



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS ANTIOXIDANTES DO ARAÇÁ (*Psidium  
cattleianum* Sabine) SOBRE *Caenorhabditis elegans* E SUAS  
IMPLICAÇÕES NA RESISTÊNCIA AO ESTRESSE E LONGEVIDADE**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

Liliana de los Santos Moraes

Uruguaiiana, RS, Brasil  
2017

LILIANA DE LOS SANTOS MORAES

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS ANTIOXIDANTES DO ARAÇÁ (*Psidium cattleianum* Sabine) SOBRE *Caenorhabditis elegans* E SUAS IMPLICAÇÕES NA RESISTÊNCIA AO ESTRESSE E LONGEVIDADE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Strictu sensu* em Bioquímica, da Universidade Federal do Pampa, UNIPAMPA, como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Bioquímica**.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cristiane Casagrande Denardin



*“Desistir... eu já pensei seriamente nisso, mas nunca me levei realmente a sério. É que tem mais chão nos meus olhos do que cansaço em minhas pernas. Mais esperança nos meus passos que tristeza nos meus ombros. Mais estrada no meu coração do que medo na minha cabeça.”*

Cora Coralina

## AGRADECIMENTO

Em primeiro lugar, agradeço a meus pais, Maria do Carmo e *Charão*, que mesmo após tanto sofrimento escolheram me amar, auxiliar e ensinar. São minhas estrelas que mesmo de longe ainda são meu norte.

E porque assim quis o destino, agradeço profundamente à 'Estelita', uma pequena grande mulher que me mostrou tanto da vida com sua sabedoria e amor ao próximo. Mais uma estrela que me cuida e me guia.

André Bairros, meu companheiro de longa jornada, que acredita em mim mais do que eu mesma, que com tamanho amor e carinho me fez (e faz!) correr atrás do melhor, me dando apoio e auxílio incomparável. Sim, eu te amo! Obrigada por tamanha confiança!

Ao Lorenzo, meu amor, minha vidinha, meu filho, meu outro coração. Por ti e para ti eu hei de fazer o melhor, de ser o melhor e de buscar sempre o melhor.

Ao meu outro coração, ainda pequenino, mas forte e pulsante, que dentro de mim, de um jeito inexplicável, me traz ainda mais forças para seguir.

Obrigada pessoal do GBToxCe, que com paciência e disposição compartilhou seu tempo e conhecimento, seus sofrimentos e angústias, além de ouvir meus pedidos e reclamações e auxiliar nos experimentos. Galera querida, que de segunda à segunda, estava ali: Ana Helena, Andreia, Cristiane, Mauricio, Hodara, Eugênia, Jean, William, Ana Thalita, Daiandra. Sem vocês eu não teria conseguido. De coração: MUITO OBRIGADA!

Aos meus amigos, hoje em dia poucos, mas presentes, sinceros, de confiança, que de longe ou de perto muito me ajudam nesta caminhada: Roberta, Géli, Karina, Luana, Fernanda, Adriano, Laura.

Às orientadoras Cristiane Denardin e Daiana Ávila. Graças à Bioquímica cá estamos novamente após a UFSM. Obrigada por todas as conversas (produtivas, acadêmicas ou nostálgicas!), por tanta paciência, compreensão e ensinamento.

Agradeço à UNIPAMPA e ao PPG Bioquímica por esta oportunidade, e aos professores do PPG Bioquímica pelos ensinamentos.

Obrigada a todos que de alguma maneira auxiliaram neste trabalho ou torceram para que ele fosse concretizado.

## RESUMO

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica  
Universidade Federal do Pampa

### **AVALIAÇÃO DOS EFEITOS ANTIOXIDANTES DO ARAÇÁ (*Psidium cattleianum* Sabine) SOBRE *Caenorhabditis elegans* E SUAS IMPLICAÇÕES NA RESISTÊNCIA AO ESTRESSE E LONGEVIDADE**

Autora: Liliana de los Santos Moraes  
Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cristiane Casagrande Denardin  
Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Daiana Silva Ávila  
Local e data da Defesa: Uruguaiana, 06 de março de 2017.

O presente estudo avaliou características e efeitos de extratos de araçá (*Psidium cattleianum* Sabine), uma fruta nativa da região Sul do Brasil que, quando madura, apresenta as variedades amarela e vermelha. Foi realizada a caracterização dos extratos de araçá amarelo e vermelho quanto ao teor total de fenólicos, flavonoides e carotenoides. A atividade antioxidante, *in vitro*, foi determinada pelos métodos de DPPH e FRAP. Ambos os extratos mostraram elevado conteúdo de compostos fenólicos, além de flavonoides e carotenoides, e não apresentaram, entre si, diferenças significativas quanto ao teor de compostos totais ou na atividade antioxidante *in vitro*. Utilizando o nematoide *Caenorhabditis elegans* foi verificada a capacidade antioxidante frente aos agentes estressores peróxido de hidrogênio e juglone, além da mensuração de espécies reativas utilizando-se o método de DCF-DA. Ambos os extratos não causaram toxicidade no organismo nas concentrações testadas (5 a 5000 µg de equivalente de ácido clorogênico/mL), conforme demonstraram as análises de sobrevivência e reprodução, bem como foram capazes de aumentar a longevidade do *C. elegans* em condições normais de manutenção. Mesmo com elevado teor de compostos com reconhecida atividade antioxidante os extratos apresentaram comportamentos diferentes em relação aos agentes estressores, com alguma melhora nos danos gerados, porém não foram suficientes para proteger contra todos os danos causados pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e juglone. Verificamos, também, que possuem a capacidade de reduzir a produção de ERO *per se* e quando expostos ao peróxido de hidrogênio, bem como foram capazes de diminuir a expressão de *hsp-16.2*, o que reflete a capacidade antioxidante de seus compostos. Concluímos, então, que os extratos de araçá amarelo e vermelho possuem uma rica composição de compostos antioxidantes, melhorando a sobrevivência, prolongando a vida útil dos vermes, além de reduzirem a produção de ERO nos vermes tratados.

Palavras-chave: antioxidantes, *Psidium cattleianum*, estresse oxidativo, *Caenorhabditis elegans*

## ABSTRACT

Dissertation of Master's Degree  
Post-Graduation Program in Biochemistry  
Federal University of Pampa

### **EVALUATION OF THE ANTIOXIDANT EFFECTS OF ARAÇÁ (*Psidium cattleianum* Sabine) ON *Caenorhabditis elegans* AND ITS IMPLICATIONS IN RESISTANCE TO STRESS AND LONGEVITY**

Author: Liliana de los Santos Moraes  
Advisor: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cristiane Casagrande Denardin  
Co-advisor: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Daiana Silva Ávila  
Place and Date of Defense: Uruguaiana, March 6<sup>th</sup>, 2017

The present study evaluated the characteristics and effects of araçá extracts (*Psidium cattleianum* Sabine), a native fruit of the southern region of Brazil that, when mature, presents the yellow and red varieties. The yellow and red extracts were characterized in terms of total phenolic, flavonoid and carotenoid content. Antioxidant activity *in vitro* was determined by the DPPH and FRAP methods. Both extracts showed a high content of phenolic compounds, flavonoids and carotenoids and showed no significant differences between them in the total compounds content or *in vitro* antioxidant activity. Using the nematode *Caenorhabditis. elegans* was verified the antioxidant capacity against the stressor agents hydrogen peroxide and juglone, in addition to the measurement of ROS using the DCF-DA method. Both extracts did not cause toxicity in the organism at the concentrations tested (5 to 5000µg chlorogenic acid equivalent/mL) as demonstrated by the survival and reproduction analyzes, as well as were able to increase the longevity of *C. elegans* under normal maintenance conditions. Even with high content of compounds with recognized antioxidant activity the extracts presented different behaviors in relation to the stressors, with some improvement in the damages generated, but they were not enough to protect against all damages caused by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and juglone. We also found that they have the ability to reduce ROS production per se and when exposed to hydrogen peroxide, and were able to decrease the expression of *hsp-16.2*, which reflects the antioxidant capacity of its compounds. We conclude that extracts of yellow and red araçá have a rich composition of antioxidant compounds, improving survival, prolonging the useful life of the worms, and reduce the production of ROS in treated worms.

Keywords: antioxidants, *Psidium cattleianum*, oxidative stress, *Caenorhabditis elegans*

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Revisão bibliográfica</b>	<b>Página</b>
Figura 1: Frutos de araçá amarelo e vermelho	16
Figura 2: Anatomia <i>C. elegans</i>	22
Figura 3: Ciclo de desenvolvimento do <i>C. elegans</i>	23
Figura 4: <i>C. elegans</i> marcado com GFP	24
 <b>Manuscrito</b>	
Table 1. <i>In vitro</i> characterization of yellow and red araçá extracts	35
Figure 1. Analysis of <i>P. cattleianum</i> on <i>C. elegans</i> (N2) survival and reproduction parameters.	37
Figure 2. Lifespan of worms exposed to yellow and red araçá extracts.	38
Figure 3. Survival analysis against H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .	40
Figure 4. Survival analysis against juglone.	41
Figure 5. Effects of extracts on ROS kinetics by the DCF-DA method.	44
Figure 6. CL2070 exposed to thermal stressor after treatment with yellow and red extracts of araçá.	46



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA – análise de variância

*C. elegans* – *Caenorhabditis elegans*

CGC – Caenorhabditis Genetics Center

CAT – catalase

DL<sub>50</sub>- Quantidade de uma determinada substância que é necessária para provocar a morte a pelo menos 50% da população

EO – estresse oxidativo

ERN – espécies reativas de nitrogênio

ERO – espécies reativas de oxigênio

CAE – Equivalentes de Ácido Clorogênico

GFP – *Green fluorescent protein* (Proteína verde fluorescente)

GPx – Glutathione-peroxidase

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – peróxido de hidrogênio

DCFH-DA – diacetato de diclorofluoresceína

NGM – Nematode Growth Media

O<sub>2</sub> – Oxigênio molecular

O<sub>2</sub><sup>•-</sup> – radical superóxido

OH<sup>•</sup> – radical hidroxila

RL – Radical livre

SOD - Superóxido dismutase

TRAP – total reactive antioxidant potential

WHO – *World Health Organization* (Organização Mundial da Saúde)

## SUMÁRIO

	Página
RESUMO	VI
ABSTRACT	VII
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	VII
LISTA DE ABREVIATURAS	IX
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	11
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	14
2.1 Consumo de frutas e benefícios à saúde .....	14
2.2 Araçá ( <i>Psidium cattleianum</i> Sabine) .....	15
2.3 Estresse Oxidativo e Antioxidantes .....	17
2.4 Consumo de Frutas e Estresse Oxidativo .....	19
2.5 <i>Caenorhabditis elegans</i> .....	21
<b>3. JUSTIFICATIVA</b> .....	25
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	26
Objetivo Geral .....	26
Objetivos Específicos .....	26
<b>5. MANUSCRITO</b> .....	28
Abstract .....	29
Introduction .....	30
Materials and Methods .....	31
Results and Discussion .....	34
References .....	47
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	50
<b>7. PERSPECTIVAS</b> .....	51
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	52

## 1. INTRODUÇÃO

Os sistemas biológicos, tanto em processos fisiológicos (morte celular programada) como em mecanismos fisiopatológicos, acabam gerando, por seu próprio metabolismo, variadas espécies de radicais livres (RL), que são substâncias altamente reativas, contendo elétrons desemparelhados, que apresentam capacidade de interagir com as mais variadas moléculas orgânicas (lipídios, DNA, proteínas), podendo causar respostas deletérias (OGA; CAMARGO; BATISTUZZO, 2014). Desta forma, estes radicais livres (sejam eles de oxigênio ou nitrogênio) precisam estar em uma situação de equilíbrio quanto a sua formação e eliminação, de modo a permitir o normal funcionamento celular, sem que ocorra injúria. Situações que promovem o desequilíbrio entre o sistema antioxidante e substâncias oxidantes acabam por gerar alterações celulares, definindo assim o estresse oxidativo (BIANCHI; ANTUNES, 1999; BACK; BRAECKMAN; MATTHIJSENS, 2012), que pode ocorrer devido à diminuição da capacidade de defesa antioxidante ou por aumento das espécies reativas. Um composto antioxidante é aquele capaz de, em pequenas concentrações em relação ao agente oxidante, inibir/ reduzir o processo de oxidação, protegendo as macromoéculas contra os possíveis danos. Assim, estes compostos podem ser classificadas como enzimáticas (catalase – CAT, superóxido dismutase – SOD, glutathione peroxidase – GPx) ou como não enzimáticas, exógenas ou endógenas (carotenóides, polifenóis, glutathione, entre outros) (BACK; BRAECKMAN; MATTHIJSENS, 2012; OGA; CAMARGO; BATISTUZZO, 2014).

Em virtude da grande variedade e da complexidade de compostos antioxidantes (flavonoides, ácidos fenólicos, carotenoides), as frutas são comumente utilizadas para promover melhora na defesa antioxidante, por apresentarem diversos destes compostos (SUCUPIRA et al., 2012), seja por atuarem eliminando os radicais livres e/ou por aumentarem a proteção celular contra o processo de oxidação (MEDINA et al., 2011), evitando danos causados pelo estresse oxidativo. Assim, a já reconhecida relação entre dieta e saúde abordada por inúmeras pesquisas científicas vem analisando mais profundamente o papel dos nutrientes presentes

nos diferentes alimentos, bem como seus efeitos no organismo. Não apenas o consumo regular de frutas, recomendação estabelecida pela OMS, mas o seu aumento, tem sido apontado como um fator benéfico, por sua associação com as defesas antioxidantes e os efeitos sobre os radicais livres gerados (BIANCHI; ANTUNES, 1999), fundamentalmente na relação com a etiologia e evolução de muitas doenças crônico-degenerativas, e, principalmente, relacionados ao envelhecimento (BIANCHI; ANTUNES, 1999; WHO, 2003; MEDINA et al., 2011).

Conforme Rocha et al. (2008) o Araçá (*Psidium cattleianum* Sabine) é uma planta arbórea, frutífera, nativa do Brasil, pertencente à família Myrtaceae, naturalmente encontrada entre Rio Grande do Sul e Bahia. No estado do Rio Grande do Sul tem ocorrência nativa ao longo de todo o território, porém, a EMBRAPA Clima Temperado (Pelotas) desenvolve cultivo e melhoramento destas plantas e busca sua difusão pela comunidade. O araçá apresenta as variedades vermelha e amarela, sugerindo dois morfotipos, de acordo com Rocha et al. (2008), sendo frutos ricos em compostos fenólicos, carotenoides e ácido ascórbico, tendo forte correlação com atividade antioxidante, pela presença destas moléculas de bioatividade conhecida (FETTER et al., 2010). Assim, a suplementação pela dieta promove um aporte de antioxidantes bem relacionado com a melhora na saúde e na prevenção de doenças. Porém, pela disponibilidade de poucos estudos com araçá, bem como de seu extrato, e tendo em vista o potencial de exploração comercial, para alimentação ou uso nutracêutico, além de ser uma alternativa para a agricultura regional (FETTER et al., 2010) foi utilizado o organismo modelo *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) para avaliar a toxicidade e os efeitos antioxidantes dos extratos (amarelo e vermelho) de araçá.

*C. elegans* são nematoides de vida livre, encontrados no solo, não patogênicos, possuem corpo transparente, pequeno tamanho quando adultos (~1mm), curto ciclo de vida, autofecundação (vermes hermafroditas e machos), possuindo código genético completamente mapeado, apresentando elevado grau de homologia com os humanos (BRENNER et al., 1974; KALETTA; HENGARTNER, 2006; MANZANO et al., 2012), e por conta destas características tem sido muito utilizados em variadas pesquisas, incluindo estudos sobre os efeitos de compostos antioxidantes (BACK; BRAECKMAN; MATTHIJSSSENS, 2012; MANZANO et al.,

2012). Além do que *C. elegans* apresenta numerosos genes para proteínas antioxidantes, sendo que muitas cepas mutantes, inclusive marcadas com fluorescência (RODRIGUEZ et al., 2013), permitem análises mais específicas.

Tendo em vista que o consumo de frutas está relacionado a uma melhora na saúde, e sabendo que o araçá apresenta compostos com reconhecida atividade antioxidante, nossa hipótese é que o extrato de Araçá amarelo e vermelho apresente elevadas concentrações de compostos antioxidantes e que seja capaz de promover benefícios ao *C. elegans*, corroborando com redução do estresse oxidativo e promovendo aumento da longevidade, em função da capacidade antioxidante da fruta.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Consumo de frutas e benefícios à saúde

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) a recomendação diária para ingestão de frutas e hortaliças é de 400g ou 5 porções (WHO, 2003), devendo ocorrer regularmente em 5 dias da semana, ou mais.

No Brasil, no entanto, somente 24,1% da população ingere a quantidade recomendada, e entre as mulheres o consumo chega a 28,3%, conforme dados divulgados pelo SEBRAE (2015). Considerando-se o consumo médio de frutas por habitante, o brasileiro ingere 33kg/hab/ano, quando o recomendado seria em torno de 100kg/hab/ano, valor muito baixo, ainda mais quando se verifica que o Brasil é o terceiro maior produtor mundial de frutas, perdendo apenas para Índia e China (SEBRAE, 2015). Quando juntamos os hábitos socioeconômicos e alimentares à diversidade de frutas brasileiras (e suas propriedades e elementos essenciais à saúde) e ao histórico de fome, de casos de desnutrição e desperdício de alimentos percebemos o grande paradoxo existente.

Uma dieta composta por alimentos saudáveis (sejam estas frutas, vegetais e legumes) proporciona boas condições de saúde, e a presença de compostos bioativos (como polifenóis, vitaminas, carotenoides) em frutas exploradas comercialmente, ou ainda pouco consumidas, as torna uma grande fonte de substâncias protetoras, dotadas de propriedades antioxidantes, que atuarão como defesa frente aos radicais livres gerados no organismo (SUCUPIRA et al., 2012).

O aumento no consumo e sua regularidade associados às características nutricionais das frutas e hortaliças, estão relacionados à prevenção de deficiências micronutricionais, mas principalmente de diversas doenças crônicas não transmissíveis como diabetes, doenças cardiovasculares, obesidade e até cânceres, que contabilizam anualmente milhões de mortes em todo o mundo (WHO, 2003). Estima-se que 1,7 milhões de vidas poderiam ser potencialmente salvas anualmente se o consumo de frutas e hortaliças pudesse ser aumentado (WHO, 2011). As doenças crônicas, no Brasil, representam a causa de 72% das mortes e estão

intimamente relacionadas aos fatores de risco como hipertensão, diabetes, sedentarismo, excesso de peso e obesidade (BRASIL, 2014). E alguns destes fatores têm direta relação com o tipo de alimentos ingeridos pela população.

Como iniciativas da OMS estão estimular o hábito de uma dieta saudável, com consumo regular de frutas, incentivar adoção de políticas públicas e campanhas e implantação de programas de promoção, produção e consumo de frutas e hortaliças, além de pesquisas com frutas de diversas regiões do mundo para evidenciar os benefícios na saúde. Assim, com o incentivo de programas de saúde pública e com adoção de uma dieta saudável, com maior consumo de frutas ricas em compostos antioxidantes (resveratrol, ácido clorogênico,  $\beta$ -caroteno, vitamina C e E) será possível melhorar a saúde, além do papel protetor contra doenças como hipertensão, diabetes e câncer (DUYN; PIVONKA, 2000). Em sociedades com crescente incidência de doenças relacionadas à idade, pelo aumento no número de idosos, se faz necessária a busca por substâncias naturais que possam, como meio de prevenção, ser usadas com finalidade terapêutica (KOCH et al., 2014).

## **2.2 Araçá (*Psidium cattleianum* Sabine)**

No Brasil, país de dimensões continentais, e com o mais rico bioma mundial, existe um grande número de frutas nativas, consideradas muitas vezes como exóticas (SUCUPIRA et al., 2012), seja pelo formato, gosto ou valor. Algumas já são bem conhecidas, cujos frutos podem ser consumidos e são potencialmente utilizadas como: goiaba (*Psidium guajava*), açaí (*Euterpe oleraceae* Mart.), graviola (*Annona muricata* L.) e pitanga (*Eugenia uniflora* L.) (Brasil, 2015; MEDINA et al., 2011), porém outras tantas apresentam inúmeras possibilidades de uso e pesquisa, mas ainda com utilização e consumo limitados (FETTER et al., 2010).

Entre as várias frutas nativas da nossa flora, e com potencial econômico, se destaca o Araçá (*Psidium cattleianum* Sabine), também conhecido como “araçá do mato, araçá rosa” que, de acordo com Rocha et al. (2008) e Franzon et al. (2009), é uma planta arbórea (de 2 a 5 metros de altura), frutífera e que pertence à família Myrtaceae, ocorrendo naturalmente nas regiões compreendidas entre os estados da

Bahia e Rio Grande do Sul, se adaptando facilmente a uma variedade de climas. No Rio Grande do Sul esta fruta tem ocorrência ao longo de todo o estado, mas o Centro de Pesquisa da EMBRAPA Clima Temperado (Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil) desenvolve o melhoramento genético desta planta buscando, também, difundí-la entre a comunidade.

Os frutos do araçazeiro são pequenas bagas (aproximadamente 2 cm), com polpa translúcida e carnosa, que apresentam duas variedades quando maduras, amarelo e vermelho (Figura 1), o que sugere a existência de dois morfotipos, de acordo com Rocha et al. (2008) e Fetter et al. (2010). Os frutos amarelo e vermelho da EMBRAPA Clima Temperado são referentes aos cultivares “Ya-cy” e “Irapuã”, respectivamente, conforme Biegelmeyer et al. (2011) e Franzon et al. (2009). São considerados frutos com forte atividade antioxidante, devido à presença de moléculas de bioatividade conhecida (FETTER et al., 2010), sendo ricos em compostos fenólicos, carotenoides e ácido ascórbico (MEDINA et al., 2011), sendo este último em quantidade até quatro vezes maior do que nas frutas cítricas (RIBEIRO et al., 2014).



FIGURA 1 – Frutos de araçá amarelo e vermelho. (obtidos, respectivamente, de: <https://www.embrapa.br/clima-temperado/busca-de-imagens/-/midia/640003/araca> e [http://www.specialtyproduce.com/produce/Strawberry\\_Guavas\\_8731.php](http://www.specialtyproduce.com/produce/Strawberry_Guavas_8731.php).)

Com pesquisas acerca da composição do araçá e sua caracterização (BIEGELMEYER et al., 2011; MEDINA et al., 2011), e tendo em vista o potencial de exploração comercial, para uso como alimento funcional (ou nutracêutico) e uso na



indústria farmacêutica e de alimentos (RIBEIRO et al., 2014; FRANZON et al., 2009), o araçá se constitui em uma alternativa para a agricultura regional com boas perspectivas econômicas (FETTER et al., 2010; FRANZON et al., 2009). Na medicina popular, o uso do araçá tem sido indicado no tratamento de hemorragias e diarreia (DENARDIN et al., 2015), mas deve-se considerar que ainda há limitada informação científica disponível quanto aos seus efeitos, além de uma carência de estudos visando sua utilização na forma de extrato ou explorando sua utilização em modelos experimentais, tanto para avaliação farmacológica quanto toxicológica.

### **2.3 Estresse Oxidativo e Antioxidantes**

Os diversos sistemas biológicos geram, por via endógena, Radicais Livres (RL) tanto em processos fisiológicos celulares (ex., durante morte celular programada, fosforilação oxidativa mitocondrial, considerada como a principal fonte de espécies reativas), quanto em mecanismos fisiopatológicos (como o envelhecimento), por ação de cicloxigenases, peroxidases, desidrogenases e sistemas de transporte de elétrons. Diferentes fontes exógenas também podem ser geradoras de RL, como é o caso da poluição ambiental, solventes, radiações ultravioleta (UV), pesticidas e íons metálicos (BIANCHI; ANTUNES, 1999; SOARES, 2002; HEIDLER, 2009).

Os RL são substâncias altamente instáveis, devido à presença de elétrons desemparelhados, e por isso são muito reativas (BIANCHI; ANTUNES, 1999; OGA; CAMARGO; BATISTUZZO, 2014). Muitos destes RL são espécies reativas de oxigênio (ERO) como  $O_2^{\cdot-}$  (radical superóxido),  $OH^{\cdot}$  (radical hidroxila),  $ROO^{\cdot}$  (radical peroxila) e  $H_2O_2$ , (peróxido de hidrogênio), que apesar de não ser um radical é um composto altamente reativo facilmente convertido em radicais. Assim o oxigênio apresenta toxicidade em decorrência da formação dessas espécies reativas; mas há outras espécies reativas contendo nitrogênio (ERN), como exemplo,  $NO^{\cdot}$  (óxido nítrico), peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) e cloro como  $Cl_2$  (gás de cloro) (HALLIWELL; WHITEMAN, 2004). Por possuírem a capacidade de interagir com as mais variadas moléculas orgânicas (lipídios, proteínas, DNA), e apesar de serem necessários para

os processos fisiológicos (em pequenas concentrações, para a transdução celular de sinalização na proliferação ou resposta imune) (KOCH et al., 2014), os radicais livres podem causar sérios danos ao organismo e, portanto, precisam estar em equilíbrio quanto à sua formação e detoxificação.

Estresse oxidativo (EO) é a situação em que ocorre um desequilíbrio entre o sistema de defesa antioxidante e a produção de espécies reativas, em favor de um estado pró-oxidativo, causando alterações celulares (BIANCHI; ANTUNES, 1999; HALLIWELL; WHITEMAN, 2004; BACK; BRAECKMAN; MATTHIJSSSENS, 2012; HEIDLER, 2009), seja por uma diminuição da capacidade das defesas antioxidantes ou por aumento na produção das espécies reativas (oxidantes), radicalares ou não, podendo potencialmente ocasionar lesões em macromoléculas (OGA; CAMARGO; BATISTUZZO, 2014). Quando ocorre o desequilíbrio entre antioxidantes e pró-oxidantes, e o sistema de defesa não foi capaz de reverter o processo oxidativo, pode-se dizer, conforme Halliwell e Whiteman (2004), que um dano a biomoléculas foi causado por ação direta das espécies reativas durante o estresse oxidativo, caracterizando assim o dano oxidativo, que pode resultar em desfechos distintos como adaptação, injúria ou inclusive na morte celular.

Pela produção contínua de radicais livres (e espécies reativas) que podem lesar as células, o organismo desenvolveu seus próprios mecanismos de defesa antioxidante. Sendo assim, uma substância antioxidante é considerada qualquer substância com capacidade de inibir ou reduzir significativamente o processo de oxidação, mesmo quando presente em pequenas concentrações em relação ao substrato oxidável, protegendo, desta forma, as macromoléculas contra possíveis efeitos potencialmente danosos (HALLIWELL; WHITEMAN, 2004; OGA; CAMARGO; BATISTUZZO, 2014). Conforme a capacidade antioxidante, a substância pode ser considerada um “scavenger” quando consegue transformar um RL em outro, porém quimicamente menos reativo, ou ainda pode ser um “quencher”, quando age neutralizando completamente o radical livre.

Portanto, muitas substâncias possuem esta capacidade antioxidante mesmo apresentando grande heterogeneidade estrutural. Dessa forma, os antioxidantes atuam por diferentes mecanismos de defesa e podem ser divididos em duas categorias: enzimáticos (como exemplos, superóxido dismutase – SOD, catalase –

CAT, glutathiona peroxidase – GPx) e não enzimáticos (endógeno como a glutathiona ou exógenos como os carotenóides, polifenóis, vitaminas) (BIANCHI; ANTUNES, 1999; OGA; CAMARGO; BATISTUZZO, 2014). Os compostos não enzimáticos com ação antioxidante, que podem quimicamente promover inativação de ERO, são comumente encontrados em verduras e frutas, nas mais variadas concentrações e combinações.

## **2.4 Consumo de Frutas e Estresse Oxidativo**

É notório que a correria da vida moderna bem como o processo de industrialização promoveram uma mudança no estilo de vida e no padrão alimentar da população, na medida em que se diminuiu o tempo para as refeições e se aumentou a oferta de “fast-foods” e de produtos industrializados (geralmente muito calóricos, com sal e açúcar em excesso) que permitem rápido consumo, muitas vezes incentivados pela mídia.

Assim, na busca por saúde, as recomendações de profissionais da saúde, sejam médicos, nutricionistas ou educadores físicos, incluem prática de exercícios, redução dos níveis de colesterol e mudança de hábitos, como parar de fumar. Mas uma recomendação é consenso e se apresenta como a principal: adoção de uma dieta saudável, com menor ingestão de sal e gorduras, dando preferência ao consumo de produtos de origem natural, vegetais e frutas.

Inúmeras pesquisas científicas vêm analisando mais profundamente o papel dos nutrientes presentes nos diferentes alimentos, bem como seus efeitos no organismo. Pela praticidade as frutas ainda são uma boa alternativa alimentar, pois são fáceis de carregar, não requerem utensílios elaborados e tem um custo acessível, principalmente quando se comparam os benefícios de seu consumo, que de acordo com SUCUPIRA et al. (2012) se dá pela ação antioxidante inerente à presença de compostos fitoquímicos diversos. E conforme Soares (2002), pela possibilidade de ocorrência de problemas devido ao consumo de antioxidantes sintéticos (ex, BHT – butilhidroxitolueno), muitas pesquisas tem se voltado para a

procura de efeitos antioxidantes de substâncias naturais, para consumo ou uso na indústria de alimentos.

Compostos antioxidantes de ocorrência natural como vitaminas (ácido ascórbico e tocoferol, respectivamente, vitamina C e E), compostos fenólicos (ácido clorogênico), flavonoides (quercetina, catequina) e carotenoides ( $\beta$ -caroteno), estão distribuídos em muitas frutas, verduras e também legumes (BIANCHI; ANTUNES, 1999; SUCUPIRA et al., 2012). Tais substâncias consideradas de ação antioxidante são metabólitos secundários sintetizados pelas plantas, tendo nelas uma variedade de funções, mas principalmente de defesa contra patógenos, as quais apresentam uma possível relação com efeito medicinal para os seres humanos (VIZZOTO; KROLOW; WEBER, 2010). Assim, por possuírem diversos destes compostos, as frutas são utilizadas para promover melhora nas defesas antioxidantes, seja por atuarem na eliminação dos radicais livres e/ou aumentando a proteção celular contra os processos de oxidação (MEDINA et al., 2011), na tentativa de evitar ou minimizar os danos e as lesões celulares causados pelo estresse oxidativo, relacionados a várias doenças (BIANCHI; ANTUNES, 1999).

Estudos diversos mostram a relação entre os compostos bioativos presentes nas frutas, e produtos naturais, e os benefícios das substâncias antioxidantes frente ao envelhecimento, em doenças crônicas como diabetes, câncer, doenças cardiovasculares ou por ação imunomoduladora, antiinflamatória, antiproliferativa, entre outras (MEDINA et al., 2011; TANG et al., 2012; JING et al., 2013).

Em estudo utilizando mirtilo ou blueberry, um fruta rica em antioxidantes, Tan et al. (2016) verificou, em ratos transgênicos, que a administração do extrato de mirtilo mostrou melhora nas funções cerebrais da Doença de Alzheimer, com efeitos benéficos tanto na melhora da aprendizagem quanto na memória. Já, em um estudo em mulheres hipertensas ou pré-hipertensas pós-menopausa, Johnson et al. (2015) mostrou o efeito da administração de blueberry em pó, onde constatou diminuição da pressão arterial e redução da rigidez da parede arterial, o que em parte pode ter ocorrido pelo aumento de óxido nítrico. De forma semelhante, o composto polifenólico resveratrol, conforme recente trabalho realizado em cultura de células humanas endoteliais coronarianas e publicado por Huang et al. (2017), atenua o processo inflamatório vascular através de regulação da autofagia, indicando efeitos

benéficos no sistema cardiovascular, podendo ser uma terapia adjuvante ou alternativa para lesões arteriais coronarianas na Doença de Kawasaki (doença cardíaca adquirida, em crianças).

O estudo feito com células estreladas hepáticas ativadas, conduzido por Denardin et al. (2014), mostrou o efeito citotóxico e antiproliferativo do extrato de pitanga roxa (*Eugenia uniflora* L.), relacionado à presença de compostos fenólicos, podendo ser utilizado como uma futura terapia em doenças hepáticas como fibrose e cirrose.

Assim, considerando a fruta araçá (*Psidium cattleianum* Sabine), já foram feitos alguns estudos, como o realizado por Scur et al. (2016) para analisar atividade antimicrobiana e antioxidante das folhas, na formulação de óleos e extratos; e para análise antimicrobiana de extrato de folhas contra micro-organismos da mucosa oral feito por Alvarenga et al. (2016). Outro estudo, porém utilizando extrato da fruta foi conduzido por Medina et al. (2011), que mostrou o efeito antiproliferativo e antimicrobiano, além de atividade antioxidante, devido à composição química, provavelmente relacionada aos diversos compostos fenólicos presentes.

## **2.5 *Caenorhabditis elegans***

Mesmo com um grande conhecimento sobre as reações de estresse oxidativo e dano oxidativo, estudados em modelos como roedores e até em organismos mais complexos como os mamíferos, há um apelo da comunidade em geral, não apenas científica, em utilizar organismos alternativos para pesquisa, como a *Drosophila melanogaster* (mosca da fruta), o ‘zebrafish’ *Danio rerio* (peixe) e o *Caenorhabditis elegans* (verme não parasita) (STRANGE, 2016). De acordo com publicação do diretor e conselheiro do NIH (National Institute of Health, EUA), Dr. Michael Lauer (2016), até os dias atuais estes organismos considerados modelos ainda são alvo de muitos estudos científicos.

O organismo *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*), inicialmente pesquisado por Sydney Brenner e que publicou informações no trabalho “A genética do *Caenorhabditis elegans*”, vem sendo alvo de estudo desde os anos de 1970 em

laboratórios de pesquisa ao redor do mundo. O *C. elegans* é um nematódeo de solo, de vida livre, de pequeno tamanho (mede ~1mm quando adulto), possui corpo transparente (facilitando visualização e manipulação), tem rápido ciclo de vida (em torno de 3 semanas) e de reprodução (~3 dias), mostra constância no número e na posição de células (total de 959 células somáticas, sendo 302 neurônios), apresentando fácil cultivo e manutenção no ambiente laboratorial (BRENNER, 1974). Apresentam indivíduos hermafroditas e machos, que em condições laboratoriais controladas se desenvolvem em temperatura de 20-22°C, em placas de *Petri* com meio ágar e alimentam-se da bactéria *E. coli* (STRANGE, 2016) (Figura 2).

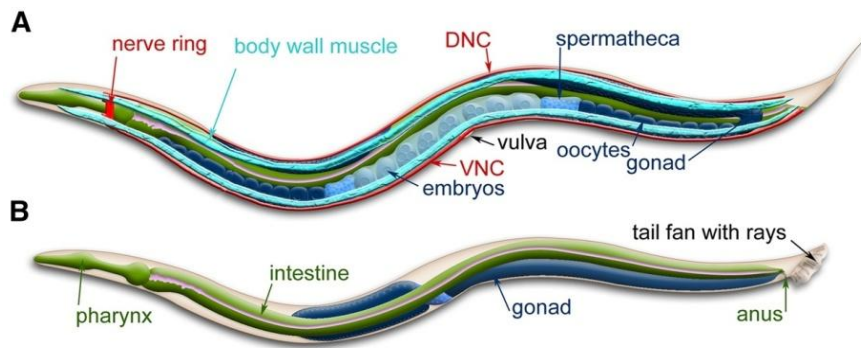


FIGURA 2 – Anatomia do *C. elegans*. (A) hermafrodita e (B) macho. Modificado de: [http://www.wormbook.org/chapters/www\\_celegansintro/celegansintro.html](http://www.wormbook.org/chapters/www_celegansintro/celegansintro.html)

O ciclo completo de desenvolvimento do *C. elegans*, visualizado na Figura 3, é composto de quatro estágios larvais (L1, L2, L3 e L4) culminando na fase adulta, que configura então a fase reprodutiva, com postura de ovos (aproximadamente 300, mas quando fecundado por um macho a postura pode chegar a 1000 ovos). Porém, quando há restrição de alimentos, ou elevada densidade populacional, os vermes em estágio L1 são ‘desviados’ do desenvolvimento normal gerando indivíduos *dauer*, que são mais resistentes a condições adversas, sofrendo uma pausa em seu desenvolvimento.

Possui com os mamíferos um elevado grau de homologia quando se comparam os genomas, atingindo 60-80% de semelhança com os genes humanos (BRENNER et al., 1974; KALETTA; HENGARTNER, 2006), sendo que dentre os organismos multicelulares, *C. elegans* foi o primeiro a ter o genoma sequenciado na

íntegra (STRANGE, 2016), o que o torna uma interessante e poderosa ferramenta para estudo de vias orgânicas complexas de resposta ao estresse (XIONG et al., 2014) e servindo, conforme citou Rodriguez et al. (2013) e Kaletta e Hengartner (2016) como modelo para estudo de doenças que acometem os humanos como diabetes, cânceres, Doenças de Huntington, de Alzheimer e de Parkinson. Tais características tornam-se vantagens frente ao uso de outros modelos de laboratório, com grande potencial para testes avaliando a toxicidade e vias metabólicas.

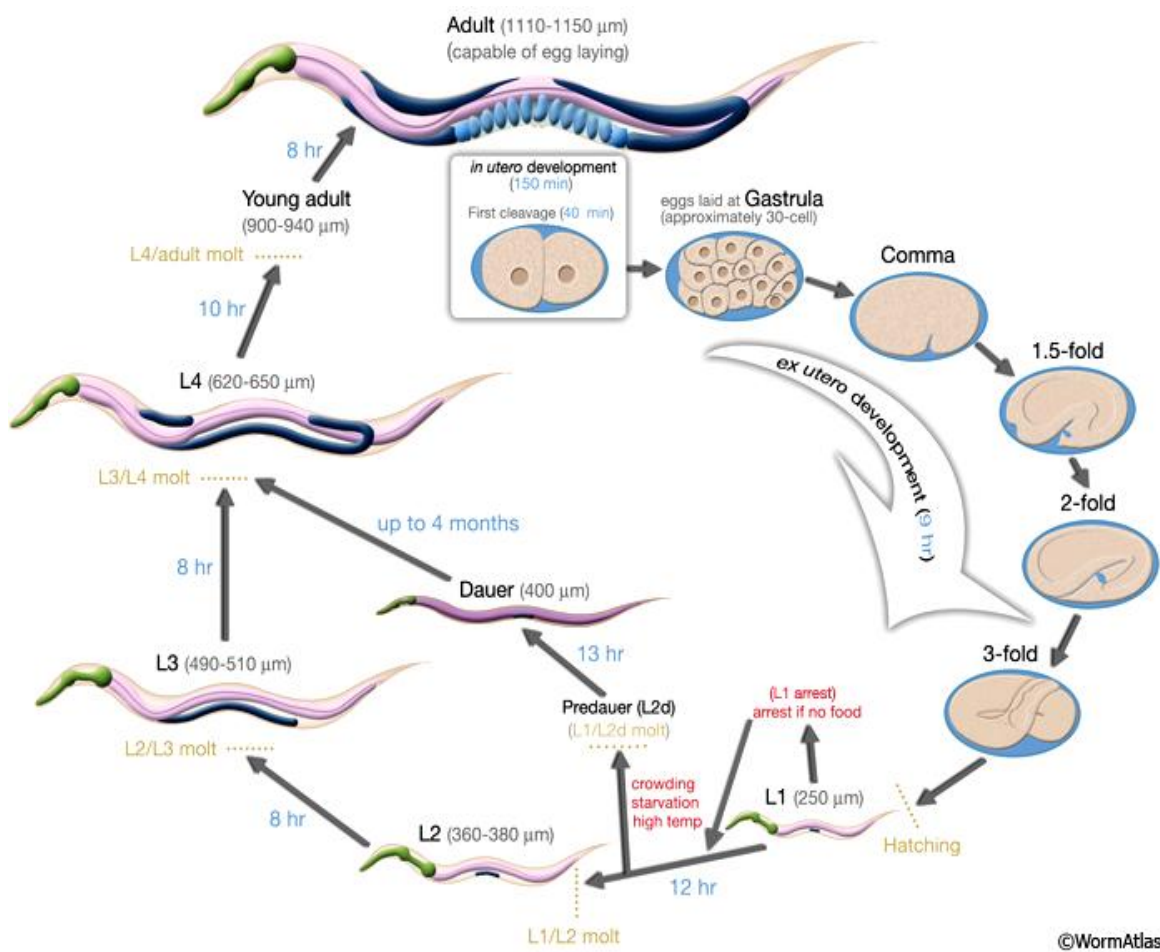


FIGURA 3 – Fases do ciclo de desenvolvimento do *C. elegans*. Disponível em: <http://wormatlas.org/hermaphrodite/introduction/IMAGES/introfig6leg.htm>

Devido a tal aplicabilidade, descobertas e pesquisas possibilitaram a geração de organismos mutantes marcados com a proteína verde fluorescente (green

fluorescent protein – GFP). Assim, a produção de cepas marcadas com GFP (Figura 4), por Martin Chalfie (1994), foi capaz de permitir a visualização *in vivo*, através de microscopia de fluorescência, de reações causadas por tratamentos bem como por agentes estressores.

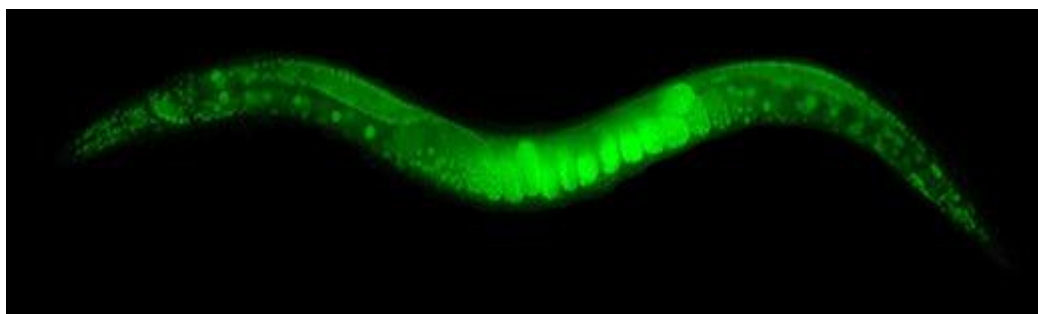


FIGURA 4 – *C. elegans* expressando marcação com GFP. Obtida de: <http://wormcas9hr.weebly.com/>

Assim, inúmeras cepas mutantes encontram-se disponíveis para pesquisa, nem todas marcadas com GFP, mas ainda permitindo análises mais direcionadas, devido a alterações específicas. Cepas com mutações em determinadas proteínas (enzimas SOD – *sod-1*), vias metabólicas de grande importância (via de sinalização da insulina – *daf-16*) (RODRIGUEZ et al., 2013) ou que permitam uma visualização fenotípica (corpo com enrolamento – *rol-6*).

Tendo este aparato disponível, fica acessível o estudo dos efeitos do estresse oxidativo afetando os diversos sistemas, enzimas e vias sinalizadoras em pesquisas utilizando compostos bioativos de plantas e frutas em *C. elegans*, conforme é possível ver no estudo feito por Xiong et al. (2014), onde foram utilizados agentes osmóticos, choque térmico e radiação ultravioleta (UV) como fonte de estresse. Além destes, e também utilizados em *C. elegans* estão paraquat (herbicida) e peróxido de hidrogênio (RODRIGUEZ et al., 2013; LI et al., 2016) e juglone (5-hidroxi-1,4-naftoquinona) (DE CASTRO; DE CASTRO; JOHNSON, 2004; ZHANG et al., 2009), agentes químicos pró-oxidantes, envolvidos na geração de ERO, para avaliação de estresse oxidativo em diversos ensaios *in vivo*. Dessa forma o *C. elegans* oferece possibilidades promissoras de pesquisa utilizando metabólitos secundários de plantas (flavonoides, fenólicos) para analisar a influência em diversos processos.



### 3. JUSTIFICATIVA

A utilização de compostos naturais com finalidade terapêutica na busca por melhorias na saúde tem dado origem a inúmeras pesquisas, cujos resultados poderão ser utilizados para aumentar a propaganda e conscientizar um maior número de pessoas a consumir mais frutas, como o araçá, que são pouco conhecidas pela população em geral. O Araçá (*Psidium cattleianum* Sabine), planta nativa da região, possui composição química já conhecida, possuindo compostos com ação terapêutica e nutricional, porém pouco se sabe sobre os efeitos antioxidantes e farmacológicos de extratos das suas frutas. Assim, torna-se de grande importância a avaliação da toxicidade e dos efeitos antioxidantes dos extratos das frutas do araçazeiro. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito antioxidante do extrato da fruta Araçá sobre o organismo *C. elegans* e suas implicações na resistência ao estresse e longevidade.

## 4. OBJETIVOS

### Objetivo geral:

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito antioxidante do extrato da fruta Araçá (*Psidium cattleianum* Sabine) amarelo e vermelho sobre o organismo *C. elegans* e suas implicações na resistência ao estresse e longevidade.

### Objetivos específicos:

- Caracterizar o extrato etanólico de araçá amarelo e vermelho, quanto ao teor de compostos fenólicos totais, flavonoides totais e carotenoides totais;
- Verificar a capacidade antioxidante *in vitro* do extrato de araçá amarelo e vermelho, usando os métodos de captura do radical DPPH e técnica de FRAP;
- Analisar no *C. elegans* os parâmetros de sobrevivência, longevidade e reprodução para determinar o efeito *per se* dos extratos e avaliar a toxicidade;
- Verificar o efeito dos extratos de araçá amarelo e vermelho sobre situações de pré e/ou pós-exposição aos agentes estressores peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e juglone (5-hidroxi-1,4- naftoquinona) em *C. elegans*;
- Analisar o efeito dos extratos amarelo e vermelho sobre a expressão do gene *hsp-16.2*, para avaliar o estresse oxidativo sob condição de estresse térmico, utilizando a cepa mutante do *C. elegans* (CL2070).

## 5. MANUSCRITO

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados na forma de manuscrito. As seções *Materiais e Métodos*, *Resultados e Discussão* e *Referências Bibliográficas* encontram-se no próprio manuscrito, sendo que este se encontra em fase final de elaboração para submissão.

## MANUSCRITO

**Investigation of protective effects of the araçá fruit extracts  
(*Psidium cattleianum* Sabine) on stress resistance in  
*Caenorhabditis elegans***

*Liliana Moraes<sup>1</sup>, Ana Helena Dal Forno<sup>1</sup>, Andréia Tambara<sup>1</sup>, Hodara Motta<sup>1</sup>,  
Mauricio Jacques<sup>1</sup>, Jean Boldori<sup>1</sup>, Márcia Vizzotto<sup>2</sup>, Daiana Silva de Ávila<sup>1</sup>,  
Cristiane Casagrande Denardin<sup>1\*</sup>*

**Affiliation**

<sup>1</sup> Grupo de Pesquisa em Bioquímica e Toxicologia em *Caenorhabditis elegans* (GBToxCe), Universidade Federal do Pampa - UNIPAMPA Campus Uruguaiana, CEP 97500-970, Uruguaiana, RS, Brazil

<sup>2</sup> Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS, Brazil.

\*Corresponding author:

Cristiane Casagrande Denardin  
Universidade Federal do Pampa - UNIPAMPA  
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica  
BR 472 – Km 592 – Caixa Postal 118  
CEP 97500-970 Uruguaiana /RS

e-mail: cristiane\_denardin@yahoo.com.br

## Abstract

This study was aimed to evaluate the composition and effects of ethanolic extracts of araçá (*Psidium cattleianum* Sabine), a little explored native fruit of the southern region of Brazil that is found at yellow and red colored berry varieties when ripe. The characterization of the extracts was performed in terms of total phenolic, flavonoid and carotenoid content. Antioxidant activity *in vitro* was determined by the DPPH and FRAP methods. Both extracts showed a high content of phenolic compounds (67693.29 µg CAE/mL and 61323.26 µg CAE/mL for yellow and red) and had no significant differences between them in the total compounds content or antioxidant activity. *C. elegans*, a model organism, was used to verify the antioxidant capacity against the stressor agents hydrogen peroxide and juglone, in addition to the measurement of ROS using the DCF-DA method (yellow fruit extract showed better ROS scavenging properties than red extract). Extracts did not cause toxicity to worms up to the concentration tested (5mg CAE/mL) as demonstrated by the survival and reproduction assays, as well as were able to increase the longevity of *C. elegans* under normal conditions, more pronounced in red. Even with high content of compounds with recognized antioxidant activity they presented different behaviors against the stressors, with some improvement in the damages generated, but they were not enough to protect against all damages caused by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and juglone. We also found that they have the ability to reduce ROS production per se and when exposed to hydrogen peroxide, and were able to decrease the expression of *hsp-16.2*, reflecting the antioxidant capacity of its compounds. We conclude that extracts of yellow and red araçá have a rich composition of antioxidant compounds, improving survival, prolonging the lifespan, and reducing the ROS production in treated worms.

Keywords: *Caenorhabditis elegans*, antioxidant, *Psidium cattleianum*, native fruit

## 1. INTRODUCTION

In the Brazilian market, as well as in the world, there is a growing consumption of fruits, in part by the WHO recommendation on the daily intake of fruits and vegetables, but mainly by the recognition of the bioactive properties of its compounds in promoting potential health benefits. The regularity in consumption in association with nutritional characteristics has a strong relation with the prevention of chronic diseases such as diabetes, cancers and cardiovascular diseases (WHO, 2003). Due to the variety and quantity of phenolic compounds and flavonoids, with antioxidant action present in fruits they are the choice to promote an improvement in antioxidant defenses (SUCUPIRA et al., 2012).

In this way, the biodiversity of the Brazilian biome allows the use of a great variety of plants, fruits and extracts, little or not yet explored, offering the opportunity to discover bioactive compounds, with potential to promote health benefits (INFANTE et al., 2016). Some native fruits are already consumed and potentially used, such as guava (*Psidium guajava*), açai (*Euterpe oleraceae* Mart.) and pitanga (*Eugenia uniflora* L.) (MEDINA et al., 2011; BRASIL, 2015).

Araçá (*Psidium cattleianum* Sabine), known as strawberry guava, is a native fruit of Brazil, belonging to Myrtaceae family, found along Rio Grande do Sul and Bahia, showing two botanical varieties which produces red and yellow berries. Few studies have been made concerning fruits of araçá, about the composition, scavenging capacity against reactive oxygen species and its biological properties (BIEGELMEYER et al, 2011; RIBEIRO et al., 2014; MEDINA et al., 2011), but it is still poorly characterized.

The *Caenorhabditis elegans* model has been increasingly used in the evaluation of beneficial or toxic substances (natural or synthetic) in biological processes, as well as helping in the study of new targets for pharmacological interventions (KALETTA, HENGARTNER, 2006), being a valuable model for assessment of diseases affecting humans.

The aim of this study was to evaluate the composition and *in vitro* antioxidant capacity of Araçá extract (yellow and red) and the effects in the model organism *C.*

*elegans* by the evaluation of parameters such as survival, longevity and reactive species production.

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1 Fruit and extract formulation

Samples of yellow and red araçá fruits (*Psidium cattleianum* Sabine), harvested 2013/2014 in the mature stage, were obtained from EMBRAPA Temperate Climate (Pelotas, RS, Brazil) and immediately frozen. The fruits (pulp, peel and seeds) were chopped and weighed, diluted in 95% ethanol and, under light protection, homogenized for 5 minutes in UltraTurrax®, followed by magnetic stirring for 30 minutes. Samples were centrifuged for 5 min at 3000 rpm. The supernatant was collected and stored in a vial protected from light, and the extraction procedure was repeated twice. All the supernatant obtained were mixed and dried in a vacuum rotavapor apparatus at 40-45°C, resuspended in distilled water and frozen.

Both extracts were used for the determinations of antioxidant compounds, for evaluation of the antioxidant capacity and for trials in *C. elegans*.

### 2.2 In vitro assays - Characterization and evaluation of the antioxidant potential of extracts

2.2.1 Characterizations assay: 1) Total phenolic content was performed by Folin-Ciocalteu method, described by Swain and Hillis (1959), using Folin-Ciocalteu solution 0.25N e Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1N, and gallic acid standard curve. Absorbance was read at 725 nm with a spectrophotometer and results were expressed as (µg chlorogenic acid equivalent – CAE/mL; 2) Total flavonoids were measured according to the AlCl<sub>3</sub> colorimetric method, by Marinova, Ribarova e Atanassova (2005), using NaNO<sub>2</sub> 5%, AlCl<sub>3</sub> 10% e NaOH 1M, and a quercetin solution as standard. Absorbance was measured at 510 nm in spectrophotometer and results were expressed as µg quercetin equivalent/mL; 3) Total carotenoids were determined by extraction with ethyl acetate and petroleum ether, a method described by Rodrigues-Amaya (1999), in spectrophotometer at 450nm and expressed as µg of β-carotene/mL extract.

2.2.2 Tests for antioxidant activity: 1) DPPH method described by Rufino et al. (2007) using a spectrophotometer at 515 nm. The concentration providing 50% inhibition of DPPH absorbance ( $EC_{50}$ ) was calculated and the results were expressed as  $EC_{50}$  g/L; 2) FRAP technique, which evaluates the iron reduction capacity ( $Fe^{3+} \rightarrow Fe^{2+}$ ), by Pulido et al. (2000) at 595nm in spectrophotometer. Results were expressed as mol  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  /mL extract.

### 2.3 *In vivo* assays – Effects of extracts on *C. elegans* parameters

#### 2.3.1 Maintenance of *C. elegans* and synchronization

Strains Bristol N2 (wild type) and CL 2070 (dvl1s70 [hsp-16.2p::GFP + rol-6(su1006)]) were obtained from CGC (*Caenorhabditis* Genetics Center, Minnesota), kept at 20°C, in Petri dishes containing Nematode Growth Medium, and *E. coli* OP50 bacteria as food source, as described by Brenner (1974).

Synchronization process (STIERNAGLE, 2006) to obtain eggs from pregnant adult worms using bleaching solution (10M NaOH; 1% NaOCl) with vigorous shaking. After 12-14hours worms at L1 stage are available for treatment.

#### 2.3.2 Lethal dose ( $LD_{50}$ ):

Was performed with doses ranging from 50 to 5000  $\mu$ g CAE/mL. Two thousand L1 worms were treated for 30 min at 22°C with both extract by constant agitation followed by three washes with buffer M9 after the incubation. Worms were placed on NGM plates seeded OP50 and at 24 hours post exposure live worms were counted.

#### 2.3.3 Effects of extracts on survival, egg laying and longevity:

Two thousand L1 worms were exposed to the treatment for 30 minutes, under constant stirring, in liquid medium with extracts (50, 100, 250 and 500  $\mu$ g CAE/mL) and M9 buffer solution. Control group without extract. The treated worms were plated with NGM medium and *E. coli* OP50 incubating at 22°C for 24 hours. After, the worms were counted to check the survival rate compared to the control group.

The egg viability test (or brood size) was done 48h after the treatment and allows to verify alterations in the reproduction. One worm from each plate was transferred to a



new NGM plate with *E. coli*. The larvae (from hatching eggs) were counted daily for 3-4 days, with the result expressed as a percentage of the control group.

For longevity analysis: after treatment as previously described 20 worms were transferred from each plate (control and treated) to new NGM plates with *E. coli*, daily counting live worms and transfer to new plates every two days, until all the worms have died.

#### *2.3.4 Oxidative stress resistance assays:*

Worms treated with the extracts were exposed to oxidative agents, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and juglone (5-hydroxy-1,4-naphthoquinone).

In the assay to evaluate the protective effect of the extract, the L1 worms, previously treated with the extracts were exposed, in liquid medium, to peroxide hydrogen (0.5mM) for 30min at 22°C. In the test to visualize the possible effect of damage reversal, the worms were first exposed to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at 22°C for 30 min and then treated with the extract. After 24h the worms alive were counted.

Tests using juglone were done only for previously treatment with extracts and after expose to oxidative agent to evaluate the protective effect, because the high toxicity of this compound. Two thousand L4 worms were treated for 30 min with extracts and then exposed to juglone (100µM) for 2h, after were plated with NGM medium and *E. coli* OP50 and alive worms were counted after 24h.

#### *2.3.5 Intracellular ROS measurement:*

Synchronized wild-type L1 worms (5.000) were acutely treated with the extracts from, yellow or red colored berries, as previously described. A widely fluorescent probe for ROS detection, DCFH-DA (dichlorodihydrofluorescein diacetate) was added and allowed to stir for 1h, in the dark, at a final concentration of 500 µM, according to Bornhorst et al. (2014) with some adaptations. The whole worms were transferred to a 96-well plate and added hydrogen peroxide (0.4mM). The fluorescence intensity of each sample was measured (excitation: 485 nm; emission: 535 nm) using a plate reader (SpectraMax® M5 multi-detection microplate reader system, Molecular Devices), read every 15 min for kinetics for 1h and normalized to time zero values. Results were expressed as  $\Delta \text{AUF} / \Delta \text{Time}$ .

### *2.3.6 Fluorescence quantification using CL2070:*

Two thousand L1 worms were treated with extracts for 1 h and then submitted to heat shock (2 h at 35°C), based on Strayer et al. (2003) for thermal stress. Worms were collected and placed on NGM plates seeded with OP 50 and allowed to recover overnight. The next day worms were washed and pictures were taken using a fluorescence microscope (EVOS FLoid®). Results were expressed as mean of pixels compared to the control group and later analysis performed with ImageJ software.

### *2.4 Statistical analyses:*

Data were reported as mean  $\pm$  SEM (standard error of mean). All tests were performed in duplicate, repeated at least 3 times. Results were analyzed by one-way ANOVA followed by Duncan's tests ( $p < 0.05$ ). All analyses and graphical were performed using the statistical software GraphPad Prism 5 for Windows (GraphPad Software Inc., version 5.01, San Diego, USA) or SPSS for Windows 18.0. Images of the strain CL 2070 were obtained by EVOS FLoid® Cell Imaging Station (Thermo Fisher Scientific) and analyzed using ImageJ Program.

## **3. RESULTS AND DISCUSSION**

### **3.1. Characterization and analysis of the antioxidant activity of ethanolic extracts**

Araçá ethanolic extracts, in general, were similar in their characterization (Table 1), but the yellow araçá extract presented a higher concentration of total phenolics and total flavonoids, while red araçá had higher total carotenoid content, showing a significant difference between extracts, and this may confer different effects for each of them. Biegelemeyer et al. (2011) characterized the araçá fruits and observed that the red araçá showed higher content of polyphenols and flavonoids than yellow one, observation also demonstrated in the study conducted by Medina et al. (2011) when measuring total phenolics comparing extract with acetone and aqueous extract in yellow and red araçá, which differ from those found in this study with ethanolic

extract. The variations observed between yellow and red, however, are due in part to color, since flavonoids and carotenoids are natural pigments, which give orange, yellow and red color to foods (Rodriguez-Amaya, 1999; Schiozer; Barata, 2007); Thus, the yellow extract is expected to have a lower carotenoid content while it has a higher amount of flavonoids. The differences found in the dosages between studies may also be due to the variation of the major compounds, which can be explained in part by the type of solvent used in the extraction process, which may show variations when using water, acetone (Medina et al., 2011) or ethanol (Ribeiro et al., 2014), or by the identification process (Biegelmeyer et al., 2011; Ribeiro et al., 2014), with consequent effect in the bioactivity of the extract.

Table 1. *In vitro* characterization of yellow and red araçá extract

	Characterization			Antioxidant activit	
	Total phenolic content ( $\mu\text{g}$ CAE/mL)	Total flavonoid content ( $\mu\text{g}$ QE/mL)	Total carotenoid content ( $\mu\text{g}$ $\beta$ carotene /mL)	DPPH ( $\text{EC}_{50}$ g/L)	FRAP (mol $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ /mL extract )
Yellow araçá	67693.29*** $\pm$ 2603.45	7003.06** $\pm$ 495.26	18.90 $\pm$ 7.81	68.63 $\pm$ 11.25	65731.23 $\pm$ 8630.03
Red Araçá	61323.26 $\pm$ 1117.17	4981.07 $\pm$ 1021.75	32.09* $\pm$ 7.25	106.60 $\pm$ 39.66	43059.73 $\pm$ 1246.43

Data expressed as Mean  $\pm$  SD. (n = 3). Unpaired *test t* (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  \*\*\*  $p < 0.001$ ).

CAE (Chlorogenic acid equivalent), QE (Quercetin equivalent),  $\text{EC}_{50}$  (effective concentration to reduce the initial concentration of the DPPH radical by 50%),  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (iron sulphate heptahydrate)

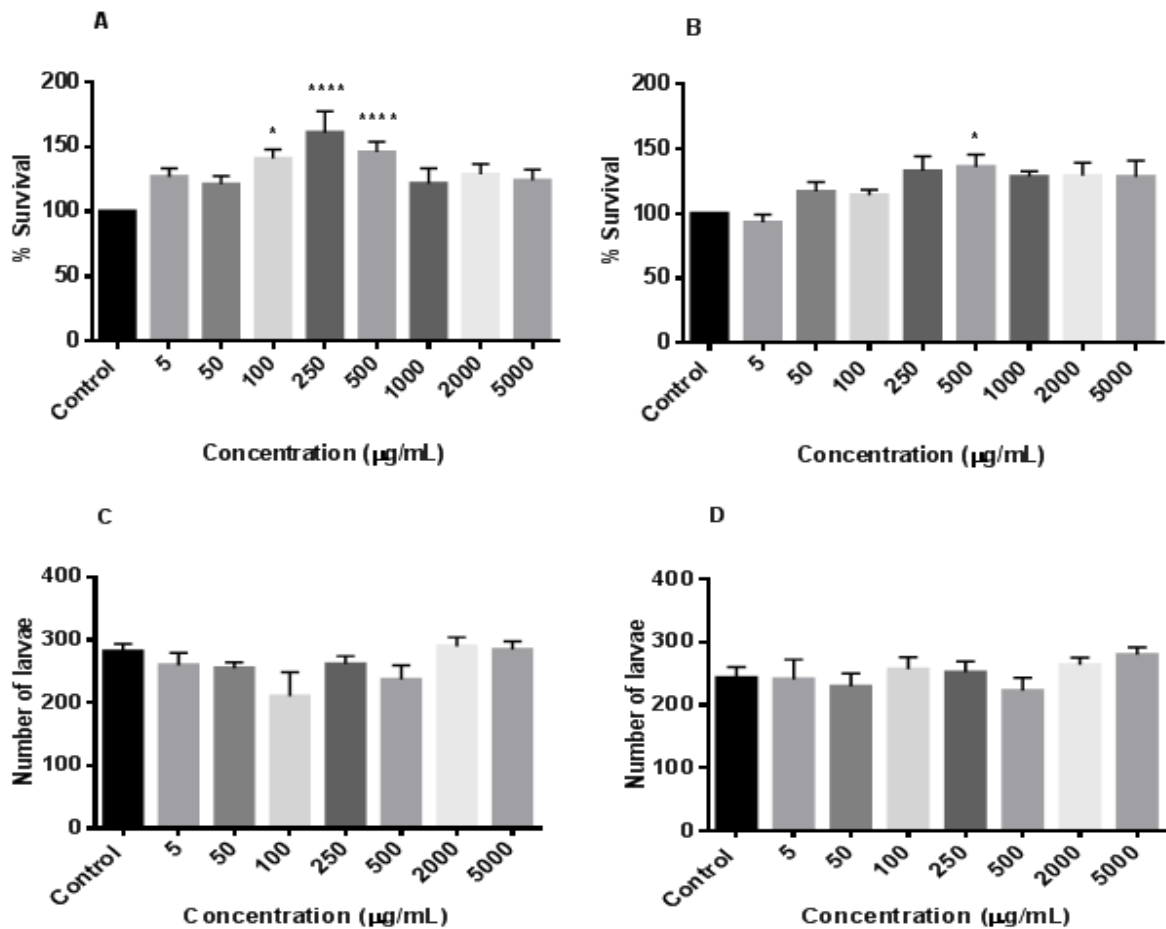
In the analysis of antioxidant activity (Table 1), although they were not statistically different, the yellow araçá extract had a lower value of  $\text{EC}_{50}$  and higher value of FRAP, indicating that could have a higher antioxidant potency compared to red. In the case of fruits are of the same species, both extracts present similar results for DPPH and FRAP, demonstrating their richness and close association with the amount of antioxidant bioactive compounds, a result that correlates with phenolics and total flavonoid content, as shown by Medina et al. (2011). Thus, these bioactive compounds (phenolic, flavonoids, carotenoids) contribute to the antioxidant activity and redox potential of plant extracts whose relationship is also strongly confirmed by

several studies (BIEGELMEYER, et al., 2011; SIQUEIRA et al., 2013; BONOMO, et al., 2014; INFANTE et al., 2016). Moreover, in a study by Medina et al. (2011) the red araçá, both in the acetone and aqueous extracts, showed a greater capacity in inhibition of the DPPH radical, compared to yellow, demonstrating the strong correlation with the composition of bioactive compounds.

### **3.2. Evaluation of survival and reproduction of extract per se in *C. elegans***

After analyzing the survival (Figure 1A and 1B), none of the extracts showed toxicity in the worms up to the concentration tested (5mg CAE/mL), because of this result it was not possible to calculate an LD<sub>50</sub> for both extracts. In addition, the yellow extract (Figure 1A) significantly increased the survival of the worms compared to the control at concentrations of 100, 250 and 500 µg CAE/mL, whereas for the red extract (Figure 1B) only the concentration of 500 µg/mL showed the same effect. These data corroborate the beneficial effect of the bioactive compounds present in the araçá, as demonstrated in a study using Carqueja hydroalcoholic extract (PAIVA et al., 2015), when verified that the dose increase also showed no toxicity.

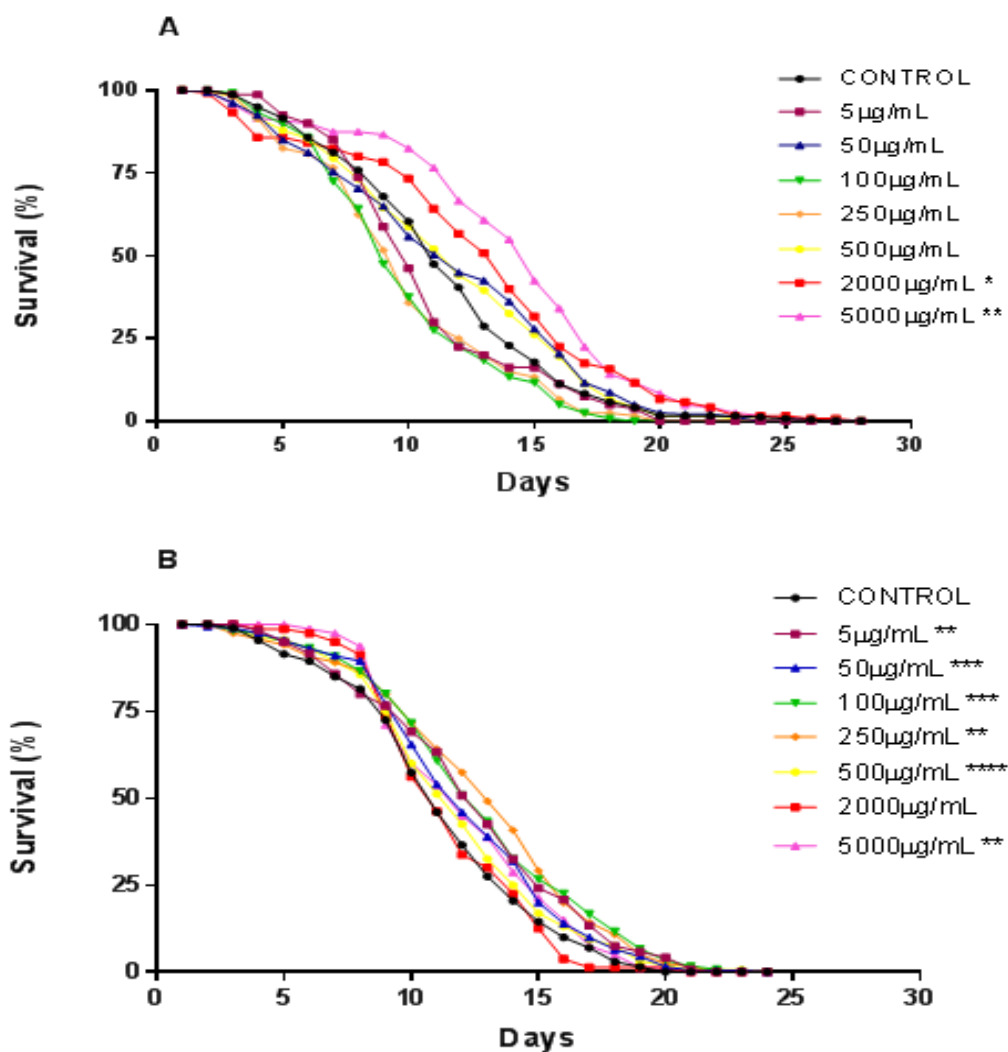
In the reproduction assay, in order to evaluate brood size, none of the extracts caused a significant change in the total number of eggs in the reproductive period (Figure 1C and 1D), according to the number of hatched larvae, in the same way that none of them affected the daily posture throughout the 3 days of the reproductive period (data not shown) demonstrating, once again, that both extracts do not present toxicity because they did not affect the reproductive cycle of the worm. Bonomo et al. (2014) and Paiva et al. (2006), in a similar study, verified that the treatment with araçá and carqueja extract, respectively, did not affect the development and the progeny, suggesting that both extracts were also not toxic for *C. elegans*. Similarly, in a study using a curcumin solution (LIAO et al., 2011), no modification in reproductive capacity was observed (either by daily posture or total number of eggs).



**Figure 1.** Analysis of *P. cattleianum* on *C. elegans* (N2) survival (upper) and reproduction (lower). Worms treated with different concentrations of (A, C) yellow and (B, D) red araçá extracts. Data for Survival: Mean  $\pm$  SEM. ANOVA, post-hoc Tukey's test (\*  $p < 0.05$  e \*\*\*\*  $p < 0.0001$ ). Brood size: data were expressed as total hatching egg  $\pm$  SEM, from at least five experiments. Result was considered significant with a \*  $p < 0.05$  when compared to control group.

### 3.3. Increased longevity in worms treated with Araçá extracts

By analyzing the longevity of *C. elegans*, the yellow extract (Figure 2A) was able to promote an increase in the life of the worm only at the highest concentrations tested (2000  $\mu\text{g}$  CAE/mL and 5000  $\mu\text{g}$  CAE/mL). In addition, the red araçá extract (Figure 2B), except for 2000  $\mu\text{g}$  CAE/mL, significantly increased longevity at all concentrations, presenting better effects at doses of 50  $\mu\text{g}$  CAE/mL, 100  $\mu\text{g}$  CAE/mL ( $p < 0.001$ ) and 500  $\mu\text{g}$  CAE/mL ( $p < 0.0001$ ).



**Figure 2.** Lifespan of  $N_2$  worms exposed to (A) yellow and (B) red araçá extracts. Data are expressed as Mean  $\pm$  SEM (% of control) of three different experiments. Repeated measures ANOVA Tukey's multiple comparisons test and results were considered significant with a \*  $p < 0.05$  when compared to control group.

In the literature, studies with fruit extracts and bioactive compounds in the longevity trial with *C. elegans* present different results. Phulara et al. (2015) found that aqueous extract of *Bacopa monnieri* (Indian medicinal plant) was not able to prolong the longevity of  $N_2$  worms under normal conditions, despite increasing the survival of animals against thermal and oxidative stress. This same result was also observed in the study using epigallocatechin gallate (EGCG) conducted by Zhang et al. (2009), and with the use of the carqueja (*Baccharis trimera*) performed by Paiva et al. (2015), showing that both plants were active only under conditions of oxidative

stress. In normal conditions, without stress, Surco-Laos et al. (2012) found that only methylated compounds of epicatechin (flavonoids) were able to increase half-life, while the maximum time was prolonged by both metabolites and epicatechin. However, Liao et al. (2011) using curcumin, demonstrated an increase in longevity, and Guha et al. (2014) found that, under normal conditions, supplementation with cranberry extract increased the longevity of worms, especially when done in the early stages of development and even better if the treatment occurs for longer periods of time. Thus, we can suggest that, due to the bioactive compounds present (phenolic and flavonoids) in araçá extracts, both were able to prolong longevity in *C. elegans*, even with a short exposure time (1h).

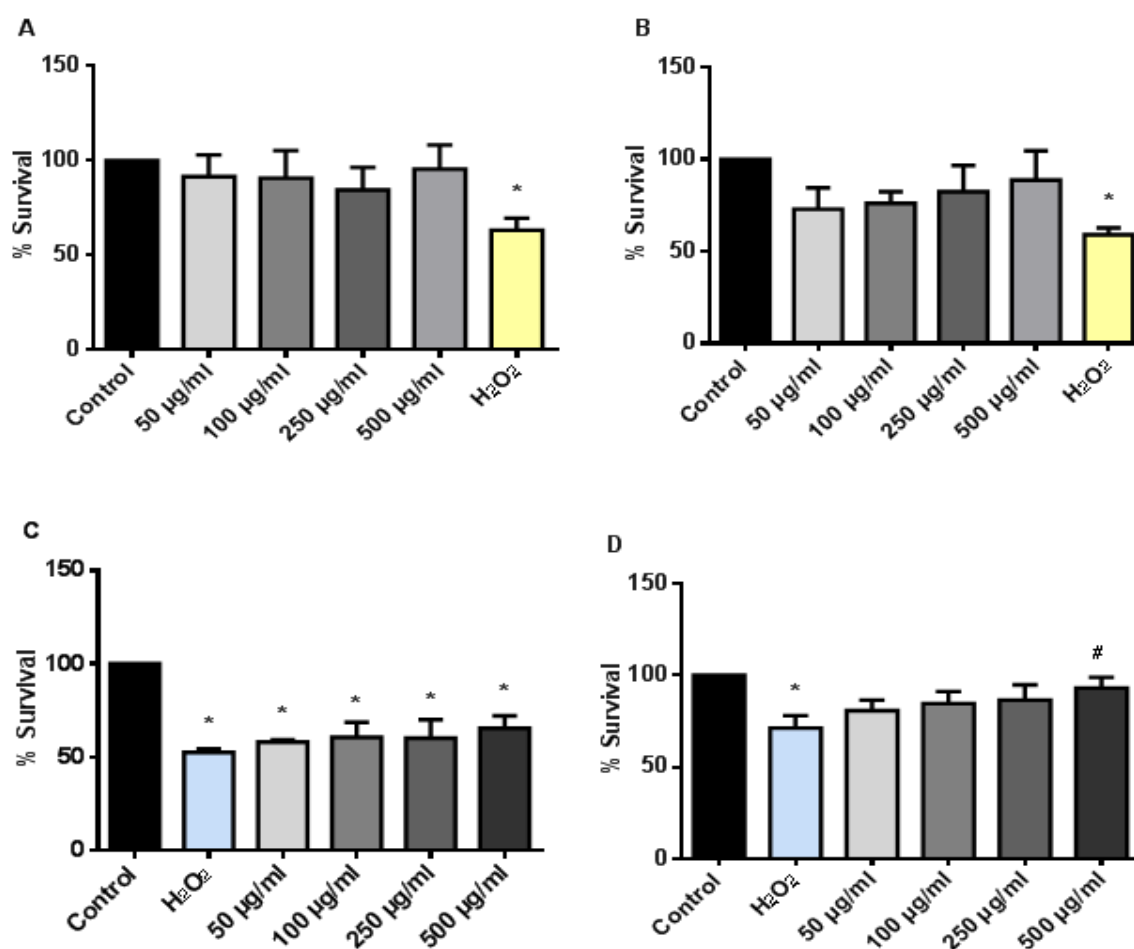
### 3.4 Survival against oxidizing agents: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and juglone

One of the most abundant reactive species is hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), being involved in the induction of intracellular oxidative stress, apoptosis, as well as aging. Using the oxidizing agent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.5mM), in the treatment for the damage prevention analysis, both extracts (Figure 3A and 3B) at all concentrations tested had a protective effect even though they were not able to revert to control levels the damage caused. Thus, a mild beneficial effect is observed in all concentrations, considering that there is no statistical difference between the doses and the control, certainly due to the presence of bioactive compounds with antioxidant action.

In the oxidative damage reversal test, the worms that received the yellow extract (Figure 3C) presented severe damage, which cannot be reverted at any of the concentrations. However, for the red extract (Figure 3D) the concentration of 500 µg CAE/mL was significantly different from H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (damage), but equivalent to the control, that is, it was able to revert the oxidative damage. However, the yellow extract has a subtle protective effect whereas red shows a more pronounced reversal effect, that is, when the organism already has some oxidative damage. A study that analyzed the Carqueja hydroalcoholic extract (PAIVA, et al., 2015) using *tert*-butyl hydroperoxide rather than H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (a less sensitive compound to contamination, more thermally stable and promoting milder damage), the authors observed that the extract

increased the survival of the worms, demonstrating an enhance in resistance to oxidative stress.

In the reproduction test against hydrogen peroxide, the worms, although treated with the extracts, did not lay eggs (data not shown) throughout the reproductive period, showing that both extracts were not able to protect or reverse the damage caused, affecting egg laying.

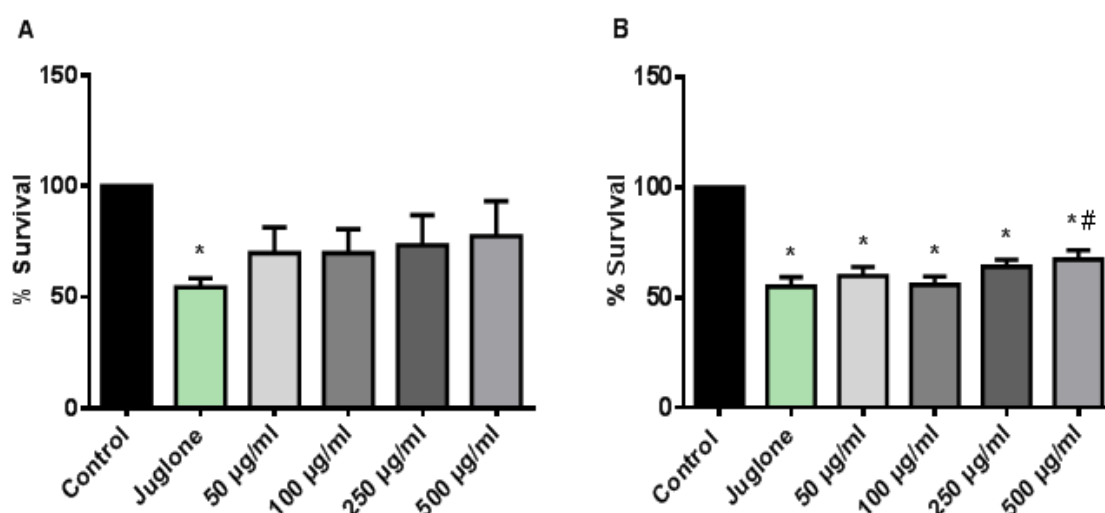


**Figure 3.** Survival analysis against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Protection treatment: first administration of yellow (A) and red (B) extracts and subsequent exposure to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Reversal treatment: initial exposure to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and then treatment with yellow (C) and red (D) extract. Data were expressed as Mean  $\pm$  SD. ANOVA and *post-hoc* Duncan's test (\*  $p < 0,005$ ) \* different of control; # different of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

In order to analyze the effect of the extracts in situations of oxidative stress, juglone was also used, a naphthoquinone identified as secondary metabolite, particularly isolated from black walnut (*Juglans nigra*) (KURTYKA et al., 2016)



capable of affecting the redox cycle by generation of reactive species, mainly superoxide radicals (HEIDLER, 2009). After administration of juglone (100  $\mu$ M) post treatment with yellow and red extract (Figure 4A and 4B), to verified the damage prevention, was observed the occurrence of severe damage in worms. Treatment with yellow extract (Figure 4A) showed a small improvement in the survival rate, with a dose-dependent but not significant increase. However, the worms treated with the red extract (Figure 4B) at the concentration of 500 $\mu$ g/mL had a better survival rate, however significant, although it was not able to prevent, until levels of control, the damage generated. In studies with *C. elegans* exposed to juglone, Surco-Laos et al. (2012) found that epicatechin treatment in adult worms of different ages increased longevity, especially in 'older' worms, demonstrating the protective effect. Similarly, the administration of curcumin (20 $\mu$ M) and epigallocatechin gallate (EGCG) increased the survival of juvenile worms exposed to juglone in studies conducted, respectively, by Liao et al. (2011) and Zhang et al, (2009), demonstrating increased resistance to stress. These studies were performed on wild-type worms ( $N_2$ ) whose exposure to the compounds lasted for at least 48 h. Treatment with *Ginkgo biloba* extract increased survival against juglone but using *C. elegans* strain CL2070 (which expresses the *hsp-16.2* gene) (Strayer et al., 2003).



**Figure 4.** Survival analysis against juglone. Worms at L4 stage were treated previously with (A) yellow and (B) red extract and exposed to juglone 100  $\mu$ M. ANOVA, *post-hoc* Duncan's test. (\* $p < 0.05$ ). \* diferente of control; # diferente of juglone.

Based on our results and the literature, it is suggested that the effect against oxidative stress is due to the ability to decrease the intracellular accumulation of ROS from flavonoids (SURCO-LAOS et al., 2012) present, but also by regulatory action of genes associated with stress resistance, such as *sod-3* and *hsp-16.2* (ZHANG et al., 2009).

Considering that in our study the exposure to araçá extracts was during 1 h, it is possible that the protective effect was probably weak due to the reduced treatment time, as well as because the intervention was not done in the early stages of development of the worms, as described by Guha et al. (2014) in their study with cranberry extract.

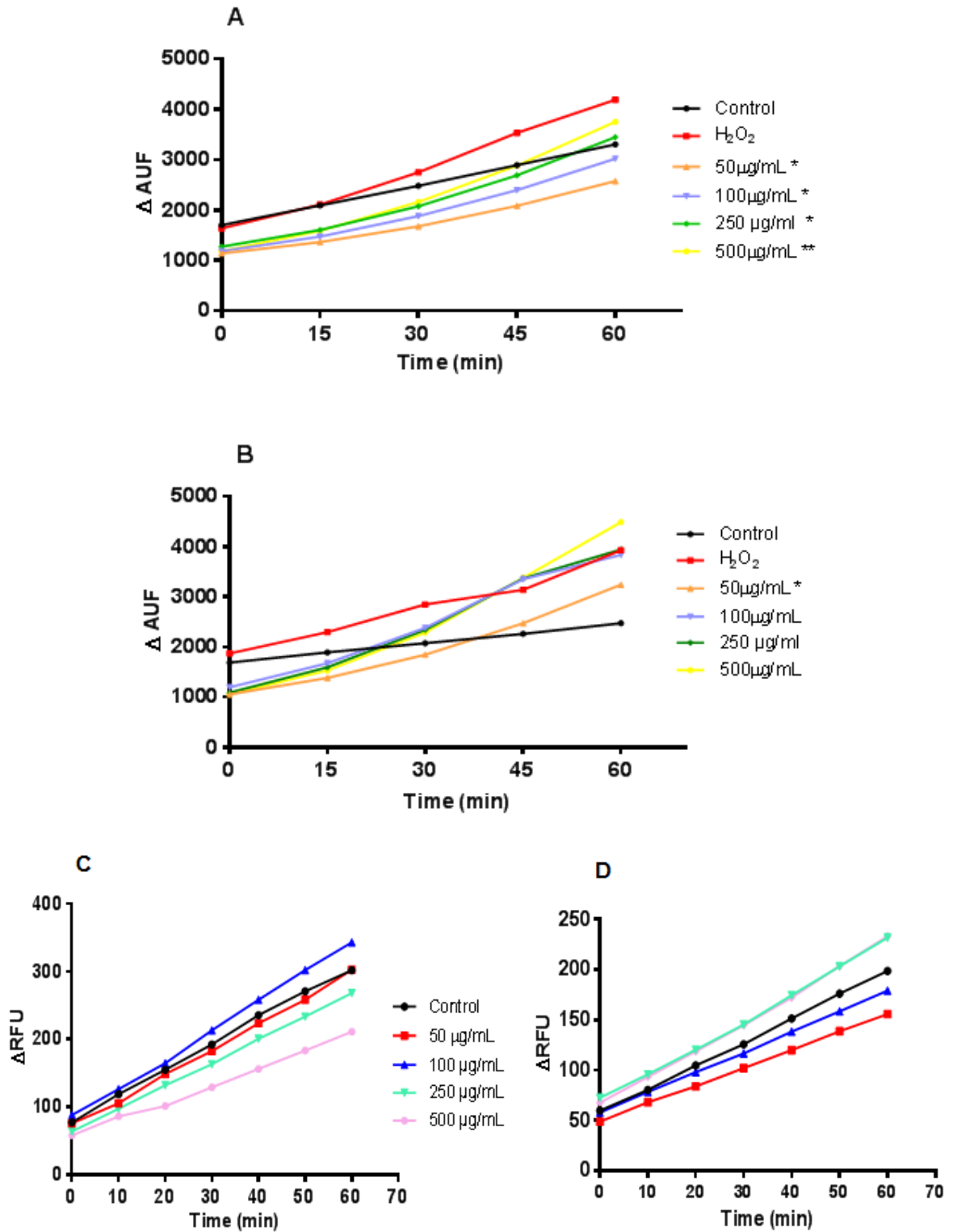
In relation to the reproduction tests using juglone (100  $\mu$ M), these could not be performed, since the worms did not survive enough time (data not shown) to evaluate such parameter, however, no other study was found in *C. elegans* who has performed some reproduction test under these same conditions.

### 3.5 Determination of ROS using H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> as stressor agent

The method using DCF-DA (a fluorescent probe) was chosen to evaluate, *in vivo*, the ability of the yellow and red extract, to remove or neutralize ROS accumulation, and the tests were performed using the living nematodes.

First, by increasing the fluorescence, it was possible to observe that H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment promoted elevation in ROS levels when compared to control (Figure 5), demonstrating the occurrence of oxidative damage in the organism. In the case of stress (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), the yellow extract (Figure 5A) at all concentrations had a good protective effect (reduction in ROS production), but the doses of 250  $\mu$ g CAE/mL ( $p < 0.05$ ) and 500  $\mu$ g CAE/mL ( $p < 0.01$ ) allowed the dosages to return to the control levels, whereas the doses of 50  $\mu$ g CAE/mL ( $p < 0.05$ ) and 100  $\mu$ g CAE/mL ( $p < 0.05$ ) resented the greatest reduction on ROS levels. For the red extract (Figure 5B) only the concentration of 50  $\mu$ g CAE/mL ( $p < 0.01$ ) showed to be able to reduce the production of reactive species.

In fact, in *C. elegans* treated with both araçá extracts there was a lower production of ROS, both under stress conditions and under normal conditions (Figure 5C and 5D), as verified by the reduction of DCF. Black tea extract (*Camellia sinensis*) also demonstrated the ability to reduce reactive species under normal culture conditions (XIONG et al, 2014). In a study using EGCG, the treatment reduced the levels of intracellular ROS in conditions with or without stress, related to the antioxidant capacity verified *in vitro* (ZHANG et al., 2009). In similar studies, Bonomo et al. (2014) and Paiva et al. (2015) found that açai extract and carqueja extract, respectively, were also effective in reducing ERO production in *C. elegans* when stress was caused by the use of the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stressor agent. Thus, the antioxidant potential of the extract may be due to the properties of phenolic compounds in neutralizing and removing ROS, as a function of the body's response to increased oxidative stress. This *in vivo* finding allows to correlate the antioxidant action of ROS removal, under stress conditions, to the effect of the extract verified *in vitro*, based on its phytochemical characterization. Thus, the action of phytochemical compounds (be they flavonoids, or phenolics) against oxidative stress may be, according to González-Manzano et al. (2012) and Bonomo et al. (2014), by direct action of the extract or compound by radical sequestration, or due to an indirect action, where the increase of resistance to stress occurs by the induction of antioxidant enzymes.



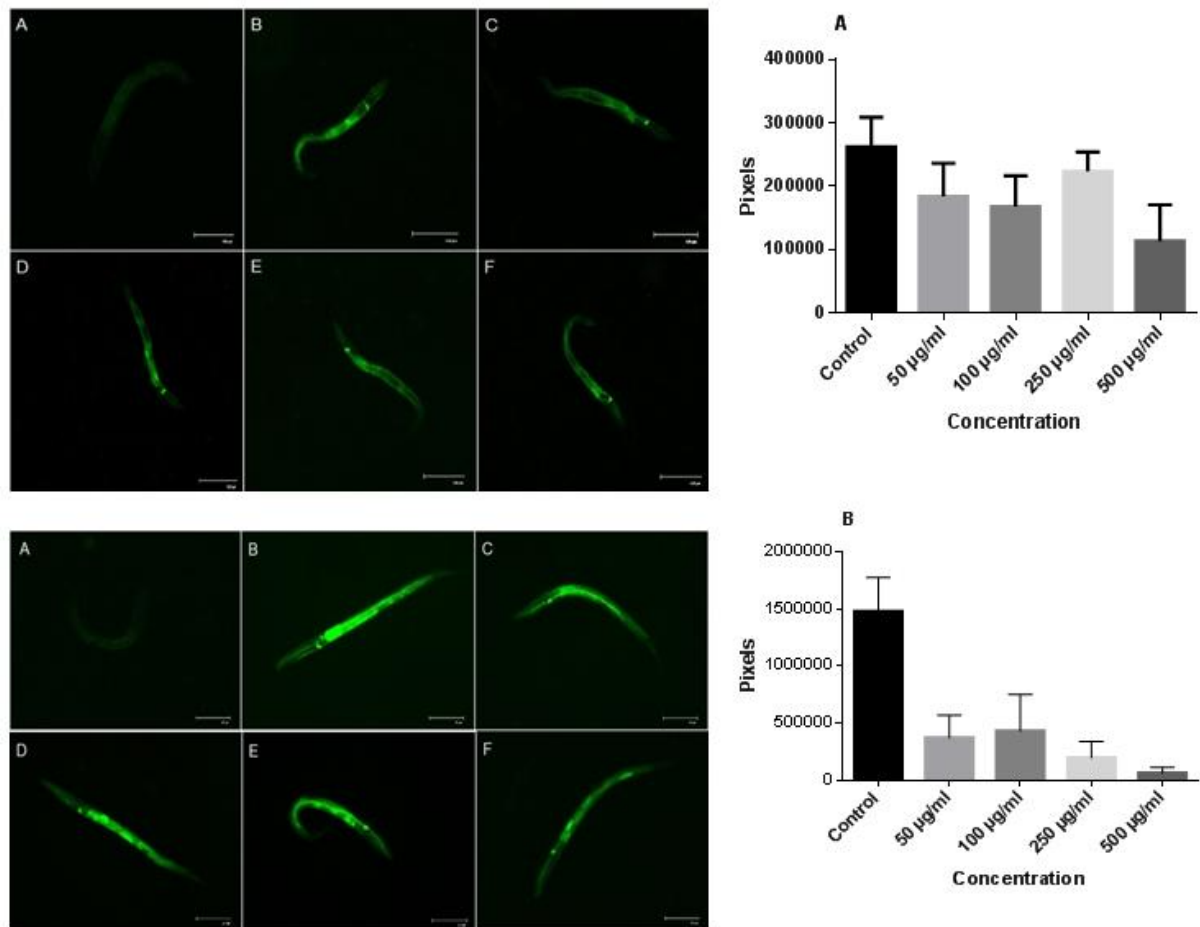
**Figure 5.** Effects of extracts on ROS kinetics by the DCF-DA method in *C. elegans*. ROS levels after treatment with extracts from yellow (A) and (B) red araçá and subsequent exposure to stress by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and at normal conditions with yellow (C) and red (D) extracts. ANOVA one-way and *post-hoc* Tukey's multiple comparisons test. (\*  $p < 0.05$ )

Considering that the longevity result was better with the red extract (increase in the period) and that in the capacity to reduce levels of reactive species *in vivo*, the best effect was verified with yellow (a more pronounced reduction in ROS production), both may initially appear contradictory, but it is suggested that in part they can be explained by the composition of their bioactive compounds (phenolics) and their possible affinity to the various free radicals generated in the process of oxidative stress (INFANTE, 2013). However, a single methodology cannot satisfactorily demonstrate the antioxidant behavior of a sample. In the review study, Koch et al. (2014) found that due to the varied structures of flavonoids differences in the ability to reduce ROS can occur. Different actions in *C. elegans*, such as modulation of longevity, influence of the compounds on the level of oxidative stress (direct effect on ROS levels or indirect in antioxidant enzymes) besides to modulation of signaling pathways involved in stress (DAF-16, HSF-1), are influenced by secondary metabolites (KOCH, et al., 2014). In addition, further analysis should be done to verify protection through antioxidant systems.

### **3.6 Fluorescence microscopy after thermal treatment with strain CL2070**

The CL2070 (*hsp-16.2* fluorescent) mutant strain treated with araçá extracts (yellow and red) was further exposed to heat (2h at 35°C) to analyze the expression of the stress response gene, *hsp-16.2*.

According to the fluorescence representative images (Figure 6, upper and lower) and based on the graphical representation of the pixels (Figure 6A and B), we observed that the red extract presented a dose-dependent fluorescence reduction, indicating a lower expression of protein *hsp-16.2*, involved in the cellular protection system against stressors, mainly heat (PHULARA, et al., 2015). The yellow extract, however, presented the same result with ROS reduction only at the concentration of 500 µg CAE/mL.



**Figure 6.** Pictures of CL2070 when exposed to thermal stressor (2h at 35°C) after treatment with yellow (upper) and red (lower) extracts at different concentrations: (A) Control N<sub>2</sub>, (B) Control CL2070, (C) 50 µg/mL, (D) 100 µg/mL, (E) 250 µg/mL and (F) 500 µg/mL. Graphic representation for (A) yellow and (B) red extracts. (n=1)

The *hsp-16.2* is a member of a small family of genes that code heat shock proteins (HSP), as cellular response to acute stress (eg, elevation of temperature) (GUISBERT et al., 2013), being chaperones that maintain cellular protein homeostasis after stress, preventing possible damage (RODRIGUEZ et al., 2013). HSP are regulated by the heat shock factor (HSF-1), which, together with DAF-16, play an important role in aging, longevity and age-related human diseases (RODRIGUEZ et al., 2013), and have been suggested to be predictors of longevity because they are involved in the heat-tolerance process (KOCH et al., 2014). Thus, as observed in this work, Hartwig et al. (2009) found that treatment with ascorbic acid decreased the expression of *hsp-16.2* in strain CL2070 after induction of stress by

juglone; and the extract of *Ginkgo biloba* (STRAYER et al., 2003) also suppressed the expression of *hsp-16.2* induced by juglone and thermal stress in CL2070 worms. Similarly, a reduction in the expression of *hsp-16.2* was observed demonstrating the increase in the resistance to stress, related to the pre-treatment with epigallocatechin gallate, but using the TJ375 strain, which also expresses this gene (ABBAS; WINK, 2009).

Therefore, by increasing resistance to stress, HSP can affect longevity in *C. elegans*, and that the expression of *hsp-16.2* may be a good ROS sensor (HARTWIG et al., 2009). Thus, our results suggest that extracts of araçá modulate the response to stress related to attenuation in ROS levels.

## REFERENCES

ABBAS, S., WINK, M. Epigallocatechin gallate from green tea (*Camellia sinensis*) increases lifespan and stress resistance in *Caenorhabditis elegans*, **Planta Medica**, v. 75, n. 3, p. 216-221, 2009.

BIEGELMEYER, R. et al. Comparative analysis of the chemical composition and antioxidant activity of red (*Psidium cattleianum*) and yellow (*Psidium cattleianum* var. *lucidum*) strawberry guava fruit. **Journal of Food Science**, v.76, n. 7, p. c991-c996, 2011.

BONOMO, L. F. et al. Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) modulates oxidative stress resistance in *Caenorhabditis elegans* by direct and indirect mechanisms. **Plos One**, v. 9, n. 3, p. 1-14, 2014.

BORNHORST, J., et al. The effects of *pdr1*, *djr1.1* and *pink1* loss in manganese-induced toxicity and the role of  $\alpha$ -synuclein in *C. elegans*. **Metallomics**, v. 6, n. 3, p. 476–490, 2014.

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

GONZÁLEZ-MANZANO, S. G. 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.

GUHA, S. et al. Supplement timing of cranberry extract plays a key role in promoting *Caenorhabditis elegans* healthspan. **Nutrients**, v. 6, p. 911-921, 2014.

GUISBERT, E. et al. Identification of a tissue-selective heat shock response regulatory network. **Plos Genetics**, v. 9, n. 4, p. 1-12, 2013.

HARTWIG, K. et al. Feeding a ROS-generator to *Caenorhabditis elegans* leads to increased expression of small heat shock protein HSP-16.2 and hormesis. **Genes and Nutrition**, v. 4, n. 1, p. 59-67, 2009.

HEIDLER, T. N. **Effects of nutritional components on stress response and aging in the nematode *Caenorhabditis elegans***. 2009. 127 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Técnica de Munique. Alemanha. Disponível em: <<https://mediatum.ub.tum.de/doc/680909/document.pdf>>. Acesso em: 8 jan 2017.

INFANTE, J. **Composição fenólica e atividade antioxidante de polpa, casca, semente e folha de espécies frutíferas nativas do Brasil**. 114p. Dissertação (Mestrado em Ciências). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – Universidade de São Paulo. Piracicaba, 2013.

INFANTE, J. et al. Antioxidant and anti-inflammatory activities of unexplored Brazilian native fruits. **PLoS One**, v. 11, n. 4, p. 1-13, 2016. doi: 10.1371/journal.pone.0152974

KOCH, K., et al. *Caenorhabditis elegans* as a model system in pharmacology and toxicology: effects of flavonoids on redox-sensitive signaling pathways and ageing. **The Scientific World Journal**, v. 2014, Article ID 920398, 15 pages, 2014. doi:10.1155/2014/920398

KURTYKA, R. et al. Effects of juglone and lowsone on oxidative stress in maize coleoptiles cells treated with IAA. **AoB Plants**, v. 8, p. 1-12, 2016. doi: 10.1093/aobpla/plw073

LIAO, V. H. et al. Curcumin-mediated lifespan extension in *Caenorhabditis elegans*. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 132, n. 10, p. 480–487, 2011.

MARINOVA, D., RIBAROVA, F., ATANASSOVA, M. Total phenolics and total flavonoids in Bulgarian fruits and vegetables. **Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy**, v. 40, n. 3, p.255-260, 2005.

PAIVA, F. A. et al. Carqueja (*Baccharis trimera*) protects against oxidative stress and  $\beta$ -amyloid-induced toxicity in *Caenorhabditis elegans*. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2015, Article ID 740162, 15 pages, 2015. doi:10.1155/2015/740162

PHULARA, S. C. et al., *Bacopa monnieri* promotes longevity in *Caenorhabditis elegans* under stress conditions. **Pharmacognosy Magazine**, v. 11, n. 42, p. 410-416, 2015.



PULIDO, R. et al. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/ antioxidant power assay. **Journal Agriculture and Food Chemistry**, v.48, n.8, p.3396-3402, 2000.

RODRIGUEZ, M. et al. Worms under stress: *C. elegans* stress response and its relevance to complex human disease and aging. **Trends in Genetics**, v. 29, n. 6, p. 367-374, 2013.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. **A guide to carotenoids analysis in foods**. Washington: Ilsi, 1999.

RUFINO, M.S.M., et al. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical DPPH. Embrapa Agroindústria Tropical. **Comunicado técnico on line**, Fortaleza, n.127, p.1-4, 2007.

SCHIOZER, A. L.; BARATA, L. E. S. Estabilidade de Corantes e Pigmentos de Origem Vegetal. **Revista Fitos**, v. 3, n. 2, p. 6-24, 2007.

SIQUEIRA, E. M. A. et al. Brazilian savanna fruits contain higher bioactive compounds content and higher antioxidant activity relative to the conventional red delicious apple. **Plos One**, v. 8, n. 8, p. 1-7, 2013.

STIERNAGLE, T. **Maintenance of *C. elegans***. WormBook. p.1-11, 2006. Disponível em: <[http://www.wormbook.org/chapters/www\\_strainmaintain/strainmaintain.html](http://www.wormbook.org/chapters/www_strainmaintain/strainmaintain.html)> Acesso em: 5 jan. 2017.

STRAYER, A. et al. Expression of the small heat-shock protein Hsp-16.2 in *Caenorhabditis elegans* is suppressed by *Ginkgo biloba* extract EGb 761. **The FASEB Journal**, v. 17, n. 15, p. 1-18, 2003. Disponível em: <<https://www.researchgate.net/publication/9066066>> Acesso em: 15 jan 2017.

SURCO-LAOS, F. S. et al. Influence of catechins and their methylated metabolites on lifespan and resistance to oxidative and thermal stress of *Caenorhabditis elegans* and epicatechin uptake. **Food Research International**, v. 46, p. 514–521, 2012.

SWAIN, T., HILLIS, W. E. The phenolic constituents of *Prunus domestica*. I. The quantitative analysis of phenolic constituents. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.10, n.1, p.63-68, 1959.

XIONG, L. G. et al. Black tea increased survival of *Caenorhabditis elegans* under stress. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 46, p. 11163–11169, 2014

ZHANG, L. et al. Significant longevity-extending effects of EGCG on *Caenorhabditis elegans* under stress. **Free Radical and Biology and Medicine**, v. 46, p. 415-421, 2009.

## 6. CONCLUSÕES

Os extratos de araçá amarelo e vermelho mostraram riqueza em compostos sendo que o amarelo apresentou mais fenólicos e flavonoides totais enquanto que o vermelho, mais carotenoides totais. Com base nestas determinações, ambos demonstraram significativa atividade antioxidante *in vitro*, conforme verificado nos métodos DPPH e FRAP, tendo forte relação à composição, principalmente, pela presença de compostos fenólicos. No entanto, para melhor caracterização, estamos aguardando a análise da composição dos nossos extratos etanólicos. Ambos mostraram boa capacidade “scavenger” contra ERO, sendo que *in vitro*, o extrato de araçá amarelo se mostrou mais potente, provavelmente pela maior presença de compostos fenólicos.

Analisando os efeitos no *C. elegans*, o extrato amarelo foi melhor em alguns parâmetros, apresentando um leve efeito protetor na sobrevivência, frente ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, e uma redução mais acentuada na produção de ERO, ao passo que o extrato vermelho promoveu melhora na longevidade, na reversão de dano por peróxido de hidrogênio e na proteção contra o juglone. Sugere-se que tais diferenças se devem às variações na composição de fenólicos, flavonoides e carotenoides, conferindo características peculiares a cada um dos extratos.

Nossos dados demonstraram elevada capacidade antioxidante dos extratos de araçá, observada no *C. elegans*, através do aumento da longevidade e da redução de espécies reativas de oxigênio, porém mais estudos se fazem necessários para averiguar quais são os mecanismos envolvidos (vias de sinalização e enzimas) nesta ação protetora.

## 7. PERSPECTIVAS

O presente estudo mostrou uma parte inicial e importante para o conhecimento dos efeitos de *Psidium cattleianum* na formulação de extratos, amarelo e vermelho, no entanto, estudos mais direcionados são necessários para melhor compreensão.

Assim, algumas perspectivas futuras são:

- proceder a caracterização de compostos fenólicos e carotenoides nos extratos etanólicos utilizando metodologia de HPLC-DAD;
- realizar testes complementares utilizando cepas mutantes de *C. elegans* (genes *mev-1*, *sod-3* e *daf-16*) para melhor avaliar estresse oxidativo;
- avaliar possíveis efeitos farmacológicos (como efeito anti-adipogênico, anticarcinogênico, antiinflamatório) utilizando cultura de células animais.

## REFERÊNCIAS

ALVARENGA, F. Q. et al. Atividade antimicrobiana *in vitro* das folhas de araçá (*Psidium cattleianum* Sabine) contra micro-organismos da mucosa oral. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 45, n.3, p. 149-153, 2016.

BACK, P., BRAECKMAN, B. P., MATTHIJSENS, F. ROS in aging *Caenorhabditis elegans*: Damage or Signaling? **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. v. 2012, article ID 608478, p. 1-14, 2012.

BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, Campinas, v.12, n.2, p.123-130, 1999.

BIEGELMEYER, R. et al. Comparative analysis of of the chemical composition and antioxidant activity of red (*Psidium cattleianum*) and yellow (*Psidium cattleianum* var. *lucidum*) strawberry guava fruit. **Journal of Food Science**, v.76, n. 7, p. c991-c996, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde (MS). Vigitel Brasil 2014: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico. Brasília. MS, 2014.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde (MS). Alimentos regionais Brasileiros. 2ª Ed. 484p, Brasília, 2015.

DE CASTRO, E.; DE CASTRO, S. H; JOHNSON, T. E. Isolation of long-lived mutants in *Caenorhabditis elegans* using selection for resistance to juglone. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 37, n. 2, p. 139 – 145, 2004.

DENARDIN, C. C. et al. Antioxidant capacity and bioactive compounds of four Brazilian native fruits. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 23, n.3, p. 387-398, 2015.

DENARDIN, C. C. et al. Antiproliferative and cytotoxic effects of purple pitanga (*Eugenia uniflora* L.) extract on activated hepatic stellate cells. **Cell Biochemistry and Function**, v. 32, n. 1, p. 16-23, 2014.

DUYN, M. A. S. V.; PIVONKA, E. Overview of the health benefits of fruit and vegetable consumption for the dietetics professional: selected literature. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 100, n. 12, p. 1511-1521, 2000.

FETTER, M.R. et al. Propriedades funcionais de araçá-amarelo, araçá-vermelho (*Psidium cattleianum* Sabine) e araçá-pera (*P. acutangulum* D.C) cultivados em Pelotas/RS. **Brazilian Journal of Food Technology**, n. 15, p. 92-95, 2010.

FRANZON, R. C. et al. Araçás do gênero *Psidium*: principais espécies, ocorrência, descrição e usos. EMBRAPA Cerrados. Documentos 266. 48p. Planaltina, DF, 2009.

GONZÁLEZ-MANZANO, S.G. et al. Oxidative status of stressed *Caenorhabditis elegans* treated with epicatechin. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 60, n. 36, p. 8911–8916, 2012.

HALLIWELL, B., WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **British Journal of Pharmacology**, v. 142, p. 231–255, 2004.

HEIDLER, T. N. **Effects of nutritional components on stress response and aging in the nematode *Caenorhabditis elegans***. 2009. 127 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Técnica de Munique. Alemanha. Disponível em: <<https://mediatum.ub.tum.de/doc/680909/document.pdf>>. Acesso em: 8 jan 2017.

HUANG, F. C. et al. Anti-inflammatory effect of resveratrol in human coronary arterial endothelial cells via induction of autophagy: implication for the treatment of Kawasaki disease. **BMC Pharmacology and Toxicology**, v 18:3, p. 1-8, 2017.

JOHNSON, S. A., et al. Daily blueberry consumption improves blood pressure and arterial stiffness in postmenopausal women with pre- and stage 1-hypertension: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. **Journal of the academy of nutrition and dietetics**, v.115, n.3, p.369-377, 2015.

KALETTA, T.; HENGARTNER, M. O. Finding function in novel targets: *C. elegans* as a model organism. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 5, n. 5, p. 387-398, 2006.

KOCH, K., et al. *Caenorhabditis elegans* as a model system in pharmacology and toxicology: effects of flavonoids on redox-sensitive signaling pathways and ageing.

**The Scientific World Journal**, v. 2014, Article ID 920398, 15 pages, 2014.  
doi:10.1155/2014/920398

LAUER, M. A Look at Trends in NIH's Model Organism Research Support. National Institute of health. 2016. Disponível em:< <https://nexus.od.nih.gov/all/2016/07/14/a-look-at-trends-in-nih-model-organism-research-support/> > Acesso em: 07 jan 2017.

LI, G. et al. Promotion of behavior and neuronal function by reactive oxygen species in *C. elegans*. **Nature Communications**, v. 7, p. 1-12, 2016.

MEDINA, A.L. et al. Araçá (*Psidium cattleianum* Sabine) fruit extracts with antioxidant and antimicrobial activities and antiproliferative effect on human cancer cells. **Food Chemistry**, v.128, n.4, p.916-922, 2011.

OGA, S.; CAMARGO, M. M.A.; BATISTUZZO, J. A. O. Fundamentos de Toxicologia. 4. Ed. São Paulo: Atheneu Editora, 2014.

RIBEIRO, A.B, et al. *Psidium cattleianum* fruit extract are efficient *in vitro* scavengers of physiologically relevant reactive oxygen and nitrogen species. **Food Chemistry**, v. 165, p. 140-148, 2014.

ROCHA, L.D. et al. Estudo anatômico comparativo da casca do caule do araçá-amarelo e araçá-vermelho, *Psidium cattleianum* Sabine, Myrtaceae. **Acta Botanica Brasilica**, Curitiba, v. 22, n. 4, p. 1114-1122, 2008.

RODRIGUEZ, M. et al. Worms under stress: *C. elegans* stress response and its relevance to complex human disease and aging. **Trends in Genetics**, v. 29, n. 6, p. 367-374, 2013.

SCUR, M. C. et al. Antimicrobial and antioxidant activity of essential oil and different plant extracts of *Psidium cattleianum* Sabine. **Brazilian Journal of Biology**, v.71, n.1, p.101-108, 2016

SEBRAE. Agronegócio – Fruticultura. Boletim de Inteligência, outubro, 2015.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 15, n.1, p. 71-81, 2002.

STRANGE, K. Drug Discovery in Fish, Flies, and Worms. **ILAR Journal**, v. 57, n. 2, p. 133-143, 2016.

SUCUPIRA, N.R. et al. Métodos para determinação da atividade antioxidante de frutos. **Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, v.14, n.4, p.263-269, 2012.

TAN, L. et al. Investigation on the role of BDNF in the benefits of Blueberry extracts for the improvement of learning and memory in Alzheimer's Disease mouse model. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 56 Preprint, n. 2 Preprint, p.1-12 (2016).

TANG, W. et al. A review of the anticancer and immunomodulatory effects of *Lycium barbarum* fruit. **Inflammopharmacology**, v.20, p.307-314, 2012.

VIZZOTO, M., KROLOW, A. C., WEBER, G. E. V. Metabólitos secundários encontrados em plantas e sua importância. Pelotas: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Clima Temperado. 16p. 2010.

World Health Organization (WHO). Fruit and vegetable promotion initiative – Report of the Meeting. Disponível em: < [http://www.who.int/dietphysicalactivity/publications/f&v\\_promotion\\_initiative\\_report.pdf](http://www.who.int/dietphysicalactivity/publications/f&v_promotion_initiative_report.pdf) > Genebra, 25-27 Agosto, 2003. Acesso em: 04 jan 2017.

World Health Organization (WHO). Global status reporter on noncommunicable diseases 2010. Disponível em: < [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44579/1/9789240686458\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44579/1/9789240686458_eng.pdf) > Acesso em: 04 jan 2017.

XIONG, L.G. et al. Black tea increased survival of *Caenorhabditis elegans* under stress. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62(46), p. 11163-11169, 2014.