

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

ÍGOR VÍCTOR DA SILVA

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DAS FOLHAS E FLORES DE
Vernonia condensata* BAKER (ASTERACEAE) *in vitro* e *in vivo

DOURADOS

2024

ÍGOR VÍCTOR DA SILVA

**ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DAS FOLHAS E FLORES DE
Vernonia condensata BAKER (ASTERACEAE) *in vitro* e *in vivo***

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

Orientadora: Prof. Dra. Jaqueline Ferreira Campos

DOURADOS

2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

S586a Silva, Ígor Víctor Da
ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DAS FOLHAS E FLORES DE *Vernonia condensata* BAKER
(ASTERACEAE) in vitro e in vivo [recurso eletrônico] / Ígor Víctor Da Silva. -- 2024.
Arquivo em formato pdf.

Orientadora: Jaqueline Ferreira Campos.
TCC (Graduação em Ciências Biológicas)-Universidade Federal da Grande Dourados, 2024.
Disponível no Repositório Institucional da UFGD em:
<https://portal.ufgd.edu.br/setor/biblioteca/repositorio>

1. Estresse oxidativo. 2. Boldo-bahiano. 3. *C. elegans*. 4. Antioxidante. 5. Espécies reativas. I.
Campos, Jaqueline Ferreira. 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.

ÍGOR VÍCTOR DA SILVA

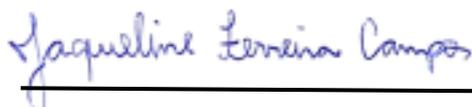
**Atividade antioxidante das folhas e flores de *Vernonia condensata*
Baker *in vitro* e *in vivo***

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

Orientadora: Prof. Dra. Jaqueline Ferreira Campos

Data da defesa: 29/11/2024

BANCA EXAMINADORA



Professora Dra. Jaqueline Ferreira Campos

Presidente



Professora Dra. Paola dos Santos da Rocha

Membro Titular

Documento assinado digitalmente
 DEBORA DA SILVA BALDÍVIA
Data: 17/12/2024 11:47:40-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Professora Dra. Débora da Silva Baldívia

Membro Titular

DOURADOS

2024

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço aos meus pais, por nunca terem medido esforços para que eu tivesse o melhor ensino ao nosso alcance, além de sempre estarem presentes na minha vida, me apoiando e incentivando sempre quando precisei.

Agradeço ao meu pai, José Aparecido da Silva, por ter me ensinado a ser uma pessoa justa, humilde, por ter me ensinado a não desistir, independente das condições e por ter sido sempre um excelente exemplo para mim. Agradeço à minha mãe, Jucelaine Aparecida Valério da Silva, por ter sido sempre o meu apoio e a pessoa que sempre busquei quando necessitei desabafar ou de conselhos. Obrigado por tanto.

Agradeço à minha irmã, Natany Kellen da Silva, que sempre foi o meu modelo na vida, a pessoa que sempre busquei me inspirar, como estudante, acadêmico, como pessoa e como futuro profissional. Agradeço ao meu irmão, João Vitor da Silva, por todos os momentos que nos divertimos morando juntos durante as nossas graduações, as nossas conversas, apesar de não muito frequentes, sempre tornaram a minha rotina mais leve.

Agradeço à minha tia, Maria Helena da Silva, que sempre foi como uma mãe para mim, e apesar da distância, sempre se fez presente na minha vida, agradeço pelos passeios, pelas viagens, pelas tardes fazendo compras e pelos momentos que estávamos juntos cozinhando, obrigado por todos os ensinamentos.

Agradeço aos meus avós, em especial a minha vó Maria, que já partiu, obrigado por todo o amor que os senhores me deram durante minha vida e obrigado por terem me ensinado a ser humano.

Agradeço à minha “panelinha” da graduação, obrigado Hérica, Juliana, Lorena, Lucas e Vitor, vocês tornaram a graduação mais leve e tolerável, com todas as nossas conversas, nossas jogatinas no Centro Acadêmico e os almoços que dividimos no RU, sempre com muitas risadas e fofocas, minha graduação não teria sido ótima como foi se não tivesse conhecido vocês, vocês à tornaram muito especial.

Agradeço aos amigos que fiz durante a graduação, Danrvney, Eduardo, Isabella, Pedro e Samara. Obrigado por todos os conselhos, conversas e momentos que dividimos juntos, agradeço por terem feito parte desses 4 anos de curso.

Agradeço ao grupo PET, em especial a professora Zefa, por terem proporcionado experiências e ensinamentos que me mudaram como pessoa e como Biólogo, obrigado por todos os eventos que organizamos, todas as visitas técnicas e por todos os cursos de campo, grande parte do Biólogo que me tornarei é graças ao que aprendi com vocês.

Agradeço a todos os professores que encontrei durante minha graduação, em especial ao professor Fernando, o professor Sandro, a professora Viviana e ao professor Zezo, obrigado por tudo que aprendi com vocês, serei eternamente grato por todos os ensinamentos, conversas e conselhos.

Agradeço à professora Jaqueline, por ter aceitado me orientar quando ainda era praticamente um calouro de Ciências Biológicas em 2022, obrigado por ter me apresentado um universo novo dentro da Biologia, agradeço pela paciência e obrigado por sempre estar disponível para conversar, ensinar, guiar e aconselhar.

Agradeço ao Grupo de Estudos em Biotecnologia e Bioprospecção aplicados ao Metabolismo e Câncer – GEBBAM, por ter me proporcionado os espaços, os equipamentos e materiais para que eu pudesse realizar as minhas duas Iniciações Científicas e o meu Trabalho de Conclusão de Curso, agradeço em especial a professora Kely de Picoli Souza e ao professor Edson Lucas dos Santos, por terem lutado para proporcionar toda a estrutura que mudou e mudará não só a minha vida, mas a de vários outros.

Agradeço ao Alex, ao Daniel, à Isabella e à Isamara, por terem sido professores para mim dentro do GEBBAM, sou grato por todos os conselhos, pelo auxílio durante a experimentação, por todos os ensinamentos e por todos os momentos que me ajudaram durante a realização desse trabalho.

Agradeço a Isamara, minha “irmã” científica, que eu acompanhei desde o primeiro momento que pisei os meus pés nos laboratórios do GEBBAM e realmente foi como uma irmã para mim, me ensinou muito do que eu sei hoje. Obrigado por tudo o que você me ensinou nos 2 anos que passamos juntos.

Agradeço ao Daniel, que apesar do ano conturbado que teve, só tenho a agradecer por todos os momentos no qual você participou me ensinando para que eu pudesse construir este trabalho, além de todos os momentos de aprendizado e de aconselhamento. Muito obrigado, grande parte do pesquisador que sou hoje é por causa de você.

Agradeço ao Alex, que no começo da construção deste trabalho era o “Doutorando” Alex, mas com o tempo que passamos juntos trabalhando se tornou uma pessoa que hoje eu chamo de amigo, obrigado por ter me apresentado o mundo da biologia molecular e por ter ensinado muito do que você sabe em relação a esse universo.

Agradeço aos outros membros, Alécio, Kamila, Natália, Pedro e Sarah, por todos os momentos de descontração que tivemos durante nossos tempos livres, durante a correria do dia-a-dia dentro do laboratório.

Agradeço aos membros da banca, professora Paola, professora Débora e professor Helder, por terem aceitado fazer parte da banca de avaliação do meu trabalho, agradeço por todas as críticas, comentários e contribuições feitas, que ajudaram a polir e aperfeiçoar este trabalho.

Agradeço a Universidade Federal da Grande Dourados – UFGD, por ter possibilitado a realização da minha graduação.

Agradeço ao FNDE, pela bolsa que recebi durante a graduação como aluno do Grupo PET.

Agradeço aos órgãos de fomento Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq e Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul – FUNDECT por todo o apoio financeiro.

*“Você não tem espaço nos seus sonhos para
arrependimentos”*

Robin – Taylor Swift (2024)

RESUMO

Espécies reativas, apesar de desempenharem um importante papel em processos fisiológicos, quando não são mantidas em níveis adequados pelos antioxidantes, elas levam um quadro de estresse oxidativo, ocasionando na oxidação de biomoléculas e à danos celulares pelo excesso dessas moléculas. O estresse oxidativo, por sua vez, está associado ao surgimento de várias doenças, inclusive doenças que lideram o ranking de mortes em todo o mundo. Desta maneira, a busca por compostos com efeito antioxidante de origem natural é crescente, para controlar desta forma o estresse oxidativo. Neste sentido, destaca-se a espécie vegetal *Vernonia condensata*, conhecida como boldo-bahiano e utilizada popularmente no tratamento de condições associadas ao sistema gastrointestinal, como úlceras. Esta espécie já foi estudada quanto a sua composição química e suas atividades biológicas, identificando metabólitos secundários de várias classes, além de ter o seu efeito antioxidante, anti-inflamatório e anticâncer *in vitro* descrito. Desta maneira, o objetivo deste trabalho foi investigar a composição química e a atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo* do extrato aquoso das folhas e flores de *V. condensata*. Para isto, foi quantificado o teor de compostos fenólicos e flavonoides dos extratos, foi avaliado o efeito inibidor de radicais livres *in vitro*, além da capacidade de ambos os extratos de proteger DNA e proteínas da oxidação. Nos ensaios *in vitro*, compostos fenólicos e flavonoides foram identificados em ambos os extratos, com uma maior presença no extrato das flores de *V. condensata*, onde foram identificados 52,1 mg EAQ/100g de amostra de compostos fenólicos e 14,38 mg EQ/100 g de amostra. Além disso, ambos foram capazes de inibir os radicais livres e proteger biomoléculas da oxidação, com maior efeito do extrato das flores, que apresentou um IC₅₀ de 28,3 µg/mL contra o radical livre DPPH• e protegeu DNA e proteínas da oxidação em 83% e 93%, respectivamente. A partir das atividades observadas *in vitro*, o extrato das flores de *V. condensata* foi escolhido para avaliar os seus efeitos *in vivo*, utilizando a ferramenta biotecnológica para ensaios pré-clínicos *C. elegans*. Nos estudos *in vivo*, foi observado que além de não apresentar toxicidade no modelo utilizado, também protegeu aos danos oxidativos induzidos, aumentando a viabilidade dos animais tratados em até 13%. Desta maneira, *V. condensata* se mostra como um potencial agente no controle do estresse oxidativo, devido a sua composição química e seus efeitos observados tanto em ensaios *in vitro* quanto *in vivo*.

Palavras chave: Estresse oxidativo; boldo-bahiano; *C. elegans*; antioxidante; espécies reativas.

ABSTRACT

Reactive species, although playing an important role in physiological processes, can lead to oxidative stress when not maintained at adequate levels by antioxidants. This results in the oxidation of biomolecules and cellular damage caused by the excess of these molecules. Oxidative stress, in turn, is associated with the development of various diseases, including those ranked among the leading causes of death worldwide. Consequently, there is a growing search for natural antioxidant compounds to manage oxidative stress effectively. In this context, the plant species *Vernonia condensata*, commonly known as "boldo-bahiano" and traditionally used to treat gastrointestinal conditions such as ulcers, stands out. Previous studies on this species have explored its chemical composition and biological activities, identifying secondary metabolites from various classes. Its antioxidant, anti-inflammatory, and anticancer effects *in vitro* have also been described. Thus, the objective of this study was to investigate the chemical composition and antioxidant activity *in vitro* and *in vivo* of the aqueous extract from the leaves and flowers of *V. condensata*. To this end, the phenolic and flavonoid content of the extracts was quantified, their free radical inhibitory effect *in vitro* was evaluated, and their ability to protect DNA and proteins from oxidation was assessed. In the *in vitro* assays, phenolic compounds and flavonoids were identified in both extracts, with a higher concentration observed in the flower extract of *V. condensata*, containing 52.1 mg GAE/100 g of sample for phenolic compounds and 14.38 mg QE/100 g of sample for flavonoids. Additionally, both extracts inhibited free radicals and protected biomolecules from oxidation, with the flower extract demonstrating greater efficacy. Specifically, the flower extract exhibited an IC₅₀ of 28.3 µg/mL against the free radical DPPH• and protected DNA and proteins from oxidation by 83% and 93%, respectively. Based on the *in vitro* activities, the flower extract of *V. condensata* was selected for *in vivo* evaluation using *C. elegans* as a biotechnological tool for preclinical assays. The *in vivo* studies showed that, in addition to exhibiting no toxicity in the chosen model, the extract also protected against induced oxidative damage, increasing the viability of treated organisms by up to 13%. Thus, *V. condensata* emerges as a potential agent for managing oxidative stress due to its chemical composition and the effects observed in both *in vitro* and *in vivo* studies.

Keywords: Oxidative stress; boldo-bahiano; *C. elegans*; antioxidant; reactive species.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Reações catalisadas por enzimas antioxidantes do sistema antioxidante endógeno. Fonte: (MORET-TATAY et al., 2016).....20
- Figura 2.** Principais constituintes do Sistema antioxidante e suas respectivas classificações. Fonte: de autoria própria.....23
- Figura 3.** Representação gráfica das principais condições associadas ao estresse oxidativo. Fonte: FLEMING; LUO, 2021.....24
- Figura 4.** Exsicata de *V. condensata* depositada no Herbário da Universidade Federal da Grande Dourados. Fonte: de autoria própria.....27
- Figura 5.** Representação com microscopias do nematoide *Caenorhabditis elegans* para apresentar o seu ciclo de vida, apresentando todos os seus estágios de desenvolvimento, do ovo ao animal adulto, além de mostrar o animal no estágio dauer e o seu dimorfismo sexual quando adulto, identificando o animal hermafrodita e macho. Fonte: CORSI; WIGHTMAN; CHALFIE, 2015.....33
- Figura 6.** Efeito protetor do extrato aquoso das folhas (EAVc-F) (A-B) e das flores (EAVc-Fl) (C-D) contra a oxidação de DNA promovida por H₂O₂ e radiação UV. Dados obtidos a partir da análise de 2 géis de experimentos independentes. Valores expressos como média ± EPM. #####P < 0.0001 versus Controle negativo; *P < 0.05, ***P < 0.001 e ****P < 0.0001 versus DNA+H₂O₂-UV.....40
- Figura 7.** Efeito protetor do extrato aquoso das folhas (EAVc-F) (A-B) e das flores (EAVc-Fl) (C-D) de *V. condensata* contra a oxidação de BSA promovida por AAPH. Dados obtidos a partir da análise de 4 géis de 2 experimentos independentes. Valores expressos como média ± EPM. #####P < 0.0001 versus Controle negativo; *P < 0.05, ***P < 0.001 e ****P < 0.0001 versus AAPH.41
- Figura 8.** Efeito do extrato aquoso das flores (EAVc-Fl) de *V. condensata* sobre a viabilidade do nematoide *C. elegans* após exposição por 24 (A) e 48 (B) horas. Os dados foram obtidos a partir de 2 experimentos independentes realizados em triplicata. Os valores estão expressos como média ± EPM.....41
- Figura 9.** Efeito do extrato aquoso das flores (EAVc-Fl) frente ao estresse oxidativo induzido por Juglone no nematoides *C. elegans* durante um período de 6 horas. Os valores estão expressos como média ± EPM. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 versus o grupo Juglone....42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estudos sobre a atividade antioxidante e os efeitos sobre condições associadas ao estresse oxidativo de <i>V. condensata</i> . Fonte: de autoria própria.....	29
Tabela 2. Teor de compostos fenólicos e de flavonoides presentes nas folhas e flores de <i>V. condensata</i>	39
Tabela 3. Atividade inibitória do radical livre DPPH• promovida pelo extrato aquoso das folhas (EAVc-F) e das flores (EAVc-Fl) de <i>V. condensata</i>	39

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

2,2'-Azobis(2-methylpropionamide) dihydrochloride – AAPH

2,2-difenil-1-picrilhidrazil – DPPH

5-hidroxi-1,4-naftalenodiona – Juglone

AGEs – Produtos finais de glicação avançada

CAT – Catalase

DCNT's – Doenças Crônicas Não Transmissíveis

EROs – Espécies Reativas de Oxigênio

Fe²⁺ – Íon Ferroso

GPx – Glutathione peroxidase

GR – Glutathione reductase

GSH – Glutathione reduzida

GSSH – Glutathione oxidada

HClO – Ácido hipocloroso

H₂O₂ – Peróxido de Hidrogênio

NGM - *Nematode Growth Medium*

NO⁻ – Óxido nítrico

NOX – NADPH Oxidase

O₂ – Oxigênio singlete

O₂⁻ – Radical ânion superóxido

•OH – Radical hidroxila

ONOO⁻ – Radical peroxinitro

RenisUS – Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde

SOD – Superóxido dismutase

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	JUSTIFICATIVA	17
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
3.1	Espécies reativas	18
3.2	Antioxidantes	19
3.2.1	Sistema antioxidante endógeno	19
3.2.2	Sistema antioxidante exógeno	22
3.3	Estresse oxidativo	24
3.4	Produtos naturais no desenvolvimento de fármacos.....	25
3.5	Família Asteraceae.....	27
3.5.1	Gênero <i>Vernonia</i>	28
3.6	Modelo para estudos pré-clínicos <i>Caenorhabditis elegans</i>	34
4	OBJETIVOS	36
4.1	Objetivo geral	36
4.2	Objetivos específicos	36
5	MATERIAIS E MÉTODOS	37
5.1	Coleta do material vegetal e preparo do extrato	37
5.2	Composição química.....	37
5.2.1	Determinação de compostos fenólicos totais.....	37
5.2.2	Determinação de flavonoides totais.....	37
5.3	Ensaio <i>in vitro</i>	38
5.3.1	Captura de radicais livres de DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazil)	38
5.3.2	Oxidação de DNA	38
5.3.3	Oxidação da albumina sérica bovina.....	39
5.4	Ensaio <i>in vivo</i>	39
5.4.1	Cultura e manutenção dos nematoides <i>Caenorhabditis elegans</i>	39
5.4.2	Letalidade sub-crônica.....	40
5.4.3	Estresse oxidativo induzido por Juglone (5-hidroxi-1,4-naftalenodiona)	40
5.5	Análise estatística	40
6	RESULTADOS	41
6.1	Quantificação de compostos fenólicos e flavonoides totais	41
6.2	Ensaio <i>in vitro</i>	41
6.2.1	Captura de radicais livres de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil).....	41
6.2.2	Oxidação de DNA	42

6.2.3	Oxidação da albumina sérica bovina	43
6.3	Ensaio in vivo	44
6.3.1	Letalidade sub-crônica	44
6.3.2	Estresse oxidativo induzido por Juglone	45
7	DISCUSSÃO	46
8	CONCLUSÃO	48

1 INTRODUÇÃO

Espécies reativas de oxigênio (ERO's) são moléculas instáveis e danosas, oriundas naturalmente de processos celulares, como a respiração celular e processos inflamatórios, e desempenham diversas funções importantes para a manutenção da homeostase. No entanto, em excesso podem ocasionar em danos às biomoléculas, como DNA, proteínas e lipídios, sendo neutralizadas pelo sistema de defesa antioxidante do nosso organismo para evitar que tais danos ocorram (JOMOVA et al., 2023). No entanto, em certos casos, a produção de espécies reativas é aumentada devido a fatores ambientais, como consumo de nicotina e exposição à produtos químicos, como herbicidas, de uma maneira que o nosso sistema de defesa antioxidante não é mais capaz de neutralizá-las, caracterizando assim um quadro de estresse oxidativo (HAJAM et al., 2022a).

O estresse oxidativo, além de estar relacionado à danos a células e biomoléculas, ele também está associado à patogênese de várias doenças, incluindo as doenças crônicas não transmissíveis (DCNT's), como câncer, Alzheimer, diabetes e doenças do sistema cardiovascular, que lideram o ranking das causas de morte em todo o mundo (HAJAM et al., 2022a; JOMOVA et al., 2023).

Neste contexto, fontes de compostos bioativos exógenos que possuem atividade antioxidante são de suma importância no controle da produção de espécies reativas (JOMOVA et al., 2023). Neste sentido, as plantas são uma importante fonte de compostos bioativos que visam auxiliar o sistema antioxidante no controle do estresse oxidativo. As plantas são fontes ricas dos mais variados compostos bioativos, incluindo terpenos, alcaloides e flavonoides. Esses compostos possuem variadas atividades biológicas, podendo atuar na prevenção e no tratamento de muitas doenças, como diabetes, obesidade, Alzheimer, Parkinson, artrite reumatoide e câncer, sendo assim o estudo destes compostos de suma importância para melhor compreender seus efeitos (CHOPRA; DHINGRA, 2021)

Sabendo disso, em 2009 o Ministério da Saúde criou a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (ReniSUS), que contém 71 espécies vegetais, que foram selecionadas devido ao seu uso popular praticado em várias localidades do Brasil. A relação tem por objetivo guiar e auxiliar na produção de estudos sobre plantas medicinais, visando a produção de dados em relação a eficácia, dosagem, segurança e quais plantas são indicadas no tratamento da doença em questão (MARMITT et al., 2015).

Dentre as espécies presentes na RENISUS está a *Vernonia condensata* (Asteraceae), conhecida popularmente como boldo baiano, boldo-grande, assa-peixe ou figatil, que é utilizada

comumente para tratar problemas gastrointestinais, como dores, úlceras, diarreias, náuseas, diabetes e inflamações (SECRETARIA DE CIÊNCIA, 2021). Além disso, já existem estudos que descrevem suas atividades biológicas, como atividade anti-inflamatória, antinociceptiva e anticâncer (SILVA et al., 2011; THOMAS et al., 2016). Essas atividades estão relacionadas com sua composição química, que é rica em compostos fenólicos, como a luteolina e o ácido clorogênico (SECRETARIA DE CIÊNCIA, 2021). Além disso, compostos já foram isolados a partir da *V. condensata*, como o esteroide glicosídeo Vernoniosideo B2, que possui atividade anti-inflamatória e analgésica (VALVERDE et al., 2001). Os compostos bioativos encontrados na *V. condensata*, assim como os que são encontrados em outras fontes naturais, além de desempenharem um papel importante no controle das condições supracitadas, também podem ser importantes no controle das espécies reativas de oxigênio (ERO's) (JOMOVA et al., 2023).

Desta maneira, estudos sobre os compostos químicos presentes na *V. condensata* e suas atividades biológicas são indispensáveis para compreender sua eficácia e seus mecanismos de ação frente ao estresse oxidativo.

Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar o potencial antioxidante dos extratos aquosos das folhas e das flores da *Vernonia condensata*, utilizando modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*.

2 JUSTIFICATIVA

Diante da relação entre o estresse oxidativo e o surgimento de doenças crônicas não transmissíveis (DCNT's), como diabetes, câncer, Alzheimer e Parkinson, doenças que lideram o ranking de mortes de todo o mundo, e que em muitos casos não possuem cura ou tratamento eficaz, somente tratamento paliativo, é de suma importância compreender as implicações do estresse oxidativo na saúde humana, além de buscar por novas fontes de compostos antioxidantes que ajudem a controlar os danos oxidativos que o organismo pode sofrer em condições de estresse, evitando assim o surgimento das condições associada. (HAJAM et al., 2022a; JOMOVA et al., 2023; OMS, sd.).

Para auxiliar no controle do estresse oxidativo visando a prevenção de doenças associadas ao quadro, compostos bioativos de origem vegetal com ação antioxidante são de suma importância para proteger o nosso organismo de danos oxidativos, sendo assim o estudo sobre a composição química de espécies vegetais e os efeitos dos seus metabólitos secundários de suma importância (AYENI et al., 2022; BJØRKLUND et al., 2022; JOMOVA et al., 2024b; PÉREZ-TORRES et al., 2021).

Neste contexto, destaca-se a *Vernonia condensata* (Asteraceae) popularmente utilizada no tratamento de várias doenças e condições, como desconfortos gastrointestinais, diabetes e como um anti-inflamatório, e que devido a presença de compostos bioativos com ação antioxidante, ela pode auxiliar no controle do estresse oxidativo e evitar o aparecimento de condições associadas, como o desenvolvimento de câncer, Alzheimer e diabetes (JOMOVA et al., 2023; SECRETARIA DE CIÊNCIA, 2021).

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Espécies reativas

As espécies reativas são moléculas produzidas naturalmente pelo nosso corpo e que participam de diversos processos fisiológicos que protegem e ajudam a manter a homeostase. A produção de espécies reativas é feita tanto por organelas celulares quanto por algumas células específicas, como as células do sistema imune (SIES; MAILLOUX; JAKOB, 2024).

Entre as organelas responsáveis pela produção endógena de espécies reativas do nosso organismo, estão as mitocôndrias, responsáveis por gerar espécies reativas durante os processos de respiração celular, mais especificamente durante a etapa da cadeia transportadora de elétrons, onde há a geração de espécies reativas de oxigênio – ERO's, como o radical ânion superóxido (O_2^-) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (TIRICHEN et al., 2021). Uma outra organela que é fonte de espécies reativas é o peroxissomo, que durante seus processos metabólicos produz H_2O_2 como subproduto das ações de enzimas que participam no catabolismo de biomoléculas, como lipídeos e aminoácidos (FORRESTER et al., 2018)

Já as células do nosso sistema imune, principalmente as que realizam fagocitose, executam um processo conhecido como explosão oxidativa, onde há uma grande produção de espécies reativas promovidas pela enzima NADPH Oxidase (NOX). Essas espécies reativas serão tanto liberadas no meio extracelular, auxiliando na opsonização de microrganismos e no processo inflamatório proveniente do sistema imune, quanto atuarão dentro do fagossoma, auxiliando na fagocitose realizada pelas células imunes (TAVASSOLIFAR et al., 2020). Ademais, essas espécies reativas quando em excesso podem participar na produção de novas espécies reativas, como o radical hidroxila ($\bullet OH$), formado a partir da reação de Fenton que ocorre a partir do excesso de H_2O_2 . A reação de Fenton consiste na interação de uma molécula de H_2O_2 com um íon ferroso (Fe^{2+}), produzindo um radical $\bullet OH$, um íon férrico (Fe^{3+}) e uma hidroxila (OH^-) (FORMAN; ZHANG, 2021).

Independente da origem das espécies reativas, elas podem ser classificadas de acordo com sua estrutura química quanto a presença/ausência de elétrons. Caso ela possua um ou mais elétrons desemparelhados na sua camada de valência, o radical será caracterizado como uma espécie reativa radicalar, como é o caso do O_2^- , $\bullet OH$ e o óxido nítrico (NO^-). Devido à ausência desse elétron na camada de valência, a molécula torna-se reativa, eletricamente carregada e instável. No entanto, há espécies reativas, como o H_2O_2 , o ácido hipocloroso (HClO) e o oxigênio singlete (O_2) que não possuem elétrons desemparelhados na última camada da sua eletrosfera, portanto são classificados como espécies reativas não radicalares (ZHANG et al., 2019).

As espécies reativas, apesar do importante papel que desempenham para garantir a homeostase do nosso corpo, quando em excesso elas podem desencadear efeitos deletérios, danificando proteínas, lipídeos, carboidratos, ácidos nucleicos e consequentemente danificando as nossas células. Para evitar que o nosso organismo sofra esses danos, nós possuímos um mecanismo de defesa antioxidante, que tem como principal papel neutralizar as espécies reativas e os seus subprodutos, evitando a oxidação de biomoléculas e promovendo a proteção celular (JOMOVA et al., 2023).

3.2 Antioxidantes

Os antioxidantes são moléculas capazes de neutralizar espécies reativas, evitando que biomoléculas, como ácidos nucleicos, lipídeos e proteínas sejam oxidados pela ação das espécies reativas (JOMOVA et al., 2023). Esse sistema é composto por antioxidantes endógenos e é complementado por antioxidantes exógeno, de origem dietética ou pelo uso de suplementos (JOMOVA et al., 2023, 2024a).

3.2.1 Sistema antioxidante endógeno

O sistema de defesa antioxidante endógeno é composto principalmente por três enzimas, a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutathiona peroxidase (GPx), que atuam neutralizando ERO's antes que elas exerçam seus efeitos deletérios em biomoléculas (ALI et al., 2020)

A SOD é a primeira linha de defesa enzimática contra EROs. Essa metaloenzima é responsável por catalisar a conversão de O_2^- em H_2O_2 com auxílio de cofatores metálicos.. No entanto, a SOD é uma metaloenzima, desta maneira, para ela exercer o seu papel, ela necessita de cofatores metálicos, como o magnésio e o zinco. Os humanos expressam 3 isoformas de SOD (SOD-1, SOD-2 e SOD-3), e apesar de todas elas desempenharem a mesma função na

neutralização do radical ânion superóxido, há divergências quanto a sua localização e o seu cofator metálico (ZHANG et al., 2019).

A SOD-1, ou Cu/Zn SOD, está presente principalmente no citoplasma, mas também é encontrada em outras organelas, como o núcleo, peroxissomo e no espaço inter-membrana da mitocôndria, sendo a responsável por catalisar a neutralização de O_2^- formados durante a cadeia transportadora de elétrons. Já a SOD-2, ou MnSOD, está presente na matriz mitocondrial, sendo a principal responsável por controlar os radicais formados durante a cadeia transportadora de elétrons. A SOD-3, ou Cu/ZnSOD, por sua vez, é a única isoforma que é encontrada no meio extracelular, estando presente principalmente em vasos sanguíneos, rins, pulmões e coração (JOMOVA et al., 2024a; ZHANG et al., 2019).

Após a conversão de O_2^- em H_2O_2 pela ação das SOD's, é importante que o H_2O_2 seja neutralizado, antes que ele danifique biomoléculas ou dê origem ao radical $\bullet OH$, que é um radical altamente reativo e deletério. Para isso, os dois principais agentes do nosso organismo são as enzimas Glutationa peroxidase (GPx) e Catalase (CAT) (ALI et al., 2020; ZHANG et al., 2019).

A GPx é a segunda linha de defesa contra os radicais livres, encontrada dentro de células de vários tecidos. Os humanos possuem oito isoformas dessa enzima, sendo 5 delas dependentes de selênio, e responsáveis por catalisarem a conversão de H_2O_2 em água e oxigênio molecular (ALI et al., 2020; JOMOVA et al., 2024a). No entanto, para que esta reação ocorra, a GPx necessita de glutatona reduzida (GSH), que após a neutralização do peróxido de hidrogênio, se tornará glutatona oxidada (GSSH). Para restaurar os níveis de GSH, a enzima Glutationa redutase (GR) irá converter GSSH em GSH, mantendo glutatona reduzida em níveis adequados para o funcionamento de GPx (ALI et al., 2020). Outra enzima que participa da neutralização do H_2O_2 é a CAT. Essa enzima está presente principalmente nos peroxissomos e no citoplasma, e atua catalisando a reação de conversão de H_2O_2 em água e oxigênio molecular (JOMOVA et al., 2024a).

As reações catalisadas por enzimas antioxidantes do sistema antioxidante endógeno estão sintetizadas na Figura 1.

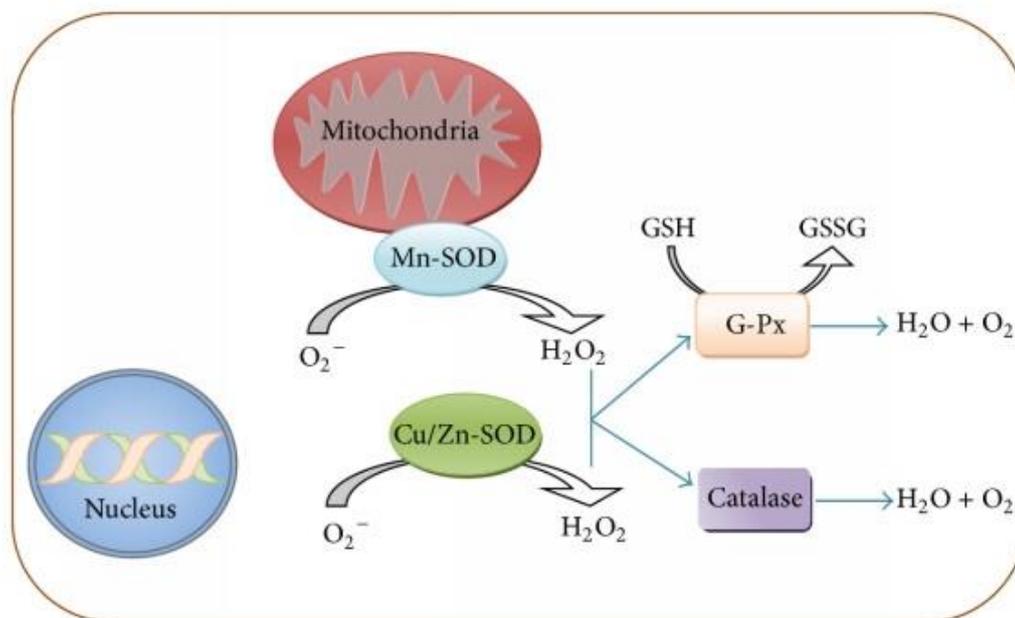


Figura 1. Reações catalisadas por enzimas antioxidantes do sistema antioxidante endógeno. Fonte: (MORET-TATAY et al., 2016)

No entanto, além das enzimas antioxidantes, nosso organismo conta também com antioxidantes não enzimáticos, que auxiliam no controle de espécies reativas, antes que elas danifiquem biomoléculas. Entre os principais antioxidantes não enzimáticos, nós temos o GSH, o ácido úrico, a bilirrubina e a melatonina (MINICH et al., 2022; ZHANG et al., 2019)

O GSH é um tripeptídeo expresso em várias células, sendo mais abundante nos hepatócitos, encontrado tanto no citoplasma quanto em organelas, como mitocôndria e retículo endoplasmático (ROY et al., 2023; ZHANG et al., 2019). Além de contribuir com o ciclo da GPx, graças ao grupo Tiol presente na sua estrutura, o GSH também atua de maneira independente, principalmente reduzindo antioxidantes, como ácido ascórbico e tocoferol, já oxidados. Desta forma, o GSH é um antioxidante de suma importância na regulação do equilíbrio redox, e sua deficiência está relacionada ao surgimento de várias doenças, como doenças neurodegenerativas e câncer (ALI et al., 2020; ZHANG et al., 2019).

Um outro antioxidante não-enzimático é o ácido úrico, que é um produto do metabolismo de purinas, formado ao final da oxidação de guanina e adenina. O ácido úrico está presente em grandes quantidades no plasma sanguíneo, sendo considerado o antioxidante principal do sangue (GHERGHINA et al., 2022; ZHANG et al., 2019). A atividade antioxidante do ácido úrico está intrinsecamente ligada ao meio no qual se encontra. Em um meio aquoso,

ele exerce perfeitamente sua função como um antioxidante, neutralizando várias espécies reativas, como NO^- , HClO e ONOO^- (GHERGHINA et al., 2022; ZHANG et al., 2019). A bilirrubina, originada a partir da conversão de um grupo heme em biliverdina, é um importante antioxidante não-enzimático que protege lipídeos de danos oxidativos (CP, 2021; ZHANG et al., 2019).

Por fim, temos a melatonina, um hormônio com ação antioxidante produzido a partir do triptofano, pela glândula pineal, e pelas células enterocromafins, presentes no trato digestório, onde ocorre a maior produção de melatonina (MINICH et al., 2022). Esse hormônio, além do seu importante papel na regulação do ciclo circadiano, ele é responsável por inibir a ação de espécies reativas, e potencializar a ação das enzimas antioxidantes, SOD, CAT e GPx (MINICH et al., 2022). Além disso, sua presença está relacionada à prevenção de várias doenças relacionadas ao estresse oxidativo e ao envelhecimento, como câncer e doenças neurodegenerativas (MINICH et al., 2022).

Em condições de estresse oxidativo, o nosso sistema antioxidante endógeno pode não ser capaz de controlar o excesso de espécies reativas, desta forma, antioxidantes provenientes da dieta ou de suplementação farmacêutica são importantes agentes para a manutenção do equilíbrio redox (JOMOVA et al., 2024a).

3.2.2 Sistema antioxidante exógeno

Os antioxidantes exógenos complementam e auxiliam os antioxidantes endógenos. Entre os principais antioxidantes exógenos estão aqueles que são provenientes da dieta, como através de suplementação, na sua forma natural ou sintética (MAJUMDER et al., 2021). Entre os principais antioxidantes exógenos estão: ácido ascórbico, tocoferol, carotenoides e os compostos fenólicos (ALI et al., 2020; MAJUMDER et al., 2021; RANA et al., 2022).

O ácido ascórbico, conhecido popularmente como vitamina C, é um antioxidante hidrossolúvel, encontrado em várias fontes vegetais, como acerola, goiaba, morango e kiwi. O ácido ascórbico é absorvido no trato intestinal, e é transportado para vários tecidos do nosso corpo, para exercer o seu papel neutralizando várias espécies reativas, como HOCl , $\bullet\text{OH}$, H_2O_2 , ONOO^- e O_2^- (DOSEDĚL et al., 2021). O ácido ascórbico também protege o DNA e os lipídeos de danos oxidativos, impedindo a sua oxidação, além de promover a ação de outros antioxidantes, como o tocoferol e GSH (DOSEDĚL et al., 2021). Devido a sua importante ação frente aos radicais livres, o ácido ascórbico é considerado um dos principais antioxidantes exógenos para impedir danos oxidativos, e consequentemente o estresse oxidativo (ALI et al., 2020; DOSEDĚL et al., 2021).

A vitamina E (Tocoferol) é um antioxidante lipossolúvel, que possui quatro isoformas, são elas: α -tocoferol, β -tocoferol, γ -tocoferol e δ -tocotrienol. Eles são encontrados em várias fontes vegetais, mas principalmente em nozes, óleos vegetais e sementes, sendo o α -tocoferol a forma mais abundante (ALI et al., 2020). A ação antioxidante do tocoferol, está intrinsecamente relacionada ao grupo hidroxila presente na sua estrutura química, que é capaz de doar átomos de hidrogênio para espécies reativas, impedindo sua ação. Além disso, o tocoferol protege os lipídeos de membrana de danos oxidativos, evitando a peroxidação lipídica. Graças à sua atividade antioxidante, o tocoferol é um importante agente frente ao estresse oxidativo e também na prevenção de várias doenças, como o câncer e a doença de Alzheimer (ALI et al., 2020; JOMOVA et al., 2024a).

Outros antioxidantes lipossolúveis importantes contra a oxidação promovidas por espécies reativas, são os carotenoides, um grupo que inclui compostos como α e β -caroteno, licopeno e zeaxantina (EGGERSDORFER; WYSS, 2018) Esses compostos são encontrados em várias fontes vegetais, como a cenoura, além de ser encontrada também em algas. Os carotenoides são capazes de neutralizar várias espécies reativas, como o radical peroxil lipídico (ROO^{\bullet}), contribuindo com a defesa antioxidante e prevenindo várias doenças, como câncer e disfunções cardíacas (EGGERSDORFER; WYSS, 2018; JOMOVA et al., 2024a).

Um outro grupo de agentes antioxidantes de origem exógena é o grupo dos compostos fenólicos, substâncias encontradas em várias fontes naturais. Eles são caracterizados pela presença de um anel aromático ligado a uma hidroxila, formando um grupo fenol. A partir deste grupo fenol, é possível classificar os compostos fenólicos em diversas categorias, como os ácidos hidrobenzóicos, lignanas, estilbenos e flavonoides. Além disso, é o grupo fenol um dos principais responsáveis pela ação antioxidante dos compostos fenólicos, neutralizando várias espécies reativas a partir da doação de elétrons, impedindo que biomoléculas sejam danificadas, promovendo o equilíbrio-redox e prevenindo doenças associadas ao estresse oxidativo, como câncer, diabetes e doenças cardiovasculares (JOMOVA et al., 2024a; RANA et al., 2022). A Figura 2 apresenta os principais componentes do sistema antioxidante.

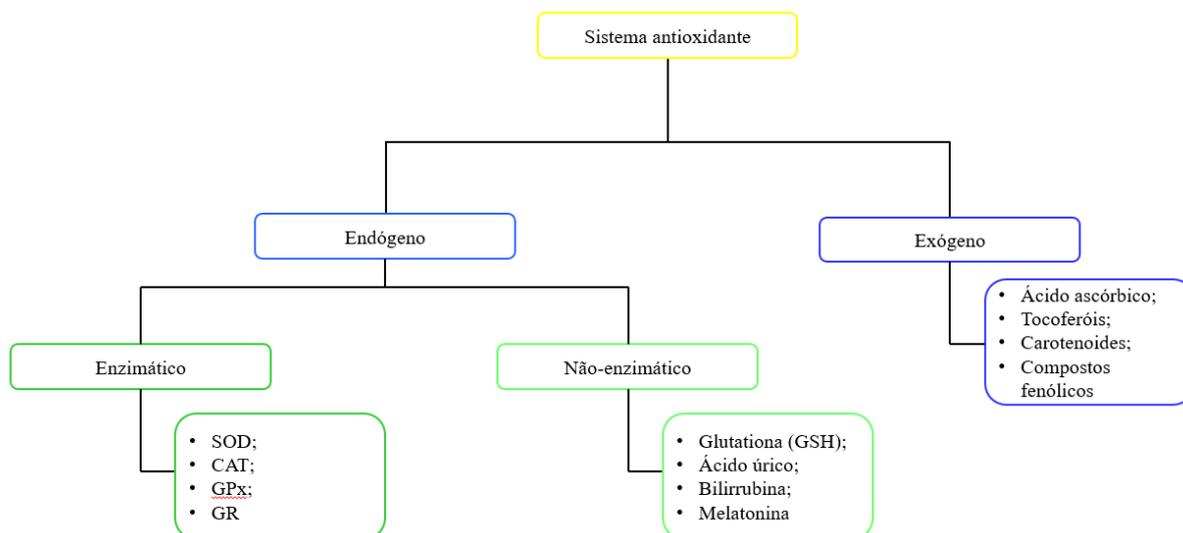


Figura 2. Principais constituintes do Sistema antioxidante e suas respectivas classificações. Fonte: de autoria própria.

3.3 Estresse oxidativo

O estresse oxidativo é uma condição gerada pelo desequilíbrio redox, quando o sistema antioxidante não foi capaz de controlar as espécies reativas no nosso organismo. Este desequilíbrio a favor das espécies reativas, leva a oxidação de lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos e consequentemente à danos celulares (FORMAN; ZHANG, 2021).

Essa oxidação é promovida por espécies reativas, como o radical $\bullet\text{OH}$, que de várias formas irão promover a oxidação das bases nitrogenadas e danificação da estrutura pentose-fosfato do DNA, levando a quebra da dupla fita de DNA. Além disso, as espécies reativas podem hidroxilar as bases nitrogenadas, processo este que está associado a mutações e consequentemente ao surgimento do câncer, por exemplo (FORMAN; ZHANG, 2021). Além disso, a interação entre as espécies reativas, como $\bullet\text{OH}$, O_2^- , HOCl , ONOO^- e H_2O_2 , e proteínas, ocasiona na oxidação dos aminoácidos constituintes das proteínas, levando a desnaturação da estrutura da proteína; perda da função proteica; diminuição na atividade de enzimas; perda de receptores e transportadores (CHAUDHARY et al., 2023; FORMAN; ZHANG, 2021; HAJAM et al., 2022b).

Além da oxidação de biomoléculas, o estresse oxidativo também participa na formação de produtos finais de glicação avançada (AGEs). Esses são originados a partir da interação entre o grupo amino de proteínas com o grupo carbonila de açúcares redutores, através de alterações glicoxidativas promovidas pelas espécies reativas em excesso (FORMAN; ZHANG, 2021). Essas alterações acarretam na diminuição da função celular, impedindo ou diminuindo a

ocorrência de vários processos fisiológicos importantes para a manutenção da homeostase. Além disso, estão relacionados a processos inflamatórios, mutações, envelhecimento celular precoce e ao surgimento de doenças como Parkinson, e diabetes (CHAUDHARY et al., 2023; FORMAN; ZHANG, 2021; HAJAM et al., 2022b). A Figura 3 mostra as principais condições associadas ao estresse oxidativo.

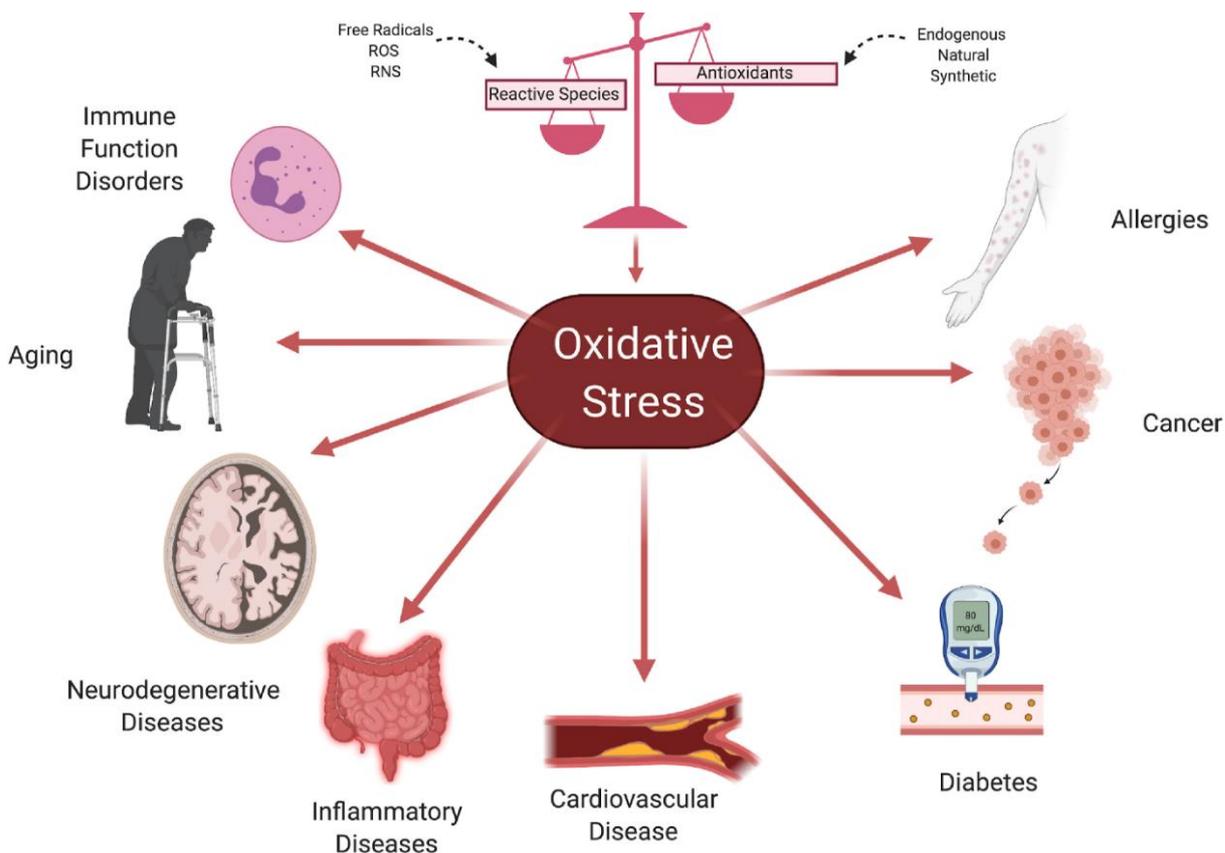


Figura 3. Representação gráfica das principais condições associadas ao estresse oxidativo. Fonte: FLEMING; LUO, 2021.

3.4 Produtos naturais no desenvolvimento de fármacos

Há muitos anos que os produtos naturais vêm sendo agentes de suma importância no desenvolvimento de drogas para a prevenção e o tratamento de várias doenças (ATANASOV et al., 2021). De 1981 e 2019, cerca de 1800 medicamentos foram desenvolvidos, destes, 751 são derivados de produtos naturais (NEWMAN; CRAGG, 2020). Entre os produtos naturais mais notáveis na descoberta de fármacos durante a história, podemos citar o fungo *Penicillium notatum*, que em 1928, foi descoberto por Alexander Fleming que ele era capaz de produzir uma substância com efeito antibacteriano, sendo posteriormente nomeada como penicilina. Aproximadamente após 20 anos, após vários estudos, a penicilina passou a ser comercializada e utilizada para tratar infecções de origem bacteriana (LOBANOVSKA; PILLA, 2017). Com o

passar dos anos, a importância dos produtos naturais na descoberta de novos antibióticos não mudou, nos últimos 40 anos, das 162 drogas antibacterianas descobertas, 90 eram derivadas de alguma forma de algum produto natural (NEWMAN; CRAGG, 2020).

Além da penicilina, ao decorrer dos anos, foram vários os medicamentos descobertos a partir de substâncias provenientes da biodiversidade, como o paclitaxel, um quimioterápico anticancerígeno, proveniente de um fungo endofítico presente nas espécies do gênero *Taxus* (GALLEGO-JARA et al., 2020). Assim como o paclitaxel, o primeiro representante das estatinas, uma classe de medicamentos usada para tratar hipercolesteolemia e hipertrigliceridemia, foi descoberto a partir de um fungo, o *Penicillium citrinum*, e com o passar dos anos, novas variações foram sendo produzidas e aplicadas no tratamento de doenças envolvidas com altos níveis de colesterol e triglicérides (CHESTER; GUINDY, 2021). Além destes exemplos, substâncias de origem animal também são importantes na descoberta de novas drogas, como o veneno da jararaca (*Bothrops jararaca*), que foi utilizado na descoberta do captopril, um medicamento usado no controle da hipertensão (OFFOR; PIATER, 2024).

A sociedade possui interesse nos produtos naturais para auxiliar na descoberta de novas drogas pois estas substâncias possuem vários compostos bioativos, das mais variadas classes químicas. Entre as principais classes estão os compostos fenólicos, alcaloides e terpenos, presentes em espécies vegetais, fungos, algas, produtos apícolas e toxinas de animais. Além dos efeitos farmacológicos no tratamento e prevenção de diversas doenças que essas substâncias podem desempenhar, esses compostos também apresentam atividade antioxidante sendo capazes de controlar o estresse oxidativo e desta forma, também auxiliar no controle de doenças relacionadas ao estresse oxidativo (AYENI et al., 2022; KHALIFA et al., 2019; KOCOT et al., 2018; SOUSA et al., 2017; VENTURELLA et al., 2021).

Como um exemplo da capacidade que produtos naturais tem para controlar o estresse oxidativo, podemos citar os efeitos *in vitro* e *in vivo* promovidos pela polpa de *Dipterix alata*, conhecida como baru, um fruto típico do cerrado, observados por Leite et al. (2020a). Os autores investigaram os efeitos antioxidantes da polpa do fruto, e foram capazes de determinar os efeitos do fruto frente radicais livres *in vitro*, além de ser observado uma atividade antioxidante *in vivo*, utilizando o modelo pré-clínico *C. elegans*, sendo observado uma proteção contra o estresse oxidativo, aumento na expectativa de vida e modulação positiva de enzimas antioxidantes nos animais que receberam a polpa de baru.

Um outro exemplo de um produto da biodiversidade como um agente no controle do estresse oxidativo são os frutos de *Campomanesia adamantium*, que tiveram a sua atividade

antioxidante investigada por De Araújo et al. (2023a). Os autores investigaram os efeitos antioxidantes da polpa dos frutos de *C. adamantium* frente à radicais livres *in vitro* e contra o estresse oxidativo induzido no nematoide *C. elegans*. Foi observado a inibição dos radicais livres DPPH• e ABTS•+, além da proteção frente ao estresse oxidativo induzido em *C. elegans*. Os autores também foram capazes de identificar a modulação positiva de enzimas antioxidantes e da via antioxidante DAF-16, além de terem observado um aumento na expectativa de vida dos animais que foram tratados com a polpa dos frutos de *C. adamantium*.

Desta maneira, a busca por novos compostos oriundos da biodiversidade, capazes de atuarem frente ao estresse oxidativo e condições associadas, aumenta a cada ano.

3.5 Família Asteraceae

A família Asteraceae, pertencente à ordem Asterales, é uma família botânica composta por mais de 1.600 gêneros, e mais de 25.000 espécies que estão espalhados por todo o globo (ROLNIK; OLAS, 2021). Entre os gêneros com o maior número de representantes, podemos citar o gênero *Senecio*, com mais de 1.400 representantes, além do gênero *Vernonia*, com cerca de 500 espécies e o gênero *Cousinia*, que possui mais de 600 representantes (MELO; PEREIRA, 2014; MOHANTA et al., 2023).

As Asteraceae estão espalhadas pelo globo, com exceção da Antártica, sendo encontrada em florestas, áreas de alta altitude e zonas tropicais (ROLNIK; OLAS, 2021). A morfologia das espécies desta família é variada, sendo possível encontrar árvores que apresentam mais de 30 m de altura, como a *Vernonia arborea*, como também é possível encontrar espécies perenes e arbustivas, que podem alcançar até 3 m de altura, como o girassol (*Helianthus annuus*) (ROLNIK; OLAS, 2021).

A família Asteraceae é de grande interesse da sociedade, seja pelo seu uso ornamental, alimentício, como a espécie *Sonchus oleraceus*, conhecida popularmente como serralha, que é típica da região do mediterrâneo e é adicionada à alguns preparos, sendo uma ótima fonte de vitamina A, luteolina e tiamina (KOSTIĆ et al., 2020; ROLNIK; OLAS, 2021). Além disso, a família é de grande interesse devido ao seu potencial farmacológico. Muitas espécies são utilizadas popularmente no tratamento de diversas condições, além de haver extensivos estudos sobre vários representantes, descrevendo sua composição química e suas atividades biológicas (KOSTIĆ et al., 2020; ROLNIK; OLAS, 2022).

Entre os representantes da família mais conhecidos devido ao seu potencial farmacológico, podemos citar a *Artemisia absinthium*, conhecida como losna, oriunda da Europa e do norte da África, e utilizada popularmente no tratamento de helmintíases e de

desconfortos gastrointestinais. Quanto à sua composição química, terpenos, como o geraniol, e compostos fenólicos, como quercetina, apigenina e ácido clorogênico já foram identificados, além de atividade antimicrobiana, antiprotozoária, hepatoprotetora, anti-inflamatória, citotóxica, neuroprotetora e analgésica já descritas (ROLNIK; OLAS, 2021; SZOPA et al., 2020).

Uma outra espécie de grande interesse que pertence à família Asteraceae é a *Taraxacum officinale*, conhecida popularmente como dente-de-leão, e utilizada na medicina popular como um sedativo, além de ser usada para tratar doenças de caráter bacteriano e viral, sendo usada também para aliviar problemas gastrointestinais (MARTINEZ et al., 2015). Quanto aos seus compostos bioativos, triterpenoides, carotenoides, coumarinas, sesquiterpenoides e compostos fenólicos foram identificados, além da descrição da atividade antiviral, anticoagulante, anti-inflamatória, citotóxica e antidiabética (MARTINEZ et al., 2015; ROLNIK; OLAS, 2021)

3.5.1 Gênero *Vernonia*

O gênero *Vernonia*, um dos constituintes da família Asteraceae, segundo alguns autores possui mais de 1.000 espécies (MISHRA et al., 2023), no entanto, as espécies estão passando por processos de revisão taxonômica e certos autores informam que o gênero na verdade possui aproximadamente 500 espécies, com o restante tendo sido agrupado em outros gêneros (MELO; PEREIRA, 2014).

Assim como outros representantes da família Asteraceae, as espécies do gênero *Vernonia* já foram estudadas extensivamente, buscando compreender os seus potenciais farmacológicos (MISHRA et al., 2023). Entre as espécies já estudadas, além do seu uso popular para tratar várias condições, como inflamação e problemas gastrointestinais (DA SILVA et al., 2013a), muitas já tiveram suas atividades biológicas descritas, como o efeito neuroprotetor e anti-diabético de *V. anthelmintica* (DOGRA; KUMAR; KUMAR, 2020), e a atividade antimicrobiana e antimalarial de *V. adoensis* (MASUKU; MOZIRANDI; MUKANGANYAMA, 2023; ZEMICHEAL; MEKONNEN, 2018).

Dentre as espécies mais estudadas do gênero está a *V. condensata* (Figura 4) (que possui outros 2 sinônimos botânicos, *V. amygdalina* e *Gymnanthemum amydalinum*). É uma espécie arbustiva, que pode atingir até 5 metros de altura, nativa da África, que foi trazida para o Brasil durante o período colonial. A espécie possui folhas alongadas, com inflorescências terminais do tipo capítulo. Atualmente a espécie que atualmente é encontrada nas regiões nordeste, centro-oeste e sudeste do Brasil. É conhecida popularmente como “boldo”, “boldo-



bahiano”, “figatil”, “alumã”, “assa-peixe” e “boldo-grande” (SECRETARIA DE CIÊNCIA, 2021). A Figura 4 apresenta uma excisata de *V. condensata*.

Figura 4. Excisata de *V. condensata* depositada no Herbário da Universidade Federal da Grande Dourados. Fonte: de autoria própria.

A espécie é utilizada popularmente para tratar diversas condições, sendo que a folha é a parte vegetal mais comumente usada. Já foi descrito o uso das folhas para tratar diarreia, constipação, desconfortos gastrointestinais, malária, diabetes, febre, problemas hepáticos e para a melhora da digestão (SECRETARIA DE CIÊNCIA, 2021). Outras partes da planta também já tiveram seu uso popular descrito, como as raízes, que são utilizadas para o tratamento de diabetes e malária, e os ramos, utilizados para tratar dor de estômago (SECRETARIA DE CIÊNCIA, 2021).

Em relação aos seus estudos, vários artigos já foram publicados descrevendo variadas atividades biológicas de *V. condensata*, com diferentes partes da planta, mas principalmente as folhas, utilizando diversos solventes e métodos de extração, além da descrição da sua composição química. A Tabela 1 apresenta os principais estudos sobre a composição química e atividades biológicas de *V. condensata* já descritos.

Tabela 1. Estudos sobre a atividade antioxidante e os efeitos sobre condições associadas ao estresse oxidativo de *V. condensata*. Fonte: de autoria própria.

Nome científico	Parte vegetal	Método de extração	Compostos identificados	Atividade Biológica	Referência
<i>Gymnanthemum amygdalinum</i>	Raiz, casca do caule, folhas e flores	Maceração metanólica	Alcaloides, flavonóides, taninos, quinonas e triterpenóides (Compostos presentes nas flores)	Inibição da α -amilase <i>in vitro</i>	VONIA; HARTATI; INSANU (2022)
<i>Vernonia condensata</i>	Folhas	Extração etanólica exaustiva e frações com hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol	Compostos fenólicos, flavonóides	Atividade antioxidante <i>in vitro</i>	SILVA et al (2013)
<i>Vernonia condensata</i>	Folhas	Extração aquosa por infusão	-	Atividade anti-câncer <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	THOMAS et al (2016)
<i>Vernonia condensata</i>	Folhas	Maceração etanólica	Ácido clorogênico, swertisin, luteolina	Atividade gastroprotetora e antioxidante <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	BOEING et al (2016)
<i>Vernonia condensata</i>	Folhas	Maceração etanólica; frações com hexano, diclorometano e acetato de etila	-	Atividade antibacteriana <i>in vitro</i>	SILVA et al (2018)
<i>Vernonia condensata</i>	Folhas	Extração aquosa por decocção	-	Toxicidade <i>in vivo</i>	MONTEIRO et al (2001)
<i>Vernonia condensata</i>	Folhas	Extração etanólica exaustiva	Flavonoides, terpenoides, esteróis, coumarina, taninos, saponinas e óleos voláteis	Atividade antinoceptiva e anti-inflamatória <i>in vivo</i>	SILVA et al (2011)
<i>Vernonia condensata</i>	Folhas	Maceração etanólica; frações com hexano, diclorometano e acetato de etila	Ácido clorogênico, luteolina, apigenina e 1,5-di-O-caffeoylquinic acid	Atividade hepatoprotetora e antioxidante <i>in vivo</i> e atividade anti-inflamatória <i>in vitro</i>	SILVA et al (2018)
<i>Vernonia amygdalina</i>	Folhas	Extração metanólica por infusão	-	Atividade antioxidante e anticâncer <i>in vitro</i>	YEDJOU et al (2022)
<i>Vernonia amygdalina</i>	Folhas	Extração metanólica por infusão	-	Atividade anticâncer <i>in vitro</i>	YEDJOU et al (2022)
<i>Vernonia amygdalina</i>	Folhas	Extração aquosa por infusão	Saponinas, compostos fenólicos, flavonóides, antraquinona, taninos, alcaloides	Atividade antioxidante <i>in vivo</i>	ROTIMI et al (2022)

<i>Vernonia amygdalina</i>	Folhas	Extração aquosa por infusão	Alcaloides	Atividade antidiabética e antioxidante <i>in vivo</i>	ERUKAINURE et al (2019)
<i>Vernonia amygdalina</i>	Flores	Maceração com hexano, clorofórmio e acetona; frações com hexano, hexano:acetato de etila, acetato de etila:metanol, clorofórmio, clorofórmio:metanol	Isolaram 4 compostos não identificados	Atividade antibacteriana e antioxidante <i>in vitro</i>	HABTAMU; MELAKU (2018)
<i>Vernonia amygdalina</i>	Folhas	Maceração com etanol 96%; frações com hexano, hexano:acetato de etila, acetato de etila:metanol, metanol, éter dietil, clorofórmio, água	Flavonóides, alcalóides, triterpenóides	Atividade anticâncer <i>in vitro</i>	HOANG; NGUYEN; BUI (2024)
<i>Vernonia amygdalina</i>	Folhas	Maceração hidroetanólica	-	Atividade anti-hiperglicêmica <i>in vivo</i> e anticâncer <i>in vitro</i>	NKONO et al (2022)
<i>Vernonia amygdalina</i>	Folhas	Extração com metanol, etanol, acetona em conjunto com água; frações com hexano, acetato de etila, isopropanol e etanol	Compostos fenólicos e flavonoides	Inibição da α -amilase e atividade antioxidante <i>in vitro</i>	PATATHANANONE et al (2023)
<i>Vernonia amygdalina</i>	Folhas	Maceração com metanol	Saponinas, antraquinona, alcaloides, flavonoides, lignanas, xantonas, terpenos, esteróides, coumarinas, taninas e terpenóides	Atividade neuroprotetora <i>in vivo</i>	OLADELE et al (2020)
<i>Vernonia amygdalina</i>	Folhas	Maceração com acetato de etila	Alcaloides, compostos fenólicos e terpenos	Atividade anticâncer <i>in vitro</i>	SAMUTRTAI et al (2024)
<i>Vernonia amygdalina</i>	Folhas	Extração por sonicação com etanol 50%, com extrações sucessivas com os resíduos com etanol 50% e com água	-	Atividade anticâncer <i>in vitro</i>	JOSEPH et al (2021)

<i>Vernonia amygdalina</i>	Folhas	Frações com hexano, acetato de etila e etanol	Ácido clorogênico, luteolina, apigenina, e outros compostos fenólicos, além de terpenos	Atividade anticâncer <i>in vitro</i>	HASIBUAN et al (2020)
<i>Vernonia amygdalina</i>	Folhas	Extração por infusão	Quercetina e epi-catequina	Atividade antioxidante e anti-diabética <i>in vitro</i> e <i>ex vivo</i>	ERUKAINURE et al (2018)

3.6 Modelo para estudos pré-clínicos *Caenorhabditis elegans*

Caenorhabditis elegans é um organismo vermiforme de vida livre, de cerca de 1 mm de comprimento, pertencente ao filo Nematoda. Os nematoides são encontrados em regiões temperadas, onde habitam solos ricos em matéria orgânica. O seu uso como um modelo para estudos *in vivo* teve início na década de 70, quando o pesquisador e biólogo sul-africano Sydney Brenner começou a estudar organismos do gênero *Caenorhabditis* para a realização de ensaios de Biologia Molecular. Atualmente o nematoide vem sendo cada vez mais empregado na realização de ensaios pré-clínicos, devido ao fato de o nematoide possuir uma série de características vantajosas na realização de estudos *in vivo* (CORSI; WIGHTMAN; CHALFIE, 2015; HUNT, 2017).

Entre suas características que tornam a sua utilização vantajosa estão o fato de que o nematoide possui um curto ciclo de vida, levando cerca de 3 dias para atingir a fase adulta e vivendo em média 25 dias. O ciclo de vida dos nematoides é dividido em 6 estágios de desenvolvimento, sendo eles: ovo, estágio larval L1, L2, L3, L4 e adulto (CORSI; WIGHTMAN; CHALFIE, 2015). No entanto, em condições não propícias para o desenvolvimento, como baixas temperaturas ou baixa disponibilidade de alimento, animais em estágio L2 podem entrar em um processo de dormência, conhecido como dauer, onde eles param o seu metabolismo até que as condições melhorem, reativando o seu metabolismo e se tornando um animal em estágio L4, não passando pelo estágio L3 (CORSI; WIGHTMAN; CHALFIE, 2015). Quanto aos seus aspectos sexuais e reprodutivos, a grande maioria dos nematoides são hermafroditas, sendo que um único indivíduo é capaz de gerar, através de autofecundação, aproximadamente 300 ovos durante o seu período reprodutivo, sendo capazes de produzir aproximadamente 1000 ovos caso realizem a reprodução com machos. A Figura 5 sintetiza o ciclo de vida do nematoide. (CORSI; WIGHTMAN; CHALFIE, 2015).

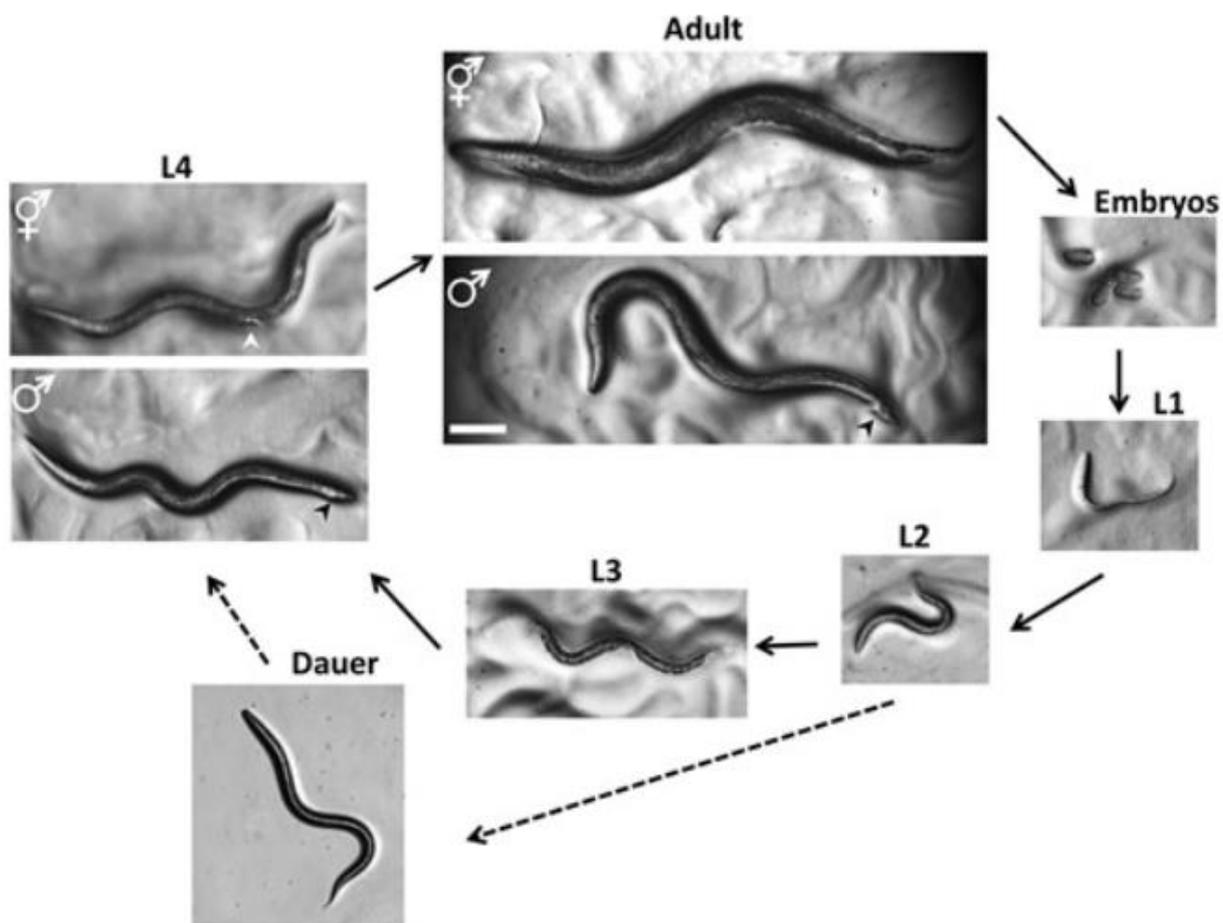


Figura 5. Representação com microscopias do nematoide *Caenorhabditis elegans* para apresentar o seu ciclo de vida, apresentando todos os seus estágios de desenvolvimento, do ovo ao animal adulto, além de mostrar o animal no estágio dauer e o seu dimorfismo sexual quando adulto, identificando o animal hermafrodita e macho. Fonte: CORSI; WIGHTMAN; CHALFIE, 2015.

Uma outra vantagem é o fato que esses animais possuem um corpo transparente, permitindo análises de microscopia para a realização de ensaios moleculares e bioquímicos (CORSI; WIGHTMAN; CHALFIE, 2015). Além disso, o *C. elegans* foi o primeiro organismo pluricelular a ter o seu genoma completamente sequenciado, com a identificação de vários genes envolvidos em variados processos celulares, além de 80% de genes homólogos aos genes humanos, e várias vias conservadas (CORSI; WIGHTMAN; CHALFIE, 2015; MUDD; LICEAGA, 2022).

Devido à essas características, o uso dos nematoides para a realização de ensaios é muito vantajoso. Atualmente, uma ampla gama de estudos são realizados utilizando esses animais, avaliando a toxicidade de compostos e também estudando doenças humanas, como obesidade, câncer e doenças neurodegenerativas. Esses estudos tornam-se possíveis pois são

produzidos *C. elegans* mutantes, que possuem uma alteração no seu genoma para expressarem genes e proteínas envolvidas em doenças humanas. Como um exemplo, temos a cepa mutante CL2006, que expressa placas da proteína β -amilóide, que está intrinsicamente envolvida na patogênese e progressão da doença de Alzheimer, sendo assim possível realizar estudos pré-clínicos em um modelo *in vivo* para avaliar o potencial anti-Alzheimer de compostos (ALVAREZ et al., 2022; HUNT, 2017; SHEN; YUE; PARK, 2018).

Além disso, através do uso de proteínas fluorescentes, como a proteína verde fluorescente, é possível marcar proteínas e enzimas e observar a partir de técnicas de microscopia com fluorescência eventos bioquímicos, moleculares e de modulação de vias e de atividades enzimáticas, como é o caso da cepa mutante CF1553, que possui a enzima SOD-3 marcada com uma proteína fluorescente, e é utilizada para avaliar a modulação da atividade dessa enzima promovida por compostos (DE ARAÚJO et al., 2023a).

permitindo a sua utilização para realização de ensaios de toxicidade de compostos, mas também para investigar várias doenças e condições, como obesidade, Alzheimer, Parkinson, envelhecimento e câncer. Esses estudos são possíveis devido à presença de genes homólogos ao metabolismo e à doenças humanas, como DAF-16 (CERÓN, 2023; HUNT, 2017; RANI et al., 2023; SHEN; YUE; PARK, 2018).

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Investigar a composição química e avaliar a atividade antioxidante dos extratos aquosos das folhas e flores de *Vernonia condensata* *in vitro* e *in vivo*.

4.2 Objetivos específicos

- Coletar o material vegetal de *V. condensata* e preparar o extrato aquoso das folhas de *Vernonia condensata* (EAVc-F) e o extrato aquoso das flores de *Vernonia condensata* (EAVc-FI);
- Investigar a composição química de EAVc-F e EAVc-FI a partir da determinação do teor de compostos fenólicos totais e flavonoides totais;
- Avaliar a capacidade dos extratos de capturar os radicais livres de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil);
- Determinar a capacidade dos extratos de proteger moléculas de DNA contra a oxidação promovida por peróxido de hidrogênio e radiação ultravioleta;
- Avaliar a capacidade dos extratos de proteger moléculas de proteínas contra a oxidação promovida por AAPH (2,2'-Azobis(2-methylpropionamide) dihydrochloride);

- Analisar a toxicidade subcrônica dos extratos no nematoide *Caenorhabditis elegans*;
- Investigar o efeito protetor dos extratos contra o estresse oxidativo induzido por Juglone (5-hidroxi-1,4-naftalenodiona) em *Caenorhabditis elegans*.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Coleta do material vegetal e preparo do extrato

O material vegetal foi coletado na cidade de Dourados, no estado do Mato Grosso do Sul, Brasil (90 °L 22°14 '4 "S 54°46'41 °O), após a autorização do Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado – SISGEN, sob número de cadastro A9CF765. As folhas e flores foram separadas, lavadas em água corrente e foram secas em estufa de circulação de ar à 40 °C por 6 dias. Após a secagem, o material vegetal foi triturado em moinho de facas e o pó foi submetido a uma infusão aquosa exaustiva. O solvente foi retirado por liofilização. Ao final do processo, foi obtido o extrato aquoso das folhas de *Vernonia condensata* (EAVc-F) e o extrato aquoso das flores de *Vernonia condensata* (EAVc-Fl). Uma exsicata foi depositada no herbário da Universidade Federal da Grande Dourados, sob o número 6393.

5.2 Composição química

5.2.1 Determinação de compostos fenólicos totais

Para determinar o teor de compostos fenólicos presentes no extrato aquoso das folhas (EAVc-F) e das flores (EAVc-Fl) de *V. condensata*, o método descrito por De Araújo et al (2023) foi realizado. Para isso, 500 µL dos extratos (500 µg/mL) foi adicionado a 2,5 mL de uma solução de Folin-Ciocalteu 2,5%. Esta mistura foi incubada no escuro em temperatura ambiente por 5 minutos. Após o intervalo, foi adicionado à mistura 2 mL de uma solução de carbonato de sódio (Na₂CO₃) 14%. A mistura foi homogeneizada e incubada em temperatura ambiente, protegida da luz, por 2 horas. Ao final do período de incubação, as amostras foram lidas em espectrofotômetro a 760 nm. Como referência, uma curva de calibração com ácido gálico (0,0004-0,0217 mg/mL) foi feita. O teor de compostos fenólicos presentes no EAVc-F e no EAVc-Fl foi representado como mg equivalente ao ácido gálico/g do extrato. O experimento foi realizado em triplicata.

5.2.2 Determinação de flavonoides totais

Para determinar o teor de flavonoides presentes no extrato aquoso das folhas (EAVc-F) e das flores (EAVc-Fl) de *V. condensata*, o método descrito por De Araújo et al (2023) foi

realizado. Para este fim, 500 µL dos extratos (500 µg/mL) foi adicionado a 4,5 mL de uma solução metanólica de cloreto de alumínio (AgCl₃) 2%. A mistura foi homogeneizada e mantida em temperatura ambiente, protegida da luz, por 30 minutos. Após o intervalo, as amostras tiveram sua absorvância medida em espectrofotômetro a 415 nm. Uma curva de calibração de quercetina (0,0004-0,0217 mg/mL) foi utilizada como referência. O teor de flavonoides presentes nos extratos foi expresso como mg equivalente a quercetina/g do extrato. O experimento foi realizado em triplicata.

5.3 Ensaio *in vitro*

5.3.1 Captura de radicais livres de DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazil)

O ensaio de captura de radicais livres DPPH• foi realizado para avaliar a atividade antioxidante *in vitro* de EAVc-F e EAVc-Fl. O ensaio foi realizado de acordo com o método descrito por Ferreira et al (2023). Para isso, 1800 µL de uma solução DPPH• 0,11 mM em etanol 80% foi misturado com 200 µL de diferentes concentrações dos extratos (0,1-2000 µg/mL). As amostras foram incubadas em temperatura ambiente, longe da luz, por 30 minutos e então tiveram sua absorvância medida em espectrofotômetro T70 UV/Vis (PG Instruments Limited, Leicestershire, Reino Unido) a 517 nm. Como controles positivos, foram utilizados dois antioxidantes sintéticos, o ácido ascórbico e o butilhidroxitolueno (BHT). Após a realização da curva de inibição, o IC₅₀ (Concentração mínima para inibir 50% dos radicais livres) foi calculado a partir da absorvância do controle (200 µL de etanol 80% + 1800 µL de DPPH•) e a absorvância da amostra, de acordo com a seguinte equação:

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

Foram realizados dois experimentos independentes em triplicata.

5.3.2 Oxidação de DNA

Para avaliar a proteção promovida pelos extratos em DNA frente a danos oxidativos, foi realizado o ensaio de oxidação de DNA induzido por peróxido de hidrogênio e radiação UV de acordo com o método descrito por Monteiro-Alfredo et al (2020). Para isso, 4 µL de DNA genômico extraído de células da linhagem K562 foi incubado com 4 µL de diferentes concentrações de EAVc-F ou EAVc-Fl (10-1000 µg/mL) e 4 µL de H₂O₂. Em seguida, as amostras foram incubadas em transiluminador UVT-312 a 302 nm, que emite radiação UVB, por 5 minutos, para que fosse induzida fotólise do H₂O₂ por radiação ultravioleta para formar radicais hidroxila, os quais promovem danos ao DNA. Após a fotólise, foi realizada uma

eletroforese em gel de agarose 2% com brometo de etídio, com posterior fotodocumentação utilizando Gel Doc™ EZ System. Como controle, foram realizados os seguintes tratamentos: DNA incubado somente com PBS 1x (Tampão salina fosfato) com ou sem incubação no transiluminador; DNA incubado com H₂O₂ e incubação no transiluminador; DNA incubado somente com os extratos. Foram realizados dois experimentos independentes.

5.3.3 Oxidação da albumina sérica bovina

Para investigar a proteção promovida pelos extratos frente a oxidação de proteínas induzida por AAPH, o ensaio de oxidação de albumina bovina sérica foi realizado conforme o método descrito por Monteiro-Alfredo et al (2020). Para esse fim, 15 µL de albumina sérica bovina foi pré-incubada com 15 µL de diferentes concentrações de EAVc-F ou EAVc-FI (10-1000 µg/mL) por 30 minutos a 37°C em um termociclador. Após o período de pré-incubação, as amostras receberam 15 µL de uma solução de AAPH 225 mM (Concentração final de 75 mM) e foram incubadas por 2 horas a 37°C em um termociclador. Ao fim da incubação, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilada 10%. Em seguida, os géis foram fotodocumentados utilizando Gel Doc™ EZ System. Como controle, foram realizados os seguintes tratamentos: BSA incubada somente com água ultra pura; BSA incubada somente com AAPH 75 mM; BSA incubado somente com os extratos. Foram realizados dois experimentos independentes em duplicata.

5.4 Ensaios in vivo

5.4.1 Cultura e manutenção dos nematoides *Caenorhabditis elegans*

Os nematoides *Caenorhabditis elegans* N2 *Bristol* foram utilizados para a realização dos ensaios *in vivo*. Os animais foram obtidos do *Caenorhabditis Genetics Center* (CGC), Minnessota, EUA. Os nematoides foram mantidos em estufas B.O.D a 20 °C em placas de petri com ágar NGM (*Nematode Growth Medium*) e foram alimentados com bactéria *Escherichia coli* OP50. Para a realização dos experimentos, os nematoides foram sincronizados, para que estivessem no estágio de desenvolvimento larval L4, de acordo com o método descrito por Stiernagle (2006). Em resumo, as placas foram lavadas com 3,5 mL de tampão M9, o líquido foi transferido para um tubo Falcon e foi adicionado 1 mL de hipoclorito 2,5% e 500 µL de hidróxido de sódio (NaOH) 5M. Os tubos foram homogeneizados por 5 minutos, para provocar a lise dos animais, resultando em uma solução contendo somente os ovos resistentes à lise. Em seguida, o líquido foi centrifugado a 1300 rpm por 1 minuto e o sobrenadante foi descartado, sendo adicionado, posteriormente, cerca de 10 mL de tampão M9. Os tubos foram

homogeneizados e novamente centrifugados a 1300 rpm por 1 minuto, com posterior descarte do sobrenadante. O pellet contendo os ovos dos animais foi transferido para novas placas de ágar NGM com *E. coli* OP50, que foram incubadas por 48 horas em B.O.D a 20 °C, para que os nematoides atingissem o estágio L4 (STIERNAGLE, 2006)

5.4.2 Letalidade sub-crônica

A partir dos resultados obtidos nos ensaios *in vitro*, o EAVc-FI foi selecionado para a realização dos ensaios *in vivo*. O ensaio de letalidade sub-crônica foi realizado para determinar uma faixa de concentrações seguras para a realização de ensaios posteriores. Desta maneira, o ensaio foi realizado de acordo com o método descrito por Leite et al (2020). Para isso, cerca de 10-20 animais em estágio L4 foram transferidos manualmente, com o auxílio de um fio de platina, para uma placa de 96 poços contendo 100 µL de tampão M9 em cada poço. Em seguida, foi adicionada em cada poço 100 µL de diferentes concentrações de EAVc-FI (10-1000 µg/mL). As placas foram incubadas a 20 °C por 48 horas e a viabilidade dos nematoides foi aferida após 24 e 48 horas. Os animais foram considerados mortos quando não responderam ao toque do fio de platina. Como controle, nematoides foram incubados somente com tampão M9. Foram realizados dois experimentos independentes em triplicata.

5.4.3 Estresse oxidativo induzido por Juglone (5-hidroxi-1,4-naftalenodiona)

Para avaliar o efeito protetor do extrato aquoso das flores de *V. condensata* frente ao estresse oxidativo induzido por 5-hidroxi-1,4-naftalenodiona – Juglone, o ensaio de estresse oxidativo foi realizado conforme o método descrito por De Araújo et al. (2023). Para isto, cerca de 10 nematoides sincronizados em estágio L4 foram transferidos para uma placa de 96 poços contendo 100 µL de tampão M9. Após a transferência, os animais foram pré-tratados com 100 µL do EAVc-FI (250-1000 µg/mL), por 1 hora a 20°C. Ao final do período de pré-tratamento, os nematoides foram expostos à 50 µL de Juglone (5-hidroxi-1,4-naftalenodiona) (250 µM). A viabilidade dos animais foi aferida a cada hora, durante um período total de 6 horas, por meio da resposta ao toque do fio de platina. Como controle, foram utilizados animais incubados com tampão M9 e animais que receberam tampão M9 e Juglone 250 µM. Foi realizado dois experimentos independentes em triplicata.

5.5 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o *software* GraphPad Prism 9.0. Os resultados estão expressos como média ± EPM. O IC₅₀ foi determinado através de regressão

não linear. A concentração de compostos fenólicos e flavonoides totais foi determinada através de uma regressão linear. A análise ANOVA univariada com pós-teste de Dunnet foi utilizada para comparar dois ou mais grupos. Os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

6 RESULTADOS

6.1 Quantificação de compostos fenólicos e flavonoides totais

Ao analisar a composição química de ambos os extratos, foi possível quantificar o teor de compostos fenólicos e flavonoides totais presentes no EAVc-F e EAVc-Fl. A Tabela 2 apresenta os resultados obtidos. O EAVc-F apresentou um menor teor de compostos fenólicos quanto de flavonoides, enquanto o EAVc-Fl demonstrou possuir uma quantidade maior de compostos fenólicos quase 3 vezes maior que o EAVc-F, e apresentou cerca de 2 vezes mais flavonoides que extrato das folhas.

Tabela 2. Teor de compostos fenólicos e de flavonoides presentes nas folhas e flores de *V. condensata*.

Amostras	Compostos fenólicos totais (mg de EAG/100 g)	Flavonoides totais (mg de EQ/100 g)
EAVc-F	19,15	6,3
EAVc-Fl	52,1	14,38

6.2 Ensaios *in vitro*

6.2.1 Captura de radicais livres de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil)

Os resultados obtidos no ensaio de captura de radicais livres de DPPH• estão expressos como concentração necessária para inibir 50% dos radicais livres de DPPH• (IC₅₀) (Tabela 3). Ambos os extratos atingiram o IC₅₀, com o IC₅₀ do EAVc-Fl apresentou um IC₅₀ muito semelhante ao do controle BHT, com uma diferença de aproximadamente 15%, além de ser 41% menor que o IC₅₀ apresentado pelo EAVc-F.

Tabela 3. Atividade inibitória do radical livre DPPH• promovida pelo extrato aquoso das folhas (EAVc-F) e das flores (EAVc-FI) de *V. condensata*.

Amostras	IC ₅₀ (µg/ml)	Inibição máxima (%)	(µg/ml)
Ácido Ascórbico	2,59 ± 0,65	92,6 ± 1,4	500
BHT	24,31 ± 1,7	90,1 ± 2,2	500
EAVc-F	68,64 ± 1,6	86,2 ± 4,05	1000
EAVc-FI	28,3 ± 6,9	89,4 ± 1,05	1000

Valores expressos como média ± EPM

6.2.2 Oxidação de DNA

Ambos os extratos foram capazes de proteger o DNA genômico contra os danos oxidativos promovidos pelo H₂O₂ e radiação UV, como é possível observar na Figura 6A-D. O EAVc-F protegeu contra a oxidação do DNA de maneira significativa a partir da concentração de 100 µg/mL, atingindo uma proteção máxima contra a oxidação de cerca de 78% na maior concentração avaliada (1000 µg/mL). Já o EAVc-FI só foi capaz de impedir a oxidação do DNA de maneira significativa a partir da concentração de 250 µg/mL, atingindo uma proteção máxima de cerca de 83% na concentração de 1000 µg/mL.

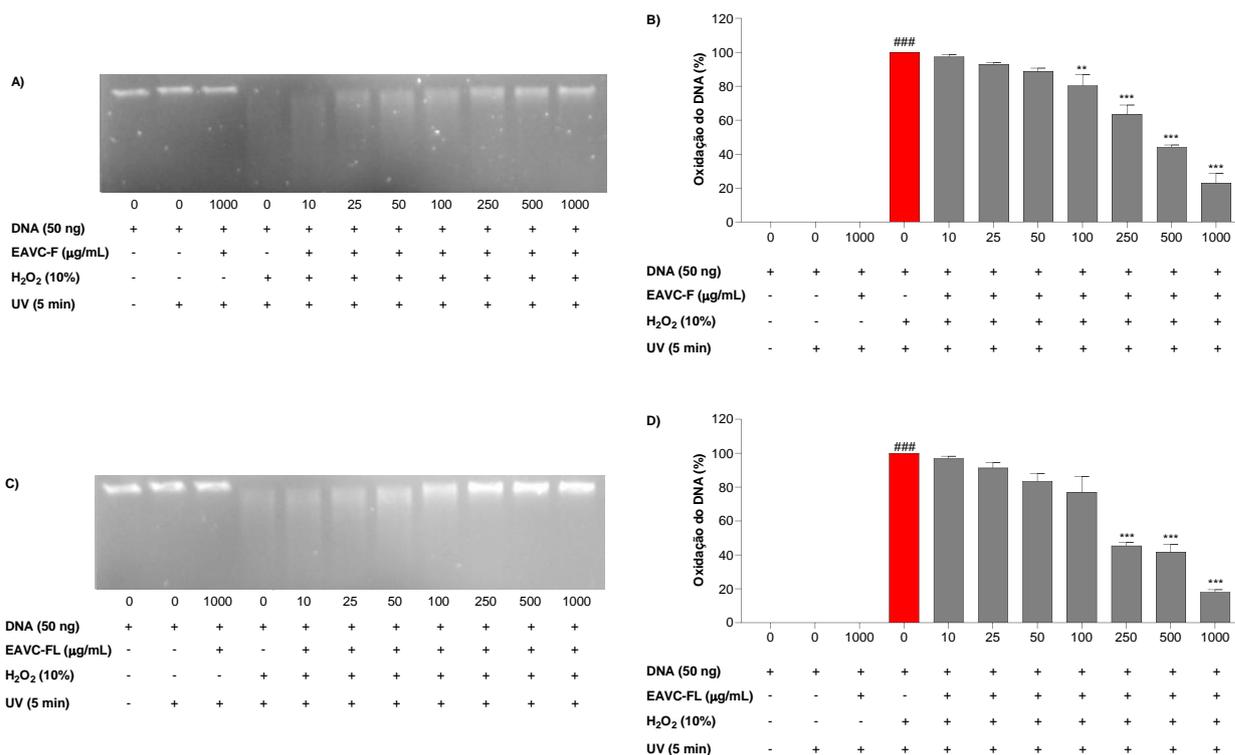


Figura 6. Efeito protetor do extrato aquoso das folhas (EAVc-F) (A-B) e das flores (EAVc-Fl) (C-D) contra a oxidação de DNA promovida por H₂O₂ e radiação UV. Dados obtidos a partir da análise de 2 géis de experimentos independentes. Valores expressos como média ± EPM. #####P < 0.0001 versus Controle negativo; *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 versus DNA+H₂O₂-UV.

6.2.3 Oxidação da albumina sérica bovina

Conforme é possível observar na Figura 7A-D, os dois extratos apresentaram proteção significativa contra a oxidação de proteínas em todas as concentrações avaliadas. Ambos os extratos apresentaram uma proteção semelhante, de cerca de 93% na concentração de 1000 µg/mL. Porém, o EAVc-Fl apresentou uma proteção estatisticamente mais significativa do que a proteção promovida pelo EAVc-F.

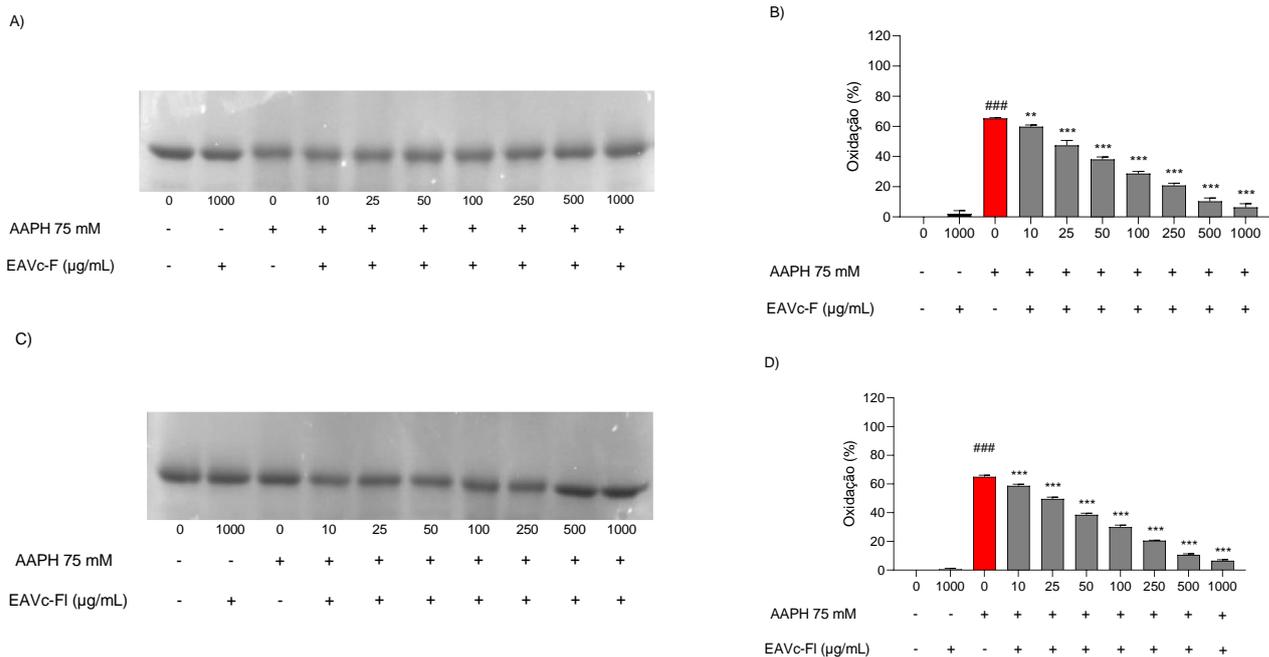


Figura 7. Efeito protetor do extrato aquoso das folhas (EAVc-F) (A-B) e das flores (EAVc-FI) (C-D) de *V. condensata* contra a oxidação de BSA promovida por AAPH. Dados obtidos a partir da análise de 4 géis de 2 experimentos independentes. Valores expressos como média \pm EPM. #####P < 0.0001 versus Controle negativo; *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 jversus AAPH.

6.3 Ensaios *in vivo*

6.3.1 Letalidade sub-crônica

Conforme é possível observar na Figura 8, no ensaio de letalidade sub-crônica, o EAVc-FI não promoveu redução da viabilidade do nematoide *C. elegans* em nenhum dos dois períodos avaliados, em nenhuma das concentrações testadas.

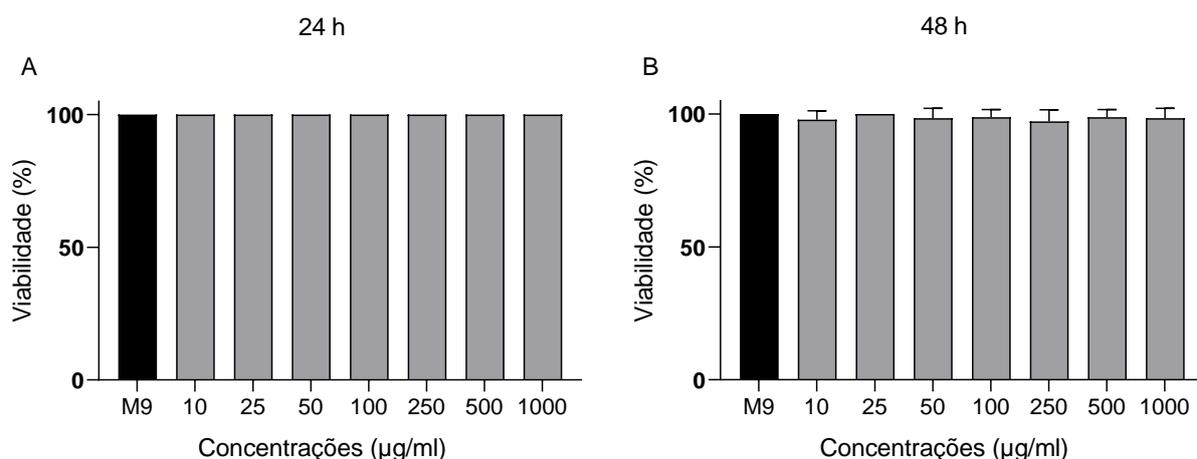


Figura 8. Efeito do extrato aquoso das flores (EAVc-FI) de *V. condensata* sobre a viabilidade do nematoide *C. elegans* após exposição por 24 (A) e 48 (B) horas. Os dados foram obtidos a partir de 2 experimentos independentes realizados em triplicata. Os valores estão expressos como média \pm EPM.

6.3.2 Estresse oxidativo induzido por Juglone

Na Figura 9 é possível observar os resultados obtidos no ensaio de estresse oxidativo induzido por Juglone em *C. elegans* tratados com diferentes concentrações do extrato aquoso das flores de *V. condensata*. Foi possível observar uma atenuação na redução da viabilidade dos nematoides tratados com as concentrações de 250, 500 e 1000 µg/mL do EAVc-FI. A atividade antioxidante foi mais pronunciada nas duas maiores concentrações, que até a terceira hora de avaliação atuaram de maneira muito semelhante. Porém, na quarta hora, somente a concentração de 1000 µg/mL foi capaz de proteger significativamente os nematoides contra os danos oxidativos produzidos pelo agente oxidante Juglone.

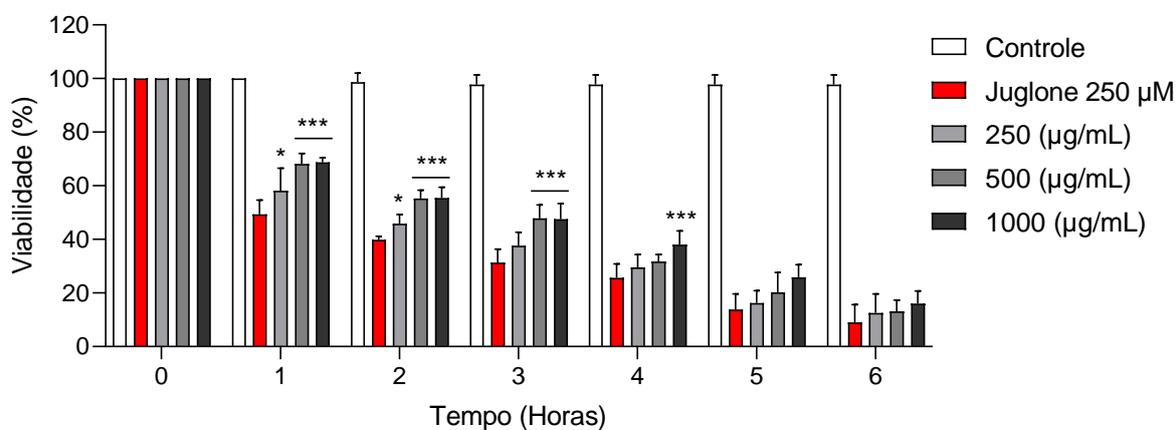


Figura 9. Efeito do extrato aquoso das flores (EAVc-FI) frente ao estresse oxidativo induzido por Juglone no nematoides *C. elegans* durante um período de 6 horas. Os valores estão expressos como média \pm EPM. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 versus o grupo Juglone.

7 DISCUSSÃO

Espécies vegetais são organismos de grande interesse farmacológico pois possuem metabólitos secundários, como os compostos fenólicos, são uma importante fonte dietética de componentes do sistema antioxidante exógeno do nosso organismo, atuando em conjunto com o sistema antioxidante endógeno frente as espécies reativas e o estresse oxidativo (ALI et al., 2020; JOMOVA et al., 2024a). Esse estudo é o primeiro a descrever o efeito antioxidante *in vivo* das flores de *V. condensata* no modelo de estudos *in vivo* pré-clínico *C. elegans*. Além de ser o primeiro trabalho que descreve a capacidade de ambas as partes vegetais de protegerem moléculas de danos oxidativos, sendo um importante parâmetro em estudos sobre estresse oxidativo.

Desta maneira, ao estudar o potencial biológico de espécies vegetais, é de suma importância compreender a sua composição química, para entender melhor os seus possíveis efeitos e mecanismos de ação associados a seus compostos bioativos. Tanto no extrato das folhas, quanto no extrato das flores de *V. condensata*, compostos fenólicos e flavonoides foram identificados, corroborando com dados da literatura, onde foram encontrados compostos fenólicos como o ácido clorogênico, um composto pertencente à classe dos ácidos fenólicos, e flavonoides, como apigenina, quercetina e luteolina em diferentes partes vegetais de *V. condensata* (DA SILVA et al., 2013a; BOEING et al., 2016; ERUKAINURE et al., 2019a). Porém, o EAVc-FI apresentou um maior teor tanto de compostos fenólicos quanto de flavonoides, quando comparado ao EAVc-F. Essa diferença na composição química pode estar relacionada ao período de desenvolvimento na planta, já que durante o período de floração, pode haver uma maior concentração de metabólitos secundários nas flores, conforme o que foi observado por (FEDURAEV et al., 2019).

A presença destes compostos pode explicar a atividade antioxidante *in vitro* apresentada por ambos os extratos, na captura direta dos radicais livres de DPPH. Essa atividade se deve ao fato de que a estrutura característica dos compostos fenólicos, que é um anel aromático ligado à um grupo hidroxila, formando um grupo fenol, está intrinsecamente associado à atividade antioxidante destas substâncias (OLSZOWY, 2019; ZEB, 2020).

Tanto o anel aromático, quanto a hidroxila, que constituem o grupo fenol presente em compostos fenólicos, são responsáveis por sua atividade antioxidante, pois são eles quem estabilizam os radicais livres, através da doação de prótons de hidrogênio e também pela doação de elétrons. A quantidade destes grupos, principalmente de hidroxilas, está relacionada ao efeito

reduzidor destes compostos, pois quanto maior o número de hidroxilas e anéis aromáticos, maior a sua atividade antioxidante, como é observado nos flavonoides, que possuem pelo menos dois anéis aromáticos ligados a duas hidroxilas cada, quando comparados aos ácidos carboxílicos, com somente um anel aromático (DIAS; PINTO; SILVA, 2021; ZEB, 2020). Além disso, outros grupos, como o grupo carboxílico, presentes em alguns compostos fenólicos, como o ácido gálico, também estão associados à atividade antioxidante desta classe de metabólitos (ZEB, 2020). Além disso, a diferença na composição química que há entre EAVc-F e EAVc-Fl, onde foi observado uma presença maior de compostos fenólicos e flavonoides, explica a diferença na capacidade dos extratos de inibir os radicais livres, sendo um dos motivos que justifica o menor IC₅₀ do EAVc-Fl, pois este extrato possui um maior teor de fenólicos e flavonoides.

É de suma importância que produtos naturais em estudo sejam capazes de inibir a ação de espécies reativas, pois quando em excesso, são capazes de oxidar biomoléculas, levando a perda de função proteica, mutações e mal formação de proteínas. Ambos os extratos de *V. condensata* foram capazes de impedir a oxidação de DNA e de proteínas *in vitro*, provavelmente devido à presença de compostos fenólicos e flavonoides identificados neste estudo (GARGOURI et al., 2011; TAJIK et al., 2017; HUSSAIN et al., 2024; JAVADI; SOBHANI, 2024). Entre as substâncias presentes que podem ter sido as responsáveis pelo efeito de proteção contra a oxidação de biomoléculas, estudos anteriores já encontraram compostos como ácido clorogênico, luteolina e apigenina, metabólitos secundários que já foram descritos como capazes de proteger biomoléculas contra oxidação promovidas por espécies reativas. Esses compostos são capazes de proteger o DNA da oxidação, por impedir a quebra da fita dupla de DNA e a oxidação de bases nitrogenadas, além de também proteger proteínas da carboxilação característica que elas sofrem quando em contato com espécies reativas (DEMIRCI-ÇEKIÇ et al., 2022; PISOSCHI et al., 2021). Além disso, a ação antioxidante mais pronunciada do EAVc-Fl pode ser devido à diferença na composição química dos extratos, pois o extrato das flores apresentou um maior teor de fenólicos e flavonoides, compostos estes que sabidamente possuem atividade antioxidante (ZEB, 2020).

Desta forma, os extratos se mostram como agentes em potencial não só no controle direto das espécies reativas, mas de condições associadas ao seu excesso, como danos às biomoléculas, característico de um quadro de estresse oxidativo (PISOSCHI et al., 2021).

Levando em conta a atividade antioxidante *in vitro* dos extratos, onde foi observado um efeito mais proeminente do extrato das flores de *V. condensata*, este foi selecionado para a

realização dos ensaios *in vivo*, utilizando o modelo pré-clínico *C. elegans*. Antes de avaliar o efeito antioxidante das flores de *V. condensata in vivo*, foi determinada uma curva de concentrações seguras do extrato, onde foi observado que nenhuma das concentrações avaliadas diminuiu a viabilidade dos nematoides.

A partir disso, os nematoides *C. elegans* foram induzidos ao estresse oxidativo utilizando uma quinona sintética, conhecida como Juglone, que é capaz de aumentar a produção de EROs (AHMAD; SUZUKI, 2019). Foi observado que os nematoides tratados com o extrato foram capazes de sobreviver às condições de estresse, quando comparados aos animais que só foram expostos ao agente oxidante. Esse efeito protetor frente ao estresse oxidativo induzido por Juglone nos nematoides pode estar associado à vários mecanismos, como a inibição dos radicais livres produzidos pelo Juglone, realizada pelos compostos fenólicos e flavonoides já identificados no EAVc-FI, como também a modulação positiva de vias envolvidas na resposta antioxidante, como a regulação de fatores transcricionais DAF-16 e SKN-1, que são duas vias homólogas à FOXO-1 e NRF-2, respectivamente. Estas vias regulam a atividade de enzimas antioxidantes, como SOD-1, atenuando os efeitos deletérios causados pelo Juglone (BLACKWELL et al., 2015; SUN; CHEN; WANG, 2017).

Essa possível regulação positiva de DAF-16 e SKN-1 promovida pelo extrato pode ser devido a presença de compostos como a quercetina e apigenina, que já foram identificados em *V. condensata* e já descritos anteriormente como capazes de regular positivamente ambas as vias, aumentando a expressão de fatores antioxidantes, como as enzimas superóxido dismutase e catalase, que estão envolvidas na resposta antioxidante, neutralizando espécies reativas, aumentando assim a viabilidade dos animais em condições de estresse (CHENG et al., 2023; LI et al., 2023) corroborando, desta maneira, com a atividade protetora do extrato das flores de *V. condensata* frente ao estresse oxidativo que os nematoides *C. elegans* foram submetidos.

8 CONCLUSÃO

Em suma, o conjunto de dados reforça a atividade antioxidante *in vitro* de *V. condensata*, já descrita anteriormente, porém este é o primeiro estudo a descrever a atividade antioxidante das flores *in vivo* utilizando o modelo para estudos pré-clínicos *Caenorhabditis elegans*. No entanto, apesar dos resultados promissores, ainda é necessário um estudo mais aprofundado tanto da composição química de ambos os extratos, para identificar quais os compostos fenólicos presentes nos extratos, mas também os mecanismos de ação por trás da resposta antioxidante observada *in vivo*.

Ademais, este estudo mostra o potencial antioxidante das folhas e flores de *V. condensata in vitro*, além de demonstrar o seu efeito frente a condições associadas ao estresse oxidativo, colocando a espécie como um agente potencial na prevenção e/ou tratamento de doenças associadas ao estresse oxidativo, como câncer, Alzheimer e obesidade. Além disso, foi o primeiro estudo sobre o potencial antioxidante das flores de *V. condensata in vivo* na ferramenta biotecnológica *C. elegans*. Sendo assim mais um fator que torna a *V. condensata* como um agente promissor no controle do estresse oxidativo, além de destacar a importância da biodiversidade devido a todas as possibilidades que ela tem a nos oferecer no desenvolvimento de novas drogas e terapias.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD, T.; SUZUKI, Y. J. Juglone in Oxidative Stress and Cell Signaling. **Antioxidants** **2019**, Vol. **8**, Page **91**, v. 8, n. 4, p. 91, 5 abr. 2019.

ALI, S. S. et al. Understanding oxidants and antioxidants: Classical team with new players. **Journal of food biochemistry**, v. 44, n. 3, 1 mar. 2020.

ALVAREZ, J. et al. Modeling Alzheimer's Disease in *Caenorhabditis elegans*. **Biomedicines** **2022**, Vol. **10**, Page **288**, v. 10, n. 2, p. 288, 26 jan. 2022.

ATANASOV, A. G. et al. Natural products in drug discovery: advances and opportunities. **Nature Reviews Drug Discovery** **2021** **20:3**, v. 20, n. 3, p. 200–216, 28 jan. 2021.

AYENI, E. A. et al. Medicinal Plants for Anti-neurodegenerative diseases in West Africa. **Journal of ethnopharmacology**, v. 285, 1 mar. 2022.

BJØRKLUND, G. et al. Natural Compounds and Products from an Anti-Aging Perspective. **Molecules**, v. 27, n. 20, p. 7084, 1 out. 2022.

BLACKWELL, T. K. et al. SKN-1/Nrf, stress responses, and aging in *Caenorhabditis elegans*. **Free radical biology & medicine**, v. 88, n. Pt B, p. 290–301, 2015.

BOEING, T. et al. Antiulcer mechanisms of *Vernonia condensata* Baker: A medicinal plant used in the treatment of gastritis and gastric ulcer. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 184, p. 196–207, 26 maio 2016.

CERÓN, J. *Caenorhabditis elegans* for research on cancer hallmarks. **Disease models & mechanisms**, v. 16, n. 6, 1 jun. 2023.

CHAUDHARY, P. et al. Oxidative stress, free radicals and antioxidants: potential crosstalk in the pathophysiology of human diseases. **Frontiers in Chemistry**, v. 11, p. 1158198, 10 maio 2023.

CHENG, Y. et al. Transient inhibition of mitochondrial function by chrysin and apigenin prolong longevity via mitohormesis in *C. elegans*. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 203, p. 24–33, 1 jul. 2023.

CHESTER, A.; GUINDY, A. EL. From Fleming to Endo: The discovery of statins. **Global Cardiology Science & Practice**, v. 2021, n. 4, p. e202132, 2021.

CHOPRA, B.; DHINGRA, A. K. Natural products: A lead for drug discovery and development. **Phytotherapy Research**, v. 35, n. 9, p. 4660–4702, 13 set. 2021.

CORSI, A. K.; WIGHTMAN, B.; CHALFIE, M. A Transparent Window into Biology: A Primer on *Caenorhabditis elegans*. **Genetics**, v. 200, n. 2, p. 387–407, 1 jun. 2015.

CP, S. C. Bilirubin: The toxic mechanisms of an antioxidant molecule. **Archivos argentinos de pediatria**, v. 119, n. 1, 1 fev. 2021.

DA SILVA, J. B. et al. New Approaches to Clarify Antinociceptive and Anti-Inflammatory Effects of the Ethanol Extract from *Vernonia condensata* Leaves. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, n. 12, p. 8993–9008, 7 dez. 2011a.

DA SILVA, J. B. et al. New Approaches to Clarify Antinociceptive and Anti-Inflammatory Effects of the Ethanol Extract from *Vernonia condensata* Leaves. **International Journal of Molecular Sciences 2011, Vol. 12, Pages 8993-9008**, v. 12, n. 12, p. 8993–9008, 7 dez. 2011b.

DA SILVA, J. B. et al. *Vernonia condensata* Baker (Asteraceae): A Promising Source of Antioxidants. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2013, n. 1, p. 698018, 1 jan. 2013a.

DA SILVA, J. B. et al. *Vernonia condensata* Baker (Asteraceae): A Promising Source of Antioxidants. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2013, n. 1, p. 698018, 1 jan. 2013b.

DA SILVA, J. B. et al. A promising antibiotic, synergistic and antibiofilm effects of *Vernonia condensata* Baker (Asteraceae) on *Staphylococcus aureus*. **Microbial Pathogenesis**, v. 123, p. 385–392, 1 out. 2018.

DE ARAÚJO, L. C. A. et al. *Campomanesia adamantium* O Berg. fruit, native to Brazil, can protect against oxidative stress and promote longevity. **PLOS ONE**, v. 18, n. 11, p. e0294316, 1 nov. 2023a.

DE ARAÚJO, L. C. A. et al. *Campomanesia adamantium* O Berg. fruit, native to Brazil, can protect against oxidative stress and promote longevity. **PLOS ONE**, v. 18, n. 11, p. e0294316, 1 nov. 2023b.

DEMIRCI-ÇEKİÇ, S. et al. Biomarkers of Oxidative Stress and Antioxidant Defense. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 209, p. 114477, 5 fev. 2022.

DIAS, M. C.; PINTO, D. C. G. A.; SILVA, A. M. S. Plant Flavonoids: Chemical Characteristics and Biological Activity. **Molecules**, v. 26, n. 17, p. 5377, 1 set. 2021.

DOSEĎĚL, M. et al. Vitamin C-Sources, Physiological Role, Kinetics, Deficiency, Use, Toxicity, and Determination. **Nutrients**, v. 13, n. 2, p. 1–36, 1 fev. 2021.

EGGERSDORFER, M.; WYSS, A. Carotenoids in human nutrition and health. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 652, p. 18–26, 15 ago. 2018.

ERUKAINURE, O. L. et al. Histochemistry, phenolic content, antioxidant, and anti-diabetic activities of *Vernonia amygdalina* leaf extract. **Journal of Food Biochemistry**, v. 43, n. 2, 1 fev. 2019a.

ERUKAINURE, O. L. et al. *Vernonia Amygdalina* Del. stimulated glucose uptake in brain tissues enhances antioxidative activities; and modulates functional chemistry and dysregulated metabolic pathways. **Metabolic Brain Disease**, v. 34, n. 3, p. 721–732, 15 jun. 2019b.

FEDURAEV, P. et al. Variation in Phenolic Compounds Content and Antioxidant Activity of Different Plant Organs from *Rumex crispus* L. and *Rumex obtusifolius* L. at Different Growth Stages. **Antioxidants**, v. 8, n. 7, p. 237, 1 jul. 2019.

FERREIRA, I. C. et al. Chemical Components and Antioxidant Activity of *Geotrigona* sp. and *Tetragonisca fiebrigi* Stingless Bee Cerumen Reduce Juglone-Induced Oxidative Stress in *Caenorhabditis elegans*. **Antioxidants 2023, Vol. 12, Page 1276**, v. 12, n. 6, p. 1276, 15 jun. 2023.

FLEMING, E.; LUO, Y. Co-delivery of synergistic antioxidants from food sources for the prevention of oxidative stress. **Journal of Agriculture and Food Research**, v. 3, 1 mar. 2021.

FORMAN, H. J.; ZHANG, H. Targeting oxidative stress in disease: promise and limitations of antioxidant therapy. **Nature Reviews Drug Discovery 2021 20:9**, v. 20, n. 9, p. 689–709, 30 jun. 2021.

FORRESTER, S. J. et al. Reactive Oxygen Species in Metabolic and Inflammatory Signaling. **Circulation Research**, v. 122, n. 6, p. 877–902, 16 mar. 2018.

FRUTUOSO, V. S. et al. Analgesic and anti-ulcerogenic effects of a polar extract from leaves of *Vernonia condensata*. **Planta medica**, v. 60, n. 1, p. 21–25, 1994.

GALLEGO-JARA, J. et al. A Compressive Review about Taxol®: History and Future Challenges. **Molecules 2020, Vol. 25, Page 5986**, v. 25, n. 24, p. 5986, 17 dez. 2020.

GARGOURI, B. et al. Protective effect of quercetin against oxidative stress caused by dimethoate in human peripheral blood lymphocytes. **Lipids in Health and Disease**, v. 10, p. 149, 2011.

GHERGHINA, M. E. et al. Uric Acid and Oxidative Stress—Relationship with Cardiovascular, Metabolic, and Renal Impairment. **International Journal of Molecular Sciences 2022, Vol. 23, Page 3188**, v. 23, n. 6, p. 3188, 16 mar. 2022.

HABTAMU, A.; MELAKU, Y. Antibacterial and Antioxidant Compounds from the Flower Extracts of *Vernonia amygdalina*. **Advances in Pharmacological and Pharmaceutical Sciences**, v. 2018, n. 1, p. 4083736, 1 jan. 2018.

HAJAM, Y. A. et al. Oxidative Stress in Human Pathology and Aging: Molecular Mechanisms and Perspectives. **Cells**, v. 11, n. 3, p. 552, 5 fev. 2022a.

HAJAM, Y. A. et al. Oxidative Stress in Human Pathology and Aging: Molecular Mechanisms and Perspectives. **Cells 2022, Vol. 11, Page 552**, v. 11, n. 3, p. 552, 5 fev. 2022b.

HASIBUAN, P. A. Z. et al. The anticancer activities of *Vernonia amygdalina* Delile. Leaves on 4T1 breast cancer cells through phosphoinositide 3-kinase (PI3K) pathway. **Heliyon**, v. 6, n. 7, p. e04449, 1 jul. 2020.

HOANG, T. C.; NGUYEN, T. Q.; BUI, T. K. L. Anti-leukemic effects of *Vernonia amygdalina* extract. **Brazilian Journal of Biology**, v. 84, p. e287203, 14 out. 2024.

HUNT, P. R. The *C. elegans* model in toxicity testing. **Journal of Applied Toxicology**, v. 37, n. 1, p. 50–59, 1 jan. 2017.

HUSSAIN, Y. et al. Role of Quercetin in DNA Repair: Possible Target to Combat Drug Resistance in Diabetes. **Current Drug Targets**, v. 25, n. 10, p. 670–682, 16 maio 2024.

JAVADI, B.; SOBHANI, Z. Role of apigenin in targeting metabolic syndrome: A systematic review. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 27, n. 5, p. 524, 1 maio 2024.

JOHNSON, W.; TCHOUNWOU, P. B.; YEDJOU, C. G. Therapeutic Mechanisms of *Vernonia amygdalina* Delile in the Treatment of Prostate Cancer. **Molecules : A Journal of Synthetic Chemistry and Natural Product Chemistry**, v. 22, n. 10, p. 1594, 1 out. 2017.

JOMOVA, K. et al. Reactive oxygen species, toxicity, oxidative stress, and antioxidants: chronic diseases and aging. **Archives of Toxicology**, v. 97, n. 10, p. 2499–2574, 19 out. 2023.

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 2024 98:5**, v. 98, n. 5, p. 1323–1367, 14 mar. 2024a.

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, 14 maio 2024b.

JOSEPH, J. et al. In vitro Anticancer Effects of *Vernonia amygdalina* Leaf Extract and Green-Synthesised Silver Nanoparticles. **International Journal of Nanomedicine**, v. 16, p. 3599, 2021.

KHALIFA, S. A. M. et al. Marine Natural Products: A Source of Novel Anticancer Drugs. **Marine Drugs 2019, Vol. 17, Page 491**, v. 17, n. 9, p. 491, 23 ago. 2019.

KOCOT, J. et al. Antioxidant Potential of Propolis, Bee Pollen, and Royal Jelly: Possible Medical Application. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2018, n. 1, p. 7074209, 1 jan. 2018.

KOSTIĆ, A. et al. Balkans' Asteraceae Species as a Source of Biologically Active Compounds for the Pharmaceutical and Food Industry. **Chemistry & Biodiversity**, v. 17, n. 6, p. e2000097, 1 jun. 2020.

LEITE, N. R. et al. Baru Pulp (*Dipteryx alata* Vogel): Fruit from the Brazilian Savanna Protects against Oxidative Stress and Increases the Life Expectancy of *Caenorhabditis elegans* via SOD-3 and DAF-16. **Biomolecules** **2020**, Vol. 10, Page 1106, v. 10, n. 8, p. 1106, 25 jul. 2020a.

LEITE, N. R. et al. Baru Pulp (*Dipteryx alata* Vogel): Fruit from the Brazilian Savanna Protects against Oxidative Stress and Increases the Life Expectancy of *Caenorhabditis elegans* via SOD-3 and DAF-16. **Biomolecules**, v. 10, n. 8, p. 1106, 25 jul. 2020b.

LI, J. et al. Oxidized quercetin has stronger anti-amyloid activity and anti-aging effect than native form. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 271, p. 109676, 1 set. 2023.

LOBANOVSKA, M.; PILLA, G. Penicillin's Discovery and Antibiotic Resistance: Lessons for the Future? **The Yale Journal of Biology and Medicine**, v. 90, n. 1, p. 135, 1 mar. 2017.

MAJUMDER, D. et al. Understanding the complicated relationship between antioxidants and carcinogenesis. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 35, n. 2, p. e22643, 1 fev. 2021.

MARMITT, D. J. et al. REVISÃO SISTEMÁTICA SOBRE A PRODUÇÃO CIENTÍFICA DE PLANTAS MEDICINAIS DA RENISUS VOLTADAS AO DIABETES MELLITUS. **Caderno Pedagógico**, v. 12, n. 1, 30 maio 2015.

MARTINEZ, M. et al. *Taraxacum officinale* and related species—An ethnopharmacological review and its potential as a commercial medicinal plant. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 169, p. 244–262, 1 jul. 2015.

MELO, M. R. C. S. DE; PEREIRA, R. DE C. DE A. REVISAO HISTÓRICA DA TRIBO VERNONIEAE CASS. (FAMILIA ASTERACEAE) PARA O BRASIL. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica**, v. 11, p. 172–192, 2014.

MINICH, D. M. et al. Is Melatonin the “Next Vitamin D”? A Review of Emerging Science, Clinical Uses, Safety, and Dietary Supplements. **Nutrients** **2022**, Vol. 14, Page 3934, v. 14, n. 19, p. 3934, 22 set. 2022.

MOHANTA, Y. K. et al. Potential use of the Asteraceae family as a cure for diabetes: A review of ethnopharmacology to modern day drug and nutraceuticals developments. **Frontiers in Pharmacology**, v. 14, p. 1153600, 2023.

MONTEIRO, M. H. D. et al. Toxicological evaluation of a tea from leaves of *Vernonia condensata*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 74, n. 2, p. 149–157, 1 fev. 2001.

MONTEIRO-ALFREDO, T. et al. *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart. Leaves Increase SIRT1 Levels and Improve Stress Resistance. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2020, 2020.

MORET-TATAY, I. et al. Possible biomarkers in blood for Crohn's disease: Oxidative stress and microRNAs - Current evidences and further aspects to unravel. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, 2016.

MUDD, N.; LICEAGA, A. M. Caenorhabditis elegans as an in vivo model for food bioactives: A review. **Current Research in Food Science**, v. 5, p. 845–856, 1 jan. 2022.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of Natural Products**, v. 83, n. 3, p. 770–803, 27 mar. 2020.

NKONO, B. L. N. Y. et al. Antihyperglycemic effect of Vernonia amygdalina and in vitro evaluation of its antiproliferative activity on human osteosarcoma MG-63. **The Pan African Medical Journal**, v. 42, n. 222, p. 222, 1 maio 2022.

OFFOR, B. C.; PIATER, L. A. Snake venom toxins: Potential anticancer therapeutics. **Journal of Applied Toxicology**, v. 44, n. 5, p. 666–685, 1 maio 2024.

OLADELE, J. O. et al. Neuroprotective mechanism of Vernonia amygdalina in a rat model of neurodegenerative diseases. **Toxicology Reports**, v. 7, p. 1223–1232, 1 jan. 2020.

OLSZOWY, M. What is responsible for antioxidant properties of polyphenolic compounds from plants? **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 144, p. 135–143, 1 nov. 2019.

PATATHANANONE, S. et al. Inhibitory Effects of Vernonia amygdalina Leaf Extracts on Free Radical Scavenging, Tyrosinase, and Amylase Activities. **Preventive Nutrition and Food Science**, v. 28, n. 3, p. 302, 1 set. 2023.

PÉREZ-TORRES, I. et al. Oxidative Stress, Plant Natural Antioxidants, and Obesity. **International Journal of Molecular Sciences 2021, Vol. 22, Page 1786**, v. 22, n. 4, p. 1786, 11 fev. 2021.

PISOSCHI, A. M. et al. Oxidative stress mitigation by antioxidants - An overview on their chemistry and influences on health status. **European journal of medicinal chemistry**, v. 209, 1 jan. 2021.

RANA, A. et al. Health benefits of polyphenols: A concise review. **Journal of Food Biochemistry**, v. 46, n. 10, p. e14264, 1 out. 2022.

RANI, N. et al. Caenorhabditis elegans: A transgenic model for studying age-associated neurodegenerative diseases. **Ageing research reviews**, v. 91, 1 nov. 2023.

ROLNIK, A.; OLAS, B. The Plants of the Asteraceae Family as Agents in the Protection of Human Health. **International Journal of Molecular Sciences 2021, Vol. 22, Page 3009**, v. 22, n. 6, p. 3009, 16 mar. 2021.

ROLNIK, A.; OLAS, B. A Review of the Effect of Preparations from Vegetables of the Asteraceae Family and Cucurbitaceae Family on the Cardiovascular System and Its Diseases. **Nutrients 2022, Vol. 14, Page 3601**, v. 14, n. 17, p. 3601, 31 ago. 2022.

ROY, Z. et al. Understanding the Role of Free Radicals and Antioxidant Enzymes in Human Diseases. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 24, n. 10, p. 1265–1276, ago. 2023.

SAMUTRTAI, P. et al. Vernonia amygdalina Leaf Extract Induces Apoptosis in HeLa Cells: A Metabolomics and Proteomics Study. **Pharmaceuticals**, v. 17, n. 8, p. 1079, 1 ago. 2024.

SECRETARIA DE CIÊNCIA, T. E I. E. EM S. (BRASIL). D. DE A. F. E I. E. Informações Sistematizadas da Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS: Vernoniacondensata baker, asteraceae (“Boldo-baiano”). p. 115–115, 2021.

SHEN, P.; YUE, Y.; PARK, Y. A living model for obesity and aging research: Caenorhabditis elegans. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 58, n. 5, p. 741–754, 24 mar. 2018.

SIES, H.; MAILLOUX, R. J.; JAKOB, U. Fundamentals of redox regulation in biology. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, 30 abr. 2024.

SILVA, J. B. DA et al. New aspects on the hepatoprotective potential associated with the antioxidant, hypocholesterolemic and anti-inflammatory activities of Vernonia condensata Baker. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 198, p. 399–406, 23 fev. 2017.

SOUSA, L. Q. DE et al. Bufadienolides from amphibians: A promising source of anticancer prototypes for radical innovation, apoptosis triggering and Na⁺/K⁺-ATPase inhibition. **Toxicon**, v. 127, p. 63–76, 1 mar. 2017.

STIERNAGLE, T. Maintenance of C. elegans. **WormBook : the online review of C. elegans biology**, p. 1–11, 11 fev. 2006.

SUN, X.; CHEN, W. D.; WANG, Y. D. DAF-16/FOXO transcription factor in aging and longevity. **Frontiers in Pharmacology**, v. 8, n. AUG, p. 285640, 23 ago. 2017.

SZOPA, A. et al. Artemisia absinthium L.—Importance in the History of Medicine, the Latest Advances in Phytochemistry and Therapeutical, Cosmetological and Culinary Uses. **Plants**, v. 9, n. 9, p. 1063, 1 set. 2020.

TAJIK, N. et al. The potential effects of chlorogenic acid, the main phenolic components in coffee, on health: a comprehensive review of the literature. **European Journal of Nutrition** **2017** **56:7**, v. 56, n. 7, p. 2215–2244, 8 abr. 2017.

TAVASSOLIFAR, M. JAVAD et al. The Influence of Reactive Oxygen Species in the Immune System and Pathogenesis of Multiple Sclerosis. **Autoimmune Diseases**, v. 2020, p. 1–14, 25 jun. 2020.

The top 10 causes of death. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>>. Acesso em: 13 dez. 2024.

THOMAS, E. et al. Extract of Vernonia condensata, Inhibits Tumor Progression and Improves Survival of Tumor-allograft Bearing Mouse. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 23255, 24 mar. 2016a.

THOMAS, E. et al. Extract of *Vernonia condensata*, Inhibits Tumor Progression and Improves Survival of Tumor-allograft Bearing Mouse. **Scientific Reports** **2016** **6:1**, v. 6, n. 1, p. 1–12, 24 mar. 2016b.

TIRICHEN, H. et al. Mitochondrial Reactive Oxygen Species and Their Contribution in Chronic Kidney Disease Progression Through Oxidative Stress. **Frontiers in Physiology**, v. 12, 23 abr. 2021.

VALVERDE, A. L. et al. Analgesic and antiinflammatory activities of vernonioside B2 from *Vernonia condensata*. **Phytotherapy Research**, v. 15, n. 3, p. 263–264, 8 maio 2001.

VENTURELLA, G. et al. Medicinal Mushrooms: Bioactive Compounds, Use, and Clinical Trials. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 2, p. 1–31, 2 jan. 2021.

VONIA, S.; HARTATI, R.; INSANU, M. In Vitro Alpha-Glucosidase Inhibitory Activity and the Isolation of Luteolin from the Flower of *Gymnanthemum amygdalinum* (Delile) Sch. Bip ex Walp. **Molecules** **2022**, **Vol. 27**, **Page 2132**, v. 27, n. 7, p. 2132, 25 mar. 2022.

YEDJOU, C. G. et al. *Vernonia amygdalina* Delile Induces Apoptotic Effects of PC3 Cells: Implication in the Prevention of Prostate Cancer. **Journal of biomedical research & environmental sciences**, v. 3, n. 9, p. 1118, out. 2022a.

YEDJOU, C. G. et al. *Vernonia amygdalina* Delile Induces Apoptotic Effects of PC3 Cells: Implication in the Prevention of Prostate Cancer. **Journal of biomedical research & environmental sciences**, v. 3, n. 9, p. 1118, out. 2022b.

ZEB, A. Concept, mechanism, and applications of phenolic antioxidants in foods. **Journal of food biochemistry**, v. 44, n. 9, 1 set. 2020.

ZHANG, L. et al. Biochemical basis and metabolic interplay of redox regulation. **Redox Biology**, v. 26, p. 101284, set. 2019.