

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA

CRISTIANE DE FREITAS RODRIGUES

**AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DA EXPOSIÇÃO CRÔNICA DO EXTRATO DE GOJI
BERRY (*LYCIUM BARBARUM*) EM *CAENORHABDITIS ELEGANS***

Uruguiana

2023

CRISTIANE DE FREITAS RODRIGUES

**AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DA EXPOSIÇÃO CRÔNICA DO EXTRATO DE GOJI
BERRY (*LYCIUM BARBARUM*) EM *CAENORHABDITIS ELEGANS***

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Licenciatura
Ciências da Natureza da Universidade
Federal do Pampa, como requisito parcial
para obtenção do Título de Licenciada em
Ciências da Natureza.

Orientador: Prof. Dr^a. Cristiane
Casagrande Denardin

**Uruguaiana
2023**

Ficha catalográfica elaborada automaticamente com os dados fornecidos pelo(a)
autor(a) através do Módulo de Biblioteca do
Sistema GURI (Gestão Unificada de Recursos Institucionais) .

R696a Rodrigues, Cristiane

AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DA EXPOSIÇÃO CRÔNICA DO EXTRATO DE
GOJI BERRY (LYCIUM BARBARUM) EM CAENORHABDITIS ELEGANS /
Cristiane Rodrigues.

50 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) -- Universidade
Federal do Pampa, CIÊNCIAS DA NATUREZA, 2023.

"Orientação: Cristiane Denardin".

1. Goji berry. 3. suplemento. 5. dose-resposta. I. Título.

CRISTIANE DE FREITAS RODRIGUES

**AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DA EXPOSIÇÃO CRÔNICA DO EXTRATO DE GOJI
BERRY (*LYCIUM BARBARUM*) EM *CAENORHABDITIS ELEGANS***

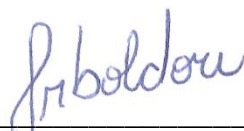
Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso Licenciatura em
Ciência da Natureza da Universidade
Federal do Pampa, como requisito parcial
para obtenção do Título de Licenciado em
Ciências da Natureza

Trabalho de Conclusão de Curso defendido e aprovado em: 10, fevereiro e 2023.

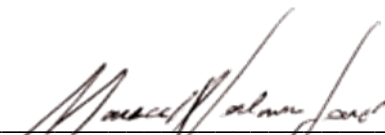
Banca examinadora:



Prof. Dra. Cristiane Casagrande Denardin (Nome do Orientador)
Orientador
(UNIPAMPA)



Ms. Jean Ramos Boldori
(UNIPAMPA)



Ms. Marcell Valandro Soares
(UFSM)

Dedico este trabalho a Deus, minha mãe (Glacir), aos meus filhos (Rafaela e Rômulo) e meu marido (Ronimar).

AGRADECIMENTO

Agradeço a todos que de alguma forma possibilitaram a finalização desta etapa. Primeiramente, agradeço a Deus por me fortalecer e me ensinar o verdadeiro significado da palavra resiliência.

A minha família, por todo apoio e acreditarem na educação. Em especial, aos meus filhos, os verdadeiros motivos, nos quais busco a cada dia ser uma pessoa melhor.

Ao meu eterno grupo de pesquisa, GBToxBio, pelo acolhimento e aprendizado durante todos estes anos, em especial a minha orientadora Cristiane Denardin, e aos queridos colegas do grupo Andrea Tambara, Jean Boldori, Emannuele Correa, Felix Munieweg. Estarei sempre torcendo por vocês!

Aos amigos que a universidade trouxe para minha vida, Liliana Moraes, Ana Helena Dal Forno, Marcell Valandro, Willian Salgueiro, Matheus Bianchini, Daiandra Fagundez. E aos demais, colegas do curso de ciências da natureza, Anne Savall, Murilo Carriço, Daisy Nunes e tantos outros, os quais tive a oportunidade de conviver e apreender, muito obrigada!

Também agradeço a todos os professores do curso Ciências da Naturezas, que proporcionaram momentos de dinâmicas, práticas e planejamentos, tanto em sala de aula como em estágios, residência pedagógica e outras vivências nas escolas. Visando melhorar aprendizado, didática e prática docente, e principalmente obter experiências no âmbito escolar.

Por fim, agradeço a UNIPAMPA por poder me proporcionar tamanho aprendizado, e agradeço aos órgãos de aporte financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

Muito obrigada!

“Se

Que hay en tus ojos con solo mirar

Que estás cansado de andar y de andar...

Que las ventanas se pueden abrir

Cambiar el aire depende de ti

Te ayudará, vale la pena una vez más..

Que lo imposible se puede lograr

Y así será, la vida cambia y cambiará”.

Diego Torres – Color Esperanza

RESUMO

Atualmente, as pessoas fazem uso de suplementos alimentares para auxiliar à saúde. Por outro lado, não se sabe ao certo quais os efeitos do uso de suplementos em longo prazo, e a possibilidade de se acumular em outra região, além da esperada. Sendo assim, são necessários estudos para avaliar as ações dos suplementos em longo prazo, detalhando sua dose-resposta em relação as ações pró oxidantes/toxicológicas. Entre os diversos suplementos consumidos, o Goji berry (Gb) vem destacando-se, por seus compostos bioativos, como polifenóis e polissacarídeos, mas principalmente por ações antioxidantes e possíveis modulações lipídicas. Entretanto, se desconhece a dose-resposta do uso do Gb, em relação a sua dose baixa para efeito antioxidante e dose alta para efeito pro-oxidante/toxicológico. Além de não estar elucidado como o suplemento se comporta em longo prazo. Neste contexto, o trabalho tem como objetivo avaliar a relação dose-resposta frente uma exposição prolongada ao extrato de Goji berry (GBE) em *Caenorhabditis elegans*. A fruta Gb em formato de baga, foi adquirida no comércio local, realizando-se uma extração hidroalcolica para as devidas análises. Para fins de padronização das concentrações, os cálculos foram baseados no teor de compostos fenólicos totais (método de *Folin-Ciocalteu* - μg equivalente de ácido gálico/ μL - μg GAE/ μL). Para os ensaios biológicos foram utilizados cerca de 3000 vermes (L1), os quais foram expostos utilizando diferentes concentrações de 0.025, 0.1, 0.5, 1.5, 2 μg GAE/ μL GBE, por 48 horas. Primeiramente, obteve-se uma curva dose-resposta para selecionar as concentrações a serem utilizadas. Conforme foram realizados os experimentos, conseguiu-se observar que as concentrações maiores de 1.5 e 2 μg GAE/ μL , apresentam alto grau de toxicidade, bem como o aumento na geração de espécies reativas e aumento da peroxidação lipídica, promovendo um desequilíbrio nas defesas antioxidantes, prejudicando assim o tempo de vida do verme. De tal modo, o dano oxidativo também influenciou os parâmetros comportamentais, *omega turn*, *reversal* e *swimming*. Sugerindo assim, que a exposição prolongada ao GBE nos vermes, nas concentrações testadas, poderia estar afetando nas vias de sinalização motoras, desencadeando alterações disfuncional devido ao aumento das espécies reativas.

Palavras-Chave: Goji berry, suplemento, dose-resposta, comportamento

ABSTRACT

Nowadays, people make use of food supplements to support their health. On the other hand, it is not known for sure what the effects of long-term use of supplements are, and the possibility of accumulation in another region, beyond what is expected. Therefore, studies are needed to evaluate the long-term actions of supplements, detailing their dose response in relation to pro-oxidant/toxicological activities. Among the various supplements consumed, Goji berry (Gb) has stood out for its bioactive compounds, such as polyphenols and polysaccharides, but mainly for antioxidant actions and possible lipid modulations. However, the dose-response of Gb use is unknown in relation to its low dose for antioxidant effect and high dose for pro-oxidant/toxicological effect. Besides not being elucidated how the supplement behaves in the long term. In this context, the study aims to evaluate the dose-response relationship against prolonged exposure to Goji berry extract (GBE) in *Caenorhabditis elegans*. The Gb fruit in the form of a berry was purchased in the local market, and a hydroalcoholic extraction was carried out for the necessary analyses. To standardizing concentrations, calculations were based on the content of total phenolic compounds (*Folin-Ciocalteu* method - μg gallic acid equivalent/ μL - μg GAE/ μL). For the biological tests, approximately 3000 worms (L1) were used, which were exposed to different concentrations of 0.025, 0.1, 0.5, 1.5, 2 μg GAE/ μL GBE, for 48 hours. First, a dose-response curve was obtained to select the concentrations to be used. As the experiments were carried out, it was observed that concentrations greater than 1.5 and 2 μg GAE/ μL present a high degree of toxicity, as well as an increase in the generation of reactive species and an increase in lipid peroxidation, promoting an imbalance in the antioxidant activity defenses, thus harming the life of the worm. Thus, oxidative damage also influenced behavioral parameters, omega turn, reversal and swimming. Thus, suggesting that prolonged exposure to GBE on the reverse side, at the concentrations tested, could be affecting motor signaling pathways, triggering dysfunctional changes due to the increase in reactive species.

Keywords: Goji berry, supplement, dose-response, behavior

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

| | |
|--|----|
| Figura 1 – Imagem do <i>Lycium barbarum</i> | 17 |
| Figura 2 – Estrutura química dos polissacarídeos do <i>L. barbarum</i> | 18 |
| Figura 3 – <i>Caenorhabditis elegans</i> | 22 |
| Figura 4 – Identificação de larvas de <i>C. elegans</i> em uma população mista | 22 |
| Figura 5 – Ciclo dos <i>C. elegans</i> | 23 |

Artigo Científico

| | |
|---|----|
| FIGURA 1 – Análises na sobrevivência, postura de ovos, <i>lifespan</i> e bombeamento faríngeo nos <i>C. elegans</i> | 40 |
| FIGURA 2 – Efeitos do GBE frente ao estresse oxidativo em <i>C. elegans</i> | 41 |
| FIGURA 3 – Efeitos da GBE no comportamento nos <i>C. elegans</i> | 42 |
| FIGURA 4 – Efeitos do GBE no ensaio <i>swimming</i> e locomoção em <i>C. elegans</i> | 43 |

LISTA DE ABREVIATURAS

cap. – capítulo

coord. – coordinador

Gb – Goji berry

GBE – extrato Goji berry

n. – número

p. – página

v. – volume

LISTA DE SIGLAS

ANOVA: Análise de Variância

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CGC: Caenorhabditis Genetics Center

DCF: Dichlorofluorescein

DCF-DA: Dichlorofluorescein Diacetate

DPPH - Método do Sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil

DL50- Quantidade de uma determinada substância que é necessária para provocar a morte a pelo menos 50% da população

EFSA - Autoridade Europeia de Segurança Alimentar

ERO - Espécies reativas de oxigênio

FDA - *Food and Drugs Administration*

FRAP - Poder Antioxidante de Redução do Ferro

GFP - Proteína verde fluorescente

H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio

NGM: Nematode Growth Media

ORAC - Capacidade De Absorção Dos Radicais Oxigenados

TEAC - Capacidade Antioxidante Equivalente de Trolox

UNIPAMPA - Universidade Federal do Pampa

SUMÁRIO

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO..... | 14 |
| 2 | REVISÃO DE LITERATURA..... | 15 |
| 2.1 | Suplementos alimentares..... | 15 |
| 2.2 | Goji berry | 16 |
| 2.3 | Dose-respostas dos antioxidantes | 21 |
| 2.4 | <i>Caenorhabditis elegans</i> | 22 |
| 3 | JUSTIFICATIVA | 24 |
| 4 | OBJETIVOS | 25 |
| 4.1 | Objetivo geral..... | 25 |
| 4.2 | Objetivos específicos | 25 |
| 5 | ARTIGO CIENTÍFICO | 26 |
| 6 | CONSIDERAÇÕES FINAIS | 44 |
| 7 | REFERÊNCIAS..... | 45 |

1. INTRODUÇÃO

Nos Estados Unidos desde 1994 existe uma lei, relacionada a Saúde e Educação de Suplementos Alimentares, que regulamenta todos os produtos consumidos considerados suplementos alimentares, tendo como um órgão fiscalizador a *Food and Drugs Administration* (FDA). A FDA tem como finalidade proteger a saúde pública, por meio de normas aplicadas nas indústrias farmacêutica, alimentícia, veterinária e cosmética, garantindo assim, a segurabilidade dos alimentos e produtos para a população. No Brasil, existe uma agência equivalente a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Em 2018, a Anvisa criou uma categoria para os suplementos alimentares, considerados não medicamentosos e com propriedades benéficas (ANVISA, 2023).

No Brasil, existem diversos suplementos comercializados, que contêm substâncias bioativas, nutrientes, probióticos e muitas outras biomoléculas existentes, entre eles está o Goji berry (Gb). Gb é uma fruta em formato de baga, com nome científico, *Lycium barbarum*, proveniente de arbustos encontrado na Ásia (MA *et al.*, 2019). Estas pequenas bagas ganharam apreço comercial por suas ações antioxidantes e possíveis reduções lipídicas, o qual auxilia na prevenção de algumas patologias, como diabetes, hiperlipidemias, neoplasias, hepatites, baixa imunidade, trombose e infertilidade masculina (POTTERAT, 2010; SHAN *et al.*, 2010).

Entretanto, existem poucas publicações que contemplem as consequências da utilização de suplementos em longo prazo e quais os possíveis efeitos toxicológicos. Do mesmo modo, pouco se sabe sobre a dose-resposta, que proporciona a atuação dos efeitos benéficos ou os efeitos toxicológicos. Além do mais, muitos fitoquímicos presentes nos suplementos, pode produzir uma resposta hormética bifásica nas funções fisiológicas, nas quais os efeitos benéficos são observados em baixas doses, enquanto os efeitos prejudiciais são produzidos em altas doses (MARTEL, J., *et al.*, 2019). Da mesma forma, que alguns destes suplementos podem atuar ativando vias metabólicas nas células nervosas, possibilitando desencadear alterações, como disfunção mitocondrial, modificação epigenética e neuro inflamação (MAO *et al.*, 2021).

Por isso, deve-se ter cuidado ao se suplementar com quaisquer produtos considerados “naturais”, pois, por mais que tenham ações antioxidantes, sua ingesta ex-

cessiva ou errônea em longo prazo pode promover efeitos tóxicos. Assim, este trabalho tem como objetivo avaliar aspectos comportamentais frente a exposição prolongado ao GBE, utilizando como modelo experimental *Caenorhabditis elegans*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Suplementos alimentares

Na antiguidade, atletas e soldados consumiam partes específicas de animais, com intuito de ter mais bravura, habilidade, velocidade ou força (APPLEGATE; GRIVETTI, 1997). Foi na Idade Moderna, que a nomenclatura suplementos alimentares passou a ser mais utilizadas, com intuito de prevenir e/ou reduzir sinais clínicos, melhorando a saúde e o bem-estar em geral, bem como associados ao aumento da expectativa de vida (KIM *et al.*, 1993).

De acordo com FDA, os benefícios dos suplementos alimentares devem ultrapassar a nutrição básica, pois contém compostos bioativos concentrados, os quais irão agir a favor da saúde (NOONAN & NOONAN, 2004). Segundo ANVISA (2010), são considerados suplementos alimentares todos produtos de ingestão oral, que fornecem nutrientes complementares a alimentação, não atuando como medicamentos e como tal não podem exercer ação farmacológica, imunológica ou metabólica (BRASIL, 2019). Sendo destinado a corrigir deficiências nutricionais, manter uma ingestão adequada de determinados nutrientes e/ou apoiar funções fisiológicas específicas (KWAK & JUKES, 2001).

Do mesmo modo, Roberfroid (2002), caracteriza os alimentos funcionais das seguintes formas: devem ser alimentos convencionais e serem consumidos na dieta normal/usual;

- ✓ Devem ser compostos por componentes naturais, algumas vezes, em elevada concentração ou presentes em alimentos que normalmente não os supririam;
- ✓ Devem ter efeitos positivos além do valor básico nutritivo, que pode aumentar o bem-estar e a saúde e/ou reduzir o risco de ocorrência de doenças, promovendo benefícios à saúde, além de aumentar a qualidade de vida, incluindo os desempenhos físico, psicológico e comportamental;
- ✓ A alegação da propriedade funcional deve ter embasamento científico;

- ✓ Pode ser um alimento natural ou um alimento no qual um componente tenha sido removido;
- ✓ Pode ser um alimento em que a natureza de um ou mais componentes tenha sido modificada;

Os suplementos alimentares são fontes concentradas de nutrientes (minerais e vitaminas) ou outras substâncias com efeito nutricional e/ou fisiológico que são comercializados na forma de dose, por meio de pílulas, comprimidos, cápsulas e líquidos (RADHIKA; SINGH; SIVAKUMAR, 2011). Desta forma, para maior regulamentação técnica de ingestão recomendada, a ANVISA também regulamenta a quantidade de suplementos que podem ser consumidos durante um dia, ingestão diária recomendada – IDR, de acordo com a faixa etária e o tipo de mineral e/ou vitamina a ser suplementada (BRASIL, 1998).

Em vista disso, inúmeros suplementos estão adentrando ao mercado com diversos atributos benéficos, principalmente, por suas propriedades químicas e funcionais exclusivas contendo polifenóis. Estimulando assim, a suplementação destes produtos naturais, como é o caso do Goji berry (KWAK & JUKES, 2001; WANG *et al.*, 2022).

2.2 Goji Berry

Lycium barbarum L. (*L. barbarum*) pode ser chamado de diferentes maneiras, framboesa, Fructus lycii, Gouqizi, Goji berry e wolferry (BRYAN *et al.*, 2008). Esta fruta pertence à família de plantas *Solanaceae*, nasce de um arbusto solanáceo desfolhado que cresce na China, Tibete e outras partes da Ásia. Por ser amplamente cultivado na região de Ningxia, ao longo das planícies férteis no Huang Ho, o chá de suas folhas passou a ser muito consumido em países asiáticos (CHANG; SO, 2008). As frutas são consumidas como suplementos alimentares a mais de 2.000 anos, inseridas em chás e sopas. Além disso, as frutas maduras são transformadas em produtos como sucos, *drinks*, cereais, cereais matinais, biscoitos, carnes e *in natura* (BRYAN *et al.*, 2008; POTTERAT, 2010; VIDOVIĆ *et al.*, 2022).

Em 1753 o sueco Carolus Linnaeus foi o pioneiro em descrever botanicamente o Goji berry, após 15 anos Philip Miller terminou a descrição dos diferentes tipos de espécies da planta *Lycium* (DHARMANANDA, 2007). A espécie *Lycium Barbarum* L.

provém de um arbusto espinhoso de raiz seca, com crescimento até 3m de altura e com folhas verde-acinzentadas. Ela contém um fruto pequeno de 1 a 2 cm de comprimento, em formato de bagas elipsoides, com coloração laranja-avermelhadas brilhantes de sabor adocicado (Fig.1) (AMAGASE; FARNSWORTH, 2011).



Figura 1: Imagem do *Lycium barbarum* (AMAGASE; FARNSWORTH, 2011)

A partir de 1983 o Ministério da Saúde Pública da China aprovou a comercialização das frutas *Lycium Barbarum*, como parte da botânica medicinal, enfatizando principais nutrientes e com uma aceitabilidade no paladar, servindo em preparos de várias bebidas leves ou alcoólicas e seus extratos concentrados em infusões preparadas a partir das bagas (AMAGASE; FARNSWORTH, 2011).

Em relação aos seus constituintes químicos, Goji berry tem uma grande variedade de efeitos biológicos mostrados em vários estudos *in vitro* e *in vivo*, seus nutrientes como os polissacarídeos, flavonoides, carotenoides, glicolípídios, glicopeptídeos, antocianinas, óleos essenciais, ácidos orgânicos e oligoelementos são responsáveis por ações benéficas ao organismo (AMAGASE; SUN; BOREK, 2009, LUI *et al.*, 2016, MENG *et al.*, 2017).

Estima-se que nos frutos secos de Goji berry são encontrados cerca de 5 a 8% de polissacarídeos (WANG; CHEN; ZHANG, 1991). Além de conter monossacarídeos como compostos majoritários, entre eles a glicose, arabinose, manose, xilose, ramnose, fucose, ácido galacturônico e ácido glucurônico (Fig.2) (ZENG *et al.*, 2019). Também foram descobertos na fruta *L. barbarum* glicopéptidos, heteropolissacarídeos

e polipéptidos ácidos ou protéicos (JIAPAER *et al.*, 2013).

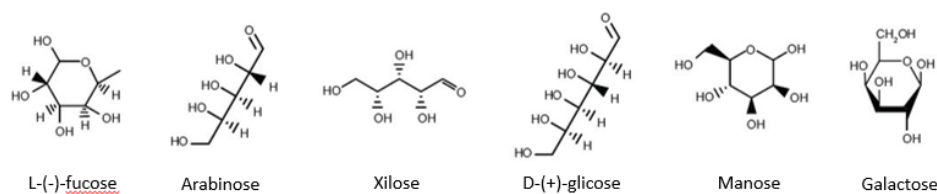


Figura 2: Estrutura química dos polissacarídeos do *L.barbarum* (ZENG *et al.*, 2019).

Além dos carboidratos, o Goji berry também possui outros nutrientes como aminoácidos (alanina, cistina, betaína e o ácido aspártico), ácidos graxos (ácido palmítico, ácido linoléico e ácido mirístico) e outros como cerebrosídeo (esfingolípido) e beta-sitosterol (fitoesterol) (JIANG *et al.*, 2021).

A fruta também é rica em carotenoides, incluindo betacaroteno, luteína, zeaxantina e criptoxantina e contém diversos flavonoides, ácido ascórbico (73 mg por 100 g da fruta desidratada), vitaminas do complexo B (B1, B2 e B3), minerais (ferro, cálcio e magnésio) e outros metabólicos secundários como a cumarina, uma lactona (ZENG *et al.*, 2019; JIANG *et al.*, 2021).

Com tamanha variedade de compostos bioativos, Amagase e Farnsworth (2011), ainda relata que a fruta Goji berry também apresenta outras pequenas moléculas, como betaína, cerebrosídeo, beta-sitosterol, ácido p-cumárico, glutamina, asparagina, entre outras várias vitaminas.

Além do mais, já foram quantificados ácidos fenólicos e flavonóides na fruta *L. barbarum*, sendo identificados ao todo 37 compostos. Dentre os 15 compostos identificados a quercetina-rhamno-di-hexosídeo esteve presente na maior fração de massa (438,6µg/g), quercetina-3-O-rutinosídeo (281,3µg/g), isômeros do ácido dicafeoilquínico (250,1µg/g), ácido clorogênico (237,0µg/g), quercetina-di- (rhamnohexoside) (117,5µg/g), quercetina-di-(rhamno)-hexosido (116,8µg/g), kaempferol-3-O-rutinosídeo (97,7µg/g), isorannetina-3-O-rutinosídeo (72,1µg/g), ácido p-cumárico (64,0µg/g), ácido caféico (23,7µg/g) e ácido vanílico (22,8µg/g) (INBARAJ, LU, KAO, & CHEN, 2010).

Devido a coloração laranja-avermelhada, percebe-se que esta fruta apresenta diferentes carotenóides em sua composição, com apenas 0,03–0,5% dos frutos seco, contendo total de 11 carotenóides livres e 7 ésteres de carotenóides (PENG *et al.*,

2005). Desta forma, o carotenóide predominante é a zeaxantina, um pigmento amarelo, um isômero da luteína e um derivado do β -caroteno (CHENG *et al.*, 2005). Com esta variedade de compostos bioativos e nutrientes presentes na fruta Goji berry, foi considerado um superalimento (AMAGASE; FARNSWORTH, 2011).

De tal modo, que os nutrientes encontrados no Goji berry apresentam propriedades antioxidantes possibilitando acentuar e melhorar ações biológicas no corpo e por meio de seu consumo contribuir para o bem-estar (CHAUDAHARI, 1999). Sua atividade antioxidante foi analisada por ensaios *in vitro* da fruta seca do Goji berry pelos métodos de solução aquosa de metanol (extração de ultrassom), etanol (80%) e extração aquosa por ultrassom. Observando, o potencial antioxidante *in vitro*, tais como ORAC (Capacidade De Absorção Dos Radicais Oxigenados), TEAC (Capacidade Antioxidante Equivalente de Trolox), FRAP (Poder Antioxidante de Redução do Ferro) e DPPH (Método do Sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (JIANG *et al.*, 2021). Esses excelentes potenciais antioxidantes estão associados a quantidade relativamente alta de compostos fenólicos totais e flavonoides, o que propõem uma alta atividade antioxidante do Goji berry, para combater e/ou controlar radicais livres, ânion superóxido e radicais hidroxila (KULCZYŃSKI; GRAMZA-MICHAŁOWSKA, 2015).

Lako e colaboradores (2007) relataram que os antioxidantes presentes no fruto *Lycium Barbarum* possuem efeitos protetores à saúde, possibilitando combater danos decorrentes do estresse oxidativo. Da mesma forma, que o estudo com extrato dos polissacarídeos do Goji berry, apresenta ações antioxidantes capazes de atuarem como neuroprotetores, anti-fadiga/resistência, aumentar o metabolismo energético e controlar o índice glicêmico (LUO *et al.*, 2004).

Outro estudo destacou que as propriedades antioxidantes que contém no Goji berry possibilita combater células tumorais, atuando via imunomodulação, citoproteção e na redução do envelhecimento. Assim, ganhando fama como um “superalimento” decorrente a esta gama de informações atreladas as ações antioxidantes do fruto Goji berry (AMAGASE; SUN; BOREK, 2009).

Por outro lado, apesar dos avanços já conquistados, existem poucos estudos relacionados a ensaios de toxicidade aguda e de doses respostas, genotoxicidade. Contemplando uma avaliação toxicológica de fitoterápicos de uso tópico, em prol de

verificar danos subsequentes (OUEDRAOGO *et al*, 2016). Nesse contexto, Dharmnanda (2007) averiguou que a fruta *Lycium barbarum* não possui propriedades tóxicas suficientes para causar danos graves, já que vem sendo utilizada tradicionalmente como alimento e fitoterapia há mais de 2500 anos. Contudo, o consumo elevado de suplementos alimentares e os efeitos relacionados ainda não são bem definidos (SOBAL; MARQUART, 1994).

A maior parte dos ensaios clínicos direciona uma administração de curto prazo e muitas vezes com o nutriente isolado, os quais, nessas condições, não evidencia lesões toxicológicas significativas aos tecidos examinados (AMAGASE, 2008).

Estudos que avaliam os possíveis efeitos adversos ou toxicológicos do Goji Berry são escassos, mas já existem relatos clínicos e alguns estudos demonstrando que o Goji Berry pode interagir com fármacos usados na coagulação do sangue, tal como a varfarina. Esse relato de caso fornece evidências adicionais para a interação entre *Lycium barbarum* e varfarina e da importância da rotulagem do *Lycium barbarum* com um aviso sobre o uso simultâneo com varfarina (RIVERA *et al.*, 2012).

Outro relato de caso, ocorreu com uma mulher de 60 anos, que foi internada no hospital por causa de astenia, artralgias, diarreia não sanguinolenta e, cólica e dor abdominal. A paciente apresentou icterícia mucocutânea leve e erupção cutânea maculopapular eritematosa e pruriginosa generalizada, após ter consumido uma quantidade de chá com bagas de *L. barbarum* (Goji), três vezes ao dia, nos últimos dez dias (ARROYO-MARTINEZ, *et al.*, 2011).

O primeiro caso de fotossensibilidade sistêmica ocorreu devido às bagas de Goji, relatado por um homem de 53 anos, o qual havia consumido por 5 meses Goji Berry, em conjunto com outro composto (“unha-de-gato”), causando a uma erupção pruriginosa localizada (GÓMEZ-BERNAL *et al.*, 2011). Do mesmo modo que Ballarín e colaboradores (2011) descreveram dois casos de pacientes que apresentaram sintomas alérgicos após o consumo das bagas de *Lycium barbarum*, acompanhado por urticária generalizada aguda nas mãos, palmas e lábios, edema, dispneia e rinite aguda.

Recentemente, foi avaliado o efeito do suco do Goji berry em longo tempo em *C. elegans*, os quais foram expostos de L1 até L4. Nossos resultados contribuíram para avaliar os efeitos pró-oxidantes/toxicológicos que o suco proporcionou, devido ao aumento de espécies reativas, as quais desequilibraram as defesas antioxidantes,

promovendo um envelhecimento precoce e um aumento no número de corpos apoptóticos. Logo, nosso estudo pode-se servir de alerta pelo efeito pela ingestão elevado do suco do Goji berry (RODRIGUES *et al.*, 2021).

2.3. Dose-respostas dos antioxidantes

Muitos alimentos fisiologicamente funcionais ricos em polifenóis, vem sendo estudadas por seus principais mecanismos de ação responsáveis por seus efeitos benéficos, entretanto, alguns estudos, já elencam as altas concentrações com efeitos toxicológicos, presumivelmente devido a propriedades pró-oxidativas. Espécies reativas de oxigênio (ROS) têm demonstrado desempenhar vários papéis em condições fisiológicas e patológicas via modificação oxidativa de biomoléculas presentes em células e tecidos. O acúmulo de pegadas de dano oxidativo nessas moléculas biológicas foi descrito como envolvido no aparecimento de inúmeras doenças e envelhecimento (MURAKAMI, 2014).

Segundo Rattan (2008), os mecanismos moleculares detalhados que provocam os efeitos horméticos estão sendo cada vez mais compreendidos e compreendem uma cascata de resposta ao estresse e outras vias de manutenção e reparo. Embora a extensão dos efeitos horméticos imediatos após a exposição a um determinado estresse possa ser apenas moderada, a cadeia de eventos após a hormese inicial leva a efeitos biologicamente amplificados que são muito maiores, sinérgicos e pleiotrópicos. Muitas vezes, levam à perda ou ganho indesejado de suas funções para perturbação da homeostase, tais como modificações bioquímicas do DNA celular e proteínas por ROS e produtos de peroxidação lipídica, como acroleína, malonaldeído e 4-hidroxi-2-nonenal (MURAKAMI, 2014).

Da mesma forma, que o fenômeno relação dose-resposta, muitas vezes está atrelado ao efeito hormético de produtos fitoquímicos. Caracterizando pela estimulação de baixa dose e inibição de alta dose, sendo independente do agente químico/físico, modelo biológico e ponto final medido (CALABRESE; BALDWIN; 2003). Muitas vitaminas e minerais são essenciais para a vida em doses baixas, mas tóxicos em doses mais altas. Da mesma forma, exercícios, restrição calórica e consumo de álcool são exemplos de processos prejudiciais ao extremo, mas benéficos com moderação. Deste modo, os testes toxicológicos com altas doses favorece a demonstração dose-respostas, as quais sugere que qualquer composto químico pode

apresentar efeitos prejudiciais dependendo da quantidade (BUKOWSKI; LEWIS, 2000)

3.1 *Caenorhabditis elegans*

Caenorhabditis elegans é um minúsculo nematóide de vida livre, larvas recém eclodidas têm 0,25 milímetros de comprimento e adultos têm 1 em torno de milímetro de comprimento. Além disso, possui um corpo translúcido, o que possibilita a visualização microscópica de células específicas e estrutura subcelular (Figura 3) (CORSI; WIGHTMAN; CHALFIE, 2015). De acordo Brenner (1974), o modelo animal apresenta muitas vantagens, citando a facilidade de manipulação, isolamento, mapeamento genético, construção de vermes mutantes, além de apresentar comportamentos e morfologia já elucidados e caracterizados.



Figura 3 - *Caenorhabditis elegans* (BRENNER, 1974)

Esse nematóide de fácil manipulação e rápida reprodutibilidade, apresenta curto ciclo de vida (Figura 4) (CHALFIE *et al.* 1994). O *C.elegans* também possui uma alta variabilidade genética e ampla variedade de processos biológicos, incluindo apoptoses, sinalização celular, ciclo celular, polaridade celular, regulação de genes, metabolismo e envelhecimento (KALETTA; HENGARTNER, 2006).

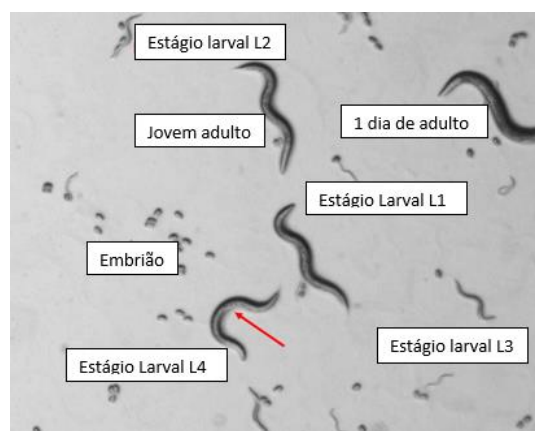


Figura 4 - Identificação de larvas de *C.elegans* em uma população mista (RIECKHER; TAVERNARAKIS, 2018).

Com relação ao seu desenvolvimento os nematóides passam por quatro estágios larvais (L1, L2, L3, L4), antes de atingir a idade adulta (Figura 5). No primeiro estágio larval L1, caso não haja fonte de alimento disponível, os vermes entram num estágio larval denominado “dauer”, uma alternativa eficaz de sobrevivência (CORSI; WIGHTMAN; CHALFIE, 2015). Com isso, esses dauers podem sobreviver a condições extremas, sendo dessecação ou falta de comida por longos períodos, retornando a normalidade até que as condições melhorem e comida esteja disponível (SOMMER, 2005).

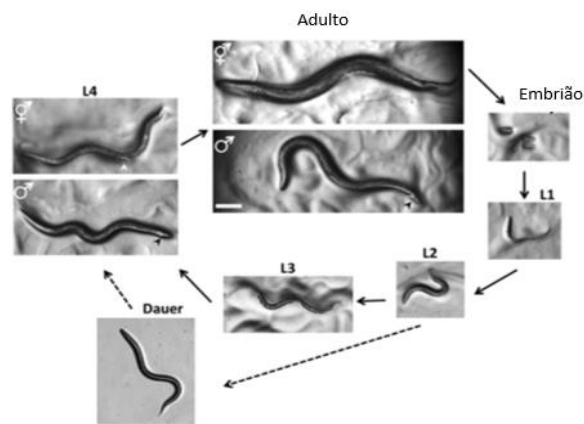


Figura 5 – Ciclo dos *C.elegans* (CORSI; WIGHTMAN; CHALFIE, 2015)

Alguns estudos trazem os *C.elegans* como um excelente modelo a fim de avaliar via relacionandas a longevidade (RIECKHER; TAVERNARAKIS, 2018). Do mesmo modo, se torna uma excelente ferramenta para teste com drogas e compostos bioativos, que afetam sua viabilidade e movimento, indicando os efeitos de toxinas via comportamentos e alterações no ciclo de vida (DETIENNE *et al.*, 2018; CORSI; WIGHTMAN; CHALFIE, 2015).

Apesar de sua aparente simplicidade, o verme tornou-se um modelo importante para a pesquisa biomédica, particularmente na caracterização funcional de novos alvos de drogas que foram identificados usando tecnologias genômicas. A complexidade celular e a conservação dos caminhos da doença entre *C. elegans* e organismos superiores, juntamente com a simplicidade e o custo-benefício do cultivo, criam um modelo *in vivo* eficaz que é passível de telas compostas de alto rendimento de todo o organismo e grandes validação de meta de escala (KALETTA; HENGARTNER, 2006).

3. JUSTIFICATIVA

O uso de alguns suplementos alimentares é amplamente reconhecido que pela ciência, pois desempenham um papel fundamental na prevenção e progressão de doenças não transmissíveis. Acredita-se que os efeitos dos suplementos estão diretamente associados aos seus compostos bioativos, entretanto não existe evidências que estariam isentos de quaisquer toxicidades. Desta forma, o consumo do Goji berry como suplemento, 100gr de fruta/dia, de maneira errada ou excessiva pela população pode estar associada a efeitos tóxicos, e não apenas na modulação de neurotransmissores, mas possivelmente por uma disfunção neuronal. Com isso, deve haver estudos que informe a população sobre o consumo errado de suplementos, atrelado a informações fidedignas sobre seus efeitos toxicológicos. Justificando-se assim este presente trabalho, em proporcionar uma análise aos efeitos do consumo prolongado do Goji berry como um suplemento alimentar em longo prazo.

4. OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

- Observar os efeitos em uma exposição crônica ao extrato hidroalcoólico do Goji berry em *C. elegans*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a toxicidade aguda e determinar a LC50 do extrato hidroalcoólico de Goji berry *in vivo*;
- Observar os efeitos do extrato hidroalcoólico de Goji berry na qualidade de vida dos *C. elegans*;
- Analisar os parâmetros comportamentais dos animais tratados com extrato hidroalcoólico de Goji berry;
- Investigar o envolvimento dos efeitos na locomoção da toxicidade do extrato hidroalcoólico do Goji berry em *C. elegans*.

5. ARTIGO CIENTÍFICO

Os resultados obtidos neste trabalho estão na forma de Manuscrito a ser submetido para a revista *Brazilian Journal of Food Research*, com Qualis A2.

Efeitos Comportamentais do Extrato Hidroalcoólico Goji Berry em *C.elegans*

Cristiane de Freitas Rodrigues¹, Matheus Bianchin¹, Cristiane C. Denardin^{1*}

¹Grupo de Pesquisa em Bioquímica e Toxicologia de Compostos Bioativos (GBToxBio), Universidade Federal do Pampa - UNIPAMPA, CEP 97500-970, Uruguaiana, RS, Brazil

Corresponding author: Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), 97500- 970, Uruguaiana, RS, Brazil. Phone: 55-55-3413-4321/ FAX: 55-55-3413-4321. Email:crisdenardin@gmail.com

RESUMO

O *Lycium barbarum* (Goji berry) tornou-se conhecido como um superalimento devido a variedade de seus nutrientes, os quais passou a ser amplamente utilizado pela população. No entanto, estudos *in vivo* que avaliem a sua eficácia e segurança toxicológica são raros. Assim, o presente estudo tem como objetivo avaliar os efeitos comportamentais causados pela suplementação com extrato de Goji berry (GBE) em *C.elegans*. A fruta seca de Goji Berry foi adquirida no comércio local, extraído o extrato com etanol, evaporado pelo rotavapor e ressuspendido em água. Os vermes foram expostos por 48 horas em diferentes concentrações de GBE, de acordo com a equivalência de compostos fenólicos, de acordo com *Folin-Ciocalteu*. As concentrações utilizadas foram 0,025, 0,1, 0,5, 1,5 e 2µg de equivalentes de ácido gálico (GAE)/µL, o que permitiu observar ensaios relacionados à sobrevivência, tempo de vida, desenvolvimento, bombeamento faríngeo e efeitos sobre o comportamento locomotor. Os resultados mostraram que a maior concentração de GBE diminuiu a sobrevivência, e quase todas as concentrações reduzem a estimativa de vida nos vermes, porém sem afetar o tamanho da ninhada. Conseqüentemente, o aumento das espécies reativas estaria relacionado a alta toxicidade, sugerindo um desequilíbrio das defesas antioxidantes, mesmo com a presença de compostos fenólicos existentes no GBE. Além do mais, pode-se observar nas maiores concentrações do GBE, as alteraram o comportamento locomotor um *omega turn*, *reserval* e *swimming*. Sugerindo assim, que a suplementação do GBE em *C.elegans*, estaria promovendo

uma disfunção neuronal pela toxicidade de compostos bioativos, os quais poderiam influenciar diretamente os neurotransmissores GABAérgicos e mecanosensores, estes relacionados ao comportamento.

Palavras chaves: *Lycium barbarum*, toxicidade, comportamento

INTRODUÇÃO

A “Food and Drugs Administration” (FDA) dos EUA, exige que todos os suplementos alimentares sejam regulamentados de acordo com a “Lei de Saúde e Educação de Suplementos Alimentares” de 1994. Os fabricantes de suplementos devem garantir que seus produtos sejam seguros e corretamente rotulados. Foi em 1998, que o FDA toma duras medidas contra qualquer fabricante que venda um produto que pareça estar adulterado ou com marca alterada, juntamente com a Equipe Nacional de Alimentos de Varejo a fim de medir ocorrências de práticas e comportamentos comumente identificados pelos Centros de Controle e Prevenção de Doenças como fatores contribuintes em surtos de doenças transmitidas por alimentos (2022).

O uso de suplementos alimentares para complementar a dieta da população, tornou-se cada vez mais corriqueiro, a fim de prevenir e/ou amenizar o aparecimento de doenças, melhorar e/ou auxiliar no bem-estar físico e mental (ROBERFROID, 2002, KWAK; JUKES, 2001). Porém, é necessário maior validação dos suplementos alimentares existentes no mercado e seu uso para ser considerado alimento funcional.

Entre os diversos suplementos alimentares, *Lycium barbarum* L. (Goji Berry), tem sido amplamente consumido, por seus efeitos antioxidantes e por possíveis modulações lipídicas (LUO *et al.*, 2004). Além do mais, as bagas de Goji são usadas há muito tempo pelo valor nutricional e fins medicinais nos países asiáticos. Tornando-as populares em todo o mundo e consumidas como um suplemento alimentar sem analisar as possíveis interações do Goji berry com medicamentos convencionais e outros produtos considerados naturais (VIDOVIĆ *et al.*, 2022).

Recentemente, foi observado os efeitos pró-oxidantes do suco de Goji berry em *C.elegans*, os quais desencadearam um envelhecimento precoce devido ao comprometimento das defesas antioxidantes e o aumento de número de corpos apoptóticos (RODRIGUES *et al.*, 2021). Desta forma, são necessários mais estudos clínicos, os quais comprovem a eficácia do Goji berry constatando uma posologia

adequada, as quais previnem quaisquer efeitos adversos ao suplemento, e possíveis interações da Goji berry com para a saúde precisam ser investigadas com mais detalhes (VIDOVIĆ *et al.*, 2022).

Para tais estudos a longo prazo, foi imprescindível a utilização do modelo complementar *C.elegans*. Este verme possui descrição genética completa, possibilitando a análise comparativa com mamíferos e seu curto ciclo de vida possibilita ensaios relacionados a longevidade, tornando-o bem-conceituado e eficaz em ensaios relacionados a toxicidade (BRENNER, 1974; HERNDON, L.A.; *et al.*, 2018).

Neste contexto, que se justifica este trabalho em proporcionar mais investigação sobre os possíveis efeitos decorrentes da exposição crônica ao Goji berry, utilizando *C.elegans* para modelo experimental. Possibilitando uma análise comportamental baseada no rastreamento dos movimentos do verme ao percorre sua placa de ágar. Esta analogia comportamental proporcionadas dados mais robustos ao relacionar sobrevivência e outros fatores, como sensorial, neuronal, locomotor e fenotipagem (HART, 2006; LIKITLERSUANG *et al.*, 2012). Com isso, que este ensaio toxicológico tem como objetivo observar as possíveis alterações comportamentais frente a exposição aguda ao extrato do Goji berry (GBE), sugerindo os possíveis neurotransmissores envolvidos. Já que o GBE contém compostos fenólicos, estes podem estar atuando como estimuladores neuronais e afetando diretamente a coordenação motora.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Preparação de extrato de Goji berry (GBE)

O fruto do Goji berry foi comprado de um fornecedor local (*Chá mais*) realizado uma extração etanólica. Em béquer protegido contra a luz foi adicionando 100g de frutas com 300mL de solução etanólica (95%), os quais foram homogeneizados utilizando um misturador ultra-turrax, por 5 min e depois colocados em agitador magnético durante 30 min. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas por 5 min a 3000 rpm, para obter o sobrenadante. O resíduo foi novamente submetido a extração, conforme a descrição acima.

Os sobrenadantes foram misturados e evaporado em *rotavapor*, sob temperaturas entre 40 e 45°C a vácuo. Todo excesso de etanol foi retirado e o extrato foi

ressuspenso em água destilada. Para devidos fins de concentrações utilizadas, este extrato obtido foi realizado as determinações de compostos fenólicos totais quantificados de acordo *Folin-Ciocalteu* (SWAIN; HILLIS, 1959), utilizando uma curva padrão o ácido gálico de pureza (>95%, Sigma).

Para avaliar a atividade antioxidante *in vivo* do GBE, as concentrações testadas no nematoide *C. elegans* foram selecionadas com base em estudos toxicológicos prévios de nosso grupo e considerando a quantidade de compostos fenólicos totais, as quais resultaram 1.488,99 µg de equivalente de ácido gálico/mL (GAE/mL).

2. Cepas de *C. elegans* e Protocolo de Exposição GBE

As seguintes cepas foram utilizadas neste estudo cepas do tipo selvagem Bristol (N₂) e *unc-25(e156)* III (CB156), todas as cepas de *C. elegans* foram obtidas do *Caenorhabditis Genetics Center* (Minnesota, EUA) e mantidas a 20°C em meio de crescimento de nematoides sólidos (MCN) semeado com *E. coli* (OP50) como fonte de alimento (BRENNER, 1974). A sincronização ocorreu recolhendo vermes hermafroditas grávidos, utilizando uma solução de lisa a com hipoclorito de sódio (NaOH) para obter todos os ovos desta cultura. Após 14-16hs da sincronização, foram utilizadas 3000 larvas do primeiro estágio (L1) para devidas análises. Os vermes L1 foram expostos ao GBE nas concentrações de 0 (controle), 0,025, 0,1, 0,5, 1,5 e 2µg GAE/µL, por 48 horas em placas de NGM semeadas com *E. coli* (morta por UV).

2.2 Ensaio *egg laying* e *lifespan*

Os vermes do tipo selvagem em estágio L4 após a exposição de diferentes concentrações GBE conforme descrito em 2.1, foram transferidos individualmente para novas placas de NGM, semeada com *E. coli* (OP50) no centro. Sendo contabilizado a postura de ovos, diariamente com a transferência destes vermes para uma nova placa. Este procedimento ocorreu até o último dia reprodutivo e foi contabilizado o número de ovos postos, utilizando auxílio de um estereomicroscópio.

Para o ensaio de longevidade, foram transferidos 20 vermes do tipo selvagem na idade adulta de cada grupo, para uma nova placa contendo MCN e semeado *E. coli* (OP50) no centro. Os 20 vermes foram transferidos diariamente até a mortalidade do último, sendo considerado dia 0 para o primeiro dia de transferência da idade adulta do nematoide. Foram descartados ou não transferidos aqueles vermes que não

responderam a nenhum estímulo quando observados.

2.3. Análise de peroxidação lipídica

Os vermes tratados conforme descrição em 2.1, após o período de 48h, foram lavados com tampão M9 para retirada da *Escherichia coli* e, em seguida, transferidos para microtubos. Posteriormente, as amostras foram congeladas e descongeladas duas vezes, e em seguida sonicadas também duas vezes no microturrax durante 10 segundos, usando gelo para não esquentar a amostra. Após o preparo das amostras, estas foram incubadas 60µL de amostra com 60 µL de ácido fosfórico (0,1%), 60 µL de TBA (0,6%) e 60 µL de SDS (0,6%) por 1,5h no banho-maria a 100°C, conforme descrito por Ohkawa (1979). As medidas de absorbância foram realizadas em placa de 96 poços (532nm) e os resultados são expressos nmol MDA/µg de proteína.

2.4 Ensaio de resistência ao estresse oxidativo

Os vermes L4, previamente expostos a diferentes concentrações do extrato pelo período de 48 horas. Foram coletados das placas, lavados com M9 para retirada de quaisquer compostos, e em seguida expostos a *juglone* (5-hidroxi-1,4-naftoquinona) 50µM em microtubos no homogeneizador por 1 hora. Ao término no tempo, os vermes foram novamente lavados com M9, retirando o agente pró-oxidante. Os nematóides foram transferidos para novas placas de MCN com *E.coli* e após 24 horas, foi contabilizada a sobrevivência dos vermes.

2.5 Determinação de espécies reativas de oxigênio (ROS)

As espécies reativas de oxigênio foram determinadas conforme descrito anteriormente (GONZALEZ-MANZANO *et al.*, 2012) com modificações. Os vermes foram expostos em L1 até o estágio L4 com diferentes concentrações GBE. Os vermes foram coletados para microtubos e foram lavados com M9, duas vezes, e em sequência adicionado H₂DCFDA (50µM) nas amostras. Com auxílio de um homogeneizador, os vermes vivos ficaram em contato com a *probe* H₂DCFDA (50µM) por 1 hora e após a finalização do tempo, eles foram novamente lavados com M9 (três vezes a 3min a 7000rpm) e transferidos para uma placa de 96 poços. Para devida leitura foi utilizado um leitor de microplacas (leitor de microplacas SpectraMax M5, Molecular Devices®), analisando a intensidade da fluorescência de cada amostra,

mensurada conforme a medida excitação: 485 nm; emissão: 535 nm. Leitura cinética de 1 hora com intervalos de 15 minutos, os resultados foram corrigidos por μg de proteína

2.6. Determinação das Tiois proteicos (SH) e Tiois Não Proteico (NPSH)

O nível de NPSH foi determinado de acordo com o método Elmann e colaboradores (1961), os quais os vermes foram expostos conforme descrito anteriormente. Os vermes foram coletados para microtubos, congelados e sonificados, para conseqüentemente realizar o ensaio de NPSH. Com 70 μL das amostras homogeneizadas foram precipitados com 70 μL TCA de 10% (1:1 v:v), seguido de centrifugação a 3000 $\times\text{g}$ por 10 min a 4°C. O sistema de reação foi composto por 940 μL de tampão fosfato de potássio dibásico 1 M, 50 μL de amostra e 10 μL de DTNB 5mM. Para o ensaio de Tiois Total, foi utilizado tampão fosfato de potássio dibásico 1M 0,081% SDS seguido de centrifugação a 10000rpm por 10 min a 4°C após adição de 50 μM de DTNB. Para ambos os ensaios, após 10 min de incubação com DTNB à temperatura ambiente (25°C), a microplacas foi realizada a leitura, com absorbância 412 nm. Os resultados foram expressos em % de controle após correção por nível de proteína total.

2.7. Comportamento de *C. elegans*

Bombeamento faríngeo - A taxa de bombeamento é medida pela contagem dos movimentos visíveis da faringe (RAIZEN *et al.*, 1995). Foram transferidos para novas placas um verme por vez, num total de 5 vermes por tratamento, marcando 1 minuto de ambientação e após a contagem por um minuto dos movimentos da faringe.

Omega turn, reversal turn e movimento body bends – Os ensaios do movimento *omega turn* foram realizados em placas de ensaio de NGM sem alimentos, conforme descrito anteriormente (GRAY; COLINA; BARGMANN, 2005). Os vermes foram transferidos individualmente para novas placas para análise do comportamento. Com o auxílio de um estereomicroscópio (SZX16, Olympus, Tóquio) foi aferido o número de *omega turn* durante 1 minuto, aqueles vermes que ao estimulados fazem o movimento *omega*. No máximo foram realizados cinco toques por animal, e o primeiro *omega* foi pontuado sob a observação de um giro acentuado cujo ângulo de giro deve ser maior que 120°.

Para o movimento *reversal*, os procedimentos são quase iguais ao descrito anteriormente pelo movimento *ômega*, a diferença está, que durante um minuto sob o estímulo, irão aferir o retorno desde verme. Já o movimento *body bends*, sem necessário estímulos, deve contabilizar os movimentos da curva do corpo do nematoide durante 1 minuto.

Velocidade de locomoção e ensaio *swimming* - Os movimentos associados à natação foram avaliados em vermes tratados e não tratados de acordo com Ghosh e Emmons (2008), com algumas adaptações. Os vermes foram expostos por 48 horas ao GBE, posteriormente foram transferidos para uma placa de doze poços contendo 200 μ L M9. Foram registrados os movimentos dos animais num período de 30 segundos (30 quadros por segundo) utilizando um microscópio estéreo *Olympus SZ2-LGB* e uma câmera *Fujifilm FinePix JX500*. O software de análise do vídeo e modelagem *Tracker* foi então usado para rastrear a velocidade dos movimentos de cada verme. Calculou-se uma velocidade média e distância percorrida para cada grupo de 6 animais.

2.8. Determinação das proteínas

A dosagem de proteína segundo o protocolo de Bradford (1976), foram medida para correção da quantidade de vermes, utilizando-se albumina sérica bovina (1 mg/mL) como padrão.

3. Análise estatística

Os resultados foram apresentados como média \pm desvio padrão determinado pelo menos em triplicados de duas amostras independentes. Os testes estatísticos foram realizados no *GraphPad Prism* versão 6 (US Inc.) usando *One-way ANOVA* seguido de *post-hoc* de *Tukey*. Para as análises do movimento locomotor da velocidade média do *swimming* foram utilizados como testes estatístico *Kruskal-Wallis* seguido de *post-hoc Dunn's*. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando o valor de *p* foi menor que 0,05 ($p < 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Há milhares de anos, o homem vem consumindo suplementos alimentares como alternativa para tratamento de diversas patologias, relacionando seus benefícios

as ações antioxidantes e funções orgânicas. Na maioria dos casos, os antioxidantes possuem privilégios, pelos seus nutrientes, de acentuar e melhorar ações biológicas no corpo e através do consumo de certos alimentos, entre eles o Goji berry (CHAUDAHARI, 1999). Esta fruta em formato de baga tem sido utilizada como suplemento alimentar, pela presença de antioxidantes e pela ampla variedade de compostos bioativos comprovados utilizando metodologia *in vitro* (LIN *et al.*, 2021). Desta forma, utilizamos como embasamento das concentrações a serem testadas o cálculo da quantidade de compostos fenólicos 1.488,99 µg de equivalente de ácido gálico/mL (GAE/mL), utilizando como curva padrão o ácido gálico.

No presente estudo pode-se realizar uma curva de toxicidade dose-resposta, no qual encontrando uma LC50 de 1.56 µg GAE/µL. Neste caso, foram escolhidas cinco concentrações, as quais apresentam uma margem de diferenças entre elas, isto é, sem mortalidade, pouca mortalidade e muita mortalidade (Fig.1A). Estes primeiros resultados já demonstram, que por mais que o Goji Berry apresente compostos bioativos seu consumo em longo prazo deve-se ser cauteloso.

Dando continuidade, buscou-se analisar outros parâmetros nos vermes, como a reprodução e longevidade. Em relação a reprodução, pode-se observar, que todas as concentrações testadas não alteram a postura de ovos, mesmo aquelas concentrações que ultrapassaram a LC50, sugerindo que sua toxicidade não envolve a função reprodutiva (Fig.1B). Doses abaixo da DL50 causaram dano, não o suficiente para matar em 48h, mas diminuíram a qualidade de vida do verme

No entanto, avaliando a longevidade do nematoides, todas as concentrações, exceto a de 0.025 µg GAE/µL reduziram significativamente o tempo de vida e a vida média destes vermes (Fig.1C), quando analisado se está mortalidade estaria sendo relacionada com a falta de ingestão ou aversão alimentar, pode-se observar que não houve alteração no bombeamento da faringe (Fig.1D), descartando que a toxicidade seria devido à falta de ingestão alimentar. Estes resultados encontrados corroboram com os dados do nosso estudo anterior, no qual o suco de Goji Berry em *C. elegans* em longo prazo, promoveram uma redução na longevidade sem afetar a progênie, mas desequilibrando as defesas antioxidantes deste verme (RODRIGUES *et al.*, 2021).

Do mesmo modo, foi-se averiguar como estaria as defesas antioxidantes, neste trabalho pode-se observar que o GBE em *C. elegans* em longo prazo, aumenta a

peroxidação lipídica na concentração 1.5 µg GAE/µL (Fig.2A). Por outro lado, o GBE sua proteção contra o agente estressor na concentração menor, ou seja, quanto maior a concentração menor a proteção, um efeito concentração-dependente inversamente (Fig.2B), no qual a concentração-dependente no aumento das espécies reativas de oxigênio (Fig.2C), sem alterar níveis de tiois proteicos e não proteicos (Fig.2D e 2E). Sugerindo que este desequilíbrio nas defesas antioxidantes nos vermes frente a exposição prolongada do GBE podem indicar dano oxidativo, o qual reduz a longevidade. Diferentemente de outro estudo, o qual observou uma redução na peroxidação lipídica e aumento nos níveis superóxido dismutase e glutathione peroxidase, na bebida industrializada a base de Gb, GoChi (AMAGASE; SUN; BOREK, 2009). No entanto, o mesmo estudo afirma que os resultados encontrados podem não ser suficientes para apoiar efeitos benéficos em relação a marcadores antioxidantes endógenos, principalmente por não ser em longo prazo.

Também foram observados outros parâmetros básicos em *C. elegans*, especificamente relacionados a função comportamental. Apesar, da exposição com GBE em longo prazo promover aumento das espécies reativas, tal efeito parece não influenciar ao movimento de cabeça dos animais (Fig.3A). Contudo, houve uma redução significativa no movimento de *reversal* nos vermes na concentração 2µg GAE/µL (Fig.3B) e um aumento na quantidade de movimentos *omega turns* nas concentrações 0.5 e 1.5µg GAE/µL (Fig.3C). Tal efeito sugere que a toxicidade também foi demonstrada nestes ensaios comportamentais, sugerindo danos neuronais. Os efeitos comportamentais estão relacionados por múltiplos fatores, incluindo estímulos externos, estrutura neuronal e alterações fisiológicas mudanças no meio interno do animal (HART, 2006).

Por outro lado, muitas alterações a nível celular ou funcional em *C. elegans* podem alterar profundamente a atividade basal e memória. Portanto, os ensaios comportamentais oferecem ao pesquisador ferramentas simples, sensíveis e poderosas para prever a função neuronal. Desta forma, fomos analisar outros parâmetros comportamentais, baseados na avaliação da locomoção. Primeiramente, quantificamos o número de movimentos de natação realizados por vermes suspensos em meio líquido, revelando que na concentração 2µg GAE/µL houve uma redução significativa em relação aos não tratados (Fig.4A).

Da mesma forma, observamos redução estaria na velocidade média, tornando-

os mais lentos (Fig.4B), sem alterar a amplitude (Fig.4C). Mas, influenciando o comprimento da onda (Fig.4D) e a capacidade dos vermes se moverem (Fig.4E). Nossos resultados apontam que o GBE estaria promovendo disfunções do padrão de locomoção, os quais poderiam ser influência de danos neuronais.

Naranjo-Galindo e colaboradores (2022), relaciona a qualidade de vida do *C. elegans* com ensaios de sobrevivência, bombeamento faríngeo, memória, comportamento e *swimming* do verme. Interligando os neurônios no processo de neuro degeneração, neurônios dopaminérgicos (PD) com proteínas de agregação α -sinucleína os ensaios de motilidade. Neurônio GABAérgicos (AD) vinculados a proteína de agregação TAU nos ensaios de bombeamento faríngeo e *swimming*. Neurônio mecanosensoriais com a proteína de agregação PolyQ para os ensaios de memória. E neurônios GABAérgicos (ALS), envolvendo a proteína de agregação a TDP-1 para ensaios de sobrevivência e longevidade. Sugerindo que existe neurônios envolvidos nas alterações comportamentais ocasionadas pelo aumento das espécies reativas de oxigênio.

Além do mais, a neurodegeneração não se limita apenas ao aspecto morfológico pela perda do neurônio, mas apenas um efeito na sinalização, o qual pode ser acoplado com experimentos que nos dão uma indicação sobre o estado de condicionamento físico dos neurônios de interesse, como o ensaio de resposta, ou a capacidade de desacelerar e alterar a direção do movimento quando atinge o alimento (NARANJO-GALINDO; *et al.*, 2022).

CONCLUSÃO

Durante muito tempo as bagas de Goji berry vem sendo consumidas em países asiáticos, ganhado credibilidade no mundo pela alta quantidade de nutrientes. Entretanto, este presente estudo demonstrou, que por mais que a baga da fruta contenha propriedades antioxidantes, a ingesta em longo prazo, aqui representada como equivalente ao ácido gálico, pode tornar-se pró-oxidante e acarretar danos subsequentes a saúde. Por isso, é de grande valia este estudo para investigar concentrações não tóxicas e tóxicas, as quais possam demonstrar o quão cauteloso deve ser uma suplementação de Goji berry em longo prazo.

Contudo, este ensaio toxicológico pode observar as possíveis alterações comportamentais frente a exposição aguda ao extrato do Goji berry (GBE), sendo que

o aumento das espécies reativas gerou um desequilíbrio nas defesas antioxidantes, causando toxicidade no modelo. Do mesmo modo, que afetou parâmetros comportamentais, tais como *omega turn*, *reserval* e *swimming*. Sugerindo assim, que possivelmente o GBE em longo prazo poderia estar agindo como um depressor, no qual atua afeta a coordenação motora devido ao aumento das espécies reativas. Mas, contudo, são necessários mais estudos que viabilizem os possíveis mecanismos envolvidos na neurobiologia.

REFERENCIAS

AMAGASE H, SUN B, BOREK C. *Lycium barbarum* (goji) juice improves *in vivo* antioxidant biomarkers in serum of healthy adults. **Nutrition Research**, v. 29, n.1, p. 19-25, jan, 2009.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v.72, p. 248-254, 1976.

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

CALABRESE EJ, BALDWIN LA. Hormesis: the dose-response revolution. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v.43, p.175-197, 2003.

HART, A.C. Behavior - WormBook: The Online Review of *C. elegans* Biology. **WormBook**, 2006. Disponível em: <[behavior.pdf \(wormbook.org\)](http://behavior.pdf(wormbook.org))> Acesso em 02/02/2023.

ELLMAN, G.L.; *et al.* A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochem Pharmacol.**, v.7, p.88-95, 1961.

FDA – Food and Drugs Administration. Estudo de Fatores de Risco de Alimentos no Varejo. United States government, 2022. Disponível em: <[Retail Food Risk Factor Study | FDA](#)>. Acesso em: 10/12/2022.

GENDREL, MARIE; ATLAS, E.G.; HOBERT, O. A cellular and regulatory map of the GABAergic nervous system of *C.elegans*. **eLife**, v.5, p.1-38, 2016.

GHOSH, RAJARSHI; EMMONS, SCOTT. Episodic swimming behavior in the nematode *C. elegans*. **J. Exp. Biol.**, v.211, n.23, p.3703-3711, 2008.

GONZÁLEZ-MANZANO, S.; *et al.* Oxidative Status of Stressed *Caenorhabditis elegans* Treated with Epicatechin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.60, n.36, p.8911-8916, 2012.

GOODMAN, M.B. Mechanosensation. Wormbook: the Online Review of *C. Elegans* Biology, **Wormbook**, p.1-14, 2006.

GRAY, J.M.; HILL, J.J.; BARGMANN, C.I. A circuit for navigation in *Caenorhabditis elegans*. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, USA, v.102, n.9, p.3184-3191, 2005.

HERNDON, L.A.; WOLKOW, C.A.; DRISCOLL, M.; HALL, D.H. Introduction to Aging in *C.elegans*. **WormAtlas**, 2018.

HUNT, P.R.; OLEJNIK, N.; BAILEY, K.D.; VAUGHT, C.A.; SPRANDO, R.L. *C. elegans* Development and Activity Test detects mammalian developmental neurotoxins. **Food Chem. Toxicol.**, v.121, p. 583-592, 2018.

KWAK, N.; JUKES, D. J. Functional foods. Part 1: the development of a regulatory concept. **Food Control.**, v.12, p.99-107, 2001.

LIKITLERSUANG, J.; STEPHENS, G.; PALANSKI, K.; RYU, W.S. *C. elegans* tracking and behavioral measurement. **J Vis Exp.**, v.69, nov., 2012.

LIN, Feng.; *et al.* Effects of different processing methods on bioactive substances and antioxidation properties of *Lycium barbarum* (goji berry) from China, **Food Bioscience**, v. 42, 2021.

LUO, Q. *et al.* Hypoglycemic and hypolipidemic effects and antioxidant activity of fruit extracts from *Lycium barbarum*. **Life Sci.**, v.76, n.2, p.137-149, 2004

NARANJO-GALINDO, F.J.; *et al.* *C.elegans* as an Animal Model to Study the Intersection of DNA Repair, Aging and Neurodegeneration. **Front. Aging**, v.3, 2022.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical biochemistry**, v.95, n.2, p.351-358, 1979.

RAIZEN, D.M.; LEE, R.Y.; AVERY, L. Interacting genes required for pharyngeal excitation by motor neuron MC in *Caenorhabditis elegans*. **Genetics**, v.141, p.1365–1382, 1995.

ROBERFROID, M. Functional food concept and its application to prebiotics. **Digestive and Liver Disease**, v.34, n.2, p.105-110, 2002.

RODRIGUES, C. *et al.* Goji berry (*Lycium barbarum* L.) juice reduces lifespan and premature aging of *Caenorhabditis elegans*: Is it safe to consume it? **Food Res Int.**, v.144, jun., 2021.

SWAIN, T.; HILLIS, W.E. The phenolic constituents of *Prunus domestica*. I. The quantitative analysis of phenolic constituents. **J. Sci. Food Agric.**, v.10, p. 63-68, 1959.

VIDOVIĆ BB, MILINČIĆ DD, MARČETIĆ MD, DJURIŠ JD, ILIĆ TD, KOSTIĆ AŽ, PEŠIĆ MB. Health Benefits and Applications of Goji Berries in Functional Food Products. Development: A Review. **Antioxidants**, Basel, v.11, n. 2, p.248, 2022.

ANEXOS

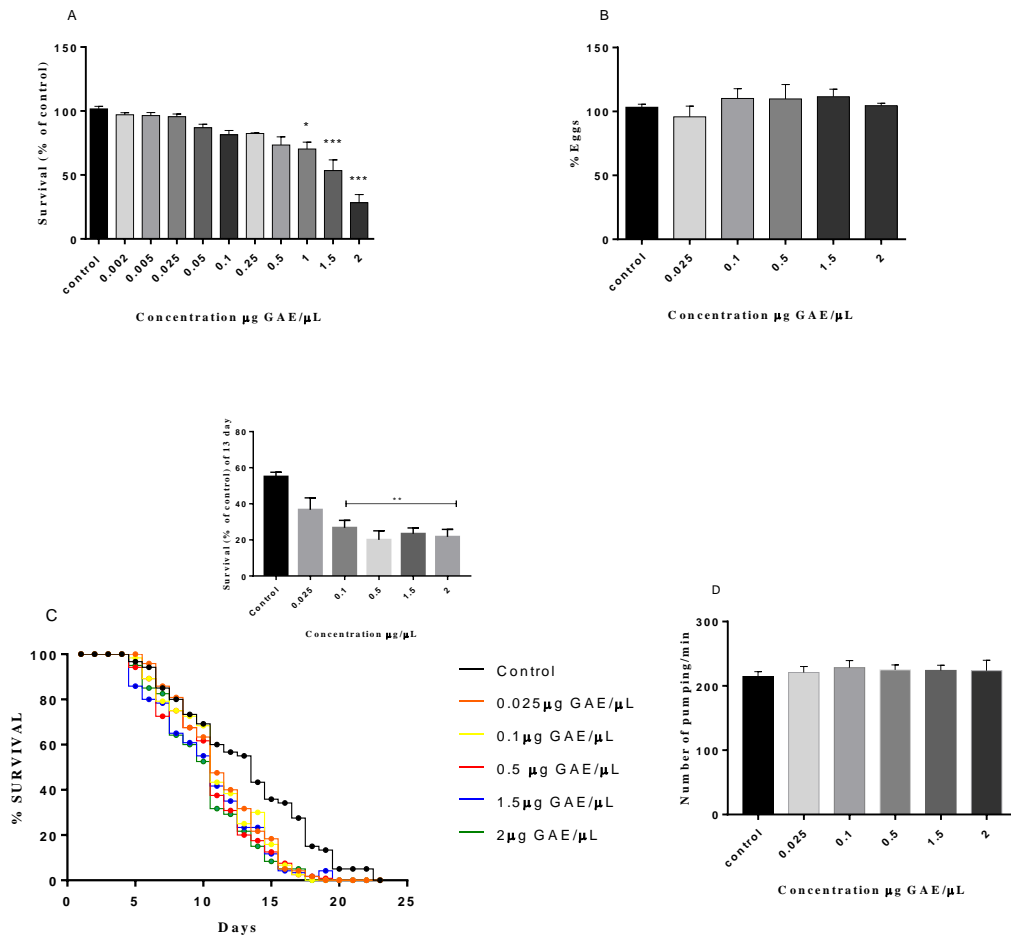


FIGURA 1: Análises na sobrevivência, postura de ovos, lifespan e bombeamento faríngeo (A) Efeitos do GBE exposto por 48 horas em vermes do tipo selvagem em diferentes concentrações (mg/µL), até a mortalidade de 50% (DL50). (B) O número de ovos postos mediante a exposição ao GBE nas concentrações (C) Medição do tempo de vida adulta nos vermes tratados diferentes concentrações do GBE e média de vida, no 13º dia (D) Número de bombeamento faríngeo/min dos vermes tratados com GBE. As análises estatísticas foram comparadas com o controle e as diferentes concentrações dos grupos, usando como teste estatístico One-way ANOVA de medidas repetidas seguidas de post-hoc Tukey's. Os dados são expressos como média ± SEM. *indica diferença estatística em relação ao grupo não tratado analisado por ANOVA two-way seguida de teste post-hoc de Tukey (p<0,05).

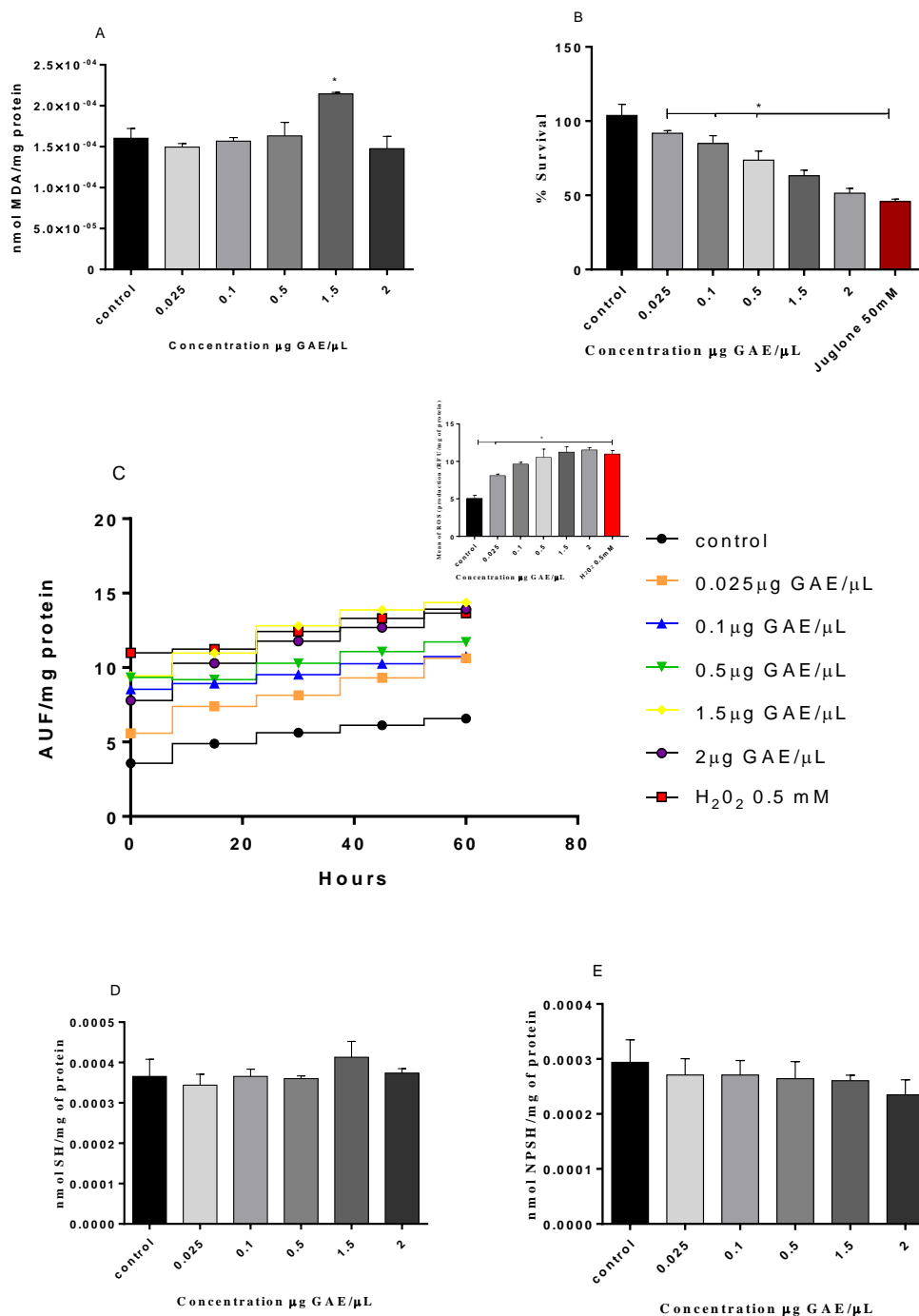


FIGURA 2: Efeitos do GBE frente ao estresse oxidativo em *C. elegans*. (A) Níveis malondialdeído por grama de proteína, nos vermes tratados diferentes concentrações de GBE. (B) Os efeitos do pré-tratamento a exposição ao GBE e pós-tratamento com Juglone 50mM. (C) Produção de espécies reativas de oxigênio (DCF-DA) por minuto em vermes tratados com GBE e controle negativo do H₂O₂ 0.5mM. Níveis de tiois proteicos (D) e não proteicos (E) nos vermes tratados com GBE. As análises estatísticas foram comparadas ao juglone 50mM na figura 2B e os demais gráficos foram comparadas em relação ao controle com as demais concentrações, usando como teste estatístico One-way ANOVA de medidas repetidas seguidas de post-hoc

Tukey's. Os dados são expressos como média \pm SEM. *indica diferença estatística em relação ao grupo não tratado analisado por ANOVA two-way seguida de teste post-hoc de Tukey ($p < 0,05$)

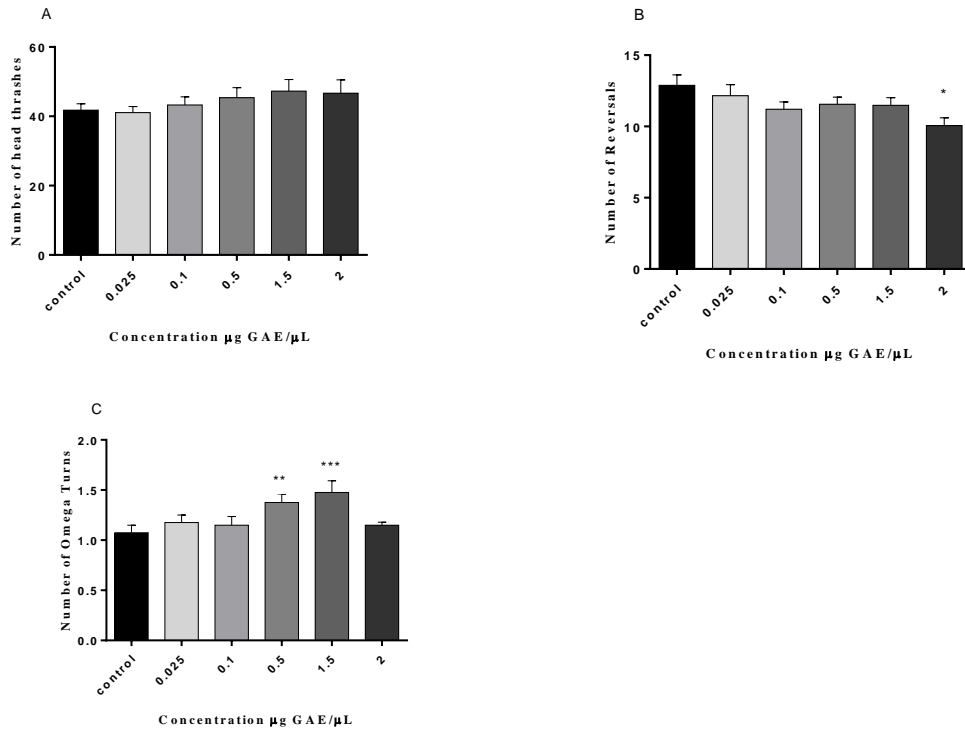


FIGURA 3: Efeitos da GBE no comportamento em *C. elegans*. (A) Número de movimentos oscilatórios *head thrashes* por minuto (B) Número de *reversal* por segundo em (C) Número de movimentos *omega turn* por minuto. As análises estatísticas foram comparadas com o controle e as diferentes concentrações dos grupos, usando como teste estatístico One-way ANOVA de medidas repetidas seguidas de post-hoc Tukey's. Os dados são expressos como média \pm SEM. *indica diferença estatística em relação ao grupo não tratado analisado por ANOVA two-way seguida de teste post-hoc de Tukey ($p < 0,05$)

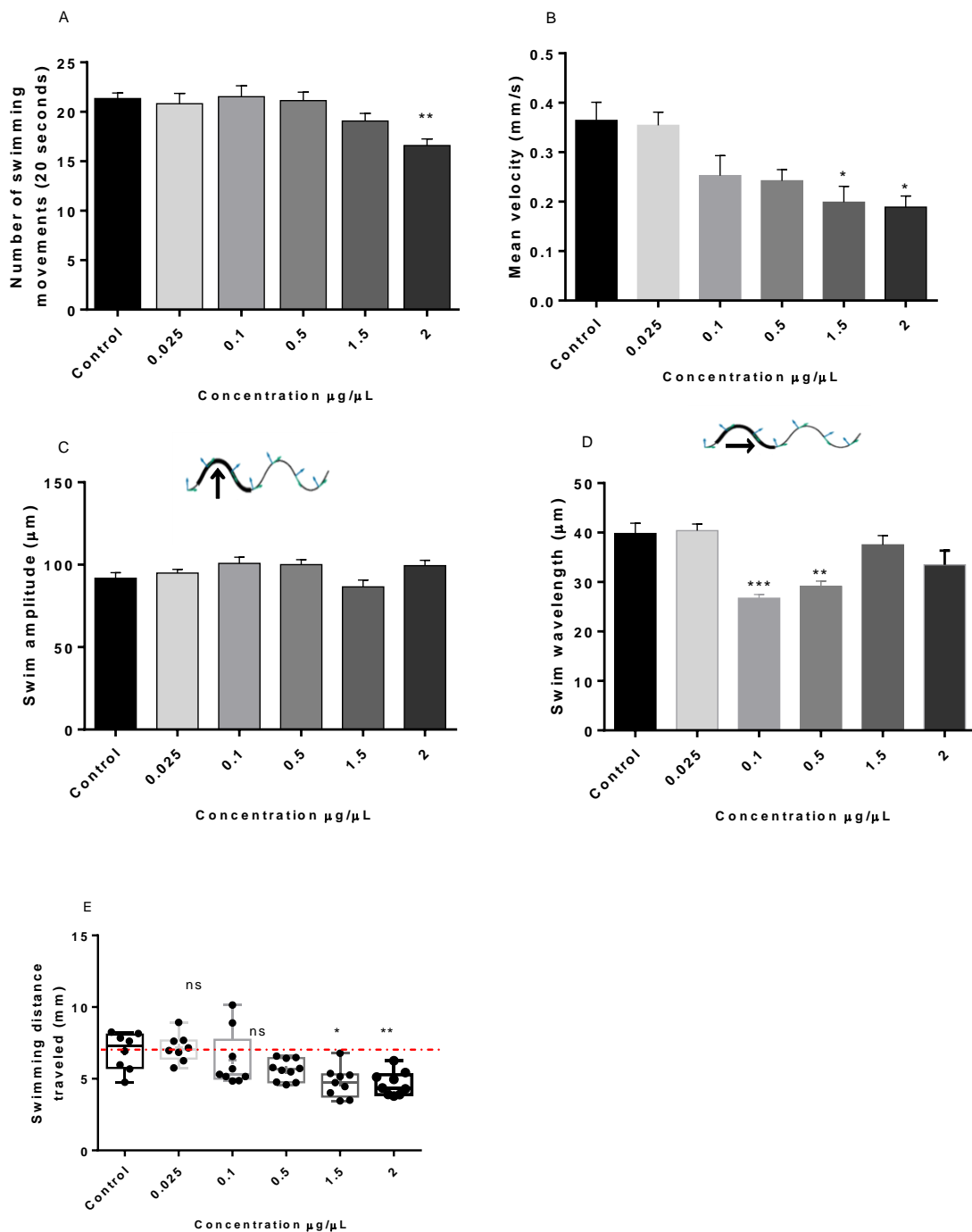


FIGURA 4: Efeitos do GBE no ensaio *swimming* e locomoção em *C. elegans*. (A) Número de movimentos de *swimming* em 20 segundos. (B) Velocidade média dos vermes expostos ao GBE. (C) Amplitude de swim dos vermes tratados com GBE. (D) Comprimento de onda de swim nos vermes tratados com GBE. (E) quantificação da distância percorrida no *swimming* nos vermes tratados com GBE, para estes ensaios foi analisado estatisticamente pela significância, sendo determinada pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste post hoc de Dunn's. As demais análises por One-way ANOVA de medidas repetidas seguidas de post-hoc Tukey's. Os dados são expressos como média \pm SEM. *indica diferença estatística ($p < 0,05$).

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A suplementação faz parte do cotidiano da população e o Goji berry (Gb) ganhou muito espaço por ações antioxidantes devido a presença de compostos bioativos. Apesar da presença de propriedades benéficas a quantidade excessiva em longo prazo pode desencadear danos à saúde. Com isso, neste trabalho analisamos a exposição ao suplemento Gb e seus efeitos em longo prazo, utilizando diferentes concentrações, as quais foram normalizadas por equivalentes de ácido gálico, como um fator benéfico nas exposições, devido a presença de compostos fenólicos e concentrações baixas consideradas antioxidantes. Mesmo assim, conseguimos observar toxicidade crônica ao extrato hidroalcoólico de Goji Berry (GBE), caracterizada por uma LC50 de 1,56 µg GAE/µL, sem alterações na reprodução e ingesta de alimentos.

Também observamos efeitos toxicológicos na longevidade, pela produção de espécies reativas de oxigênio, as quais aumentaram níveis de peroxidação lipídica. Em relação das concentrações maiores, 1,5 e 2 µg GAE/µL, também alteraram parâmetros comportamentais, *omega turn*, *reversal* e *swimming*. Sendo assim, sugerimos que o GBE nas concentrações testadas poderia estar agindo como depressor, afetando diretamente as funções motoras. Entretanto, para obtermos tais respostas são necessários maior evidências que assosiem relação da dose-resposta com seus mecanismos envolvidos na toxicidade, e possíveis neurotransmissores, interneurônios e/ou neurônio motores envolvidos. Diante disso, este trabalho serve como um alerta para a população sobre a ingestão das bagas de Gb como suplemento, 100gr/dia.

7. REFERÊNCIAS

AMAGASE, Harunobu. General toxicity and histological analysis from acute toxicological study of a standardized *Lycium barbarum* (Goji) juice (GoChi™) in rodents. **FASEB Journal**, v.22, n.2, p.722, 2008.

AMAGASE, H.; FARNSWORTH, N.R. A review of botanical characteristics, phytochemistry, clinical relevance in efficacy and safety of *Lycium barbarum* fruit (Goji). **Food Research International**. Phoenix: v.44, n.7, p.1702-1717, 2011.

AMAGASE, H.; SUN, B.; BOREK, C. *Lycium barbarum* (goji) juice improves in vivo antioxidant biomarkers in serum of healthy adults. **Nutr Res.**, v.29, n.1, p.19-25, jan., 2009.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Rotulagem Nutricional Obrigatória: Manual de Orientação aos Consumidores, Educação para o Consumo Saudável. **Universidade de Brasília**, 2001.

APPLEGATE, E. A.; GRIVETTI, L. E. Search for the competitive edge: a history of dietary fats and supplements. **The Journal of Nutrition**, Davis, v.127, n.5, p.869-873, may, 1997.

ARROYO-MARTINEZ, Q.; SÁENZ, M.J.; ARIAS, F.A.; ACOSTA, M.S.J. *Lycium barbarum*: A new hepatotoxic “natural” agent? **Digestive and Liver Disease**, v.43, p.749, 2011.

BALLARÍN, Monzón S. et al. Anaphylaxis associated with the ingestion of Goji berries (*Lycium barbarum*). **J. Investig. Allergol Clin. Immunol.**, v.21, n.7, p.567–570, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria da Vigilância Sanitária. Portaria n. 32 de 13 de janeiro de 1998. Aprova o regulamento técnico para suplementos vitamínicos e ou de minerais. Diário Oficial da União.

BRENNER, S. The genetics of *Caenorhaditis elegans*, **Genetics**, v.77, p.71-94, 1974.

BRYAN, J. K.; COSTA, D.; GIESE, N.; NUMMY, K.; RAPP, C.; SEAMON, E. *et al.* Goji (*Lycium spp*) in natural standard monograph. **Natural Standard Inc. natural medicine**, 2008.

BUKOWSKI, J.A.; LEWIS, R.J. Hormesis and health: a little of what you fancy may be good for you. **South Med J.**, v.93, n.1, p.371-374, apr., 2000.

CHALFIE, M.; SULSTON, J. Developmental genetics of the mechanosensory neurons of *Caenorhabditis elegans*. **Dev.Biol.**, v.82, p.358-370, 1994.

CHANG, Raymond Chuen-Chung; SO, Kwok-Fai. Use of anti-aging herbal medicine, *Lycium barbarum*, against aging-associated diseases. What do we know so far? **Cell Mol Neurobiol.**, v.5, n.28, p.643–652, 2008.

CHAUDAHARI, R.F. Foods of the future: the impact of functional foods in the cereal industry. **Cereal Food World**, v.44, p.93-95, 1999.

CHENG, C.Y.; CHUNG, W.Y.; SZETO, Y.T.; BENZIE, I.F. Fasting plasma zeaxanthin response to *Fructus barbarum* L. (wolfberry; Kei Tze) in a food-based human supplementation trial. **British Journal of Nutrition**, v.93, n.1, p.123-130, 2005.

CORSI, ANN K.; WIGHTMAN, BRUCE; CHALFIE, MARTIN. A Transparent window into biology: A primer on *Caenorhabditis elegans*. **WormBook**, june, 2015. Disponível em <<http://www.wormbook.org>>, acesso agosto, 2022.

DETIENNE, G.; DE, HAES W.; MERGAN, L.; EDWARDS, S.L.; TEMMERMAN, L.; VAN, BAEL, S. Beyond ROS clearance: Peroxiredoxins in stress signaling and aging. **Ageing Res Rev.**, v.44, p.33-48, 2018.

DHARMANANDA, S. LYCIUM FRUIT, Food and Medicine, Institute for Traditional Medicine, Portland, Oregon, august, 2007.

GÓMEZ-BERNAL, S.; RODRÍGUEZ-PAZOS, L.; GARCÍA, Martínez F.J.; GINARTE, M.; RODRÍGUEZ-GRANADOS, M.T.; TORIBIO, J. Systemic photosensitivity due to Goji berries. **BRIEF COMMUNICATION**, v.27, n.5, p.245-247, 2011.

INBARAJ, B.S.; LU, H.; KAO, T.; CHEN, H. Simultaneous determination of phenolic acids and flavonoids in *Lycium barbarum Linnaeus* by HPLC-DAD-ESI-MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.51, n.3, p.549-556, feb., 2010.

JIANG, Yuqin; FANG, Zhongxiang; LEONARD, William; ZHANG, Pangzhen. Phenolic compounds in *Lycium berry*: Composition, health benefits and industrial applications. **Journal of Functional Foods**, v.77, feb., 2021.

JIAPAER, R. et al. A review of phytochemical composition and bio-active of *Lycium barbarum* fruit (Goji). **Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology**, v.13, n.8, p.161-172, 2013.

KALETTA, TITUS; HENGARTNER, MICHAEL O. Finding function in novel targets: *C.elegans* as a model organisms. **Nature Reviews Drug Discovery**. v.5, p.387–399, 2006.

KIM, I. et al. Vitamin and mineral supplement use and mortality in a US Cohort. **American Journal of Public Health**, Atlanta, v.83, n.4, p.546-550, apr. 1993.

KWAK, N.; JUKES, D. J. Functional foods. Part 1: the development of a regulatory concept. **Food Control**., v.12, p.99-107, 2001.

KULCZYŃSKI, B.; GRAMZA-MICHAŁOWSKA, A. Goji Berry (*Lycium barbarum*): Composition and Health Effects – a Review. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**, v.66, n.2, p.67-75, 2016.

LAKO, JIMAIMA; TRENNERY, CRAIGE; WAHLQVIST, MARKA; WATTANAPENPAIBOON, NAIYANA; SOTHEESWARAN, SUBRAMANIUM;

PREMIER, ROBERT. Phytochemical flavonols, carotenoids and the antioxidant properties of a wide selection of Fijian fruit, vegetables, and other readily available foods. **Food Chemistry**, v.101, n.4, p.1727-1741, 2007.

LIU, R.; TAM, T.W.; MAO, J.; SALEM, A.; ARNASON, J.T.; KRANTIS, A.; FOSTER, B.C. *In vitro* activity of *Lycium barbarum* (Goji) against major human phase I metabolism enzymes. **J. Complement. Integr. Med.**, v.13, n.3, p.257-265, sep., 2016.

LUO, Q.; CAI, Y.; YAN, J.; SUN, M.; CORKE, H. Hypoglycemic and hypolipidemic effects and antioxidant activity of fruit extracts from *Lycium barbarum*. **Life Sci.**, v.76, p.137-149, 2004.

MARTEL, J.; OJCIUS, D.M.; KO, Y.F.; KE, P.Y.; WU, C.Y.; PENG, H.H.; YOUNG, J.D. Hormetic Effects of Phytochemicals on Health and Longevity. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, n.6, v.30, p.335-346, june, 2019.

MENG, JIAO; LV, ZHENYU; LI, XIAOPENG; SUN, CHUANXIN; JIANG, ZHENGGUO; ZHANG, WANCHANG; CHEN, CHANG. Lycium extracts protect against β amyloid-induced pathological behaviors through UPRmt in transgenic *Caenorhabditis elegans*. **J. Aging Age Relat. Dis.**, v.1, n.1, p.1001, 2017.

MURAKAMI, A. Dose-dependent functionality and toxicity of green tea polyphenols in experimental rodents. **Arch. Biochem. Biophys.**, v.557, p.3-10, 2014.

NOONAN, W. P.; NOONAN, C. Legal requirements for “functional foods” claims. **Toxicology Letters**. v.150, p.1924, 2004.

OUEDRAOGO, MOUSTAPHA; *et al.* Review of current and “omics” methods for assessing the toxicity (genotoxicity, teratogenicity and nephrotoxicity) of herbal medicines and mushrooms. **Journal of Ethnopharmacology**, n.3, v.140, p.492-512, april, 2012.

PENG, Y. *et al.* Quantification of zeaxanthin dipalmitate and total carotenoids in *Lycium*

fruits (Fructus Lycii). **Plant Foods Hum. Nutr.**, v.60, p.161-164, 2005.

POTTERAT, O. Goji (*Lycium barbarum* and *L. chinense*): phytochemistry, pharmacology and safety in the perspective of traditional uses and recent popularity. **Planta Med.**; n.1, v.76, p.7–19, 2010.

RADHIKA, P.R.; SINGH, R.B.M.; SIVAKUMAR, T. Nutraceuticals: an area of tremendous scope. **IJRAP**, v.2, p.400–415, 2011.

RATTAN, S.I. Hormesis in aging. **Ageing Res. Rev.**, v.7, n.1, p.63-78, jan., 2008.

RIECKHER, Matthias; TAVERNARAKIS, Nektarios. P-body and stress granule quantification in *Caenorhabditis elegans*. **BioProtoc.**, n.2, v.7, p.20, january, 2017.

RIVERA, C.A.; FERRO, C.L.; BURSUA, A.J.; GERBER, B.S. Probable interaction between *Lycium barbarum* (goji) and warfarin. **Pharmacotherapy**, v.32, n.3, p.50-53, mar., 2012.

ROBERFROID, M. Functional food concept and its application to prebiotics. **Digestive and Liver Disease.**, v.34, n.2, p.105-10, 2002.

SHAN, XIAOZHONG; ZHOU, JUNLAI; MA, TAO; CHAI, QIONGXIA. *Lycium barbarum* Polysaccharides Reduce Exercise-Induced Oxidative Stress. **Int. J. Mol. Sci.**; v.12, p.1081-1088, 2011.

SOBAL, J.; MARQUART, L. F. Vitamin/mineral supplement use among high school athletes. **Adolescence**, San Diego, v.116, n.29, p.835-843, 1994.

SOMMER, R.J. Evolution of development in nematodes related to *C.elegans* **WormBook**, The C.elegans Research Community, 2005.

WANG, Q.; CHEN, S.; ZHANG, Z. Determination of polysaccharide contents in Fructus Lycii. **Chinese Traditional and Herbal Drugs**, v.22, n.2, p.67-68, 1991.

ZENG, Pengjiao *et al.* The structures and biological functions of polysaccharides from traditional Chinese herbs. **Progress in molecular biology and translational science**, v.163, p.423-444, 2019.