

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA

JEAN RAMOS BOLDORI

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO EXTRATO DE JABUTICABA (*Myrciaria cauliflora*)
FRENTE A MÚLTIPLOS ESTRESSES EM *Caenorhabditis elegans*.**

**Uruguiana
2018**

JEAN RAMOS BOLDORI

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO EXTRATO DE JABUTICABA (*Myrciaria cauliflora*)
FRENTE A MULTIPLOS ESTRESSES EM *Caenorhabditis elegans*.**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Farmácia da
Universidade Federal do Pampa, como
requisito parcial para obtenção do Título de
Bacharel em farmácia.

Orientador: Cristiane Casagrande
Denardin

Coorientador: Daiana Silva de Ávila

**Uruguaiiana
2018**

Jean Ramos Boldori

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO EXTRATO DE JABUTICABA
(*Myrciaria cauliflora*) FRENTE A MÚLTIPLOS ESTRESSES EM
*Caenorhabditis elegans***

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de Farmácia da Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), como requisito parcial para aprovação na disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso.

Orientador (a): Prof^ª. Dr^ª. Cristiane Casagrande Denardin

Área de concentração: Farmácia

Trabalho de conclusão de curso defendido e aprovado em: 03/04/2018

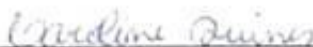
Banca examinadora:



Prof^ª. Dr^ª. Cristiane Casagrande Denardin
Orientadora
Curso de Farmácia - UNIPAMPA



Prof^ª. Dr^ª. Fabiane Moreira Farias
Curso de Farmácia - UNIPAMPA



Ms^ª. Caroline Brandão Quines
Farmacêutica

Dedico este trabalho a minha família e amigos, que foram de extrema importância durante esta caminhada.

AGRADECIMENTO

Primeiramente, gostaria de agradecer as professoras Cristiane Denardin e Daiana Ávila por terem me acolhido no laboratório e desde então terem me ensinado e ajudado em tudo que precisei, certamente foram pessoas essenciais para meu crescimento pessoal e profissional.

Ao pessoal do GBToxCe por esses quatro anos de parceria, companheirismo, ajuda e pelos happy hour (e como teve!). Estendo esse agradecimento para as pessoas que já se desligaram do laboratório, todos estarão para sempre no meu coração.

As minhas colegas de curso: Karine, Sonia, Mariani, Renata, Maria Juliana e Gabriela por compartilhar esses últimos anos comigo, sofrendo nas provas, comemorando as aprovações, vocês são incríveis e além do meu agradecimento desejo toda a sorte e sucesso do mundo.

As poczinhas lindas: Eduardo, Luan, Matheus e Vinicius por estarem a mais de anos falando pra eu sair do videogame e tomar jeito na vida (consegui!). Obrigado pela parceria, pelos conselhos e pela jogatina.

Por fim, e mais importante, minha família, acho que não há palavras que podem descrever tudo que vocês já fizeram e ainda fazem para que eu alcance os meus objetivos, obrigado por serem meus exemplos de pessoas e profissionais. Amo vocês incondicionalmente!

“My will made real”.

Moira O’deorain – OVERWATCH

RESUMO

O elevado consumo de frutas está associado com uma redução na incidência de doenças não degenerativas, incluindo câncer e doenças do coração. As frutas contêm altos níveis de componentes biologicamente ativos que conferem benefícios à saúde, além do valor nutricional básico. Dentre estes os antioxidantes naturais têm atraído a atenção devido sua segurança e efeito terapêutico em potencial. Estes antioxidantes são capazes de atuar como sequestradores de radicais livres, captadores de peróxido e oxigênio singleto e inibidores de enzimas. A Jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) pertence à família Myrtaceae e é uma fruta nativa da Mata Atlântica do Brasil, esta tem sido utilizada no tratamento de várias doenças, como asma e diarreia. Tem sido relatado que o fruto da jabuticabeira tem alta concentração de taninos, vitamina C e flavonóides, especialmente na sua casca, o que indica um grande potencial antioxidante e, assim, um possível papel na prevenção de várias doenças relacionadas com o estresse oxidativo. Para avaliar isto, o nematoide *Caenorhabditis elegans* tem sido amplamente utilizado em estudos de envelhecimento e toxicidade devido suas inúmeras vantagens: tamanho reduzido, ciclo de vida curto, alta reprodutibilidade e manipulação genética. O objetivo do estudo foi avaliar a atuação do extrato de jabuticaba frente a múltiplos estresses em *C. elegans*. O extrato foi preparado a partir de uma extração etanólica das frutas, nesta dosou-se seu conteúdo fenólico e sua atividade antioxidante *in vitro* pelos métodos DPPH e FRAP, os animais foram expostos as concentrações de 5, 10, 50, 100 e 250 GAE/mL durante 30 minutos. Após a exposição do extrato pode-se observar que as concentrações testadas não apresentaram toxicidade para o nematoide, através dos ensaios de sobrevivência e reprodução, e ainda foi capaz de estender a vida do verme. Em relação aos estresses, mostrou-se capaz de proteger significativamente contra o estresse oxidativo causado pela juglone e contra o estresse térmico causado a 37°C. Entretanto, o mecanismo de atuação do extrato não é totalmente compreendido, porém há pistas que indicam que este pode estar modulando *daf-16*, um importante fator de transcrição responsável pela transcrição de diversas proteínas antioxidantes.

Palavras-Chave: Jabuticaba, Antioxidante, Estresse Oxidativo, *C. elegans*.

ABSTRACT

High fruit consumption is associated with a reduction in the incidence of non-degenerative diseases, including cancer and heart disease, fruits contain high levels of biologically active components that confer health benefits, as well as the basic nutritional value. Among these, natural antioxidants have attracted attention because of their safety and potential therapeutic effect. These antioxidants are able to act as free radical scavengers, singlet oxygen and oxygen scavengers and enzyme inhibitors. The jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) belongs to the family Myrtaceae and is a native fruit of the Atlantic Forest of Brazil, this has been used in the treatment of several diseases, such as asthma and diarrhea. It has been reported that the fruit of the jabuticabeira has high concentration of tannins, vitamin C and flavonoids, especially in its bark, which indicates a great antioxidant potential and, thus, a possible role in the prevention of several diseases related to oxidative stress. To evaluate this, the nematode *Caenorhabditis elegans* has been widely used in studies and aging and toxicity due to its numerous advantages: reduced size, short life cycle, high reproducibility and genetic manipulation. The objective of the study was to evaluate the performance of jabuticaba extract against multiple stresses. The extract was prepared from an ethanolic extract of the fruits, in which it was measured its phenolic content and its antioxidant activity *in vitro* by the DPPH and FRAP methods, the animals were exposed to concentrations of 5, 10, 50, 100 and 250 GAE/mL for 30 minutes, after this exposure it can be observed that the extract did not show toxicity to the nematode, through the survival and reproduction tests, and was still able to extend the life of the animal. Faced with the stresses, it was able to protect significantly against the oxidative stress caused by juglone and against the thermal stress caused at 37°C. The mechanism of action of the extract is not fully understood, but there are clues that indicate that it may be modulating *daf-16*, an important transcription factor responsible for the transcription of several antioxidant proteins.

Keywords: Jabuticaba, Antioxidant, Oxidative Stress, *C. elegans*.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 CONCEITOS GERAIS E REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1 Estresse oxidativo.....	13
2.2 Consumo de frutas e seus compostos bioativos	15
2.3 Jabuticaba (<i>Myrciaria cauliflora</i>).....	17
2.4 <i>Caenorhabditis elegans</i>	18
3 OBJETIVOS.....	21
3.1 Objetivo geral	21
3.2 Objetivos específicos.....	21
4 METODOLOGIA	22
4.1 Preparação do extrato de jabuticaba (<i>Myrciaria cauliflora</i>).....	22
4.2 Cepas e manutenção dos <i>Caenorhabditis elegans</i>	22
4.3 Sincronização	23
4.4 Ensaio de sobrevivência, longevidade e reprodução	23
4.5 Ensaio de estresse oxidativo	23
4.6 Ensaio de estresse térmico	23
4.7 Análise de DAF-16.....	24
4.8 Estresse por radiação UV	24
4.9 Análise estatística	24
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
5.1 Efeito antioxidante <i>in vitro</i> do extrato de jabuticaba	25
5.2 Efeito do extrato de jabuticaba <i>per se</i> em <i>C. elegans</i>	26
5.3 Extrato de jabuticaba é capaz de promover resistência ao estresse oxidativo, térmico e por UV.....	28
5.4 O extrato de jabuticaba modula a transcrição de <i>daf-16</i>	30
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	33
REFERÊNCIAS.....	34

1 INTRODUÇÃO

O elevado consumo de frutas está associado com uma redução na incidência de doenças não degenerativas, incluindo câncer, doenças do coração, inflamação, artrite, depleção do sistema imunológico, disfunção cerebral e catarata (RUFINO, 2010). As frutas contêm altos níveis de componentes biologicamente ativos que conferem benefícios à saúde, além do valor nutricional básico. Dentre esses componentes biologicamente ativos, os antioxidantes naturais têm atraído a atenção dos pesquisadores devido sua segurança e efeito terapêutico em potencial. Estes antioxidantes são capazes de atuar como sequestradores de radicais livres, captadores de peróxido e oxigênio singleto, além de inibidores de enzimas ou sinérgicos (KERLEY, 2018).

Fisiologicamente, o dano oxidativo gerado normalmente no organismo é balanceado pelas defesas antioxidantes endógenas. Porém uma proteção adicional fornecida pelos elementos nutritivos e não nutritivos provenientes de alimentos é de vital importância para a prevenção de doenças. Nesse sentido, a geração de radicais livres é importante tanto em sistemas alimentares como nos sistemas biológicos. A oxidação é um processo biológico essencial para a produção de energia em muitos organismos vivos. No entanto, o excesso de espécies reativas de oxigênio (ROS) produzidas *in vivo* durante algumas reações oxidativas, é fortemente associado com a peroxidação lipídica de macromoléculas biológicas a qual está relacionada com o desenvolvimento de certas doenças como câncer, inflamação, arteriosclerose, diabetes e envelhecimento (XIE, 2018).

Considerado como um dos países com a mais rica biodiversidade do mundo, o Brasil vem utilizando de forma ineficiente seus recursos naturais (CALIXTO, 2005). Além disso, as plantas têm sido de importância crucial para a saúde humana há séculos (BALBANI, 2009). Os extratos de algumas plantas possuem diversas atividades biológicas como antioxidantes, anti-úlceras, anti-malária, anti-câncer, anti-inflamatórias, antidiabéticas entre outras. Geralmente a atividade antioxidante destes extratos é atribuída, principalmente, a presença de compostos fenólicos como flavonoides, ácidos fenólicos e diterpenos. Estes compostos polifenólicos atuam inibindo várias enzimas oxidativas e inflamatórias, além de atuarem como sequestradores de radicais livres e ROS (VALCHEVA-KUSMANOVA, 2018).

Sabe-se que frutos coloridos são uma fonte potencialmente rica de muitos compostos fenólicos e flavonoides da dieta e acredita-se que podem desempenhar um papel importante na prevenção de muitas doenças oxidativas e inflamatórias. Com isso, ao fazer melhor uso dos produtos vegetais naturais brasileiros através de sua utilização em pesquisas de extração e tecnologia, podemos obter novos tratamentos ou até mesmo a cura para muitas doenças e distúrbios ainda sem tratamento (ARTS, 2005).

Neste contexto a jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) pertence à família Myrtaceae e é uma fruta nativa da Mata Atlântica do Brasil, apresentando ocorrência espontânea por uma extensa faixa do país, ou seja, dos estados do Pará ao Rio Grande do Sul (PEREIRA, 2003). A *Myrciaria cauliflora* tem sido utilizada no tratamento de várias doenças, sendo a sua casca utilizada popularmente no tratamento de hemoptise, asma, diarreia e inflamação crônica das amígdalas (SANTOS, 2009). Os poucos estudos que têm sido feitos sobre os constituintes químicos, especialmente em relação às frações dos frutos, são apresentados principalmente em publicações locais. No entanto, tem sido relatado que o fruto da jabuticabeira tem alta concentração de taninos, vitamina C e flavonóides, especialmente na sua casca, o que indica um grande potencial antioxidante e, assim, um possível papel na prevenção de várias doenças relacionadas com o estresse oxidativo (WU, 2013).

O nematoide de vida livre *Caenorhabditis elegans* têm sido muito utilizado como modelo experimental em diversos estudos, devido sua fácil manipulação e manutenção, mantidos em placas com meio NGM e bactéria *Escherichia coli* como alimento. As diversas vantagens de seu uso incluem: seu ciclo de vida curto (variando de 20 a 25 dias), alta reprodutibilidade, tamanho reduzido (aproximadamente 1mm quando adulto) e possuir homologia com o genoma humano, visto que, o genoma dos nematoides foi sequenciado em 1988. *C. elegans* por ser um modelo mais simples, é um ótimo modelo para estudos de toxicidade, pois permite a identificação do benefício de extratos de frutas e plantas em estudos preliminares (DEUSING, 2015).

2 CONCEITOS GERAIS E REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Estresse oxidativo

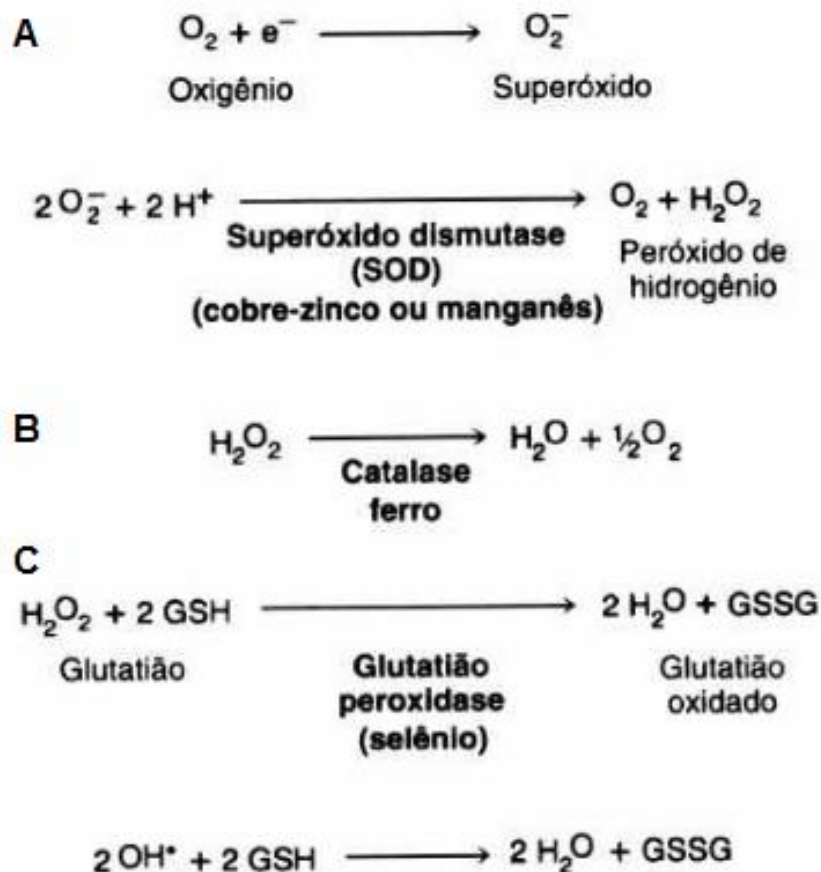
A oxidação de biomoléculas é essencial para o funcionamento do organismo, tendo em vista que é parte fundamental para a geração de energia para as células. A geração dos radicais livres ocorre de forma fisiológica, em vários processos metabólicos, e de maneira contínua (BARREIROS, 2006). Os radicais livres são moléculas e átomos que apresentam um elétron desemparelhado em sua última camada de valência, esta ausência de emparelhamento proporciona para a molécula uma alta reatividade e instabilidade, permitindo reação com membranas biológicas, DNA, ácidos graxos e carboidratos (BARBOSA, 2010). Durante a respiração celular e geração de ATP nas mitocôndrias celulares é quando ocorre a maior formação destes radicais, principalmente derivados da molécula de oxigênio (O_2), estas espécies reativas de oxigênio (EROs) dividem-se em ânion radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila ($\bullet OH$). Através de um sistema antioxidante eficiente, estas moléculas são rapidamente degradadas e mantém-se a homeostase fisiológica (VASCONCELOS, 2007).

A homeostase é mantida pelos sistemas antioxidantes que realizam a remoção e inibição destes radicais, porém quando há uma deficiência nestes sistemas ou quando há uma produção excessiva dos radicais, superando o limiar de atuação destas defesas, ocorre à instalação de um processo denominado estresse oxidativo. Com o aumento da oxidação de moléculas e tecidos, o processo torna-se cada vez mais crônico e desenvolvem-se enfermidades como cardiopatias, aterosclerose, diabetes, problemas pulmonares e câncer (NIKI, 2018).

Como forma de combater os radicais livres, existem as substâncias antioxidantes, que tem como função ceder um elétron para que este radical se estabilize e, conseqüentemente, reduza sua reatividade, minimizando os danos aos tecidos (GONÇALVES, 2008). O sistema de defesa antioxidante pode ser dividido em dois grupos: complexos enzimáticos como superóxido dismutase (SOD), catalase e glutathiona peroxidase (GPx) e não enzimáticos que consistem em substâncias advindas da alimentação como vitaminas, carotenoides e compostos fenólicos (FERREIRA, 2009).

A superóxido dismutase (SOD) é uma enzima que apresenta um grupo prostético que pode ser cobre-zinco ou manganês, tem como função neutralizar o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio molecular (O_2), tendo como cofator o próton H^+ (FIGURA 1A). A catalase, por sua vez, realiza a conversão do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular, necessitando de NADPH para sua atividade (FIGURA 1B), estas duas enzimas em conjunto conferem proteção para células aeróbias (FERREIRA, 2009). Além destas enzimas, ainda há a glutathiona peroxidase (GPx) que para sua ação apresenta como coenzima a glutathiona reduzida (GSH), esta substância apresenta diversos papéis no interior da célula como participação do estoque e transporte de cisteína, função imunológica, proliferação celular e principalmente como antioxidante e detoxificante (NETO, 2010). A enzima GPx irá realizar a conversão do peróxido de hidrogênio e peróxidos orgânicos em seus respectivos alcoóis (FIGURA 1C) (FERREIRA, 2009).

Figura 1: Representação da atuação das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase e glutathiona peroxidase (GPx).



As vitaminas, principalmente A, C e E, e os carotenoides inibem o estresse oxidativo por capturarem os radicais livres e/ou atuando como agentes redutores e estabilizando estes radicais pela doação de elétrons. A vitamina C ainda apresenta a capacidade de regenerar a forma ativa de outras vitaminas e glutathione para que realizem o papel antioxidante (BONI, 2010). Os compostos fenólicos incluem diversas classes de substâncias e, dessa forma, sua atuação depende principalmente de sua estrutura química, estas são capazes de sequestrar ou neutralizar agentes pró-oxidantes e quelar metais de transição, impedindo a iniciação, propagação e instalação do dano oxidativo (SOUSA, 2007)

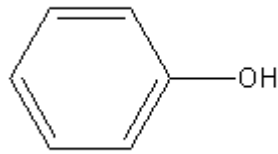
2.2 Consumo de frutas e seus compostos bioativos

A alimentação saudável, rica em frutas e legumes, proporciona uma nutrição saudável, além de minimizar o risco do desenvolvimento de doenças crônicas, como diabetes, doenças cardiovasculares, inflamações e câncer (ARTS, 2005). Estes alimentos apresentam diversas atividades, pois são compostos por diversas substâncias que em conjunto atuam promovendo a saúde, porém o consumo de frutas e legumes ainda é baixo, principalmente no Brasil. Segundo pesquisas, cerca de 40% dos brasileiros consomem este tipo de alimento, o que é preocupante, tendo em vista que o Brasil é um dos principais produtores e exportadores de frutas (SEBRAE, 2015).

A organização mundial da saúde (OMS) indica o consumo diário de 400 gramas de qualquer tipo de fruta, como forma de profilaxia frente a doenças crônicas, pois desta forma o indivíduo estaria nutrido com a maioria dos micronutrientes, fibras e outras substâncias essenciais (OMS, 2002). Os biocompostos mais abundantes nas frutas são os compostos fenólicos e destes vem as maiores atividades biológicas exercidas.

Os compostos fenólicos são uma classe que apresenta a maior diversidade de substâncias, pois ocorre uma grande variedade de combinações na natureza e os resultantes são subdivididos em diversas subclasses (HARBORNE, 1989). Apresentam em sua composição, obrigatoriamente, um anel aromático onde ao menos um hidrogênio é substituído por grupamento hidroxila (FIGURA 2), este esqueleto carbônico é o responsável pela principal divisão existente (SCHENKEL, 2010).

Figura 2: Estrutura básica de um composto fenólico.



Distribuem-se amplamente nas angiospermas e gimnospermas, porém raramente são encontrados na sua forma livre, mas combinados na forma de ésteres e heterosídeos, esta composição química fornece para estas substâncias uma alta solubilidade em água e solventes orgânicos polares. Além disto, apresentam alta reatividade e para seu isolamento necessitam apenas de soluções fracamente básicas, tendo em vista que a maioria das substâncias apresentam características ácidas. Por outro lado, são substâncias facilmente oxidáveis, seja pela ação da luz, calor, metais e enzimas, levando a subprodutos de oxidação menos ativos (SCHENKEL, 2010).

Desempenham diversas funções nos vegetais, entre elas está à contribuição para o sabor, odor e cor destes, sendo utilizados como corantes e flavorizantes de alimentos e bebidas. Aliado a isto, apresentam aplicações farmacológicas, onde diversos medicamentos, a base de compostos fenólicos, já se encontram no mercado farmacêutico, como por exemplo, o guiacol utilizado como expectorante (SCHENKEL, 2010).

2.3 Jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*)

Segundo classificação botânica a jabuticaba pertence à família Myrtaceae, gênero *Myrciaria* e a espécie *Myrciaria cauliflora*. Pode ser encontrada em outra denominação, devido a divergências botânicas, como *Plinia cauliflora* (GOVAERTS, 2008). A jabuticabeira é uma árvore nativa do Brasil, mais precisamente da Mata

Atlântica, e distribui-se em uma ampla faixa que compreende os estados do Pará ao Rio Grande do Sul (PEREIRA, 2003).

A jabuticabeira é uma árvore que demora cerca de vinte anos para frutificar e foi descrita inicialmente em 1828, porém sua origem é desconhecida. O fruto é uma baga lisa, sub-globular, preto-púrpura quando maduro com cerca de 1,6 – 2,2 centímetro de diâmetro e pode conter de 1 a 4 sementes (GOMES, 2007). A casca é fina e muito frágil e a polpa tem uma cor que varia do branco a translúcido com sabor doce a levemente ácido (WHALEN, 1997). Deve ser cultivada sob sol com um solo rico em matéria orgânica, devendo receber irrigação de água regularmente, principalmente nas etapas de floração e frutificação.

Para a indústria, é possível criar vários produtos alimentícios utilizando os frutos da jabuticaba, como vinhos, sucos, licores, geleias e vinagres, isto devido a sua semelhança morfológica com a uva, porém este fruto ainda apresenta-se pouco explorado economicamente, mesmo com a aceitação de seus produtos (SILVEIRA, 2006). Além disto, a jabuticaba tem sido amplamente pesquisada devido aos seus teores de compostos bioativos como flavonóides, taninos, vitamina C, estas substâncias conferem uma alta capacidade antioxidante que deve ser melhor explorada (WU, 2013).

Estudos anteriores utilizando a jabuticaba descreveram diversas atividades inerentes a este extrato, como o efeito protetor e indutor de reparo ao DNA pelo extrato da semente sobre a genotoxicidade induzida pela ciclofosfamida (SILVA, 2016). Além disto, alguns estudos têm demonstrado uma atuação em doenças crônicas como hipertensão e diabetes, diminuindo a complicação de seus quadros, foi observado que o extrato de jabuticaba apresentou capacidade *scavenger* de radicais livres e reduziu danos renais e cardíacos em ratos hipertensos (SOUZA, 2017) e também atenuou um quadro de nefropatia diabética por suprimir o estresse oxidativo e inflamação induzido por um tratamento conjunto de estreptozotocina e nicotinamida em camundongos (HSU, 2016).

2.4 *Caenorhabditis elegans*

Diversas pesquisas são realizadas anualmente visando a procura de substâncias naturais que promovam a saúde e minimizem os danos, buscando uma fórmula perfeita para prolongar a vida. Para isto, utilizam-se mamíferos como modelos experimentais, pois são mais semelhantes aos humanos, destacando ratos, camundongos e coelhos. Em contrapartida, discussões têm sido realizadas para melhorar as condições destes animais durante estes estudo. Neste sentido surge um projeto denominado 3Rs, do inglês Reduction (redução), Refinement (refinamento) e Replacement (substituição), esta iniciativa tem como objetivo diminuir o número dos animais utilizando, assegurando sua integridade sem alterar a qualidade dos resultados científicos obtidos (VICTAL, 2014).

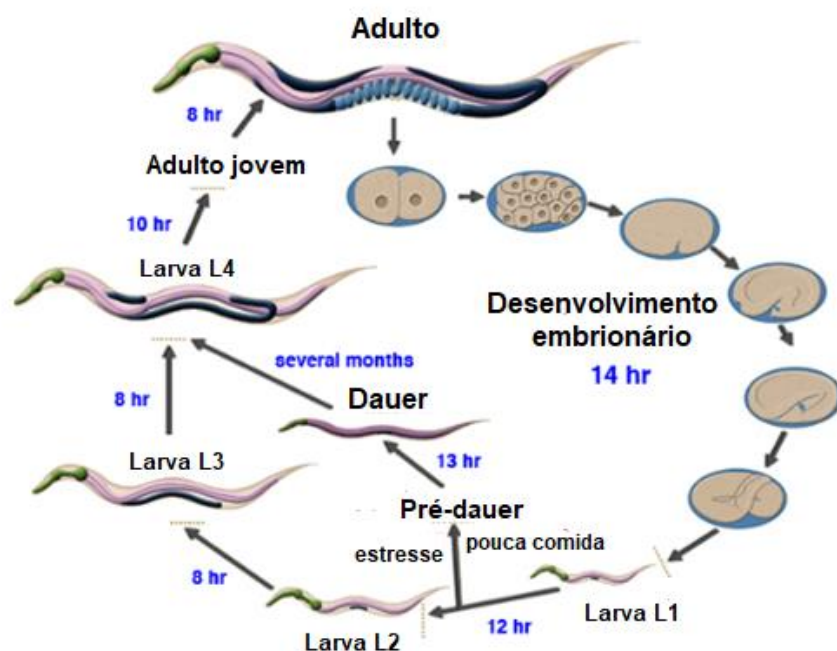
Neste contexto, estudos *in vitro* e *in silico*, tem sido utilizados para substituir o uso de animais e atuam como auxiliares na pesquisa, pois muitas vezes proporcionam resultados preliminares (VICTAL, 2014). Além disso, modelos alternativos surgem para dar assistência às pesquisas e diminuir a experimentação com mamíferos. Dentre os principais representantes destes modelos são: *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* e *zebrafish*, que são mais fáceis de manter e manipular, sendo muitas vezes preferidos para realização de pesquisas (CHATTOPADHYAY, 2018).

O nematoide *Caenorhabditis elegans* será utilizado no presente estudo, este pertence à família *Rhabditidae* e tem como principal habitat natural os ambientes terrestres e não são parasitas, sendo considerados animais de vida livre, pois se alimentam apenas de fungos, bactérias, algas e outros nematoides Sua manutenção em laboratório envolve placas de petri contendo o meio de cultura NGM (nematode growth media) e como alimento a bactéria *Escherichia coli* na sua cepa OP50, mantido sempre a 20°C (GILBERT, 1988).

Este modelo apresenta inúmeras características que o tornam excelente para pesquisas de toxicidade e envelhecimento, entre elas: facilidade na manutenção, corpo transparente e de tamanho reduzido, ciclo de vida curto (variando de 20 a 25 dias), genoma totalmente sequenciado que apresenta homologia aos mamíferos e alta reprodutibilidade, uma hermafrodita grávida é capaz de liberar de 200 a 300 ovos em apenas um ciclo reprodutivo (PARK, 2013). Neste modelo, ainda são possíveis modificações genéticas para deletar e/ou marcar genes de interesse utilizando proteínas fluorescentes, gerando assim cepas transgênicas que irão fornecer resultados mais precisos para o estudo, gerando ferramentas estratégicas para a pesquisa (HULME, 2011).

O ciclo de vida do *C. elegans* (FIGURA 2) envolve a maturação do seu ovo, estágios larvais (L1 – L4) e a fase adulta, este animal demora cerca de 48 horas para que atinja a fase adulta e esteja apto para a reprodução. Porém se durante seu desenvolvimento este animal sofrer um estresse grande, como ausência de comida, estresse térmico ou oxidativo, pode entrar em um estágio larval intermediário denominado dauer, nesta fase torna-se mais resistente e capaz de viver 60 dias (HULME, 2011).

Figura 2: ciclo de vida do nematoide *Caenorhabditis elegans*.



Vários estudos têm sido realizados para avaliar atividade antioxidante e protetora de produtos naturais utilizando este modelo experimental, muitos deles apresentaram resultados positivos e promissores, indicando diversos produtos como potenciais agentes detoxificantes e promotores da saúde. Dentre eles podemos citar o extrato de *Calycophyllum spruceanum* (pau-mulato), amplamente utilizado na medicina tradicional na região amazônica do Brasil, apresentou capacidade de promover a longevidade e aumentar a resistência ao estresse em *C. elegans* (PEIXOTO, 2018). Além disso, o extrato de chá verde mostrou-se capaz de aumentar a longevidade e resistência ao estresse em *C. elegans* (FEI, 2017).

As frutas também apresentam estudos toxicológicos e que mostrem seus efeitos benéficos neste modelo experimental, podem-se destacar o extrato da casca da romã ou extrato de amor que protegem o verme das complicações decorrentes de um quadro de hiperglicemia (BARATHIKANNAN, 2016; YAN, 2017), e ainda o extrato de cranberry é capaz de minimizar a toxicidade da proteína β -amiloide em um modelo de doença de Alzheimer (GUO, 2018).

Um dos principais mecanismos de defesa deste nematoide envolve a transcrição do fator daf-16 do citosol para o núcleo das células, este fator é capaz de induzir a transcrição de diversas famílias de proteínas de defesa para o verme, sendo capaz de aumentar a defesa antioxidante e a detoxificação dos radicais livres presentes no organismo deste animal (MCLAUGHLIN, 2017).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade do extrato de jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) frente ao estresse térmico e oxidativo em *Caenorhabditis elegans*.

3.2 Objetivos específicos

Obter o extrato de jabuticaba, quantificar os fenólicos totais, bem como avaliar a atividade antioxidante *in vitro* do extrato da fruta, pelos testes DPPH e FRAP;

Verificar o efeito do extrato sobre a sobrevivência, reprodução e longevidade dos nematoides;

Analisar sua possível proteção ou reversão contra alguns agentes estressores: juglone, estresse térmico e luz ultravioleta;

Avaliar o possível mecanismo envolvido na proteção gerada pela exposição ao extrato de jabuticaba, via translocação de DAF-16.

4 METODOLOGIA

4.1 Preparação do extrato de jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*)

Os frutos da jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) foram colhidos em seu estágio maduro nas instalações da EMBRAPA-CPACT-Pelotas/RS e foram congelados previamente ao transporte, que foi realizado em caixas térmicas e na presença de gelo. Para a extração dos compostos fenólicos, as frutas foram lavadas em água corrente e as sementes/caroço foram removidas, sendo a amostra composta de polpa e casca da fruta.

Para a extração dos compostos fenólicos, cem gramas de amostra congelada foram homogeneizadas com 300 mL de uma solução etanólica (95°GL) acidificada com HCl 1M em béquer protegido da luz, utilizando-se um misturador ultra-turrax por 5 minutos, e a seguir foram colocadas em agitador magnético por 30 minutos. As amostras foram centrifugadas por 5 min a 3.000 rpm e o sobrenadante foi recuperado. O resíduo foi submetido à nova extração como descrito acima, sendo o sobrenadante misturado ao anterior. O sobrenadante recuperado foi evaporado em aparelho rotaevaporador utilizando-se temperaturas entre 40-45°C e vácuo. O extrato seco obtido, ressuspenso em água milliQ, foi utilizado para as determinações de compostos fenólicos totais (quantificados com Folin; Swain & Hillis, 1959), atividade antioxidante total (determinada utilizando DPPH; Brand-Williams *et al.*, 1995) e potencial antioxidante de redução de ferro (Benzie & Strain, 1996) (todas as análises serão realizadas em triplicata). Baseado na quantidade de compostos fenólicos obtidos, padronizou-se as concentrações de 5, 10, 50, 100 e 250µg de equivalentes de ácido gálico/mL.

4.2 Cepas e manutenção dos *Caenorhabditis elegans*

As cepas utilizadas durante o estudo foram N2 (tipo selvagem), TJ356 [DAF-16:GFP] (fator de transcrição daf-16 marcado com proteína verde fluorescente) e TK22 [*mev-1(kn1)* III] (longevidade reduzida). Todas as cepas foram obtidas do *Caenorhabditis Genetic Center* (Minesota, USA).

Durante este estudo, os nematoides foram mantidos em meio NGM (*nematode growth media*) e bactéria *E. coli* OP50, como fonte de alimento, conservados em incubadora a 20°C para que ocorra o desenvolvimento apropriado dos animais.

4.3 Sincronização

Para obtenção dos vermes em seu estágio L1, eles passaram por um processo de sincronização. Este processo consiste na utilização de uma solução de hipoclorito de sódio e hidróxido de sódio, para que assim a cutícula dos vermes grávidos se rompa e obtenham-se os ovos, 14 horas depois as larvas L1, que foram utilizadas para os tratamentos.

4.4 Ensaio de sobrevivência, longevidade e reprodução

As larvas L1 foram expostas a diferentes concentrações do extrato em meio líquido durante 30 minutos e, logo após, foram acondicionadas em placas contendo meio NGM e bactéria *E. coli* OP50, foram assim acondicionados por 48 horas, mantidos a 20°C. Quando atingiram a fase adulta, ou seja, estágio L4 foram analisados verificando sua taxa de sobrevivência em relação ao grupo controle. Após este período foram, diariamente, transferidos para novas placas, até que todos estivessem mortos. Foram considerados mortos todos os vermes que não responderam ao estímulo do toque. O ensaio de longevidade foi realizado utilizando as cepas N2 e TK22.

Para o ensaio da reprodução, utiliza-se o mesmo protocolo inicial, os vermes após atingirem o estágio L4, foram transferidos para novas placas por três dias, verificando sua postura de ovos até o fim de sua reprodução.

4.5 Ensaio de estresse oxidativo

As larvas L1 foram expostas a diferentes concentrações do extrato em meio líquido durante 30 minutos, logo após, foram expostas a concentração de 75µM de juglone por 2 horas, segundo padronização do laboratório, foram acondicionados em placas contendo meio NGM e bactéria *E. coli* OP50. Após 24 horas foram analisados verificando sua taxa de sobrevivência em relação ao grupo controle N2 e grupo controle positivo.

4.6 Ensaio de estresse térmico

As larvas L1 foram expostas a diferentes concentrações do extrato em meio líquido por 30 minutos, logo após, foram acondicionadas em placas com meio NGM e bactéria *E. coli* e submetidas ao calor de 37°C da estufa bacteriológica por 2 horas. Após 24 horas foram analisados verificando sua taxa de sobrevivência em relação ao grupo controle positivo.

4.7 Ensaio de localização de DAF-16

Neste ensaio foi utilizado a cepa TJ356 [DAF-16::GFP] os nematoides em estágio L1 foram expostos ao extrato de jabuticaba durante 30 minutos, logo após, os animais foram analisados em microscópio de fluorescência (FLoid® Cell Imaging Station), avaliando a migração do fator de transcrição do citoplasma para o núcleo.

4.8 Estresse por radiação UV

Os animais em estágio L4 foram submetidos a exposição com o extrato da jabuticaba durante 30 minutos, em seguida foram expostos a radiação UV em capela de fluxo laminar (Veco®) durante 10 minutos. Logo após, 10 vermes foram transferidos para novas placas e monitorou-se sua mortalidade durante 7 dias.

4.9 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm DP. Os resultados foram submetidos a ANOVA de uma ou duas vias de acordo com a necessidade e pós teste de Tukey ou similar com nível de significância $p < 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Efeito antioxidante *in vitro* do extrato de jabuticaba

As técnicas *in vitro* são utilizadas como estudos preliminares para a avaliação antioxidante de extratos, neste sentido inicialmente foi verificada a capacidade antioxidante do extrato de jabuticaba *in vitro* utilizando técnicas de quantificação dos compostos fenólicos totais, captura do radical DPPH e redução do íon férrico (FRAP). Pode-se observar que o extrato apresentou capacidade antioxidante e uma grande quantidade de compostos fenólicos, apresentou uma quantidade de $5.543,908 \pm 1.047,7 \mu\text{g}$ de equivalentes de ácido gálico/mL de extrato, $9,22 \pm 3,73 \text{mg}$ de capacidade de captura do radical DPPH e ainda $45.954,58 \pm 1.585,7 \mu\text{mol}$ de ferro reduzidos em um grama de fruta (TABELA 1). Na literatura encontram-se alguns estudos com extratos de frutas ou plantas que também se destacam pela quantidade de compostos fenólicos, como o extrato das folhas de *Vitis vinífera* que apresentam $790,59 \pm 7,31 \mu\text{g}$ de EAG/mL e ainda capacidade de capturar $11,18 \pm 0,12$ do radical DPPH (AOUEY, 2016), ainda o extrato de mirtilo apresentou $443,6 \pm 17 \mu\text{g}$ de EAG/mL e capacidade de reduzir $22,5 \pm 0,6 \mu\text{mol}$ de ferro em uma grama de fruta (BASU, 2016).

Tabela 1: Avaliação antioxidante *in vitro* do extrato de jabuticaba utilizando os ensaios FRAP, DPPH e quantificação de compostos fenólicos.

	FRAP ($\mu\text{mol FeSO}_4 \text{ g}^{-1}$)	DPPH (mg de fruta/mL)	COMPOSTOS FENÓLICOS (μg de equivalentes de ácido gálico/mL)
<i>Myrciaria cauliflora</i>	$45.954,58 \pm$ $1.585,7$	$9,22 \pm 3,73$	$5.543,908 \pm$ $1.047,7$

Os compostos fenólicos englobam uma grande quantidade de substâncias e desta forma desempenham diversos efeitos biológicos, incluindo a captação e/ou redução de radicais livres presentes no meio. Neste sentido um extrato contendo uma grande quantidade destes fitoquímicos poderá apresentar uma grande capacidade antioxidante (WU, 2018). Além disso, uma dieta rica em compostos fenólicos levará a diversos benefícios ao indivíduo, levando a prevenção de diversos quadros que podem evoluir a distúrbios maiores, tendo em vista as diversas propriedades biológicas exercidas por estas substâncias (NASCIMENTO, 2012).

É importante ressaltar que a técnica de extração e preparação da amostra utilizada irá interferir diretamente no resultado obtido, algumas técnicas surgem como as mais utilizadas para a extração e preparação de extratos de origem vegetal, como por exemplo, a maceração, extração por micro-ondas e extração por ultrassom, neste sentido a maceração ainda apresenta-se como a melhor forma de extrair os compostos de um vegetal, quando comparado com as demais técnicas. Isto está relacionado, com a necessidade de encontrar um método que seja capaz de retirar a grande maioria dos compostos de uma planta ou fruta com o objetivo de criar produtos que apresentem grande quantidade de nutrientes e capacidade antioxidante, facilitando os processos industriais (ALBUQUERQUE, 2018).

Após a obtenção destes resultados *in vitro* foram calculadas as concentrações baseadas na quantidade de compostos fenólicos presentes no extrato, estas concentrações foram: 5, 10, 50, 100 e 250 μ g de EAG/mL que posteriormente foram testadas no modelo *C. elegans*.

5.2 Avaliação toxicológica do extrato de jaboticaba em *C. elegans*

Para avaliar a atividade *in vivo* do extrato, primeiramente foi realizada uma sobrevivência e pode-se verificar que o extrato não apresentou mortalidade para os vermes, mantendo a sobrevivência nos níveis do controle (FIGURA 4A). Outro aspecto toxicológico que pode ser observado nos *C. elegans* é alterações na reprodução e novamente o extrato não mostrou alterações neste parâmetro (FIGURA 4B). Por outro lado, o extrato nas concentrações de 10, 50 e 100 μ g de EAG/mL mostrou capacidade de promover aumento significativo da longevidade dos animais quando comparados ao grupo controle (FIGURA 4C).

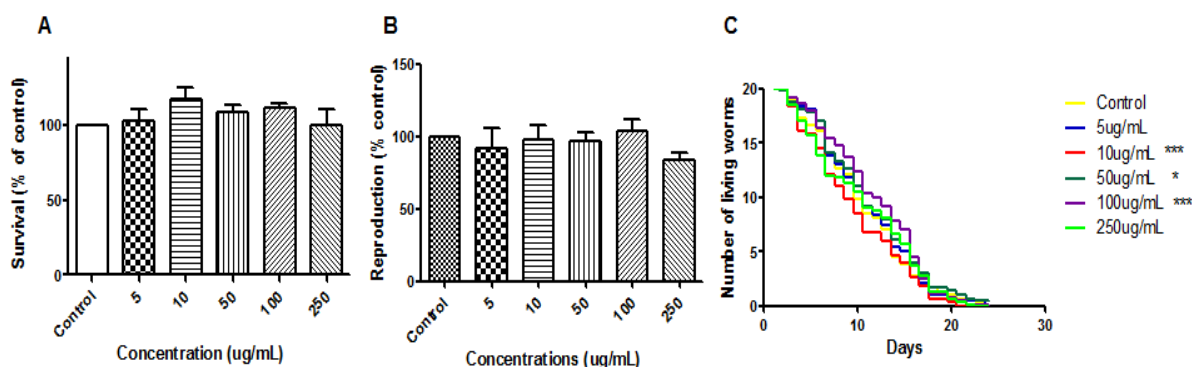


Figura 4: Avaliação toxicológica do extrato de jaboticaba no nematoide *C. elegans* (N2). (A) sobrevivência; (B) tamanho da ninhada e (C) longevidade utilizando as concentrações de 5, 10, 50, 100 e 250 GAE/mL. * $p < 0,05$ de significância por ANOVA. (n = 3).

O nematoide *C. elegans* destaca-se nestas pesquisas, pois diversos parâmetros podem ser analisados para visualizar danos toxicológicos, entre eles destacam-se a sobrevivência e a reprodução, porém podem-se visualizar danos neuronais através do comportamento dos animais (RUSZKIEWICZ, 2018). Existem relatos na literatura que comprovam que a reprodução é bastante sensível a danos externos, muitas vezes a postura dos ovos é acelerada para que haja a reprodução da espécie ou a toxicidade ocorre nas células reprodutivas levando a defeitos na reprodução e diminuição do tamanho da ninhada dos animais (WEI-LI, 2018).

Aliado a ausência de toxicidade, o extrato foi capaz de prolongar a vida útil dos animais, as concentrações de 10, 50 e 100µg de EAG/mL foram responsáveis por este efeito promotor de longevidade, indicando que o extrato pode estar envolvido no balanço redox das células, impedindo que haja exacerbação dos radicais livres decorrentes do aumento da idade (ZHAO, 2017). O envelhecimento é um processo biológico inerente a todos os organismos, nesta fase da vida é comum o aparecimento de diversas doenças relacionadas a idade, por isto é ideal o consumo de alimentos que promovam a saúde a fim de retardar estes processos biológicos (DEVAGI, 2018).

5.3 Extrato de jaboticaba é capaz de promover resistência ao estresse oxidativo, térmico e por UV

O extrato mostrou-se capaz de reduzir a mortalidade causada pelo pesticida juglone na concentração de 250 μ g EAG/mL (FIGURA 5A), a juglone é uma das naftoquinonas mais abundantes, pertence à classe das quinonas e é responsável pela produção de peróxido de hidrogênio e superóxido intracelular, devido a sua capacidade de aceitar ou doar elétrons facilmente, isto leva a danos a macromoléculas biológicas e aceleram o processo de envelhecimento e aparecimento de doenças (KURTYKA, 2016; BENITES, 2017). A fim de investigar se o extrato apresenta capacidade de prolongar a longevidade em animais sob estresse, utilizou-se a cepa TK22, esta apresenta uma mutação na enzima succinato desidrogenase presente no citocromo b (complexo II) da cadeia transportadora de elétrons, o que leva a perda de função em *mev-1* diminuindo a fosforilação oxidativa e consequentemente a longevidade destes animais (DEVAGI, 2018), os nematoides expostos a concentração de 250 μ g de EAG/mL apresentaram uma tendência no aumento da longevidade quando em comparação com o grupo controle *mev-1*, porém esta diferença não mostrou-se significativa (FIGURA 5B), indicando uma possível atividade sequestradora de radicais livres.

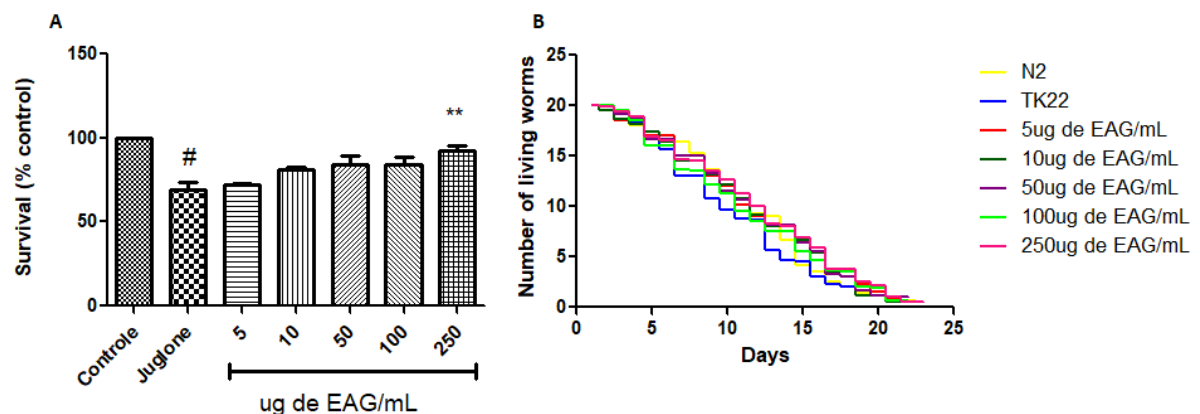


Figura 5: Avaliação do estresse oxidativo em *C. elegans*. A) avaliação do extrato de jabuticaba frente a exposição a juglone (75 μ M) por 2 horas (N2); B) longevidade utilizando a cepa TK22 (*mev-1*) utilizando as concentrações de 5, 10, 50, 100 e 250 μ g de EAG/mL. * Indica diferenças ao grupo controle juglone e # indica diferenças ao grupo controle *p < 0,05 de significância por ANOVA. (n = 3).

Verificou-se também que todas as concentrações (5, 10, 50, 100 e 250 μ g de EAG/mL) do extrato de jabuticaba foi capaz de prevenir o dano causado pelo choque térmico (FIGURA 6), quando o nematoide foi submetido a 37°C, sendo este um possível indicativo de que pode estar modulando o fator de transcrição HSF (“*heat shock transcription factor*”) que é responsável pela transcrição de proteínas chaperonas ou de choque térmico (SONG, 2018). Estas proteínas apresentam capacidade de estabilizar proteínas que estão sendo formadas e remodelar proteínas que sofreram danos e encontram-se modificadas (PATEL, 2017).

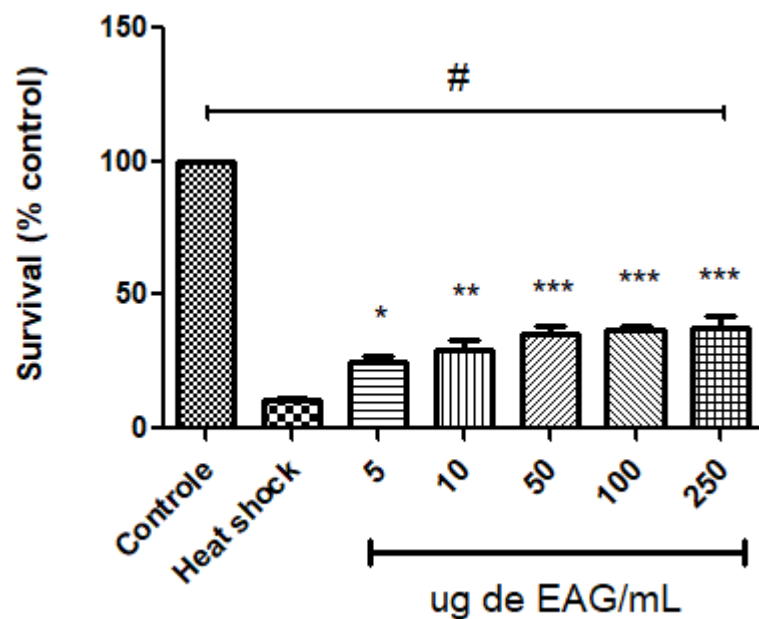


Figura 6: Exposição dos nematoides a 37°C por 2 horas após a exposição ao extrato de jabuticaba nas concentrações de 5, 10, 50, 100 e 250 μ g de EAG/mL (N2). * indica diferenças ao grupo heat shock e # indica diferenças ao grupo controle. *p < 0,05 de significância por ANOVA. (n = 3).

A radiação ultravioleta é emitida naturalmente pelo sol, porém grande parte não alcança a atmosfera devido a camada de ozônio presente em torno da Terra, esta radiação é capaz de causar danos imunológicos e na pele, em caso de exposição crônica pode levar a danos irreversíveis e envelhecimento (PRASANTH, 2016). A concentração de 250 μ g de EAG/mL do extrato de jabuticaba apresentou tendência em proteger os nematoides frente a exposição aguda ao UV, porém este resultado não mostrou-se significativo (FIGURA 7).

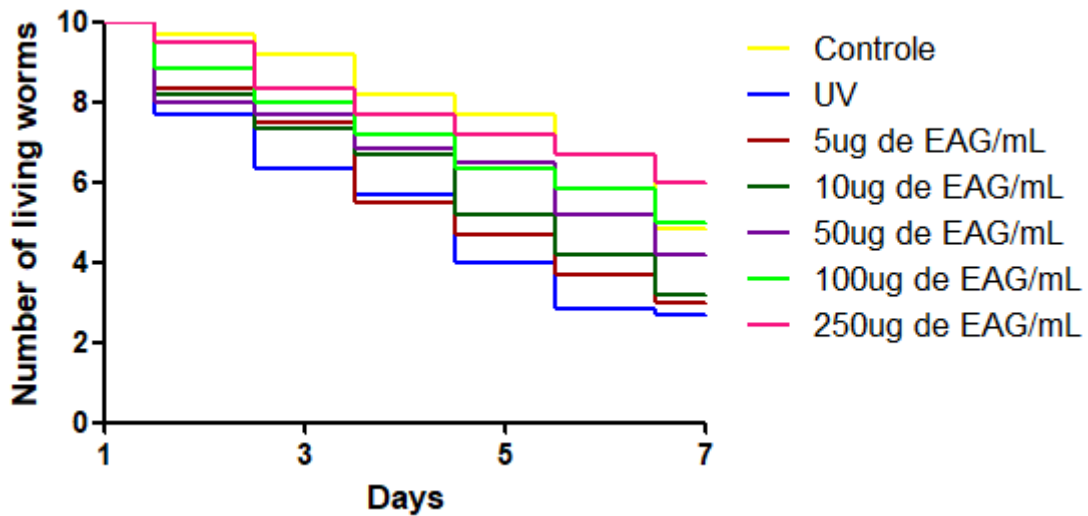


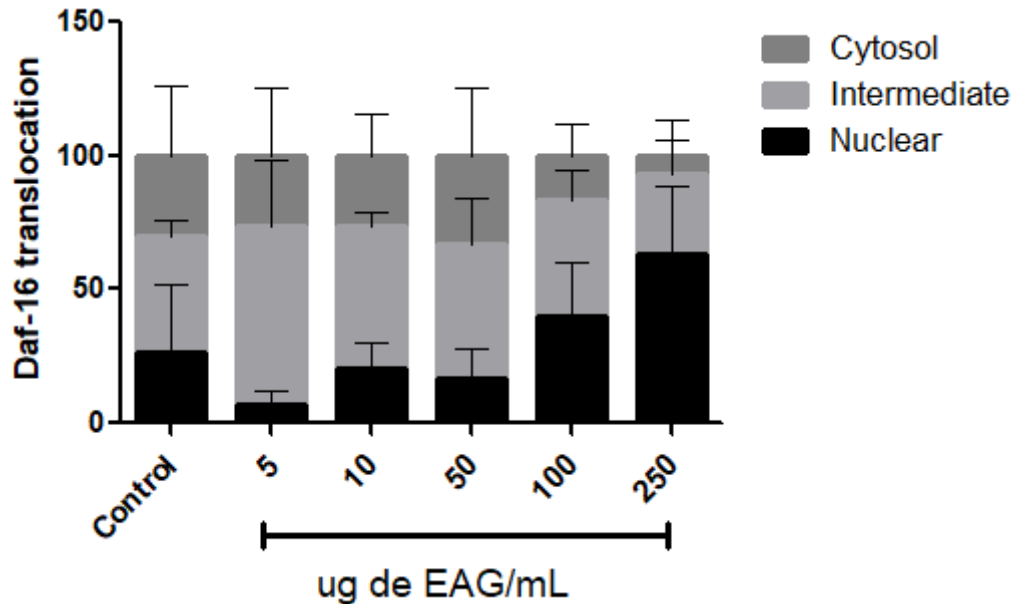
Figura 7: Exposição dos nematoides a radiação ultravioleta por 10 minutos após a exposição ao extrato de jabuticaba nas concentrações de 5, 10, 50, 100 e 250µg de EAG/mL (N2). *p < 0,05 de significância por ANOVA. (n = 3).

5.4 O extrato de jabuticaba modula a transcrição de *daf-16*

O gene *daf-2* é responsável pela codificação do IGF-1 (“*insulin-like growth factor*”) que está envolvido no aumento da longevidade e aumento da resistência ao estresse, aliado a este gene está o *sir-2.1* que também modula respostas de longevidade e estresse, sendo estes dois os principais genes que regulam a expressão e migração de *daf-16* do citoplasma celular para o núcleo, onde exerce seus efeitos (ROHN, 2018). Outro fator predisponente para a migração de *daf-16* são as espécies reativas de oxigênio, durante um quadro de estresse oxidativo agudo, estas ROS irão aumentar sua concentração celular e desencadear a migração de *daf-16* para o núcleo visando a regulação de genes envolvidos na detoxificação destas espécies reativas, como por exemplo, *sod-1*, *sod-2* e *sod-3* (SENUCHUK, 2018). É importante ressaltar que este fator de transcrição presente no *C. elegans* é homólogo ao FOXO presente em mamíferos, apresentando alta similaridade estrutural e funcional (SUN, 2017).

Verificou-se que o extrato de jabuticaba foi capaz de promover a translocação de *daf-16* para o núcleo das células, para que desta forma pudesse realizar sua função de ativação de proteínas de detoxicação e defesa para o nematoide, a concentração de 250µg de EAG/mL apresentou uma maior fluorescência, indicativo de translocação deste fator do citoplasma para o núcleo (FIGURA 8). A ativação de diversas proteínas

subsequentes nesta cascata de sinalização podem ser as responsáveis pelos efeitos visualizados anteriormente como a proteção aos estresses (oxidativo, térmico e pela radiação ultravioleta) e aumento da longevidade dos animais selvagens e com deleção de gene *mev-1*.



B

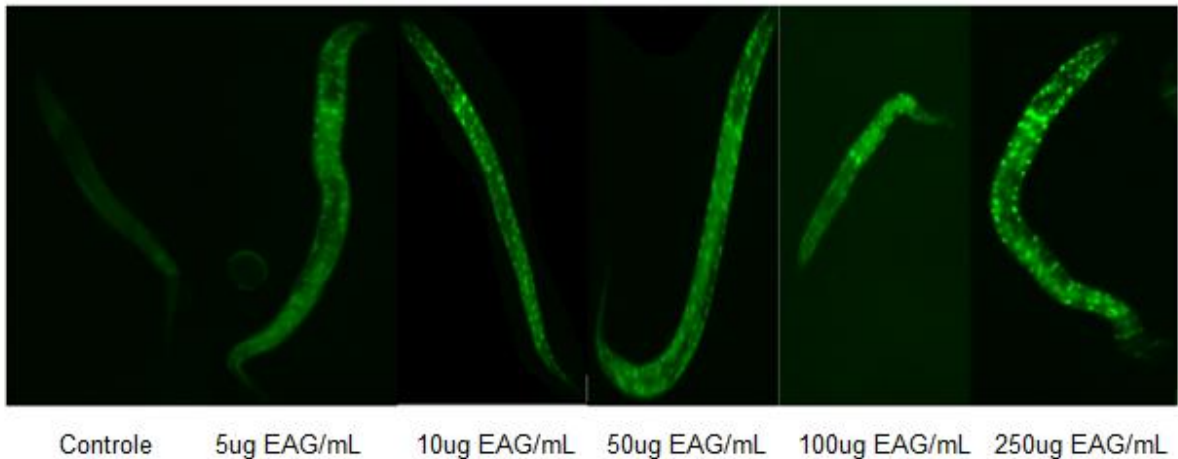


Figura 8: A) avaliação da translocação do fator de transcrição *daf-16* para o núcleo da célula após exposição de 30 minutos ao extrato de jabuticaba nas concentrações de 5, 10, 50, 100 e 250µg de EAG/mL utilizando a cepa TJ356. B) imagens representativas dos animais expostos ao extrato de jabuticaba. * $p < 0,05$ de significância por ANOVA.

Alguns trabalhos na literatura utilizando frutas mostraram que esta via de regulação é bastante influenciada por compostos bioativos, demonstrando que compostos naturais apresentam grande capacidade de promoção da longevidade pela redução dos múltiplos estresses ambientais, como por exemplo, uma mistura de ervas tradicionais chinesas (ZHI, 2017), árvore denominada popularmente como “Mulateiro”, nativa do Amazonas (PEIXOTO, 2018) e extrato de amora rico em antocianinas (YAN, 2017).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A jabuticaba é uma fruta nativa do Brasil e compreende uma faixa bastante extensa do território nacional, desta forma está presente no dia-a-dia de vários brasileiros, aliado a isto, não possui uma extensa caracterização de todos os seus benefícios para a saúde, tornando importante seu estudo para maior compreensão de seus benefícios para a população.

O extrato apresentou capacidade antioxidante, visualizada pelos testes do FRAP e do DPPH, além de apresentar uma grande quantidade de compostos fenólicos.

Não mostrou toxicidade para o nematoide *Caenorhabditis elegans* e ainda foi capaz de prolongar sua vida.

O extrato foi capaz de proteger do dano causado pelo pesticida juglone e ainda pela exposição a 37°C, diminuindo a mortalidade do animal sob estas condições.

Seu mecanismo de atuação encontra-se incompreendido, porém este trabalho traz um indicativo que haja a modulação do fator de transcrição daf-16, havendo sua translocação para o núcleo celular e a consequente ativação de proteínas de defesa para o verme.

Em conjunto, é possível verificar que o extrato de jabuticaba é importante para a proteção dos danos aos quais diariamente estamos expostos, de maneira a diminuir os radicais livres e consequentemente os danos que levam ao envelhecimento e/ou surgimento de doenças. Desta maneira, estimular o consumo de frutas como a jabuticaba.

Mais experimentos são necessários para elucidar totalmente os mecanismos de ação envolvidos na proteção do extrato, é necessário avaliar enzimas antioxidantes como superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase, avaliar vias de sinalização neste animal e avaliar os danos oxidativos.

REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, B. R.; PRIETO, M. A.; VAZQUEZ, J. A.; BARREIRO, M. F.; BARROS, L.; FERREIRA, I. C. F. R. Recovery of bioactive compounds from *Arbutus umedo* L. fruits: comparative optimization study of maceration/microwave/ultrasound extraction techniques. **Food Research International**. 2018.

AOUEY, B.; SAMET, A. M.; FETOUI, H.; SIMMONDS, S. M. J.; BOUAZIZ, M. Anti-oxidant, anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activities of grapevine leaf extract (*Vitis vinifera*) in mice and identification of its active constituents by LC-MS/MS analyses. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. 2016.

ARTS, I. C. W.; HOLLMAN, P. C. H. Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. **American Journal of Clinical Nutrition**. 2005.

BALBANI, A. P. S.; SILVA, D. H.; MONTOVANI, J. C. Patents of drugs extracted from Brazilian medicinal plants. **Expert opinion on therapeutic patente**. 2009.

BARATHIKANNAN, K.; VENKATADRI, B.; KHUSRO, A.; AL-DAHBI, N.; AGASTIAN, P.; ARASU, M. V.; CHOI, H. G.; KIM, Y. O. Chemical analysis of *Punica granatum* Fruit peel and its in vitro and in vivo biological properties. **BMC complementary and alternative medicine**. 2016.

BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. C. G.; PAULA, S. O.; MINIM, V. P. R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**. 2010.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**. 2006.

BASU, P.; MAIER, C. *In vitro* antioxidant activities and polyphenol contents of seven commercially available fruits. **Pharmacognosy research**. 2016

BENITES, J.; TOLEDO, H.; SALAS, F.; GUERRERO, A.; RIOS, D.; VALDERRAMA, J. A.; CALDERON, P. B. *In vitro* inhibition of *Helicobacter pylori* growth by redox cyclin phenylaminojuglones. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. 2018.

BENZIE, I. F., STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. **Analytical Biochemistry**. 1996.

BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**. Agosto de 1999.

BONI, A.; PUGLIESE, C.; CLAUDIO, C. C.; PATIN, R. V.; OLIVEIRA, F. L. C. Vitaminas antioxidantes e prevenção da arteriosclerose na infância. **Revista Paulista de Pediatria**. 2010.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. **Food, Science and Technology**. 1995.

CHATTOPADHYAY, D.; THIRUMURUGAN, K. Longevity promoting efficacies of different plant extracts in lower model organisms. **Mechanisms of Ageing and Development**. 2018.

DEUSING, D. J.; WINTER, S.; KLER, A.; KRIESL, E. BONNLÄNDER, B.; WENZEL, U.; FITZENBERGER, E. A catechin-enriched green tea extract prevents glucose-induced survival reduction in *Caenorhabditis elegans* through sir-2.1 and uba-1 dependent hormesis. **Fitoterapia**. 2015.

DEVAGI, G.; MOHANKUMAR, A.; SHANMUGAM, G.; NIVITHA, S.; DALLEMER, F.; KALAIVANI, P.; SUNDARARAJ, P.; PRABHAKARAN, R. Organoruthenium (II) complexes ameliorates oxidative stress and impedes the age associated deterioration in *Caenorhabditis elegans* through JNK-1/DAF-16 signaling. **Scientific reports**. 2018.

FEI, T.; FEI, J.; HUANG, F.; XIE, T.; XU, J.; ZHOU, Y.; YANG, P. The anti-aging and anti-oxidation effects of tea water extract in *Caenorhabditis elegans*. **Experimental Gerontology**. 2017.

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

GOMES, R. P. Fruticultura brasileira. 13ª edição. Nobel. 2007.

GONÇALVES, A. E. S. S. Avaliação da capacidade antioxidante de frutas e polpas de frutas nativas e determinação dos teores de flavonoides e vitamina C. Dissertação de mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo. 2008.

GOVAERTS, R.; SOBRAL, M.; ASHTON, P.; BARRIE, F. World checklist of Myrtaceae. 2008.

GUO, H.; DONG, Y.; YE, B. Cranberry extract supplementation exerts preventive effects through alleviating A β toxicity in *Caenorhabditis elegans* model of Alzheimer's disease. **Chinese Journal of Natural Medicines**. 2016.

HARBORNE, J. H. DEY, P. M. Methods in plants biochemistry. Volume 1: Plant phenolics. American Press, 1989;

HILLS, W. E., SWAIN. T. The phenolic constituents of *Prunus domestica*. I.—The quantitative analysis of phenolic constituents. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. 1959.

HSU, J. D.; WU, C. C.; HUNG, C. N.; WANG, C. J.; HUANG, H. P. Myrciaria cauliflora extract improves diabetic nephropathy via suppression of oxidative stress and inflammation in streptozotocin-nicotinamide mice. **Journal of Food and Drug Analysis**. 2016.

KERLEY, C. P. A review of plant-based diets to prevent and treat heart failure. **Cardiac Failure Review**. 2018

KURTYKA, R.; POKORA, W.; TUKAJ, Z.; KARCZ, W. Effects of juglone and lawsone on oxidative stress in maize coleoptile cells treated with IAA. **AOB Plants**. 2016.

MCLAUGHLIN, C.; BROIHIER, H. Keeping neurons Young and Foxy: FoxOs promotes neuronal plasticity. **Trends in genetics**. 2017

NASCIMENTO, K. S. Compostos fenólicos, capacidade antioxidante e propriedades físico-químicas de méis de *Apis mellifera* do estado do Rio Grande do Sul. Dissertação de mestrado. Faculdade de Ciências farmacêuticas. Universidade de São Paulo. São Paulo, 2016.

NETO, A. S. S. R. Glutathiona: envolvimento em defesa antioxidante, regulação de morte celular programada e detoxificação de drogas. Dissertação de mestrado. Faculdade de Ciências da Saúde. Universidade Fernando Pessoa. Porto, 2010.

NIKI, E. Oxidant-Specific Biomarkers of Oxidative Stress. Association with Atherosclerosis and Implication for Antioxidant Effects. **Free Radical Biology and Medicine**. 2018.

OMS, Global Strategy on Diet, Physical Activity and Health. Disponível em: <http://www.who.int/dietphysicalactivity/publications/releases/pr84/en/>. Acesso em: Março/2018.

PARK, S. K. Electrolyzed-reduced water increases resistance to oxidative stress, fertility, and lifespan via insulin/IGF-1-like signal in *C. elegans*. **Biological Research**. 2013.

PATEL, R.; SRIRAMOJI, S.; MARUCCI, M.; IBRAHIM, A.; SHAH, S.; SESTI, F. Cytoskeletal remodeling via Rho GTPases during oxidative and thermal stress in *Caenorhabditis elegans*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 2017.

PEIXOTO, H.; ROXO, M.; KOOLEN, H.; SILVA, F.; SILVA, E.; BRAUN, M. S.; WANG, X.; WINK, M. *Calycophyllum spruceanum* (Benth.), the Amazonian “Tree of Youth” Prolongs Longevity and Enhances Stress Resistance in *Caenorhabditis elegans*. **Molecules**. 2018.

PEREIRA, M. Propagação via estacas apicais, caracterização morfológica e molecular de jabuticabeiras (*Myrciaria* spp). Tese de doutorado. Universidade de Sao Paulo, 2003.

PRASANTH, M. I.; SANTOSHRAM, G. S.; BHASKAR, J. P.; BALAMURUGAN, K. Ultraviolet-A triggers photoaging in model nematode *Caenorhabditis elegans* in a DAF-16 dependent pathway. **Age (Dordr)**. 2016.

ROHN, I.; MARSCHALL, T. A.; KROEPFL, N.; JENSEN, K. B.; ASCHNER, M.; TUCK, S.; KUEHNELT, D.; SCHWERDTLE, T.; BORNHORST, J. Selenium species-dependent toxicity, bioavailability and metabolic transformations in *Caenorhabditis elegans*. **Metalomics**. 2018.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURACALIXTO, F.; MANCINI-FILHO, J. Bioactive compounds and antioxidant capacities of eighteen non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**. 2010.

RUSZKIEWICZ, J. A.; PINKAS, A.; MIAH, M. R.; WEITZ, R. L.; LAWES, M. J. A.; AKINYEMI, A. J.; IJOMONE, O. M.; ASCHNER, M. C. *C. elegans* as a model in developmental neurotoxicology. **Toxicology and Applied Pharmacology**. 2018.

SANTOS, D. T.; MEIRELES, M. A. A. Jabuticaba as a source of functional pigments. **Pharmacognosy Reviews**. 2009.

SEBRAE, Mercado de fruticultura, panorama do setor no Brasil, Brasília: Sebrae, 2015. Disponível em: www.sebrae.com.br, acesso em: Março/2018

SENCHEUK, M. M.; DUES, D. J.; SCHAAR, E.; JOHNSON, B. K.; MADAJ, Z. B.; BOWMAN, M. J.; WINN, M. E.; RAAMSDONK, J. M. V. Activation of DAF-16/FOXO by reactive oxygen species contributes to longevity in long-lived mitochondrial mutants in *Caenorhabditis elegans*. **Plos One**. 2017.

SILVA, R. M.; PEREIRA, L. D.; VÉRAS, J. H.; VALE, C. R.; CHEN-CHEN, L.; SANTOS, S. D. Protective effect and induction of DNA repair by *Myrciaria cauliflora* seed extract and pedunculagin on cyclophosphamide-induced genotoxicity. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**. 2016.

SILVEIRA, F. T.; ORTOLANI, F. A.; MATAQUEIRO, M. F.; MORO, J. R. Caracterização citogenética em duas espécies do gênero *Myrciaria*. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**. 2006.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSSMAN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6ª edição. UFSC, 2010.

SONG, M.; SONG, K.; KIM, S.; LEE, J.; HWANG, S.; HAN, C. *Caenorhabditis elegans* BRICHOS Domain-Containing Protein C09F5.1 Maintains Thermotolerance and Decreases Cytotoxicity of A β ₄₂ by Activating the UPR. **Genes**. 2018.

SOUSA, C. M. M.; SILVA, H. R.; VIEIRA, G. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**. 2007.

SOUZA, C. G.; ANDRADE, D. M. L.; JORDÃO, J. B. R.; ÁVILA, R. I.; BORGES, L. L.; VAZ, B. G.; VALADARES, M. C.; GIL, E. S.; CONCEIÇÃO, E. C.; ROCHA, M. L. Radical scavenger capacity of Jabuticaba fruit (*Myrciaria cauliflora*) and its biological effects in hypertensive rats. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. 2017.

SUN, X.; CHEN, W. D.; WANG, Y. D.; DAF-16/FOXO transcription factor in aging and longevity. **Frontiers in Pharmacology**. 2017.

VALCHEVA-KUSMANOVA, S.; KUZMANOV, A.; KUZMANOVA, V.; TZANEVA, A. *Aronia melanocarpa* fruit juice ameliorates the symptoms of inflammatory bowel disease in TNBS-induced colitis in rats. **Food and chemical toxicology**. 2018.

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

VICTAL, J. C.; VALÉRIO, L. B.; OSHIRO, M. C.; BAPTISTA, S. C.; PINHEIRO, F. Métodos alternativos *in vitro* e *in silico*: métodos auxiliares e substitutivos à experimentação animal. **RevInter**. 2014.

WEI-LI, S.; HOW, C. M.; LIAO, V. H. C.; Prolonged exposure of di(2-ethylhexyl) phthalates induces multigenerational toxic effects in *Caenorhabditis elegans*. **Science of the Total Environment**. 2018.

WU, H.; LUO, T.; LI, Y. M.; GAO, Z. P.; ZHANG, K. Q.; SONG, J. Y.; XIAO, J. S.; CAO, Y. P. Granny smith apple procyanidin extract upregulates tight junction protein expression and modulates oxidative stress and inflammation in lipopolysaccharide-induced Caco-2 cells. **Food & Function**. 2018.

WU, S.; LONG, C.; KENNELLY, E. J. Phytochemistry and health benefits of jaboricaba, an emerging fruit crop from Brazil. **Food Research International**. 2013.

XIE, Q.; ZHAO, H.; LI, N.; SU, L.; XU, X.; HONG, Z. Protective effects of Timosaponin BII on oxidative stress damage in PC12 cells based on metabolomic. **Biomedical Chromatography**. 2018.

YAN, F.; CHEN, Y.; AZAT, R.; ZHENG, X. Mulberry anthocyanin extract ameliorates oxidative damage in HepG2 cells and prolongs the lifespan of *Caenorhabditis elegans* through MAPK and Nrf2 pathways. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. 2017.

YAN, F.; CHEN, Y.; AZAT, R.; ZHENG, X. Protective effect of mulberry fruit anthocyanin on human hepatocyte cells (LO2) and *Caenorhabditis elegans* under hyperglycemic conditions. **Food Research International**. 2017.

ZHAO, X.; LU, L.; QI, Y.; LI, M.; ZHOU, L. Emodin extends lifespan of *Caenorhabditis elegans* through insulin/IGF-1 signaling pathway depending on DAF-16 and SIR-2.1. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**. 2017.

ZHI, D.; WANG, D.; YANG, W.; DUAN, Z.; ZHU, S.; DONG, J.; WANG, N.; WANG, N.; FEI, D.; ZHANG, Z.; WANG, X.; WANG, M.; LI, H. Dianxianning improved amyloid β -induced pathological characteristics partially through DAF-2/DAF-16 insulin like pathway in transgenic *C. elegans*. **Scientific Reports**. 2017.