

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS – UFGD
FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E AMBIENTAIS – FCBA
BIOTECNOLOGIA – BACHARELADO

SARAH KEILA CERQUEIRA BRAGA

**ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DAS FOLHAS DE *Eugenia uniflora* E REDUÇÃO DO
ESTRESSE OXIDATIVO EM MODELO PRÉ-CLÍNICO *Caenorhabditis elegans***

DOURADOS, MS

2024

SARAH KEILA CERQUEIRA BRAGA

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DAS FOLHAS DE *Eugenia uniflora* E REDUÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO EM MODELO PRÉ-CLÍNICO *Caenorhabditis elegans*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Universidade Federal da Grande Dourados, como parte dos requisitos para obtenção do título em Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Edson Lucas dos Santos

Coorientador: Prof^ª Dr^ª Kely de Picoli Souza

DOURADOS, MS
2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

B813a Braga, Sarah Keila Cerqueira
ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DAS FOLHAS DE *Eugenia uniflora* E REDUÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO EM MODELO PRÉ-CLÍNICO *Caenorhabditis elegans* [recurso eletrônico] / Sarah Keila Cerqueira Braga. -- 2024.
Arquivo em formato pdf.

Orientador: Edson Lucas dos Santos.
Coorientadora: Kely de Picoli Souza.
TCC (Graduação em Biotecnologia)-Universidade Federal da Grande Dourados, 2024.
Disponível no Repositório Institucional da UFGD em:
<https://portal.ufgd.edu.br/setor/biblioteca/repositorio>

1. pitangueira. 2. biodiversidade. 3. radical livre. I. Santos, Edson Lucas Dos. II. Souza, Kely De Picoli. III. Título.

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

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

SARAH KEILA CERQUEIRA BRAGA

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DAS FOLHAS DE *Eugenia uniflora* E REDUÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO EM MODELO PRÉ-CLÍNICO *Caenorhabditis elegans*

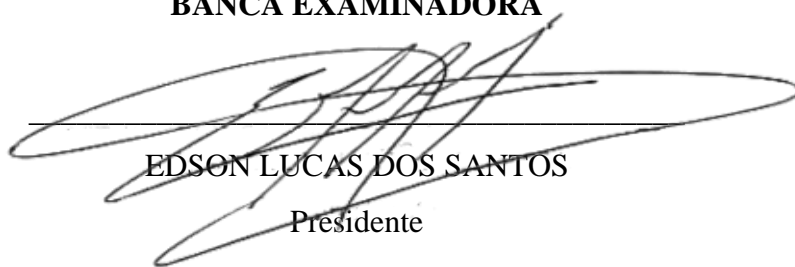
Trabalho de Conclusão de Curso aprovado pela Banca Examinadora como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia, da Universidade Federal da Grande Dourados.

Orientador: Prof. Dr. Edson Lucas dos Santos

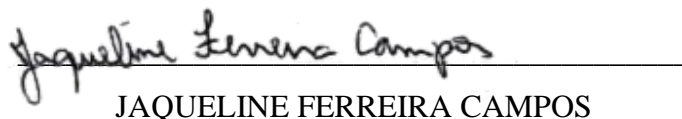
Coorientador: Prof^a Dr^a Kely de Picoli Souza

Aprovado em: 28 de novembro de 2024

BANCA EXAMINADORA

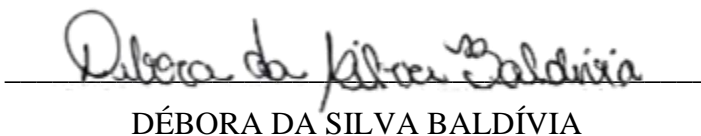


EDSON LUCAS DOS SANTOS
Presidente



JAQUELINE FERREIRA CAMPOS

Membro



DÉBORA DA SILVA BALDÍVIA

Membro

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DAS FOLHAS DE *Eugenia uniflora* E REDUÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO EM MODELO PRÉ-CLÍNICO *Caenorhabditis elegans*

RESUMO

O acúmulo de produtos da oxidação compromete diversas estruturas celulares e está relacionado ao desenvolvimento de doenças crônicas. Quando há um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e os mecanismos antioxidantes, ocorre o estresse oxidativo, que induz processos deletérios nas principais biomoléculas do organismo. Antioxidantes, tanto endógenos quanto exógenos, neutralizam essas EROs, desempenhando um papel essencial na prevenção e redução dos danos oxidativos e das doenças relacionadas. Neste contexto, o presente estudo concentrou-se em avaliar a atividade antioxidante, toxicidade e resistência ao estresse oxidativo de *Eugenia uniflora*. Para essa finalidade, utilizou-se as folhas como material vegetal para o preparo do extrato hidroetanólico de *E. uniflora* (EHEu). A partir do EHEu, foram investigadas sua toxicidade sub-crônica em modelo *in vivo* *Caenorhabditis elegans* e atividade antioxidante, *in vivo* e *in vitro*. O EHEu apresentou alterações toxicológicas em *C. elegans* nas maiores concentrações analisadas, gerando dados iniciais sobre a segurança do extrato. Quanto ao potencial antioxidante do EHEu *in vivo*, o EHEu reduziu o impacto do agente pró-oxidante juglone na viabilidade de *C. elegans*. *In vitro*, o extrato foi capaz de decrescer a redução de Fe³⁺ para Fe²⁺ no ensaio de poder redutor férrico. De forma conjunta, este estudo amplia a compreensão sobre o potencial antioxidante das folhas de *Eugenia uniflora*.

Palavras-chave: pitangueira; biodiversidade; radical livre

ANTIOXIDANT ACTIVITY OF *Eugenia uniflora* LEAVES AND REDUCTION OF OXIDATIVE STRESS IN THE PRE-CLINICAL MODEL *Caenorhabditis elegans*

ABSTRACT

The accumulation of oxidation products compromises several cellular structures and is related to the development of chronic diseases. When there is an imbalance between the production of reactive oxygen species (ROS) and antioxidant mechanisms, oxidative stress occurs, which induces deleterious processes in the main biomolecules of the organism. Antioxidants, both endogenous and exogenous, neutralize these ROS, playing an essential role in the prevention and reduction of oxidative damage and related diseases. In this context, the present study focused on evaluating the antioxidant activity, toxicity and resistance to oxidative stress of *Eugenia uniflora*. For this purpose, the leaves were used as plant material for the preparation of the hydroethanolic extract of *E. uniflora* (EHEu). From EHEu, its sub-chronic toxicity in an in vivo *Caenorhabditis elegans* model and antioxidant activity, in vitro and in vivo, were investigated. EHEu presented toxicological alterations in *C. elegans* at the highest concentrations analyzed, generating initial data on the safety of the extract. Regarding the antioxidant potential of EHEu in vitro, the extract was able to decrease the reduction of Fe³⁺ to Fe²⁺ in the ferric reducing power assay. In vivo, EHEu reduced the impact of the pro-oxidant agent juglone on the viability of *C. elegans*. Together, this study expands the understanding of the antioxidant potential of *Eugenia uniflora* leaves.

Keywords: pitanga; biodiversity; free radical

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1. Diagrama de energia dos orbitais do átomo de oxigênio.

Figura 2. Geração de EROs na mitocôndria.

Figura 3. Principais antioxidantes no sistema humano.

Figura 4. Ação da glutathiona peroxidase-1, catalase e superóxido dismutase.

Figura 5. *Eugenia uniflora*.

Figura 6. Folhas de *Eugenia uniflora*.

Figura 7. Floração de *Eugenia uniflora*.

Figura 8. Nematóide *Caenorhabditis elegans*.

Figura 9. Ciclo de vida do *Caenorhabditis elegans*.

Figura 10. Toxicidade em *C. elegans*. Viabilidade dos nematoides é expressa em porcentagem, os indivíduos foram expostos ao meio M9 (Controle) e a diferentes concentrações de EHEu (31,25 - 2000 µg/mL), após 24 h (A) e 48 h (B) de incubação. Os valores são expressos como a média ± EPM de três experimentos independentes, realizados em triplicata.

Figura 11. Ensaio de estresse oxidativo induzido por Juglone. Viabilidade dos nematoides expressa em porcentagem expostos ao meio M9 (CT), ao pro-oxidante juglone (250 µM) (CTJ) e a diferentes concentrações de EHEu (31,25 - 1000 µg/mL) com juglone (250 µM). Experimento foi realizado durante 6 horas, com verificações a cada hora. Os valores são expressos como a média ± EPM de três experimentos independentes, realizados em triplicata.

Tabela 1. Ensaio antioxidante FRAP para o extrato e antioxidantes padrão.

LISTA DE SIGLAS

$^1\text{O}_2$ – oxigênio singleto

AA – ácido ascórbico

ADP – adenosina difosfato

ANOVA – análise univariada de variância

ATP – adenosina trifosfato

AU – ácido úrico

B.O.D. – Biochemical Oxygen Demand (demanda bioquímica de oxigênio)

BHT – hidroxitolueno butilado

C – carbono

CAT – catalase

CoQ – coenzima Q

CTJ – controle juglone

Cu – cobre

DCNT – doenças crônicas não transmissíveis

DNA – ácido desoxirribonucleico

EC₅₀ – concentração efetiva

EHEu – extrato hidroetanólico das folhas de *Eugenia uniflora*

EPM – erro padrão da média

EROs – espécies reativas de oxigênio

ERNs - espécies reativas de nitrogênio

Fe – ferro

Fe³⁺ – íon férrico

Fe²⁺ – íon ferroso

(NH₄)₂Fe(SO₄)₂·6H₂O – sulfato de ferro e amônio

FRAP – poder redutor férrico
GPx – glutathiona peroxidase
GPx1 – glutathiona peroxidase 1
H – hidrogênio
H₂O – água
H₂O₂ – peróxido de hidrogênio
HOCl – ácido hipocloroso
Juglone – 5-hidroxi-1,4-naftoquinona
LPS – lipopolissacarídeos
M – molar
Mb - megabases
NADPH – fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina
NaOH – hidróxido de sódio
NGM – Nematode Growth Medium (meio de crescimento de nematoides)
nmol – nanomol
NOX4 - nadph oxidase 4
O₂ – oxigênio
O₂^{•-} – ânion superóxido
OH⁻ – ânion hidroxila
•OH – radical hidroxila
RL – radical livre
RE – retículo endoplasmático
RENISUS – Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde
SOD – superóxido dismutase
TPTZ – 2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazina
Trx – tioredoxina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. JUSTIFICATIVA	12
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
3.1 Estresse oxidativo	13
3.2 Espécies reativas: Radicalares e não radicalares	13
3.2.1 Fontes endógenas.....	15
3.2.1 Fontes exógenas.....	16
3.3 Mecanismos de defesa antioxidantes.....	18
3.3.1 Antioxidantes endógenos enzimáticos.....	18
3.3.2 Antioxidantes endógenos não enzimáticos.....	20
3.3.2 Antioxidantes exógenos.....	21
3.4 <i>Eugenia uniflora</i>	22
3.5 <i>Caenorhabditis elegans</i>	24
4. OBJETIVOS	26
4.1 Objetivo geral	26
4.2 Objetivos específicos	26
5. MATERIAL E MÉTODOS	26
5.1 Coleta do material vegetal e preparo do extrato	26
5.2 Ensaios <i>in vitro</i> : Ensaio do poder redutor férrico (FRAP)	27
5.3 Ensaios <i>in vivo</i> : Linhagens e manutenção de <i>Caenorhabditis elegans</i>	27
5.3.1 Ensaio de toxicidade aguda	28
5.3.2 Ensaio de estresse oxidativo induzido por Juglone	28
5.4 Análises estatísticas	29
6. RESULTADOS	29
6.1 Toxicidade no modelo <i>in vivo</i> <i>C. elegans</i>	29
6.2 Ensaio <i>in vitro</i> FRAP.....	30
6.3 Proteção contra o estresse oxidativo induzido por juglone	31
7. DISCUSSÃO	32
8. CONCLUSÃO.....	34
9. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	35

1. INTRODUÇÃO

O oxigênio é uma molécula essencial para a sobrevivência da maioria dos seres vivos, desempenhando um papel fundamental em diversos processos biológicos. No entanto, essa molécula está associada ao desenvolvimento radicais livres (RL) que são estruturas químicas contendo um ou mais elétrons desemparelhados. Esses RLs podem ser classificados em espécies reativas de oxigênio (EROs) e como espécies reativas de nitrogênio (ERN) (Nangami, 2015).

Nos seres humanos, o acúmulo de produtos gerados pela oxidação, combinado com o desequilíbrio nos mecanismos antioxidantes endógenos, pode comprometer diversas estruturas celulares, levando ao chamado estresse oxidativo (Baquero, *et al.*, 2019). Essa condição está associada ao desenvolvimento de doenças crônicas e degenerativas (Radi R, 2018). Sendo assim, os antioxidantes desempenham um papel importante na prevenção e no tratamento de doenças relacionadas ao estresse oxidativo, neutralizando os efeitos prejudiciais das espécies reativas de oxigênio (Neha et al., 2019). Os sistemas antioxidantes endógenos incluem enzimas como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutatona peroxidases (GPxs) e tioredoxina (Trx), além de antioxidantes não enzimáticos, como tióis, melatonina, ácido úrico, bilirrubina e coenzima Q10, que juntos contribuem para reduzir o estado oxidativo (Farrar et al., 2019). Já os antioxidantes exógenos são encontrados em diversas plantas, incluindo carotenoides, vitaminas A e C, e flavonoides (Petruk et al., 2019; Neha et al., 2019).

As plantas produzem compostos provenientes dos metabolismos primário e secundário. Os metabólitos primários são essenciais para o crescimento, desenvolvimento e manutenção das funções vitais da planta, suprimindo suas necessidades para a sobrevivência, como a produção de energia, síntese de proteínas e crescimento celular. Enquanto, os metabólitos secundários, como os compostos fenólicos, estão principalmente relacionados à defesa da planta, mas também desempenham outras funções importantes, como atração de polinizadores, proteção contra herbívoros e adaptação a condições ambientais adversas (Borges, 2020). Os compostos fenólicos têm ação antioxidante, uma vez que, envolvem-se na eliminação de EROs (Lyu, *et al.*, 2020). Devido a bioatividade de algumas plantas, mostra-se promissor na elucidação de novos fármacos naturais (Sá-Filho, *et al.*, 2021) para o tratamento de doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) que incluem doenças inflamatórias, câncer, diabetes e distúrbios imunológicos (Gleddie, *et al.*, 2018).

Nesse cenário, a bioprospecção frente à diversidade de plantas acontece através de uma busca sistemática, levando em consideração o bioma do seu habitat natural, condições abióticas

e bióticas, a fim de explorar seus potenciais naturais. Isso se deve ao fato de que fatores como clima, tipo de solo, disponibilidade de água, interação com outros organismos e adaptações ao ambiente influenciam diretamente a composição química das plantas e a produção de metabólitos bioativos (Chaguturu R, 2022). O Brasil, por possuir a maior biodiversidade do mundo, destaca-se como abrigo de diversas plantas medicinais, como *Eugenia uniflora*, *Stryphnodendron adstringens* e *Senna velutina* (Baldivia et al., 2019; Sabeh et al., 2020).

Devido a essa rica biodiversidade, aumenta o potencial de estudos fitoquímicos com o intuito de identificar os compostos bioativos e comprovar sua eficácia, visando o desenvolvimento de novos medicamentos (Barbalho, et al., 2019). A *Eugenia uniflora*, popularmente conhecida de pitangueira, é uma planta que faz parte da família Myrtaceae e é nativa do Brasil. Ela é reconhecida como uma fonte natural de compostos bioativos. Recentemente, um estudo revelou que espécies pertencentes à família Myrtaceae possuem propriedades antioxidantes significativas (Oliveira, et al., 2022), resulta em um interesse crescente por parte da comunidade científica (Ferreira, et al., 2023).

Considerando a presença de compostos bioativos como flavonoides, taninos e ácidos fenólicos, a *Eugenia uniflora* destaca-se como uma candidata promissora para o tratamento de doenças crônicas não transmissíveis. Para investigar suas propriedades terapêuticas, é essencial utilizar abordagens acessíveis e eficientes que permitam validar seu potencial. Nesse contexto, o modelo pré-clínico *Caenorhabditis elegans* tem sido amplamente empregado, esse nematoide possui fácil cultivo, ciclo de vida curto e genes responsáveis pela codificação de proteínas que são fortemente conservados, apresentando cerca de 60% de similaridade com os genes humanos. Essas características tornam o *C. elegans* uma ferramenta valiosa na investigação de doenças crônicas e na avaliação de possíveis tratamentos (Como et al., 2018; Lu et al., 2018).

2. JUSTIFICATIVA

A condição de estresse oxidativo, que está associada a uma ampla variedade de doenças, pode ser causa primária ou um contribuinte secundário para a progressão dessas patologias (Forman et al., 2021). Para combater esse estresse, encontram-se antioxidantes, que possuem origens distintas, podem ser produzidos no corpo humano, obtidos através da dieta ou ser moléculas sintéticas (Jiménez-Morales et al., 2024). Considerando esse contexto, pesquisas têm investigado as propriedades antioxidantes de compostos vegetais no tratamento de doenças. Entre as opções terapêuticas, as plantas medicinais se destacam devido às suas atividades

biológicas, com menos efeitos adversos e custos mais acessíveis para a saúde pública. O gênero *Eugenia* é amplamente utilizado na medicina popular para tratar uma variedade de condições, incluindo feridas, gripe, febre, tosse, gota, hipertensão, doenças digestivas e hepáticas, reumatismo, amigdalite, dor de garganta, hemorroidas e diarreia (Fidelis *et al.*, 2023).

O Brasil oferece um enorme potencial para a bioprospecção de plantas com propriedades medicinais, visando o desenvolvimento de produtos farmacêuticos. O uso sustentável desses recursos pode promover o desenvolvimento de novos medicamentos e tratamentos para diversas doenças (Bruno *et al.*, 2021), uma vez que, diversos estudos sobre plantas medicinais do Cerrado revelaram que os extratos vegetais brutos ou derivados possuem propriedades antioxidantes (Dos Santos *et al.*, 2024). Pesquisas farmacológicas recentes indicam que os compostos bioativos do gênero *Eugenia* exibem atividades anti-inflamatórias, antioxidantes e antidiabéticas. Extratos de *Eugenia uniflora* contêm uma variedade de metabólitos secundários, incluindo terpenoides, carotenoides, antocianinas, taninos e flavonoides (Sabeh *et al.*, 2020).

Dado o uso tradicional da espécie no tratamento de diversas patologias, este estudo visa investigar a ação dos metabólitos presentes nas folhas de *Eugenia uniflora*, com foco em suas propriedades antioxidantes. Esta espécie apresenta um grande potencial para o desenvolvimento de novos medicamentos e outros produtos biotecnológicos.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Estresse oxidativo

A obtenção de energia nos organismos vivos ocorre por meio da oxidação de moléculas orgânicas, depende de um fluxo contínuo de reações químicas conduzidas pelas células (Alberts B, 2017). Durante essas reações, EROs são formados e, em condições normais, seus níveis são controlados por mecanismos de defesa celular. No entanto, em determinadas circunstâncias, a produção de oxidantes pode aumentar, causando um desequilíbrio que reduz a ação das enzimas antioxidantes ou pela ineficácia do sistema de regulação celular em manter a homeostase redox, levando o organismo a um estado de estresse oxidativo (Junior *et al.*, 2018). Esse desequilíbrio pode resultar em modificações nas biomoléculas, contribuindo para o desenvolvimento de doenças crônicas (Iordache *et al.*, 2021).

3.2 Espécies reativas: Radicalares e não radicalares

A geração de espécies reativas no organismo humano constitui um processo fisiológico normal, que atuam na transferência de elétrons e nas reações bioquímicas. O radical livre é uma estrutura química que possui um ou mais elétrons desemparelhados na camada de valência, tornando-o instável. Essa instabilidade pode danificar ácidos nucleicos, lipídios e proteínas, alterando suas funções biológicas (Prevedello M, 2021).

Apesar desse potencial dano, as EROs em quantidade moderada, mostram um efeito significativo na proteção contra infecções (Husain N, 2012). Esses níveis basais fazem parte da função normal e não excedem o limite entre a biologia redox e os níveis citotóxicos (Mittler R, 2017). Elas são essenciais para a homeostase celular, sinalização e várias respostas biológicas, como as funções de diferenciação, migração e proliferação. Além disso, as espécies reativas de oxigênio são utilizadas na transdução de sinal que envolve citocinas (Gorrini C, 2013).

As EROs incluem não apenas radicais livres de oxigênio, mas também alguns não radicais (não possuem elétrons desemparelhados) como o peróxido de hidrogênio, derivados do oxigênio molecular (Figura 1). As espécies reativas de oxigênio são moléculas formadas pela redução parcial do oxigênio molecular (O_2). Os principais produtos das EROs gerados após a redução parcial do O_2 incluem o oxigênio singlete (1O_2), o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Em reações subsequentes, são formados o radical hidroxila ($OH\bullet$) e o ácido hipocloroso ($HOCl$) (Lambeth JD, 2007).

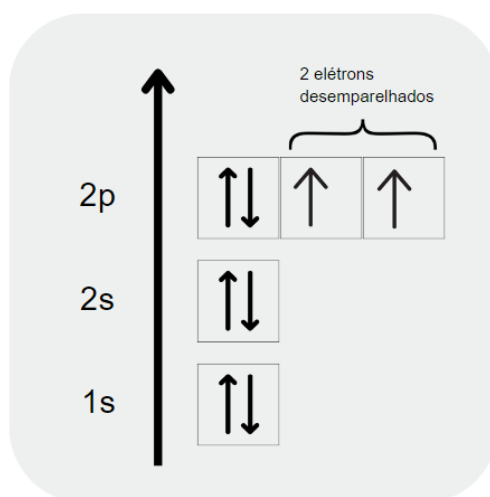


Figura 1. Diagrama de energia dos orbitais do átomo de oxigênio. **Adaptado de:** Lambeth JD, 2007.

O ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) contém um elétron desemparelhado e é uma espécie carregada negativamente que não se difunde através das membranas biológicas. Ele pode reagir rapidamente com aglomerados Fe-S, gerando H_2O_2 , com Fe^{2+} , formando OH^\bullet pela reação de Fenton, e com a superóxido dismutase (SOD), que converte $O_2^{\bullet-}$ em H_2O_2 e O_2 . A reação de Haber-Weiss, que inclui a reação de Fenton, utiliza Fe^{2+} para gerar o altamente reativo OH^\bullet quando $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 não são metabolizados.

O H_2O_2 não é um radical livre, sendo mais estável que o $O_2^{\bullet-}$ e capaz de atravessar as membranas, a sua produção está associada ao escape de elétrons da cadeia transportadora de elétrons, na membrana do retículo endoplasmático (RE) e pela NADPH oxidase NOX4. Outras fontes de H_2O_2 resultam da dismutação do $O_2^{\bullet-}$, seja espontaneamente ou enzimaticamente via superóxido dismutase (Egea *et al.*, 2020).

Neste contexto, as espécies reativas de oxigênio podem ser produzidos por fontes endógenas ou exógenas.

3.2.1 Fontes endógenas

Os mecanismos de geração de EROs ocorrem predominantemente nas mitocôndrias, nas membranas celulares e no citoplasma. Esses processos podem ser especialmente favorecidos pela presença de íons de ferro e cobre. A cadeia respiratória mitocondrial é essencial para a fosforilação oxidativa e desempenha um papel central no metabolismo energético celular. A mitocôndria, por meio da cadeia de transporte de elétrons, é a principal fonte de produção de EROs (Figura 2). As células têm uma necessidade constante de produzir ATP (adenosina trifosfato), que fornece energia para seus processos vitais. A maior parte desse ATP é gerada na mitocôndria, uma organela especializada na conversão de energia. Esse processo ocorre principalmente na matriz mitocondrial, onde ácidos graxos e piruvato, derivado da glicose, são oxidados. Além de produzir energia, as mitocôndrias desempenham um papel essencial no controle do potencial redox do citosol, contribuindo para a manutenção do equilíbrio celular. (Alberts B, 2017).

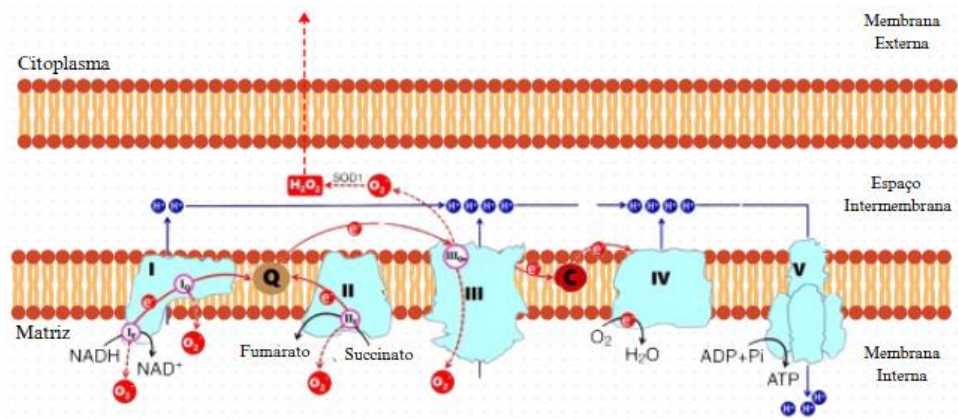
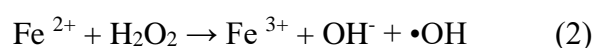
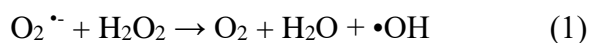


Figura 2. Geração de EROs na mitocôndria. Adaptado de: Zhao *et al.*, 2019.

A cadeia transportadora de elétrons, localizada na membrana mitocondrial interna, é composta por cinco complexos enzimáticos. Durante o metabolismo celular, o escape de elétrons nos complexos I (NADH desidrogenase) e III (citocromo c redutase) pode levar à geração de superóxido ($O_2^{\bullet-}$) pela redução parcial do oxigênio molecular (O_2). Nas mitocôndrias, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é formado como subproduto da dismutação do superóxido, enquanto em fagócitos ativados, H_2O_2 é gerado principalmente pela ação da enzima NADPH oxidase, contribuindo para a eliminação de microrganismos durante infecções. O superóxido ($O_2^{\bullet-}$) pode ser convertido em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pela ação da enzima superóxido dismutase através da reação de Haber-Weiss (Reação 1). Este peróxido de hidrogênio pode então ser transformado em outras espécies reativas de oxigênio, como radicais hidroxila ($\bullet OH$) e ânions hidroxila (OH^-), e finalmente em água pela ação da catalase e glutaciona peroxidase (GPx). Quando o peróxido de hidrogênio reage com Fe^{2+} na reação de Fenton (Reação 2), forma-se o radical hidroxila ($\bullet OH$), que pode levar à peroxidação lipídica, esse processo resulta no comprometimento das membranas celulares, formação de aldeídos tóxicos como o malondialdeído (MDA) e o 4-hidroxinonenal (4-HNE), e amplificação do estresse oxidativo, afetando a integridade e funcionalidade celular. (Carocho *et al.*, 2013).



Os íons de ferro e cobre são extremamente reativos em processos de óxido-redução, tornando-se potentes catalisadores na geração de radicais livres. Por exemplo, no citoplasma das células hepáticas, o ferro livre (não ligado à ferritina) dissocia-se facilmente na forma de

íon, tornando-se cataliticamente ativo e apto a participar de reações de óxido-redução, resultando na geração de radicais livres. Além disso, os ácidos graxos poli-insaturados presentes nas membranas celulares contribuem significativamente para que estas sejam potentes geradoras de radicais livres (Barbosa KBF, 2010).

Outra fonte significativa de radicais livres são as enzimas NADPH oxidases. Essas proteínas transmembrana têm a função principal de transferir elétrons através das membranas celulares. Normalmente, o acceptor de elétrons é o oxigênio, resultando na formação do radical superóxido ($O_2\cdot$). Existem pelo menos seis isoformas de NADPH, que diferem em termos de local de expressão e co-fatores necessários para sua ativação (Ganguly *et al.*, 2021).

3.2.2 Fontes exógenas

Os principais fatores exógenos que contribuem para o estresse oxidativo incluem: radiação, tratamentos anticancerígenos, tabagismo, consumo de álcool e algumas drogas. Além disso, o consumo de carne defumada e a uso de medicamentos contendo metais, como ciclosporina, bleomicina e gentamicina, também contribuem para a geração de EROs (Bhattacharyya *et al.*, 2014)

O tabagismo é uma fonte significativa de EROs e foi documentado que ele afeta o trato gastrointestinal. A fumaça do cigarro contém mais de 4 mil compostos, incluindo espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, que podem ter efeitos altamente prejudiciais sobre macromoléculas, especialmente nos lipídeos. Estima-se que uma única inalada de fumaça de cigarro contém radicais livres de diversas origens, incluindo aldeídos, quinonas, epóxidos, óxidos nítricos, entre outros (Bhattacharyya *et al.*, 2014). Da mesma forma, a carne vermelha, por seu alto teor de ferro, pode catalisar a formação de EROs. Além disso, os ácidos graxos trans, presentes em alimentos como “salgadinhos”, cereais e bolachas, são uma fonte adicional de EROs, devido à presença de acrilamida. Esta substância pode interagir com a hemoglobina e aumentar a produção de EROs (Jomova *et al.*, 2023).

Os xenobióticos, compostos químicos estranhos ao organismo humano que não são produzidos naturalmente pelo corpo, promovem a produção de EROs por meio do citocromo P-450 ou do ciclo redox. Nesse processo, um mediador de baixo peso molecular, geralmente o flavina adenina dinucleotídeo, atua como acceptor de elétrons do xenobiótico, transferindo esses elétrons sequencialmente para o oxigênio, o que resulta na formação de radicais superóxido. Além disso, anti-inflamatórios não esteroides induzem a geração desses radicais ao ativar a

NADPH oxidase, um complexo enzimático transmembrana responsável pela produção de radicais superóxido (Barbosa KBF, 2010).

A exposição prolongada à luz UV também pode aumentar a produção de EROs. Esse aumento ocorre quando as moléculas como citocromos, riboflavina, heme e porfirina, absorvem fótons, iniciando a geração de EROs. Essas moléculas excitadas reagem com o oxigênio, desencadeando respostas inflamatórias, queimaduras solares e envelhecimento precoce da pele. Além disso, os fótons UVB, devido à sua alta energia, podem ser diretamente absorvidos pelo DNA, promovendo o surgimento de lesões mutagênicas e aumentando o risco de câncer de pele (Chen *et al.*, 2021).

A radiação infravermelha, por sua vez, pode desregular a expressão genética das metaloproteinases da matriz, enzimas responsáveis pela degradação do colágeno e de outras proteínas da matriz extracelular. Como essa radiação é pouco absorvida pela melanina, o dano ocorre principalmente por meio das mitocôndrias e do citocromo C oxidase (Egambaram *et al.*, 2020).

Já a radiação ionizante libera elétrons rápidos com baixa transferência de energia. A interação fotoelétrica entre um fóton e um elétron ejetado gera radicais cátions de água, que são convertidos em $\bullet\text{OH}$ por transferência de prótons. As mitocôndrias também são suscetíveis a essa radiação, o que provoca disfunções mitocondriais, além de alterações no DNA nuclear e mitocondrial, e nas proteínas que o estabilizam, tornando o DNA mais vulnerável a danos causados por EROs, como deleções, mutações e outras consequências genéticas graves (Cruz *et al.*, 2022).

Por fim, o acúmulo de metais pesados em sistemas biológicos pode catalisar reações que aumentam a geração de EROs, além de impactar negativamente os mecanismos de defesa antioxidante, principalmente aqueles de natureza enzimática (Jomova *et al.*, 2023).

3.3 Mecanismos de defesa antioxidantes

O corpo humano conta com um sistema antioxidante (Figura 3) capaz de neutralizar e eliminar o excesso de espécies reativas, prevenindo o organismo dos seus efeitos nocivos. Esse sistema é composto por antioxidantes endógenos, enzimáticos ou não enzimáticos e por antioxidantes exógenos, obtidos através da dieta (Pisoschi *et al.*, 2015). O mecanismo de ação desse sistema inclui: ação preventiva, que é a primeira linha de defesa, onde os antioxidantes previnem as reações dos radicais livres com substâncias biológicas; mecanismos de reparação,

que interrompem as reações de oxidação; e, por fim, a reparação dos danos estruturais causados pelas espécies reativas (Kosten *et al.*, 2013).

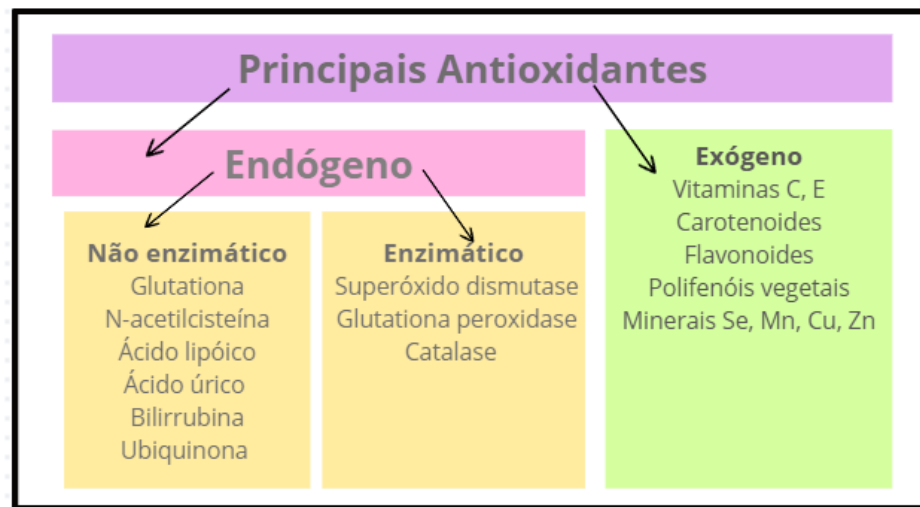


Figura 3. Principais antioxidantes no sistema humano. **Adaptado de:** Janciauskiene *et al.*, 2020.

3.3.1 Antioxidantes endógenos enzimáticos

As enzimas antioxidantes catalisam a transformação de EROs e seus subprodutos em espécies menos nocivas e mais estáveis, representando um importante mecanismo de defesa contra o estresse oxidativo. Entre essas enzimas, a superóxido dismutase, a glutathione peroxidase e a catalase, proporcionam uma defesa mútua contra as EROs (Figura 4) (Hassan *et al.*, 2024).

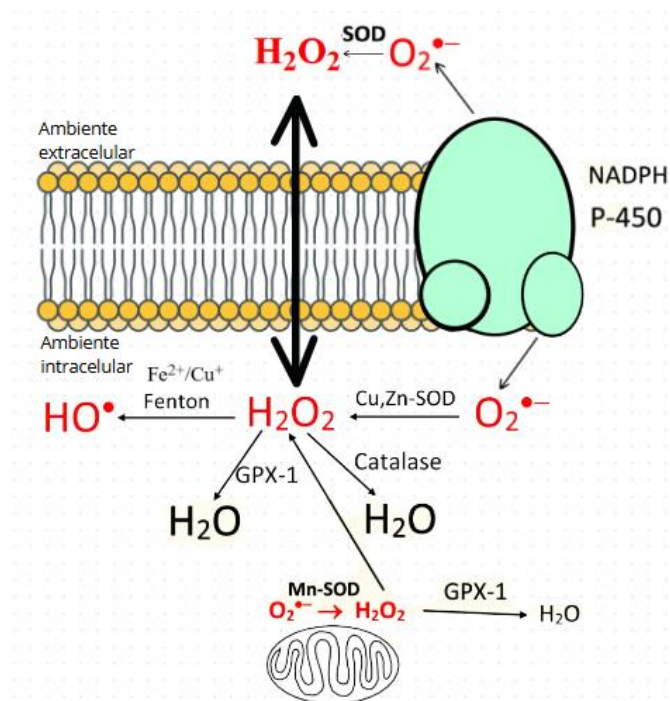


Figura 4. Ação da glutatona peroxidase-1, catalase e superóxido dismutase. **Adaptado de:** Jomova *et al.*, 2023.

A superóxido dismutase, catalisa a dismutação do ânion superóxido em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio molecular, convertendo a toxicidade do $O_2^{\bullet-}$ em compostos menos reativos. Em seres humanos, existem três formas principais de superóxido dismutase (SOD1): Zn-SOD, localizada no citoplasma; Mn-SOD2, presente nas mitocôndrias e responsável por cerca de 15% do total dessas enzimas e SOD3 extracelular, encontrada predominantemente na matriz extracelular dos tecidos. (Shaw *et al.*, 2022).

A catalase é uma enzima que catalisa a quebra de duas moléculas de peróxido de hidrogênio em duas moléculas de água e uma molécula de oxigênio, desempenhando um papel crucial em condições associadas ao estresse oxidativo, incluindo inflamação, mutagênese e supressão da apoptose (Nandi *et al.*, 2019).

A glutatona peroxidase (GPx) é uma família de enzimas, que são responsáveis por reduzir hidroperóxidos lipídicos a álcoois e peróxido de hidrogênio a água. A família GPx inclui várias isoenzimas, sendo a glutatona peroxidase-1 (GPx-1) a mais abundante, utilizando o peróxido de hidrogênio como seu principal substrato. A GPx-1 desempenha um papel importante no ambiente intracelular, mantendo níveis fisiológicos de peróxido de hidrogênio, que são essenciais para a função mitocondrial, a homeostase redox e a transdução de sinal (Hassan *et al.*, 2024).

3.3.2 Antioxidantes endógenos não enzimáticos

Esses antioxidantes, atuam interrompendo e finalizando as reações em cadeia dos radicais livres. Alguns desses antioxidantes são hidrossolúveis e localizam-se no citosol ou na matriz citoplasmática, enquanto outros são lipossolúveis e estão presentes nas membranas celulares. Entre eles, destacam-se os tióis (N-acetilcisteína e ácido lipóico), melatonina, ácido úrico, bilirrubina e ubiquinona (Nimal *et al.*, 2022).

A N-acetilcisteína é um antioxidante derivado do aminoácido L-cisteína, precursor da glutatona que reduz os efeitos deletérios do estresse oxidativo, através do seu grupo acetil ligado ao átomo de nitrogênio, comum em tióis e pode ser oxidado interagindo com uma ampla variedade de radicais livres, neutralizando seus efeitos nocivos. (Rind *et al.*, 2022)

O ácido lipóico (ácido 1,2-ditiolano-3-pentanóico) é um composto ditiol, sintetizado na mitocôndria a partir do ácido octanóico. Esses ácidos atuam como antioxidantes, sendo capazes de eliminar diretamente as EROs, regenerar antioxidantes endógenos como a glutatona e as vitaminas E e C, além de possuírem atividade quelante. As propriedades antioxidativas desses ácidos são mantidas mesmo em sua forma reduzida, conhecida como ácido di-hidrolipóico (Molinari *et al.*, 2019)

A melatonina é um hormônio produzido pela glândula pineal, com capacidade de se ligar diretamente a radicais livres, formando produtos quimicamente estáveis e que não podem ser regenerados. Além disso, a melatonina protege contra danos causados por EROs, eliminando peróxidos lipídicos e lipopolissacarídeos (LPS) (Yang *et al.*, 2022).

O ácido úrico (AU) é o produto dos nucleotídeos de purina em humanos, que pode ser decomposto em alantoína. Esse produto atua como um antioxidante, removendo as EROs, como oxigênio singlete e peroxinitrito, inibindo assim a peroxidação lipídica. Este composto é um dos principais antioxidantes no corpo humano, contribuindo para até 55% da capacidade antioxidante extracelular na eliminação de radicais livres (Wada *et al.*, 2022).

A coenzima Q (CoQ) ou ubiquinona é um derivado da benzoquinona localizado na cadeia respiratória mitocondrial e em outras membranas internas. A CoQ fornece proteção antioxidante às membranas celulares e lipoproteínas plasmáticas e na cadeia de transporte de elétrons, aumentam a eficiência do transporte de elétrons, evitando a perda descontrolada de elétrons. Ademais a CoQ também ajuda a regenerar outros antioxidantes, como vitamina E ou vitamina C, reduz e neutraliza as EROs (Janciauskiene *et al.*, 2020).

3.3.2 Antioxidantes exógenos

Os antioxidantes exógenos complementam os antioxidantes endógenos, trabalhando em conjunto para manter o equilíbrio do metabolismo redox. Esses antioxidantes podem ser obtidos através da alimentação, como nutrientes ou minerais, e apresentam diversos mecanismos de ação. Os antioxidantes exógenos podem sequestrar radicais livres, reduzindo a produção de EROs, reparar membranas oxidadas e neutralizar radicais lipídicos através do metabolismo lipídico, onde ésteres de colesterol e ácidos graxos de cadeia curta atuam na neutralização das EROs (Warraich *et al.*, 2020)

A vitamina C ou ácido ascórbico, é um antioxidante hidrossolúvel que também atua na eliminação de radicais livres. Ela pode regenerar a vitamina E, que está presente na membrana celular e ajuda a prevenir a peroxidação lipídica, além de manter a homeostase da membrana plasmática. A vitamina C também reage com diversas espécies reativas de oxigênio e metais de transição redox ativos (Jomova *et al.*, 2024).

A vitamina E ou tocoferol, é uma vitamina lipossolúvel presente na natureza com oito isoformas distintas. Ela elimina EROs, como os radicais peroxila ($\text{ROO}\cdot$) e alcóxila ($\text{RO}\cdot$), proporcionando proteção às membranas celulares contra o estresse oxidativo. Sua principal atividade antioxidante é converter radicais hidroperoxila lipídicos em hidroperóxidos lipídicos (Miyazawa *et al.*, 2019).

Os compostos fenólicos são metabólitos secundários presentes em espécies vegetais, exibindo uma grande diversidade estrutural. Eles são caracterizados por um anel aromático ligado a uma hidroxila, variando desde fenólicos simples até compostos mais complexos, desempenham um papel essencial na neutralização de radicais livres e na proteção contra danos celulares induzidos pelo estresse oxidativo (Alara *et al.*, 2021).

Os flavonoides, uma classe de compostos fenólicos, são metabólitos secundários que possuem um anel benzopirona com grupos fenólicos ou polifenólicos em várias posições. Eles são classificados de acordo com sua estrutura química, grau de insaturação e oxidação do anel de carbono. Esta grande família de compostos polifenólicos desempenha diversas funções importantes nas plantas. Os benefícios dos flavonoides para a saúde são atribuídos à sua capacidade de eliminar espécies reativas de oxigênio e reduzir o estresse oxidativo (Jomova *et al.*, 2024).

Por fim, os carotenoides são pigmentos naturais que variam do vermelho ao amarelo, encontrados em plantas, bactérias, fungos e algas. Eles desempenham várias funções, principalmente devido à sua interação com a luz e suas propriedades fotoprotetoras. Os carotenóides reagem com espécies reativas de oxigênio, através de diversos mecanismos, incluindo a neutralização de oxigênio singlete (Janciauskiene *et al.*, 2020).

3.4 *Eugenia uniflora*

Popularmente conhecida como “pitanga”, “pitangueira” ou “cerejeira brasileira”, a *Eugenia uniflora* é uma espécie vegetal pertencente à família Myrtaceae, sendo nativa da América do Sul e especialmente encontrada no Brasil (Figura 5). Essa espécie possui alta adaptabilidade às condições de clima e solo adversas e desenvolve-se bem em climas quentes e úmidos, adaptando-se também a climas temperados e diversas altitudes, podendo ser resistente a ventos fortes, geadas e temperaturas negativas. A planta tolera a seca, crescendo adequadamente em condições semiáridas com fornecimento mínimo de água (Rattmann *et al.*, 2012). Seu fruto é rico em vitaminas e as folhas possuem propriedades medicinais sendo comumente utilizadas na medicina popular para a produção de medicamentos fitoterápicos. A *E. uniflora* está incluída na Lista Nacional de Plantas Medicinais de Interesse para o Sistema Único de Saúde (RENISUS, 2009).



Figura 5. *Eugenia uniflora*. **Fonte:** Próprio autor, 2024.

Árvore frutífera que possui uma copa densa e arredondada, podendo atingir entre 2 e 9 metros de altura, com ramificações e folhagem perene. Seu sistema radicular é profundo, e suas folhas são simples e opostas, com pecíolos de aproximadamente 2 mm. As folhas jovens têm uma coloração verde-amarronzada, enquanto as folhas adultas se distinguem por um tom verde-escuro (Figura 6). As flores aparecem na base dos ramos após cerca de um ano. Elas são hermafroditas, com uma fragrância suave e produzem pouco ou nenhum néctar. Cada flor tem quatro pétalas brancas e livres, anteras amarelas ricas em pólen e estiletes brancos (Figura 7). Diferentes partes da pitangueira são amplamente aproveitadas devido à sua riqueza em compostos bioativos, entre os quais se destacam os antioxidantes, como compostos fenólicos, flavonoides e carotenoides. Esses compostos apresentam um significativo potencial para promover benefícios à saúde, contribuindo para a proteção contra o estresse oxidativo e outros processos relacionados. (Fidelis *et al.*, 2022).



Figura 6. Folhas de *Eugenia uniflora*. **Fonte:** Próprio autor, 2024.



Figura 7. Floração de *Eugenia uniflora*. **Fonte:** Próprio autor, 2024.

Os metabólitos secundários encontrados em espécies vegetais exibem uma notável diversidade estrutural e química, refletindo-se nas diversas atividades biológicas atribuídas a plantas medicinais. Por algum tempo, o emprego de plantas medicinais tem se destacado como uma alternativa para mitigar sintomas e tratar uma variedade de doenças. Isso ocorre mediante a avaliação do potencial farmacológico, aliado à segurança de utilização de determinadas espécies (Ferreira MRA, 2023). Entre as espécies consideradas promissoras está, a *Eugenia uniflora*, a composição dos extratos abrange uma variedade de compostos fenólicos, tais como

flavonoides, terpenos, taninos, antraquinonas, antocianinas, carotenoides, e óleos essenciais (Franzolin MR, 2022).

3.5 *Caenorhabditis elegans*

O *Caenorhabditis elegans* é um nematoide (Figura 8) de vida livre e não parasitário encontrado em diversos países. Com um ciclo de vida rápido e, em sua maioria, hermafroditas autofecundantes, esses organismos crescem ao longo dos quatro estágios larvais. São facilmente cultivados em placas com ágar e suplementados com bactéria *E. coli* OP50, favorece sua manutenção em laboratório.

Este nematoide possui um genoma sequenciado com apenas 97 Mb de tamanho, compartilhando cerca de 60-80% de homologia genética com os humanos. Além disso, apresenta tamanho reduzido, alta taxa reprodutiva, facilidade de cultivo, baixo custo de manutenção, capacidade de criopreservação a longo prazo, ciclo de vida rápido e transparência em todo seu ciclo de vida. (Ann, 2015).



Figura 8. Nematóide *Caenorhabditis elegans*. **Fonte:** Yochem, 2006.

Os estágio larvais desses animais se inicia em L1 a L4, sendo quatro estágios de vida (Figura 9). O estágio L1 tem uma duração de cerca de 16 horas, enquanto os estágios subsequentes, L2 a L4, duram aproximadamente 12 horas cada. Cada estágio é seguido por um período de inatividade, semelhante a um estado de letargia. Além disso, leva aproximadamente 16 horas a uma temperatura de 20°C para iniciar a embriogênese do *C. elegans*. Após a eclosão dos ovos, ocorre a transição para a fase de larva de primeiro estágio (L1). Cerca de 12 horas

após a última mudança para o estágio L4, os hermafroditas adultos iniciam a produção de descendentes, um processo que se estende por um período de 2 a 3 dias (Ann, 2015).

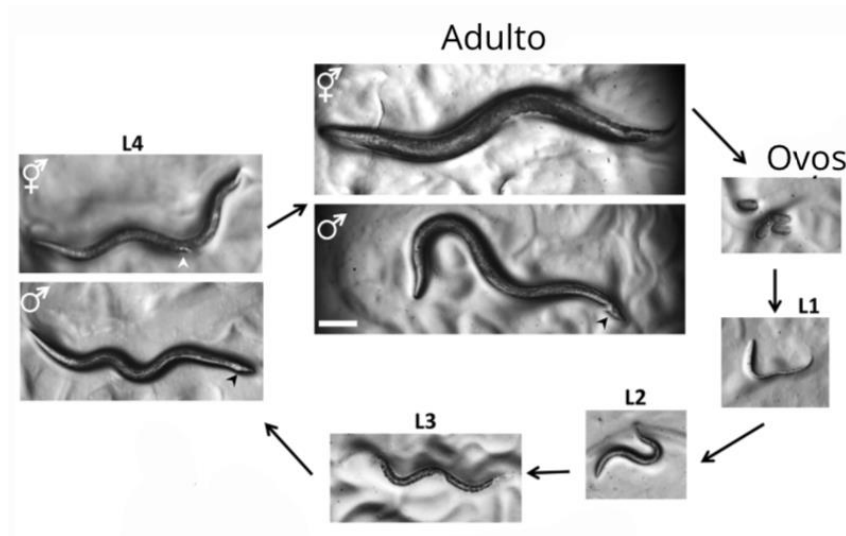


Figura 9. Ciclo de vida do *Caenorhabditis elegans*. **Fonte:** Yochem, 2006.

Em laboratório, os animais são geralmente cultivados em placas de ágar cobertas com a bactéria *Escherichia coli* OP50. Quando as bactérias são consumidas, os animais recorrem às suas reservas de gordura. Sem alimento, o desenvolvimento dos jovens em estágio larval é interrompido. Para reativar o desenvolvimento, pode-se transferir um pedaço do ágar da placa antiga para uma nova placa com bactérias, processo conhecido como *chuking*. Este organismo tornou-se essencial em várias áreas de pesquisa, incluindo desenvolvimento, neurobiologia, genética, envelhecimento e aplicações farmacêuticas (Sin *et al.*, 2014).

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar a toxicidade, atividade antioxidante do extrato hidroetanólico de *Eugenia uniflora* (EHEu) utilizando modelos *in vitro* e *in vivo*.

4.2 Objetivos específicos

- Analisar a toxicidade do EHEu em *Caenorhabditis elegans*;
- Avaliar a ação do EHEu diante à indução de estresse oxidativo,
- Investigar a atividade antioxidante do EHEu utilizando o ensaio *in vitro* FRAP.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Coleta do material vegetal e preparo do extrato

O material vegetal, composto por folhas de *Eugenia uniflora*, foi coletado no centro urbano de Dourados, MS, Brasil (22°13'13.5"S e 54°49'04.4"W). A identificação da espécie foi realizada pela Prof.^a Dr.^a Zefa Valdivina Pereira, da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais da Universidade Federal da Grande Dourados (FCBA, UFGD), e uma exsiccata foi depositada no Herbário DDMS da UFGD com o número 5730.

As folhas foram lavadas, sanitizadas e secas em estufa com circulação de ar a 40°C até atingirem peso constante. Em seguida, o material vegetal foi triturado em moinho de facas para obtenção do pó, que foi submetido a um extrator de fluido pressurizado (Dionex®, modelo ASE 150) com uma célula de extração de 5 mL. O material foi extraído com etanol 80% sob os seguintes parâmetros: temperatura de 125 °C por 5 minutos, seguido de lavagem da célula com 100% do volume de sua capacidade e limpeza por 60 segundos. Posteriormente, o extrato foi concentrado em um rotaevaporador para remoção do solvente e, então, liofilizado para obtenção do extrato bruto. Os rendimentos foram calculados utilizando a fórmula correspondente:

$$\text{Rendimento da extração (\%)} = (\text{MES} / \text{MMF}) \times 100; \text{ onde: MES} = \text{massa do extrato seco (g) e MMF} = \text{massa do material fresco (g).}$$

5.2 Ensaios *in vivo*: Linhagens e manutenção de *Caenorhabditis elegans*

Para executar os ensaios *in vivo*, linhagem selvagem N2 do nematoide *Caenorhabditis elegans*, foi adquirida do *Caenorhabditis Genetics Center* (University of Minnesota, Minneapolis, MN, EUA). Os nematoides foram mantidos em placas de Petri contendo ágar *Nematode Growth Medium* (NGM) e alimentados com bactéria *Escherichia coli* OP50. Os animais utilizados nos experimentos estavam no estágio L4, correspondente ao estágio de jovem adulto. Para obter uma população uniforme no mesmo estágio de desenvolvimento, inicialmente foi realizado um procedimento denominado *chunking*. Nesse método, um pedaço do meio de crescimento contendo um número significativo de nematoides foi retirado de uma placa e levado para uma nova placa contendo NGM e bactérias. Posteriormente, a placa foi vedada e mantida em BOD a 20 °C por 96 horas. Após esse período, a placa apresentou uma população considerável de nematoides em várias fases de desenvolvimento e ovos, etapa

necessária para realizar o segundo procedimento, a sincronização. Para essa finalidade, a placa foi lavada com meio M9, caracterizando a remoção dos nematóides e ovos do meio de crescimento. O conteúdo obtido é transferido para um tubo Falcon, onde adiciona-se hipoclorito de sódio (2%) e hidróxido de sódio (NaOH) 5 M, que promove a lise dos indivíduos e posterior liberação dos ovos. Ademais, os ovos são então lavados em meio M9 e transferidos para uma nova placa contendo NGM e bactérias. A placa precisa ser vedada e mantida em BOD a 20 °C por 48 horas, para que os animais possam se desenvolver até o estágio L4.

5.2.1 Ensaio de toxicidade Sub-crônica

Para avaliar a possível toxicidade *in vivo* do extrato, foi realizado um ensaio de toxicidade sub- crônica em nematoides *C. elegans* no estágio L4, baseado no método descrito por Vilasboas-Campos et al. (2020), com algumas modificações. Inicialmente, foram adicionados 100 µL de meio M9 a uma placa de 96 poços. Em seguida, de 10 a 20 nematoides foram transferidos para cada poço utilizando uma microespátula de platina. Posteriormente, foram adicionados 100 µL de diferentes concentrações (31,25 – 2.000 µg/mL) de EHEu aos respectivos poços. Para o controle, foram adicionados 100 µL de meio M9. A placa foi mantida em BOD a 20 °C por 24 e 48 horas. Após os períodos mencionados, a viabilidade dos nematoides foi avaliada utilizando um microscópio estereoscópico modelo SMZ-140 & 46 W10X/23 (British Columbia, Canadá). Os nematoides foram tocados com uma microespátula de platina e classificados como vivos ou mortos. Foram realizados três experimentos independentes em triplicata, e os resultados foram expressos como a porcentagem de nematoides vivos. A porcentagem foi calculada utilizando a equação a seguir, em que (Ni) representa o número inicial de nematoides e (Nf) é o número final de nematoides após 24 e 48 horas de incubação:

$$\text{Viabilidade dos nematoides (\%)} = (\text{Ni} \times 100) / \text{Nf}$$

5.2.2 Ensaio de estresse oxidativo induzido por Juglone

O ensaio de estresse oxidativo foi conduzido expondo os nematoides ao agente oxidante juglone (5-hidroxi-1,4-naftoquinona) diluído em etanol a 80%, seguindo o protocolo descrito por Vilasboas-Campos et al. (2020), com algumas modificações. Os animais foram sincronizados e incubados por 48 horas até atingirem o estágio L4. Em seguida, foram

transferidos para placas de 96 poços, com 10 a 20 animais por poço, contendo 100 µg/mL de meio M9. No grupo de controle não tratado e de controle juglone, foram adicionados 100 µL de M9, enquanto nos grupos tratados com o extrato, foram adicionados 100 µL de cada concentração (32,25 – 1000 µg/mL), por 1 hora a 20 °C. Em seguida, os animais foram expostos a 50 µL do agente oxidante juglone (250 µM) e incubados a 20 °C por 6 horas, com a viabilidade avaliada a cada hora por meio de um estereomicroscópio. Os indivíduos foram considerados viáveis quando se movimentaram após serem tocados com um fio de platina. Os resultados foram calculados como a média de três ensaios independentes, cada um realizado em triplicata.

$$\text{Viabilidade dos nematoides (\%)} = (\text{Ni} \times 100) / \text{Nf}$$

5.3 Ensaio *in vitro*: Ensaio do poder redutor férrico (FRAP)

O ensaio de poder antioxidante de redução do ferro (FRAP) foi criado como uma alternativa para medir a redução do ferro em fluidos biológicos e soluções aquosas de compostos puros, como extratos. Este ensaio baseia-se na transferência eletrônica, que avalia a redução de íons férricos (Fe^{3+}) em íons ferrosos de cor azul intensa (Fe^{2+}) por antioxidantes em meio ácido (Jiménez-Morales *et al.*, 2024). O experimento FRAP foi realizado conforme descrito por Rocha *et al.* (2019), com algumas modificações. Para este ensaio, 20 µL de extrato (1–500 µg/mL) foram misturados com 280 µL de reagente FRAP. O reagente FRAP era composto por 10 mL de solução 10 mmol/L de 2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazina (TPTZ) em 1 mL de metanol, 10 mL de 20 mmol/L $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e 100 mL de tampão acetato 0,3 mol/L (pH = 3,6). A mistura foi incubada a 37 °C por 30 minutos. A absorbância foi medida a 492 nm. Ácido ascórbico, BHT e sulfato de ferro e amônio ($\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) foram usados como referência. Como controle, 20 µL do solvente foram incubados com 280 µL de reagente FRAP. Três experimentos independentes foram realizados em triplicata. O valor da concentração efetiva máxima (EC50) foi determinado usando a equação de regressão correspondente.

5.4 Análises estatísticas

Os dados foram apresentados como média ± erro padrão da média (EPM). As concentrações efetivas (EC50) dos radicais livres foram calculadas por meio de regressão não linear. A análise de variância univariada (ANOVA), seguida pelo teste de Dunnett, foi utilizada para comparar dois ou mais grupos. Todas as análises foram realizadas utilizando o software

GraphPad Prism 9.0. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$.

6. RESULTADOS

6.1 Toxicidade no modelo *in vivo* *C. elegans*

O efeito do EHEu na viabilidade do *C. elegans* é apresentado na Figura 10. Os dados mostram que, no período de 24 horas, a maior concentração de EHEu (2000 $\mu\text{g/mL}$) reduziu a viabilidade dos nematoides em cerca de 36% em comparação com o grupo controle. No período de 48 horas, as concentrações de 500, 1000 e 2000 $\mu\text{g/mL}$ de EHEu também mostraram uma toxicidade, reduzindo a viabilidade em aproximadamente 38%, 51% e 55%, respectivamente.

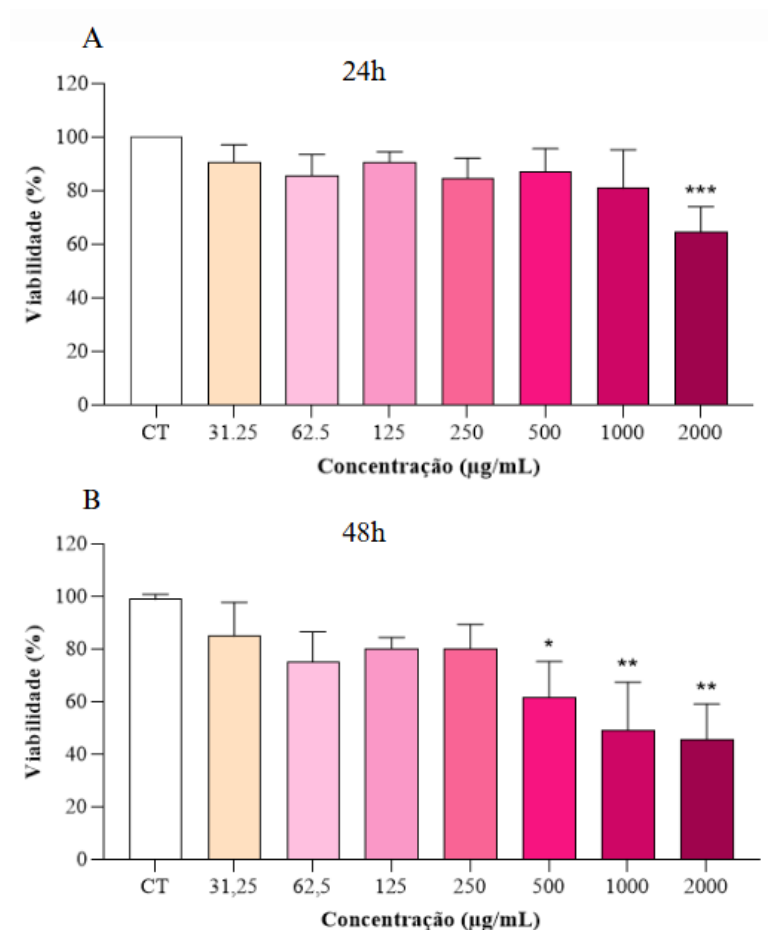


Figura 10. Toxicidade sub-crônica em *C. elegans*. A viabilidade dos nematoides é expressa em porcentagem, os indivíduos foram expostos ao meio M9 (Controle) e a diferentes concentrações de EHEu (31,25 - 2000 $\mu\text{g/mL}$), após 24 h (A) e 48 h (B) de incubação. Os valores são expressos como a média \pm EPM de três experimentos independentes, realizados em triplicata.

6.2 Proteção contra o estresse oxidativo induzido por juglone

No ensaio de proteção contra o estresse oxidativo, foi observado que o EHEu apresentou um efeito protetor sobre a viabilidade dos nematoides ao longo de um período de 6 horas (figura 11). Nas duas primeiras horas, nenhuma concentração demonstrou proteção significativa em relação ao controle juglone (CTJ). No entanto, a partir da terceira hora, todas as concentrações apresentaram uma viabilidade superior ao CTJ (20%), com destaque para a concentração de 500 µg/mL, que apresentou 35% de viabilidade. Na quarta hora, as concentrações de 500 e 1000 µg/mL apresentaram, respectivamente, cerca de 31% e 23% de viabilidade, comparadas ao CTJ, que foi de 12,6%. Nas últimas duas horas, observa-se a redução completa da viabilidade dos animais no CTJ, representando 100% de morte entre a quinta e a sexta hora. Adicionalmente, as concentrações de 125 a 1000 µg/mL apresentaram uma proteção significativa nessas horas. No final do período experimental (6h), os nematoides tratados com EHEu nas concentrações de 125 a 1000 µg/mL apresentaram viabilidades de aproximadamente 11%, 12%, 34% e 20%, respectivamente.

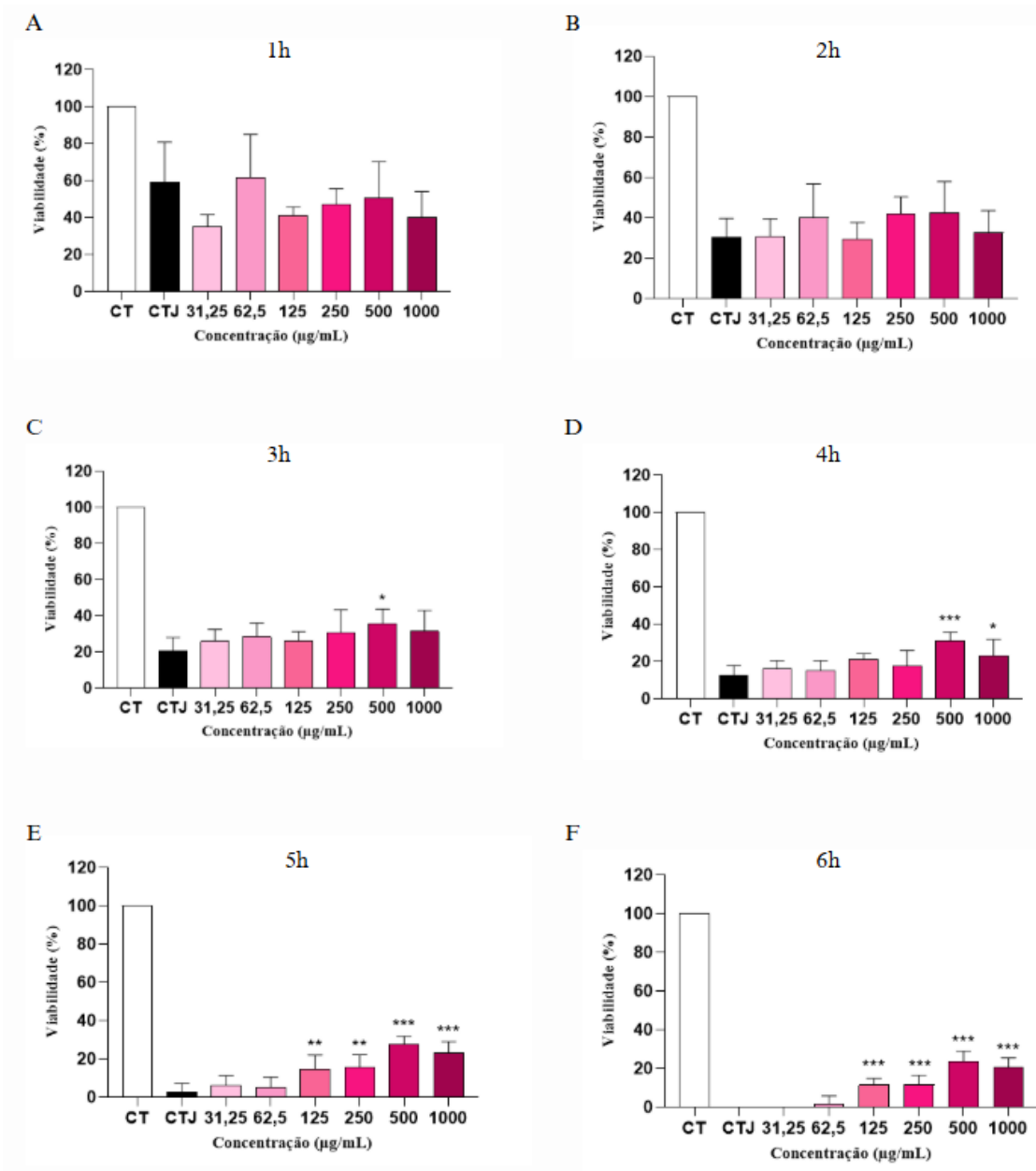


Figura 11. Ensaio de estresse oxidativo induzido por Juglone. Viabilidade dos nematoides expressa em porcentagem expostos ao meio M9 (CT), ao pro-oxidante juglone (250 µM) (CTJ) e a diferentes concentrações de EHEu (31,25 - 1000 µg/mL) com juglone (250 µM). Experimento foi realizado durante 6 horas, com verificações a cada hora. Os valores são expressos como a média ± EPM de três experimentos independentes, realizados em triplicata.

6.3 Ensaio *in vitro* FRAP

Os dados apresentados na tabela 1, demonstra a atividade antioxidante do EHEu. O extrato apresentou um EC50 2,4 vezes maior que o antioxidante de referência ácido ascórbico.

Referente a geração de Fe^{2+} , o extrato foi 2,1 vezes maior para gerar Fe^{2+} , quando comparado com antioxidante de referência BHT, ademais na redução do Fe^{3+} o extrato demonstrou reduzir 2,4 vezes mais quando comparados com Sulfato ferroso.

Tabela 1. Ensaio antioxidante FRAP para o extrato e antioxidantes padrão.

Amostras	FRAP	
	EC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	A _{máx} ($\mu\text{g/mL}$)
AA	15 ± 3,83	50
BHT	77 ± 11,05	100
Sulfato Ferroso	88 ± 3,79	50
EHEu	36 ± 8,02	50

AA: ácido ascórbico, BHT: hidroxitolueno butilado, EHEu: extrato hidroetanólico das folhas de *Eugenia uniflora*. EC₅₀: metade da concentração efetiva do EHEu para gerar Fe^{2+} A_{máx}: Atividade máxima. Os valores são expressos como a média ± EPM.

7. DISCUSSÃO

O Brasil, detém a maior biodiversidade do planeta, distribui sua riqueza biológica em seis biomas principais: Amazônia, Cerrado, Mata Atlântica, Caatinga, Pantanal e Pampa. Essa vasta diversidade de ecossistemas e espécies proporciona ao país um imenso potencial para desenvolver produtos farmacêuticos a partir de plantas com propriedades medicinais. O uso com finalidade terapêutica tem se mostrado promissor, dada a grande variedade de compostos e estruturas químicas associadas à bioatividade das plantas. (Bruno *et al.*, 2021).

A *Eugenia uniflora* contém uma variedade de compostos bioativos, incluindo fenólicos totais, antocianinas e flavonoides (Moura, *et al.* 2018). Esses compostos são conhecidos por suas propriedades antioxidantes, que são essenciais na neutralização de espécies reativas de oxigênio e na prevenção de danos celulares causados pelo estresse oxidativo, a sua relevância já é elucidada em pesquisas de diversas áreas de conhecimento como fisiologia, farmacologia, nutrição (Sabeh *et al.*, 2020).

Neste contexto, o presente estudo dá continuidade ao trabalho previamente desenvolvido pelo grupo de pesquisa, no qual foram realizados ensaios antioxidantes, como DPPH•, ABTS•+, AAPH e MDA, além de análises de determinação de compostos fenólicos e flavanoides. Esses ensaios sugerem a presença de propriedades antioxidantes e forneceram uma base sólida para a condução dos experimentos apresentados neste trabalho.

Ademais, para compreender e avaliar de forma detalhada as propriedades antioxidantes, é essencial empregar métodos que investiguem os diferentes mecanismos de ação antioxidante. Sendo assim, um dos métodos amplamente utilizados é o FRAP (Gulcin, 2020).

No ensaio de poder antioxidante de redução do ferro, a eficácia antioxidante do EHEu foi comparada a substâncias isoladas, como o ácido ascórbico (AA) e o BHT. O extrato, quando comparado ao AA, teve uma menor redução férrica, esse dado sugere sua capacidade em amenizar a formação de Fe^{2+} , o que pode atenuar o estresse oxidativo resultante da geração excessiva de EROs. Esse efeito é relevante no contexto da reação de Fenton, onde o ferro desempenha um papel central na geração de radicais livres altamente reativos em sistemas biológicos. Durante essa reação, o Fe^{2+} reage com H_2O_2 , produzindo radicais hidroxila ($\bullet OH$), espécies que podem causar danos significativos às biomoléculas (Egea et al., 2020).

Esses dados são fundamentais para entender o potencial terapêutico do EHEu e para determinar as concentrações seguras e eficazes para futuros ensaios. A segurança e a eficácia no uso de plantas medicinais dependem da correta identificação da planta, do conhecimento sobre a parte a ser utilizada, do modo de preparo, da forma de uso e da dose adequada. No entanto, o uso de plantas pode causar efeitos adversos, seja pelo uso isolado, inadequado, crônico ou em combinação com medicamentos convencionais ou outras plantas e fitoterápicos (Pedroso, *et al.*, 2021). Este estudo demonstrou que o extrato hidroetanólico das folhas de *Eugenia uniflora* não apresentou toxicidade nas concentrações mais baixas, no entanto, nas três concentrações mais altas avaliadas, foi observada toxicidade. Isso pode ser atribuído ao fato de o extrato não ser um composto isolado, sugerindo a presença de outros compostos que podem ser tóxicos. De acordo com esses dados, foi possível determinar as concentrações seguras para os próximos experimentos.

Com base nesses pressupostos, o efeito do EHEu foi então analisado em um organismo vivo exposto ao estresse oxidativo. É importante notar que, *in vivo*, outros mecanismos antioxidantes, como enzimas antioxidantes, podem ser ativados (Nimal et al., 2022). Neste contexto, o juglone, um composto orgânico com propriedades alelopáticas, é conhecido por sua habilidade de induzir estresse oxidativo em organismos biológicos (Parque H, et al., 2017). Ao ser expostos, os nematoides, como o *Caenorhabditis elegans*, sofrem aumento na produção de radicais livres, o que desencadeia danos celulares, comprometendo a integridade das células e reduzindo a viabilidade do organismo (Moreno-Arriola et al., 2014). Nesse contexto, os resultados deste estudo indicaram que o EHEu proporcionou um efeito protetor significativo a

partir da terceira hora de exposição esse efeito é provavelmente atribuído à presença de fenólicos totais, antocianinas e flavonoides, que atuaram como antioxidantes, sugerindo sua capacidade de proteger contra danos causados por estressores oxidantes. Durante o estresse induzido pelo agente oxidante juglone, vias de sinalização, como DAF-16/FOXO, podem ter sido ativadas pelos compostos presentes no extrato. Essas vias podem promover a atividade do sistema antioxidante, convertendo o ânion radical superóxido pela enzima SOD-3 em peróxido de hidrogênio, considerado menos prejudicial e que pode ser posteriormente convertido em água e oxigênio (Kim, *et al.*, 2017).

Em suma, o EHEu demonstra potencial antioxidante capaz de proteger organismos vivos como o modelo *C. elegans* contra os efeitos prejudiciais do estresse oxidativo. A proteção observada, principalmente nas concentrações intermediária à alta (125 a 1000 µg/mL), reforçando a hipótese que o extrato pode exercer uma ação antioxidante eficaz, abrindo novas perspectivas de estudo na busca de aplicações terapêuticas em contextos biológicos relacionados ao estresse oxidativo. Além disso, análises futuras podem ser realizadas com *C. elegans* e outros modelos experimentais buscando identificar os mecanismos moleculares envolvidos na proteção antioxidante mediada pelo EHEu, como por exemplo a ativação de sistemas de defesa endógenos e a modulação de vias celulares associadas à resposta ao estresse oxidativo.

8. CONCLUSÃO

Este estudo evidenciou o potencial antioxidante do extrato hidroetanólico das folhas de *Eugenia uniflora*, demonstrando sua capacidade de proteger *Caenorhabditis elegans* contra o estresse oxidativo induzido por juglone. Contudo, a análise também identificou indícios de toxicidade em concentrações mais elevadas, ressaltando a necessidade de delimitar faixas seguras de dosagem para investigações futuras. Esses achados contribuem significativamente para o entendimento das propriedades bioativas de *E. uniflora* e indicam seu potencial terapêutico como agente antioxidante. Entretanto, estudos complementares são indispensáveis para avaliar sua segurança, mecanismos de ação e eficácia em diferentes modelos biológicos e contextos clínicos.

9. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ALARA, Oluwaseun Ruth; ABDURAHMAN, Nour Hamid; UKAEGBU, Chinonso Ishamel. **Extraction of phenolic compounds: A review**. *Current Research in Food Science*, v. 4, p. 200–214, 2021.

ALBERTS, Bruce. **Biologia molecular da célula**. 6. ed. Porto Alegre: ArtMed, 2017.

BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. D. C. G.; DE PAULA, S. O.; MINIM, V. P. R.; BRESSAN, J. **Oxidative stress: concept, implications and modulating factors**. *Revista de Nutrição*, v. 23, n. 4, p. 629–643, 2010.

BHATTACHARYYA, A.; CHATTOPADHYAY, R.; MITRA, S.; CROWE, S. E. **Oxidative stress: an essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases**. *Physiological Reviews*, v. 94, n. 2, p. 329–354, 2014. DOI: 10.1152/physrev.00040.2012.

BORGES, L. P.; AMORIM, V. A. **Secondary plant metabolites**. *Revista Agrotecnologia*, v. 11, n. 1, 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. **Lista Nacional de Plantas Medicinais de Interesse para o Sistema Único de Saúde (SUS)**. Brasília: Ministério da Saúde, 2009.

BRUNO, S. F.; MATOS, U. A. de O. **Benefícios da biodiversidade para as comunidades tradicionais: a nova legislação os sustenta?** *Ciência Florestal*, v. 31, n. 2, p. 998-1019, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.5902/1980509834222>. Acesso em: 04 nov. 2024.

CAROCHO, M.; FERREIRA, I. C. F. R. **A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives**. *Food and Chemical Toxicology*, v. 51, p. 15–25, 2013.

CHAGUTURU, R. **Bioprospection: a perspective**. *Comb Chem High Throughput Screen*, v. 25, n. 7, p. 1131–1133, 2022. DOI: 10.2174/1386207325666220209092454.

CHATTERJEE, C.; GLEDDIE, S.; XIAO, C. W. **Soybean bioactive peptides and their functional properties**. *Nutrients*, v. 10, n. 9, p. 1211, 2018. DOI: 10.3390/nu10091211.

CHEN, Juanjuan; LIU, Yang; ZHAO, Zhao; et al. **Oxidative stress in the skin: Impact and related protection**. *International Journal of Cosmetic Science*, v. 43, n. 5, p. 495–509, 2021.

CM, Como; LI, S. W.; LIAO, V. H. **A exposição crônica ao triadimenol em concentrações ambientalmente relevantes afeta negativamente os biomarcadores de envelhecimento em *Caenorhabditis elegans* associados à via de sinalização insulina/IGF-1**. *Science of the Total Environment*, v. 640–641, p. 485–492, 2018. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2018.05.314.

CRUZ-GREGORIO, A.; ARANDA-RIVERA, A. K.; ARANCIBIA-HERNÁNDEZ, Y. L.; et al. **ROS and oxidative stress: an overview of basic concepts**. *Oxygen*, v. 2, n. 4, p. 437–478, 2022.

DE GIFFONI DE CARVALHO, J. T.; DA SILVA BALDIVIA, D.; LEITE, D. F.; DE ARAÚJO, L. C. A.; DE TOLEDO ESPINDOLA, P. P.; ANTUNES, K. A.; ROCHA, P. S.; DE PICOLI SOUZA, K.; DOS SANTOS, E. L. **Medicinal plants from Brazilian Cerrado: antioxidant and anticancer potential and protection against chemotherapy toxicity**. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v. 2019, p. 3685264, 2019. DOI: 10.1155/2019/3685264.

DOS SANTOS DA ROCHA, P.; ORUÉ, S. L.; LEITE, D. F.; DE TOLEDO ESPINDOLA, P. P.; CASSEMIRO, N. S.; DA SILVA, D. B.; CAROLLO, C. A.; NUNES-SOUZA, V.; RABELO, L. A.; CAMPOS, J. F.; ESTEVINHO, L. M. F.; DOS SANTOS, E. L.; DE PICOLI SOUZA, K. **Beneficial effects of Bauhinia rufa leaves on oxidative stress, prevention, and treatment of obesity in high-fat diet-fed C57BL/6 mice.** *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v. 2022, p. 8790810, 2022. DOI: 10.1155/2022/8790810.

DOS SANTOS, C. M.; BALDIVIA, D. D. S.; DE CASTRO, D. T. H.; CARVALHO, J. T. G.; OLIVEIRA, A. S.; DA ROCHA, P. D. S.; CAMPOS, J. F.; BALOGUN, S. O.; DE OLIVEIRA, C. F. R.; DA SILVA, D. B.; CAROLLO, C. A.; DE PICOLI SOUZA, K.; DOS SANTOS, E. L. **Chemical composition, antioxidant, and cytotoxic effects of Senna rugosa leaf and root extracts on human leukemia cell lines.** *Pharmaceuticals (Basel)*, v. 17, n. 8, p. 974, 2024. DOI: 10.3390/ph17080974.

EGAMBARAM, O. P.; KESAVAN PILLAI, S.; RAY, S. S. **Materials science challenges in skin UV protection: a review.** *Photochemistry and Photobiology*, v. 96, n. 4, p. 779–797, 2020.

EGEA, G.; JIMÉNEZ-ALTAYÓ, F.; CAMPUZANO, V. **Espécies reativas de oxigênio e estresse oxidativo na patogênese e progressão de doenças genéticas do tecido conjuntivo.** *Antioxidants*, v. 9, n. 10, p. 1013, 2020. DOI: 10.3390/antiox9101013.

FERREIRA, M. R. A.; LIMA, L. B.; SANTOS, E. C. F.; MACHADO, J. C. B.; SILVA, W. A. V.; PAIVA, P. M. G.; NAPOLEÃO, T. H.; SOARES, L. A. L. **Eugenia uniflora: a promising natural alternative against multidrug-resistant bacteria.** *Brazilian Journal of Biology*, v. 83, p. e274084, 2023. DOI: 10.1590/1519-6984.274084.

FIDELIS, E. M.; SAVALL, A. S. P.; DE OLIVEIRA PEREIRA, F.; QUINES, C. B.; ÁVILA, D. S.; PINTON, S. **Pitanga (Eugenia uniflora L.) as a source of bioactive compounds for health benefits: A review.** *Arabian Journal of Chemistry*, v. 15, n. 4, p. 103691, 2022.

FIDELIS, E. M.; SAVALL, A. S. P.; MELLO, J. D.; QUINES, C. B.; COMIS-NETO, A. A.; SAMPAIO, T. B.; DENARDIN, C. C.; DE ÁVILA, D. S.; ROSA, S. G.; PINTON, S. **O extrato de pitanga roxa (Eugenia uniflora) atenua o estresse oxidativo induzido pelo MPTP.** *Metabolic Brain Disease*, v. 38, n. 8, p. 2615–2625, 2023. DOI: 10.1007/S11011-023-01318-Z.

FORMAN, H. J.; ZHANG, H. **Direcionamento do estresse oxidativo na doença: promessa e limitações da terapia antioxidante.** *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 20, n. 9, p. 689–709, 2021. DOI: 10.1038/S41573-021-00233-1.

FRANZOLIN, M. R.; COURROL, D. D. S.; DE SOUZA BARRETO, S.; COURROL, L. C. **Eugenia uniflora L. Silver and Gold Nanoparticle Synthesis, Characterization, and Evaluation of the Photoreduction Process in Antimicrobial Activities.** *Microorganisms*, v. 10, n. 5, p. 999, 2022. DOI: 10.3390/microorganisms10050999.

GANGULY, U.; KAUR, U.; CHAKRABARTI, S. S.; et al. **Oxidative stress, neuroinflammation, and NADPH oxidase: implications in the pathogenesis and treatment of Alzheimer's disease.** *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v. 2021, p. e7086512, 2021.

GORRINI, C.; HARRIS, I. S.; MAK, T. W. **Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy.** *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 12, n. 12, p. 931–947, 2013.

GULCIN, İ. **Antioxidantes e métodos antioxidantes: uma visão geral atualizada.** *Archives of Toxicology*, v. 94, n. 3, p. 651–715, 2020. DOI: 10.1007/s00204-020-02689-3.

HASSAN, H. A.; AHMED, H. S.; HASSAN, D. F. **Free radicals and oxidative stress: Mechanisms and therapeutic targets.** Human Antibodies, 2024. Preprint.

HUSAIN, N.; KUMAR, A. **Reactive oxygen species and natural antioxidants: a review.** Advances in Bioresources, v. 3, n. 4, p. 164–175, 2012.

IORDACHE, Florin; PISOSCHI, Aurelia Magdalena; POP, Aneta; et al. **Oxidative stress mitigation by antioxidants - An overview on their chemistry and influences on health status.** European Journal of Medicinal Chemistry, v. 209, p. 112891, 2021.

JANCIAUSKIENE, S. **The beneficial effects of antioxidants in health and diseases.** Chronic Obstructive Pulmonary Diseases: Journal of the COPD Foundation, v. 7, n. 3, p. 182, 2020.

JIMÉNEZ-MORALES, W. A.; CAÑIZARES-MACIAS, M. D. P. Fast FRAP-SIA method to determine antioxidant capacity. Talanta, v. 273, p. 125813, 2024. DOI: 10.1016/j.talanta.2024.125813.

JOMOVA, K. et al. **Several lines of antioxidant defense against oxidative stress: antioxidant enzymes, nanomaterials with multiple enzyme-mimicking activities, and low-molecular-weight antioxidants.** Archives of Toxicology, v. 98, n. 5, p. 1323–1367, 2024.

JOMOVA, K.; RAPTOPA, R.; ALOMAR, S. Y.; ALWASEL, S. H.; NEPOVIMOVA, E.; KUCA, K.; VALKO, M. **Reactive oxygen species, toxicity, oxidative stress, and antioxidants: chronic diseases and aging.** Archives of Toxicology, v. 97, n. 10, p. 2499–2574, 2023. DOI: 10.1007/s00204-023-03562-9.

JUNIOR, Hilton Lopes; MARCUCCI, Maria Cristina. **Avaliação da atividade de captura de radicais livres na espécie vegetal Eucharis x grandiflora Planch. & Linden, Amaryllidaceae: Imagem: StockPhotos.** Revista Científica da Faculdade de Educação e Meio Ambiente, v. 9, n. 2, p. 706–711, 2018.

KIM, Sun Y.; WEBB, Ashley E. **Neuronal functions of FOXO/DAF-16.** Nutrition and Healthy Aging, v. 4, p. 113-126, 2017. DOI: 10.3233/NHA-160009.

LAMBETH, J. D. **Nox enzymes, ROS, and chronic disease: an example of antagonistic pleiotropy.** Free Radical Biology and Medicine, v. 43, n. 3, p. 332–347, 2007. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2007.03.027.

LU, C.; SVOBODA, K. R.; LENZ, K. A.; et al. **Toxicity interactions between manganese (Mn) and lead (Pb) or cadmium (Cd) in a model organism: the nematode C. elegans.** Environmental Science and Pollution Research, v. 25, p. 15378–15389, 2018. DOI: 10.1007/s11356-018-1752-5.

LYU, J. I.; RYU, J.; JIN, C. H.; et al. **Phenolic compounds in extracts of Hibiscus acetosella (cranberry hibiscus) and their antioxidant and antibacterial properties.** Molecules, v. 25, n. 18, p. 4190, 2020. DOI: 10.3390/molecules25184190.

MARKAKI, Maria; TAVERNARAKIS, Nektarios. **Caenorhabditis elegans as a model system for human diseases.** Current Opinion in Biotechnology, v. 63, p. 118–125, 2020. DOI: 10.1016/j.copbio.2019.12.011.

MITTLER, R. **ROS are good.** Trends in Plant Science, v. 22, n. 1, p. 11–19, 2017.

MIYAZAWA, T. et al. **Vitamin E: regulatory redox interactions.** IUBMB Life, v. 71, n. 4, p. 430–441, 2019.

MOLINARI, C. et al. **Role of combined lipoic acid and vitamin D3 on astrocytes as a way to prevent brain ageing by induced oxidative stress and iron accumulation.** Oxidative Medicine and Cellular Longevity, v. 2019, p. 2843121, 2019.

MORENO-ARRIOLA, E.; CÁRDENAS-RODRÍGUEZ, N.; COBALLASE-URRUTIA, E.; PEDRAZA-CHAVERRI, J.; CARMONA-APARICIO, L.; ORTEGA-CUELLAR, D. **Caenorhabditis elegans: um modelo útil para estudar distúrbios metabólicos nos quais o estresse oxidativo é um fator contribuinte.** Oxidative Medicine and Cellular Longevity, v. 2014, p. 705253, 2014. DOI: 10.1155/2014/705253.

MOURA, G. S.; OLIVEIRA, I. J. de; BONOME, L. T. da S.; FRANZENER, G. **Eugenia uniflora L.: potential uses as a bioactive plant.** Arquivos do Instituto Biológico, v. 85, p. e0752017, 2018. DOI: 10.1590/1808-1657000752017.

NANDI, A.; YAN, L. J.; JANA, C. K.; DAS, N. **Role of Catalase in Oxidative Stress- and Age-Associated Degenerative Diseases.** Oxid Med Cell Longev., v. 2019, p. 9613090, 2019. DOI: 10.1155/2019/9613090.

NEHA, K.; HAIDER, M. R.; PATHAK, A.; YAR, M. S. **Medicinal prospects of antioxidants: a review.** European Journal of Medicinal Chemistry, v. 178, p. 687–704, 2019. DOI: 10.1016/j.ejmech.2019.06.010.

NIMAL, Rafia; SELCUK, Ozge; KURBANOGLU, Sevinc; et al. **Trends in electrochemical nanosensors for the analysis of antioxidants.** Trends in Analytical Chemistry, v. 153, p. 116626, 2022.

OLIVEIRA, E. S. C.; ACHO, L. D. R.; DA SILVA, B. J. P.; MORALES-GAMBA, R. D.; PONTES, F. L. D.; DO ROSÁRIO, A. S.; BEZERRA, J. A.; CAMPOS, F. R.; BARCELLOS, J. F. M.; LIMA, E. S.; MACHADO, M. B. **Hypoglycemic effect and toxicity of the dry extract of Eugenia biflora (L.) DC. leaves.** Journal of Ethnopharmacology, v. 293, p. 115276, 2022. DOI: 10.1016/j.jep.2022.115276.

PARQUE, H.-E. H.; JUNG, Y.; LEE, S.-J. V. **Ensaio de sobrevivência usando Caenorhabditis elegans.** Molecules and Cells, v. 40, p. 90–99, 2017. DOI: 10.14348/molcells.2017.0017.

PEDROSO, R. dos S.; ANDRADE, G.; PIRES, R. H. **Medicinal plants: an approach to rational and safe use.** Physis: Revista de Saúde Coletiva, v. 31, p. e310218, 2021.

PEIXOTO, J. C.; NEVES, B. J.; VASCONCELOS, F. G.; NAPOLITANO, H. B.; BARBALHO, M. G. D. S.; SILVA, S. D. E.; ROSSETO, L. P. **Flavonoids from Brazilian Cerrado: biosynthesis, chemical and biological profile.** Molecules, v. 24, n. 16, p. 2891, 2019. DOI: 10.3390/molecules24162891.

PEÑA-BAUTISTA, C.; BAQUERO, M.; VENTO, M.; CHÁFER-PERICÁS, C. **Free radicals in Alzheimer's disease: lipid peroxidation biomarkers.** Clinica Chimica Acta, v. 491, p. 85–90, 2019. DOI: 10.1016/j.cca.2019.01.021.

PETRUK, G.; DEL GIUDICE, R.; RIGANO, M. M.; MONTI, D. M. **Antioxidants from plants protect against skin photoaging.** Oxidative Medicine and Cellular Longevity, v. 2018, p. 1454936, 2018. DOI: 10.1155/2018/1454936.

PISOSCHI, A. M.; POP, A. **The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review.** European Journal of Medicinal Chemistry, v. 97, p. 55–74, 2015.

RADI, R. **Oxygen radicals, nitric oxide, and peroxynitrite: redox pathways in molecular medicine.** Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 115, n. 23, p. 5839–5848, 2018. DOI: 10.1073/pnas.1804932115.

RATTMANN, Y. D.; DE SOUZA, L. M.; MALQUEVICZ; PAIVA, S. M.; DARTORA, N.; SASSAKI, G. L.; GORIN, P. A.; et al. **Análise de flavonoides de folhas de Eugenia uniflora e seu efeito protetor contra sepse murina.** Evid Based Complement Alternat Med, v. 2012, p. 623940, 2012.

RIND, L. et al. **An insight on safety, efficacy, and molecular docking study reports of N-acetylcysteine and its compound formulations.** Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology, v. 33, n. 3, p. 223–233, 2022.

SÁ-FILHO, G. D.; SILVA, A. I. B.; COSTA, E. M.; NUNES, L. E.; RIBEIRO, L. H. F.; CAVALCANTI, J. R. L. P.; et al. **Medicinal plants used in the Brazilian caatinga and the therapeutic potential of secondary metabolites: a review.** Research, Society and Development, v. 10, n. 13, p. e140101321096, 2021.

SIN, O.; MICHELS, H.; NOLLEN, E. A. **Genetic screens in Caenorhabditis elegans models for neurodegenerative diseases.** Biochimica et Biophysica Acta, v. 1842, n. 10, p. 1951–1959, 2014. DOI: 10.1016/j.bbadis.2014.01.015.

SOBEH, M.; HAMZA, M. S.; ASHOUR, M. L.; ELKHATIEB, M.; EL RAEY, M. A.; ABDEL-NAIM, A. B.; WINK, M. **A polyphenol-rich fraction from Eugenia uniflora exhibits antioxidant and hepatoprotective activities in vivo.** Pharmaceuticals (Basel), v. 13, n. 5, p. 84, 2020. DOI: 10.3390/ph13050084.

TIAN, Y. E.; CROPLEY, V.; MAIER, A. B.; LAUTENSCHLAGER, N. T.; BREAKSPEAR, M.; ZALESKY, A. **Heterogeneous aging across multiple organ systems and prediction of chronic disease and mortality.** Nature Medicine, v. 29, n. 5, p. 1221–1231, 2023. DOI: 10.1038/s41591-023-02296-6.

U, Q.; KOSTEN, T. R.; ZHANG, X. Y. **Free radicals, antioxidant defense systems, and schizophrenia.** Progress in Neuropsychopharmacology and Biological Psychiatry, v. 46, p. 200–206, 2013.

WADA, A. et al. **Protective effect of luminal uric acid against indomethacin-induced enteropathy: Role of antioxidant effect and gut microbiota.** Digestive Diseases and Sciences, v. 67, p. 121–133, 2022.

WARRAICH, Umm-e-Ammara; HUSSAIN, Fatma; KAYANI, Haroon Ur Rashid. **Aging: Oxidative stress, antioxidants and computational modeling.** Heliyon, v. 6, n. 5, p. e04107, 2020.

YANG, K.; CAO, F.; XUE, Y.; TAO, L.; ZHU, Y. **Three classes of antioxidant defense systems and the development of postmenopausal osteoporosis.** Frontiers in Physiology, v. 13, p. 840293, 2022.

YOICHEM, J. **Nomarski images for learning the anatomy, with tips for mosaic analysis.** WormBook, ed. The C. elegans Research Community, 2006. DOI: 10.1895/wormbook.1.100.1.

ZHAO, R. Z.; JIANG, S.; ZHANG, L.; YU, Z. B. **Cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, geração e desacoplamento de ROS.** International Journal of Molecular Medicine, v. 44, n. 1, p. 3–15, 2019. DOI: 10.3892/ijmm.2019.4188.