

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

PEDRO HENRIQUE PATRÍCIO BARBOSA

**COMPOSIÇÃO QUÍMICA E POTENCIAL ANTIOXIDANTE DO
CERUME DE *Nannotrigona testaceicornis* (HYMENOPTERA,
APIDAE, MELIPONINI)**

**DOURADOS
MATO GROSSO DO SUL
2024**

**COMPOSIÇÃO QUÍMICA E POTENCIAL ANTIOXIDANTE DO CERUME DE
Nannotrigona testaceicornis (HYMENOPTERA, APIDAE, MELIPONINI)**

PEDRO HENRIQUE PATRÍCIO BARBOSA

ORIENTADORA: Profa. Dra. Jaqueline Ferreira Campos

CO-ORIENTAÇÃO: Profa. Dra. Paola Dos Santos Da Rocha

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Universidade Federal da
Grande Dourados, ao curso de Ciências
Biológicas - Licenciatura.

DOURADOS

MATO GROSSO DO SUL

2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

B238c Barbosa, Pedro Henrique Patricio
COMPOSIÇÃO QUÍMICA E POTENCIAL ANTIOXIDANTE DO CERUME DE
Nannotrigona testaceicornis (HYMENOPTERA, APIDAE, MELPONINI) [recurso eletrônico]
/ Pedro Henrique Patricio Barbosa. -- 2024.
Arquivo em formato pdf.

Orientadora: Jaqueline Ferreira Campos.
Coorientadora: Paola dos Santos da Rocha.
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. produtos apícolas. 2. radicais livres. 3. estresse oxidativo. 4. C. elegans. 5. abelhas
sem ferrão. I. Campos, Jaqueline Ferreira. II. Rocha, Paola Dos Santos Da. III. Título.

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

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

PEDRO HENRIQUE PATRÍCIO BARBOSA

**COMPOSIÇÃO QUÍMICA E POTENCIAL ANTIOXIDANTE DO CERUME DE
Nannotrigona testaceicornis (HYMENOPTERA, APIDAE, MELIPONINI)**

ORIENTADORA: Profa. Dra. Jaqueline Ferreira Campos

CO-ORIENTAÇÃO: Profa. Dra. Paola Dos Santos Da Rocha

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Universidade Federal da
Grande Dourados, ao curso de Ciências
Biológicas - Licenciatura.

Aprovado em: 13 de dezembro de 2024.

BANCA EXAMINADORA

Jaqueline Ferreira Campos

PRESIDENTE

Helder Freitas dos Santos

MEMBRO TITULAR

Michele Castro de Paula da Silva

MEMBRO TITULAR

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha família. Aos meus avós, Vó Zezé (Maria José Machado Patrício) que já partiu dessa vida, Vô Dito (Benedito Patrício) que hoje com seus 97 anos, ainda permanece teimoso e aos meus pais, Luizelena Patrício e Jomar de Oliveira Barbosa, que me permitiram estar vivendo toda essa grande aventura que é a vida.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, por permanecer sempre comigo e não me abandonar nos momentos mais difíceis. Agradeço a ele por ter iluminado e aberto meus caminhos para que hoje estivesse aqui. Agradeço a Maria por sempre me cobrir com seu manto me afastar de todo mal.

Neste momento agradeço a minha família por todo apoio e dedicação para que hoje eu estivesse aqui. Minha Vó Zézé, que hoje não está entre nós, mas que sempre foi meu anjo da guarda. Vô Dito, que sempre foi meu pai e cuidou de mim, e mesmo longe nunca deixou de cuidar e de sempre se meter em alguma arte. Minha mãe, Luizelena Patrício, que sempre foi um suporte desde sempre, mulher forte e guerreira, que batalhou muito para que eu estivesse aqui hoje. Ao meu pai, Jomar de Oliveira Barbosa, que sempre me incentivou a tentar ser o meu melhor, e que a gente tem que trabalhar duro independentemente de onde estivermos. Ao meu irmão mais velho Giovany, que mesmo implicando sempre comigo quando mais novo, nunca deixou que eu tomasse os caminhos errados e Gabriel meu irmão caçula que sempre tá alegre e ama a escola, me lembrando que as vezes a gente tem que deixar a alegria tomar conta.

Agradeço a minha melhor amiga Gabrielle Mendes, que deixei na minha cidade pra seguir esse sonho, que nunca mediu esforços pra tentar estar comigo e pra me ver feliz ao máximo, mesmo quando eu tinha as vezes só uma semana de “férias”. Saiba que tenho muito orgulho de ti, e da mulher e profissional que se tornou.

Agradeço meus amigos da graduação que formou a “Panelinha”, Luana, Bê, Isaac, Miranda, Sarah, Igor, Lígia e Gabriel. Saibam que fizeram eu viver essa cidade e a faculdade intensamente, e nunca vou me esquecer das pessoas incríveis que são. Voem.

Agradeço, ao meu amigo e companheiro de apartamento José Júlio dos Santos Netto, por me aguentar todo esse tempo e me dar apoio durante toda essa jornada, obrigado por ser essa pessoa em que posso confiar e por dividir momentos muito especiais, que carregarei comigo.

Agradeço a minha orientadora, Jaqueline Ferreira Campos, por ter me acolhido, ter se dedicado, ter se preocupado e ter dado broncas. Obrigado por ter me dado a chance de fazer parte de algo tão incrível que é a ciência, que naquela disciplina de

Tópicos em Biologia Celular e Molecular no EAD, você não me deu apenas uma oportunidade mais sim um motivo de continuar.

Agradeço a minha coorientadora Paola dos Santos da Rocha, desde a disciplina de Anatomia Humana, que me encorajou e me incentivou a continuar a disciplina me mostrando o conhecimento que tenho e que muitas vezes guardo pra mim. Também te agradeço por todo trabalho que realizamos juntos, quando minha orientadora precisou se ausentar por um bem maior. Que a senhora nunca deixe morrer a ciência e a professora que abriga em seu coração.

Agradeço ao Grupo de Estudos em Biotecnologia e Bioprospecção Aplicadas ao Metabolismo – GEBBAM, por me permitir realizar esse trabalho e outros durante todo esse tempo, em especial agradeço a professora Kely de Picoli Souza, que sempre nos inspira e me instiga sempre a querer mais à docência e ao professor Edson Lucas dos Santos, que também não mede esforços para que todos consigamos realizar nossas pesquisas com excelência, e sempre abriu o olhar para as pequenas coisas que deixamos passar batido.

Agradeço também a todos os demais membros do GEBBAM, ao Alex por não ter me deixado desistir no início, ao Daniel que me ensinou sobre as práticas laboratoriais e me aguenta até hoje com a minha teimosia e a dupla dinâmica Lecotaia que sempre que necessário nunca mediu esforços pra me auxiliar. Também agradeço a Isabella e ao Igor, meus dois calouros que hoje fazem parte do mesmo grupo, obrigado por me ajudarem, e me ensinarem sempre, saiba que tenho muita admiração pelas pessoas que estão se tornando. Agradeço a professora Débora da Silva Baldivia, por ajudar assim quando entrei no laboratório, a quem tenho muita admiração.

Agradeço nesse momento, duas pessoas que tornaram a minha vivência em laboratório muito especial. Sarah Lam Orué e Isamara Carvalho Ferreira, mesmo sendo da mesma turma creio que não havia melhor hora para conhece-las, eu como colega de classe atrasado, passei a aprender com duas mestrandas incríveis. Muito obrigado por me auxiliarem sempre que precisei, por me ensinarem e estarem comigo, sou muito grato por ter encontrado vocês. Isamara nunca deixe o seu jeitinho mineiro morrer, nunca se esqueça da grande pessoa e profissional que você é! Sarah você é uma professora excepcional, e sei que seus alunos terão sorte de tê-la como Professora de Biologia assim como eu tive no laboratório.

Agradeço aos integrantes da banca avaliadora, Professora Michele Castro, Professor Helder Freitas dos Santos e a Professora Débora da Silva Baldivia, que aceitaram com muito carinho participar desse momento tão especial em minha vida.

Agradeço ao professor “Zezo” pelos ensinamentos sobre as abelhas sem ferrão a qual tenho maior paixão atualmente e por disponibilizar os produtos apícolas desses meliponíneos que são essenciais para a biodiversidade do estado. Participar da coleta do cerume utilizado neste trabalho junto ao senhor, foi um grande processo de aprendizagem.

Agraço à Universidade Federal da Grande Dourados – UFGD, pela possibilidade de realização da minha graduação, 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 pelo apoio financeiro.

E por fim, agradeço a todos aqueles que contribuíram para a minha formação acadêmica e para com a realização deste trabalho.

“Nem Marculino e nem Firmino, é Dito igual o pai!”

(Benedito Patrício)

Resumo

O estresse oxidativo é uma condição associada ao desenvolvimento e progressão de diversas doenças, caracterizado pelo desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio e a defesa antioxidante do organismo. Desta maneira, a descoberta de novos agentes antioxidantes é extremamente relevante para contribuir com o estado redox do organismo, atuando na manutenção da saúde, prevenção e/ou tratamento de doenças. Diferentes compostos químicos provenientes de produtos apícolas vêm sendo descritos pelo seu potencial antioxidante. Neste contexto, o presente estudo avaliou a composição química, toxicidade e a atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo* do cerume da abelha sem ferrão *Nannotrigona testaceicornis*. O extrato etanólico de cerume de *Nannotrigona testaceicornis* (EEC-Nt) foi preparado na proporção de 4,5 ml de etanol 80% para cada 1 g de cerume, e o conteúdo de compostos fenólicos totais e flavonoides foi avaliado. A atividade antioxidante *in vitro* do EEC-Nt foi investigada pelos métodos de captura dos radicais livres 2,2-difenil-1-picril-hidrazina (DPPH•) e 2,2'-azinobis 3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico (ABTS•+). Para avaliar a toxicidade e o potencial antioxidante *in vivo* do EEC-Nt foi utilizado o nematoide *Caenorhabditis elegans*. O conteúdo de compostos fenólicos e flavonoides no EEC-Nt foi de $8,39 \pm 0,26$ mg EAG/g e $1,59 \pm 0,14$ mg EQ/g, respectivamente. As concentrações do EEC-Nt capazes de inibir 50% dos radicais livres DPPH• e ABTS•+ foi de $637,05 \pm 3,35$ µg/ml e $128,5 \pm 3,88$ µg/ml, respectivamente *in vivo*, o EEC-Nt não foi tóxico aos nematoides nas concentrações e tempos avaliados. Entretanto, o EEC-Nt não foi capaz de promover a proteção contra o estresse oxidativo induzido por juglone em *C. elegans*, mas potencializou o efeito tóxico deste agente pró-oxidante. Em suma, este estudo abre perspectivas para investigação do potencial citotóxico e adjuvante à quimioterápicos, bem como contribui para a bioprospecção e valorização da biodiversidade apícola do Estado do Mato Grosso do Sul.

Palavras-chave: produtos apícolas; radicais livres; estresse oxidativo;

Abstract

Oxidative stress is a condition associated with the development and progression of several diseases, characterized by an imbalance between the production of reactive oxygen species and the body's antioxidant defense. Thus, the discovery of new antioxidant agents is extremely relevant to contribute to the redox state of the body, acting in the maintenance of health, prevention and/or treatment of diseases. Different chemical compounds from bee products have been described for their antioxidant potential. In this context, the present study evaluated the chemical composition, toxicity and in vitro and in vivo antioxidant activity of cerumen from the stingless bee *Nannotrigona testaceicornis*. The ethanolic extract of cerúmen *Nannotrigona testaceicornis* (EEC-Nt) was prepared in the proportion of 4.5 ml of 80% ethanol for each 1 g of cerumen, and the content of total phenolic compounds and flavonoids was evaluated. The in vitro antioxidant activity of EEC-Nt was investigated by the scavenging methods of the free radicals 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazine (DPPH•) and 2,2'-azinobis 3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS•+). The nematode *Caenorhabditis elegans* was used to evaluate the toxicity and in vivo antioxidant potential of EEC-Nt. The content of phenolic compounds and flavonoids in EEC-Nt was 8.39 ± 0.26 mg EAG/g and 1.59 ± 0.14 mg EQ/g, respectively. The concentrations of EEC-Nt capable of inhibiting 50% of DPPH• and ABTS•+ free radicals were 637.05 ± 3.35 µg/ml and 128.5 ± 3.88 µg/ml, respectively in vivo. EEC-Nt was not toxic to nematodes at the concentrations and times evaluated. However, EEC-Nt was not able to promote protection against juglone-induced oxidative stress in *C. elegans*, but potentiated the toxic effect of this pro-oxidant agent. In summary, this study opens perspectives for investigation of the cytotoxic and adjuvant potential of chemotherapeutics, as well as contributes to bioprospecting and valorization of the apicultural biodiversity of the State of Mato Grosso do Sul.

Key words: bee products; free radicals; oxidative stress

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

	Página
Figura 1: Ação das enzimas antioxidantes endógenas: superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase	10
Figura 2: Espécime de <i>Nannotrigona testaceicornis</i>	15
Figura 3: Ninho de <i>Nannotrigona testaceicornis</i>	17
Figura 4: <i>Caenorhabditis elegans</i> . Embriões, larva e adultos	18
Figura 5: Ciclo de vida de <i>C. elegans</i>	19
Figura 6: Porcentagem da viabilidade de <i>Caenorhabditis elegans</i> tratados com diferentes concentrações de EEC-Nt (10 - 2000 µg/ml) e dos controles (C) após: (A) 24 h de incubação (B) 48h de incubação. Os valores são expressos como a média ± EPM.....	28
Figura 7: Estresse oxidativo agudo no modelo experimental <i>in vivo</i> <i>C. elegans</i> tratados com EEC-Nt em (A) tempo inicial (0h), (B) 1h e (C) 2h. Controle (CT) e controle juglone (CJ). Resultado considerados estatisticamente significativos ($p < 0,05$) quando o grupo tratado foi comparado com o controle. Os valores são expressos como a média ± EPM. # versus controle; * versus juglone (250 µM)	30
Figura 8: Estresse oxidativo no modelo experimental <i>in vivo</i> <i>C. elegans</i> tratados com EEC-Nt. Controle (CT), controle juglone (CJ). (A) 24 h de incubação (B) 48 h de incubação. Resultado considerados estatisticamente significativos ($p < 0,05$) quando o grupo tratado foi comparado com o controle. Os valores são expressos como a média ± EPM. # versus controle	31
Tabela 1. Capacidade antioxidante do extrato etanólico de cerume da <i>Nannotrigona testaceicornis</i> (EEC-Nt) frente aos radicais DPPH [•] e ABTS ^{•+} . BHT: hidroxitolueno butilado, AA: ácido ascórbico	28

LISTA DE SIGLAS

μg – micrograma

μl – microlitro

$^1\text{O}_2$ – Oxigênio singlete

AA – Ácido ascórbico

Abs - Absorbância

ABTS•+ - 2,2' – azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)

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

BH4 - Tetrahydrobiopterina

BHT – Hidroxitolueno butilado

CAT – Catalase

Cu^{2+} - Cobre

DOX - Doxorrubicina

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DPPH• - 2,2 – difenil-1-picril-didrazil

EAG – Equivalente de ácido gálico

EEC-Nt – Extrato etanólico de Cerume de *Nannotrigona testaceicornis*

EPM – Erro padrão da média

EQ – Equivalente de quercetina

ERNs – Espécies reativas de nitrogênio

EROs – Espécies reativas de oxigênio

FAD – Flavina adenina dinucleotídeo

Fe^{2+} - Ferro

FMN – Flavina mononucleotídeo

G - Grama

GPx – Glutathione peroxidase

GSH – Glutathione

H – Hora

H_2O - água

H_2O_2 – Peróxido de hidrogênio

HOCl – Ácido hipocloroso

IC50 – concentração inibitória

L-Arg – L- arginina

M – Molar

Mg – Miligrama

Min – Minutos

mL – mililitro

mM – milimolar

NADPH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

NGM – Nematode Growth Medium

nm – Nanômetro

NO \cdot - Óxido nítrico

NOS – Oxido nítrico sintases

O $_2^{\cdot-}$ - Ânion superóxido

OH \cdot - Radical hidroxila

ONOO $^-$ - Peroxinitrito

R \cdot - Radical alquil

RO \cdot - Radical alcóxil

ROO \cdot - Radical peroxil

ROOH – Hidroperóxido lipídico

RS \cdot - Radical tiól

SOD – Superóxido dismutase

SUMÁRIO

	Páginas
1. Introdução	01
2. Revisão bibliográfica	02
2.1. Espécies reativas	02
2.2. Estresse oxidativo	06
2.3. Antioxidantes	07
2.3.1. Antioxidantes endógenos enzimáticos	08
2.3.2. Antioxidantes endógenos não enzimáticos	10
2.3.3. Antioxidantes exógenos	12
2.4. Abelhas sem ferrão	14
2.5. <i>Nannotrigona testaceicornis</i> (<i>N. testaceicornis</i>)	14
2.6. Produtos apícolas	16
2.7. Modelo pré-clínico <i>Caenorhabditis elegans</i> (<i>C. elegans</i>)	17
3. Objetivos	21
4. Justificativa	22
5. Material e métodos	23
5.1. Obtenção do Cerume e preparo do extrato	23
5.2. Ensaio de determinação de compostos fenólicos totais e flavonoides.....	23
5.3. Atividade antioxidante <i>in vitro</i>	24
5.4. Captura do radical livre DPPH*	24
5.5. Captura do radical livre ABTS*	24
5.6. Atividade antioxidante <i>in vivo</i>	25
5.7. Linhagem e manutenção de <i>C. elegans</i>	25
5.8. Toxicidade em <i>C. elegans</i>	25
5.9. Estresse oxidativo agudo induzido por Juglone	26
5.10. Estresse oxidativo subcrônico induzido por Juglone	26
5.11. Análises estatísticas	26
6. Resultados	28
6.1. Compostos fenólicos totais e flavonoides	28
6.2. Atividade antioxidante <i>in vitro</i>	28
6.3. Toxicidade em <i>C. elegans</i>	29

6.4. Atividade antioxidante <i>in vivo</i>	30
7. Discussão	32
8. Conclusão	35
9. Referências bibliográficas	36

1. Introdução

As espécies reativas possuem papel essencial nos processos fisiológicos celulares, incluindo a participação no sistema de defesa do organismo, no processo de fagocitose, cicatrização e sinalização celular (Forester et al., 2018; Di Meo; Venditti, 2020).

Quando em grandes quantidades no organismo, as espécies reativas são capazes de causar efeitos deletérios em biomoléculas, como em proteínas, lipídios, DNA e RNA (Zorov; Juhaszova; Sollott, 2014). Assim, podemos definir o estresse oxidativo como o desequilíbrio entre as espécies reativas e moléculas antioxidantes, onde há uma superprodução de espécies reativas em uma baixa concentração de antioxidantes (Pizzino et al., 2017). Desta forma, o quadro de estresse oxidativo pode desencadear doenças como Alzheimer, câncer, aterosclerose, diabetes, além do desenvolvimento do envelhecimento precoce (Pizzino et al., 2017; Liguori et al., 2018; Darenskaya; Kolesnikova; Kolesnikov, 2021; Teleanu et al., 2022).

Para o controle das espécies reativas, o organismo possui o sistema de defesa antioxidante, formado por moléculas enzimáticas e não enzimáticas com a capacidade de neutralização e/ou inibição dos efeitos deletérios promovidos pelas espécies reativas, e podem ainda reparar danos celulares ocasionados em biomoléculas (Sies, 1997).

Dentre os antioxidantes endógenos enzimáticos estão as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx). Já os não enzimáticos incluem a glutathione (GSH), ácido úrico, melatonina, bilirrubina, e coenzima Q. Adicionalmente, é possível contar com antioxidantes exógenos, provenientes da dieta, como a vitamina C (ácido ascórbico), vitamina E (α -tocoferol), carotenoides (β -carotenos), polifenóis e outros compostos (He et al., 2017).

Desta forma, uma dieta rica em antioxidantes, auxilia o nosso sistema de defesa na proteção contra as espécies reativas deletérias, mantendo a homeostase celular, reduzindo danos celulares e evitando ou retardando o desenvolvimento de doenças ocasionadas por esse desequilíbrio (Xu et al., 2017).

Assim sendo, podemos ressaltar os produtos apícolas como o mel, própolis, geoprópolis, cerume, pólen apícola e geleia real, como fontes dietéticas e futuros fármacos para terapias relacionadas ao estresse oxidativo, visto que possuem compostos químicos que desempenham atividades biológicas como anti-inflamatória,

antiobesidade, anticancerígena, antimicrobiana e antioxidante (Fratellone; Tsimis; Fratellone, 2016).

No entanto, há uma grande quantidade de estudos científicos que relatam as atividades de produtos apícolas produzidos por *Apis mellifera* (Linnaeus, 1758) (abelhas com ferrão) e em contraponto com os produtos de abelhas sem ferrão (Meliponíneos), existe uma menor diversidade de trabalhos científicos, mesmo havendo maior diversidade de espécies e sendo um novo campo a se explorar (Al-Hatamleh et al., 2020).

Atualmente mais de 500 espécies de abelha sem ferrão são descritas, incluindo *Nannotrigona testaceicornis* (Lepelletier, 1836), espécie que pode ser encontrada em regiões tropicais como no Brasil (Camargo 2013; Camargo,2023).

Neste contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar a composição química e o potencial antioxidante do cerume da abelha sem ferrão *N. testaceicornis* em ensaios *in vitro* e *in vivo* utilizando o modelo pré-clínico *Caenorhabditis elegans*.

2. Revisão bibliográfica

2.1. Espécies reativas

As espécies reativas são pequenas moléculas ou átomos que possuem a capacidade de reagir com outras moléculas ou íons tendo como características um tamanho reduzido que permite atravessar membranas celulares biológicas e uma configuração química que as tornam altamente reativas e instáveis (JENSEN, 2003). Dentro desse grande grupo, podem ser diferenciadas principalmente em: espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas de nitrogênio (ERNs). As EROs podem ser produzidas por meio de processos endógenos, como a liberação dos subprodutos das mitocôndrias por meio da cadeia transportadora de elétrons, metabolismo do citocromo P450, peroxissomos e ativação de células inflamatórias (VALKO et al., 2006a).

As ERNs por sua vez, são formadas a partir de processos e respostas inflamatórias, além de também serem formadas por meio da cadeia transportadora de elétrons (ANDRÉS et al., 2022). E em ambos os casos, a produção dessas espécies reativas pode ser advinda de fatores exógenos, como: poluição, tabagismo, uso de bebidas alcoólicas, radiação, exposição a produtos químicos, exposição a luz UV e metais pesados (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015).

As espécies reativas são classificadas como radicalares e não radicalares. Os radicais livres radicalares são moléculas formadas a partir de reações bioquímicas de oxido-redução, que possuem como característica, a presença de um número ímpar de elétrons desemparelhados na sua última camada de valência (HALLIWELL, 2005). Desta forma, essa configuração eletrônica faz com que essas moléculas busquem sua estabilização por meio da interação com outras moléculas, o que as tornam altamente instáveis e reativas, podendo ocasionar danos biomoleculares (VALKO et al., 2007). Dentre as espécies radicalares podemos destacar o ânion superóxido (O_2^-), radical hidroxila ($\cdot OH$), radical peroxil ($ROO\cdot$), radical alcóxil ($RO\cdot$), óxido nítrico ($NO\cdot$) e o radical tiól ($RS\cdot$) (MARTELLI; NUNES, 2014).

Já os radicais livres não radicalares, são moléculas que não possuem elétrons desemparelhados, mas são altamente reativas podendo gerar ou interagir com outras moléculas, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ácido hipocloroso ($HOCl$), peroxinitrito ($ONOO$) e o oxigênio singlete (O_2) (BIRBEN et al., 2012; ANDRÉS et al., 2022).

O radical ânion superóxido (O_2^-) é uma ERO primária, considerada um subproduto formado a partir da cascata de reações que ocorrem nas mitocôndrias por meio da cadeia transportadora de elétrons (complexos I e III), onde ele é formado pela redução de um elétron da molécula de O_2 (MURPHY, 2009). O O_2^- , possui alta capacidade de interação com outras moléculas o que favorece na geração de EROs secundárias, seja essa relação direta, ou por meio de catalisadores metálicos (VALKO et al., 2006a). Essa espécie reativa pode assumir a forma de radical hidroperoxila ($HO_2\cdot$), que é a forma protonada do radical superóxido, que possui capacidade de destruir membranas biológicas (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

O radical hidroxila ($\cdot OH$) é formado a partir da redução de três elétrons do oxigênio e é considerado o oxidante mais reativo entre as EROs, sendo produzido durante as reações de Harber-Weiss, reações de Fenton ou pela decomposição do peroxinitrito (VILLAMENA, 2013; JUAN et al., 2021). Esse radical possui uma meia-vida muito curta e um alta reatividade, capaz de causar danos a todas as biomoléculas, como, as proteínas, lipídios, aminoácidos, carboidratos e DNA (DUMANOVIĆ et al., 2021).

O radical peroxil ($ROO\cdot$) é formado durante a peroxidação lipídica, que é um processo onde há o efeito deletério ocasionado pelas EROs sobre os ácidos graxos presentes nas membranas biológicas (WEIDINGER; KOZLOV, 2015). Por exemplo, o

$\cdot\text{OH}$ formado pela decomposição do tipo Fenton em interação com os ácidos graxos das membranas, retira um H da cadeia lipídica formando o radical alquil ($\text{R}\cdot$), deste modo, este radical reage instantaneamente com o oxigênio molecular (O_2) presente nas células, formando por fim o $\text{ROO}\cdot$ (VALGIMIGLI, 2023). Após a formação do radical peróxil, ele pode interagir novamente com ácidos graxos presentes nas membranas, removendo um átomo de hidrogênio e formando um hidroperóxido lipídico (ROOH) e um $\text{R}\cdot$, formando uma reação em cadeia, ocasionando em danos às membranas celulares, tornando-os altamente reativos (ENDALE; TESFAYE; MENGSTIE, 2023; VALGIMIGLI, 2023).

O radical alcólxil ($\text{RO}\cdot$), assim como o $\text{ROO}\cdot$ e gerado durante os processos de peroxidação lipídica, por meio da decomposição dos hidroperóxidos lipídicos (D. PATEL et al., 2024). Após a formação do hidroperóxido lipídico ele é catalisado pela interação com metais de transição, como o ferro (Fe^{2+}) ou cobre (Cu^{2+}), pela via de reações de Fenton, tendo como produto um radical alcólxil e um radical hidroxila, que auxilia nos processos de oxidação em cadeia, causando efeitos deletérios a ácidos graxos e proteínas (ENDALE; TESFAYE; MENGSTIE, 2023; VALGIMIGLI, 2023).

O óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$) é gerado nos sistemas biológicos por meio de enzimas óxido nítrico sintases (NOS), elas utilizam a L-arginina como substrato e converte em óxido nítrico, por meio de processos de oxidação, que necessitam de cofatores como nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), flavina adenina dinucleotídeo (FAD), flavina mononucleotídeo (FMN) e tetrahydrobiopterina (MACCALLINI et al., 2024). Existem três isoformas de NOSs que auxiliam na produção de $\text{NO}\cdot$ que são: as (I) endoteliais, responsáveis pelo relaxamento dos vasos sanguíneos e regulação da pressão arterial, as (II) neuronais, localizadas nos neurônios, atuando na sinalização celular do sistema nervoso e as (III) induzidas, que produzem $\text{NO}\cdot$ em grandes quantidades durante respostas imunes e inflamatórias (LUO et al., 2021b; MACCALLINI et al., 2024).

O radical tiól ($\text{RS}\cdot$), ou radical de enxofre, tem sua formação por meio da oxidação de tiolatos (RS^-), que são grupos derivados de tiól ($-\text{SH}$) que estão presentes em aminoácidos como as cisteínas (POOLE, 2014). A formação desses radicais pode ser por meio da desprotonação do grupo tiol RS^- , que podem sofrer oxidação por EROs como o radical hidroxila, gerando um radical tiol ($\text{RS}\cdot$). Outras vias de formação desse

radical são por meio da exposição dos grupos tiol a radiações ionizantes e por meio de reações catalíticas na presença de metais de transição (FRANCIOSO et al., 2020).

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é uma molécula instável, derivado do processo de dismutação do O_2^- (gerado nas mitocôndrias), catalisado pela enzima superóxido dismutase (SOD), mas também pode ser formado por meio de redução de oxigênio de dois elétrons em reações catalisada por oxidases como as xantinas oxidases e glicose oxidases (JOMOVA et al., 2023). Vale ressaltar, que o H_2O_2 , na presença de metais de transição como o íon ferroso (Fe^{2+}), doa elétrons a esse radical, convertendo o ferro em sua forma férrica (Fe^{3+}) e produzindo o radical hidroxila, considerada uma das espécies mais reativas (BLOKHINA; VIROLAINEN; FAGERSTEDT, 2003).

Além disso o H_2O_2 , não possui carga, o que garante sua capacidade de atravessar as membranas biológicas, podendo desempenhar papéis essenciais na transdução de sinal induzido pelo fator de crescimento, manutenção da homeostase redox do tiol e funcionamento mitocondrial, como pode atuar como um fator prejudicial se acumulando dentro das células e interagindo com outras espécies reativas altamente oxidantes, causando danos biomoleculares (VILLAMENA, 2013; JOMOVA et al., 2023) .

O ácido hipocloroso (HOCl) é uma espécie reativa não radicalar endógena e altamente oxidante, possuindo sua maior produção por neutrófilos, eosinófilos, fagócitos mononucleares e linfócitos B em respostas imunológicas ocasionadas por lesões ou combate de infecções, mediados pelas enzimas NADPH oxidases, que estão localizada na membrana mitocondrial (BLOCK; ROWAN, 2020). Nesses sistemas biológicos, sua formação ocorre por meio da reação entre o peróxido de hidrogênio com o íon cloreto (Cl^-), sendo catalisada pela enzima mieloperoxidase, gerando como produto final HOCl + H_2O , e adicionalmente, após a sua formação ele pode reagir com outras EROs gerando outros agentes oxidantes (PULLAR; VISSERS; WINTERBOURN, 2000; VILLAMENA, 2013).

O peroxinitrito (ONOO) é um grande oxidante que possui capacidade de causar danos às biomoléculas, como as proteínas e o DNA, além de interferir em vias de sinalização por meio de nitração de aminoácidos proteicos (JOMOVA et al., 2023). Durante o processo oxidativo que ocorre nos processos inflamatórios, as células do sistema imune produzem quantidades significativas de $NO\cdot$ e o O_2^- , e desta forma, esses

radicais interagem juntos por meio de uma reação de adição e formam o ONOO⁻ (VILLAMENA, 2013).

O oxigênio singlete (¹O₂) é a forma excitada do oxigênio molecular, sendo considerado um grande agente oxidante em sistemas biológicos e uma espécie reativa não radicalar, por não possuir elétrons desemparelhados na última camada de valência, entretanto, podem interagir com outras EROs e causar danos às biomoléculas (KRUMOVA; COSA, 2016). O ¹O₂ é formado a partir da elevação dos elétrons paralelos a um orbital mais alto, com inversão de seu spin, quando submetidos a uma certa quantidade de energia nos sistemas biológicos, como a absorção de energia derivada da luz submetidas as faixas de tons de azul e rosa (DI MEO; VENDITTI, 2020; CUI et al., 2024) . Além disso, essas espécies reativas podem ser produzidas em reações bioquímicas que envolvam outras EROs, durante respostas aos processos inflamatórios do organismo e durante o processo de estresse oxidativo (EDGE; TRUSCOTT, 2021; PRZYGODA et al., 2023).

Em geral, as espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, quando encontradas em baixas concentrações em sistemas biológicos, exibem papéis importantes e desempenham funções como, sinalização celular, vasodilatação, proliferação celular, diferenciação celular, apoptose, defesa contra infecções, respostas inflamatórias e auxiliam no processo de fagocitose, que são essenciais para a atividade, manutenção e defesa dos organismos (PHAM-HUY; HE; PHAM-HUY, 2008; DI MEO; VENDITTI, 2020). Contudo, quando encontrada em altas concentrações em nossos organismos de forma com que, os sistemas antioxidantes não consigam neutralizar e/ou eliminar essa EROs e ERNs, elas causam danos oxidativos as biomoléculas fundamentais, como as proteínas, os lipídios e o DNA (PRYOR et al., 2006).

2.2. Estresse oxidativo

A definição do conceito de estresse oxidativo teve seu aparecimento em 1985, por Helmut Sies, onde em seu trabalho apresentou uma revisão ampla sobre pró-oxidantes, antioxidantes e suas origens (SIES, 1986). Sies definiu o estresse oxidativo como um desequilíbrio entre oxidantes e os antioxidantes, onde há uma superprodução de espécies reativas em baixas concentrações de antioxidantes, que pode ocasionar perda de sinalizações celulares, do controle redox e causar danos moleculares (SIES, 2015; TELEANU et al., 2022).

Os prejuízos ocasionados pelo estresse oxidativo nos organismos biológicos, envolvem danos às organelas, proteínas, lipídios e DNA (HAJAM et al., 2022). Esses danos celulares podem levar ao desenvolvimento do envelhecimento precoce e a uma diversidade de doenças, incluindo, as neurodegenerativas, cardíacas, respiratórias, o câncer, inflamatórias crônicas, renais, hepáticas e diabetes (VALKO et al., 2006; TÖNNIES; TRUSHINA, 2017; PEOPLES et al., 2019; SADASIVAM et al., 2022; JOMOVA et al., 2023).

Entretanto, nosso organismo dispõe de mecanismos de defesa para controlar os danos provocados pela superprodução de radicais livres, a fim de reduzir os danos causados por essas moléculas (BIRBEN et al., 2012). Esses mecanismos são advindos do sistema antioxidante, que podem ser de origem endógena ou exógena.

2.3. Antioxidantes

Como dito anteriormente, a produção de espécies reativas é um processo natural do nosso metabolismo, que auxilia na manutenção e sinalização celular, quando em baixas concentrações. Entretanto, quando existe uma alta produção de radicais livres, gerando uma reação em cadeia deletéria, nosso sistema antioxidante é ativado.

Os antioxidantes, portanto, são considerados enzimas e/ou substâncias que quando presente em concentrações mais baixas em comparação com agentes oxidantes, são capazes de inibir, minimizar e/ou reparar os efeitos deletérios sobre as biomoléculas gerados pelas altas concentrações de espécies reativas (PISOSCHI; POP, 2015). Os antioxidantes podem ser classificados em antioxidantes endógenos enzimáticos e não enzimáticos, e antioxidantes exógenos. Além disso, fazem parte de um sistema complexo, possuindo mais de um mecanismo de ação, sendo eles, a doação de elétrons, quelação de metais, regeneração de antioxidantes e enzimáticos (NIMSE; PAL, 2015; CHAUDHARY et al., 2023) .

Os antioxidantes podem atuar por meio da doação de elétrons ou hidrogênios, para as espécies reativas, estabilizando sua última camada eletrônica e neutralizando esse radical. O ácido ascórbico, é considerado um antioxidante hidrossolúvel capaz de doar elétrons atuando como um agente redutor e neutralizando espécies reativas, como, o peróxido de hidrogênio e o superóxido (PADAYATTY et al., 2003). Outros antioxidantes podem atuar por meio do sequestro de íons metálicos, como o ferro e o cobre, que atuam

por meio da prevenção da catalisação de reações, como as de Fenton, que geram radicais livres (MEYERSTEIN, 2022).

Alguns antioxidantes, podem atuar na regeneração de outros antioxidantes já oxidados, de forma sinérgica, como uma “reciclagem”. Por exemplo, a Coenzima Q10 (ubiquinona), possui capacidade de regenerar antioxidantes lipossolúveis como a vitamina E (GÓMEZ-FERNÁNDEZ; LLAMAS; ARANDA, 1999). Sobretudo, os antioxidantes podem atuar por meio de degradação ou remoção de EROs e ERNs, por meio da ação de enzimas, como a superóxido dismutase (SOD) e a catalase (CAT) (ZHENG et al., 2023).

2.3.1. Antioxidantes endógenos enzimáticos

Os antioxidantes endógenos enzimáticos, são enzimas geradas por nosso organismo com poder antioxidante e são consideradas a linha de frente contra o estresse oxidativo, pois possuem a capacidade de neutralizar, prevenir, impedir e/ou controlar a formação de espécies reativas (BARBOSA et al., 2010). Os antioxidantes endógenos são uma das principais vias de defesa contra o estresse oxidativo, além de auxiliar na manutenção celular. Alguns exemplos desse grupo de antioxidantes são: a superóxido dismutase (SOD); a catalase (CAT); a glutathione peroxidase (GPx) e a glutathione reductase (GR) (ELSAYED AZAB et al., 2019).

A SOD possui três isoformas em sistemas biológicos, SOD1 (Cobre-Zinco SOD), SOD2 (Manganês SOD) e SOD3 (Cobre-Zinco SOD extracelular) e todas elas são responsáveis por converter o ânion superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio (PERRY et al., 2010).

A SOD1 se encontra predominantemente no citoplasma celular, mas também pode ser encontrada no núcleo, nos lisossomos e peroxissomos, e sua atividade depende da presença de cofatores, como o cobre e o zinco (CHE et al., 2015). A SOD2 localiza-se na matriz mitocondrial, mas tem sua síntese no citoplasma, que posteriormente é carregado às mitocôndrias por peptídeo sinal, e precisa da presença de manganês, que atua como cofator para ativação da enzima (FARACI; DIDION, 2004; FUKAI; USHIO-FUKAI, 2011). A SOD3 é uma proteína secretora e está localizada principalmente nos tecidos, matriz celular e superfície celular e em menor quantidade no plasma e fluidos extracelulares, possuem os mesmos cofatores que SOD1, entretanto possuem um peptídeo sinal responsável pela localização e secreção (FUKAI; USHIO-FUKAI, 2011).

Por meio da ação da SOD durante o processo de respiração celular o H_2O_2 é gerado, visto isso, a CAT é predominantemente encontrada nos peroxissomos e atua na defesa antioxidante por meio da catalisação da decomposição do peróxido de hidrogênio em água (H_2O) e oxigênio (O_2), evitando o acúmulo de H_2O_2 celular, que pode ocasionar danos celulares na presença de íons metálicos de transição por meio da geração de radicais com maior potencial reativo (GALASSO et al., 2021).

A GPx é considerada uma família de enzimas antioxidantes, possuindo oito isoformas diferentes (GPx1 – GPx8), entretanto, a mais abundante encontrada nos organismos é a GPx1, localizada no citoplasma de todos os tecidos e possui maior quantidade no coração. Sobretudo, a GPx1 atua junto a SOD e a CAT catalisando a redução do H_2O_2 em duas moléculas de H_2O por meio da oxidação da glutatona reduzida (GSH) em glutatona oxidada/dissulfeto (GSSG) (PEI et al., 2023; JOMOVA et al., 2024).

A glutatona oxidada/dissulfeto (GSSG) é a forma da glutatona (GSH) oxidada, que é formada após as reações de redução de espécies reativas. Ela indica o estado oxidativo celular por meio do equilíbrio entre GSH e GSSG (NARAYANANKUTTY; JOB; NARAYANANKUTTY, 2019). O acúmulo de GSSG é utilizado como um sinalizador de estresse oxidativo, visto que, para a sua formação é necessário o uso de GSH para neutralização de radicais livres e peróxidos (SARIKAYA; DOGAN, 2020). Quando em altas quantidades no organismo, a glutatona redutase (GR) consegue converter o GSSG em GSH por meio da doação de elétrons de NADPH, mantendo o equilíbrio entre GSH e GSSG, exemplificado na **Figura 1** (VAŠKOVÁ et al., 2023).

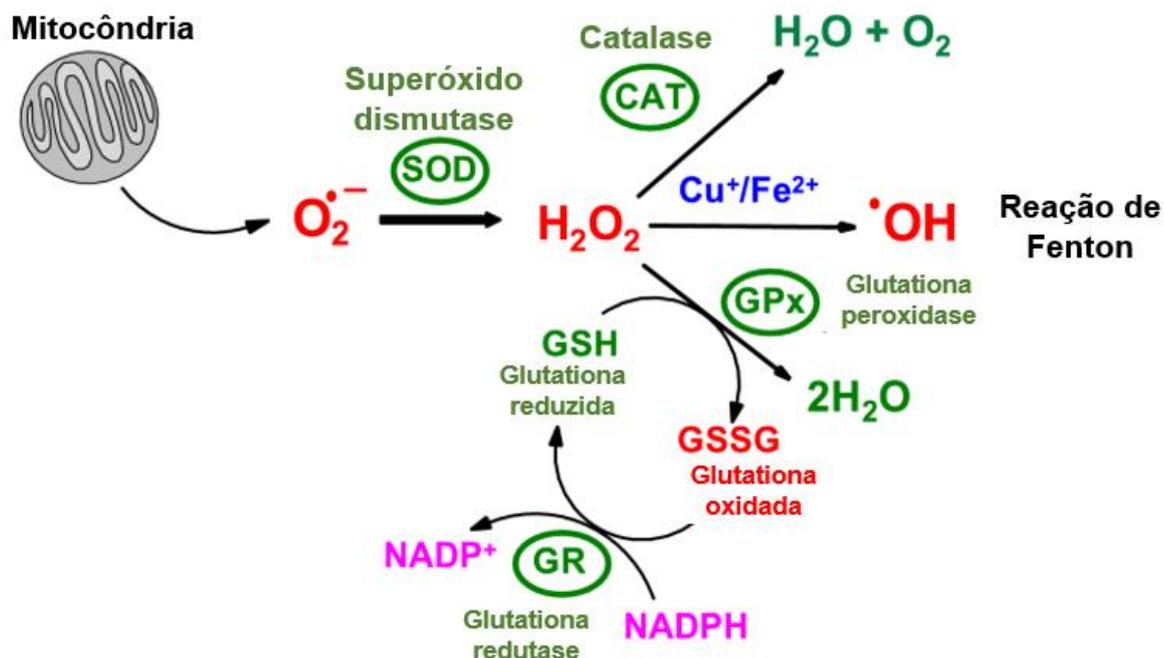


Figura 1: Ação das enzimas antioxidantes endógenas: superóxido dismutase, catalase e glutaciona peroxidase. **Adaptado de:** JOMOVA et al., (2024)

2.3.2. Antioxidantes endógenos não enzimáticos

Os antioxidantes endógenos não enzimáticos são moléculas sintetizadas pelo nosso organismo, capazes de neutralizar rapidamente radicais livres sem a necessidade da atividade catalítica de enzimas. Sua ação ocorre por meio da doação direta de elétrons para espécies reativas a fim de neutralizá-las. Alguns dos principais antioxidantes endógenos não enzimáticos são: as proteínas de ligação de metais, a glutaciona, ácido úrico, melatonina, bilirrubina, e coenzima Q (AHMED; MOHAMMED, 2020).

As proteínas de ligação de metais foram um dos primeiros antioxidantes endógenos descritos, que incluem proteínas extracelulares e intracelulares, como a albumina, ceruloplasmina, metalotioneínas, ferritina, transferina, lactoferrina e mioglobina. A Albumina é considerada uma proteína antioxidante, capaz de se ligar a metais redox e agir na eliminação de espécies reativas reagindo com radicais hidroxila. A ceruloplasmina, pode atuar por meio da inibição de radicais livres por ligação de cobre livre e íons de ferro. As metalotioneínas possuem capacidade de se ligar a íons metálicos redox ativos e estáveis redox, além de atuar como um necrófago de espécies reativas. Já as transferinas, ferritinas e lactoferrinas, são quelantes de ferro capazes de atuar na

inibição de radicais livres em reações de Fenton. E a mioglobina é um dos principais eliminadores de NO^\cdot (MIROŃCZUK-CHODAKOWSKA; WITKOWSKA; ZUJKO, 2018).

A glutatona é um composto formado por três aminoácidos (glicina, cisteína e ácido glutâmico) com baixo peso molecular, geralmente ela é sintetizada nos hepatócitos, entretanto outros tecidos também podem sintetizá-la, por se tratar de um antioxidante solúvel, pode ser encontrada no citoplasma, nas mitocôndrias e no núcleo celular (LU, 2013). A GSH é responsável não somente pela eliminação de radicais livres, como auxilia no reparo dos danos causados pelos mesmos, além de conseguir regenerar outros antioxidantes já oxidados, como a vitamina C e a vitamina E (MIROŃCZUK-CHODAKOWSKA; WITKOWSKA; ZUJKO, 2018).

O ácido úrico é considerado um produto final do processo de catabolismo de nucleotídeos de purinas, podendo ser sintetizado principalmente em nosso organismo pelo intestino, fígado, músculos, rins, glândulas mamárias, endotélio vascular e o epitélio da córnea ou advindo por meio de alimentos da dieta (NDREPEPA, 2018). Além disso, em concentrações ideais, atua como um dos mais importantes antioxidantes no plasma, sendo capaz de neutralizar radicais livres como o ONOO^- , o $\cdot\text{OH}$ e os radicais livres que contenham ferro, além de auxiliar na preservação da função e estrutura da SOD extracelular e atuar na proteção e reparo do DNA oxidado (ROUMELIOTIS et al., 2019).

A melatonina é considerada um hormônio essencial que é secretado durante o período noturno, e sua produção ocorre pela glândula pineal, que está localizada no cérebro, possuindo um papel extremamente importante na regulação do ciclo do sono, conhecido como: ciclo circadiano (SANTOS-LEDO; GARCÍA-MACIA, 2024). Adicionalmente a MEL, atua como um antioxidante endógeno não enzimático, capaz de eliminar radicais hidroxila e o peroxinitrito, reduzir a peroxidação lipídica no cérebro e evitar a toxicidade do oxigênio singlete, desta forma garantindo efeitos neuroprotetores e protetores celulares contra os danos oxidativos (WATSON et al., 2016).

A bilirrubina, é produzida principalmente no baço e no fígado, por meio do processo de degradação de componentes que possuem heme, como a hemoglobina e algumas proteínas específicas (ADIN, 2021). A bilirrubina é considerada, portanto, um produto final do catabolismo heme, onde cerca de 4mg por quilograma corporal é produzido por nosso organismo (OTERO REGINO; VELASCO; SANDOVAL, 2009).

A coenzima Q ou ubiquinona, é sintetizada a partir de aminoácidos de tirosina e da via de mevalonato, sendo encontrada em todas as membranas celulares atuando como um transportador de elétrons e um potente antioxidante (MANTLE et al., 2023). A

ubiquinona é considerada um lipídio redox-ativo, atuando nas mitocôndrias como um transportador de elétrons na cadeia respiratória, onde recebe elétrons dos complexos I e II e doa ao complexo III da cadeia transportadora de elétrons (FERNÁNDEZ-DEL-RÍO; CLARKE, 2021). Quando encontrada em sua forma reduzida, denominada de ubiquinol, atua como um potente antioxidante capaz de eliminar os radicais livres, protegendo contra o efeito deletério ocasionado sobre lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos (FIŠAR; HROUDOVÁ, 2024).

2.3.3. Antioxidantes exógenos

Os antioxidantes exógenos, são compostos que geralmente não são produzidos por nosso organismo, podendo ser obtidos por meio da dieta alimentar ou por suplementação (TRESSERRA-RIMBAU, 2020). Assim como os antioxidantes endógenos enzimáticos e não enzimáticos, os antioxidantes exógenos possuem papel essencial na neutralização das espécies reativas (BIANCHI; ANTUNES, 1999). Dentre os antioxidantes exógenos podemos destacar o ácido ascórbico (vitamina C), os tocoferóis (vitamina E), os carotenoides, os polifenóis, flavonoides, e os minerais, como o selênio (Se) e o zinco (Zn).

O ácido ascórbico (AA) é essencial para várias funções do nosso organismo, entretanto, durante a evolução, humanos e alguns primatas deixaram de sintetizar esse composto ocasionado por uma disfunção na L-gulonolactona oxidase, enzima essa, responsável por catalisar a conversão de L-gulonolactona em AA (TRABER; STEVENS, 2011). Diante disso, os seres humanos dependem de fontes exógenas advindas da dieta e/ou suplementação, para a obtenção desse relevante antioxidante.

A vitamina C é considerada um dos antioxidantes mais poderosos, com características hidrossolúveis, possuindo potencial de eliminação direta de radicais livres como o superóxido, radicais hidroxila, oxigênio singlete e redução do peróxido de hidrogênio a água por meio de uma reação de ascorbato peroxidase (BLOKHINA; VIROLAINEN; FAGERSTEDT, 2003). Em acréscimo, o AA pode atuar como cofator de enzimas (em especial as hidrolases), na síntese de colágeno e regenerar o tocoferol por meio do radical tocoferoxila (THOMAS et al., 1992; ROCK; JACOB; BOWEN, 1996; BIANCO; SILVA, 2017).

Já o tocoferol, que também é conhecido popularmente como vitamina E, é um potente antioxidante lipofílico, e essa característica o torna um excelente eliminador de radicais livres do tipo peroxila (TRABER; STEVENS, 2011). A vitamina E, doa elétrons

para radicais peroxila e mantém a sua estabilidade por meio de ressonância, essa atividade garante a interrupção de reações em cadeia de oxidação de membranas e lipoproteínas plasmáticas ocasionadas por radicais livres, evitando a peroxidação lipídica (SUÁREZ-JIMÉNEZ et al., 2016; YAMAUCHI; YAGI; KATO, 1996).

Os carotenoides, correspondem a mais de 600 compostos descritos, considerados antioxidantes que possuem moléculas com características lipofílicas, assim como os tocoferóis (KRINSKY, 1998; PISOSCHI; POP, 2015). Devido a sua característica lipofílica, também são considerados forte eliminadores de radicais peroxila, protegendo contra danos oxidativos às membranas celulares (STAHL; SIES, 2003). Entretanto, esses compostos também possuem capacidade de eliminação de oxigênio singlete, e essas reações podem ser por meio transferência direta de elétrons, abstração de hidrogênio e adição de radicais às moléculas (YOUNG; LOWE, 2001).

Os polifenóis são um grande grupo de compostos bioativos naturais de origem vegetal, que são amplamente encontrados na dieta alimentar. Esse grupo inclui classes como os flavonoides, os ácidos fenólicos, os taninos e estilbenos (TRESSERRA-RIMBAU, 2020). Como dito anteriormente, os polifenóis são de origem vegetal, produzidos como metabólitos secundário das plantas para proteção contra organismos, desta forma quando consumido, esses compostos auxiliam nosso organismo na defesa antioxidante neutralizando radicais livres, por meio de doação de elétrons, quelação de metais e regeneração de vitaminas, além de estimular enzimas antioxidantes endógenas e quebrar reações de oxidação em cadeia (TSAO, 2010).

Os flavonoides fazem parte do grande grupo de compostos fenólicos, que são sintetizados por plantas como metabólitos secundários, auxiliando no desenvolvimento e defesa desse organismo (HERNÁNDEZ et al., 2009). Esses compostos possuem a estrutura química básica formada por 2 anéis aromáticos, um anel heterocíclico oxigenado e 15 átomos de carbono, entretanto, a troca do grupo funcional no anel heterocíclico por metil, hidroxila, glicano, acetil, ou outro grupo, determinam as subclasses de flavonoides (ALKHALIDY; WANG; LIU, 2018).

Adicionalmente os flavonoides são encontrados em plantas como derivados glicosilados, podendo ser encontrado nas flores, frutos, vegetais, grãos e ervas aromáticas, desempenhando importantes atividades em nosso corpo, como, efeito antioxidante, anti-inflamatória, neuroprotetora e cardioprotetora (PIETTA, 2000; ROCHA-VELASCO; YEH et al., 2021; MORALES-SUÁREZ-VARELA; LLOPIS-GONZÁLEZ, 2024).

Os minerais selênio (Se), zinco (Zn), cobre (Cu), manganês (Mg) e ferro (Fe), também são antioxidantes advindos da dieta, que auxiliam nosso sistema de defesa antioxidante como cofatores de enzimas antioxidantes endógenas como a GPx, SOD e CAT na neutralização de espécies reativas (GOFF, 2018).

2.4. Abelhas sem ferrão

As abelhas são agentes essenciais na polinização para a reprodução da maioria das angiospermas, e esse fato está totalmente relacionado com a dependência desses insetos por recursos florais, como o pólen e o néctar, desde a sua fase larval até o indivíduo adulto, e dentre as abelhas, os meliponíneos são os principais agentes polinizadores de espécies nativas (DA PAZ, 2012; ROUBIK, 2023; SILVA).

As abelhas sem ferrão ou “abelhas indígenas” ou “abelhas nativas”, são pertencentes a ordem Hymenoptera, da família Apidae, e da tribo Meliponini, encontradas nas regiões tropicais e subtropicais, como no sudeste da Ásia, na África, na Austrália e América Latina, incluindo o Brasil, com a existência de cerca de mais de 600 espécies de abelha sem ferrão, sendo que só no Brasil já foram descritas 300 espécies (ROUBIK; ROUBIK, 1992).

Embora sejam denominadas como abelhas sem ferrão, essas abelhas possuem um ferrão vestigial, ou seja, elas apresentam as estruturas e o aparato da picada, mas são reduzidos, atrofiados e não funcionais (ENGEL et al., 2023). Essas abelhas constroem seus ninhos a partir de fissuras, cavidades e espaços ociosos já existentes na natureza e no ambiente em que se encontram, além de possuírem hábitos de nidificação diversificada e relativamente complexa, desde a estrutura da entrada do ninho ao seu interior (SILVA; DA PAZ, 2012).

As abelhas sem ferrão são parte de um grupo bem diversificado em sua fisiologia, morfologia e tamanho, podendo variar de 0,2 mm a mais de 20 mm, e essas características principalmente em relação ao seu tamanho está relacionado diretamente com a distância de voo que essas abelhas podem voar, ou seja, abelhas de menor tamanho percorrem menores distâncias que abelhas de maior porte (ARAÚJO et al., 2004; STUCHI et al., 2014).

2.5. *Nannotrigona testaceicornis*

Dentre as espécies de abelhas sem ferrão descritas atualmente, destaco a *Nannotrigona testaceicornis* (Lepelletier, 1836) (**Figura 2**), distribuída pelos estados

brasileiros como a Bahia, Espírito Santo, Goiás, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraná, Rio Grande do Sul, Rio de Janeiro, Santa Catarina, São Paulo e Tocantins (CAMARGO, 2023) Essas abelhas são de pequeno porte, em torno de 4,90 mm e sua colônia possui cerca de 1750 operárias, e são utilizadas na meliponicultura brasileira. Entretanto, essas abelhas possuem uma baixa produção de mel e cerume (CORREIA; PÉREZ-MALUF; COSTA, 2023).



Figura 2: Espécime de *Nannotrigona testaceicornis*. **Fonte:** “Coleção Entomológica do Prof. João M.F. Camargo”, FFCLR/ USP.

Essa espécie é conhecida popularmente como Iraí, considerada como uma abelha dócil, que pode ocupar vegetações neotropicais e até mesmo alguns ambientes urbanos (RASMUSSEN; GONZALEZ, 2017) . A entrada do ninho das abelhas dessa espécie é formada por um canudo, a partir de ceras e resinas, que ficam resguardado por uma fileira de operárias, e em caso de ameaça ao ninho, elas entram rapidamente para a colônia e fecham a entrada com cera, principalmente no período noturno (CORREIA; PÉREZ-MALUF; COSTA, 2023).

Populações indígenas consideram os produtos provenientes dessas abelhas de extrema riqueza, utilizando larvas, mel, pólen apícola e cerume para diversas finalidades, como alimentação, artesanato e medicina (RASMUSSEN; GONZALEZ, 2017).

Atualmente os produtos apícolas de *N. testaceicornis*, vem ganhando espaço no campo científico, com trabalhos que relatam potenciais atividades do mel e própolis dessa espécie, como atividade antioxidante e atividade antimicrobiana (ALVES FILHO; MENEZES, 2005; GONÇALVES; SANCHES; PEREIRA; SERRÃO, 2017; CARVALHO et al., 2021).

2.6. Produtos apícolas

Atualmente há uma busca por produtos naturais que possuam benefícios a saúde humana, como atividade antioxidante, anticâncer, antibacteriana, e/ou que auxiliem no tratamento de diversas doenças e na prevenção do envelhecimento precoce. No âmbito dos produtos naturais destaca-se os produtos apícolas de abelhas sem ferrão, que são comumente encontrados na natureza e produzidos em meliponiculturas.

Os produtos apícolas têm sido alvo de estudos no campo científico, onde já existem diversos trabalhos que comprovam as atividades desses produtos. Dentre estes produtos estão o mel, a própolis, o geoprópolis, o cerume, , e o pão de abelha, que são produzidos, coletados e até fermentados por abelhas sem ferrão (PIMENTEL et al., 2022; ZAKARIA et al., 2022; FERREIRA et al., 2023).

Não é possível se estabelecer uma uniformidade na composição química dos produtos de abelha sem ferrão, uma vez que a flora, a localização geográfica, o clima e até mesmo o manejo desse material na meliponicultura podem alterar as propriedades químicas desses produtos e interferir na sua bioatividade, sobretudo, isso torna esses produtos únicos a depender de cada região e coleta (AL-HATAMLEH et al., 2020).

Diferentemente das abelhas com ferrão, as abelhas sem ferrão armazenam o seu mel em potes feitos com cerume que podem variar em tamanho e forma e dependendo da forma em que é coletado pode adquirir uma característica mais ácida devido ao contato com o pão de abelha (produto fermentado), que pode adquirir propriedades diferentes (MENEZES; VOLLET NETO; FONSECA, 2012).

O cerume é um produto apícola produzido exclusivamente por meliponíneos, e elaborado a partir da mistura de enzimas salivares, cera de abelha e resinas vegetais coletadas de diversas plantas (ROUBIK, 2006). Esse material é produzido pelas abelhas sem ferrão e secretado por meio de glândulas cerígenas localizadas em seu abdômen, que são misturadas a resinas vegetais no ninho, formando uma mistura densa e relativamente flexível (CHUTTONG et al., 2023) .

O cerume é utilizado para diversas funções no ninho (**Figura 3**) que auxiliam no funcionamento e sobrevivência das colônias, como a construção de estruturas internas, sendo elas os potes de mel e pólen, células de cria, pilares, invólucros e reparos internos. Além disso, atua como barreiras para a proteção da colônia e auxiliam no isolamento da colmeia, mantendo a temperatura interna do ninho (SHANAHAN; SPIVAK, 2021). Na (**Figura 3**) é possível observar a própolis produzidas por essas abelhas sem ferrão que auxilia junto ao cerume a proteção do ninho.

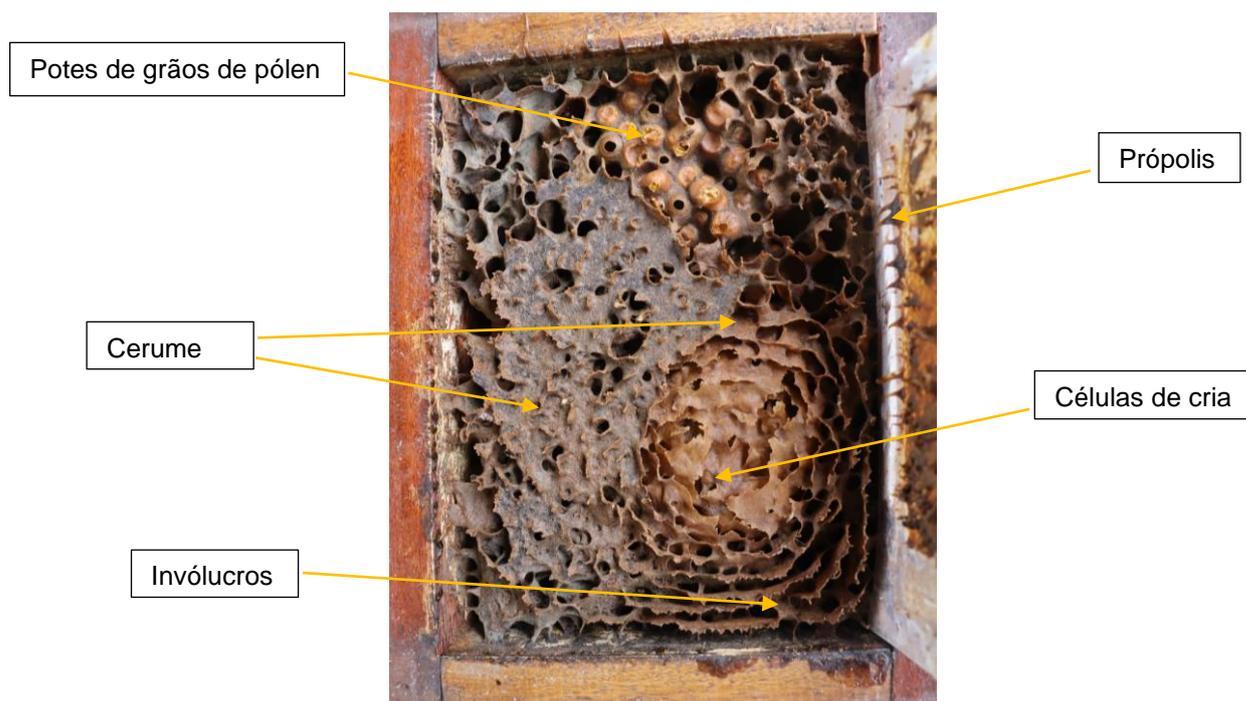


Figura 3: Ninho de *Nannotrigona testaceicornis*. Autoria própria.

Devido a sua composição possuir resinas vegetais que podem conter diversos compostos incluindo polifenóis e flavonoides, garantem certas propriedades tanto para a manutenção e sobrevivência dos ninhos, quanto para o campo científico que vem explorando essa bioatividade (FERREIRA et al., 2023). Dentre essas propriedades podemos destacar a atividade antioxidante e antimicrobiana (CHUTTONG et al., 2023; FERREIRA et al., 2023). Além disso, Ferreira *et al* (2023) trouxe pela primeira vez, a avaliação do potencial antioxidante do cerume de *Tetragonista fiebrigi* e *Geotrigona sp.* Em modelo *in vivo* utilizando o modelo pré-clínico *C. elegans*, aplicado a área da saúde.

2.7. Modelo pré clínico *Caenorhabditis elegans*

O *Caenorhabditis elegans* (**Figura 4**) foi identificado pela primeira vez por Sydney Brenner em 1993, esses nematoides possuem vida livre, podendo ser encontrado no solo e em matéria vegetal em decomposição (WU et al., 2024). São indivíduos que possuem cerca de 60 – 80 % de genes homólogos com seres humanos, que desempenham funções biológicas semelhantes em ambos os organismos, além disso possuem cerca de 40 % de genes ortólogos a algumas doenças (CORSI; WIGHTMAN; CHALFIE, 2015).

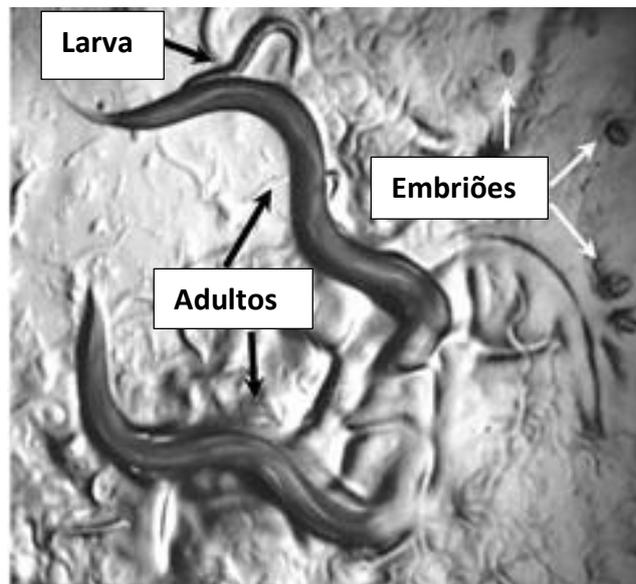


Figura 4: *Caenorhabditis elegans*. Embriões, larva e adultos. **Adaptado de:** Corsi et al. (2015)

Na primeira fase larval possui cerca de 0,25 mm de comprimento, enquanto adultos conseguem atingir tamanho de 1 mm. Esses nematoides podem ser hermafroditas e autofecundantes, ou machos. Um grande potencial desse modelo é seu ciclo de vida relativamente rápido, podendo chegar a fase adulta com postura de ovos em 72 h e possui uma expectativa média de vida entre 25 e 26 dias, contados desde a fase embrionária (STRANGE, 2006).

Esse organismo multicelular possui uma embriogênese de 16 h, onde após a fertilização é constituído uma casca em volta do ovo fecundado, o tornando impermeável, desta forma, esses animais ficam retidos dentro dos hermafroditas até a formação de 24 células, e após esse período é realizada a postura (NANCE, 2005). A eclosão ocorre quando o embrião atinge 558 núcleos celulares, atingindo o estágio L1. Já os estágios

larvais (L1 – L4) tem duração de cerca de 12 horas, onde cada fim de estágio é formado uma nova cutícula no animal. Quando atingem o estágio final L4, após 12 horas, os hermafroditas já são considerados indivíduos adultos e começam a fazer a postura de ovos que pode durar de 3 – 5 dias, atingindo uma postura média de 300 ovos (WU et al., 2024). Esse ciclo de vida pode ser observado na **Figura 5**.

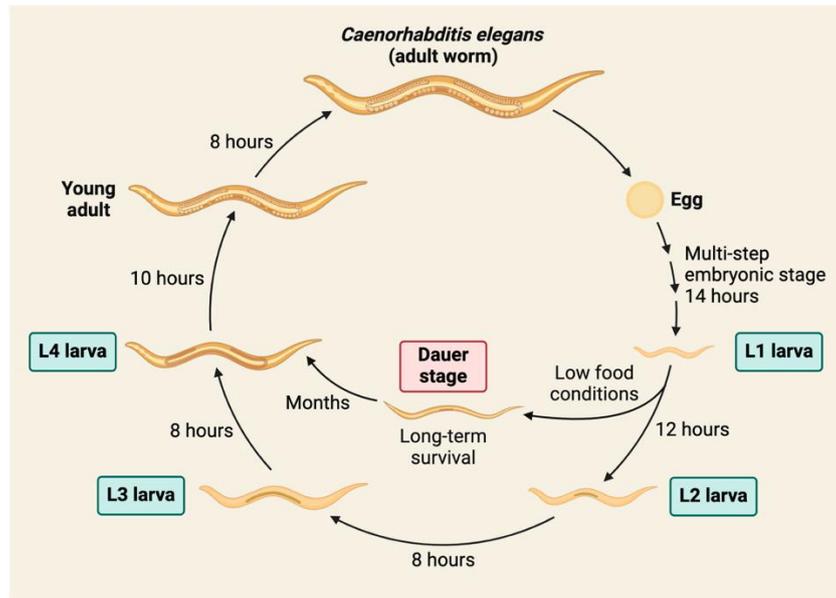


Figura 5: Ciclo de vida de *C. elegans*. **Fonte:** WU et al., 2024

Uma característica fundamental desses animais é o mecanismo de sobrevivência denominado “dauer”. Quando há escassez de alimento, ou fatores ambientais que não favorecem seu desenvolvimento, larvas em estágio L2 formam uma cutícula de proteção que envolve o animal por completo obstruindo a sua boca, impedindo sua alimentação e diminuindo sua atividade metabólica (GOLDEN; RIDDLE, 1984). Esse ciclo de vida alternativo possibilita que esses nematoides sobrevivam por meses até encontrar condições favoráveis para seu desenvolvimento, onde perdem a cutícula que recobre a boca, possibilitando que o animal volte a se alimentar e continuar a se desenvolver em estágio L4 (GOLDEN; RIDDLE, 1984).

Em laboratórios esses nematoides são criados em placas de Petri contendo ágar NGM (Nematode Growth Medium), que consiste em um meio com nutrientes essenciais para seu desenvolvimento, e como fonte de alimentação, são tratados com *Escherichia*

coli OP50 (WU et al., 2024). Para seu manuseio e trabalho, é essencial e necessário o uso de microscópio estereoscópio para visualização, pois possuem tamanho reduzido. Esses indivíduos possuem corpo transparente, sendo possível a visualização de estruturas funcionais, além de serem excelentes modelos para visualização de proteínas e expressões gênicas por meio de marcadores de fluorescência, o que permite estudar vias de sinalização, conjuntos de células, desenvolvimento celular e embrionário, e os sistemas (CORSI; WIGHTMAN; CHALFIE, 2015).

Outro fator importante desses animais, é que foram os primeiros organismos multicelulares a terem a sua sequência genômica descrita. Esses nematoides possuem um número invariável de 959 células somáticas, sendo que hermafroditas possuem 302 neurônios e os indivíduos machos possuem 385 (CORSI; WIGHTMAN; CHALFIE, 2015).

Todas essas informações descritas anteriormente, tornam o *C. elegans* um excelente modelo animal e ferramenta biotecnológica, auxiliando no desenvolvimento de pesquisas envolvendo ensaios de toxicidade, longevidade, vias de sinalização, expressão gênica, metabolismo e reprodutivos em um organismo celular completo (HUNT, 2017; JONES et al., 2010; LINK et al., 2003).

3. Objetivos

Geral

Investigar a composição química e a atividade antioxidante do cerume da abelha sem ferrão *Nannotrigona testaceicornis* *in vitro* e *in vivo*.

Específicos

- Quantificar a concentração de polifenóis e flavonoides no extrato etanólico de cerume da abelha *N. testaceicornis* (EEC-Nt).
- Analisar a capacidade do EEC-Nt de inibir os radicais livres 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH•) e 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS•+) *in vitro*;
- Verificar a toxicidade de diferentes concentrações de EEC-Nt em *Caenorhabditis elegans* na linhagem selvagem N2;
- Avaliar atividade antioxidante aguda e subcrônica induzida por 5-hidroxi-1,4-naftoquinona (Juglone) de EEC-Nt.

4. Justificativa

A grande importância de investigar antioxidantes naturais está associada ao seu papel crucial que exercem no combate ao estresse oxidativo, condição essa que ocorre quando existe um desequilíbrio entre as espécies reativas e os mecanismos antioxidantes de defesa do nosso organismo (AHMED; MOHAMMED, 2020). Esse desequilíbrio se encontra diretamente ligado ao envelhecimento precoce e ao desenvolvimento de diversas doenças, como, as cardiovasculares, neurodegenerativas, câncer e diabetes (CHAUDHARY et al., 2023).

A busca por fontes naturais de antioxidantes que podem ser advindos por meio da dieta, é uma área de crescente interesse científico, especialmente quando associada a sustentabilidade e a valorização de recursos provenientes da biodiversidade (TRESSERRA-RIMBAU, 2020). Desta forma, os produtos naturais, emergem como uma alternativa viável para o desenvolvimento de terapias antioxidantes, sendo importante tanto para a ciência, quanto para a indústria farmacêutica (FIRUZI et al., 2011).

Nesse contexto, o uso de produtos apícolas já é conhecido por suas propriedades biológicas benéficas tanto para fins nutritivos, quanto para seu uso medicinal (LUO et al., 2021a). Entretanto há uma ampla gama de estudos referentes aos produtos apícolas de *Apis mellifera*, e uma baixa produção de estudos referentes aos produtos apícolas de meliponíneos (AL-HATAMLEH et al., 2020).

As abelhas sem ferrão, são responsáveis pela produção de diversos biocompostos com relevâncias ecológicas e terapêuticas. A *Nannotrigona testaceicornis* possui na literatura trabalhos referentes a atividade antioxidante e antibacteriana de seu mel e própolis, entretanto, o estudo dos produtos apícolas desse meliponíneo ainda é escasso (ALVES FILHO; MENEZES, 2005; GONÇALVES; SANCHES; PEREIRA; SERRÃO, 2017; CARVALHO et al., 2021). Dentre os produtos apícolas de abelha sem ferrão, destaco o cerume da abelha *Nannotrigona testaceicornis*, produto composto pela mistura de cera e resinas vegetais coletadas do ambiente (PEREIRA et al., 2012).

Atualmente, a literatura não apresenta estudos relacionados ao cerume dessa espécie, mas, com base em estudos referente ao mel e própolis dessa abelha, acredita-se que esse produto possa apresentar potencial bioprospectivo. Desta forma, este estudo, buscou investigar a atividade antioxidante do cerume de *N. testaceicornis* por meio de ensaios *in vitro* e *in vivo* utilizando o modelo pré-clínico *Caenorhabditis elegans*.

5. Material e métodos

5.1. Obtenção do cerume e preparo do extrato

As amostras de cerume da espécie *N. testaceicornis* foram coletadas pelo professor José Benedito Perrela Balestieri em Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil (22°13'24.8"S 54°48'45.2"W). Para o preparo do extrato etanólico de cerume de *Nannotrigona testaceicornis* (EEC-Nt) foi utilizado 4,5 ml de etanol 80% para cada 1 g de cerume. A mistura ficou em banho-maria a 70 °C em recipiente fechado até a sua total dissolução, em seguida as amostras foram filtradas com papel filtro qualitativo 80 g/m², obtendo-se o EEC-Nt, que foi armazenado a -20 °C para a realização dos experimentos.

5.2. Ensaio de determinação de compostos fenólicos totais e flavonoides

O conteúdo de compostos fenólicos totais foi investigado utilizando o método colorimétrico Folin-Ciocalteu, descrito por Meda et al. (2005). Para isto, 500 µl de EEC-Nt na concentração de 3,0 mg/ml foram adicionados a 2,5 ml do reagente Folin-Ciocalteu (1:10). Essa solução foi incubada no escuro em temperatura ambiente por 5 min, e após esse período, foram adicionados 2,0 ml de carbonato de sódio (Na₂CO₃) (14%) sendo incubado novamente ao abrigo de luz por 2 h. Como curva padrão de calibração, foram utilizadas diferentes concentrações de ácido gálico (0,2 – 21,7 µg/ml). Para o branco, foi utilizado etanol 80%. A absorbância foi mensurada a 760 nm, e os resultados expressos em mg equivalentes de ácido gálico por g de extrato. Foram realizados três experimentos independentes em triplicata.

O conteúdo de flavonoides foi determinado de acordo com método descrito por Liberio et al., (2011). Neste método, 500 µl de EEC-Nt na concentração de 3,0 mg/ml, foram adicionados a 4,5 ml do reagente cloreto de alumínio hexahidratado (AlCl₃6H₂O) (2%), que foi solubilizado em metanol. Essa solução foi incubada ao abrigo de luz e em temperatura ambiente por 3 min. Para a curva padrão de calibração, foram utilizadas diferentes concentrações de quercetina (0,2 – 21,7 µg/ml). Para o branco foi utilizado metanol. A absorbância foi mensurada a 415 nm, e os resultados expressos em mg equivalentes de quercetina por g de extrato. Foram realizados três experimentos independentes em triplicata.

5.3. Atividade antioxidante *in vitro*

A experimentação *in vitro*, foi realizada com finalidade de avaliar a atividade antioxidante do EEC-Nt em ambiente controlado. Os ensaios foram realizados em laboratórios, por meio de sistemas bioquímicos específicos para a análise dessas propriedades, como o método de captura do radical livre DPPH[•] e ABTS[•]. Ensaios *in vitro*, permite analisar de forma controlada e reprodutível a atividade antioxidante do EEC-Nt, como uma eficaz triagem inicial. Além disso, esses experimentos permitem a continuidade dos estudos em modelos mais complexos, como ensaios *in vivo*.

5.4. Captura do radical livre DPPH[•]

O ensaio de captura do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH[•]) foi realizado de acordo com o método descrito por Campos et al (2015). Para isso, 200 µl de diferentes concentrações de EEC- Nt (1 – 3000 µg/ml) foram misturadas à 1800 µl de solução de DPPH (0, 11 mM) em etanol 80 %. A mistura foi homogeneizada e incubada à temperatura ambiente no escuro durante 30 min, e a absorvância mensurada a 517 nm. O ácido ascórbico (AA) e BHT foram utilizados como controles de referência. Foram realizados três experimentos independentes em triplicata. A porcentagem de inibição do DPPH nas amostras foi calculada pela equação descrita a seguir:

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

5.5. Captura do radical livre ABTS[•]

O ensaio de captura do radical livre 2,2'- azinobis (3- etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) ABTS[•], foi realizado como descrito por Re et al (1999). Para isso, 20 µl de diferentes concentrações de EEC- Nt (1 – 2000 µg/ml) foram misturadas à 1980 µl de solução de ABTS[•] (com absorvância de 0,700 ± 0,05). A mistura foi homogeneizada e incubada no escuro por 6 minutos em temperatura ambiente, e absorvância foi mensurada a 734 nm em espectrofotômetro. O ácido ascórbico e o BHT foram usados como controles de referência. A porcentagem de inibição do ABTS[•] nas amostras foi definida pela seguinte equação:

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

5.6. Atividade Antioxidante *in vivo*

A experimentação *in vivo* foi realizada com objetivo de avaliar os efeitos de toxicidade e atividade antioxidante do EEC-Nt em organismos vivos. Para isso, foram utilizado o modelo pré-clínico *C. elegans*. Dentre as vantagens de uso desses nematoides em estudos de biologia celular e molecular aplicados à saúde humana destaca-se a presença de 40 a 60% de homologia com genes humanos, descrição e sequenciamento completos de seu genoma, curto ciclo de vida, corpo transparente e facilidade de manutenção comparado a outros modelos (CORSI; WIGHTMAN; CHALFIE, 2015). Estas vantagens viabilizam a investigação das propriedades biológicas de produtos naturais, fármacos e biomoléculas em um organismo *in vivo* por completo (Corsi, 2015).

5.7. Linhagem e manutenção de *C. elegans*

Para realização dos ensaios *in vivo* foi utilizada a linhagem selvagem N2 de *C. elegans*, obtidas do *Caenorhabditis Genetics Center* (CGC) (University of Minnesota, Minneapolis, MN, USA). Os nematoides foram cultivados em placas de Petri contendo ágar NGM (*Nematodes Growth Medium*) e alimentados com *Escherichia coli* OP50. Para a realização dos experimentos, os nematoides foram sincronizados antes da experimentação, e utilizados em estágio L4.

5.8. Letalidade em *C. elegans*

Para avaliação do potencial efeito tóxico do extrato foi realizado o teste de toxicidade em *C. elegans*. Nematoides (10 a 20 indivíduos) em estágio L4 foram transferidos para placas de 96 poços contendo 100 µl de meio M9. Posteriormente, foram adicionados 100 µl do EEC-Nt em diferentes concentrações (10 – 2000 µg/ml). Para o controle de viabilidade, foram adicionados 100 µl de meio M9. As placas foram mantidas em B.O.D a 20 °C e avaliadas em 24 e 48 h. A viabilidade dos nematoides foi avaliada pela sensibilidade e movimentação, com auxílio de uma micro espátula de fio de platina,

classificando-os como vivos ou mortos. Para a visualização dos nematoides durante o experimento foi utilizado um microscópio estereoscópio. Foram realizados três experimentos independentes em triplicata e os resultados expressos em porcentagem de sobrevivência dos nematoides pela seguinte equação: Viabilidade (%) = $(N_f \times 100) / N_i$. Onde: N_i é o número inicial de nematoides e N_f o número final de nematoides.

5.9. Estresse oxidativo agudo induzido por Juglone

Para o ensaio de estresse oxidativo agudo induzido pelo agente oxidante juglone, 10 a 20 nematoides do tipo selvagem N2 em estágio L4 foram transferidos para microplacas de 96 poços contendo 100 µl de diferentes concentrações do EEC-Nt (100 – 1500 µg/ml) e pré incubados a 20 °C por 1 h. Posteriormente, 50 µl de juglone (concentração final 250 µM) foi adicionado aos poços, e a microplaca foi incubada em B.O.D a 20 °C. O controle positivo foi incubado apenas com meio M9 e, o controle negativo foi incubado com M9 e juglone. A viabilidade foi avaliada pela movimentação e sensibilidade dos nematoides ao toque de uma micro espátula de fio de platina de hora em hora, durante 6h. Os animais foram classificados como vivos ou mortos. Foram realizados três experimentos independentes em triplicata.

5.10. Estresse oxidativo subcrônico induzido por Juglone

Para o ensaio de estresse oxidativo subcrônico induzido pelo agente oxidante juglone, 10 a 20 nematoides do tipo selvagem N2 em estágio L4 foram transferidos para microplacas de 96 poços contendo 100 µl de diferentes concentrações do EEC-Nt (10 – 2000 µg/ml) e incubados a 20 °C por 1 h. Posteriormente, 50 µl de juglone (concentração final 40 µM) foi adicionado aos poços, e a microplaca foi incubada em BOD a 20 °C por 24 e 48 h. O controle positivo foi incubado apenas com meio M9 e, o controle negativo foi incubado com M9 e juglone. A viabilidade foi avaliada pela movimentação e sensibilidade dos nematoides ao toque de uma micro espátula de fio de platina. Os animais foram classificados como vivos ou mortos. Foram realizados três experimentos independentes em triplicata.

5.11. Análises estatísticas

Os dados obtidos foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM), e para a análise entre os grupos experimentais foi utilizada a análise de variância (ANOVA), com pós teste de *Dunnett*, comparando os tratamentos com seu controle. Foi utilizado o software *GraphPad Prism 8*. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0.05$.

6. Resultados

6.1. Compostos fenólicos totais e flavonoides

As concentrações dos compostos avaliados foram os compostos fenólicos e os flavonoides. O teor desses compostos foram $8,39 \pm 0,26$ mg EAG/g do extrato e $1,59 \pm 0,14$ mg EQ/g do extrato, respectivamente.

6.2. Atividade antioxidante *in vitro*

O EEC-Nt apresentou atividade antioxidante *in vitro*, sendo que obteve o menor IC_{50} no método de descoloração do radical $ABTS^{++}$, demonstrando aproximadamente 5 vezes maior eficiência no sequestro desse radical quando comparado com o DPPH \cdot . Os valores de IC_{50} pela captura dos radicais DPPH \cdot e $ABTS^{++}$ por EEC-Nt são apresentados na **tabela 1**.

Tabela 1. Capacidade antioxidante do extrato etanólico de cerume da *Nannotrigona testaceicornis* (EEC-Nt) frente aos radicais DPPH \cdot e $ABTS^{++}$. BHT: hidroxitolueno butilado, AA: ácido ascórbico.

Amostra	DPPH \cdot			ABTS $^{++}$		
	Inibição máxima			Inibição máxima		
	IC_{50} (μ g/ml)	%	μ g/ml	IC_{50} (μ g/ml)	%	μ g/ml
AA	$3,43 \pm 0,14$	$92,32 \pm 0,55$	10	$2,53 \pm 0,39$	$95,93 \pm 2,08$	5
BHT	$53,51 \pm 0,74$	$89,85 \pm 0,50$	500	$3,42 \pm 1,11$	$95,39 \pm 0,22$	10
EEC-Nt	$637,05 \pm 3,35$	$88,53 \pm 0,39$	3000	$128,55 \pm 3,88$	$99,48 \pm 0,19$	1000

6.3. Toxicidade em *C. elegans*

O primeiro parâmetro avaliado no modelo pré-clínico foi a toxicidade *in vivo*. Os nematoides foram expostos ao EEC-Nt durante a fase L4 por 24h (**Figura 6 – A**) e 48h (**Figura 6 – B**). Neste ensaio, não foi observado efeitos tóxicos nas concentrações avaliadas (10 – 2000 µg/ml) em *C. elegans*, permitindo desta forma continuar as próximas avaliações em segurança.

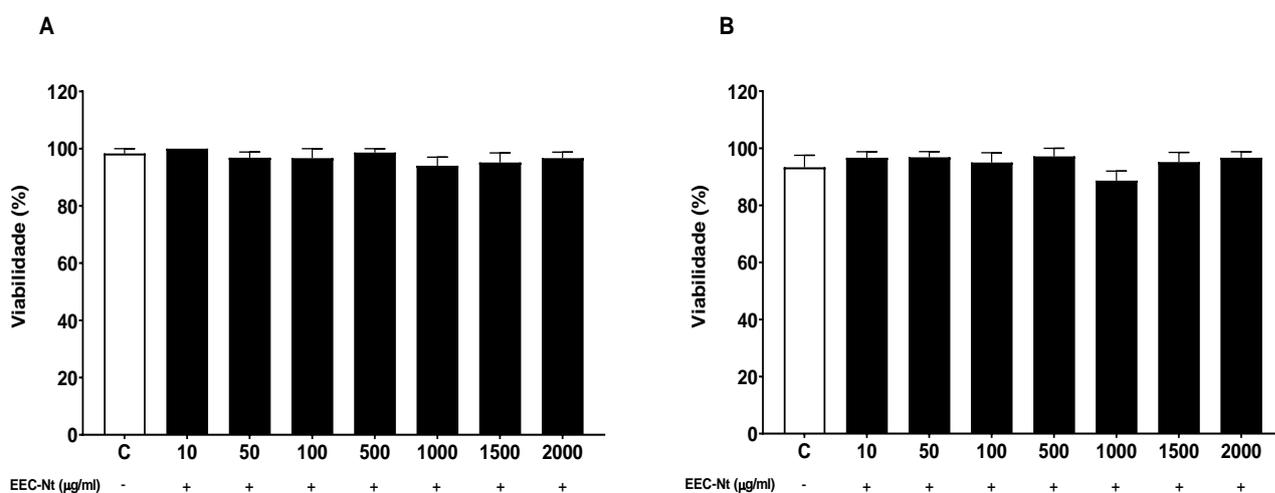


Figura 6: Porcentagem da viabilidade de *Caenorhabditis elegans* tratados com diferentes concentrações de EEC-Nt (10 – 2000 µg/ml) e dos controles © após: (A) 24 h de incubação (B) 48h de incubação. Os valores são expressos como a média ± EPM.

6.4. Atividade antioxidante *in vivo*

As propriedades antioxidantes do EEC-Nt foram avaliadas *in vivo* no modelo pré-clínico *C. elegans*. Os nematoides foram expostos ao agente oxidante juglone, que possui capacidade de gerar espécies reativas, promovendo a morte desses animais. No ensaio de estresse oxidativo agudo avaliado durante 6h (**Figura 7**), durante todo o período avaliado (1 – 6 h), não observou – se proteção em *C. elegans* tratados com deferentes concentrações de EEC-Nt (100 – 1500 µg/ml).

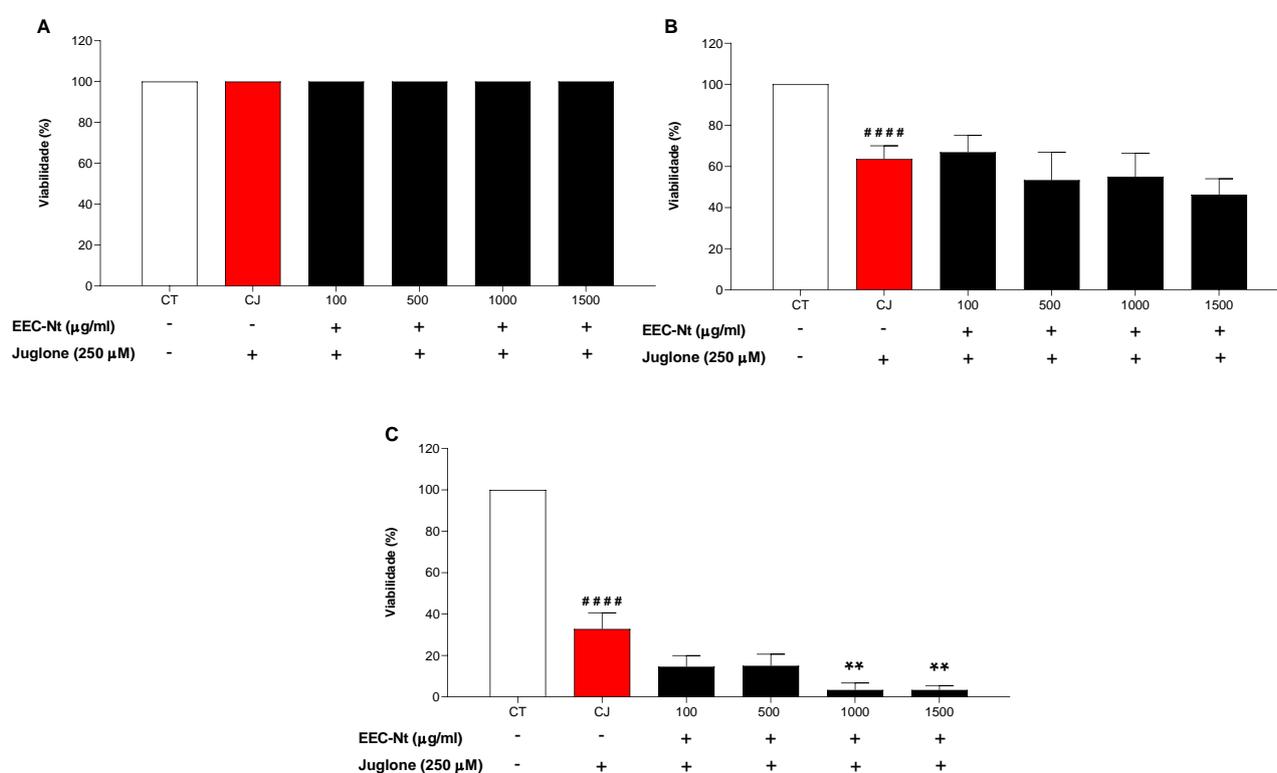


Figura 7: Estresse oxidativo agudo no modelo experimental *in vivo* *C. elegans* tratados com EEC-Nt em (A) 0h, (B) 1h e (C) 2h. Controle (CT) e controle juglone (CJ). Resultado considerados estatisticamente significativos ($p < 0,05$) quando o grupo tratado foi comparado com o controle. Os valores são expressos como a média \pm EPM. # versus controle; * versus juglone (250 µM).

No ensaios de estresse oxidativo subcrônico 24 h (**Figura 8-A**) e 48 h (**Figura 8-B**), também não foram observados resultados que mostrem proteção frente ao estresse oxidativo induzido por juglone, nas diferentes concentrações avaliadas de EEC-Nt (10 – 2000 µg/ml).

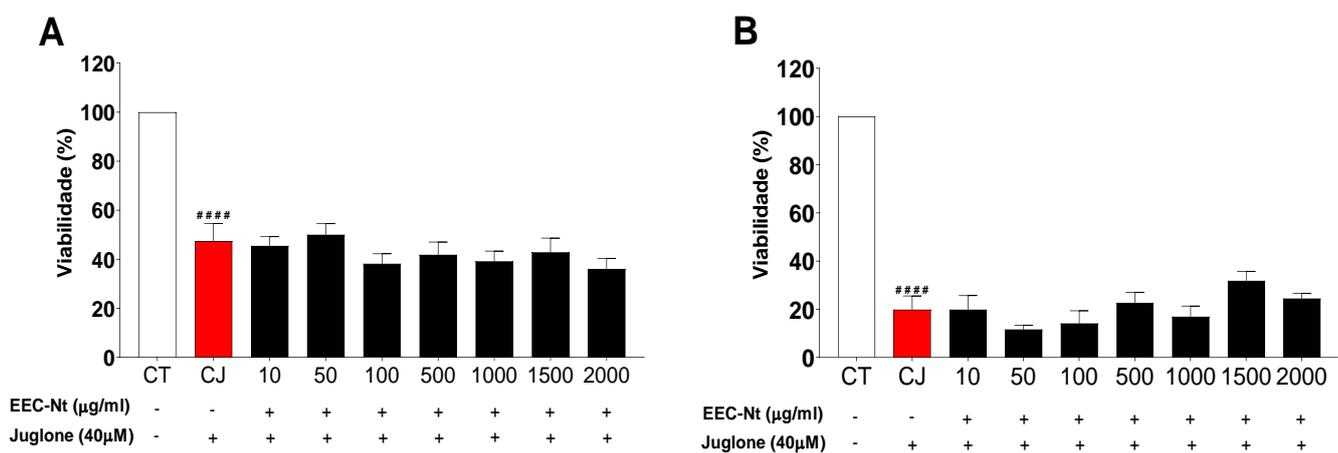


Figura 8: Estresse oxidativo no modelo experimental *in vivo* *C. elegans* tratados com EEC-Nt. Controle (CT), controle juglone (CJ). (A) 24 h de incubação (B) 48 h de incubação. Resultados considerados estatisticamente significativos ($p < 0,05$) quando o grupo tratado foi comparado com o controle. Os valores são expressos como a média \pm EPM. # versus controle.

7. Discussão

Este estudo apresenta pela primeira vez, a atividade antioxidante do cerume da abelha sem ferrão *Nannotrigona testaceicornis*, espécie nativa encontrada no estado do Mato Grosso do Sul. Ao investigar a composição química do cerume de *N. testaceicornis* por meio de ensaios colorimétricos, foi observada a presença de compostos fenólicos e flavonoides. Os compostos fenólicos são um grupo abrangente que englobam diversas classes de compostos, dentre eles, os ácidos fenólicos, taninos, naftoquinonas, tocoferóis e inclusive os flavonoides (ANGELO; JORGE, 2007; GUTIÉRREZ-GRIJALVA et al., 2016; MATSUMURA et al., 2023).

Estes compostos possuem potencial antioxidante já descrito na literatura, atividade atribuída à sua forma química estrutural, devido a presença de pelo menos um anel aromático ligado a um ou mais grupos hidroxilas, que conferem a capacidade de neutralizar radicais livres pela doação de seus elétrons, (AL MAMARI, 2021; KRUK et al., 2022).

Além disso, os polifenóis detêm a capacidade de realizar ressonância, característica pela qual são capazes de deslocar seus elétrons e grupos funcionais durante os processos de reações redox, devido a presença de anéis aromáticos em sua molécula (HSUEH; WU; CHEN, 2019). Essa atividade permite que esses compostos, após doarem seus elétrons, permaneçam estáveis e mantenham sua função antioxidante (ANDRÉS et al., 2023). Essa característica ressonante é o que os tornam excelentes agentes antioxidantes.

Neste estudo, o EEC-Nt apresentou atividade antioxidante *in vitro* pela captura dos radicais livres DPPH[•] e ABTS^{•+}, sendo a maior atividade evidenciada na captura do radical ABTS^{•+}. O ensaio de sequestro do radical DPPH[•] possui maior sensibilidade a moléculas com características lipofílicas, enquanto o ABTS^{•+} é sensível a tanto a moléculas hidrofílicas quanto lipofílicas (GULCIN, 2020). Do mesmo modo, Ferreira *et al* (2023), relata melhor atividade antioxidante do cerume de *Tetragonisca fiebrigi* e *Geotrigona sp.* ao capturar o radical ABTS^{•+}, devido a presença de moléculas que possuem característica anfifílica.

Após avaliar a atividade antioxidante *in vitro* do EEC-Nt, foi investigado o potencial contra o estresse oxidativo *in vivo*, utilizando o nematoide *C. elegans* como modelo pré-

clínico. Esse modelo biotecnológico permite estudar os mecanismos de ação de produtos naturais, bem como os futuros fármacos, nos processos bioquímicos e fisiológicos que ocorrem no organismo completo desse animal, visto que possuem homologia com genes humanos, além de ortologia com genes relacionados a doenças. (HUNT, 2017).

Após a avaliação da toxicidade, o EEC-Nt não apresentou efeitos tóxicos aos nematoides, garantindo segurança para futuros ensaios. Ensaios de toxicidade são de grande importância e relevância, para conhecer concentrações seguras de uso, visto que, por meio deles é possível avaliar se os produtos naturais estudados possuem algum efeito nocivo, além de auxiliarem na avaliação da toxicidade de futuros fármacos (ASUZU et al., 2022; DENG; VAN MEEL, 2004).

Em *C. elegans*, a atividade antioxidante foi avaliada por meio da exposição dos nematoides ao agente oxidante juglone, de forma aguda e subcrônica. O juglone é um metabólito secundário derivado de plantas da família *Jungladiaceae* (ISLAM; WIDHALM, 2020), capaz de gerar ânion superóxido, considerada uma espécie reativa de oxigênio gerada intracelularmente no ciclo redox (AHMAD; SUZUKI, 2019). Contudo, o EEC-Nt não demonstrou atividade antioxidante no ensaio de estresse oxidativo agudo e subcrônico, não sendo capaz de proteger os nematoides em nenhuma das concentrações contra a geração de espécies reativas de oxigênio.

Entretanto, no estresse agudo induzido por juglone, nas maiores concentrações o EEC-Nt apresentou atividade pró-oxidante. A atividade pró-oxidante é caracterizada pela capacidade de alguns compostos gerarem mais espécies reativas e desencadarem o quadro de estresse oxidativo (FORESTER; LAMBERT, 2011). Diante disso, estudos mostram que o agente oxidante juglone pode atuar em sinergismo com outros compostos acentuando sua atividade na geração de espécies reativas de oxigênio (KVICINSKI et al., 2012; OURIQUE et al., 2015).

Desta forma, alguns medicamentos quimioterápicos, são descritos pelo seu mecanismo no aumento de EROs, como a doxorubicina (DOX). A DOX, se liga a cardiolipina presente na membrana mitocondrial interna, e inicia o processo de geração de EROs, que com o aumento dessas espécies causam danos as estruturas presentes na mitocôndria, levando ao processo de apoptose (KCIUK et al., 2023). Alguns estudos relatam efeitos sinérgicos entre DOX e ascorbato, demonstrando um perfil citotóxico frente a linhagens celulares (LIU et al., 2019; YANG et al., 2017).

Diante disso, O EEC-Nt pode ser utilizado em ensaios de citotoxicidade junto a quimioterápicos como a DOX para investigar efeitos sinérgicos na redução de danos ocasionados por esses compostos, como também na investigação de efeitos sinérgicos relacionados ao aumento de EROs intracelular na indução da apoptose. Além disso, trabalhos relatam efeitos citotóxicos frente a linhagem celular K562 utilizando própolis de *Plebeia droryana*, *Melipona quadrifasciata anthidioides* e *Scaptotrigona depilis* (BONAMIGO *et al.*, 2017a, 2017b) , corroborando para o desenvolvimento de novos ensaios e perspectivas com relação aos dados obtidos.

Os dados obtidos neste trabalho destacam ainda, a importância do conhecimento para a preservação. Este estudo valoriza os produtos naturais, como produtos apícolas de abelha sem ferrão encontrados no Mato Grosso do Sul, fomentando a bioeconomia e bioprospecção. Contudo, evidenciando a potencialidade dos produtos apícolas reforça a necessidade de conservação e proteção dessas espécies, essencial para a saúde, equilíbrio ambiental e biodiversidade do Cerrado.

8. Conclusões

O extrato etanólico de cerume de *Nannotrigona testaceicornis* apresentou a presença de compostos fenólicos, efeito antioxidante *in vitro* e não demonstrou perfil tóxico em *Caenorhabditis elegans*. Entretanto em ensaios antioxidantes *in vivo* foi possível observar efeito pró oxidante nas maiores concentrações do extrato, o que colabora para a investigação de novas perspectivas, como possível efeito citotóxico em linhagens celulares e mecanismos de ação sinérgicas com quimioterápicos. Este estudo ainda valoriza a biodiversidade e bioprospecção e conseqüentemente, a conservação das abelhas sem ferrão *Nannotrigona testaceicornis*.

9. Referências bibliográficas

- ADIN, C. A. Bilirubin as a Therapeutic Molecule: Challenges and Opportunities. **Antioxidants**, v. 10, n. 10, p. 1536, out. 2021.
- AHMAD, T.; SUZUKI, Y. J. Juglone in Oxidative Stress and Cell Signaling. **Antioxidants**, v. 8, n. 4, p. 91, 5 abr. 2019.
- AHMED, O.; MOHAMMED, M. OXIDATIVE STRESS: THE ROLE OF REACTIVE OXYGEN SPECIES (ROS) AND ANTIOXIDANTS IN HUMAN DISEASES. **Plant Archives**, v. 20, p. 4089–4095, 7 out. 2020.
- AL MAMARI, H. H. Phenolic compounds: Classification, chemistry, and updated techniques of analysis and synthesis. **Phenolic compounds-chemistry, synthesis, diversity, non-conventional industrial, pharmaceutical and therapeutic applications**, v. 10, 2021.
- AL-HATAMLEH, M. A. I. et al. Antioxidant-Based Medicinal Properties of Stingless Bee Products: Recent Progress and Future Directions. **Biomolecules**, v. 10, n. 6, p. 923, 18 jun. 2020.
- ALKHALIDY, H.; WANG, Y.; LIU, D. Dietary Flavonoids in the Prevention of T2D: An Overview. **Nutrients**, v. 10, n. 4, p. 438, 31 mar. 2018.
- ANDRÉS, C. M. C. et al. The Role of Reactive Species on Innate Immunity. **Vaccines**, v. 10, n. 10, p. 1735, out. 2022.
- ANDRÉS, C. M. C. et al. Polyphenols as Antioxidant/Pro-Oxidant Compounds and Donors of Reducing Species: Relationship with Human Antioxidant Metabolism. **Processes**, v. 11, n. 9, p. 2771, set. 2023.
- ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos—Uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 1–9, 2007.
- ARAÚJO, E. D. et al. Body size and flight distance in stingless bees (Hymenoptera: Meliponini): inference of flight range and possible ecological implications. 1 ago. 2004.
- ASUZU, P. C. et al. Cell Culture-Based Assessment of Toxicity and Therapeutics of Phytochemical Antioxidants. **Molecules**, v. 27, n. 3, p. 1087, jan. 2022.
- BARBOSA, K. B. F. et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629–643, ago. 2010.
- BIANCHI, M. DE L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, v. 12, p. 123–130, ago. 1999.
- BIANCO, D. D. A.; SILVA, C. D. O. E. Influência da vitamina C na cicatrização dos tecidos gengivais: revisão de literatura. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research**, v. 20, n. 2, p. 136–139, 2017.

- BIRBEN, E. et al. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. **World Allergy Organization Journal**, v. 5, n. 1, p. 9–19, 1 jan. 2012.
- BLOCK, M. S.; ROWAN, B. G. Hypochlorous Acid: A Review. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 78, n. 9, p. 1461–1466, 1 set. 2020.
- BLOKHINA, O.; VIROLAINEN, E.; FAGERSTEDT, K. V. Antioxidants, Oxidative Damage and Oxygen Deprivation Stress: a Review. **Annals of Botany**, v. 91, n. 2, p. 179–194, 2 jan. 2003.
- BONAMIGO, T. et al. Antioxidant, Cytotoxic, and Toxic Activities of Propolis from Two Native Bees in Brazil: *Scaptotrigona depilis* and *Melipona quadrifasciata anthidioides*. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, p. 1038153, 2017a.
- BONAMIGO, T. et al. Antioxidant and cytotoxic activity of propolis of *Plebeia droryana* and *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae) from the Brazilian Cerrado biome. **PLoS ONE**, v. 12, n. 9, p. e0183983, 12 set. 2017b.
- CARVALHO, É. L. S. et al. Atividade Antibacteriana, Antioxidante e Compostos Fenólicos de Méis Produzidos por *Nannotrigona testaceicornis* Lepeletier (Apidae, Meliponini). **Research, Society and Development**, v. 10, n. 10, p. e48101018424–e48101018424, 5 ago. 2021.
- CHAUDHARY, P. et al. Oxidative stress, free radicals and antioxidants: potential crosstalk in the pathophysiology of human diseases. **Frontiers in Chemistry**, v. 11, 10 maio 2023.
- CHE, M. et al. Expanding roles of superoxide dismutases in cell regulation and cancer. **Drug discovery today**, v. 21, n. 1, p. 143, 19 out. 2015.
- CHUTTONG, B. et al. Exploring the Functional Properties of Propolis, Geopropolis, and Cerumen, with a Special Emphasis on Their Antimicrobial Effects. **Foods**, v. 12, p. 3909, 25 out. 2023.
- CORREIA, C. S.; PÉREZ-MALUF, R.; COSTA, M. A. Recognition and Defensive Behavior of *Nannotrigona testaceicornis* Workers (Lepeletier, 1836) (Hymenoptera, Apidae) in Intra and Inter-colonial Bioassays. **Sociobiology**, v. 70, n. 1, p. e8778, 31 mar. 2023.
- 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, jun. 2015.
- CUI, S. et al. Singlet Oxygen in Photodynamic Therapy. **Pharmaceuticals**, v. 17, n. 10, p. 1274, out. 2024.
- DENGG, M.; VAN MEEL, J. C. A. *Caenorhabditis elegans* como sistema modelo para avaliação rápida da toxicidade de compostos farmacêuticos. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 50, n. 3, p. 209–214, 1 nov. 2004.

DI MEO, S.; VENDITTI, P. Evolution of the Knowledge of Free Radicals and Other Oxidants. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2020, p. 9829176, 23 abr. 2020.

D. PATEL, K. et al. Oxidative stress modulating nanomaterials and their biochemical roles in nanomedicine. **Nanoscale Horizons**, v. 9, n. 10, p. 1630–1682, 2024.

DUMANOVIĆ, J. et al. The Significance of Reactive Oxygen Species and Antioxidant Defense System in Plants: A Concise Overview. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, 6 jan. 2021.

EDGE, R.; TRUSCOTT, T. G. The Reactive Oxygen Species Singlet Oxygen, Hydroxy Radicals, and the Superoxide Radical Anion—Examples of Their Roles in Biology and Medicine. **Oxygen**, v. 1, n. 2, p. 77–95, dez. 2021.

ELSAYED AZAB, A. et al. Oxidative stress and antioxidant mechanisms in human body. **Journal of Applied Biotechnology & Bioengineering**, v. 6, n. 1, p. 43–47, 21 fev. 2019.

ENDALE, H. T.; TESFAYE, W.; MENGSTIE, T. A. ROS induced lipid peroxidation and their role in ferroptosis. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 11, 1 ago. 2023.

ENGEL, M. S. et al. Stingless bee classification and biology (Hymenoptera, Apidae): a review, with an updated key to genera and subgenera. **ZooKeys**, v. 1172, p. 239, 27 jul. 2023.

FARACI, F. M.; DIDION, S. P. Vascular Protection. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 24, n. 8, p. 1367–1373, ago. 2004.

FERNÁNDEZ-DEL-RÍO, L.; CLARKE, C. F. Coenzyme Q Biosynthesis: An Update on the Origins of the Benzenoid Ring and Discovery of New Ring Precursors. **Metabolites**, v. 11, n. 6, p. 385, 14 jun. 2021.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, mar. 1997.

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**, v. 12, n. 6, p. 1276, 15 jun. 2023.

FIRUZI, O. et al. Antioxidant Therapy: Current Status and Future Prospects. **Current Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 25, p. 3871–3888, 1 set. 2011.

FIŠAR, Z.; HROUDOVÁ, J. CoQ10 and Mitochondrial Dysfunction in Alzheimer's Disease. **Antioxidants**, v. 13, n. 2, p. 191, fev. 2024.

FORESTER, S. C.; LAMBERT, J. D. The role of antioxidant versus pro-oxidant effects of green tea polyphenols in cancer prevention. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 55, n. 6, p. 844–854, 2011.

FRANCIOSO, A. et al. Chemistry and Biochemistry of Sulfur Natural Compounds: Key Intermediates of Metabolism and Redox Biology. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2020, p. 8294158, 29 set. 2020.

FUKAI, T.; USHIO-FUKAI, M. Superoxide Dismutases: Role in Redox Signaling, Vascular Function, and Diseases. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 15, n. 6, p. 1583, 15 set. 2011.

GALASSO, M. et al. Browsing the oldest antioxidant enzyme: catalase and its multiple regulation in cancer. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 172, p. 264–272, 20 ago. 2021.

GOFF, J. P. *Invited review*: Mineral absorption mechanisms, mineral interactions that affect acid–base and antioxidant status, and diet considerations to improve mineral status. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 4, p. 2763–2813, 1 abr. 2018.

GOLDEN, J. W.; RIDDLE, D. L. The *Caenorhabditis elegans* dauer larva: Developmental effects of pheromone, food, and temperature. **Developmental Biology**, v. 102, n. 2, p. 368–378, 1 abr. 1984.

GÓMEZ-FERNÁNDEZ, J. C.; LLAMAS, M. A.; ARANDA, F. J. The interaction of coenzyme Q with phosphatidylethanolamine membranes. **European Journal of Biochemistry**, v. 259, n. 3, p. 739–746, 1999.

GONÇALVES, A. L.; ALVES FILHO, A.; MENEZES, H. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO MEL DA ABELHA NATIVA SEM FERRÃO *NANNOTRIGONA TESTACEICORNIS* (HYMENOPTERA: APIDAE, MELIPONINI). **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 72, n. 4, p. 455–459, dez. 2005.

GULCIN, İ. Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview. **Archives of Toxicology**, v. 94, n. 3, p. 651–715, 1 mar. 2020.

GUTIÉRREZ-GRIJALVA, E. P. et al. Review: dietary phenolic compounds, health benefits and bioaccessibility. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 66, n. 2, p. 87–100, jun. 2016.

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. 2022.

HALLIWELL, B. Free Radicals and Other Reactive Species in Disease. Em: WILEY (Ed.). **Encyclopedia of Life Sciences**. 1. ed. [s.l.] Wiley, 2005.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. [s.l.] Oxford University Press, 2015.

HERNÁNDEZ, I. et al. How relevant are flavonoids as antioxidants in plants? **Trends in Plant Science**, v. 14, n. 3, p. 125–132, 1 mar. 2009.

HSUEH, C.-C.; WU, C.-C.; CHEN, B.-Y. Polyphenolic compounds as electron shuttles for sustainable energy utilization. **Biotechnology for Biofuels**, v. 12, p. 271, 18 nov. 2019.

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

ISLAM, A. K. M. M.; WIDHALM, J. R. Agricultural Uses of Juglone: Opportunities and Challenges. **Agronomy**, v. 10, n. 10, p. 1500, out. 2020.

JENSEN, S. J. K. Oxidative stress and free radicals. **Journal of Molecular Structure: THEOCHEM**, v. 666–667, p. 387–392, dez. 2003.

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, 1 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**, v. 98, n. 5, p. 1323–1367, 1 maio 2024.

JONES, L. M. et al. Proteomic Analyses of *Caenorhabditis elegans* Dauer Larvae and Long-Lived *daf-2* Mutants Implicates a Shared Detoxification System in Longevity Assurance. **Journal of Proteome Research**, v. 9, n. 6, p. 2871–2881, 4 jun. 2010.

JUAN, C. A. et al. The Chemistry of Reactive Oxygen Species (ROS) Revisited: Outlining Their Role in Biological Macromolecules (DNA, Lipids and Proteins) and Induced Pathologies. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 9, p. 4642, jan. 2021.

KCIUK, M. et al. Doxorubicin—An Agent with Multiple Mechanisms of Anticancer Activity. **Cells**, v. 12, n. 4, p. 659, jan. 2023.

KRINSKY, N. I. The Antioxidant and Biological Properties of the Carotenoids. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 854, n. 1, p. 443–447, 1998.

KRUK, J. et al. Antioxidative properties of phenolic compounds and their effect on oxidative stress induced by severe physical exercise. **The Journal of Physiological Sciences**, v. 72, n. 1, p. 19, 5 ago. 2022.

KRUMOVA, K.; COSA, G. Overview of Reactive Oxygen Species. Em: NONELL, S. et al. (Eds.). **Singlet Oxygen: Applications in Biosciences and Nanosciences**. [s.l.] The Royal Society of Chemistry, 2016. p. 0.

KVIECINSKI, M. R. et al. Inhibition of cell proliferation and migration by oxidative stress from ascorbate-driven juglone redox cycling in human bladder-derived T24 cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 421, n. 2, p. 268–273, 4 maio 2012.

LINK, C. D. et al. Análise da expressão gênica em um modelo transgênico de doença de Alzheimer de *Caenorhabditis elegans*. **Neurobiology of Aging**, v. 24, n. 3, p. 397–413, 1 maio 2003.

LIU, Y. et al. Ascorbate promotes the cellular accumulation of doxorubicin and reverses the multidrug resistance in breast cancer cells by inducing ROS-dependent ATP depletion. **Free Radical Research**, v. 53, n. 7, p. 758–767, 3 jul. 2019.

LU, S. C. Glutathione synthesis. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1830, n. 5, p. 3143–3153, maio 2013.

LUO, X. et al. Processing Technologies for Bee Products: An Overview of Recent Developments and Perspectives. **Frontiers in Nutrition**, v. 8, 3 nov. 2021a.

LUO, Y. et al. Roles of Nitric Oxide in the Regulation of Reproduction: A Review. **Frontiers in Endocrinology**, v. 12, 19 nov. 2021b.

MACCALLINI, C. et al. Advancements in the Research of New Modulators of Nitric Oxide Synthases Activity. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 15, p. 8486, jan. 2024.

MANTLE, D. et al. Primary Coenzyme Q10 Deficiency: An Update. **Antioxidants**, v. 12, n. 8, p. 1652, ago. 2023.

MARTELLI, F.; NUNES, F. M. F. Radicais livres: em busca do equilíbrio. **Ciência e Cultura**, v. 66, n. 3, p. 54–57, set. 2014.

MATSUMURA, Y. et al. Dietary Phenolic Compounds: Their Health Benefits and Association with the Gut Microbiota. **Antioxidants**, v. 12, n. 4, p. 880, abr. 2023.

MENEZES, C.; VOLLET NETO, A.; FONSECA, V. L. I. A method for harvesting unfermented pollen from stingless bees (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). **Journal of Apicultural Research**, v. 51, n. 3, p. 240–244, jan. 2012.

MEYERSTEIN, D. What Are the Oxidizing Intermediates in the Fenton and Fenton-like Reactions? A Perspective. **Antioxidants**, v. 11, n. 7, p. 1368, 14 jul. 2022.

MIROŃCZUK-CHODAKOWSKA, I.; WITKOWSKA, A. M.; ZUJKO, M. E. Endogenous non-enzymatic antioxidants in the human body. **Advances in Medical Sciences**, v. 63, n. 1, p. 68–78, 1 mar. 2018.

MURPHY, M. P. How mitochondria produce reactive oxygen species. **Biochemical Journal**, v. 417, n. 1, p. 1–13, 1 jan. 2009.

NANCE, J. Gastrulation in *C. elegans*. **WormBook**, 2005.

NARAYANANKUTTY, A.; JOB, J. T.; NARAYANANKUTTY, V. Glutathione, an Antioxidant Tripeptide: Dual Roles in Carcinogenesis and Chemoprevention. **Current Protein & Peptide Science**, v. 20, n. 9, p. 907–917, 17 set. 2019.

NDREPEPA, G. Uric acid and cardiovascular disease. **Clinica Chimica Acta**, v. 484, p. 150–163, 1 set. 2018.

NIMSE, S. B.; PAL, D. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. **RSC Advances**, v. 5, n. 35, p. 27986–28006, 16 mar. 2015.

OTERO REGINO, W.; VELASCO, H.; SANDOVAL, H. The protective role of bilirubin in human beings. **Revista colombiana de Gastroenterología**, v. 24, n. 3, p. 293–301, set. 2009.

OURIQUE, F. et al. DNA Damage and Inhibition of Akt Pathway in MCF-7 Cells and Ehrlich Tumor in Mice Treated with 1,4-Naphthoquinones in Combination with Ascorbate. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2015, n. 1, p. 495305, 2015.

PADAYATTY, S. J. et al. Vitamin C as an Antioxidant: Evaluation of Its Role in Disease Prevention. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 22, n. 1, p. 18–35, fev. 2003.

PEI, J. et al. Research progress of glutathione peroxidase family (GPX) in redoxitation. **Frontiers in Pharmacology**, v. 14, 2 mar. 2023.

PEOPLES, J. N. et al. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in heart disease. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 51, n. 12, p. 1–13, 19 dez. 2019.

PEREIRA, F. DE M. et al. Manejo de colônias de abelhas-sem-ferrão. 2012.

PERRY, J. J. P. et al. The structural biochemistry of the superoxide dismutases. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, v. 1804, n. 2, p. 245–262, fev. 2010.

PHAM-HUY, L. A.; HE, H.; PHAM-HUY, C. Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. **International Journal of Biomedical Science : IJBS**, v. 4, n. 2, p. 89, jun. 2008.

PIETTA, P.-G. Flavonoids as Antioxidants. **Journal of Natural Products**, v. 63, n. 7, p. 1035–1042, 1 jul. 2000.

PIMENTEL, T. C. et al. Stingless bee honey: An overview of health benefits and main market challenges. **Journal of Food Biochemistry**, v. 46, n. 3, p. e13883, mar. 2022.

PISOSCHI, A. M.; POP, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 97, p. 55–74, 5 jun. 2015.

POOLE, L. B. The Basics of Thiols and Cysteines in Redox Biology and Chemistry. **Free radical biology & medicine**, v. 0, p. 148, 27 nov. 2014.

PRYOR, W. A. et al. Free radical biology and medicine: it's a gas, man! **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 291, n. 3, p. R491–R511, set. 2006.

PRZYGODA, M. et al. Cellular Mechanisms of Singlet Oxygen in Photodynamic Therapy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 23, p. 16890, jan. 2023.

- PULLAR, J. M.; VISSERS, M. C. M.; WINTERBOURN, C. C. Living with a Killer: The Effects of Hypochlorous Acid on Mammalian Cells. **IUBMB Life**, v. 50, n. 4–5, p. 259–266, 2000.
- RASMUSSEN, C.; GONZALEZ, V. H. The neotropical stingless bee genus *Nannotrigona* Cockerell (Hymenoptera: Apidae: Meliponini): An illustrated key, notes on the types, and designation of lectotypes. **Zootaxa**, v. 4299, n. 2, 27 jul. 2017.
- ROCHA-VELASCO, O. A.; MORALES-SUÁREZ-VARELA, M.; LLOPIS-GONZÁLEZ, A. Dietary Flavonoids: Mitigating Air Pollution's Cardiovascular Risks. **Nutrients**, v. 16, n. 16, p. 2647, 10 ago. 2024.
- ROCK, C. L.; JACOB, R. A.; BOWEN, P. E. Update on the Biological Characteristics of the Antioxidant Micronutrients. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 96, n. 7, p. 693–702, jul. 1996.
- ROUBIK, D. W. Stingless bee nesting biology. **Apidologie**, v. 37, n. 2, p. 124–143, mar. 2006.
- ROUBIK, D. W. Stingless Bee (Apidae: Apinae: Meliponini) Ecology. **Annual Review of Entomology**, v. 68, n. Volume 68, 2023, p. 231–256, 23 jan. 2023.
- ROUBIK, D. W.; ROUBIK, D. W. **Ecology and Natural History of Tropical Bees**. [s.l.] Cambridge University Press, 1992.
- ROUMELIOTIS, S. et al. Dietary Antioxidant Supplements and Uric Acid in Chronic Kidney Disease: A Review. **Nutrients**, v. 11, n. 8, p. 1911, 15 ago. 2019.
- SADASIVAM, N. et al. Oxidative Stress, Genomic Integrity, and Liver Diseases. **Molecules**, v. 27, n. 10, p. 3159, 15 maio 2022.
- SANCHES, M. A.; PEREIRA, A. M. S.; SERRÃO, J. E. Pharmacological actions of extracts of propolis of stingless bees (Meliponini). **Journal of Apicultural Research**, v. 56, n. 1, p. 50–57, jan. 2017.
- SANTOS-LEDO, A.; GARCÍA-MACIA, M. Melatonin: A Myriad of Functions to Discover. **Antioxidants**, v. 13, n. 3, p. 360, mar. 2024.
- SHANAHAN, M.; SPIVAK, M. Resin Use by Stingless Bees: A Review. **Insects**, v. 12, n. 8, p. 719, 11 ago. 2021.
- SIES, H. Biochemistry of Oxidative Stress. **Angewandte Chemie International Edition in English**, v. 25, n. 12, p. 1058–1071, 1986.
- SIES, H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. **Redox Biology**, v. 4, p. 180, 2 jan. 2015.
- SILVA, W. P.; DA PAZ, J. R. L. Abelhas sem ferrão: muito mais do que uma importância econômica. **Natureza online**, v. 10, n. 3, p. 146–152, 2012.

STAHL, W.; SIES, H. Antioxidant activity of carotenoids. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 24, n. 6, p. 345–351, dez. 2003.

STRANGE, K. An Overview of *C. elegans* Biology. Em: STRANGE, K. (Ed.). **C. elegans: Methods and Applications**. Totowa, NJ: Humana Press, 2006. p. 1–11.

STUCHI, A. L. P. B. et al. Molecular Marker to Identify Two Stingless Bee Species: *Tetragonisca angustula* and *Tetragonisca fiebrigi* (Hymenoptera, Meliponinae). **Sociobiology**, v. 59, n. 1, p. 123, 21 out. 2014.

SUÁREZ-JIMÉNEZ, G. M. et al. Role of Endogenous and Exogenous Tocopherols in the Lipid Stability of Marine Oil Systems: A Review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 12, p. 1968, dez. 2016.

TELEANU, D. M. et al. An Overview of Oxidative Stress, Neuroinflammation, and Neurodegenerative Diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 11, p. 5938, 25 maio 2022.

THOMAS, C. E. et al. Ascorbate and phenolic antioxidant interactions in prevention of liposomal oxidation. **Lipids**, v. 27, n. 7, p. 543–550, jul. 1992.

TÖNNIES, E.; TRUSHINA, E. Oxidative Stress, Synaptic Dysfunction, and Alzheimer's Disease. **Journal of Alzheimer's disease: JAD**, v. 57, n. 4, p. 1105–1121, 2017.

TRABER, M. G.; STEVENS, J. F. Vitamins C and E: Beneficial effects from a mechanistic perspective. **Free Radical Biology and Medicine**, Translational aspects of free radical biology. v. 51, n. 5, p. 1000–1013, 1 set. 2011.

TRESSERRA-RIMBAU, A. Dietary Polyphenols and Human Health. **Nutrients**, v. 12, n. 9, p. 2893, 22 set. 2020.

TSAO, R. Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. **Nutrients**, v. 2, n. 12, p. 1231, 10 dez. 2010.

VALGIMIGLI, L. Lipid Peroxidation and Antioxidant Protection. **Biomolecules**, v. 13, n. 9, p. 1291, set. 2023.

VALKO, M. et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biological Interactions**, v. 160, n. 1, p. 1–40, mar. 2006a.

VALKO, M. et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biological Interactions**, v. 160, n. 1, p. 1–40, mar. 2006b.

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, n. 1, p. 44–84, jan. 2007.

VAŠKOVÁ, J. et al. Glutathione-Related Enzymes and Proteins: A Review. **Molecules**, v. 28, n. 3, p. 1447, 2 fev. 2023.

VILLAMENA, F. A. Chemistry of Reactive Species. Em: VILLAMENA, F. A. (Ed.). **Molecular Basis of Oxidative Stress**. 1. ed. [s.l.] Wiley, 2013. p. 1–48.

WATSON, N. et al. Melatonin as an Antioxidant for Stroke Neuroprotection. **Cell Transplantation**, v. 25, n. 5, p. 883–891, 1 maio 2016.

WEIDINGER, A.; KOZLOV, A. V. Biological Activities of Reactive Oxygen and Nitrogen Species: Oxidative Stress versus Signal Transduction. **Biomolecules**, v. 5, n. 2, p. 472–484, jun. 2015.

WU, C.-Y. et al. *Caenorhabditis elegans* as a Convenient Animal Model for Microbiome Studies. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 12, p. 6670, jan. 2024.

YAMAUCHI, R.; YAGI, Y.; KATO, K. Oxidation of α -Tocopherol during the Peroxidation of Dilinoleoylphosphatidylcholine in Liposomes. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 60, n. 4, p. 616–620, jan. 1996.

YANG, Y. et al. Palmitoyl ascorbate and doxorubicin co-encapsulated liposome for synergistic anticancer therapy. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 105, p. 219–229, 15 jul. 2017.

YEH, T.-S. et al. Long-term Dietary Flavonoid Intake and Subjective Cognitive Decline in US Men and Women. **Neurology**, v. 97, n. 10, p. e1041, 7 set. 2021.

YOUNG, A. J.; LOWE, G. M. Antioxidant and Prooxidant Properties of Carotenoids. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 385, n. 1, p. 20–27, jan. 2001.

ZAKARIA, Z. et al. Therapeutic Effects of *Heterotrigona itama* (Stingless Bee) Bee Bread in Improving Hepatic Lipid Metabolism through the Activation of the Keap1/Nrf2 Signaling Pathway in an Obese Rat Model. **Antioxidants**, v. 11, n. 11, p. 2190, 5 nov. 2022.

ZHENG, M. et al. The Applications and Mechanisms of Superoxide Dismutase in Medicine, Food, and Cosmetics. **Antioxidants**, v. 12, n. 9, p. 1675, set. 2023.

SARIKAYA, Eren; DOĞAN, Selami. Glutathione peroxidase na saúde e nas doenças. **Sistema de glutathione e estresse oxidativo na saúde e na doença**, v. 49, 2020.