse oxidativo e modulação da toxicidade induzida por (β A) são necessários para evitar o desenvolvimento e progressão da DA. Neste sentido, os alimentos funcionais e nutracêuticos, tais como, frutos ricos em compostos bioativos, têm sido relacionados com a prevenção e sugeridos como opção de tratamento para distúrbios neurodegenerativos. Assim, o objetivo deste estudo, foi identificar os constituintes químicos e investigar as propriedades antioxidantes *in vitro* do fruto de *Hancornia speciosa* (HSFL) e seus efeitos em modelo *Caenorhabditis elegans*. Identificamos em HSFL, 27 constituintes químicos, entre eles, compostos fenólicos e flavonoides, pigmentos lipofílicos e ácido ascórbico. A atividade antioxidante *in vitro* foi demonstrada via captura de radicais livres DPPH[•] e ABTS^{•+}. Nos ensaios *in vivo*, HSFL não alterou parâmetros toxicológicos e apresentou melhora da capacidade locomotora em nematoides envelhecidos. HSFL promoveu efeito protetor em condições de estresse oxidativo. Surpreendentemente, no modelo transgênico para DA, HSFL retardou e reverteu a paralisia induzida pela toxicidade de (β A). Além disso, HSFL atuou na modulação da expressão da enzima antioxidante SOD-3 e ativação de DAF-16. Em suma, os resultados demonstram que o fruto de *H. speciosa* apresenta potencial nutracêutico para o desenvolvimento de produtos naturais e suplementos alimentares que auxiliem na prevenção e tratamento de doenças neurodegenerativas.

Palavras-chave: Mangaba; Antioxidante; Efeito protetor; Doença de Alzheimer; Produtos naturais

1. Introdução

A Doença de Alzheimer (DA) é reconhecida pela Organização Mundial da Saúde como uma prioridade global de saúde pública e representa um dos maiores desafios para a medicina e para a ciência deste século, pois na medida em que os indivíduos envelhecem agravam-se os sintomas dessa proteinopatia (Lane et al., 2017a; Hickman et al., 2016). Estudos científicos descreveram os possíveis mecanismos envolvidos na patogênese da DA, onde o estresse oxidativo é considerado peça chave, pois a oxidação de importantes biomoléculas, entre elas, lipídios e proteínas, provocam a ruptura da integridade da membrana das células neuronais (Cheignon et al., 2018a). As principais consequências deste processo são o aumento extracelular anormal dos níveis de peptídeos β -amiloide (β A) e a formação de agregados de oligômeros de β A (Tramutola et al., 2017). O acúmulo de oligômeros de β A permeáveis nas membranas celulares neuronais dá início a uma série de eventos neurotóxicos, entre eles o estresse oxidativo, a interrupção de sinapses, hiperfosforilação da proteína Tau, neuroinflamação e morte neuronal (Cheignon et al., 2018b).

Na literatura científica, a DA é evidenciada pela perda progressiva de memória e funcionamento cognitivo; comprometimento funcional; manifestação de sintomas neuropsicológicos, além de ser considerada a causa mais comum de demência em adultos com 65 anos ou mais de idade (Deb et al., 2017). Atualmente não existe cura para DA e a carência de agentes terapêuticos eficazes contra a progressão da doença, desperta o interesse da indústria farmacêutica e da comunidade científica na busca por produtos naturais e moléculas bioativas que atuem na prevenção e no tratamento da DA.

Nos últimos 30 anos, agentes terapêuticos foram desenvolvidos direta ou indiretamente a partir de produtos naturais, correspondente a 27% para alvos da inflamação, 16% para obesidade, 57% para diabetes, 8% para doença de Parkinson e 50% para doença de Alzheimer (Newman et al., 2016 e Dos Santos et al., 2018a). Contudo, diversos estudos destacam o papel relevante da dieta e dos suplementos nutricionais, entre eles, os alimentos funcionais e nutracêuticos, para a prevenção do comprometimento cerebral e para o tratamento estratégico de pacientes diagnosticados com DA (Carrasco-Gallardo et al., 2012; Fernando et al., 2015; Sawikr et al., 2017; Sadhukhan et al., 2018). Além disso, essas novas alternativas terapêuticas baseadas em

produtos naturais demonstraram eficácia e efeitos adversos reduzidos, como baixo risco de toxicidade ao organismo (Dey et al., 2017 e Islam et al., 2017).

No Brasil, plantas nativas utilizadas na medicina tradicional têm recebido notável atenção sobre seus compostos bioativos e suas propriedades biológicas. Neste seleto grupo de plantas, inclui-se a espécie frutífera *Hancornia speciosa* Gomes (Apocynaceae), distribuída nos Biomas brasileiros Amazônia, Mata Atlântica, Caatinga e Cerrado (Koch et al., 2015). Foram descritas propriedades farmacológicas advindas de diferentes partes vegetais desta planta. Os frutos, denominados popularmente de mangaba, são consumidos *in natura* pela população e considerados ricos em nutrientes e vitaminas, principalmente a vitamina C (Campos et al., 2018). Além disso, a polpa do fruto apresentou atividade antioxidante (Almeida et al., 2011) e anti-inflamatória (Torres-Rêgo et al., 2016). Outros estudos, demonstraram atividades antioxidante, antimicrobiana e efeito gastroprotetor advindos da casca do fruto (De Mello Moraes et al., 2008), já o látex do caule da planta apresentou atividade anti-inflamatória (Marinho et al., 2011). As folhas da *H. speciosa* são amplamente estudadas e foram descritas as atividades anti-hipertensiva, anticolinérgica e antioxidante (Silva et al., 2011; Silva et al., 2016; Penido et al., 2017a), anti-inflamatória (Geller et al., 2015), antidiabética (Pereira et al., 2015), antimicrobiana e antioxidante (Santos et al., 2016). Recentemente, Dos Santos et al. 2018b, utilizando as folhas de *H. speciosa* nativa do Bioma Cerrado, demonstraram as atividades antimutagênica, anti-inflamatória, antiobesidade, anti-hiperglicêmica, antioxidante e anti Parkinson e Alzheimer (DA).

Considerando os aspectos gerais da patogênese da DA, a identificação de compostos bioativos naturais que exibam efeitos biológicos, em especial atividade antioxidante, que possam atuar em diferentes mecanismos, como sequestro de espécies reativas e regeneração de antioxidantes endógenos, e ainda, aliviar a toxicidade promovida por peptídeos βA , representam grande relevância para o desenvolvimento de produtos nutracêuticos que possam auxiliar em tratamentos neuroprotetores contra a DA (Cheignon et al., 2018c).

Neste contexto, o objetivo deste estudo foi caracterizar e identificar os compostos químicos de frutos de *H. speciosa* (HSFL) e avaliar a atividade antioxidante *in vitro*. Bem como, os efeitos toxicológicos e na expectativa de vida de *Caenorhabditis elegans*. Adicionalmente, buscamos investigar o efeito protetor de HSFL contra o

estresse oxidativo e a paralisia induzida por peptídeos βA em cepa transgênica para DA, e os possíveis mecanismos envolvidos.

2. Material e métodos

2.1. Coleta do material vegetal e obtenção do fruto liofilizado

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, foi cadastrada no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento tradicional associado (SisGen), cadastro número AA6FADF).

Os frutos da espécie *H. speciosa* foram coletados em fragmentos do Bioma Cerrado, localizado no município de Dourados (S 21° 59' 41,8" e W 55° 19' 24,9"), estado do Mato Grosso do Sul, Brasil. Um espécime testemunho foi identificado e depositado no herbário da Universidade Federal da Grande Dourados, Estado do Mato Grosso do Sul, sob o registro número 5820.

Para obtenção do fruto liofilizado *H. speciosa* (HSFL), 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 min, seguidos de lavagem com água potável. Posteriormente, os frutos foram macerados, congelados sob temperatura de -80 °C e liofilizados. O rendimento do fruto liofilizado foi calculado pela seguinte equação:

$$\text{Fruto liofilizado (\%)} = \frac{\text{peso do fruto fresco (g)} \times 100}{\text{peso resultante do processo de liofilização (g)}}$$

Para os ensaios experimentais, 0,005 g de HSFL foi ressuspensa em 5 mL de água ultrapura estéril e homogeneizada por agitação constante por 5 min. Em seguida, acondicionado em tubos protegidos da luz e mantidos refrigerados a 4 °C por 24 h, buscando obter uma maior dissolução da polpa e seus constituintes químicos. Somente, após este período a HSFL foi utilizada nas análises experimentais.

2.2. Identificação dos constituintes por LC-DAD-MS

A amostra de HSFL foi analisada por LC-DAD-MS utilizando um UFLC Prominence Shimadzu acoplado ao detector de matriz de diodos (DAD) e um espectrômetro de massa (MicrOTOF-Q III, Bruker Daltonics, Billerica, MA, EUA). As

análises foram realizadas nos modos negativo e positivo. A coluna cromatográfica era uma coluna Kinetex C18 (2,6 μ m, 150 \pm 2,1 mm, Phenomenex) aplicando vazão de 0,3 mL/min. Todos os parâmetros cromatográficos e MS conforme descrito por Baldivia et al. (2018).

2.3. Determinação dos compostos fenólicos

Para determinação dos teores de compostos fenólicos e flavonoides a HSFL foi centrifugada a 5000 rpm durante 10 min e o sobrenadante utilizado nas análises.

Os teores de compostos fenólicos presentes na HSFL, foi determinado através do método colorimétrico de Folin-Ciocalteu. Para isso, 2,5 mL de reagente de Folin – Ciocalteu (1:10 v/v, diluído em água destilada) foram adicionados a 0,5 mL (concentração de 500 μ g/mL). A solução foi incubada no escuro durante 5 min. Subsequentemente, 2,0 mL de carbonato de sódio aquoso a 14% (Na₂CO₃) foi adicionado e incubado à temperatura ambiente durante 120 min e protegidos da luz. A absorbância foi mensurada a 760 nm utilizando um espectrofotômetro T70 UV/Vis (PG Instruments Limited, Leicestershire, UK). Uma curva de calibração com ácido gálico (0,0004 – 0,0217 mg/mL) foi usado como padrão. A concentração de compostos fenólicos presentes na HSFL foi expressa em mg equivalente ao ácido gálico (GAE)/g de fruto. Foram realizados três ensaios independentes em triplicatas.

2.4. Determinação dos compostos lipofílicos

Para a determinação dos antioxidantes lipofílicos β -caroteno, licopeno e clorofila a e b foram utilizados (150 mg) de HSFL, vigorosamente agitados em 10 mL de uma mistura acetona-hexano (4:6, v/v) por 1 min. e filtrada utilizando papel de filtro qualitativo Whatman® Grau 4. As absorbâncias do filtrado foram mensuradas a 453, 505, 645 e 663 nm. Os teores de β -caroteno, licopeno e clorofila a e b foram calculados de acordo com equações matemáticas: 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 = $0,999 \times \text{Abs}663 - 0,0989 \times \text{Abs}645$ e Clorofila b = $-0,328 \times \text{Abs}663 + 1,77 \times \text{Abs}645$. Os resultados foram expressos em mg/100 g de HSFL.

2.5. Determinação do ácido ascórbico

Para determinação da concentração de ácido ascórbico, 0,5 g de HSFL, foi homogeneizada 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 de filtro qualitativo Whatman® Grau 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 s. O ácido ascórbico foi utilizado como controle padrão. Os resultados foram calculados com base na seguinte equação e expressos em mg de ácido ascórbico/100 g de HSFL:

$$\frac{mgVit.C}{100g_{amostra}} = \frac{DCFI_{amostra}}{DCFI_{padrão}} \times \frac{100}{M_{amostra}} \times \frac{(M_{solvente} + M_{amostra})}{m_{poipa}} \times \frac{50mL}{10mL} \times F$$
$$F = \frac{M_{AA}}{50} \times \frac{1}{25} \times 10$$

Onde, DCFI_{amostra} e DCFI_{padrão} são respectivamente o volume gasto na titulação da amostra e do padrão em mL, M_{amostra}, M_{solvente} e M_{fruto} 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). Foram realizados três experimentos independentes em triplicatas.

2.6. Atividade antioxidante *in vitro*

2.6.1. Atividade de 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. Para isso, misturou-se 0.2 mL da HSFL (0,1 – 1000 µg/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 min e protegida da luz. A absorbância foi mensurada a 517 nm. O ácido ascórbico e o hidroxitolueno butilato (BHT) (0,1 – 1000 µg/mL) foram utilizados como antioxidantes de referência (controles positivos). Foram

realizados três ensaios independentes em triplicatas. 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 equação a seguir:

$$\text{Atividade de captura do radical livre DPPH}^{\bullet} (\%) = 1 - \frac{\text{Abs amostra}}{\text{Abs controle}} \times 100$$

2.6.2. Ensaio de descoloração 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 h 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 HSFL (0,1 – 1500 µg/mL) foi misturada com 1980 µL do radical ABTS^{•+}. A solução foi homogeneizada e incubada durante 6 min. 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 triplicatas. A curva de inibição foi preparada e os valores de IC₅₀ foram calculados. A porcentagem de inibição do ABTS^{•+} foi determinada de acordo com a seguinte equação:

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

2.7. Ensaios *in vivo*

2.7.1. Cepas e condições de manutenção de *Caenorhabditis elegans*

Para a realização dos ensaios *in vivo*, foram utilizados nematoides tipo selvagem N2 Bristol e as cepas transgênicas TJ356 [daf-16p:daf-16a/b::GFP + rol-6 (su1006)]; CF1553 muIs84 [(pAD76) sod-3p::GFP + rol-6 (su1006)]; CL2166 dvIs19 [(pAF15) gst-4p::GFP::NLS] III e CL2006 (dvIs2 [pCL12(unc-54/human Aβ 1-42 minigene) + pRF4]). A cepa CL2006 possui o peptídeo βA₁₋₄₂ e sob controle de temperatura expressa

o gene promotor específico *unc-54*, conduzindo a paralisia muscular progressiva em nematoides adultos (Leiteritz et al., 2018). Todas as cepas foram obtidas do *Caenorhabditis* Genetics Center (CGC), Minnesota, EUA. Os nematoides foram mantidos em estufas incubadoras a 16 °C ou 20 °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). As bactérias utilizadas como alimento para os nematoides foram inativadas com o antibiótico Canamicina (10mM).

A cultura dos nematoides foi sincronizada com hipoclorito de sódio a 2% e hidróxido de sódio 5M. Nos ensaios de toxicidade aguda, os ovos resistentes à lise alcalina, foram coletados e transferidos para placas de Petri contendo apenas meio de cultivo NGM e *E. coli* (OP50) até atingirem a fase L4. Para os demais ensaios, os ovos resistentes à lise alcalina foram coletados e transferidos para placas de Petri contendo meio de cultivo NGM, *E. coli* (OP50) e com água ou concentrações da HSFL (500 ou 1000 µg/mL) até atingirem a fase L4. O pré-tratamento consistiu em expor durante 30 min os nematoides sincronizados, em seus respectivos tratamentos, água (controle negativo) ou concentrações de HSFL (500 ou 1000 µg/mL) em meio M9.

2.7.2. Ensaio de Toxicidade aguda

Neste ensaio, avaliamos o efeito tóxico da exposição aguda de HSFL aos nematoides N2. Para isto, em média 10 nematoides, sincronizados em fase L4, foram transferidos para microplacas de 96 poços contendo meio de cultura M9 (100 µL) e a HSFL (100 µL) em diferentes concentrações (10 – 1000 µg/ mL). Posteriormente, os nematoides foram incubados a 20 °C por 24 e 48 h. Como controle negativo, os nematoides foram incubados apenas com meio de cultura M9 (200 µL). Após o período de incubação, a viabilidade dos nematoides foi avaliada pela sensibilidade ao toque com auxílio de um fio de platina. Foram realizados três experimentos independentes em triplicatas.

2.7.3. Ensaio de Toxicidade reprodutiva

Para avaliar os efeitos de HSFL sobre a capacidade reprodutiva de nematoides quantificamos o número de progênies viáveis durante o período reprodutivo de cinco dias. Neste ensaio, após a sincronização, cinco nematoides na fase L4, foram

transferidos diariamente para novas placas contendo meio NGM/*E. coli* (OP50) e água ou HSFL (500 ou 1000 µg/mL). O número de progênie foi avaliado em cada placa após alcançar a fase larval L3 ou L4. Os resultados estão expressos pela média de três ensaios independentes.

2.7.4. Ensaio de Toxicidade locomotora

A avaliação do efeito de HSFL sobre a capacidade locomotora dos nematoides N2, foi realizada em duas fases do ciclo de vida dos nematoides, sendo a primeira fase foi de ovo até adulto jovem (dia 2 após L4) e a segunda fase foi de ovo até envelhecimento (dia 7 após L4). Para isto, após a sincronização, em média 10 nematoides na fase L4, foram transferidos diariamente para novas placas contendo seus respectivos tratamentos até atingirem fase adulto jovem e de envelhecimento. Após estes períodos, os nematoides foram transferidos para novas placas contendo apenas meio de cultivo NGM, seguido da aclimação durante 1 min e posterior avaliação. Nas avaliações, foram quantificadas o número de curvaturas sinusoidais no período 30 s de locomoção. Foram realizados dois ensaios independentes em triplicatas.

2.7.5. Ensaio de Toxicidade induzida por β -amilóide

Neste ensaio, avaliamos o efeito da HSFL sobre a toxicidade induzida pelo peptídeo βA_{1-42} em cepas transgênicas *CL2006* para DA que apresentam o fenótipo de paralisia progressiva em condições permissivas. Os nematoides foram sincronizados e expostos ao HSFL por 72 h, a 20°C. Após isso, os nematoides foram pré-tratados em meio M9 contendo água ou HSFL por um período de 1 h a 20°C. Em seguida, 20 nematoides por placa, em triplicata, foram transferidos para novas placas de 35 mm contendo *E. coli* com ou sem HSFL (500 e 1000 µg/ mL). Posteriormente, para iniciar a paralisia induzida por β -amilóide, os nematoides foram mantidos a 25 °C durante de 22 h. Após a indução da paralisia, as avaliações foram realizadas a cada 2 h, durante o período de 10 h. Os nematoides foram classificados como paralisados quanto a incapacidade de mover seus corpos quando estimulados por um fio de platina.

2.7.6. Ensaio de reversão da paralisia em CL2006

Para avaliar a capacidade de HSFL em reverter a paralisia dos nematoides *CL2006* submetidos à toxicidade induzida por βA_{1-42} , realizamos a exposição das respectivas placas ao período de recuperação de 24 h sob temperatura de 20 °C. Posteriormente, determinamos a capacidade de reversão da paralisia pela contagem do número de nematoides que demonstraram estímulo natatório quando expostos a uma alíquota de meio líquido de cultivo M9 sobre as placas.

2.7.7. Ensaio em condições de estresse térmico

Nos ensaios de estresse térmico avaliamos o efeito protetor de HSFL, para isto em média 20 nematoides N2 na fase L4 foram pré-tratados e transferidos para novas placas contendo meio NGM/*E. coli* (OP50) e água ou HSFL (500 ou 1000 µg/mL). O estresse térmico foi induzido pelo aumento da temperatura de cultivo de 20 °C para 37 °C, sendo avaliado a cada hora de exposição pelo período experimental de 6 h. A viabilidade dos nematoides expostos a 37 °C nos diferentes períodos de incubação foi confirmada após o período de recuperação de 16 h a 20 °C, pela sensibilidade ao toque utilizando um fio de platina. Foram realizados três ensaios independentes em triplicatas.

2.7.8. Ensaio em condições de estresse oxidativo

O ensaio de proteção contra o estresse oxidativo foi realizado por exposição dos nematoides N2 ao agente oxidante Juglone (5-Hydroxy-1,4-naphthoquinone) na concentração letal de 250 µM. Após a sincronização, em média 10 nematoides L4 foram pré-tratados e transferidos, para microplacas de 96 poços contendo 100 µL de meio de cultura M9, 100 µL da HSFL (500 ou 1000 µg/mL) e 50 µL de Juglone. Como controles, os nematoides previamente incubados com água, foram expostos a 250 µL meio de cultura M9 (controle negativo) ou 200 µL de meio M9 mais 50 µl Juglone (controle positivo). Todas as microplacas foram incubadas a 20 °C e a viabilidade dos nematoides avaliada a cada hora pelo período experimental de 6 h. A viabilidade dos nematoides foi confirmada pela sensibilidade ao toque utilizando um fio de platina. Foram realizados três ensaios independentes em triplicatas.

2.7.9. Expectativa de vida

Nos ensaios de expectativa de vida foram utilizados nematoides N2 na fase L4. No primeiro dia da fase adulta L4 (dia 1), 20 nematoides por grupo foram transferidos para novas placas NGM/*E. coli* OP50 contendo seus respectivos tratamentos. Durante os seis primeiros dias, correspondentes ao período de reprodução, os nematoides foram transferidos diariamente para novas placas NGM contendo os respectivos tratamentos. A partir do 7^a dia, a transferência para novas placas ocorreu a cada dois dias. As avaliações consistiram em classificar os nematoides como mortos ou vivos até o dia de registro de morte do último nematoides. Os nematoides eram considerados mortos quando não se movimentavam com ou sem estímulo ao toque com um fio de platina. Os nematoides com ovos eclodidos internamente ou não visualizados nas placas tiveram seus dados excluídos. Foram realizados dois ensaios independentes em triplicatas.

2.7.10. Expressão de SOD-3 e GST-4

Para analisar a expressão das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD-3) e glutathione-S-transferase (GST-4), foram utilizadas as cepas CF1553 e CL2166 fusionada a uma proteína verde fluorescente (GFP). Após a sincronização, 05 nematoides na fase L4 foram pré-tratados e transferidos para lâminas de microscópio contendo levamisol 1mM como anestésico. Em seguida, foram realizadas as capturas das imagens individuais dos nematoides utilizando um microscópio de epifluorescência (Nikon Eclipse 50i) conectado a câmera digital (Samsung ST64). Imagens de 05 nematoides por grupo foram expressas como média de pixels e a fluorescência utilizando o software ImageJ. Foram realizados três ensaios independentes em triplicatas.

2.7.11. Localização celular do fator transcricional DAF-16

Para avaliar a translocação do fator transcricional DAF-16, utilizamos a linhagem transgênica TJ356 com fusão do gene repórter *daf-16::GFP*, o qual permite a visualização da localização celular de DAF-16. Neste ensaio, após a sincronização, 30 nematoides na fase L4 foram pré-tratados e transferidos para lâminas de microscópio. Para monitorar a translocação nuclear de DAF-16-GFP, foram capturadas imagens dos nematoides utilizando um microscópio de epifluorescência (Nikon Eclipse 50i) conectado a câmera digital (Samsung ST64). As imagens dos nematoides foram

classificadas de acordo com a localização do GFP. Foram analisados 30 animais por grupo, sendo realizados três ensaios independentes.

2.8. Análise estatística

Utilizamos o software GraphPad Prism 5.1 (San Diego, CA, EUA) para realizar as análises estatísticas. Os dados são expressos como a média \pm erro padrão da média (EPM). Diferenças significativas entre os grupos foram determinadas usando o teste *t* de Student para comparação entre dois grupos e análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Dunnett para comparação de dois ou mais grupos. Os ensaios de expectativa de vida estão representados pela curva de Kaplan-Meier e os valores de *P* foram calculados pelo teste Log-rank. Os resultados foram considerados significativos quando $P < 0.05$.

3. Resultados

3.1 Identificação dos constituintes químicos por LC-DAD-MS

Foram detectados 27 compostos químicos em HSFL e identificados 16 compostos, pertencentes a classes dos compostos fenólicos, além de ácidos graxos (25 - 27) e ácidos orgânicos (1 - 2), tais como ácido cítrico e ácido ascórbico (**Fig.1 e Tabela 1**).

Os constituintes identificados incluem os flavonóis dímero de procianidina (tipo B) (**9**); epicatequina (**11**), derivados de quercetina O-desoxi-hexosil-hexosil-quercetina (**17**) e O-hexosil-quercetina (**18**). O constituinte **21**, que pertence à classe das flavonas O-desoxi-hexosil-hexosil luteolina, também foi identificado. Os ácidos fenólicos pertencentes à classe dos compostos não flavonoides, foram identificados nos picos **7**, **23** e **24**.

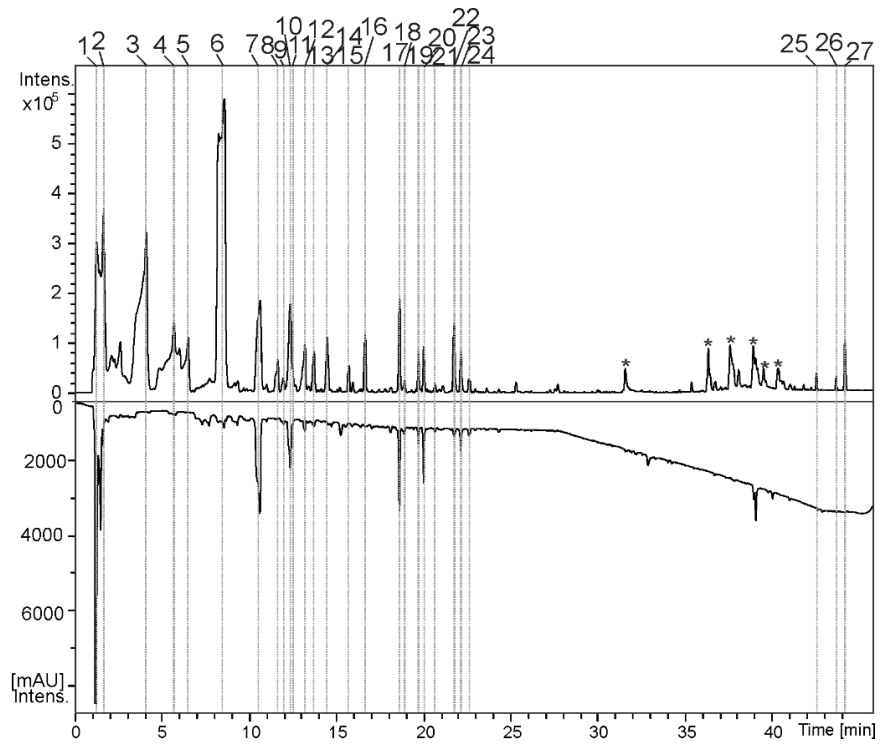


Fig. 1. Cromatograma de pico de base de *H. speciosa* (HSPF) obtido pelo modo de íons negativos e positivo no comprimento de onda de 230 a 280 nm.

Tabela 1. Identificação dos constituintes do fruto *H. speciosa* (HSFL) por LC-DAD-MS / MS.

Pico	TR (min)	Composto	UV (nm)	FM	Modo negativo (<i>m/z</i>)		Modo positivo (<i>m/z</i>)	
					MS [M-H] ⁻	MS/MS	MS [M+H] ⁺	MS/MS
1	1.2	di-O-hexósido	-	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	341.1101	179	-	-
		Ácido Cítrico	-	C ₆ H ₈ O ₇	191.0221	-	193.0344	-
		Ácido ascórbico	-	C ₆ H ₈ O ₆	175.0246	-	-	-
2	1.6	Ácido desidroascórbico	-	C ₆ H ₆ O ₆	173.0089	-	175.0230	-
3	4.0	NI	-	C ₁₄ H ₂₆ O ₁₀	353.1478	207, 161	-	-
4	5.6	NI	-	C ₁₆ H ₃₀ O ₁₁	397.1722	251, 205, 161	-	-
5	6.5	NI	-	C ₁₆ H ₃₀ O ₁₁	397.1738	251, 205	-	-
6	8.6	NI	-	C ₁₈ H ₂₈ O ₁₂	435.1544	289, 247, 205, 161	-	-
7	10.6	Ácido 5-O-E-cafeoilquínico	299, 354	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	353.0901	191	355.1024	-
8	11.6	NI	-	C ₂₀ H ₃₀ O ₁₁	445.1742	-	-	-
9	12.1	Dímero de procianidina (tipo B)	280	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	577.1383	407, 289, 245, 203, 161	579.1510	-
10	12.4	NI	280	C ₁₉ H ₂₆ O ₁₃	461.1336	191	-	-
11	12.5	Epicatequina *	280	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	289.0724	245, 203	291.0853	-
12	13.2	NI	280, 320	C ₁₈ H ₃₂ O ₁₂	439.1847	205	-	-
		NI		C ₂₀ H ₂₈ O ₁₃	475.1484	191, 167	-	-
13	13.7	Ácido benzoiloxi-hidroxipropil glucurônico	280	C ₁₆ H ₂₀ O ₁₀	371.1010	249, 189	-	-
14	14.3	Ácido benzoiloxi-hidroxipropilmetil	280	C ₁₇ H ₂₂ O ₁₀	385.1170	249	-	-

glucurônico							
15	15.6	Hexosídeo de metilbutil O-desoxihexosil	-	C ₁₇ H ₃₂ O ₁₀	395.1934	249	-
16	16.6	NI	-	C ₂₁ H ₃₂ O ₁₂	475.1844	205	-
17	18.6	O-desoxihexosil hexosil quercetina	260, 352	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	609.1468	300, 271, 255	611.1641
18	18.9	O-hexosil quercetina	265, 350	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	463.0911	300, 271, 255, 179	465.1007
19	19.7	Hexosido de di-hidroxifenil-etil-O-desoxissoxil-O-cafeoil (verbascoside)	299, 327	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₅	623.1979	461, 315, 161	-
20	20.0	NI	280, 330, 380	C ₂₈ H ₂₆ O ₁₄	585.1255	423, 323, 261, 217, 161	-
21	20.6	O-desoxihexosil-hexosil luteolina	270, 340	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	593.1534	285	-
22	21.7	NI	280, 320sh	C ₂₃ H ₃₄ O ₁₃	517.1954	163, 148	-
23	22.1	Ácido 4,5-di-O-E-cafeoilquínico	299, 326	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	515.1218	191, 179, 173	-
24	22.7	Di-hidroxifenil-etil-O-desoxi-hexosil-O-ferrulil-hexosido	287, 330	C ₃₀ H ₃₈ O ₁₅	637.2159	461, 315, 193, 175, 160	-
25	42.6	Ácido octadecadienoico	-	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	279.2327	-	-
26	43.6	Ácido hexadecanóico	-	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	255.2326	-	-
27	44.1	Ácido octadecenóico	-	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	281.2487	-	-

TR: tempo de retenção; MF: fórmula molecular; NI: não identificado; ^{a2}: [M + Na]⁺; * confirmado por injeção de padrão autêntico

3.2. Rendimento e caracterização de compostos bioativos

O rendimento obtido do fruto *in natura* após o processo de liofilização foi de 28,41%. Os compostos bioativos presentes em HSFL estão apresentados na **Tabela 2**.

Tabela 2. Compostos bioativos presentes em frutos de *H. speciosa* (HSFL).

Compostos bioativos	Resultados
Compostos fenólicos totais	448,19±0,43 mg de AGE/100g
β-caroteno	0,026 ± 0,007 mg/g
Licopeno	0,120 ± 0,002 mg/g
Clorofila a	0,350 ± 0,040 µg/g
Clorofila b	0,355 ± 0,008 µg/g
Ácido ascórbico	809,29 ± 28,84 mg/100g

Valores expressos como média ± EPM.

3.3. Atividade antioxidante *in vitro*

A avaliação da atividade antioxidante *in vitro* da HSFL, representada pela concentração capaz de inibir 50% (IC₅₀) dos radicais DPPH[•] e ABTS^{•+}, esta apresentada na **Tabela 3**. A HSFL foi mais eficiente na captura do radical ABTS^{•+} em relação ao radical DPPH[•], apresentando o IC₅₀ aproximadamente 1,57 vezes menor.

Tabela 3. Atividades antioxidantes do fruto de *H. speciosa* (HSFL).

Amostras	DPPH [•]	ABTS ^{•+}
	IC ₅₀ (µg/mL)	IC ₅₀ (µg/mL)
Ácido ascórbico	2,65 ± 0,20	1,43 ± 0,09
BHT	14,58 ± 2,15	10,15 ± 0,94
HSFL	555,10 ± 16,60	352,80 ± 43,00

Valores expressos como média ± EPM.

3.4. Ensaios *in vivo*

3.4.1. Toxicidade aguda

Inicialmente avaliamos *in vivo* o parâmetro toxicidade em condição de tratamento agudo com HSFL em diferentes concentrações (0,01 a 1 mg/mL). As **Figs. 2A e B** respectivamente, demonstram que em nenhuma das concentrações avaliadas HSFL promoveu alterações toxicológicas, representada pela viabilidade dos nematoides durante os períodos de 24 e 48 h. A partir destes resultados definimos com segurança as concentrações para os próximos ensaios.

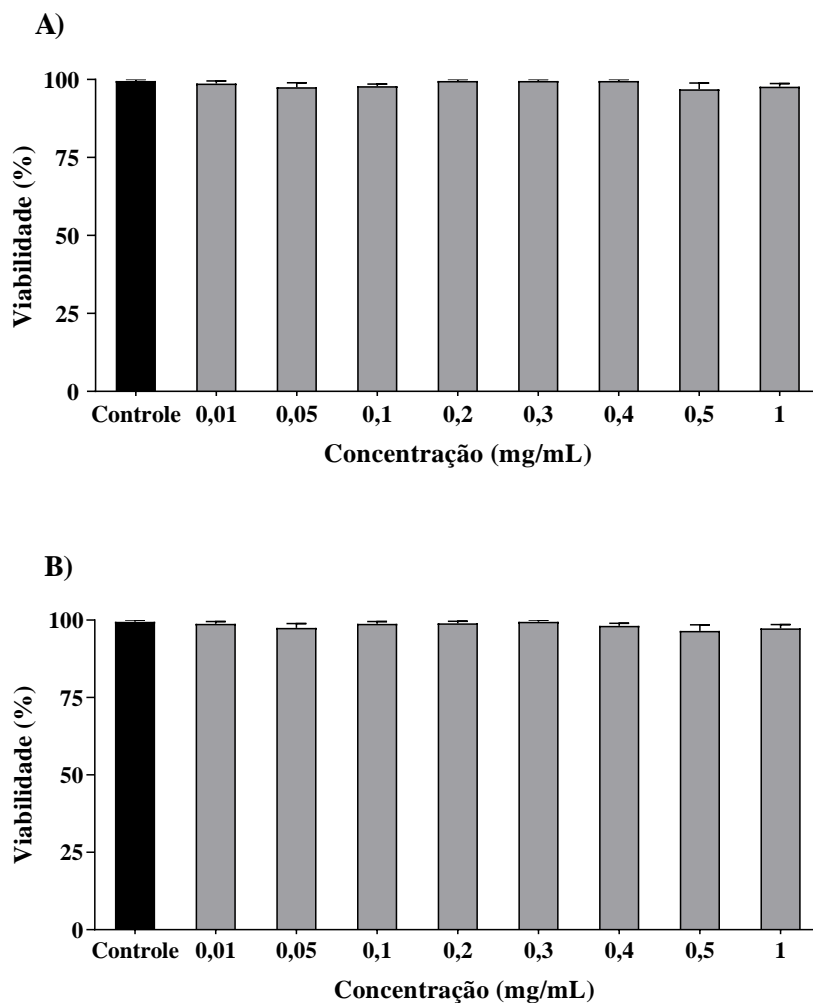


Fig. 2. *H. speciosa* (HSFL) não promove efeitos tóxicos em *C. elegans* N2 no período de (A) 24 h e período de (B) 48 h. Os valores são expressos como média \pm EPM (n = 3). * $p < 0.05$ quando o grupo tratado foi comparado com o grupo controle.

3.4.2. Capacidade reprodutiva

A **Fig. 3A** mostra que nenhuma das concentrações avaliadas promoveram alterações no número diário ou total de progênes viáveis (**Fig 3B**). Estes resultados indicam que os tratamentos com as diferentes concentrações de HSFL não promovem efeitos tóxicos que interfiram nos padrões fisiológicos da capacidade reprodutiva dos nematoides.

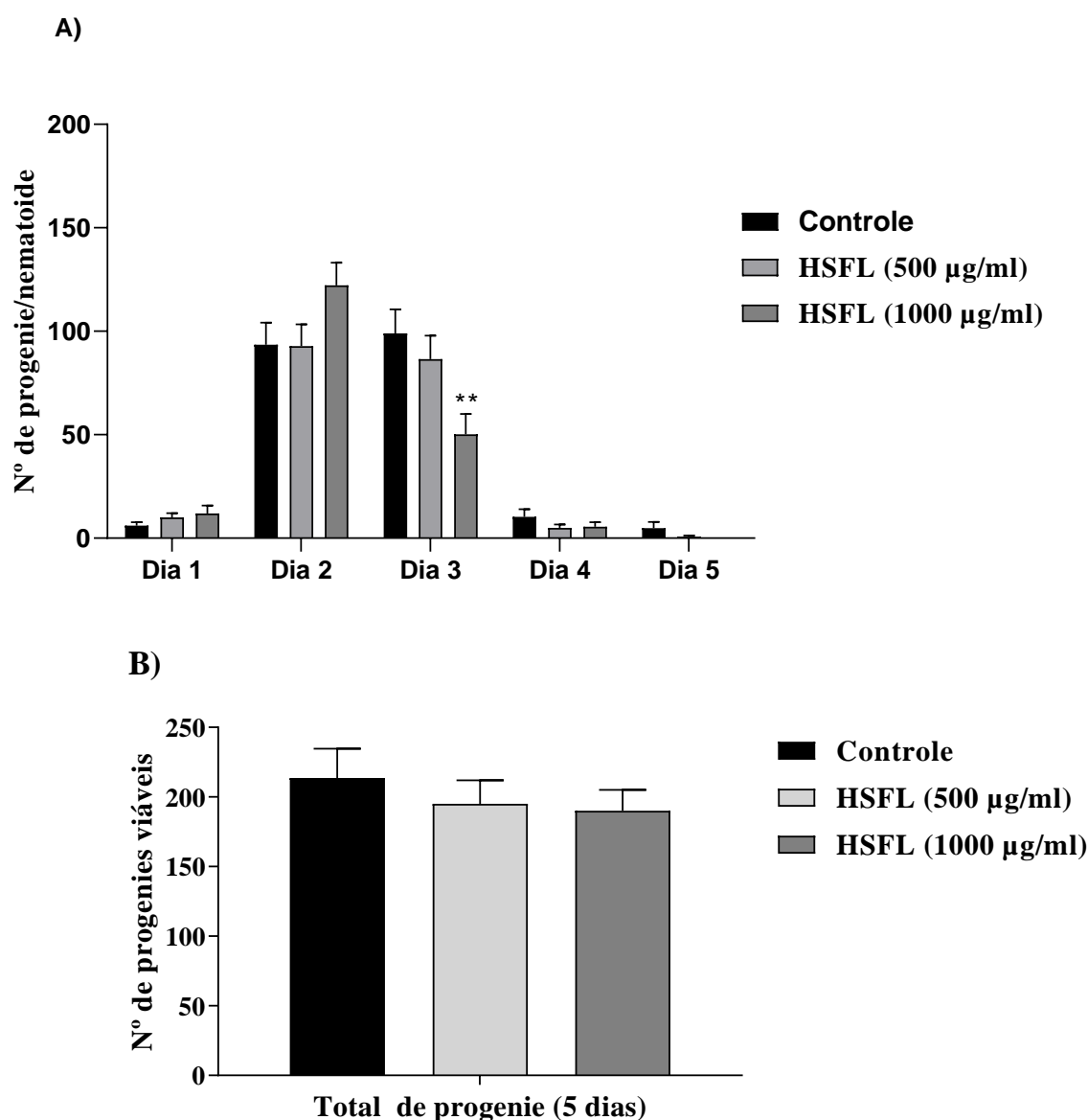


Fig. 3. Efeito da polpa do fruto de *H. speciosa* (HSFL) sobre a capacidade reprodutiva em *C. elegans* N2 (A) Quantificação diária do número de progênie de *C. elegans* tratados com HSFL. (B) Quantificação total do número de progênie de *C. elegans* tratados com HSFL durante 5 dias. Os valores são expressos como média \pm EPM. ** $p < 0.01$ quando o grupo tratado foi comparado com o grupo controle.

3.4.3. Capacidade Locomotora

O efeito de HSFL sobre a capacidade locomotora dos nematoides até as fases adulto jovem e envelhecimento, representa um importante parâmetro para avaliar a qualidade de vida dos nematoides em fases distintas do ciclo de vida. Observamos que HSFL (500 e 1000 $\mu\text{g/mL}$) promoveram aumento da locomoção dos nematoides durante a fase jovem adulto quando comparados ao grupo controle (**Fig. 4A**). A frequência de curvaturas corporais no grupo controle foi de $20,95 \pm 0,90$, já os nematoides tratados HSFL (500 e 1000 $\mu\text{g/mL}$) apresentaram $31,05 \pm 1,16$ e $34,30 \pm 1,21$, respectivamente.

Além disso, surpreendentemente observamos efeito benéfico sobre a motilidade dos nematoides tratados durante a fase de envelhecimento (**Fig. 4B**). Enquanto, a frequência curvaturas corporais no grupo controle foi de $9,95 \pm 0,40$, os nematoides tratados HSFL (500 e 1000 $\mu\text{g/mL}$) apresentaram as frequências corporais de $14,80 \pm 0,47$ e $18,35 \pm 0,89$, respectivamente. Estes resultados, quando comparados ao grupo controle expressaram melhora em 48,74% e 84,42% para o número de curvaturas corporais (**Fig. 4B**).

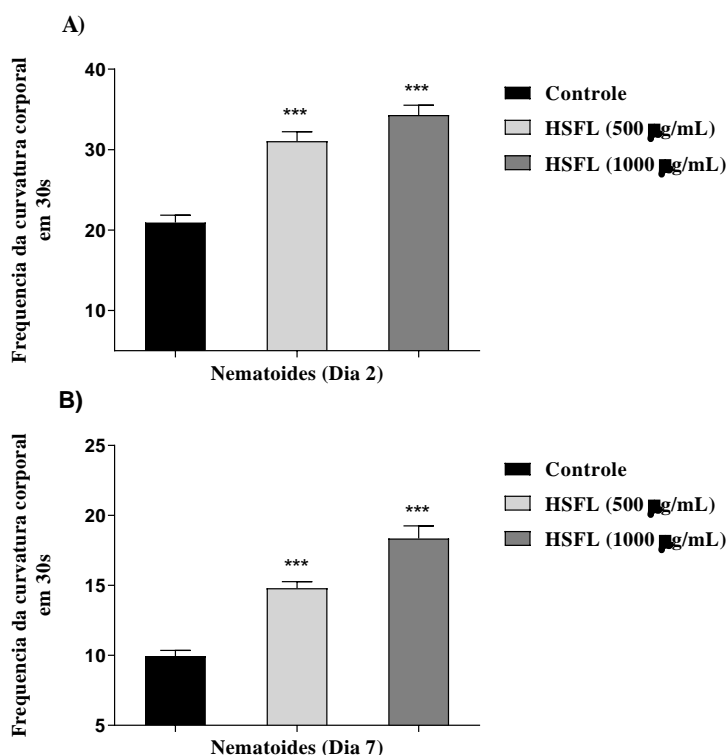


Fig. 4. Efeitos dos tratamentos com HSFL sobre a capacidade locomotora de nematoides N2. **(A)** Fase ovo até a fase jovem adulto e **(B)** Fase ovo até a fase de envelhecimento. Os valores são apresentados como média \pm DP. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

3.4.4. Paralisia induzida por β -amilóide

Neste ensaio avaliamos o efeito da HSFL sobre a toxicidade induzida pelo peptídeo βA_{1-42} sobre a paralisia dos nematoides (*CL2006*) transgênicos para DA em condições permissivas de temperatura SOB 25 °C, e ainda em condições favoráveis à sua recuperação. A **Fig. 5** demonstra que os tratamentos com a HSFL (500 e 1000 $\mu\text{g/mL}$) foram capazes de promover atrasos significativos nas taxas de paralisias dos nematoides tratados quando comparados ao grupo controle em ambas as condições. Observamos que ao final do período de avaliação o grupo controle apresentou $87,5 \pm 1,70\%$ de nematoides paralisados, enquanto os grupos tratados com a HSFL (500 e 1000 $\mu\text{g/mL}$) apresentaram $75,83 \pm 3,74\%$ e $60,35 \pm 4,11\%$ de nematoides paralisados, respectivamente (**Fig. 6A**).

3.4.5. Reversão da paralisia induzida por β -amilóide

Os efeitos dos tratamentos com HSFL sob condições permissivas para indução de paralisia e favoráveis para reversão da paralisia em nematoides *CL2006* estão apresentados nas **Fig. 6A e B**. Após o período de recuperação, houve diminuição da percentagem de nematoides paralisados tratados com HSFL (500 e 1000 $\mu\text{g/mL}$), correspondente a $51,17 \pm 4,54\%$ e $32,46 \pm 6,75\%$, respectivamente, enquanto o controle foi de $70,00 \pm 5,16\%$ (**Fig. 6A**).

Já **Fig. 6B**, demonstra a eficiência da HSFL em condições permissivas de toxicidade e favoráveis a reversão da paralisia. Os resultados demonstram que os tratamentos com a HSFL (500 e 1000 $\mu\text{g/mL}$) não promoveram a paralisia de $24,17 \pm 3,74\%$ e $39,65 \pm 4,11\%$ dos nematoides, enquanto no grupo controle $12,50 \pm 1,71\%$ dos nematoides encontravam-se não paralisados. Após o período de recuperação, o grupo controle apresentou $30,00 \pm 5,16\%$ de nematoides não paralisados. Contudo, houve aumento na porcentagem de nematoides não paralisados, sendo $45,83 \pm 4,55\%$ e $67,58 \pm 6,76\%$ quando tratados com a HSFL (500 e 1000 $\mu\text{g/mL}$), respectivamente.

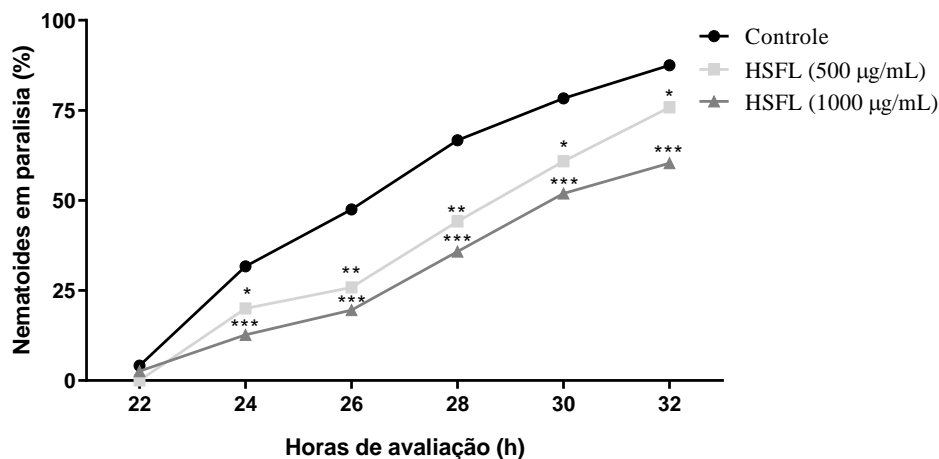


Fig. 5. Atraso na paralisia induzida em *C. elegans* (CL2006), submetidos aos tratamentos com a HSFL. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$.

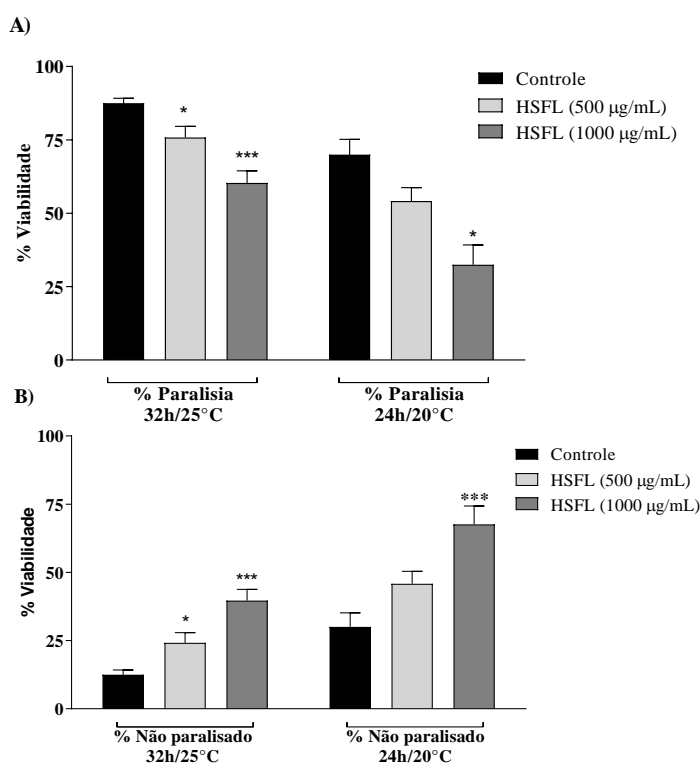


Fig. 6. Efeitos dos tratamentos com HSFL em nematoides CL2006. **(A)** Percentagem de nematoides paralisados ao final do período experimental (32h) e após 24h equivalente ao período de recuperação. **(B)** Percentagem de nematoides não paralisados ao final do período experimental (32h) e após 24h equivalente ao período de recuperação. * $p < 0.05$ e *** $p < 0.001$ com relação ao respectivo controle do período avaliado.

3.4.6. Proteção contra o estresse térmico

Neste ensaio avaliamos o efeito protetor da HSFL contra o estresse térmico sobre a viabilidade dos nematoides durante o período de 6 h (**Fig. 7**). A HSFL foi capaz de proteger os nematoides a partir do período correspondente a 5 h de exposição, o grupo controle apresentou $13,00 \pm 2,05\%$ de nematoides viáveis, enquanto o tratamento com a HSFL (1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) apresentou viabilidade de $21,87 \pm 2,07\%$. Ao final do período experimental (6h), o percentual de nematoides viáveis no grupo controle foi de $2,50 \pm 1,34\%$, já os tratamentos com HSFL (500 e 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) apresentaram $10,72 \pm 0,72$ e $18,13 \pm 1,32\%$, respectivamente.

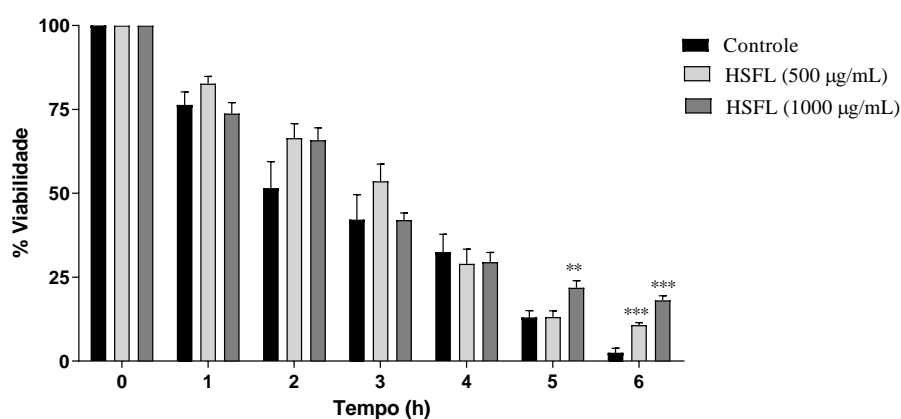


Fig. 7. Efeito protetor do fruto de *H. speciosa* (HSFL) contra o estresse térmico durante o período de avaliação de 6 h utilizando o modelo biológico *C. elegans*. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ em comparação ao grupo controle.

3.4.7. Proteção contra o estresse oxidativo

O aumento da resistência ao estresse oxidativo, demonstra um efeito protetor benéfico frente ao agente estressor Juglone um potente gerador de espécies reativas de oxigênio. Na **Fig. 8**, os nematoides tratados com a HSFL na menor concentração avaliada (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) demonstrou efeito protetor a partir da 3 h do período de avaliação. Ao final do período de exposição 6 h, a viabilidade dos nematoides tratados com a HSFL (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) foram de $20,37 \pm 2,75$ e $5,78 \pm 1,51\%$, enquanto no grupo controle a viabilidade foi de $2,72 \pm 1,42\%$.

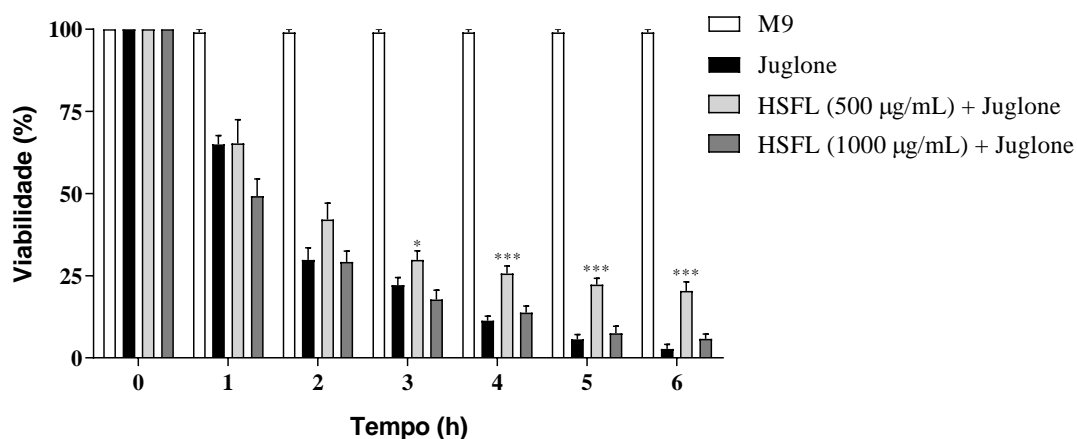


Fig. 8. Ensaio de proteção contra o estresse oxidativo em *C. elegans* N2, expostos aos tratamentos com (HSFL) durante 6 h. * $p < 0.05$ e *** $p < 0.001$ em comparação ao grupo controle (Juglone).

3.4.8. Expectativa de vida

Avaliamos a capacidade da HSFL em prolongar a vida, seus efeitos a sobre a expectativa de vida média e máxima de nematoides N2. Os resultados demonstram que a HSFL aumentou a expectativa de vida média e máxima dos nematoides já na menor concentração avaliada (**Fig. 9** e **Tabela 4**). A expectativa de vida média dos nematoides tratados com HSFL foi prolongada em 2,5 dias (500 µg/mL) e 1,6 dias (1000 µg/mL). Os efeitos mais evidentes promovidos pela HSFL foram sobre expectativa máxima de vida, sendo de 4,5 dias (500 µg/mL) e 5 dias (1000 µg/mL).

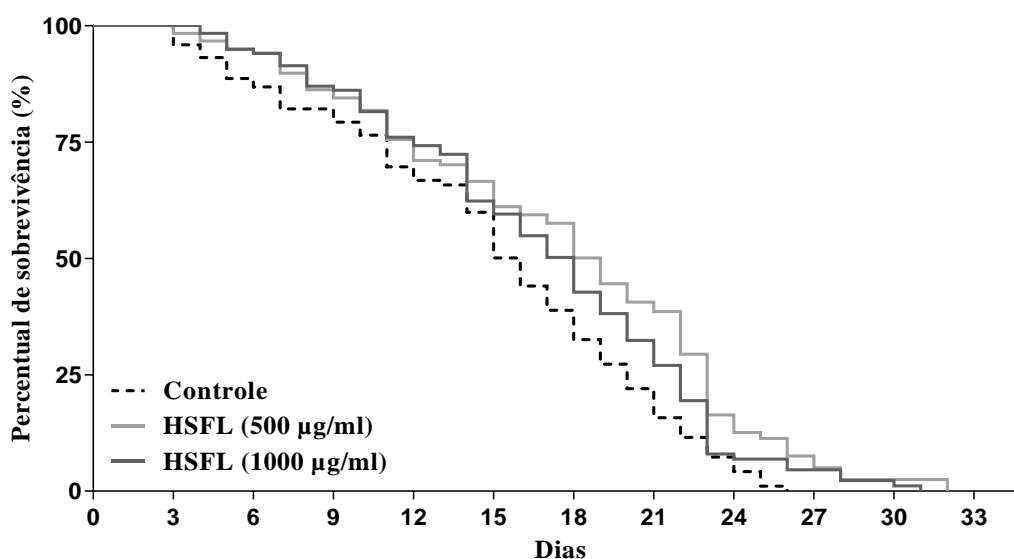


Fig. 9. Ensaio de longevidade em *C. elegans* tratados com HSFL. O ensaio foi realizado em duplicata. A análise estatística foi realizada com os valores de Prism 5.1 e $p < 0.001$ calculados pelo teste de Log-rank.

Tabela 4. Efeitos de HSFL sobre a expectativa de vida em *C. elegans*.

Tratamento	Expectativa de vida média	Extensão de vida média	Expectativa de vida máxima	Extensão de vida máxima	Log-rank Test vs. Controle	Nº total de nematoídeos
(µg/mL)	(Dias)	(%)	(Dias)	(%)		
Controle	16,00 ± 1,0	-	25,50 ± 0,50	-	-	120
HSFL (500)	18,50 ± 1,5	15,6	30,00 ± 2,00	17,64	<0,0001***	120
HSFL (1000)	17,50 ± 0,5	9,37	30,50 ± 0,50	19,60	<0,05*	120

3.4.9. Expressão de enzimas antioxidantes

Os efeitos de HSFL sobre a expressão de enzimas antioxidantes em linhagens transgênicas CF1553 (SOD-3::GFP) e CL2166 (GST-4::GFP) estão apresentados nas **Figs. 10 e 11**. A quantificação de fluorescência de SOD-3 foi aumentada em 42,00% nos nematoides tratados com HSFL na maior concentração avaliada (**Fig. 10**). As expressões de GST-4 em ambas concentrações foram reguladas negativamente (**Fig. 11**).

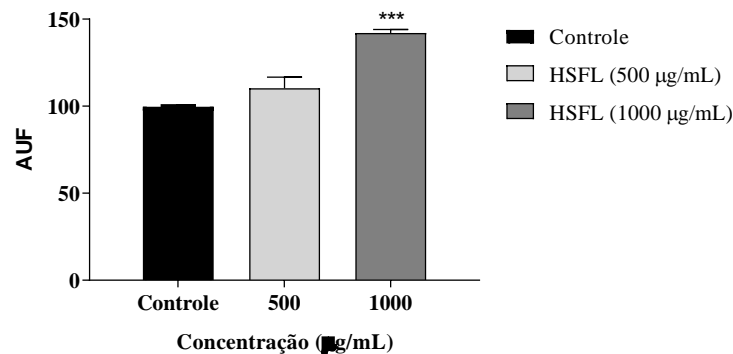


Fig. 10. Expressão de SOD-3::GFP (CF1553 [sod-3p : GFP]) em nematoides tratados com HSFL. Os valores são expressos como média ± EPM. * $p < 0.05$ e ** $p < 0.01$, quando o grupo tratado foi comparado com o grupo controle.

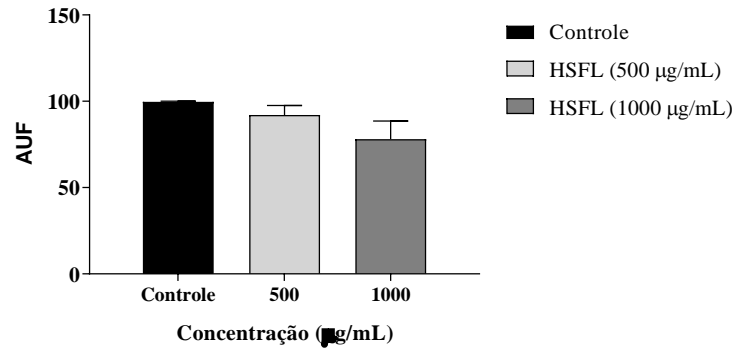
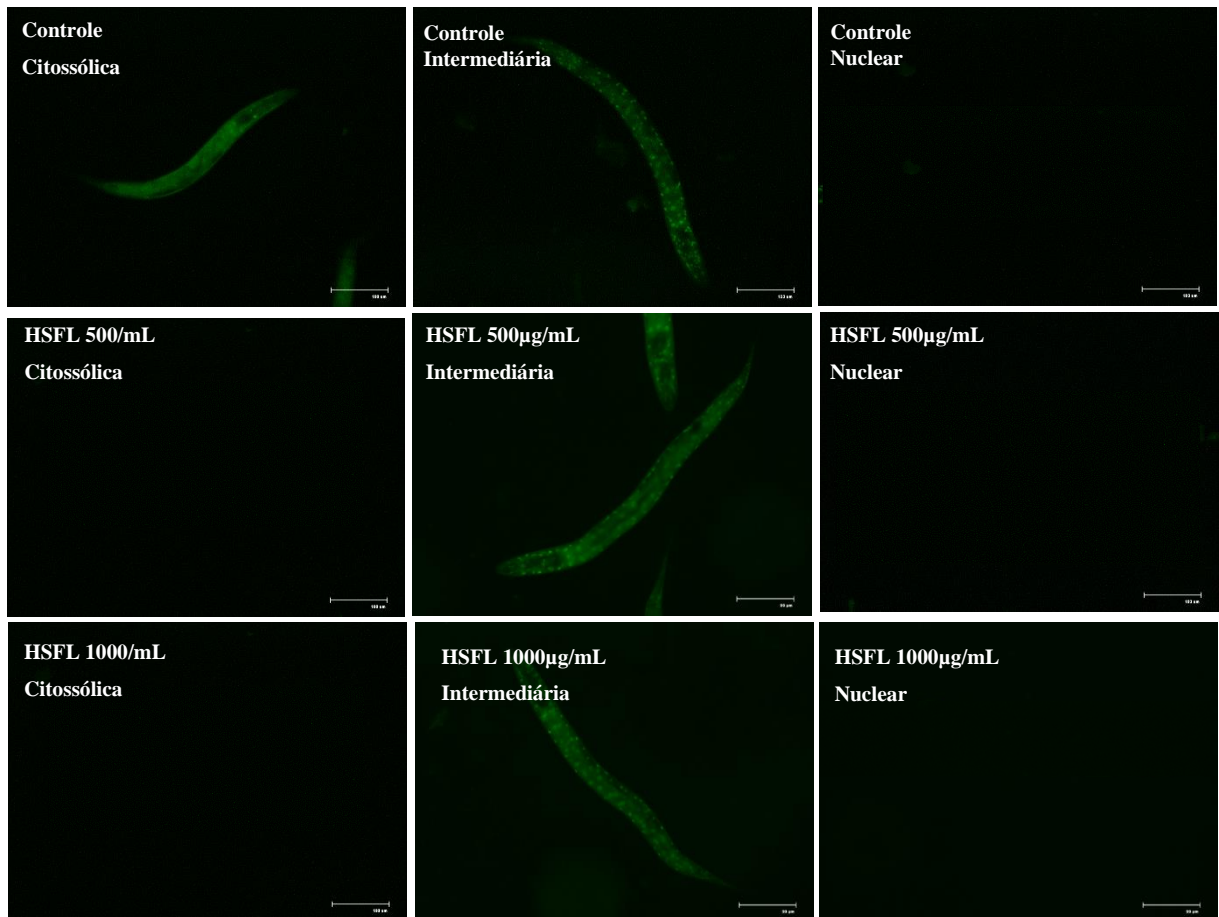


Fig. 11. Expressão proteica de GST-4::GFP (CL 2166 [*gst-4p* : GFP]) em nematoides tratados com HSFL. Os valores são expressos como média \pm EPM. * p <0.05 e ** p <0.01, quando o grupo tratado foi comparado com o grupo controle.

3.4.10. Localização de DAF-16

Para demonstrar o mecanismo associado ao efeito antioxidante de HSFL analisamos a localização subcelular do fator de transcrricional DAF-16. Na **Fig.12**, podemos observar que HSFL induziu maiores translocações para a região intermediária das células de nematoides tratados com HSFL. Os resultados apresentaram translocação intermediária de $95,67 \pm 4,33\%$ (500 µg/mL de HSFL) e $99,00 \pm 1,00\%$ (1000 µg/mL de HSFL), enquanto o grupo controle apresentou $64,67 \pm 7,88\%$.

A)



B)

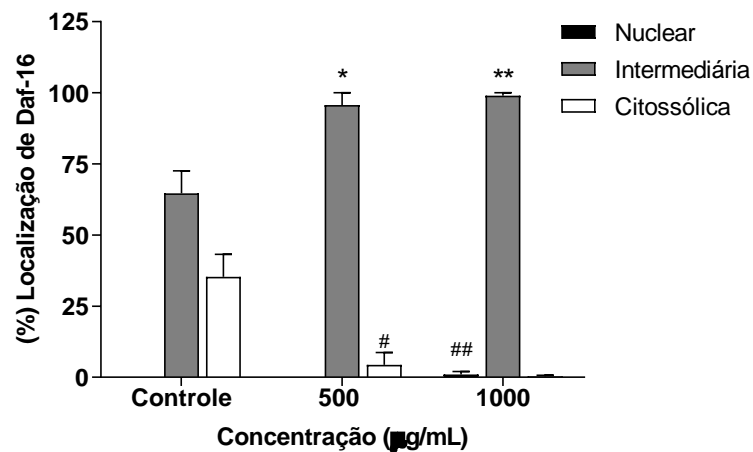


Fig. 12. Localização subcelular de DAF-16 em nematoides (TJ356 [daf-16p: daf-16a / b: GFP + rol-6 (su1006)]) tratados com HSFL. Os valores são expressos como média \pm EPM. # $p < 0.05$ e ## $p < 0.01$ localização citossólica quando comparado com o grupo controle. * $p < 0.05$ e ** $p < 0.01$, localização intermediária quando comparado com o grupo controle.

4. Discussão

O Brasil detém Biomas ricos em diversidade de espécies vegetais detentoras de compostos com alto potencial para o desenvolvimento de suplementos alimentares e medicamentos. Neste distinto grupo de plantas, as espécies frutíferas nativas apresentam em sua constituição compostos biologicamente ativos que demonstram aspectos relevantes tais como, a reduzida toxicidade e o potencial antioxidante, importantes para a prevenção de doenças relacionadas ao estresse oxidativo, entre elas as doenças neurodegenerativas.

No presente estudo, identificamos 27 constituintes químicos advindos dos frutos de *Hancornia speciosa*. Os resultados da análise fitoquímica apresentam como constituintes químicos majoritários pertencentes às classes de compostos fenólicos, entre eles, os compostos flavonoides e não flavonoides, os ácidos fenólicos e seus derivados. Além disso, ácidos fenólicos e flavonoides glicosilados, tais como o ácido cafeoilquínico, quercetina e luteolina, também foram identificados. O perfil de compostos fenólicos de *H. speciosa*, foi descrito por De Lima et al. 2015, os autores demonstraram a presença de flavonoides (catequina e rutina) e não flavonoides (ácido gálico, ácido clorogênico, ácido vanílico, ácido o-marrínico e ácido rosmarínico) na polpa do fruto de *H. speciosa*, adicionalmente, os autores investigaram o efeito antimutagênico, enfatizando o potencial uso deste fruto como alimento funcional e sua aplicabilidade na indústria de alimentos.

Em nosso estudo, identificamos os compostos químicos ácido ascórbico e ácido cafeico, descritos por Chan et al. 2016 pela capacidade de quelar metais de transição, tais como Cu (II), Zn (II) e Fe (II), atividade antioxidante contra os radicais livres, e ainda inibição da fibrilação do peptídeo neurotóxico A β ₄₂, sugerindo efeitos benéficos associados à DA.

Pela primeira vez, foram identificados nos frutos, constituintes derivados de ácidos graxos, sendo estes, o ácido octadecadienoico, ácido hexadecanoico e ácido octadecenoico. Os ácidos graxos desempenham importante papel no metabolismo energético celular e são descritos como moléculas sinalizadoras que regulam vários efeitos fisiológicos, tal como a inflamação (Proschak et al., 2017). Entre os ácidos graxos identificados em HSFL, foram predominantes o ácido oleico monoinsaturado

(ácido octadecenoico), o ácido linoleico poli-insaturado (ácido octadecadienoico), seguido do ácido palmítico saturado (ácido hexadecanoico). O ácido oleico tem sido associado a regulação do metabolismo celular e aos efeitos fisiológicos, como o desenvolvimento embrionário e a longevidade em *C. elegans* (Fayezi et al., 2018 e Han et al., 2017). O ácido linoleico foi descrito por desempenhar importante papel na sinalização de indicadores relacionados à inflamação (TNF- α , IL-6, MMP9) e aos marcadores relacionados ao estresse oxidativo (ox-LDL, MDA e SOD), levando à regulação do estado de estresse oxidativo e efeitos anti-inflamatórios (Li et. al., 2019). Já o ácido saturado palmítico, desempenha importante papel no comportamento alimentar, bem como no metabolismo de lipídios e glicose, entretanto quando incluído na dieta em elevadas concentrações, está associado ao desenvolvimento de doenças metabólicas relacionadas à obesidade, como resistência à insulina e diabetes *mellitus* tipo II (Morselli et al., 2019).

Notavelmente, identificamos em HSFL um constituinte químico considerado promissor na categoria de moléculas potenciais para estudos sobre estrutura-atividade relacionados a DA, trata-se do composto O-caffeoyl hexoside (verbacoside). Korshavn et al., 2015, investigaram a atividade biológica de diferentes estruturas de verbacoside, e descreveram a capacidade destes compostos em regular a agregação e reduzir a citotoxicidade de metais livres e metais associados ao peptídeo β A, indicando que o composto verbacoside representa uma estrutura promissora para o desenvolvimento de alvos moleculares contra DA.

A quantificação de compostos naturais antioxidantes, incluindo antioxidantes lipofílicos, em produtos naturais, fornece parâmetros-chave para avaliar a qualidade e o potencial biológico de produtos fitoterápicos (Dos Santos et al., 2018d). Neste estudo, compostos antioxidantes lipofílicos, entre eles, β -caroteno, as clorofilas a e b e licopeno, foram quantificados em HSFL. Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram atividades anti-inflamatórias e antioxidantes promovidas por estes compostos (Amrani-Allalou et al., 2019 e Zheng et al., 2019). Tais propriedades benéficas despertam grande interesse da indústria, que os utiliza em formulações farmacêuticas, nutracêuticas e como aditivos alimentares de alto valor agregado.

Embora os seres humanos e outros animais não sejam capazes de sintetizar carotenoides, estes compostos desempenham propriedades biológicas importantes na reprodução e desenvolvimento embrionário, modulação imunológica e na manutenção

dos tecidos oculares (Müller-Maatsch et al., 2017). Já as clorofilas exibiram atividade antioxidante e melhoraram consistentemente a atividade de eliminação de radicais peróxil, suprimiram a produção de EROS mitocondrial e peróxido de hidrogênio em células cancerígenas (Vaňková et al., 2018). Dentre os compostos quantificados e identificados em HSFL, o ácido ascórbico, conhecido como vitamina C, foi definido como um dos compostos antioxidantes mais importantes para os seres humanos, atuando contra danos causados pelo estresse oxidativo, devido a sua capacidade de doar elétrons para as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (Carocho & Ferreira, 2013). Foram descritos relevantes evidências sobre o ácido ascórbico para o desenvolvimento e funcionamento normais do cérebro, como funções neuromodulatórias e sequestradora de espécies reativas de oxigênio geradas durante a atividade sináptica e no metabolismo neuronal. Essas são propriedades importantes, pois o desequilíbrio redox e a agregação anormal de proteínas constituem mecanismos centrais implicados na patogênese de doenças neurodegenerativas, incluindo a DA (Moretti et al., 2017). Além do efeito neuroprotetor através da modulação da neuroinflamação e a supressão da fibrilação do peptídeo β -amiloide (Monacelli et al. 2017).

Diante da caracterização e identificação dos constituintes químicos, nos motivamos a investigar a capacidade antioxidante de HSFL em sistemas *in vitro*. HSFL apresentou atividade antioxidante via captura direta de radicais livres DPPH[•] e descoloração do radical ABTS^{•+}. Podemos atribuir a atividade antioxidante aos compostos bioativos quantificados, entre eles os compostos fenólicos, que apresentam em sua estrutura de anéis aromáticos capazes de estabilizar e deslocar elétrons desemparelhados de radicais livres, e conseqüentemente podem reduzir danos oxidativos (Nayak et al., 2015). E ainda, compostos carotenoides e os pigmentos lipofílicos, descritos pela capacidade de impedir a oxidação de substratos, promovendo efeitos benéficos ao organismo e atuando em diferentes mecanismos de defesa antioxidante (Fiedor & Burda, 2014 e Kurutas, 2016).

Adicionalmente, os potenciais efeitos *in vivo* de HSFL foram investigados no nematoide *Caenorhabditis elegans*. Este modelo de experimentação é um dos mais versáteis organismos utilizados em estudos sobre vias moleculares relacionadas à diversas doenças e ao envelhecimento.

Inicialmente avaliamos a toxicidade aguda, considerada um dos principais parâmetros realizados na prospecção de agentes terapêuticos, nutracêuticos e fármacos.

Verificamos que as concentrações avaliadas de HSFL não alteram a viabilidade dos nematoides. Em seguida, a capacidade reprodutiva dos nematoides foi avaliada, também investigada como um indicativo de possíveis efeitos tóxicos no estágio de desenvolvimento L4 e, de modo indireto, na atividade neuromuscular para postura de ovos (Boyd et al., 2010; Peterson et al., 2008). Não foram observadas quaisquer alterações no número de progênie dos nematoides tratados com HSFL em relação ao controle. Estes resultados, corroboram com estudos realizados em *C. elegans*, que demonstraram ausência de toxicidade e alteração da capacidade reprodutiva utilizando extratos provenientes de frutos, consumidos popularmente, tais como, maçã, romã e guaraná (Vayndorf et al. 2013a; Barathikannan et al., 2016 e Tambara et al., 2018a). Ainda, nesta perspectiva investigamos os possíveis efeitos tóxicos de HSFL sobre a capacidade locomotora dos nematoides, consideramos que a redução da locomoção poderia afetar a qualidade de vida dos nematoides em diferentes fases do ciclo de vida. Contudo, observamos a melhora significativa da capacidade locomotora nos grupos tratados nas fases adulta e de envelhecimento. Estes resultados nos conduziram a investigar o potencial efeito benéfico de HSFL em cepas transgênicas para DA. Para isto, utilizamos a linhagem transgênica *CL2006* que apresenta agregados de peptídeos amiloides constituídos nos músculos da parede de seu corpo, e este processo é dependente da idade, descrito como similar ao ocorrido no cérebro de pacientes com DA.

Em humanos diagnosticados com DA, observam-se o comprometimento cognitivo, ocorrendo a perda da linguagem e habilidades motoras (Kirova et al., 2015 e Vöglein et al., 2019), já nematoides *CL2006*, em condições permissivas apresentam a paralisia progressiva do corpo como consequência da toxicidade do peptídeo βA , permitindo a avaliação da progressão dos nematoides em paralisia (Regitz et al., 2016). Nossos resultados, demonstraram que HSFL foi capaz de atrasar significativamente a paralisia induzida por βA em nematoides transgênicos para DA, e ainda, curiosamente reverteu a paralisia quando os nematoides foram submetidos as condições de tratamentos e temperatura favoráveis à sua recuperação. Este é o primeiro estudo acerca do efeito protetor do fruto nativo sobre a redução da toxicidade de βA e reversão da paralisia no modelo *C. elegans* para DA.

Diante das consistentes evidências do envolvimento do estresse oxidativo na patogênese da DA, investigamos se os efeitos protetores de HSFL estariam associados com sua capacidade antioxidante. Então, avaliamos o efeito protetor de HSFL em *C. elegans* submetidos a duas condições de estresse, sendo estas, estresse térmico e estresse oxidativo.

Em nosso estudo, os nematoides tratados com HSFL demonstraram efetiva proteção, contra o estresse térmico. O efeito protetor demonstrado possivelmente está relacionado com a diversidade dos compostos bioativos e o sinergismo de estruturas químicas presentes em HSFL. Estudos anteriores demonstraram que o tratamento com compostos naturais antioxidantes pode atuar em mecanismos promotores de resistência de nematoides expostos ao estresse térmico, apresentando funções específicas de sinalização celular como a regulação da expressão de proteínas de choque térmico (HSPs) (Zamberlan et al., 2016 e Wilson et al., 2006).

O estresse oxidativo foi descrito por desempenhar importante papel na patogênese da DA, pois com o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio ocorre a perda de função de enzimas de defesa do sistema antioxidante (Butterfield et al., 2013), este processo também limita a qualidade e a expectativa de vida em *C. elegans* (Meng et al., 2017). Nesta perspectiva, continuamos investigando os efeitos antioxidantes de HSFL contra o estresse oxidativo induzido utilizando o composto pró-oxidante Juglone. Nossos resultados demonstraram que HSFL exibe efeito protetor contra o estresse oxidativo. Outros estudos evidenciam o efeito benéfico de extratos advindos de frutos, promovendo o efeito protetor em nematoides tratados contra o estresse oxidativo induzido (Vayndorf et al., 2013b; Tambara et al., 2018b e Guerrero-Rubio et al., 2019a).

Recentes estudos elucidam efeitos benéficos mediados por compostos naturais, tais como melhora da saúde, proteção contra estressores térmicos e oxidativos e efeito pró-longevidade em *C. elegans* (Van Raamsdonk, 2018; Guerrero-Rubio et al., 2019b). Deste modo, exploramos esta hipótese e avaliamos os efeitos de HSFL sobre a expectativa de vida de nematoides selvagens e seus mecanismos subjacentes. Nossos resultados demonstram que a HSFL foi capaz de aumentar a expectativa média de vida,

inclusive na menor concentração avaliada, além de promover a longevidade em *C. elegans*.

As vias de sinalização e processos bioquímicos envolvidos no aumento da expectativa de vida são conservados em humanos e *C. elegans* (Chen et al., 2019). O fator transacional DAF 16/FOXO, é considerado o principal fator-chave de transcrição, capaz de integrar diferentes sinais dessas vias para modular a longevidade, através da ativação de genes alvos (Sun et al., 2017). Neste estudo, as enzimas antioxidantes SOD-3 e GST-4, alvos de DAF-16 e SKN-1, foram quantificadas em nematoides tratados com HSFL. Observamos a regulação positiva para SOD-3 e regulação negativa para GST-4, podemos sugerir que HSFL pode atuar por outras vias, uma vez que, neste trabalho, a maior expressão do fator transacional de DAF-16 foi localizada na região intermediária das células. Assim, podemos inferir que a extensão do tempo de vida e ativação da expressão de proteínas antioxidantes não é estritamente dependente de DAF-16 e que outras vias podem estar relacionadas com o sinergismo dos constituintes químicos e suas respostas biológicas.

Em conclusão, o presente estudo sobre o fruto nativo brasileiro *H. Speciosa* identificou diferentes constituintes bioativos com atividade antioxidante promissora, confirmadas em ensaios *in vitro* e *in vivo*. Além disso, demonstramos pela primeira vez que *H. speciosa* foi capaz de aumentar a expectativa de vida e atenuar a toxicidade causada pelo peptídeo β A, em cepa transgênica para a Doença de Alzheimer. Assim, estes resultados lançam novas perspectivas de estudos para aplicações de interesse nas indústrias alimentícia e farmacêutica para elaboração de fórmulas ou produtos naturais com propriedades nutracêuticas que auxiliem na prevenção e tratamento de doenças neurodegenerativas.

Referências Bibliográficas

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., 2011. Bioactive compounds and antioxidant activity of fresh exotic fruits from northeastern Brazil Food Research International, 44 (7): 2155-2159. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.03.051>.

Amrani-Allalou, H., Boulekbache-Makhlouf, L., Mapelli-Brahm, P., Sait, S., Tenore, G. C., Benmeziane, A., ... & Jesús, A. M. M., 2019. Antioxidant activity, carotenoids, chlorophylls and mineral composition from leaves of *Pallenis spinosa*: an Algerian medicinal plant. Journal of complementary & integrative medicine, 2019. <https://doi.org/10.1515/jcim-2017-0081>.

Bailão, E., Devilla, I., da Conceição, E., & Borges, L., 2015. Bioactive compounds found in Brazilian Cerrado fruits. International Journal of Molecular Sciences, 16(10), 23760-23783. <https://doi.org/10.3390/ijms161023760>.

Barathikannan, K., Venkatadri, B., Khusro, A., Al-Dhabi, N. A., Agastian, P., Arasu, M. V., Choi, H. S., ... Kim, Y. O., 2016. Chemical analysis of *Punica granatum* fruit peel and its *in vitro* and *in vivo* biological properties. BMC Complementary and Alternative Medicine, 16(1), 264. <https://doi.org/10.1186/s12906-016-1237-3>.

Boyd, W. A., Smith, M. V., Kissling, G. E., & Freedman, J. H. 2010. Medium-and high-throughput screening of neurotoxicants using *C. elegans*. Neurotoxicology and teratology, 32(1), 68-73, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2008.12.004>.

Butterfield, D. A., Swomley, A. M., & Sultana, R., 2013. Amyloid β -peptide (1-42)-induced oxidative stress in Alzheimer disease: importance in disease pathogenesis and progression. Antioxidants & Redox Signaling, 19(8), 823-35. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.5027>.

Carocho, M., & Ferreira, I. C. (2013). A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology*, *51*, 15-25. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.09.021>.

Carrasco-Gallardo, C., Farías, G. A., Fuentes, P., Crespo, F., & Maccioni, R. B., 2012. Can nutraceuticals prevent Alzheimer's disease? Potential therapeutic role of a formulation containing Shilajit and complex B vitamins. *Archives of Medical Research*, *43*(8), 699-704. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2012.10.010>.

Campos, L. Z., Nascimento, A. L. B., Albuquerque, U. P., & Araújo, E. L., 2018. Use of local ecological knowledge as phenology indicator in native food species in the semiarid region of Northeast Brazil. *Ecological Indicators*, *95*, 75-84. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2018.07.016>.

Chan, S., Kantham, S., Rao, V. M., Palanivelu, M. K., Pham, H. L., Shaw, P. N., ... & Ross, B. P., 2016. Metal chelation, radical scavenging and inhibition of A β 42 fibrillation by food constituents in relation to Alzheimer's disease. *Food Chemistry*, *199*, 185-194. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.11.118>.

Cheignon, C., Tomas, M., Bonnefont-Rousselot, D., Faller, P., Hureau, C., & Collin, F., 2018^{a,b,c}. Oxidative stress and the amyloid beta peptide in Alzheimer's disease. *Redox Biology*, *14*, 450-464. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.10.014>.

Chen, W., Wang, J., Shi, J., Yang, X., Yang, P., Wang, N., ... Fei, J., 2019. Longevity Effect of Liuwei Dihuang in Both *Caenorhabditis Elegans* and Aged Mice. *Aging and disease*, *10*(3), 578–591. <https://dx.doi.org/10.14336%2FAD.2018.0604>.

Deb, A., Thornton, J. D., Sambamoorthi, U., & Innes, K. (2017). Direct and indirect cost of managing Alzheimer's disease and related dementias in the United States. *Expert review of Pharmacoeconomics & Outcomes Research*, *17*(2), 189-202. <https://dx.doi.org/10.1080%2F14737167.2017.1313118>.

Dey, A., Bhattacharya, R., Mukherjee, A., & Pandey, D. K. (2017). Natural products against Alzheimer's disease: Pharmaco-therapeutics and biotechnological interventions. *Biotechnology Advances*, 35(2), 178-216. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.12.005>.

De Lima, J. P., Azevedo, L., de Souza, N. J., Nunes, E. E., & Boas, E. V. D. B. V., 2015. First evaluation of the antimutagenic effect of mangaba fruit *in vivo* and its phenolic profile identification. *Food Research International*, 75, 216-224. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.05.045>.

De Mello Moraes, T., Rodrigues, C. M., Kushima, H., Bauab, T. M., Villegas, W., Pellizzon, C. H., ... & Hiruma-Lima, C. A., 2008. *Hancornia speciosa*: Indications of gastroprotective, healing and anti-*Helicobacter pylori* actions. *Journal of Ethnopharmacology*, 120(2), 161-168. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.08.001>.

Dos Santos, U. P., Tolentino, G. S., Morais, J. S., de Picoli Souza, K., Estevinho, L. M., & dos Santos, E. L., 2018^{a,b,c,d}. Physicochemical Characterization, Microbiological Quality and Safety, and Pharmacological Potential of *Hancornia speciosa* Gomes. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/2976985>.

Fayezi, S., Leroy, J. L., Novin, M. G., & Darabi, M., 2018. Oleic acid in the modulation of oocyte and preimplantation embryo development. *Zygote*, 26(1), 1-13. <https://doi.org/10.1017/S0967199417000582>.

Fernando, W. M. A. D. B., Martins, I. J., Goozee, K. G., Brennan, C. S., Jayasena, V., & Martins, R. N., 2015. The role of dietary coconut for the prevention and treatment of Alzheimer's disease: potential mechanisms of action. *British Journal of Nutrition*, 114(1), 1-14. <https://doi.org/10.1017/S0007114515001452>.

Fiedor, J., & Burda, K., 2014. Potential role of carotenoids as antioxidants in human health and disease. *Nutrients*, 6(2), 466-488. <https://doi.org/10.3390/nu6020466>.

Geller, F. C., Teixeira, M. R., Pereira, A. B. D., Dourado, L. P. A., Souza, D. G., Braga, F. C., & Simões, C. M. O., 2015. Evaluation of the wound healing properties of *Hancornia speciosa* leaves. *Phytotherapy Research*, 29(12), 1887-1893. <https://doi.org/10.1002/ptr.5438>.

Guerrero-Rubio, M. A., Hernández-García, S., García-Carmona, F., & Gandía-Herrero, F., 2019^{a,b}. Extension of life-span using a RNAi model and *in vivo* antioxidant effect of *Opuntia* fruit extracts and pure betalains in *Caenorhabditis elegans*. *Food Chemistry*, 274, 840-847. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.09.067>.

Han, S., Schroeder, E. A., Silva-García, C. G., Hebestreit, K., Mair, W. B., & Brunet, A., 2017. Mono-unsaturated fatty acids link H3K4me3 modifiers to *C. elegans* lifespan. *Nature*, 544(7649), 185. <https://doi.org/10.1038/nature21686>.

Hickman, R. A., Faustin, A., & Wisniewski, T., 2016. Alzheimer disease and its growing epidemic: risk factors, biomarkers, and the urgent need for therapeutics. *Neurologic Clinics*, 34(4), 941-953. <https://doi.org/10.1016/j.ncl.2016.06.009>.

Islam, A., Saif Khandker, S., Alam, F., Ibrahim Khalil, M., Amjad Kamal, M., & Hua Gan, S. (2017). Alzheimer's disease and natural products: Future regimens emerging from nature. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 17(12), 1408-1428. <https://doi.org/10.2174/1568026617666170103163054>.

Kirova, A. M., Bays, R. B., & Lagalwar, S., 2015. Working memory and executive function decline across normal aging, mild cognitive impairment, and Alzheimer's disease. *BioMed Research International*, 2015. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/748212>.

Koch, I., Rapini, A., Simões, A. O., Kinoshita, L. S., Spina, A. P., & Castello, A. C. D. (2015). Apocynaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. [(Accessed on 12 march 2019)]; Available online: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB15557>.

Korshavn, K. J., Jang, M., Kwak, Y. J., Kochi, A., Vertuani, S., Bhunia, A., ... & Lim, M. H., 2015. Reactivity of metal-free and metal-associated amyloid- β with glycosylated polyphenols and their esterified derivatives. *Scientific Reports*, 5, 17842. <https://doi.org/10.1038/srep17842>.

Kurutas E. B. (2016). The importance of antioxidants which play the role in cellular response against oxidative/nitrosative stress: current state. *Nutrition Journal*, 15(1), 71. <https://doi.org/10.1186/s12937-016-0186-5>.

Lane, C. A., Hardy, J. and Schott, J. M., 2017^{a,b}. Alzheimer's disease. *European Journal Neurology*, 25: 59-70. <https://doi.org/10.1111/ene.13439>.

Li, Z., Yang, L., Liu, Y., Xu, H., Wang, S., Liu, Y., ... & Xu, Y. (2019). Anti-inflammatory and antioxidative effects of Dan-Lou tablets in the treatment of coronary heart disease revealed by metabolomics integrated with molecular mechanism studies. *Journal of Ethnopharmacology*, (240) 111911. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.111911>.

Linsley, J. W., Reisine, T., & Finkbeiner, S. (2019). Cell death assays for neurodegenerative disease drug discovery. *Expert opinion on drug discovery*, 14(9), 901-913. <https://doi.org/10.1080/17460441.2019.1623784>.

Marinho, D. G., Alviano, D. S., Matheus, M. E., Alviano, C. S., & Fernandes, P. D., 2011. The latex obtained from *Hancornia speciosa* Gomes possesses anti-inflammatory activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 135(2), 530-537. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.03.059>.

Meng, F., Li, J., Wang, W., & Fu, Y., 2017. Gengnianchun, a Traditional Chinese Medicine, Enhances Oxidative Stress Resistance and Lifespan in *Caenorhabditis elegans* by Modulating daf-16/FOXO. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/8432306>.

Monacelli, F., Acquarone, E., Giannotti, C., Borghi, R., & Nencioni, A., 2017. Vitamin C, aging and Alzheimer's disease. *Nutrients*, *9*(7), 670. <https://doi.org/10.3390/nu9070670>.

Moretti, M., Fraga, D. B., & Rodrigues, A. L. S., 2017. Preventive and therapeutic potential of ascorbic acid in neurodegenerative diseases. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, *23*(12), 921-929. <https://doi.org/10.1111/cns.12767>.

Morselli, E., Hernández-Cáceres, M. P., Toledo-Valenzuela, L., Ávalos, Y., Peña-Oyarzun, D., & Criollo, A., 2019. Palmitic acid reduces the autophagic flux and insulin sensitivity through the activation of the Free Fatty Acid Receptor 1 (FFAR1) in the hypothalamic neuronal cell line N43/5. *Frontiers in Endocrinology*, *10*, 176. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00176>.

Müller-Maatsch, J., Sprenger, J., Hempel, J., Kreiser, F., Carle, R., & Schweiggert, R. M., 2017. Carotenoids from gac fruit aril (*Momordica cochinchinensis* [Lour.] Spreng.) are more bioaccessible than those from carrot root and tomato fruit. *Food Research International*, *99*(2), 928-935. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.10.053>.

Nayak, B., Liu, R. H., & Tang, J., 2015. Effect of processing on phenolic antioxidants of fruits, vegetables, and grains - A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *55*(7), 887-918. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.654142>.

Newman D. J., Cragg G. M., 2016. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. *Journal of Natural Products*. *79*(3):629–661. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b01055>.

Penido, A. B., De Morais, S. M., Ribeiro, A. B., Alves, D. R., Rodrigues, A. L., Dos Santos, L. H., & de Menezes, J. E., 2017^{a,b}. Medicinal Plants from Northeastern Brazil against Alzheimer's Disease. Evidence-based Complementary and Alternative Medicine. *2017*. <https://doi.org/10.1155/2017/1753673>.

Penke, B., Bogár, F., Crul, T., Sántha, M., Tóth, M. E., & Vígh, L., 2018. Heat Shock Proteins and Autophagy Pathways in Neuroprotection: from Molecular Bases to Pharmacological Interventions. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(1), 325. <https://doi.org/10.3390/ijms19010325>.

Pereira, A. C., Pereira, A. B. D., Moreira, C. C., Botion, L. M., Lemos, V. S., Braga, F. C., & Cortes, S. F., 2015. *Hancornia speciosa* Gomes (Apocynaceae) as a potential anti-diabetic drug. *Journal of Ethnopharmacology*, *161*, 30-35. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2014.11.050>.

Peterson, R. T., Nass, R., Boyd, W. A., Freedman, J. H., Dong, K., & Narahashi, T., 2008. Use of non-mammalian alternative models for neurotoxicological study. *Neurotoxicology*, *29*(3), 546-555. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2008.04.006>.

Proschak, E., Heitel, P., Kalinowsky, L., & Merk, D., 2017. Opportunities and challenges for fatty acid mimetics in drug discovery. *Journal of Medicinal Chemistry*, *60*(13), 5235-5266. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b01287>.

Regitz, C., Fitzenberger, E., Mahn, F. L., Dußling, L. M., & Wenzel, U., 2016. Resveratrol reduces amyloid-beta ($A\beta_{1-42}$) induced paralysis through targeting proteostasis in an Alzheimer model of *Caenorhabditis elegans*. *European Journal of Nutrition*, *55*(2), 741-747. <https://doi.org/10.1007/s00394-015-0894-1>.

Sadhukhan, P., Saha, S., Dutta, S., Mahalanobish, S., & Sil, P. C., 2018. Nutraceuticals: an emerging therapeutic approach against the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Pharmacological Research*, *129*, 100-114. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2017.11.028>.

Shal, B., Ding, W., Ali, H., Kim, Y. S., & Khan, S., 2018. Anti-neuroinflammatory potential of natural products in attenuation of Alzheimer's disease. *Frontiers in Pharmacology*, *9*. <https://dx.doi.org/10.3389/fphar.2018.00548>.

Santos, U. P., Campos, J. F., Torquato, H. F., Paredes-Gamero, E. J., Carollo, C. A., Estevinho, L. M., de Picoli Souza, K., ... Dos Santos, E. L., 2016. Antioxidant, Antimicrobial and Cytotoxic Properties as Well as the Phenolic Content of the Extract

from *Hancornia speciosa* Gomes. PloS One, 11(12), e0167531.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167531>.

Sawikr, Y., Yarla, N. S., Peluso, I., Kamal, M. A., Aliev, G., & Bishayee, A., 2017. Neuroinflammation in Alzheimer's disease: the preventive and therapeutic potential of polyphenolic nutraceuticals. In Advances in protein chemistry and structural biology (Vol. 108, pp. 33-57). Academic Press. v108, 33-57
<https://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2017.02.001>.

Silva G. C., Braga F. C., Lima M. P., Pesquero J. L., Lemos V.S., Cortes S.F., 2011. *Hancornia speciosa* Gomes induces hypotensive effect through inhibition of ACE and increase on NO. Journal Ethnopharmacol, 137(1), 709–713.
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.06.031>.

Silva, G. C., Braga, F. C., Lemos, V. S., & Cortes, S. F., 2016. Potent antihypertensive effect of *Hancornia speciosa* leaves extract. Phytomedicine, 23(2), 214-219.
<https://doi.org/10.1016/j.phymed.2015.12.010>.

Sun, X., Chen, W. D., & Wang, Y. D., 2017. DAF-16/FOXO transcription factor in aging and longevity. Frontiers in Pharmacology, 8, 548.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00548>.

Tambara, A. L., Moraes, L. D. L. S., Dal Forno, A. H., Boldori, J. R., Soares, A. T. G., de Freitas Rodrigues, C., ... & Denardin, C. C., 2018^{a,b,c}. Purple Pitanga fruit (*Eugenia uniflora* L.) protects against oxidative stress and increase the lifespan in *Caenorhabditis elegans* via the DAF-16/FOXO pathway. Food and Chemical Toxicology, 120, 639-650. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.07.057>.

Torres-Rêgo, M., Furtado, A. A., Bitencourt, M. A., Lima, M. C., Andrade, R. C., Azevedo, E. P., Soares, T., Tomaz, J. C., Lopes, N. P., da Silva-Júnior, A. A., Zucolotto, S. M.,...&Fernandes-Pedrosa, M., 2016. Anti-inflammatory activity of aqueous extract and bioactive compounds identified from the fruits of *Hancornia*

speciosa Gomes (Apocynaceae). BMC Complementary and Alternative Medicine, *16*(16), 275. <https://doi.org/10.1186/s12906-016-1259-x>.

Tramutola, A., Lanzillotta, C., Perluigi, M., & Butterfield, D. A., 2017. Oxidative stress, protein modification and Alzheimer disease. Brain Research Bulletin, *v.133*, p. 88-96. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2016.06.005>.

Vayndorf, E. M., Lee, S. S., & Liu, R. H., 2013^{a,b}. Whole apple extracts increase lifespan, healthspan and resistance to stress in *Caenorhabditis elegans*. Journal of Functional Foods, *5*(3), 1235-1243. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2013.04.006>.

Van Raamsdonk, J. M. (2018). Mechanisms underlying longevity: A genetic switch model of aging. Experimental Gerontology, *107*, 136-139. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2017.08.005>.

Vaňková, K., Marková, I., Jašprová, J., Dvořák, A., Subhanová, I., Zelenka, J., Novosádová, I., Rasl, J., Vomastek, T., Sobotka, R., Muchová, L., ... Víték, L., 2018. Chlorophyll-Mediated Changes in the Redox Status of Pancreatic Cancer Cells Are Associated with Its Anticancer Effects. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, *2018*. <https://doi.org/10.1155/2018/4069167>.

Vöglein, J., Paumier, K., Jucker, M., Preische, O., McDade, E., Hassenstab, J., ... & Ghetti, B., 2019. Clinical, pathophysiological and genetic features of motor symptoms in autosomal dominant Alzheimer's disease. Brain, *142*(5), 1429-1440. <https://doi.org/10.1093/brain/awz050>.

Wang, E., & Wink, M. (2016). Chlorophyll enhances oxidative stress tolerance in *Caenorhabditis elegans* and extends its lifespan. PeerJ, *4*, e1879. <https://doi.org/10.7717/peerj.1879>.

Wilson, M. A., Shukitt-Hale, B., Kalt, W., Ingram, D. K., Joseph, J. A., & Wolkow, C. A., 2006. Blueberry polyphenols increase lifespan and thermotolerance in

Caenorhabditis elegans. *Aging Cell*, 5(1), 59-68. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2006.00192.x>.

Zamberlan, D. C., Amaral, G. P., Arantes, L. P., Machado, M. L., Mizdal, C. R., Campos, M. M., & Soares, F. A., 2016. *Rosmarinus officinalis* L. increases *Caenorhabditis elegans* stress resistance and longevity in a DAF-16, HSF-1 and SKN-1-dependent manner. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 49(9). <http://dx.doi.org/10.1590/1414-431x20165235>.

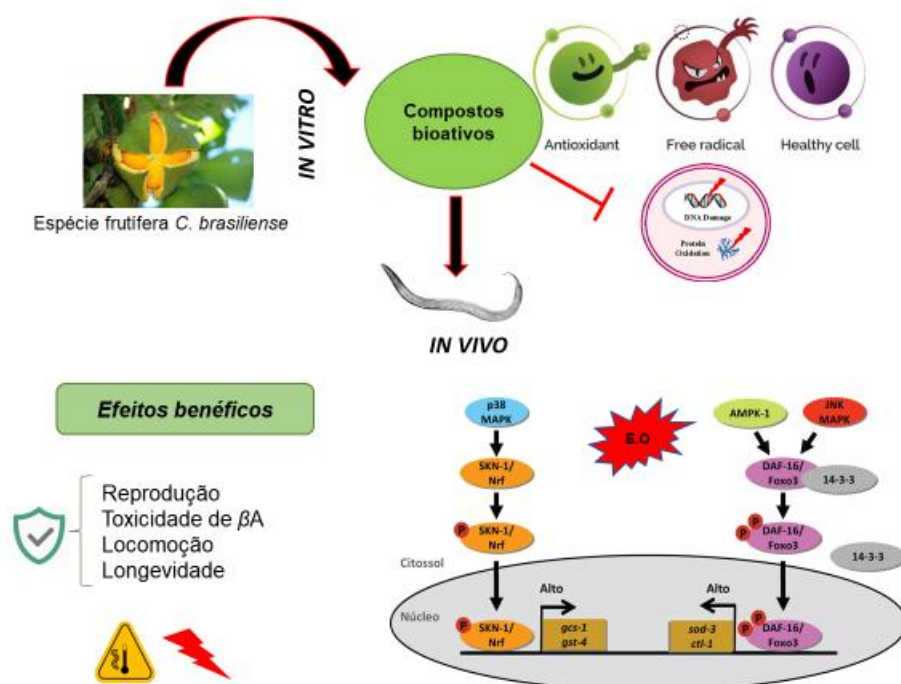
Zheng, Z., Yin, Y., Lu, R., & Jiang, Z., 2019. Lycopene Ameliorated Oxidative Stress and Inflammation in Type 2 Diabetic Rats. *Journal of Food Science*, 84(5), 1194-1200. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14505>.

5.4 Propriedades antioxidantes do fruto nativo *Caryocar brasiliense* Camb. melhoram a qualidade de vida e promovem longevidade em *Caenorhabditis elegans*

Destaques:

- O fruto pequi é nativo do Bioma Cerrado brasileiro.
- Compostos bioativos estão presentes na polpa do fruto pequi.
- *In vitro*, CBPF demonstrou atividade antioxidante.
- *In vivo*, CBPF promove os efeitos benéficos à saúde e aumenta a expectativa de vida.

Resumo gráfico:



Resumo

Caryocar brasiliense Camb. (Caryocaraceae) nativa do Bioma Cerrado, produz frutos apreciados pela culinária tradicional brasileira e suas partes vegetais são utilizadas na medicina popular. Neste estudo, caracterizamos os compostos bioativos da polpa do fruto *C. brasiliense* (CBFP) e investigamos a atividade antioxidante *in vitro* e suas propriedades biológicas no modelo *Caenorhabditis elegans*. A caracterização química demonstrou a presença de compostos fenólicos e flavonoides, compostos lipofílicos e ácido ascórbico. A atividade antioxidante foi apresentada pela captura direta de radicais livres (DPPH• e ABTS^{•+}) e proteção contra danos oxidativos ao DNA. Nos ensaios *in vivo*, CBFP não apresentou efeitos tóxicos e alteração da capacidade reprodutiva, houve melhora da capacidade locomotora e aumento da expectativa de vida em *C. elegans*. CBFP demonstrou efeito protetor contra toxicidade do peptídeo β A em cepas transgênicas (CL2006) para doença de Alzheimer. O efeito protetor de CBPF também foi observado frente às condições de estresse oxidativo e térmico. Tomados em conjunto, os resultados demonstram que CBPF apresenta efeitos benéficos promotores de saúde e qualidade de vida em *C. elegans*, demonstrando seu potencial para o desenvolvimento de novos suplementos alimentares que promovam efeitos benéficos para saúde humana.

Palavras-chave: Pequi; Compostos bioativos; Efeito protetor; *C. elegans*; Qualidade de vida

1. Introdução

O Brasil abriga biomas ricos em biodiversidade, entre estes, o Cerrado constitui um patrimônio de recursos naturais, com destaque para as espécies de plantas frutíferas, detentoras de características sensoriais únicas e alto valor nutricional. A espécie *Caryocar brasiliense* Camb (Caryocaraceae), produz frutos comestíveis, popularmente conhecidos como pequi ou pequiá e amplamente utilizados na culinária regional (De Oliveira et al., 2018^a). Na medicina popular, a polpa do fruto é utilizada para tratamentos estomacais e doenças respiratórias (Roll et al., 2018). Estudos demonstraram propriedades biológicas e farmacológicas advindas principalmente do óleo extraído da polpa dos frutos de *C. brasiliense*, descritas pelo potencial quimiopreventivo contra o câncer hepático em ratos (Palmeira et al., 2016) e efeitos analgésico e anti-inflamatório em camundongos (Jorge et al., 2019). Além disso, Traesel et al. 2016, demonstraram que o óleo da polpa do fruto, apresenta baixa toxicidade aguda e subcrônica em roedores. Já a farinha obtida a partir da casca desidratada do fruto, apresentou compostos fenólicos e antocianinas e exibiu atividade antioxidante (Leão et al., 2017). A importância desta espécie frutífera nativa como alimento medicinal é atribuída por sua relevante diversidade de compostos bioativos, tais como, vitamina A, carotenoides e compostos fenólicos (Nascimento-Silva & Naves, 2019a). Compostos fenólicos anteriormente identificados nas folhas de *C. brasiliense* foram associados aos efeitos benéficos de proteção celular, sendo capazes de atuar contra a ação de espécies reativas e efeitos neuroprotetores associados as propriedades anticolinesterásicas e antioxidantes (De Oliveira et al., 2018). Os danos oxidativos ocasionados por moléculas altamente reativas contribuem para o processo de senescência celular (Jiang et al., 2016) e estão vinculados ao desenvolvimento e progressão de doenças neurodegenerativas como a doença de Alzheimer (DA).

Os frutos são considerados elementos importantes que constituem a dieta humana e a sua ingestão aliada à prática do exercício físico, são estratégias potenciais para a melhoria da qualidade de vida e prevenção de doenças relacionadas ao processo oxidativo e envelhecimento, tais como as doenças neurodegenerativas (Miranda et al., 2017). Considerando que a intervenção dietética e estratégias terapêuticas, desempenham funções cruciais para melhoria da qualidade de vida e prevenção de doenças, é imprescindível a busca por produtos naturais que possam atuar de maneira benéfica em mecanismos associados aos processos oxidativos e de envelhecimento.

Contudo, são escassos estudos sobre as propriedades biológicas e funcionais advindas da polpa do fruto pequi em modelos de experimentação *in vivo*.

Assim, o objetivo deste trabalho, foi caracterizar compostos bioativos e avaliar a capacidade antioxidante *in vitro* e *in vivo* da polpa do fruto de *C. brasiliense*. Além disso, pela primeira vez, investigamos parâmetros associados à qualidade de vida, entre eles, a capacidade reprodutiva, a locomoção e a longevidade. Adicionalmente, avaliamos os efeitos de *C. brasiliense* sobre a toxicidade do peptídeo β -amiloide em *C. elegans* transgênicos para Doença de Alzheimer.

2. Material e métodos

2.1. Coleta do material vegetal

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, foi cadastrada no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento tradicional associado (SisGen), cadastro número AA6FADF). Os frutos da espécie *C. brasiliense* foram coletados no município de Dourados (S 21° 59' 41,8" e W 55° 19' 24,9"), no estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. Uma exsicata foi identificada por um botânico e depositada no Herbário da Universidade Federal da Grande Dourados com número de registro 5412.

2.2. Preparação da polpa de *C. brasiliense*

Para obtenção da polpa do fruto *C. brasiliense* (CBFP), os frutos foram lavados em água corrente para eliminação de impurezas, sanitizados por imersão em solução Sumaveg® (3,3 g/L de água) durante 15 min, lavados com água potável, despulpados, seguido liofilização e acondicionados a - 80 ° C. O rendimento da polpa liofilizada foi calculado pela seguinte equação:

$$\text{Polpa liofilizada (\%)} = \frac{\text{peso da polpa fresca (g)} \times 100}{\text{peso resultante do processo de liofilização (g)}}$$

Para os ensaios experimentais, 0,005 g de CBFP foi ressuspensa em 5 mL de água ultrapura estéril e homogeneizada por agitação constante por 5 min. Em seguida, acondicionado em tubos protegidos da luz e mantidos refrigerados a 4 °C por 24 h, buscando obter uma maior dissolução da polpa e seus constituintes químicos. Somente, após este período a CBFP foi utilizada nas análises experimentais.

2.3. Determinação dos compostos fenólicos e flavonoides totais

Para determinação dos teores de compostos fenólicos e flavonoides a CBFP foi centrifugada a 5000 rpm durante 10 min e o sobrenadante utilizado nas análises.

2.3.1. Compostos fenólicos

Os teores de compostos fenólicos presentes na CBFP, foi determinado através do método colorimétrico de Folin-Ciocalteu. Para isso, 2,5 mL de reagente de Folin – Ciocalteu (1:10 v/v, diluído em água destilada) foram adicionados a 0,5 mL de CBFP (na concentração de 500 µg/mL). Esta solução foi incubada no escuro durante 5 min. Subsequentemente, 2,0 mL de carbonato de sódio aquoso a 14% (Na₂CO₃) foram adicionados e incubados à temperatura ambiente, durante 120 min, protegidos da luz. A absorbância foi mensurada a 760 nm utilizando um espectrofotômetro T70 UV/Vis (*PG Instruments Limited*, Leicestershire, UK). O ácido gálico (0,0004 – 0,0217 mg/mL) foi utilizado para construção da curva padrão de calibração. O teor de compostos fenólicos presentes na CBFP foi expresso em mg equivalente ao ácido gálico (GAE)/g de polpa. Foram realizados três ensaios independentes em triplicatas.

2.3.2. Flavonoides totais

Para determinação dos teores de flavonoides na CBFP uma solução etanólica de hexa-hidrato de cloreto de alumínio a 2% (AlCl₃.6H₂O) (4,5 mL) foi adicionada a 0,5 mL de polpa (na concentração de 500 µg/mL) e esta solução foi mantida no escuro durante 30 min em temperatura ambiente. Subsequentemente, as absorbâncias foram mensuradas a 415 nm (espectrofotômetro T70 UV/Vis, *PG Instruments Limited*, Leicestershire, Reino Unido). Foi utilizado na preparação da curva de calibração o composto padrão quercetina (0,0004 – 0,0217 mg / mL). O conteúdo total de flavonoides na CBFP foi expresso em mg equivalente de quercetina (QE)/g de polpa. Foram realizados três ensaios independentes em triplicatas.

2.3.3. Determinação de compostos lipofílicos

Para a determinação dos compostos antioxidantes lipofílicos β-caroteno, licopeno e clorofila a e b foram utilizados (150 mg) da CBFP vigorosamente agitada em 10 mL de uma mistura acetona-hexano (4:6, v/v) por 1 min, posteriormente filtrada utilizando papel de filtro qualitativo *Whatman®* Grau 4. As absorbâncias do filtrado

foram mensuradas a 453, 505, 645 e 663 nm. Os teores de β -caroteno, licopeno e clorofila a e b foram calculados de acordo com equações matemáticas: 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 = $0,999 \times \text{Abs}663 - 0,0989 \times \text{Abs}645$ e Clorofila b = $-0,328 \times \text{Abs}663 + 1,77 \times \text{Abs}645$. Os resultados foram expressos em mg/100 g de CBFP. Foram realizados três ensaios independentes em triplicatas.

2.3.4. Determinação do ácido ascórbico

Para determinação da concentração de ácido ascórbico, 0,5 g de CBFP foi homogeneizada 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 de filtro qualitativo *Whatman*® Grau 4. O filtrado foi utilizado para titular uma solução do indicador DCFI (2,6-diclorofonolindofenol-sódio). A titulação foi finalizada pela presença da coloração rosa persistente por 15 s. O ácido ascórbico foi utilizado como controle padrão. Os resultados foram calculados com base na seguinte equação e expressos em mg de ácido ascórbico/100 g de CBFP:

$$\frac{\text{mgVit. C}}{100g_{\text{amostra}}} = \frac{\text{DCFI}_{\text{amostra}}}{\text{DCFI}_{\text{padrão}}} \times \frac{100}{M_{\text{amostra}}} \times \frac{(M_{\text{solvente}} + M_{\text{amostra}})}{m_{\text{polpa}}} \times \frac{50\text{mL}}{10\text{mL}} \times F$$

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

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_{polpa} 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). Foram realizados três experimentos independentes em triplicatas.

2.4. Atividade antioxidante in vitro

2.4.1. Atividade de captura do radical livre DPPH[•]

Para os experimentos, misturou-se 0,2 mL da CBFP (0,1 – 1000 µg / 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 min e protegida da luz. A absorvância foi mensurada a 517 nm. O ácido ascórbico e o BHT hidroxitolueno butilato (0,1 – 1000 µg/mL) foram utilizados como antioxidantes de referência (controles positivos). Foram realizados três ensaios independentes em triplicatas. 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 equação a seguir:

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

2.4.2. Ensaio de descoloração do radical ABTS^{•+}

Para os ensaios, o radical ABTS^{•+} foi preparado a partir da mistura 5 mL da solução de 2,2'-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) na concentração de 7 mM e 88 µL da solução de persulfato de potássio (140 mM). A mistura foi mantida durante 12-16 h em temperatura ambiente, protegida da luz. Em seguida, a solução foi diluída em etanol absoluto até obter uma absorvância de 0.70 ± 0.05 a 734 nm. Posteriormente, 20 µL da CBFP (0,1 – 1500 µg / mL) foi misturada com 1980 µL do radical ABTS^{•+}. A solução foi homogeneizada e incubada durante 6 min. em temperatura ambiente e protegida da luz. A absorvância 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 triplicatas. A curva de inibição foi preparada e os valores de IC₅₀ foram calculados. A porcentagem de inibição do ABTS^{•+} foi determinada de acordo com a seguinte equação:

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

2.4.3. Dano oxidativo induzido ao DNA

Para avaliar a capacidade antioxidante de CBFP contra danos no DNA, utilizou-se o ensaio de indução ao dano oxidativo ao plasmídeo. Resumidamente, a mistura de reação continha 4µL de solução salina tamponada com fosfato (PBS) e 50 ng/µL de plasmídeo pcDNA 3.1 + Gentamicin. Foram realizadas diluições de CBFP em PBS que variaram de 1 até 2000 µg/mL. Para os ensaios foram utilizados 4µL de CBFP (1- 2000 µg/mL), 4 µL de plasmídeo pcDNA 3.1 e 4µL de peróxido de hidrogênio (30%). As amostras foram incubadas no equipamento transiluminador (UVT- 312) a 302 nm, sob temperatura ambiente durante 5 min. Posteriormente, as amostras foram transferidas para o gel de agarose (2%) contendo brometo de etídio (10 mg/mL). Os controles positivos utilizados foram quercetina, catequina, ácido gálico e rutina. O gel foi digitalizado em fotodocumentador *Gel Doc™ EZ System* e analisado por *Software Image Lab™*. Os efeitos do CBFP foram expressos em porcentagem de DNA fragmentado. Foram realizados dois ensaios independentes.

2.5. Ensaios *in vivo*

2.5.1. Cepas e condições de manutenção de *C. elegans*

Para a realização dos ensaios *in vivo*, foram utilizados nematoides tipo selvagem N2 Bristol e as cepas *CL2006* (dvIs2 [pCL12(unc-54/human Aβ 1-42 minigene) + pRF4]); *CF1553* (muIs84 [(pAD76)sod-3p::GFP+rol-6(su1006)]) e *CL2166* (dvIs19 [(pAF15) *gst-4p::GFP::NLS*] III), obtidas do *Caenorhabditis* Genetics Center (CGC), Minnesota, EUA. A cepa *CL2006* possui o peptídeo Aβ₁₋₄₂ que expressa o gene promotor específico *unc-54*, conduzindo a paralisia muscular progressiva em nematoides adultos. Os nematoides foram mantidos em estufas incubadoras a 16 °C ou 20 °C, cultivados em placas de Petri contendo meio de cultura para crescimento *Nematode Growth Medium* (NGM) e alimentados com bactérias *Escherichia coli* (OP50) de acordo com BRENNER, 1974. As bactérias utilizadas como alimento para os nematoides foram inativadas com o antibiótico Canamicina (10mM).

A cultura de nematoides foi sincronizada com hipoclorito de sódio a 2% e hidróxido de sódio 5M. Nos ensaios de toxicidade aguda, os ovos resistentes à lise alcalina, foram coletados e transferidos para placas de Petri contendo meio de cultivo NGM e *E. coli* (OP50) até atingirem a fase L4. Para os demais ensaios, os ovos resistentes à lise alcalina foram coletados e transferidos para placas de Petri contendo

meio de cultivo NGM, *E. coli* (OP50) com água ou concentrações da CBFP (400 ou 1000 µg/mL) até atingirem a fase L4. O pré-tratamento consistiu em expor durante 30 min os nematoides sincronizados, em seus respectivos tratamentos, água (controle negativo) ou concentrações de CBFP (400 ou 1000 µg/mL) em meio M9.

2.5.2. Ensaio de Toxicidade aguda

Nestes ensaios, avaliamos o efeito tóxico da exposição aguda ao CBFP em nematoides N2. Em média 10 nematoides, sincronizados em fase L4, foram transferidos para microplacas de 96 poços contendo meio de cultura M9 (100 µL) e CBFP (100 µL) em diferentes concentrações (10 a 1000 µg/mL). Posteriormente, os nematoides foram incubados a 20 °C por 24 e 48 h. Como controle negativo, os nematoides foram incubados apenas com meio de cultura M9 (200 µL). Após o período de incubação, a viabilidade dos nematoides foi avaliada pela sensibilidade ao toque com auxílio de um fio de platina. Foram realizados três experimentos independentes em triplicatas.

2.5.3. Ensaio de capacidade reprodutiva

Para avaliar os efeitos de CBFP sobre a capacidade reprodutiva de nematoides, quantificamos o número de progênies viáveis durante o período reprodutivo de cinco dias. Nestes ensaios, após a sincronização, cinco nematoides L4 foram pré-tratados e transferidos diariamente para novas placas contendo meio NGM/*E. coli* (OP50) e água ou CBFP nas diferentes concentrações experimentais. O número de progênie foi avaliado em cada placa após alcançar a fase larval L3 ou L4. Os resultados estão expressos pela média de três ensaios independentes.

2.5.4. Ensaio de capacidade locomotora

A avaliação do efeito de CBFP sobre a capacidade locomotora foi realizada em duas fases do ciclo de vida dos nematoides, sendo a primeira fase foi de ovo até adulto jovem (dia 2 após L4) e a segunda fase foi de ovo até envelhecimento (dia 7 após L4). Para isto, após a sincronização, em média 10 nematoides na fase L4, foram transferidos diariamente para novas placas contendo seus respectivos tratamentos CBFP (400 ou 1000 µg/mL) até atingirem a primeira fase (adulto) ou a segunda fase (envelhecimento). Após estes períodos, os nematoides foram transferidos para novas placas contendo apenas meio de cultivo NGM, seguido da aclimatação durante 1 min e posterior

avaliação. Nas avaliações, foram quantificadas o número de curvaturas sinusoidais no período 30 s de locomoção. Foram realizados dois ensaios independentes em triplicatas.

2.5.5. Ensaio de paralisia induzida por β -amilóide

Nestes ensaios, avaliamos o efeito de CBFP sobre a paralisia progressiva induzida por β -amilóide utilizando cepas transgênicas *CL2006* para DA. Os ovos foram sincronizados em placas de Petri contendo apenas *NGM/E. coli* por 72 h, a 20 °C. Após isso, os nematoides foram pré-tratados em meio M9 contendo água ou CBFP (400 ou 1000 $\mu\text{g/mL}$) por um período de 1 h a 20 °C. Em seguida, 20 nematoides foram transferidos para novas placas de Petri de 35 mm contendo os respectivos tratamentos. Posteriormente, para iniciar a paralisia induzida por β -amilóide, os nematoides foram mantidos a 25 °C durante de 22 h. Após a indução da paralisia, as avaliações foram realizadas a cada 2 h, durante o período de 10 h. Os nematoides foram classificados como paralisados quanto a incapacidade de mover seus corpos quando estimulados por um fio de platina.

2.5.6. Ensaios de expectativa de vida

Nos ensaios de expectativa de vida foram utilizados nematoides N2 (L4) pré-tratados com água (controle negativo) ou CBFP (400 ou 1000 $\mu\text{g/mL}$). No primeiro dia da fase adulta L4 (dia 1), 20 nematoides por grupo foram transferidos para novas placas *NGM/E. coli* OP50 contendo seus respectivos tratamentos. Durante os seis primeiros dias, correspondentes ao período de reprodução, os nematoides foram transferidos diariamente para novas placas *NGM* contendo CBPF (400 ou 1000 $\mu\text{g/mL}$). A partir do 7^a dia, a transferência para novas placas ocorreu a cada dois dias. As avaliações consistiram em classificar os nematoides como mortos ou vivos até o dia de registro de morte do último nematoide. Os nematoides eram considerados mortos quando não se movimentavam com ou sem estímulo ao toque com um fio de platina. Nematoides com ovos eclodidos internamente ou não visualizados nas placas tiveram seus dados excluídos. Foram realizados dois ensaios independentes em triplicatas.

2.5.7. Ensaio de estresse térmico

Nos ensaios de proteção contra o estresse térmico, em média 20 nematoides (L4) foram pré-tratados e transferidos para novas placas contendo meio NGM/*E. coli* (OP50) e água ou CBFP (400 ou 1000 µg/mL). O estresse térmico foi induzido pelo aumento da temperatura de cultivo de 20 °C para 37 °C, e avaliado a cada hora de exposição pelo período experimental de 6 h. A viabilidade dos nematoides expostos a 37 °C nos diferentes períodos de incubação foi confirmada após o período de recuperação de 16 h a 20 °C, pela sensibilidade ao toque utilizando um fio de platina. Foram realizados três ensaios independentes em triplicatas.

2.5.8. Ensaio de estresse oxidativo

Os ensaios de proteção contra o estresse oxidativo foram realizados por exposição dos nematoides ao agente oxidante Juglone (5-Hydroxy-1,4-naphthoquinone) em concentração letal (250 µM). Após a sincronização, em média 10 nematoides (L4), foram pré-tratados e transferidos para microplacas de 96 poços contendo 100 µL de meio de cultura M9, 100 µL da CBFP (400 ou 1000 µg/mL) e 50 µL de Juglone. Como controles, os nematoides previamente incubados com água, foram expostos a 250 µL meio de cultura M9 (controle negativo) ou 200 µL de meio M9 mais 50 µl Juglone (controle positivo). Todas as microplacas foram incubadas a 20 °C e a viabilidade dos nematoides avaliada a cada hora pelo período experimental de 6h. A viabilidade dos nematoides foi confirmada pela sensibilidade ao toque utilizando um fio de platina. Foram realizados três ensaios independentes em triplicatas.

2.5.9. Expressão de SOD-3 e GST-4 marcadas com GFP

Para analisar a expressão das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD-3) e glutathione S-transferase (GST-4), foram utilizadas as cepas marcadas com GFP (CF1553 e CL2166). Após a sincronização, cinco nematoides (L4) pré-tratados foram transferidos para lâminas de microscópio contendo levamisole 1mM como anestésico. Em seguida, realizadas as capturas das imagens utilizando um microscópio de epifluorescência (Nikon Eclipse 50i) conectado a câmera digital (Samsung ST64). Imagens de cinco nematoides por grupo foram expressas como média de pixels e a fluorescência relativa utilizando o software ImageJ. Foram realizados três ensaios independentes em triplicatas.

2.6. Análise estatística

Utilizamos o software GraphPad Prism 5.1 (San Diego, CA, EUA) para realizar as análises estatísticas. Os dados são expressos como a média \pm erro padrão da média (SEM). Diferenças significativas entre os grupos foram determinadas usando o teste *t* de Student para comparação entre dois grupos e análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Dunnett para comparação de dois ou mais grupos. Para os ensaios de expectativa de vida, utilizou-se a curva de Kaplan-Meier e os valores de *P* foram calculados pelo teste Log-rank. Os resultados foram considerados significativos quando $P < 0.05$.

3. Resultados

3.1. Rendimento e identificação de compostos bioativos de CBFP

O rendimento obtido da polpa *in natura* após o processo de liofilização foi de 43,73%. As concentrações dos compostos bioativos presentes em CBFP estão apresentadas na **Tabela 1**, não foi possível detectar o composto β -caroteno.

Tabela 1. Compostos bioativos presentes em CBFP.

Amostra	Compostos	Flavonoides ¹	Licopeno	Clorofila a	Clorofila b	Ácido
	mg de AGE/100g	mg de QE/100g	mg/g	μ g/g	μ g/g	mg/100g
CBFP	572,25 \pm 0,14	160,80 \pm 0,09	1,87 \pm 0,19	3,29 \pm 0,349	5,52 \pm 0,58	600,22 \pm 6,54

¹ Os resultados são expressos como média \pm SEM. N.D.: não detectado.

3.2. Atividades antioxidantes *in vitro* de CBFP

A avaliação da atividade antioxidante *in vitro* de CBFP, representada pela concentração capaz de inibir 50% (IC₅₀) dos radicais DPPH[•] e ABTS^{•+}, esta apresentada na Tabela 2. O CBFP foi mais eficiente na captura do radical ABTS^{•+} em relação ao radical DPPH[•], apresentando o IC₅₀ aproximadamente 1,60 vezes menor.

Tabela 2. Atividade antioxidante de CBPF via captura dos radicais DPPH[•] e ABTS^{•+}.

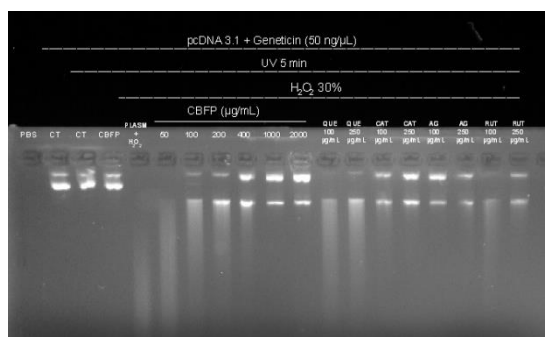
Amostras	DPPH [•]	ABTS ^{•+}
	IC ₅₀ (μg/mL)	IC ₅₀ (μg/mL)
Ácido ascórbico	2,65 ± 0,20	1,43 ± 0,09
BHT	14,58 ± 2,15	10,15 ± 0,94
CBFP	394,70 ± 25,9	245,35 ± 4,95

Os resultados são expressos como média ± SEM.

3.3. CBFP protege contra o dano oxidativo induzido ao DNA

Na **Fig. 1**, o tratamento com agente oxidante H₂O₂ e radiação UV fragmentou completamente o DNA. Observamos que CBPF exibiu efeito protetor de maneira dose dependente contra a indução de danos ao DNA.

A)



B)

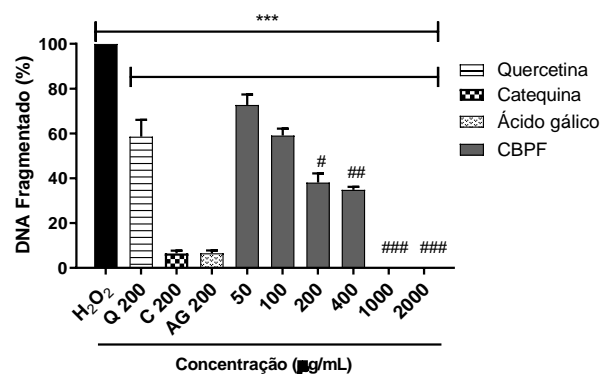


Fig. 1. (A) Eletroforese em gel de agarose de pcDNA3.1 protegido por CBPF ou danificado por H₂O₂ e radiação UV. (B) Percentagem de DNA fragmentado expostos ao dano com H₂O₂ e tratados com os respectivos controles positivos e CBPF (50 a 2000 μg/ml). *** $p < 0.001$ grupo tratado foi comparado com o grupo controle (H₂O₂); # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ e ### $p < 0.001$ grupos tratados comparados com o grupo controle positivo (Quercetina 200 μg/ml).

3.4. Ensaios *in vivo*

3.4.1. CBFP não promove efeitos tóxicos em *C. elegans*

Neste ensaio preliminar avaliamos *in vivo* a toxicidade de CBFP, em nematoides expostos a condição de tratamento agudo. Nas **Fig. 2A e B**, não foram observados efeitos tóxicos nas concentrações testadas (0,01 a 1 mg/mL). A partir destes resultados definimos com segurança as concentrações para os próximos ensaios.

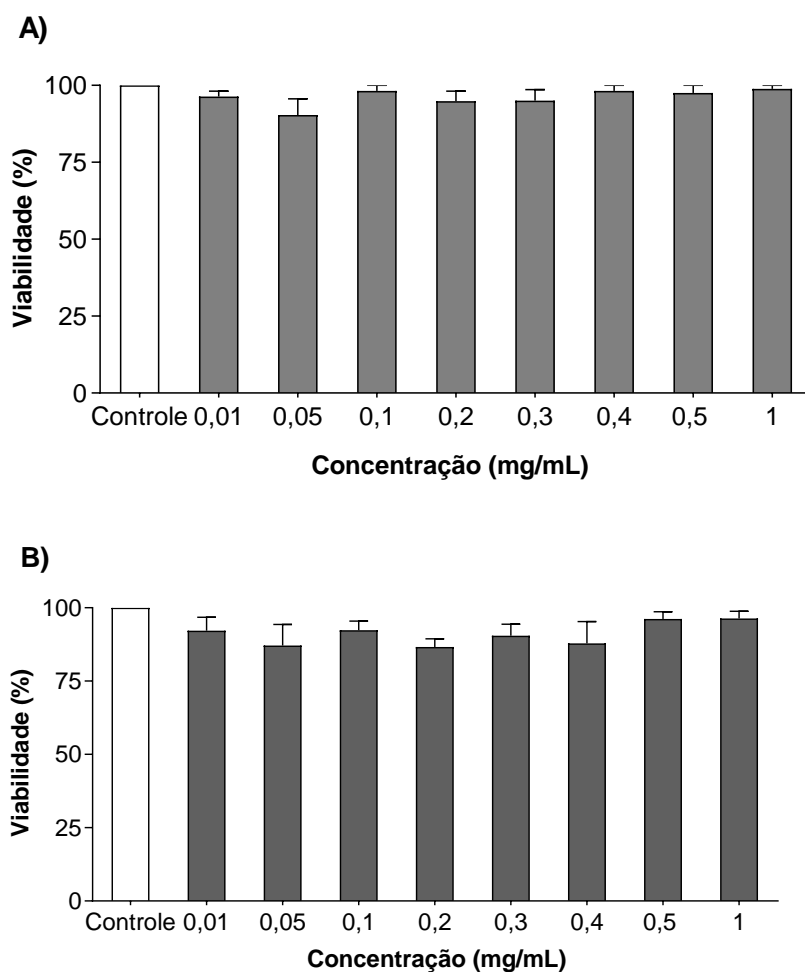


Fig. 2. Toxicidade aguda do CBFP no modelo experimental *in vivo* *C. elegans*. **(A)** Período de 24 h. **(B)** Período de 48 h. * $p < 0.05$ grupo tratado versus grupo controle (M9).

3.4.2. CBFP Promove qualidade de vida em *C. elegans*

Para investigar os efeitos de CBFP na qualidade de vida, avaliamos os indicadores que representam o padrão fisiológico saudável, sendo eles, a capacidade reprodutiva, capacidade locomoção e longevidade em *C. elegans*.

Nas avaliações dos efeitos de CBFP sobre o número de progênies viáveis dos nematoides observamos que as concentrações avaliadas de CBFP não promoveram alterações no número diário ou total de progênies viáveis (**Fig. 3A e B**). Estes resultados indicam que os tratamentos com as diferentes concentrações de CBFP não apresentam efeitos tóxicos que interfiram nos padrões fisiológicos da capacidade reprodutiva dos nematoides.

O período de envelhecimento de nematoides envelhecem é marcado pela a diminuição progressiva da mobilidade, assim a locomoção foi analisada durante fases distintas do ciclo de vida que inclui o processo de envelhecimento. Observamos que os tratamentos com CBPF promoveu aumento na motilidade dos nematoides durante a fase jovem adulto (**Fig. 3C e D**). O efeito benéfico sobre a motilidade dos nematoides tratados foi surpreendentemente notável durante a fase de envelhecimento (**Fig. 3D**). O CBFP (400 e 1000 $\mu\text{g/mL}$) demonstrou efeito semelhante durante o envelhecimento, os números de curvaturas corporais foram de $12,20 \pm 0,50$ e $14,00 \pm 0,74$, respectivamente, e quando comparados ao grupo controle expressaram melhora em 22,61% e 40,70% do número de curvaturas corporais. Quando comparado com a condição do grupo controle, o CBPF inibiu significativamente o declínio da capacidade locomotora ocorrido com a idade, principalmente no período que corresponde a fase de envelhecimento.

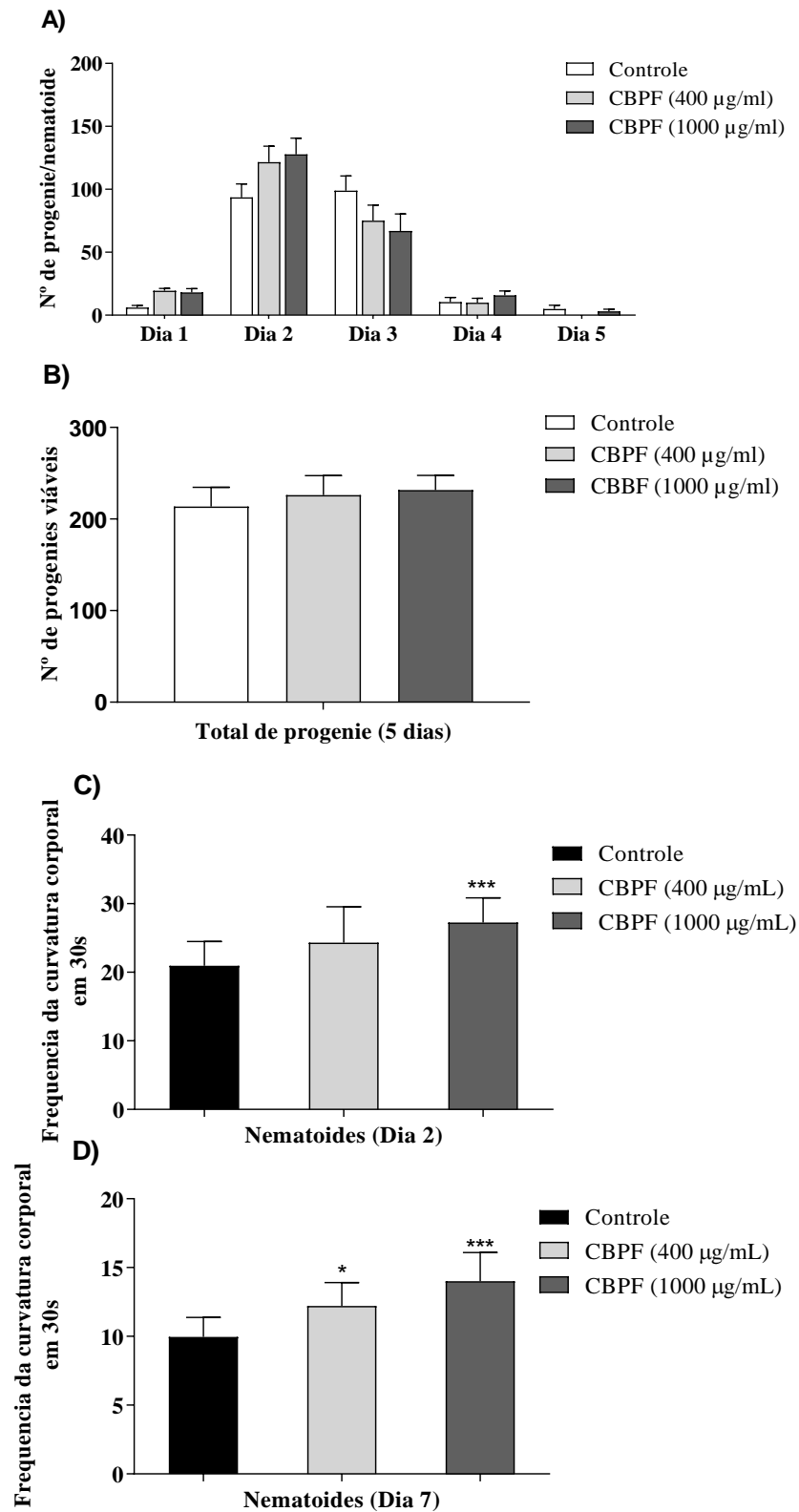


Fig. 3. Efeitos de CBPF na qualidade e vida de *C. elegans*. **(A)** Quantificação diária do número de progênie tratadas com CBPF. **(B)** Quantificação total do número de progênie tratados com CBPF durante 5 dias. **(C)** Capacidade de locomoção nas fases jovem adulto e **(D)** envelhecimento. Os valores são expressos como média \pm EPM. * $p < 0.05$ e *** $p < 0.001$ quando o grupo tratado foi comparado com o grupo controle.

Avaliamos os efeitos de CBPF na expectativa de vida dos nematoides, observamos que o grupo controle viveram $16 \pm 1,0$ dias (máximo de 25 dias), enquanto os tratamentos com CBPF (400 ou 1000 $\mu\text{g} / \text{mL}$), o tempo médio de vida aumentou para $17 \pm 2,0$ dias (máximo de 27 dias) e $17 \pm 3,0$ dias (máximo de 30 dias), respectivamente (**Fig. 4**). De acordo com os resultados, as concentrações avaliadas exibiram perfil sobrevivência semelhantes, houve aumento significativo correspondente a 6,25% no tempo máximo de vida para ambas as concentrações, em comparação ao grupo controle (**Tabela S1**).

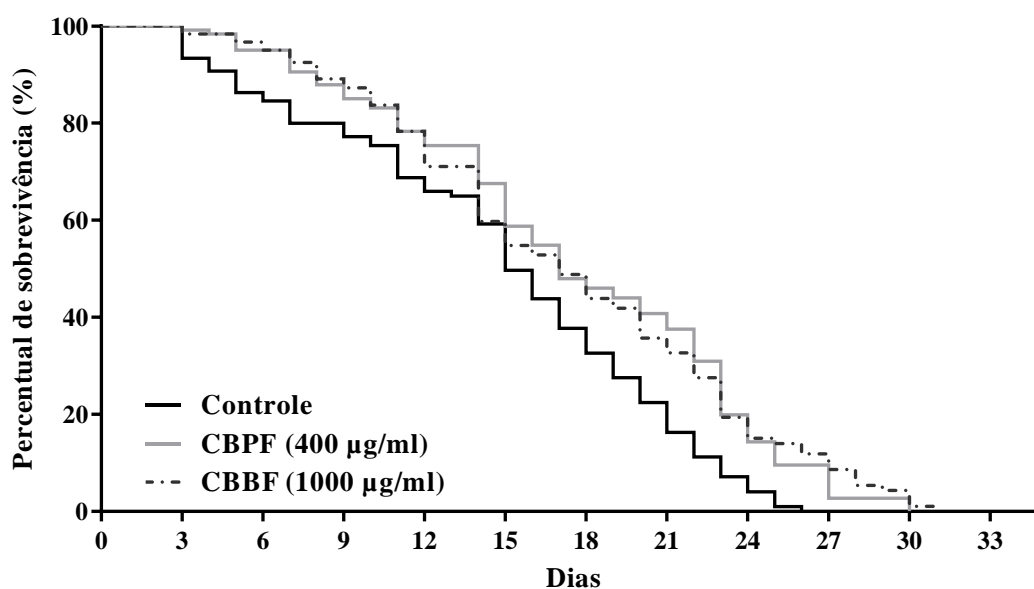


Fig. 4. Efeitos de CBPF sobre a longevidade de *C. elegans*. Foram realizados dois ensaios independentes.

Tabela S1. Análise dos efeitos dos tratamentos CBPF na expectativa média de vida e na extensão de vida em *C.elegans*.

	Tratamento ($\mu\text{g} / \text{mL}$)	Expectativa de vida média (Dias)	Extensão máxima de vida (%)	Log-rank Test vs. Control	Nº total de nematoides
Controle	0	$16 \pm 1,0$	-	-	120
CBPF	400	$17,0 \pm 2,0$	6,25	<0.001**	120
CBPF	1000	$17,0 \pm 3,0$	6,25	<0.001**	120

3.4.3. CBPF atrasa a paralisia induzida por β - amiloide (β A)

Os resultados dos efeitos de CBPF estão representados em curvas de paralisia e apresentados na **Fig. 5**. Os tratamentos com CBPF promovem atrasos significativos na paralisia induzida em 27,5% dos nematoides tratados (400 μ g/mL) e 39,17% quando tratados na maior concentração avaliada (1000 μ g/mL). Estes resultados indicam que os tratamentos com CBPF podem atuar em mecanismos que minimizam a toxicidade causada pelo peptídeo β A.

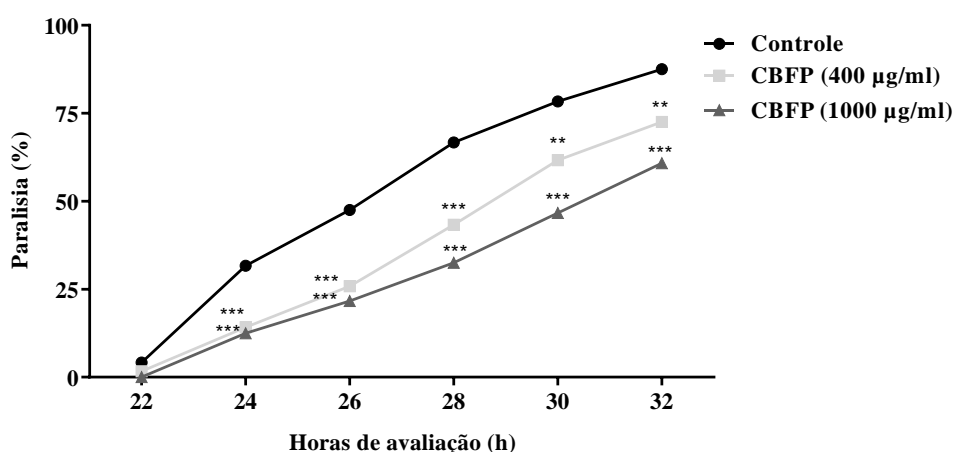


Fig. 5. Curva de paralisia induzida em *C. elegans* (CL2006) tratados com CBPF. Foram realizados três ensaios independentes. ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$ quando os grupos tratados foram comparados com o grupo controle.

3.4.4. CBPF promove proteção contra os estresses térmico e oxidativo

A **Figura 6** apresenta os efeitos de CBPF em nematoides expostos às condições adversas de estresse térmico e estresse oxidativo. O efeito protetor contra o estresse térmico foi observado nos nematoides tratados com CBPF na segunda e terceira hora de avaliação (**Fig. 6A**). Na segunda hora, a porcentagem de nematoides viáveis, foi de 48,7% para o grupo controle e de 65,8% e 71,6% para os grupos tratados com 400 e 1000 μ g/mL de CBPF, respectivamente. Na terceira hora de avaliação, a concentração 1000 μ g/mL foi capaz de manter 62,8% dos nematoides viáveis, enquanto no grupo controle apenas 28,0% dos nematoides encontravam-se viáveis. Entretanto, o CBPF não foi capaz de proteger os nematoides por longos períodos de exposição ao estresse térmico.

Na **Fig. 6B**, observamos que a menor concentração (400 µg/mL) de CBPF promoveu significativo efeito protetor a partir da segunda hora de exposição. Neste ensaio não foi possível observar o efeito do tratamento na concentração 1000 µg/mL devido a intensa coloração obtida da solução Juglone + CBPF (1000 µg/mL). Observamos que a menor concentração avaliada (400 µg/mL) exibiu efeito protetor a partir do período correspondente a 2 h e os percentuais de nematoides viáveis estão apresentados na **Tabela S2**.

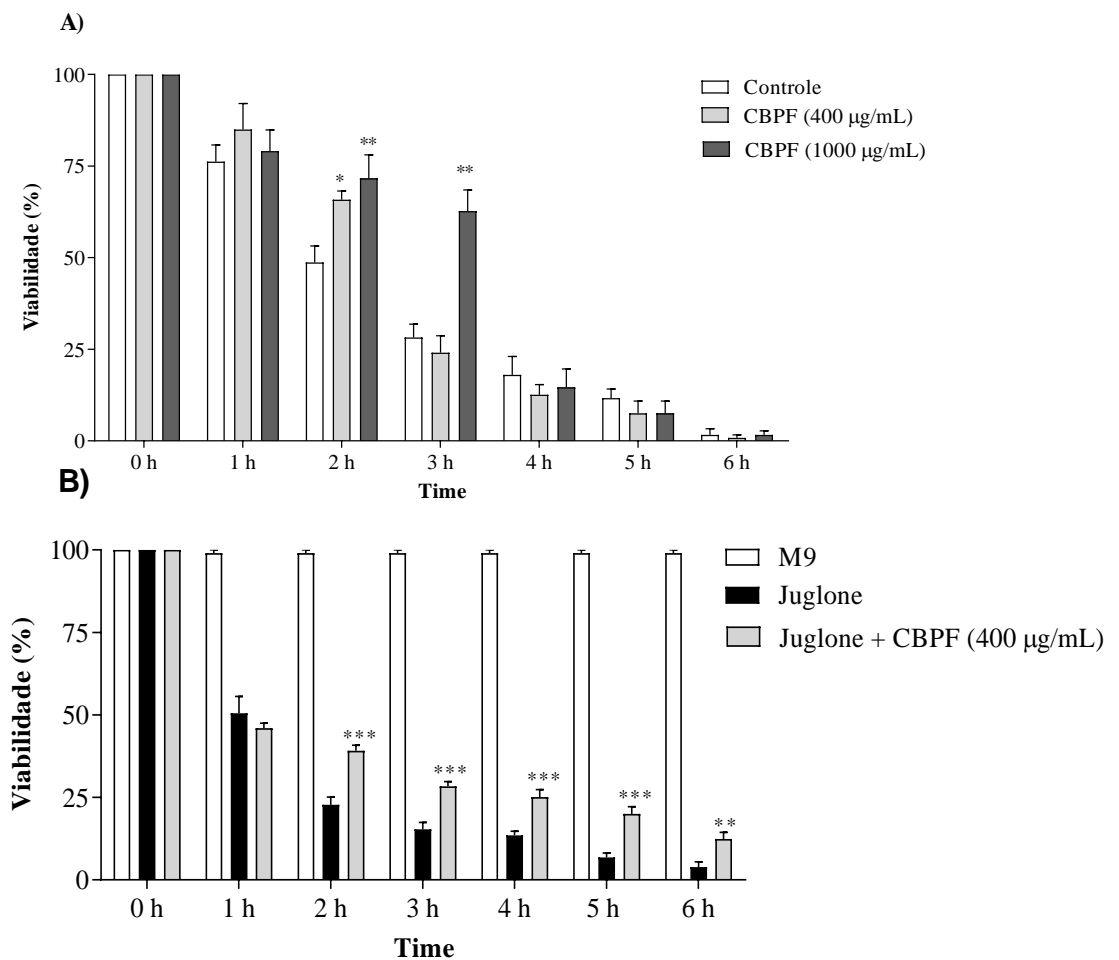


Fig. 6. Efeito de CBPF frente ao estresse térmico e estresse oxidativo. **(A)** Efeito protetor de CBPF em *C. elegans* expostos a 37 ° C durante 6 h. **(B)** Efeito protetor de CBPF em *C. elegans* submetido ao reagente pró-oxidante Juglone durante 6 h. Os valores são expressos como média ± EPM * $p < 0.05$ e ** $p < 0.01$ em comparação ao grupo controle.

Tabela S2. Análise da viabilidade de *C. elegans* expostos ao estresse oxidativo.

Horas	Juglone		Juglone + CBPF (400 µg / mL)	
	<i>(pró-oxidante)</i>		<i>(pro-oxidante + antioxidante)</i>	
	Viabilidade %	SEM	Viabilidade %	SEM
0	100,00	0,00	100,00	0,00
1	50,47	5,14	45,99	1,52
2	22,76	2,34	39,13	1,64
3	15,34	2,11	28,37	1,42
4	13,46	1,26	25,12	2,21
5	6,80	1,35	20,01	2,16
6	3,91	1,59	12,38	2,05

3.4.6. CBPF regula a expressão de genes antioxidantes

Para demonstrar os efeitos na modulação de genes alvos relacionados ao sistema antioxidante, utilizamos as cepas transgênicas CF1553 (SOD-3::GFP) e CL2166 (GST-4::GFP). Observamos na **Fig. 8A** que não houve aumento na expressão de SOD-3 em cepas CF1553 tratadas com CBPF (400 ou 1000 µg/mL), quando comparados com o grupo controle, indicando que as condições basais foram mantidas. Já as cepas CL2166 (GST-4::GFP) tratados com CBPF (400 µg/mL), regulou negativamente a expressão de GST-4 (**Fig. 8B**). Estudos futuros serão investigados diferentes genes alvos que atuam em sistemas de defesa antioxidante, tais como as catalases (CTL-1 e CTL-2) e chaperonas (hsp16.2).

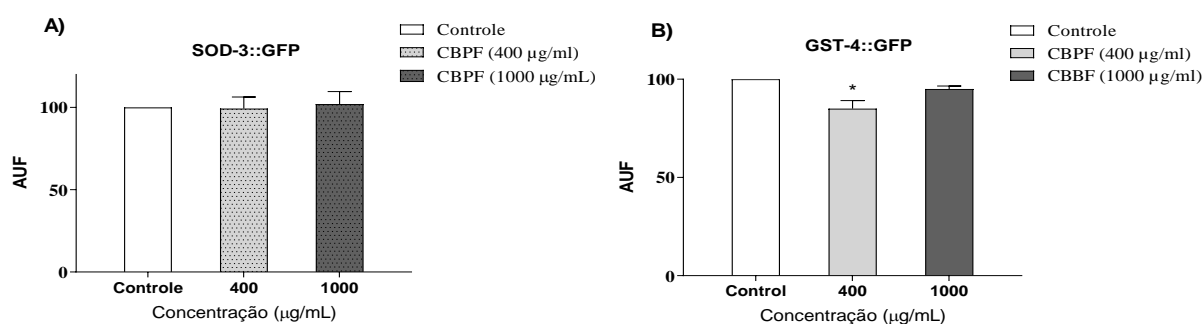


Fig 8. Expressão de enzimas antioxidantes em *C. elegans* tratados com CBPF. **(A)** Expressão de SOD-3::GFP (CF1553 [sod-3p::GFP]). **(B)** expressão de GST-4::GFP (CL 2166 [gst-4p:GFP]) em nematoides tratados com a polpa do fruto de *C. brasiliense* (CBPF). Os valores são expressos como média ± EPM. * $p < 0.05$ quando o grupo tratado foi comparado com o grupo controle.

4. Discussão

Diversas espécies frutíferas nativas da biodiversidade brasileira demonstram potencialidade para o desenvolvimento de novos alimentos funcionais e nutracêuticos com princípios ativos de importância terapêutica e reduzida toxicidade.

No presente estudo, utilizamos a polpa liofilizada do fruto nativo *C. brasiliense* e identificamos relevantes compostos bioativos preservados. A atividade antioxidante *in vitro* de CBPF foi demonstrada através da captura direta dos radicais DPPH[•] e ABST^{•+}. Associamos a atividade antioxidante com a presença dos constituintes fitoquímicos quantificados, entre eles, os compostos fenólicos, flavonoides, licopeno, clorofilas a e b e ácido ascórbico. Na literatura científica, está bem elucidado que os compostos identificados em CBPF são efetivos antioxidantes. Conforme observado por Ozsoy et al. 2009, que correlacionaram compostos naturais de plantas, incluindo fenóis, flavonoides, carotenoides e o ácido ascórbico com a atividade antioxidante. Nesta mesma perspectiva, Zhang et al. 2015, atribuíram aos compostos fenólicos de frutos com a atividade antioxidante contra os radicais livres DPPH[•] e ABST^{•+}, além do poder redutor de metais tóxicos. Na triagem fitoquímica realizada por Lay et al., 2014, diferentes extratos de frutos de *P. macrocarpa* apresentaram em sua constituição compostos fenóis, flavonóides, saponina glicosídeos e taninos, nos quais foram associados a atividade antioxidante. Já o composto licopeno foi avaliado quanto ao seu efeito antioxidante no estudo de Jiang et al. (2016); assim como, as clorofilas utilizadas no estudo de Müller et al., (2007). Entre os mecanismos de ação via compostos antioxidantes, é frequentemente descrita a captura direta de radicais, onde compostos antioxidantes que possuem em suas estruturas, grupos de hidroxilas livres são capazes de doar elétrons e ou átomos de hidrogênio a outras moléculas instáveis e reativas, tais como, os radicais livres e assim reduzir o dano oxidativo em biomoléculas (Li et al., 2013).

A exposição contínua a espécies reativas e aos radicais livres promove oxidação de lipídios e proteínas das membranas celulares, além de danos oxidativos no DNA. Desta maneira, o acúmulo de danos no DNA, desencadeia processos de mutagênese, que tem sido associado à oncogênese, ao envelhecimento e ainda, ao surgimento de doenças relacionadas à idade, incluindo, as doenças metabólicas e a Doença de Alzheimer (Shimizu et al., 2014 e Kwiatkowski, et al., 2016).

Neste sentido, investigamos os efeitos da atividade antioxidante de CBPF em DNA plasmidial sob condições de estresse oxidativo induzido. O CBPF demonstrou capacidade de proteger o DNA contra o dano oxidativo de maneira dose dependente. A proteção contra o dano ao DNA promovida pelo CBPF pode ser associada aos mecanismos diretos via captura de espécies reativas produzidas pelo peróxido de hidrogênio e assim neutralizar radicais hidroxilas (Kapoor & Dharmesh, 2016). Outros mecanismos de ação, também são descritos, como mecanismos indiretos via modulação de sistemas antioxidantes endógenos, tais como, as vias enzimáticas que atuam na prevenção do dano oxidativo celular (Davalli et al., 2018).

Pela primeira vez, as propriedades antioxidantes de CBPF foram demonstradas *in vivo* no modelo biológico *C. elegans*. Inicialmente, realizamos a exposição aguda ao CBPF em diferentes concentrações e não observamos efeitos tóxicos sobre a viabilidade dos nematoides tratados. Estes resultados corroboram com os efeitos demonstrados em estudos com *C. elegans*, avaliando diferentes extratos de frutos consumidos popularmente, tais como, Guaraná (Boasquívivis et al., 2018); Romã (Barathikannan et al., 2016) e Cranberry (Hong et al., 2016).

Recentemente, a espécie *C. brasiliense* foi descrita como um alimento medicinal (Nascimento-Silva & Naves, 2019b) e foram relatados diversos efeitos benéficos para saúde, incluindo analgésico, anti-inflamatório e antioxidante. Contudo, até o presente momento apenas um estudo investigou os efeitos neuroprotetores da parte vegetal consumida popularmente de *C. brasiliense* contra doenças neurodegenerativas como a doença de Alzheimer. No estudo, De Oliveira et al. 2018^b, foi demonstrado que extratos de folhas de *C. brasiliense* exibiram propriedades anticolinesterásicas e antioxidantes. Considerando o potencial neuroprotetor e antioxidante desta planta, e ainda a escassez de estudos *in vivo*, utilizamos o *C. elegans* como modelo para avaliar os efeitos protetores de CBPF contra a toxicidade de β -amiloide promotor da paralisia em nematoides transgênicos para Doença de Alzheimer.

Demostramos que CBPF promove os efeitos benéficos *in vivo*, incluindo o atraso da paralisia induzida por β -amiloide e a melhoria da locomoção em diferentes fases do ciclo de vida, sem apresentar alterações no número de progênies viáveis em *C. elegans*. Neste sentido, evidenciamos que o declínio nas funções relacionadas ao processo de envelhecimento, como a capacidade reprodutiva e movimento corporal foram efetivamente atrasados nos nematoides tratados, indicando que CBPF também

poderia melhorar a qualidade de vida dos nematoides envelhecidos. Além disso, a longevidade foi mediada por CBPF observada pela a extensão da expectativa média e máxima de vida dos nematoides tratados.

Sequencialmente, investigamos a capacidade antioxidante de CBPF frente a condições de estresse induzidos por alta temperatura ou agente pró-oxidante. Observamos que CBPF promove efeitos protetores em *C. elegans* expostos à alta temperatura por um período de três horas. Entretanto, em condição de estresse oxidativo, o CBPF demonstrou efeito protetor mais efetivo. Efeito similar foi demonstrado por Thabit et al. 2019, ao investigarem a atividade antioxidante de frutos asiáticos ricos em compostos fenólicos, os autores não observaram o aumento da tolerância térmica, contudo quando os nematoides que foram expostos ao estresse oxidativo, ocorreu expressiva melhora na taxa de sobrevivência. Os autores atribuíram os efeitos da atividade antioxidante aos mecanismos de captura direta de espécies reativas de oxigênio (ROS) e regulação da expressão de genes envolvidos em vias de sinalização de defesa.

Em *C. elegans*, as vias DAF-16/IGF-1 (IIS), SKN-1/Nrf, e HSF-1/HSF, modulam a expressão de genes envolvidos em respostas ao estresse térmico e oxidativo e contribuem para o aumento da expectativa de vida e longevidade, além disso, estes mecanismos são altamente conservados em mamíferos, incluindo humanos (Sun et al., 2017; Blackwell et al., 2015 and Kumsta et al., 2017). O DAF-16 é um fator de transcrição chave para a longevidade e sua localização nuclear é um pré-requisito necessário para a ativação transcricional de um amplo espectro de genes-alvos, tais como as enzimas antioxidantes CTL-1 e SOD-3. Já em condições de estresse o fator transcricional SKN-1 regula a expressão de genes de detoxificação de Fase II, entre eles, os genes *gcs-1* e *gst-4*. Em condições normais, SKN-1 associa-se à proteína WDR-23 e ao complexo proteico da ubiquitina ligase CUL-4/DDB, promovendo sua degradação pelo sistema proteassômico (Tang et al., 2015). Contudo, também foi descrito que isoformas nucleares e citoplasmáticas de WDR-23 mediam efeitos diferenciais em SKN-1 e consequentemente modulam a regulação negativa de expressão de genes de detoxificação de Fase II (Spatola et al., 2019).

Assim, para entender os mecanismos subjacentes pelos quais o CBPF exerce efeitos benéficos em *C. elegans*, avaliamos os níveis de expressão de SOD-3 e GST-4, relacionados ao mecanismo de defesa antioxidante. Nosso estudo revelou que CBPF

não alterou a expressão de SOD-3 e regulou negativamente a expressão de GST-4. Podemos sugerir que ao regular negativamente GST-4, SKN-1 poderia ser o mecanismo necessário para estender a expectativa de vida e aumentar a resistência ao estresse. Entretanto, tem sido elucidado que compostos fitoquímicos, atuam através de ativação de vias de respostas celulares distintas, além disso, diferentes genes podem atuar em mecanismos como reguladores da longevidade, seja através da regulação negativa da via da insulina DAF-2/ (IIS) ou pela ativação direta do fator transcricional DAF-16 (Zeng et al., 2019). E ainda, as vias “horméticas” também são ativadas por fitoquímicos, incluindo diferentes quinases e fatores transcricionais que induzem a expressão de genes codificadores de enzimas antioxidantes, proteínas chaperonas, fatores neurotróficos e outras proteínas citoprotetoras (Calabrese et al., 2011). Exemplos específicos de tais vias estão as vias de sinalização de NF- κ B, Nrf-2/ARE, FOXO, sirtuínas, que poderão ser o alvo de estudos futuros envolvendo compostos presentes em CBPF.

Em conclusão, este estudo sobre um fruto pequi encontrado no Cerrado brasileiro, demonstra pela primeira vez os efeitos que compostos antioxidantes promovem no modelo *in vivo* *C. elegans*. Acreditamos no potencial desta espécie vegetal para futuros estudos bioprospectivos na busca por moléculas promotoras de saúde e capazes de prevenir doenças relacionadas ao processo oxidativo.

Referências Bibliográficas

- Bailão, E., Devilla, I., da Conceição, E., & Borges, L. (2015). Bioactive compounds found in Brazilian Cerrado fruits. *International Journal of Molecular Sciences*, *16*(10), 23760-23783. <https://doi.org/10.3390/ijms161023760>.
- Barathikannan, K., Venkatadri, B., Khusro, A., Al-Dhabi, N. A., Agastian, P., Arasu, M. V., Choi, H. S. & Kim, Y. O. (2016). Chemical analysis of *Punica granatum* fruit peel and its *in vitro* and *in vivo* biological properties. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, *16*(264). <https://doi.org/10.1186/s12906-016-1237-3>
- Blackwell, T. K., Steinbaugh, M. J., Hourihan, J. M., Ewald, C. Y., & Isik, M. (2015). SKN-1/Nrf, stress responses, and aging in *Caenorhabditis elegans*. *Free Radical Biology and Medicine*, *88*, 290-301. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.06.008>.
- Boasquíviz, P. F., Silva, G. M. M., Paiva, F. A., Cavalcanti, R. M., Nunez, C. V., & de Paula Oliveira, R. Guarana (*Paullinia cupana*) extract protects *Caenorhabditis elegans* models for Alzheimer disease and Huntington disease through activation of antioxidant and protein degradation pathways. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2018*. <https://doi.org/10.1155/2018/9241308>.
- BRENNER, S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, *77*(1), p.71-94, 1974. <http://www.genetics.org/content/77/1/71.abstract>.
- Davalli P., Marverti G., Lauriola A., D'Arca D. (2018). Targeting Oxidatively Induced DNA Damage Response in Cancer: Opportunities for Novel Cancer Therapies. *Oxidative Medicine Cell Longevity*. <https://doi.org/10.1155/2018/2389523>.
- De Oliveira, T. S., Thomaz, D. V., da Silva Neri, H. F., Cerqueira, L. B., Garcia, L. F., Gil, H. P. V., ... & de Souza Gil, E. (2018a,b). Neuroprotective Effect of *Caryocar brasiliense* Camb. Leaves Is Associated with Anticholinesterase and Antioxidant

Properties. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/9842908>.

Calabrese, V., Cornelius, C., Cuzzocrea, S., Iavicoli, I., Rizzarelli, E., & Calabrese, E. J. (2011). Hormesis, cellular stress response and vitagenes as critical determinants in aging and longevity. *Molecular Aspects of Medicine*, 32(4-6), 279-304. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2011.10.007>.

Hong, G., Yu-Qing, D. O. N. G., & Bo-Ping, Y. (2016). Cranberry extract supplementation exerts preventive effects through alleviating A β toxicity in *Caenorhabditis elegans* model of Alzheimer's disease. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 14(6), 427-433. [https://doi.org/10.1016/S1875-5364\(16\)30039-5](https://doi.org/10.1016/S1875-5364(16)30039-5).

Jiang, T., Sun, Q., & Chen, S. (2016). Oxidative stress: A major pathogenesis and potential therapeutic target of antioxidative agents in Parkinson's disease and Alzheimer's disease. *Progress in Neurobiology*, 147, 1-19. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2016.07.005>.

Jiang, W., Guo, M. H., & Hai, X. (2016). Hepatoprotective and antioxidant effects of lycopene on non-alcoholic fatty liver disease in rat. *World Journal of Gastroenterology*, 22(46), 10180. <https://dx.doi.org/10.3748%2Fwjg.v22.i46.10180>.

Jorge, A., Leitão, M. M., Bernal, L. P. T., Dos, E. S., Kuraoka-Oliveira, Â. M., Justi, P., ... & Kassuya, C. A. L. (2019). Analgesic and anti-inflammatory effects of *Caryocar brasiliense*. *Anti-inflammatory & Anti-allergy agents in Medicinal Chemistry*, 2019. <https://doi.org/10.2174/1871523018666190408144320>.

Leão, D. P., Franca, A. S., Oliveira, L. S., Bastos, R., & Coimbra, M. A. (2017). Physicochemical characterization, antioxidant capacity, total phenolic and proanthocyanidin content of flours prepared from pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) fruit by-products. *Food Chemistry*, 225, 146-153. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.01.027>.

Miranda, A., Gomez-Gaete, C., & Mennickent, S. (2017). Role of Mediterranean diet on the prevention of Alzheimer disease. *Revista Medica de Chile*, *145*(4), 501-507. <https://doi.org/10.4067/S0034-98872017000400010>.

Müller, T., Ulrich, M., Ongania, K. H., & Kräutler, B. (2007). Colorless tetrapyrrolic chlorophyll catabolites found in ripening fruit are effective antioxidants. *Angewandte Chemie International Edition*, *46*(45), 8699-8702. <https://doi.org/10.1002/anie.200703587>.

Kapoor, S., & Dharmesh, S. M. (2016). Physiologically induced changes in bound phenolics and antioxidants, DNA/cytoprotective potentials in pectic poly/oligosaccharides of tomato (*Solanum lycopersicum*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *96*(15), 4874-4884. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7696>.

Kumsta, C., Chang, J. T., Schmalz, J., & Hansen, M. (2017). Hormetic heat stress and HSF-1 induce autophagy to improve survival and proteostasis in *C. elegans*. *Nature Communications*, *8*, 14337. <https://doi.org/10.1038/ncomms14337>.

Kwiatkowski, D., Czarny, P., Toma, M., Jurkowska, N., Sliwinska, A., Drzewoski, J., ... & Su, K. P. (2016). Associations between DNA damage, DNA base excision repair gene variability and Alzheimer's disease risk. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders*, *41*(3-4), 152-171. <https://doi.org/10.1159/000443953>.

Lay, M. M., Karsani, S. A., Mohajer, S., & Malek, S. N. A. (2014). Phytochemical constituents, nutritional values, phenolics, flavonols, flavonoids, antioxidant and cytotoxicity studies on *Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl fruits. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, *14*(1), 152. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-14-152>.

Li, X., Chen, W., & Chen, D. (2013). Protective effect against hydroxyl-induced DNA damage and antioxidant activity of *Radix Glycyrrhizae* (Liquorice Root). *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, *3*(1), 167. <https://dx.doi.org/10.5681%2Fapb.2013.028>.

Nascimento-Silva, N. R. R. D., & Naves, M. M. V. (2019a,b). Potential of Whole Pequi (*Caryocar* spp.) Fruit—Pulp, Almond, Oil, and Shell—as a Medicinal Food. *Journal of Medicinal Food*, 22(9). <https://doi.org/10.1089/jmf.2018.0149>.

Ozsoy, N., Candoken, E., & Akev, N. (2009). Implications for degenerative disorders: Antioxidative activity, total phenols, flavonoids, ascorbic acid, β -carotene and β -tocopherol in *Aloe vera*. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2(2), 99-106. E-publication: <http://www.landesbioscience.com/journals/oximed/article/8493>.

Palmeira, S. M., Silva, P. R., Ferrão, J. S., Ladd, A. A., Dagli, M. L., Grisolia, C. K., & Hernandez-Blazquez, F. J. (2016). Chemopreventive effects of pequi oil (*Caryocar brasiliense* Camb.) on preneoplastic lesions in a mouse model of hepatocarcinogenesis. *European Journal of Cancer Prevention*, 25(4), 299-305. <https://doi.org/10.1097/CEJ.0000000000000187>.

Roll, M. M., Miranda-Vilela, A. L., Longo, J. P. F., Agostini-Costa, T. D. S., & Grisolia, C. K. (2018). The pequi pulp oil (*Caryocar brasiliense* Camb.) provides protection against aging-related anemia, inflammation and oxidative stress in Swiss mice, especially in females. *Genetics and Molecular Biology*, 41(4), 858-869. <http://dx.doi.org/10.1590/1678-4685-gmb-2017-0218>.

Spatola, B. N., Lo, J. Y., Wang, B., & Curran, S. P. (2019). Nuclear and cytoplasmic WDR-23 isoforms mediate differential effects on GEN-1 and SKN-1 substrates. *Scientific Reports*, 9(1), 1-11. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-48286-y>.

Shimizu, I., Yoshida, Y., Suda, M., & Minamino, T. (2014). DNA damage response and metabolic disease. *Cell Metabolism*, 20(6), 967-977. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.10.008>.

Sun, X., Chen, W. D., & Wang, Y. D. (2017). DAF-16/FOXO transcription factor in aging and longevity. *Frontiers in Pharmacology*, 8, 548. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00548>.

Thabit, S., Handoussa, H., Roxo, M., Cestari de Azevedo, B., SE El Sayed, N., & Wink, M. (2019). *Styphnolobium japonicum* (L.) Schott Fruits Increase Stress Resistance and Exert Antioxidant Properties in *Caenorhabditis elegans* and Mouse Models. *Molecules*, *24*(14), 2633. <https://doi.org/10.3390/molecules24142633>.

Tang, L., & Choe, K. P. (2015). Characterization of *skn-1/wdr-23* phenotypes in *Caenorhabditis elegans*; pleiotrophy, aging, glutathione, and interactions with other longevity pathways. *Mechanisms of Ageing and Development*, *149*, 88-98. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2015.06.001>.

Traesel, G. K., Menegati, S. E. L. T., dos Santos, A. C., Souza, R. I. C., Boas, G. R. V., Justi, P. N., ... & Oesterreich, S. A. (2016). Oral acute and subchronic toxicity studies of the oil extracted from pequi (*Caryocar brasiliense*, Camb.) pulp in rats. *Food and Chemical Toxicology*, *97*, 224-231. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2016.09.018>.

Zeng, L., Sun, C., Pei, Z., Yun, T., Fan, S., Long, S., ... & Xu, F. (2019). *Liangyi Gao* extends lifespan and exerts an antiaging effect in *Caenorhabditis elegans* by modulating DAF-16/FOXO. *Biogerontology*, *20*(5): 665-676. <https://doi.org/10.1007/s10522-019-09820-7>.

Zhang, W., Zhao, X., Sun, C., Li, X., & Chen, K. (2015). Phenolic composition from different loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.) cultivars grown in China and their antioxidant properties. *Molecules*, *20*(1), 542–555. <https://doi.org/10.3390/molecules20010542>.

6. CONCLUSÃO GERAL

O presente estudo demonstra resultados científicos inéditos sobre a composição química, propriedades antioxidantes (*in vitro* e *in vivo*), parâmetros toxicológicos e efeitos biológicos de frutos nativos do bioma Cerrado pertencentes às espécies *C. adamantium*, *H. speciosa* Gomes e *C. brasiliense*. Em conjunto, nossos resultados demonstraram que os frutos, apresentam grande variedade de compostos químicos e ausência de toxicidade em um importante modelo de experimentação animal. Os tratamentos com os frutos promoveram efeitos protetores contra os estresses térmico e oxidativo, e aumentaram a expectativa de vida em *C. elegans* via captura direta de radicais livres, modulação da expressão das enzimas antioxidantes superóxido dismutase e glutathione S transferase e ativação do fator transcricional DAF-16. Demonstramos assim, o potencial biológico das espécies frutíferas nativas do bioma Cerrado brasileiro, incluindo os efeitos antienvhecimento e anti- Alzheimer. Além disso, obtivemos o registro de patente (BR 10 2019 023140 8) gerado a partir do processo metodológico descrito para obtenção das polpas dos frutos nativos, contribuindo para a divulgação da biodiversidade e inovação tecnológica do país.

