

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS

TAMAEH MONTEIRO ALFREDO

**COMPOSIÇÃO QUÍMICA, AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE E
TOXICIDADE DAS FOLHAS DE *Acrocomia aculeata* (Jacq) Lodd. ex. Mart.**

Dourados

2016

TAMAEH MONTEIRO ALFREDO

COMPOSIÇÃO QUÍMICA, AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE E
TOXICIDADE DAS FOLHAS DE *Acrocomia aculeata* (Jacq) Lodd. ex. Mart.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Geral/Bioprospecção da Universidade Federal da Grande Dourados, como requisito à obtenção do título de mestre em Biologia Geral/Bioprospecção.

Área de concentração: Biotecnologia e Bioensaios

Orientadora: Profa. Dra. Kely de Picoli Souza

Dourados

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

A392c	<p>Alfredo, Tamaeh Monteiro.</p> <p>Composição química, avaliação do potencial antioxidante e toxicidade das folhas de <i>Acrocomia aculeata</i> (Jacq) Lodd. ex. Mart. / Tamaeh Monteiro Alfredo. – Dourados, MS : UFGD, 2016.</p> <p>Orientadora: Prof. Dra. Kely de Picoli Souza.</p> <p>Dissertação (Mestrado em Biologia Geral-Bioprospecção) – Universidade Federal da Grande Dourados.</p> <p>1. Macaúba. 2. Bocaiúva. 3. Estresse oxidativo. 4. Biotecnologia. 5. Biodiversidade. I. Título.</p>
-------	--

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central – UFGD.

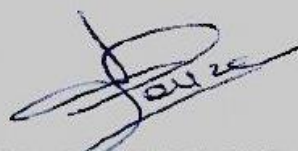
©Todos os direitos reservados. Permitido a publicação parcial desde que citada a fonte.

"COMPOSIÇÃO QUÍMICA, AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE E TOXICIDADE DAS FOLHAS DE *Acrocomia aculeata* (JACQ.) LODD EX. MART".

POR

TAMAEH MONTEIRO ALFREDO

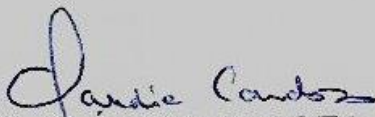
DISSERTAÇÃO APRESENTADA À UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS (UFGD), COMO PARTE DOS REQUISITOS EXIGIDOS PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM BIOLOGIA GERAL - ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: "BIOPROSPECÇÃO".



PROF^a. DR^a. KELY DE PICOLI SOUZA
ORIENTADORA – UFGD



PROF. DR. WANDERLEI ONOFRE SCHMITZ
MEMBRO TITULAR – UFGD



PROF^a. DR^a. CLÁUDIA ANDREA LIMA CARDOSO
MEMBRO TITULAR – UEMS

Aprovada em 28 de julho de 2016.

Dedico este trabalho à minha mãe Heloisa, sem
você nada na minha vida teria sido possível.
Obrigada por tudo! Te amo incondicionalmente.

AGRADECIMENTOS

Minha mãe sempre me ensinou que um dos sentimentos mais bonitos que existem é a gratidão, e com muito orgulho eu carrego ele dentro do meu coração. Sendo assim, primeiramente, agradeço ao Grande Arquiteto do Universo, nosso Deus, que me permitiu nascer, que eu tivesse oportunidades incríveis, e mais que tudo, me deu a oportunidade de ter a melhor, mais parceira, mais carinhosa, mais mais mais de todas, MINHA MÃE. Minha existência já valeu simplesmente por ter você em minha vida. Obrigada por tudo que me ensinou, por toda paciência, todo amor, tudo que você fez por mim. Obrigada Mãe!

Também devo à Deus, a gratidão por ter meu irmão Ricardo e minha cunhada Silvania. Obrigada por terem sido sempre presentes em minha vida e por terem aumentado nossa família lindamente com as melhores pecinhas Diego e Beatriz. Agradeço à toda a minha família, por todo o apoio e incentivo. Principalmente minha Tia-madrinha Eliane, meus avós Aida (*in memoriam*) e Milton, e minha amiga Elizabeth. Ao Ramon, e Tio Marcelo. Muito obrigada.

Meu muito obrigada à minha orientadora, Professora Dra. Kely de Picoli Souza, pela oportunidade ímpar, por ter me aceitado como orientanda e pela ajuda que recebi na realização deste trabalho. A Sra me mostrou uma nova maneira de ver a carreira acadêmica. Obrigada por todo apoio, por toda paciência e a dedicação. Devo também meus agradecimentos ao meu co-orientador, Professor Dr. Edson Lucas dos Santos por tudo que tem feito e faz por nós. Obrigada também ao Professor Caio Fernando Ramalho de Oliveira por toda ajuda com os experimentos e com a escrita, pela disponibilidade, pela parceria e principalmente, pela amizade.

Agradeço ao meu orientador do doutorado em Portugal, Dr. Paulo Nuno Centeio Matafome, por toda a colaboração nesse projeto, que mesmo não sendo sua função e nem parte da minha proposta a ser realizada em Coimbra, não mediu esforços e nem recursos para me ajudar a concluir esta etapa. Muito obrigada mesmo!

Quero agradecer de maneira especial à minha amiga e colega de laboratório, Sara Oliveira. Migs...não sabia que anjos trabalhavam com metabolismo (rsrs), fostes a melhor amiga de laboratório que eu poderia ter tido em Coimbra. Obrigada por tudo mesmo, pelo acolhimento, pelo carinho, pela parceria e principalmente pela confiança. Obrigada pelas horas e horas de experimentos, por dividir comigo os aprendizados, seus conhecimentos e ser tão parceira e amiga. São tantos agradecimentos por tudo que fizestes por mim que realmente acho que a palavra “obrigada” parece ser pequena, então MUITO OBRIGADA MIGS!

Ao GEBBAM (Grupo de Estudos em Biotecnologia e Bioprospecção Aplicados ao Metabolismo). Sem dúvida alguma, sem vocês eu não conseguiria ter realizado nem metade

dos meus experimentos. Hoje posso dizer que tenho amigos e não apenas colegas de laboratório. A minha co-orientada, Bianca, e aos meus amigos de laboratório Kátia, David, Jéssica, Alex, Laiandra, Natasha, Daniel, André, Anderson, Natã, Aline, Cinthia, Débora, Hélder, Janielle, Jaqueline, Laiandra, Laura, Márcio, Paola, Rafael, Stéfany, Thaliny e Uilson.

Fico feliz em poder também lembrar e agradecer à toda a equipe da UFGD que me auxiliou. Ao Carlos, Paulo, Francisco e Felipe, aos técnicos dos laboratórios, as meninas da limpeza e as tias da biblioteca, principalmente à Luciana, que sempre me recebeu com uma palavra carinhosa e com suas comidas maravilhosas.

Obrigada também ao grupo de pesquisa da Fisiologia da Universidade de Coimbra: Sara, Cátia, Gabriela, Mariana, Daniela, Luis e Tiago. Vocês foram incríveis, e me acolheram de maneira ímpar! Meu muito obrigada a todos. Obrigada também à Dra. Célia Cabral e a MSc. Mariana Magalhães pelos ensinamentos e pela ajuda com a cultura de células. Vocês foram incríveis.

Ao meu professor Dr. José Antônio Avelar Baptista por todo incentivo e por sempre acreditar em mim. Agradeço à Professora Dra, Ayd Mary Oshiro e também ao meu amigo MSc. Vinícius de Oliveira por toda ajuda e incentivo. Obrigada a todos os professores que fizeram parte da minha formação acadêmica.

Por fim, minhas amigas do coração, Catarina Nardi, Gabriela Claro, Danielly Sotolani, Giuliane Zacarias, Izabelli Ribeiro e Sol Mariela, minhas parceiras-irmãs.

Tantos “obrigada”, espero que quem leia isto, possa ter a mínima noção do quão feliz eu sou por ter estas pessoas junto comigo.

“É mais fácil obter o que se deseja com um sorriso do que à ponta da espada”.

William Shakespeare

RESUMO

A biodiversidade brasileira representa uma fonte rica de componentes químicos naturais que podem revelar substâncias potencialmente ativas para diversos fins. A importância farmacológica das plantas está relacionada à sua composição química, que fornece propriedades terapêuticas importantes, tais como a atividade antioxidante. A *Acrocomia aculeata* é uma palmeira nativa do cerrado brasileiro, sua polpa é rica em ácido láurico, β caroteno, e sua amêndoa em ácido oleico. Seu uso medicinal é descrito no tratamento de doenças respiratórias, redução da glicemia e níveis séricos de colesterol, além de possuir propriedades anti-inflamatórias e laxativas, sendo amplamente utilizada na indústria cosmética, alimentícia e na produção de biocombustíveis. Embora os frutos sejam muito utilizados e conhecidos, pouco se sabe sobre as folhas, por conta disto, este estudo objetivou avaliar a composição química, a atividade antioxidante e a toxicidade das folhas de *A. aculeata*. Para isto, foram produzidos extratos com três diferentes solventes: água (EA-Aa), etanol (EE-Aa) e metanol (EM-Aa). Os extratos foram caracterizados quimicamente através da determinação de compostos fenólicos, flavonoides e taninos, além da análise cromatográfica, seguidos da avaliação da atividade antioxidante dos extratos por métodos de captura de radical livre, DPPH e ABTS. Os EE-Aa e EM-Aa apresentaram maiores quantidades dos metabólitos secundários avaliados e melhores resultados de captura de radicais livres. Porém, no ensaio de proteção contra a hemólise oxidativa e avaliação da peroxidação lipídica em eritrócitos induzidos com AAPH, o EA-Aa apresentou maior proteção em relação aos outros extratos avaliados. Assim, continuamos os ensaios para determinar o efeito protetor de EA-Aa contra a oxidação proteica induzida por AAPH, fragmentação de DNA e a geração de EROS induzidos por H_2O_2 . Um aumento nos níveis de Sirt-1, catalase e ativação de ERK e Nrf2 foram observados em Cos-7 tratadas com EA-Aa, o que também foi observado em nematoides *C. elegans*, os quais apresentaram maior viabilidade quando induzidos com Juglone e tratados com EA-Aa. A baixa toxicidade de EA-Aa também foi comprovada nos diversos modelos experimentais testados. Em conjunto, os extratos das folhas de *A. aculeata* apresentaram composição química típica às das plantas, porém a diversidade de compostos presentes em EA-Aa provavelmente está envolvida em sua baixa toxicidade, e seu relevante potencial antioxidante avaliado em diferentes biomoléculas, em células Cos-7 e em *C. elegans*, provavelmente está relacionado com a ativação da via Sirt1/Nrf2. Desta forma, os resultados obtidos dão suporte para futuros usos de EA-Aa no tratamento de doenças relacionadas com o estresse oxidativo.

Palavras-chave: Macaúba, bocaiúva, estresse oxidativo, bioprospecção, biotecnologia, biodiversidade.

ABSTRACT

Brazilian biodiversity represents a rich source of natural chemical components that can reveal potentially active substances for various purposes. The pharmacological importance of plants is related to their chemical composition, which provides important therapeutic properties, such as antioxidant activity. *Acrocomia aculeata* is a native palm of the Brazilian Cerrado, its pulp is rich in lauric acid, β carotene, and its almond in oleic acid. Its medicinal use is described in the treatment of respiratory diseases, lowering blood glucose and serum cholesterol levels, besides having anti-inflammatory and laxative properties, being widely used in the cosmetic, food and biofuel industry. Although fruits are widely used and known, little is known about the leaves, because of this, this study aimed to evaluate the chemical composition, antioxidant activity and toxicity of *A. aculeata* leaves. Extracts with three different solvents were produced: water (EA-Aa), ethanol (EE-Aa) and methanol (EM-Aa). The extracts were chemically characterized by the determination of phenolic compounds, flavonoids and tannins, besides chromatographic analysis, followed by the evaluation of the antioxidant activity of the extracts by free radical capture methods, DPPH and ABTS. EE-Aa and EM-Aa presented higher amounts of secondary metabolites evaluated and better free radical capture results. However, in the protection assay against oxidative hemolysis and evaluation of lipid peroxidation in AAPH-induced erythrocytes, EA-Aa showed greater effect than the other extracts evaluated. Thus, we continue the trials to determine the protective effect of EA-Aa against AAPH-induced protein oxidation, DNA fragmentation, and H_2O_2 -induced EROS generation. Increased levels of Sirt-1, catalase and ERK and Nrf2 activation were observed in EA-Aa-treated Cos-7, which was also observed in *C. elegans* nematodes, which were more viable when treated with EA-Aa and induced with Juglone. The low toxicity of EA-Aa has also been proven in the various experimental models tested. Taken together, the leaf extracts of *A. aculeata* presented typical chemical composition to those of plants, but the diversity of compounds presented in EA-Aa is probably involved in their low toxicity, and their relevant antioxidant potential evaluated in different biomolecules and also in Cos-7 and *C. elegans*, is probably related to the activation of the Sirt1 / Nrf2 pathway. Thus, the results support future uses of EA-Aa in the treatment of diseases related to oxidative stress.

Keywords: Macaúba, bocaiúva, oxidative stress, bioprospecting, biotechnology, biodiversity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Redução do oxigênio à água.	Página 20
Figura 2	Ação das enzimas antioxidantes	Página 28
Figura 3	Ciclo redox da glutathiona	Página 29
Figura 4	<i>A. aculeata</i> (Jacq.) Lodd ex Mart.	Página 35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Reações químicas de estabilização eletrônica realizadas por ERs.	Página 21
-----------------	--	-----------

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

4-HNE	4-hidroxinonenal
AA	Ácido ascórbico
AAPH	2,2'-Azobis(2-methylpropionamide) dihydrochloride
ABTS	2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)
AGE	Produtos de glicação avançada (<i>Advanced glycation products</i>)
ARE	Elementos de resposta antioxidante (<i>Antioxidant response elements</i>)
ATP	Adenosina trifosfato
BCA	Ácido bicinconínico (<i>Bicinchoninic acid</i>)
BHA	Butil-hidroxi-anisol
BHT	Butil-hidroxi-tolueno
BSA	Albumina sérica bovina (Bovine serum albumin)
CAT	Catalase
CG-MS	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (Gas chromatography coupled with mass spectrometry)
CYPs	Citocromo P450 (Cytochromes P450)
DAPI	Dihidrocloreto de 4',6-diamidino-2-fenilindole (<i>4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride</i>)
DCF	Diclorofluoresceína (Dichlorofluorescein)
DHE	Dihidroetídio (<i>dihydroethidium</i>)
DMEM-HG	Dulbecco's modified Eagle medium – high glucose
DPPH	2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl
EA-Aa	Extrato aquoso de <i>Acrocomia aculeata</i>
ECL	Quimioluminescência aprimorada (<i>Enhanced Chemiluminescence</i>)
EDRF	Fator relaxante derivado do endotélio (<i>Endothelium-derived relaxing factor</i>)
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético (<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>)
EE-Aa	Extrato etanólico de <i>Acrocomia aculeata</i>
EGTA	Ácido etileno-bis (oxietilenonitrilo) tetraacético (<i>Ethylene-bis(oxyethylenenitrilo) tetraacetic acid</i>)
EM-Aa	Extrato metanólico de <i>Acrocomia aculeata</i>
ERC	Espécies reativas de carbono

ERCI	Espécies reativas de cloro
ERK	Quinase regulada por sinal extracelular (<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>)
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ERs	Espécies reativas
ERS	Espécies reativas de enxofre
FAD	Flavina-adenina dinucleótido
FBS	Soro fetal bovino (<i>Fetal bovine serum</i>)
GPx	Glutationa peroxidase
GRd	Glutationa redutase
GSH	Glutationa reduzida
GSSG	Glutationa oxidada
H₂DCFDA	2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
HDACSs	Desacetilases de histonas (<i>Histone deacetylases</i>)
HNO₂	Ácido nitroso
HO-1	Heme oxigenase-1
JNK	Quinase N-terminal do c-jun (<i>c-Jun N-terminal kinases</i>)
Keap 1	Proteína 1 associada a ECH semelhante a Kelch (<i>Kelch-like ECH-associated protein 1</i>)
LC-PDA	Cromatografia líquida com detector de matriz de fotodíodos (<i>Liquid chromatography with photodiode array</i>)
MAPK	Proteínas ativadas por mitógenos (<i>Mitogen Activated Protein Kinases</i>)
MDA	Malondialdeído
N₂O₃	Trióxido de dinitrogênio
Na₃VO₄	Ortovanadato de sódio
NaCl	Cloreto de sódio
NAD	Dinucleótido de nicotinamida e adenina (<i>Nicotinamide adenine dinucleotide</i>)
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (<i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>)

NADH	Dinucleótido de nicotinamida e adenina reduzido (<i>Reduced nicotinamide adenine dinucleotide</i>)
NaF	Fluoreto de sódio
NGM	Meio de crescimento de nematoides (<i>Nematode Growth Medium</i>)
NO[•]	Óxido nítrico
NO₂⁻	Nitritos
NO₃⁻	Nitratos
NQO1	Quinona oxido redutase
Nrf2	Fator nuclear eritróide 2-relacionado ao fator 2 (<i>Nuclear factor erythroid 2-related factor 2</i>)
O₂^{-•}	Radical superóxido
OH[•]	Radical hidroxila
ONOO⁻	Peroxinitrito
PBS	Tampão fosfato salino (<i>Phosphate-buffered saline</i>)
PDA	Detector de matriz de fotodíodos (<i>Photodiode array detector</i>)
PG	Propil galato
PKC	Proteína quinase C (<i>Protein kinase C</i>)
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonil (<i>Phenylmethylsulfonyl fluoride</i>)
PUFAs	Ácidos graxos poli-insaturados (<i>Polyunsaturated fatty acid</i>)
PVDF	Polivinilideno
RNS	Espécies reativas de nitrogênio (<i>Reactive nitrogen species</i>)
RO[•]	Radical alcoxila
ROO[•]	Radical peroxila
ROS	Espécies reativas de oxigênio (<i>Reactive oxygen species</i>)
RS	Espécies reativas (<i>Reactive species</i>)
SDS	Dodecil sulfato de sódio (<i>Sodium lauryl sulfate</i>)
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida (<i>Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
SIRT	Sirtuína (<i>Sirtuin</i>)
SOD	Superóxido dismutase
TBA	Ácido tiobarbitúrico (<i>Thiobarbituric acid</i>)
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (<i>Thiobarbituric acid reactive substances</i>)

TBHQ Terc-butil-hidroquinona
TBS Solução tampão de tris (*Tris buffer solution*)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	19
2. REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1. ESTRESSE OXIDATIVO	21
2.1.2. ESPÉCIES REATIVAS.....	22
2.1.3. MARCADORES DO ESTRESSE OXIDATIVO.....	24
2.1.4. VIAS DE DETOXIFICAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO.....	25
2.1.5. FATORES TRANSCRICIONAIS DE PROTEÇÃO REDOX	25
2.2. ANTIOXIDANTES	27
2.2.1 ANTIOXIDANTES ENDÓGENOS ENZIMÁTICOS	28
2.2.2 SUPEROXIDO DISMUTASE (SOD).....	28
2.2.3 CATALASE (CAT) E GLUTATIONA PEROXIDASE (GPX)	28
2.2.4. ANTIOXIDANTES ENDÓGENOS NÃO ENZIMÁTICOS	30
2.2.5. EXÓGENOS (SINTÉTICOS OU NATURAIS).....	31
2.3. BIODIVERSIDADE BRASILEIRA.....	32
2.3.1. PLANTAS MEDICINAIS	33
2.3.2. Arecaceae.....	34
2.3.4. <i>Acrocomia aculeata</i>	35
2.4. TOXICIDADE DAS PLANTAS MEDICINAIS	37
2.4.1. <i>Caenorhabditis elegans</i> COMO MODELO EXPERIMENTAL PARA ENSAIOS DE TOXICIDADE E RESISTÊNCIA AO ESTRESSE.....	38
3. OBJETIVOS	40
3.1. GERAL.....	40
3.2. ESPECÍFICOS	40
4. REFERÊNCIAS	41
5. ARTIGO CIENTÍFICO	50
6. CONCLUSÃO GERAL.....	99

1. INTRODUÇÃO

O aumento da expectativa de vida da população e as mudanças de hábitos têm levado ao aumento da incidência de doenças crônicas, como câncer e diabetes (GBD 2013 DALYS AND HALE COLLABORATORS et al., 2015a). O impacto econômico provocado pelos gastos realizados com o tratamento dessas doenças, dentre outros, estimula o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas, especialmente mais baratas e eficazes (WHO, 2011). O estresse oxidativo tem relação tanto com a causa quanto com a progressão destas doenças (WU et al., 2004a), podendo ser desencadeado por fatores endógenos e também exógenos, como os ambientais: radiação, metais pesados e poluição (FINKEL; HOLBROOK, 2000a).

A condição pró-oxidante do balanço redox do organismo se caracteriza pelo aumento da produção de espécies reativas (ERs), principalmente de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs), em relação à ação dos compostos antioxidantes, os quais não conseguem neutralizá-las de maneira eficiente (GÓES, 2008). Em baixas concentrações, as ERs participam da sinalização celular de processos bioquímicos e imunológicos (ZHANG et al., 2013), dentre outros. Contudo, quando em excesso, reagem com carboidratos (BARONE et al., 2014), lipídios da membrana celular, proteínas e DNA (TURK et al., 2008), podendo resultar em doenças crônicas como diabetes mellitus (TIWARI et al., 2013), obesidade e câncer (LEE; LEE, 2006).

Pelo menos em parte, os benefícios farmacológicos das plantas medicinais no tratamento e/ou prevenção do estresse oxidativo (AGATI et al., 2012; DAI; MUMPER, 2010; RAMEL; MIALOUNDAMA; HAVAUX, 2013) se devem aos seus metabólitos secundários, como os compostos fenólicos, flavonoides, carotenoides e taninos (EDEOGA; OKWU; MBAEBIE, 2005), reconhecidamente caracterizados como compostos antioxidantes (DEMIDCHIK, 2015), que podem agir isoladamente ou em sinergismo (SHAHIDI, 2009). A relação positiva entre o consumo de vegetais ricos em compostos fenólicos e a prevenção de doenças relacionadas ao estresse oxidativo estimula a busca por plantas com este potencial, tanto para fins alimentares (manutenção da saúde) quanto medicinais (tratamento de doenças) (SHAHIDI, 2009; TUKAN; TAKRURI; AL-EISAWI, 1998).

Neste contexto, o Brasil é o país que apresenta a maior biodiversidade do mundo, com uma vasta variedade ecológica e botânica. Parte dela está localizada no Cerrado (DE TOLEDO et al., 2011), servindo de importante fonte de matéria-prima para alimentação, produção de fitoterápicos e medicamentos em geral (PNPMF, 2009). Dentre as plantas nativas do Cerrado

brasileiro, encontra-se a *Acrocomia aculeata*, conhecida popularmente como macaúba ou bocaiúva (RAMOS et al., 2007).

Esta palmeira possui altura entre 10 e 15 metros e fruto amarelo-alaranjado. Sua importância econômica é expressa, por exemplo, pela ampla utilização de seus frutos na culinária (POETSCH, J; HAUPENTHAL, D, 2019) e na produção de biodiesel. O óleo da amêndoa também é usado como substituinte do azeite de oliva (BORA; MOREIRA, 2003), além de ser empregado na indústria cosmética e farmacêutica (CICONINI et al., 2013). Popularmente esta planta tem sido usada para o tratamento de doenças respiratórias e também como laxante, analgésica e na redução dos níveis séricos de glicose e colesterol (LORENZI, 2006).

Diversos compostos químicos com alto potencial antioxidante têm sido descritos na *A. aculeata*. Na polpa do fruto estão presentes ácido oleico (HIANE et al., 2005; MARIANO, R et al., 2010; RAMOS et al., 2007), β -caroteno (SANJINEZ-ARGANDOÑA; CHUBA, 2011) e α -tocoferol (COIMBRA; JORGE, 2012), enquanto na amêndoa evidenciou-se a presença de ácido láurico e oleico (BELTRÃO; OLIVEIRA, 2007). Embora os frutos sejam mais utilizados e conhecidos, as folhas são empregadas na nutrição animal e não possuem relatos de toxicidade (CICONINI et al., 2013), entretanto, pouco se sabe sobre sua composição química e seu potencial. Assim, este estudo buscou avaliar a composição química, a atividade antioxidante e a toxicidade das folhas de *A. aculeata*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

O aumento e o acúmulo de agentes oxidantes no organismo, ou seja, o estado de estresse oxidativo, está presente no envelhecimento precoce bem como na maioria das doenças crônicas, como as cardiovasculares e o câncer e tem relação tanto com sua etiologia quanto com sua progressão (WU et al., 2004b). Estas condições têm aumentado na população, especialmente, pela ampliação da expectativa de vida (GBD 2013 DALYS AND HALE COLLABORATORS et al., 2015b) e mudanças de hábitos.

O impacto econômico decorrente de mortes e gastos relacionados ao tratamento dessas doenças e suas comorbidades, dentre outros, tem estimulado o desenvolvimento de opções terapêuticas e medidas preventivas mais baratas e eficazes. Nesta perspectiva, o Brasil, um país megabiodiverso, apresenta amplas possibilidades para a bioprospecção de vegetais, permitindo ainda muitos estudos para identificação de plantas com potencial terapêutico como alternativas viáveis para o fornecimento de alimentos ligados a manutenção da saúde (nutracêuticos), bem como para o desenvolvimento de novos fármacos ligados ao controle do estresse oxidativo (CAMERON et al., 2011).

2.1. ESTRESSE OXIDATIVO

Na metade dos anos 50, Denham Harman começou a especular a “teoria do radical livre”, onde já acreditava-se que as espécies reativas de oxigênio (EROs) geradas nas células poderiam provocar um dano cumulativo (FINKEL; HOLBROOK, 2000b). Anos mais a frente, Sies (1985) estabeleceu o conceito de estresse oxidativo, o qual definiu esta condição como o desbalanço entre o sistema pro-oxidante e antioxidante do organismo (SIES, 2015). Com o avanço dos estudos na área nas últimas décadas, este conceito apresentou uma definição mais detalhada e talvez, mais próxima da realidade, onde define-se estresse oxidativo como o aumento de espécies reativas (ERs) no organismo paralelamente à redução da defesa antioxidante (PISOSCHI; POP, 2015). Assim, as ERs formadas neste sistema pró-oxidante, não são suficientemente neutralizadas pelo sistema antioxidante, o que leva à uma ruptura da sinalização e/ou do controle do sistema redox dor organismo (SIES, 2018), culminando com uma produção excessiva de substâncias pró-oxidantes, principalmente EROs/ERNs (GÓES, 2008).

Estas substâncias não são suficientemente neutralizadas pelos sistemas antioxidantes, endógenos e exógenos, resultando em um aumento dos níveis de ERs no organismo (GÓES,

2008). A produção destas ERs está relacionada com as funções metabólicas endógenas e também com a exposição do organismo a fatores ambientais (radiação, metais pesados e poluição) (FINKEL; HOLBROOK, 2000a). Quando produzidas em excesso, as ERs podem reagir com biomoléculas e provocar danos aos carboidratos (BARONE et al., 2014), lipídios da membrana celular, proteínas e DNA (TURK et al., 2008), resultando em disfunção celular (BARONE et al., 2014) e morte (CHISTÉ et al., 2014). O excesso de ERs é considerado um fator importante para o envelhecimento precoce e o desenvolvimento de doenças crônicas como diabetes mellitus (TIWARI et al., 2013), obesidade (NIJHAWAN; ARORA; BEHL, 2019), câncer (BATTELLI et al., 2019), desordens cardiovasculares, síndrome metabólica (MASLOV et al., 2019), artrite reumatoide, doenças respiratórias, neurodegenerativas e também doenças auto-imunes (REED, 2011).

2.1.2. ESPÉCIES REATIVAS

Em torno de 95% do oxigênio produzido por organismos aeróbicos é reduzido pela cadeia transportadora de elétrons da mitocôndria e no retículo endoplasmático. A redução tetravalente do O₂ ocorre através da citocromo oxidase, que fornece 4 elétrons para o oxigênio, o qual se reduz a água (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1985) conforme esquema abaixo:

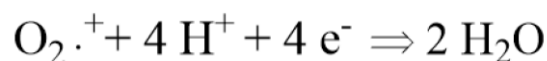


Figura 1. Redução do oxigênio à água.

De todo o oxigênio obtido através da respiração, 2 a 5% passa por redução univalente, recebendo apenas um elétron que fica localizado nos orbitais externos, tornado o orbital desemparelhado e altamente reativo, gerando as ERs (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1989). As ERs foram inicialmente descritas há mais de um século por Moses Gomberg, e por muito tempo acreditava-se que elas não estavam presentes nos sistemas biológicos por possuírem alta reatividade e baixo tempo de meia-vida. Passados mais de 30 anos, foi proposta uma nova teoria, onde acreditava-se que todos os processos oxidativos que envolviam moléculas orgânicas eram intercedidos por algum tipo de espécie reativa. Já nos anos 50, esta teoria foi confirmada, e associada a ela, uma nova hipótese, de que as ERs estivessem associadas com a etiologia e o desenvolvimento de processos patológicos e de envelhecimento. Seguindo destes acontecimentos, McCord & Fridovich descreveram a primeira enzima antioxidante, a

superóxido dismutase, e entre os anos de 1970 a 1990, outras pesquisas possibilitaram o descobrimento da relação das ERs no combate a agentes infecciosos, auxiliando o sistema imunológico; em 1980, descobriu-se a relação do óxido nítrico, produzido pela L-arginina; que contribui para a atividade do fator relaxante derivado do endotélio (EDRF); e atua na regulação de vias metabólicas (LUSHCHAK, 2014). Esta ideia se estende até os dias de hoje, e leva à inúmeras pesquisas na área, que objetivam avaliar esta relação entre ERs e os sistemas biológicos, e no que se refere aos danos, reduzi-los.

As ERs são divididas em dois grupos, radicalares (radicais livres) e não radicalares. As radicalares de oxigênio podem ser representadas por radicais hidroxila ($\text{OH}\cdot$), superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), alcóxila ($\text{RO}\cdot$) e peróxila ($\text{ROO}\cdot$), e as não radicalares de oxigênio estão o ácido hipocloroso (HNO_2) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e, dentre as não radicalares de nitrogênio, estão o óxido nitroso (N_2O_3), ácido nitroso (HNO_2), óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$), nitritos (NO_2^-), nitratos (NO_3^-) e também os peroxinitritos ($\text{ONOO}\cdot$). Existem também as ERs derivadas de enxofre (ERS) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015), de cloro (ERCl), de carbono (ERC) e de metais de transição, que também possuem importância biológica (FINKEL; HOLBROOK, 2000a).

As ERs ao atacarem outras moléculas afim de se estabilizarem (NEHA et al., 2019) fazem uso de mecanismos como os descritos na tabela abaixo.

Tabela 1: Reações químicas de estabilização eletrônica realizadas por ERs.

Mecanismo	Reação
Captura de elétrons	$\text{OH}\cdot + \text{RS}^- \rightleftharpoons \text{OH}^- + \text{RS}\cdot$
Remoção de grupos hidrogênio	$\text{CCl}_3\cdot + \text{RH} \rightleftharpoons \text{CCl}_3\text{H} + \text{R}\cdot$
Auto-aniquilação	$\text{CCl}_3\cdot + \text{CCl}_3\cdot \rightleftharpoons \text{C}_2\text{Cl}_6$
Reações de adição	$\text{CCl}_3\cdot + \text{CH}_2=\text{CH}_2 \rightleftharpoons \text{CH}_2(\text{CCl}_3) - \text{CH}_2\cdot$

Estes compostos atuam em processos bioquímicos, fisiológicos e patológicos no organismo, como em sinalizações celulares, neurotransmissão (YAMAMOTO; GAYNOR, 2001) e defesas imunológicas (ZHANG et al., 2013). De maneira geral, auxiliam na homeostase quando se encontram em quantidades equilibradas de produção e neutralização e o desequilíbrio

entre estes processos gera um estado pró-oxidante, e como consequência o estresse oxidativo (VASCONCELOS et al., 2007).

2.1.3. MARCADORES DO ESTRESSE OXIDATIVO

Os danos celulares provocados pelas reações entre ERs e macromoléculas envolvem alterações em ácidos nucléicos e mutações em RNA e DNA (TURK et al., 2008), promovidas pela quebra das cadeias e suas reorganizações, e estas mutações podem provocar alterações enzimáticas, como observado em alguns processos de oncogênese (LEE; LEE, 2006). Além de que quando a membrana celular é alvo das ERs ocorre um processo de oxidação lipídica que pode alterar o transporte de substâncias e até provocar seu rompimento, resultando em morte/lise celular. As proteínas também podem ser afetadas por ERs, íons metálicos, radiações e também fármacos. Seus aminoácidos são susceptíveis à oxidação, e esta fornece derivados carbonílicos que podem ser introduzidos em proteínas através da peroxidação lipídica, ou também pela reação de redução de açúcares, que após desidratação e rearranjo geram os produtos finais de glicação avançada (AGEs, “Advanced Glycation End Products”), reação denominada de reação de Maillard (VASCONCELOS et al., 2007). Adicionalmente, quando esta oxidação ocorre no sangue, as paredes dos vasos sanguíneos agredidas desencadeiam o acúmulo de lipídeos e, conseqüentemente, o início de um processo aterosclerótico que pode culminar em trombose e infarto (GBD 2013 DALYS AND HALE COLLABORATORS et al., 2015b).

Os principais marcadores biológicos de estresse oxidativo envolvidos com a peroxidação lipídica são: 4-hidroxinonal (4-HNE) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015), isoprostano e malondialdeído (MDA) (KUMAR; MAURYA, 2014). O MDA é produzido pela ruptura de ácidos graxos poli-insaturados da membrana celular, como o ácido linoleico, docoexanóis e araquidônico (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015). É um subproduto de fácil investigação, pois, a reação entre o ácido tiobarbitúrico (TBA) e o MDA gera um cromógeno rosa que pode ser quantificado em espectrofotômetro a 532 nm (THÉRON, P et al., 2000). Altos níveis deste produto de peroxidação lipídica foram detectados em casos de degradação celular, diversas doenças e, até mesmo, no envelhecimento precoce (RIZVI; MAURYA, 2007).

Diante deste quadro e dos mecanismos moleculares envolvidos na manutenção do equilíbrio redox, novas pesquisas e estratégias têm sido desenvolvidas afim de identificar os mecanismos e vias de ativação que estejam relacionadas com proteção antioxidante e o combate aos danos associados ao estresse oxidativo.

2.1.4. VIAS DE DETOXIFICAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO

A proteção fornecida pelo organismo contra a ERs constituem um sistema composto por três fases de detoxificação (SARKADI et al., 2006). Durante a fase 1, endobióticos e xenobióticos são modificados por enzimas como o citocromo P450 (CYPs) e algumas desidrogenases e redutases de cadeia curta (SDRs), os quais utilizam os cofatores NAD ou NADP para que seja adicionado um grupo reativo à molécula, como é o caso da hidroxila, formando assim uma ERs. Esta reação permite que compostos nocivos ao organismo possam ser excretados, porém, uma vez que estes compostos são transformados em ERs e não são neutralizado pelas proteínas de fase 2, danos podem ser provocados às biomoléculas do corpo (SARKADI et al., 2006).

As proteínas de fase 2, por sua vez, além de neutralizarem/inativarem as ERs produzidas pelo próprio organismo a partir das proteínas de fase 1, também atuam sobre as ERs já existentes, e fazem parte de um importante grupo de proteínas que atuam em defesa do corpo em resposta ao estresse gerado, neutralizando e reparando o dano provocado (SARKADI et al., 2006) (uma explicação detalhada das enzimas antioxidantes e como elas atuam é apresentada a seguir, a partir do tópico 2.2 desta revisão). Já as proteínas de fase 3 de detoxificação são as responsáveis pela retirada dos conjugados tóxicos para o meio extracelular, e isto ocorre por transportadores de ligação de ATP e outros, atuando assim na redução do estresse oxidativo (JAGANJAC, 2010; SARKADI et al., 2006).

2.1.5. FATORES TRANSCRICIONAIS DE PROTEÇÃO REDOX

A condição de desequilíbrio provocada pelo estresse oxidativo induz a ativação de vias de sinalização e fatores transcripcionais que atuam em resposta à condição redox do organismo. O principal fator transcricional envolvido nesta condição é o fator nuclear eritróide 2-relacionado ao fator 2 (Nrf2), o qual é responsável pelo início da produção das enzimas antioxidantes (JUNG; KWAK, 2010). Em níveis basais, o Nrf2 fica associado à sua proteína supressora citoplasmática *Kelch-like ECH-associated protein 1* (Keap 1), que é constituída por 27 cisteínas que regulam constantemente sua ligação ao Nrf2, promovendo assim sua degradação/inativação, quando em condições fisiológicas (BAIRD; DINKOVA-KOSTOVA, 2011).

Quando ocorre uma modificação desta condição para um estado oxidativo (que geralmente é sinalizado por resíduos de tióis de cisteína), o Nrf2 dissocia-se do Keap1 e é

translocado para o núcleo da célula (KIM; VAZIRI, 2010), onde outros fatores transcricionais se ligam ao Nrf2, conhecidos como Elementos de Resposta Antioxidante (*antioxidant response elements* - ARE) e estes promovem a codificação das proteínas de fase 2 (KIM; CHA; SURH, 2010), como por exemplo heme-oxigenase-1 (HO-1), quinona oxido redutase (NQO1) e as enzimas antioxidantes que serão mencionadas a seguir (ITOH et al., 1997). Desta forma, o Nrf2 controla o balanço oxidante e a sinalização de vias de resposta ao estresse através da regulação e expressão de 3 grupos dependentes de ARE que são as proteínas de fase 1, 2 e 3, e desta forma o sistema Keap-1/Nrf2 regula mais de 30 genes que atuam na defesa antioxidante (MA, 2013).

Em resumo, a função do Nrf2 é auxiliar na adaptação e sobrevivência das células sob condições de estresse, e para isto regula a expressão de proteínas que atuam na manutenção do equilíbrio redox. Seu principal efeito ocorre através da regulação da enzima glutathione transferase através da regeneração do NADPH, além de controlar as EROs que são produzidas nas mitocôndrias. Então para que haja um equilíbrio redox no organismo, o Nrf2 atua tanto no potencial mitocondrial, quanto na oxidação de ácidos graxos e na disponibilização de substratos utilizados na produção de ATP (DINKOVA-KOSTOVA; HOLTZCLAW; KENSLER, 2005), e sua ativação é de suma importância para auxiliar no tratamento de doenças associadas ao estresse oxidativo, como diabetes, doenças cardiovasculares e até o câncer (JIANG et al., 2010). Para que o Nrf2 possa se translocar para o núcleo e se ligar às ARE, este passa pelo processo de dissociação do Keap-1 e seguinte fosforilação, realizada por proteínas quinase, que podem ser a c-Jun N-terminal kinase (JNK), proteína quinase C (PKC) e as quinases reguladas por sinal extracelular (ERK) (KOBAYASHI et al., 2006).

Além destas, existe uma outra proteína que também regula a função de fatores transcricionais e proteínas que estão envolvidas na mecânica da resposta ao estresse e em eventos metabólicos, na regulação energética e também em processos inflamatórios, a Sirtuína (ALAGEEL et al., 2018). As sirtuínas são um grupo de 7 desacetilases dependentes de NAD que muitas vezes são ativadas por compostos de origem natural, como é o caso de carotenoides, flavonoides e compostos fenólicos em geral (WILLCOX; WILLCOX, 2014).

As sirtuínas possuem distintas localizações dentro da célula, no núcleo são encontradas as SIRT-1, SIRT-6 e SIRT-7; na mitocôndria, encontra-se as SIRT-3, SIRT-4 e SIRT-5 e no citoplasma, está localizada a SIRT-2. Dentre os 7 genes conhecidos, a SIRT-1 é o mais estudado e conhecido e está envolvido na resposta ao estresse oxidativo, e o aumento dos seus níveis do corpo humano está associado com a melhora de condições patológicas e de maior tempo de vida (LAM; PETERSON; RAVUSSIN, 2013).

Por fazerem parte da família das desacetilases de histonas (HDACSs), a principal função das sirtuínas é reverter a acetilação regulatória de proteínas tipo histona, atuando assim diretamente na estrutura dos nucleossomos e como consequência, na transcrição gênica (GREGORETTI; LEE; GOODSON, 2004). Relacionadas como alvos das HDACs estão inúmeras proteínas estruturais e fatores de transcrição (GALLINARI et al., 2007) como por exemplo ERK, JNK, p38 e o Nrf2 (YANG et al., 2019a), tornando-se assim um importante alvo terapêutico para o tratamento de diversas alterações metabólicas e também como antioxidante no tratamento de doenças relacionadas aos estresse oxidativo.

2.2. ANTIOXIDANTES

Antioxidantes são compostos que, quando em baixas concentrações em relação ao agente oxidante, neutralizam o substrato ou atuam na prevenção de sua formação, evitando as oxidações subsequentes (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015). Existe uma vasta quantidade de antioxidantes, tanto endógenos, quanto exógenos disponíveis tanto no ambiente, quanto no mercado. Os antioxidantes endógenos podem ser classificados como enzimáticos e não enzimáticos, o sistema enzimático consiste nas enzimas superóxido dismutase (SOD), glutatona peroxidase (GPx) e catalase (CAT), já o sistema não enzimático é representado pelo ácido úrico, ácido lipóico, melatonina, bilirrubina e glutatona (GSH). EM relação aos antioxidantes exógenos, estes também podem ser divididos em dois grupos, os naturais e os sintéticos. Os naturais são representados pelos carotenoides, flavonoides, vitaminas E, A e C (NEHA et al., 2019), e os principais antioxidantes da classe dos sintéticos são butil-hidroxi-anisol (BHA), butil-hidroxi-tolueno (BHT), terc-butil-hidroquinona (TBHQ) e propil-galato (PG) (RAMALHO; JORGE, 2006).

Assim, o sistema de defesa antioxidante pode atuar de diversas formas, mas o primeiro mecanismo ocorre pela inibição das reações em cadeia que ocorrem entre metais como o cobre e o ferro. Ao inibir estas reações, inibe-se a formação das ERs. Além de atuar na geração endógena, os antioxidantes bloqueiam também as ERs provenientes do metabolismo e de fontes exógenas, o que consequentemente impede o ataque às biomoléculas do corpo. Esta ação ocorre principalmente por compostos como a vitamina C, A e E, além de compostos fenólicos, flavonóides e carotenoides. Além disto, também existe outra forma de proteção realizada pelos antioxidantes, que ocorre através do reparo do dano provocado pelas ERs e a reconstituição de estruturas biológicas lesadas, onde pode existir inclusive uma adaptação do próprio organismo,

aumentando a síntese das enzimas antioxidantes, e reduzindo o efeito deletério provocado (BIANCHI; ANTUNES, 1999).

2.2.1 ANTIOXIDANTES ENDÓGENOS ENZIMÁTICOS

O sistema antioxidante enzimático é constituído pelas enzimas superóxido dismutase (SOD), glutathiona peroxidase (GPx) e catalase (CAT), as quais previnem, bloqueiam ou reduzem a formação das ERs responsáveis pela formação das reações em cadeia (BARBOSA et al., 2010).

2.2.2 SUPEROXIDO DISMUTASE (SOD)

Dentre diversas funções, muitos estudos têm indicado que a SOD possui importante papel na prevenção do estresse oxidativo durante o envelhecimento (RIZVI; MAURYA, 2007). É a primeira enzima que age na defesa das células contra as ERs através da catalisação do processo de dismutação do superóxido em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio (O_2) (FAVARETTO et al., 2011). Sua atividade, como a de outras enzimas dependem de cofatores enzimáticos, os quais diferem de acordo com o compartimento celular que atuam. No caso da SOD, esta pode ser encontrada sob duas formas, a SOD-Cu/Zn, associada e estabilizada pelo cobre e pelo zinco, localizada no citoplasma e em todas as células eucarióticas; e a SOD-Mn, que tem como co-fator o manganês e se encontra na mitocôndria (BARBOSA et al., 2010). Sua importância é baseada no fato de a SOD ser a quinta proteína e a enzima mais abundante no corpo humano (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015), e sua função foi estabelecida como específica para a dismutação do radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1985).

2.2.3 CATALASE (CAT) E GLUTATIONA PEROXIDASE (GPX)

A CAT e a GPx são importantes enzimas antioxidantes endógenas que inibem/neutralizam a formação e aumentam a remoção de EROS/ERNS reduzindo os danos oxidativos provocados (MAES et al., 2011). Após a ação da SOD, que catalisa a dismutação de $O_2^{\cdot-}$ em H_2O_2 , a CAT e a GPx atuam em sequência, reduzindo o H_2O_2 em água e oxigênio (MAURYA et al., 2016). De acordo com alguns autores, a CAT é a principal responsável pela conversão de H_2O_2 em água e oxigênio e o faz também quando existe um quadro de desbalanço

oxidativo. A CAT está presente na maioria das células aeróbicas, e nos animais se encontra principalmente no fígado, rins e eritrócitos. Órgãos como cérebro, coração e músculo esquelético também possuem CAT, no entanto, pequenas quantidades (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1985).

A GPx existe também com duas isoformas diferentes, dependente e não dependente de selênio, localizada no citoplasma ou na mitocôndria (BARBOSA et al., 2010), e utiliza a glutatona (GSH) como substrato para neutralizar o H_2O_2 . Este H_2O_2 também pode ser convertido em moléculas de água a partir da reação de Fenton e Haber-Weiss (MAURYA et al., 2016), com o auxílio de ferro e cobre, o que culmina com a geração do radical hidroxila (OH^\cdot) (BARBOSA et al., 2010) como esquematicamente apresentado a seguir.

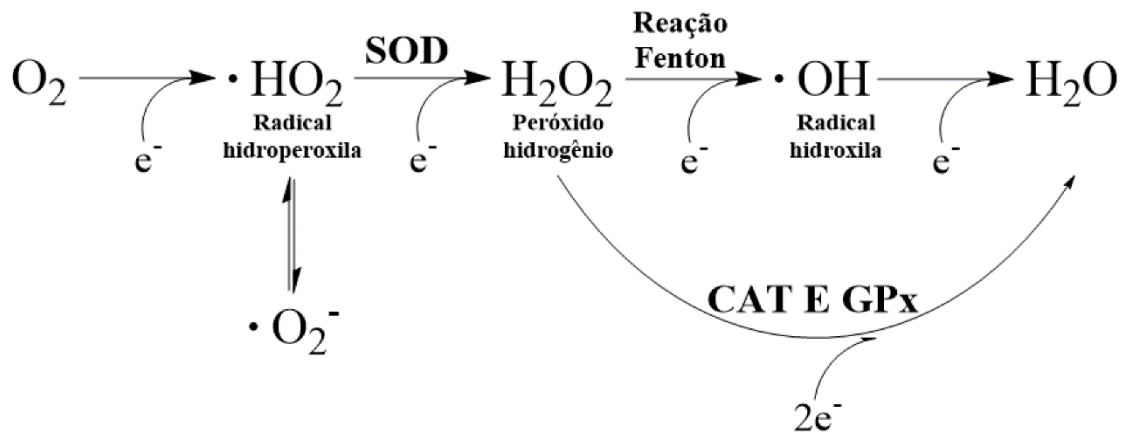


Figura 2. Ação das enzimas antioxidantes. Durante respiração celular, a retirada de alguns elétrons provoca a conversão molecular de oxigênio (O_2) no radical hidroperoxila ($\cdot\text{HO}_2$), o qual é facilmente convertido no radical superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$) que é altamente reativo. Este ânion é neutralizado a partir da atuação da superóxido dismutase (SOD), em peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O peróxido de hidrogênio é convertido para a molécula de água com o auxílio da reação de Fenton aliado a dois elétrons. Pode também ser convertido em água a partir das enzimas catalase (CAT) e glutatona peroxidase (GPx) ((RIZVI; MAURYA, 2007).

A OH^\cdot é uma ERO que não possui defesa enzimática específica e possui a maior reatividade, conseqüentemente possui um maior potencial de dano oxidativo, além também de ser a maior responsável pelo início do processo de peroxidação lipídica, alterando muitas vezes a função biológica de diversas macromoléculas. Levando em consideração as características da OH^\cdot e a ausência de defesa especializada, é muito importante que haja um equilíbrio entre as enzimas antioxidantes, para que exista a manutenção das funções integrais das células. Quando o H_2O_2 está presente em concentrações fisiológicas, a GPx se encarrega de transformá-la em

água (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1985). Adicionalmente, a GPx é dependente do ciclo redox da glutatona, o que envolve a glutatona reduzida (GSH) e a oxidada (GSSG) (BARBOSA et al., 2010), e o fornecimento de cátions de hidrogênio e elétrons realizado pelo NADH, FADH, ubiquinona e coenzima Q (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1989).

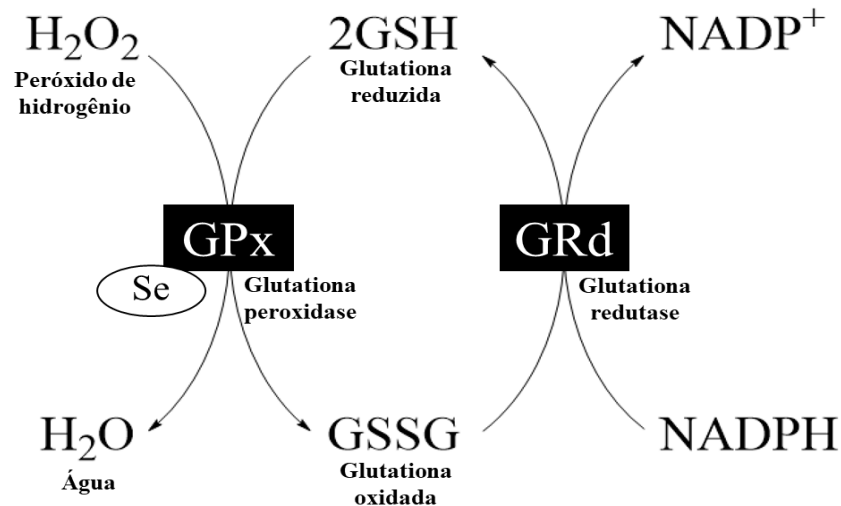


Figura 3. Ciclo redox da glutatona. Para que a GPx possa reduzir o H_2O_2 à água, esta necessita que a GSH seja convertida a GSSG, em sequência, a GRd promove a recuperação da GSH, possibilitando a manutenção do ciclo e a neutralização da ER (BARBOSA et al., 2010).

2.2.4. ANTIOXIDANTES ENDÓGENOS NÃO ENZIMÁTICOS

A glutatona ou gamma-glutamyl-cysteinyl-glycine (GSH) é sintetizada a partir do glutamato, cisteína e glicina, catalisados por enzimas citosólicas (NÉMETH; ORVOS; BODA, 2001). É considerada o principal tampão redox e age diretamente como co-fator de enzimas antioxidantes, além de ser utilizada na regeneração de moléculas com potencial antioxidante, como é o caso da vitamina C, A e E. Seu efeito mais importante está relacionado com a manutenção do estado redox da Glutationa Dissulfeto (GSSG)/Glutationa (GSH) (FERREIRA; ABREU, 2007). Estudos realizados mostram que para a manutenção da homeostase de GSH é necessária uma nutrição proteica adequada (KUMAR; MAURYA, 2014; RIZVI; MAURYA, 2008), justificada pelo seu importante papel no sistema de defesa antioxidante, além de atuar no metabolismo de nutrientes e na regulação celular. O déficit deste substrato está associado ao

aumento do estresse oxidativo, o que influencia no desenvolvimento de doenças associadas ao estresse oxidativo (WU et al., 2004a), o que faz da GSH um biomarcador para o diagnóstico das mesmas (LAPIDUS et al., 2014).

Outro exemplo de defesa antioxidante endógena não-enzimática é o ácido úrico, o qual atua tanto como antioxidante (meio extracelular) quanto como pró-oxidante (meio intracelular), e é um potente neutralizador de ERs, atuando em média em 60 % destas, inclusive no plasma, tornando-o um dos mais potentes antioxidantes presentes no sangue humano (NERY et al., 2015). Além destes exemplos, ainda existem ubiquinona, albumina, bilirrubina, melatonina, α -tocoferol, ácido lipóico, dentre outros que também estão presentes na classe dos antioxidantes endógenos não-enzimáticos (NEHA et al., 2019).

2.2.5. EXÓGENOS (SINTÉTICOS OU NATURAIS)

Entre os antioxidantes exógenos sintéticos existentes, os mais utilizados são o butil hidroxitolueno (BHT), butil hidroxianisol (BHA), terc-butil hidroquinona (TBHQ) e o propil galato (PG). A estrutura fenólica destes compostos promove a doação de um átomo de hidrogênio, o que interrompe os processos de oxidação. Devido à conhecida toxicidade dos antioxidantes sintéticos, buscam-se constantemente alternativas para sua substituição, especialmente por produtos de origem natural (KUMAR; MAURYA, 2014).

Frutas e vegetais possuem altos níveis de compostos antioxidantes que auxiliam no equilíbrio entre produção e neutralização de ERs, reduzindo seus efeitos prejudiciais no organismo (KUMAR; MAURYA, 2014). Os benefícios farmacológicos destes vegetais estão provavelmente relacionados com a presença de seus metabólitos secundários, em especial compostos fenólicos, flavonoides, carotenoides e taninos (EDEOGA; OKWU; MBAEBIE, 2005). Assim, dietas a base de plantas estão diretamente ligadas a redução das complicações provocadas pelo estresse oxidativo (MCDUGALL; STEWART, 2005; SHAHIDI, 2009).

Existem numerosos estudos que indicam uma relação positiva entre o consumo de vegetais ricos em compostos bioativos, como compostos fenólicos, e a prevenção de doenças relacionadas com o estresse oxidativo (VINSON, et al, 2001). Assim, nas últimas décadas houve um aumento progressivo do interesse em se investigar vegetais com estas características para uso tanto na alimentação quanto na medicina (SHAHIDI, 2009).

Os antioxidantes naturais podem atuar por meio da estabilização de ERs ou, através da transição de átomos de hidrogênio ou elétrons para as moléculas desestabilizadas quimicamente (RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1996). Adicionalmente a uma ação direta sobre as

ERs, outro meio capaz de reduzir os efeitos do estresse oxidativo no organismo é a capacidade dos metabólitos secundários, como os polifenóis, de estimularem a atividade das enzimas antioxidantes endógenas SOD, CAT e GPx (SHAHIDI, 2009). Os compostos fenólicos mais utilizados são o ácido gálico, elágico e o cafeico, pois possuem importância crítica na dieta por impedirem a peroxidação lipídica (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015). Os flavonoides mais utilizados, também pertencentes à classe dos compostos fenólicos são a miricetina, rutina, quercetina e naringenina (HARTMAN; SHANKEL, 1990).

Além da ação individual, a riqueza fitoquímica dos vegetais possibilita o sinergismo entre seus compostos, ampliando, ainda mais, as possibilidades de efeitos terapêuticos (SHAHIDI, 2009) relacionados ao sequestro de ERs e inibição de danos celulares e suas complicações (MOURE et al., 2001; TURK et al., 2008). Em suma, a riqueza fitoquímica dos vegetais e seus resultados positivos sobre o controle do estresse oxidativo justificam a busca pela identificação de novos vegetais com atividade antioxidante.

2.3. BIODIVERSIDADE BRASILEIRA

O Brasil é o país que ocupa praticamente a metade do continente sul americano com 8,5 milhões km² de área, além de 3,5 milhões km² de costa marinha. Também possui diversos biomas e ecossistemas, resultando em uma grande variedade ecológica e, formando uma das maiores biodiversidades do planeta (MMA, 2019). Parte importante desta biodiversidade encontra-se no Cerrado brasileiro, o qual cobre uma área de aproximadamente 2 milhões de km², o que equivale a 23% do território nacional (RATTER; RIBEIRO; BRIDGEWATER, 1997). A área do Cerrado se estende pelos estados de Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás, Distrito Federal, Minas Gerais, Paraná, São Paulo, Bahia, Tocantins, Rondônia, Bahia, Maranhão e Piauí. Nesta extensão, estão localizadas as maiores bacias hidrográficas da América do Sul, sendo elas a bacias do São Francisco, do Rio da Prata e Amazônica/Tocantins, e como resultado um grande potencial aquífero que beneficia a manutenção da biodiversidade.

O Cerrado apresenta grande variedade de espécies endêmicas, e é reconhecido como a savana mais rica do mundo, abrigando mais de 11 mil espécies de plantas já catalogadas, além de peixes, répteis e mamíferos (MMA, 2019). Dentre as várias plantas já relacionadas, estão as medicinais, que são importantes matérias-primas tanto para a alimentação, como para a produção de fitoterápicos e outros medicamentos. O incentivo à pesquisa baseada no potencial vegetal brasileiro, aliado às necessidades da população é uma importante estratégia para o

desenvolvimento de novas terapias, como indicado pela Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos do Ministério da Saúde (PNPMF, 2009).

Além disso, os estudos baseados no uso popular de plantas medicinais fornecem informações importantes para a descoberta de novas drogas, reduzindo tempo e investimentos. Os estudos científicos, além de avaliar cientificamente as indicações populares também devem se atentar para a segurança de uso das mesmas, o que já acontece para várias plantas, como *Mikania glomerata* (guaco), *Maytenus illicifolia* L. (espinheira santa), *Miracrodruon unrudeuva* (aroeira-do-sertão) e *Lippia sidoides* Cham. (alecrim-pimenta), dentre muitas outras plantas que já são utilizadas na terapêutica (PNPMF, 2009).

2.3.1. PLANTAS MEDICINAIS

A Organização Mundial da Saúde (ONU) estima que por volta de 65% a 80% da população mundial faz uso da medicina popular de alguma maneira ou depende diretamente das práticas populares para o tratamento de doenças e também para a manutenção da saúde (WHO, 2011). O uso das plantas medicinais é uma prática milenar (HAWKINS, 2008), especialmente relacionado à maior facilidade de obtenção destes vegetais, além do vasto conhecimento já estabelecido por diversas comunidades (OKEMO; OMWENGA; MBUGUA, 2012), as quais refletem forte influência da miscigenação cultural brasileira, principalmente envolvendo povos africanos, europeus (SHANLEY; LUZ, 2003; VOEKS, R, 2003) e indígenas (RODRIGUES et al, 2008). Contudo, esta prática terapêutica perde cada vez mais espaço pelo aumento da destruição da vegetação nativa que contribui com a gradativa substituição das espécies medicinais (SHANLEY; LUZ, 2003; VOEKS, R, 2003) por monoculturas (FELFILI et al., 2004; GIULIETTI et al., 2005).

A biodiversidade brasileira representa uma fonte rica de componentes químicos naturais que podem revelar substâncias ativas para diversos fins (DUARTE et al., 2005), que estão especialmente envolvidas no metabolismo primário e secundário dos vegetais. O metabolismo primário é responsável pelo suprimento das necessidades primordiais da planta, como divisão e crescimento celular, reprodução e respiração (FUMAGALI et al., 2008), envolvendo compostos como celulose, proteínas e lipídios (PACHECO; CAMARGO; SOUZA, 2011). Já o metabolismo secundário envolve uma maior complexidade química vegetal e, estas substâncias estão ligadas às atividades biológicas que as plantas possuem, sendo representadas por compostos como taninos, cumarinas, terpenóides, ácidos graxos, glicosídeos cardiotônicos, antocianinas, flavonoides, polifenóis e saponinas (TAFOLLA-ARELLANO et al., 2013).

Estes compostos se destacam por suas atividades terapêuticas, como por exemplo, a atividade anti-hipercolesterolêmica dos esteróis (ARAÚJO, J, 2008); o auxílio no fluxo sanguíneo e tratamento de edema dos glicosídeos cardiotônicos; as propriedades surfactantes, detergentes, antitumoral e antioxidante das saponinas (SIMÕES, C, 2007); e atividades anti-inflamatória, antitumoral e antioxidante dos polifenóis e flavonóides (ARAÚJO, J, 2008). As drogas derivadas de plantas fornecem novas opções para o tratamento de várias doenças, especialmente pela complexidade química vegetal, baixo custo de produção e efeitos colaterais reduzidos quando comparados com o tratamento alopático (KITAZATO; WANG; KOBAYASHI, 2007). Contudo, as propriedades químicas da maioria destas plantas ainda são bastante desconhecidas e representam possivelmente alternativas para o tratamento de muitas doenças (LIMA et al., 2011). Dentre as plantas amplamente utilizadas no estado do Mato Grosso do Sul, para diversos fins, inclusive medicinal, alimentar e industrial, estão as palmeiras da família *Arecaceae*.

2.3.2. *Arecaceae*

As palmeiras representam o maior símbolo das florestas tropicais, isto se deve por existirem em sua maioria apenas nos trópicos. No Brasil, existem 119 espécies pertencentes a 39 gêneros, encontradas em muitos ambientes por possuírem alta capacidade adaptativa. Seus frutos são amplamente utilizados, sendo a polpa para o consumo humano e, o endocarpo e o epicarpo como fonte de biomassa para diversas aplicações (DONATTI, C, 2004). Além disso, as folhas são utilizadas para nutrição animal (CICONINI et al., 2013).

O grupo das palmeiras pertencentes à família *Arecaceae* é um dos maiores, ainda a ser investigado, embora, já tenha muitas espécies com importante valor econômico reconhecido (DRANSFIELD, J; MANOKARAN, N, 1993; JONES, L, 1988). A família *Arecaceae* é dividida em 5 subfamílias, sendo elas: *Arecoideae*, *Calamoideae*, *Ceroxyloideae*, *Nypodeae* e *Coryphoideae*. Possui por volta de 440 gêneros e 3000 espécies de palmeiras distribuídas por todo o mundo. Na América do Sul, ocorre desde a costa do Brasil até a Argentina e Paraguai, onde encontram-se 36 gêneros e 195 espécies (GIULIETTI et al., 2005).

Alguns estudos mostram importantes atividades biológicas de plantas da mesma família, como antioxidantes para *Copernicia prunifera* (Mill.) H.E. Moore, conhecido como palmeira de carnaúba (RUFINO et al., 2010) e, anti-inflamatória para *Syagrus oleracea* (Mart.) Becc., conhecida como catolé (SARAIVA et al., 2015). De forma mais detalhada, o estudo realizado com o extrato metanólico de *Cocos nucifera* (L), apresentou potencial antioxidante, citoprotetor

e antidiabético, além das análises fitoquímicas demonstrarem a presença de polifenóis, ácidos fenólicos, resinas, flavonoides, proteínas e aminoácidos (RENJITH; CHIKKU; RAJAMOHAN, 2013). Além deste, foi analisado o extrato aquoso das frutas de *Arecastrum romanzoffianum* e constatado o potencial anti-inflamatório do composto extraído galactomanoglucana, que atua na fase inicial da inflamação e inibe também a formação de edema semelhantemente aos compostos já padronizados, indometacina e dexametasona (DA SILVA; PARENTE, 2010). Por fim, diferentes extratos produzidos a partir das folhas de *Butia capitata* Becc apresentaram diversas atividades antioxidantes, sendo o extrato metanólico o de maior atividade. Extratos polares e apolares das folhas apresentaram atividade anti-inflamatória, sendo os extratos apolares os mais efetivos, e cujo potencial foi atribuído a presença de flavonoides, α -tocoferóis e esteróis (AMMAR et al., 2014).

Dentre as palmeiras da família Areacacea, neste estudo destacamos a espécie *A. aculeata* (Jacq.) Lodd. Ex Mart., planta nativa do cerrado brasileiro. Suas principais características, fitogeográfica, fitoquímica, botânica e aplicações, são apresentadas a seguir.

2.3.4. *Acrocomia aculeata*

É uma palmeira distribuída na América do Sul, em diversos países como México, sul do Paraguai e norte da Argentina (COIMBRA; JORGE, 2012; LORENZI, 2006). No Brasil sua distribuição engloba os estados do Mato Grosso do Sul, Pará, São Paulo e Rio de Janeiro, dentre outros, e especialmente ocorrendo no Cerrado e Pantanal (LORENZI, 2006).

A *A. aculeata*, conforme apresentada na figura 2, é uma palmeira que possui altura entre 10 e 15 m, conhecida popularmente como macaúba ou bocaiuva (KOPPER, A et al., 2009).



Figura 4. *A. aculeata* (Jacq.) Lodd ex Mart.

Seus frutos possuem coloração amarelo-alaranjada e sua polpa é amplamente utilizada na culinária, podendo ser consumida fresca ou empregada na produção de doces como sorvetes, biscoitos e tortas (BORA; MOREIRA, 2003). No Pantanal, o fruto também é preparado como farinha e utilizado na culinária (POETSCH; HAUPENTHAL 2019).

Os óleos extraídos da polpa e das amêndoas da *A. aculeata*, possuem grande importância industrial e econômica. O óleo da polpa possui coloração intensamente alaranjada, com alta presença de ácido oleico (MARIANO et al., 2011), β - caroteno (SANJINEZ-ARGANDOÑA; CHUBA, 2011) e α -tocopherol (COIMBRA; JORGE, 2012). Já a amêndoa, possui grande quantidade de óleo de coloração clara e de alta qualidade, rico em ácido láurico (BELTRÃO; OLIVEIRA, 2007) e oleico (AMARAL, F et al., 2011; HIANE et al., 2005). A capacidade de produção do óleo da palmeira é dez vezes maior que o óleo da semente de soja por hectare (ROSCOE; RICHETTI; MARANHO, 2007). É importante fonte de produção de bioquerosene

(MANFIO et al., 2011) e biodiesel, com potencial de produção que atinge 4000 toneladas de óleo da polpa/ha (BASIRON, 2005). Paralelamente, o conteúdo de ácidos graxos presentes na polpa aumenta a demanda da indústria alimentícia, além de poder ser incorporado aos sistemas agropastoris associados à sustentabilidade (RAMOS et al., 2008). Ambos, polpa e semente, possuem aplicação tanto na indústria de cosméticos, como na farmacêutica e também na indústria de alimentos.

Assim como o óleo, as folhas, também são empregadas na nutrição animal por não conter nenhuma contraindicação nutricional ou composto tóxico descrito (AMARAL, F et al., 2011; HIANE et al., 2005). O uso desta palmeira tem se disseminado pelos seus importantes e diversos efeitos terapêuticos, no que diz respeito, por exemplo, ao tratamento de doenças respiratórias, além das propriedades laxativas, analgésicas (LORENZI, 2006) e anti-inflamatória (MANFIO et al., 2011), além de ter atividade relacionada com a redução da glicemia e níveis séricos de colesterol (SILVA, 2012). Também é relatado na literatura propriedades da planta que auxiliam em problemas ósseos, osteoartrite, artrite, dores musculares, como calmante (SARAIVA et al., 2015) e no tratamento de hipovitaminose A (RAMOS et al., 2007).

Para esta revisão, não foram encontrados trabalhos que relatam o uso popular ou que investiguem as propriedades terapêuticas das folhas de *A. aculeata*.

2.4. TOXICIDADE DAS PLANTAS MEDICINAIS

Desde tempos muito antigos as plantas são utilizadas no tratamento de diversas doenças, e esta prática têm aumentado e se tornado cada vez mais popular ao redor do mundo, principalmente no que diz respeito aos países em desenvolvimento, onde as plantas estão altamente disponíveis e ao mesmo tempo possuem baixo custo (KHARCHOUFA et al., 2018). Adicionalmente à este contexto, o uso tradicional das plantas medicinais está altamente relacionado com a percepção da população de que estes produtos têm baixo potencial de risco à saúde em relação às drogas sintéticas, porém ensaios de toxicidade devem ser realizados, pois os vegetais produzem substâncias altamente tóxicas (LUBLIN; LINK, 2013), e efeitos adversos, como teratogenicidade, carcinogenicidade e até a morte (KRISTANC; KREFT, 2016). Assim, diversos modelos experimentais tem sido desenvolvidos em pesquisas para elucidar esta condição, como é o caso de células (GOMES et al., 2013), ratos (VILLAS BOAS et al., 2018) e também nematoides (YANG et al., 2019b).

2.4.1. *Caenorhabditis elegans* COMO MODELO EXPERIMENTAL PARA ENSAIOS DE TOXICIDADE E RESISTÊNCIA AO ESTRESSE

O nematoide de vida livre *C. elegans* é um modelo experimental que tem sido amplamente utilizado tanto para análises toxicológicas, como para avaliação de diversos potenciais farmacológicos, incluindo a possibilidade da determinação de alvos moleculares (LUBLIN; LINK, 2013), comportamentais, de reprodução, resposta ao estresse (CHEN et al., 2019) além de estudos comportamentais (BRENNER, 1973) e também genéticos. A transparência do corpo do animal possibilita a observação de vários processos celulares e subcelulares por meio de proteínas fluorescentes que demarcam suas células e proteínas celulares ativas envolvidas em processos fisiológicos (KERR, 2006). As células destes nematoides podem inclusive ser avaliadas *in vitro*, como é o caso das células da glia, células musculares e neuronais (STOUT; PARPURA, 2012).

Seu genoma é completamente sequenciado, o que possibilita identificações moleculares de diversas chaves genéticas do desenvolvimento de processos biológicos. Como ponto principal, 38% dos genes codificadores de proteínas dos *C. elegans* são homólogos ao genoma humano (SHAYE; GREENWALD, 2011), 60% a 80% dos genes humanos possuem um homólogo no genoma do nematoide (KALETTA; HENGARTNER, 2006) e 40% dos genes já conhecidos por estarem associados às doenças do homem, também possuem homólogos claros no genoma do *C. elegans* (CULETTO; SATTELLE, 2000).

Os *C. elegans* possuem ciclo de vida curto (3 dias), o que ocorre com animais hermafroditas e alguns indivíduos machos (menos de 2%), isso garante a sua invariabilidade celular e permite o desenvolvimento de estudos genéticos (SULSTON et al., 1983). Possuem tamanho médio de 1,5 mm (quando adultos), rápida reprodução (progênie de 300 a 1000 ovos por animal), um sistema anatômico simplificado (menos de 1000 células), seu corpo é transparente em todas as fases da vida, possuem a possibilidade de crioconservação, existem cepas mutantes que mimetizam diversas condições e alterações ambientais, além de terem um cultivo relativamente fácil e barato, o que viabiliza o crescimento de milhares de animais em uma placa de petri suplementada com uma cobertura de *Escherichia coli* OP50 como fonte de comida (CORSI, 2006). A estirpe comumente utilizada é a cepa de Bristol N2, podendo ser obtidos no *Caenorhabditis* Genetic Center – CGC (“*Caenorhabditis* Genetics Center (CGC) - College of Biological Sciences”, [s.d.]) ou em outros laboratórios que trabalhem com os nematoides (CORSI, 2006).

Este modelo tem se tornado promissor no desenvolvimento de inúmeros ensaios, e no que diz respeito à área direcionada por esta revisão, os *C. elegans* são uma importante alternativa experimental por possuírem 16 genes a nível bioquímico envolvidos na resposta ao estresse oxidativo, além de possibilitarem a avaliação de proteínas antioxidantes. Neste contexto, a indução ao estresse oxidativo por xenobióticos (CHEN et al., 2019), como é o caso do paraquat (WU et al., 2017) e do juglone (ASTHANA et al., 2015) por exemplo, permite também a avaliação da resposta do animal tanto a nível de resposta ao estresse, quanto a toxicidade (WU et al., 2016). Estes fatos confirmam a importância deste modelo de estudo para a manutenção da saúde e para combater doenças relacionadas com o estresse oxidativo além de garantir a segurança do tratamento realizado com plantas medicinais.

3. OBJETIVOS

3.1. GERAL

Avaliar a composição química, o potencial antioxidante e a toxicidade das folhas de *A. aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart.

3.2. ESPECÍFICOS

Quanto aos extratos aquoso, etanólico e metanólico das folhas de *A. aculeata* buscar-se-á:

- Identificar os compostos químicos por métodos espectrofotométricos e cromatográficos;
- Investigar a atividade antioxidante através dos métodos de captura de radical livre DPPH e ABTS;
- Avaliar a citotoxicidade em eritrócitos humanos;
- Determinar a atividade antioxidante e de proteção à peroxidação lipídica em eritrócitos humanos induzidos com AAPH;

E em relação ao extrato aquoso, buscar-se-á:

- Avaliar o efeito protetor do extrato aquoso em outras fontes de macromoléculas, nomeadamente proteínas e DNA, induzidos com AAPH e H₂O₂ respectivamente;
- Verificar a toxicidade em células Cos-7 e em *C. elegans*;
- Determinar a melhora nos danos provocados pelas ERs geradas em células Cos-7 através de ensaios de viabilidade e sondas fluorescentes específicas, induzidos por H₂O₂;
- Identificar os mecanismos protetores produzidos pelo extrato através de Western Blot;
- Averiguar o efeito do extrato aquoso em *C. elegans* induzidos ao estresse oxidativo.

4. REFERÊNCIAS

- AGATI, G. et al. Flavonoids as antioxidants in plants: location and functional significance. **Plant Science: An International Journal of Experimental Plant Biology**, v. 196, p. 67–76, nov. 2012.
- ALAGEEL, A. et al. Evidence supporting a mechanistic role of sirtuins in mood and metabolic disorders. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 86, p. 95–101, 30 ago. 2018.
- AMARAL, F et al. **Revista ENERGIA na agricultura**. Disponível em: <<http://revistas.fca.unesp.br/index.php/energia/article/view/142>>. Acesso em: 10 set. 2019.
- AMMAR, N. M. et al. Phytochemical and biological studies of *Butia capitata* Becc. leaves cultivated in Egypt. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 4, n. 6, p. 456–462, jun. 2014.
- ARAÚJO, J. **Química de Alimentos - Teoria e Prática - 7ª Edição**. Disponível em: <<https://www.agrolivros.com.br/nutricao-e-tecnologia-de-alimentos/livro-quimica-de-alimentos-teoria-e-pratica--p>>. Acesso em: 10 set. 2019.
- ASTHANA, J. et al. Specioside ameliorates oxidative stress and promotes longevity in *Caenorhabditis elegans*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 169, p. 25–34, 1 mar. 2015.
- BAIRD, L.; DINKOVA-KOSTOVA, A. T. The cytoprotective role of the Keap1-Nrf2 pathway. **Archives of Toxicology**, v. 85, n. 4, p. 241–272, abr. 2011.
- BARBOSA, K. B. F. et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629–643, ago. 2010.
- BARONE, E. et al. The Janus face of the heme oxygenase/biliverdin reductase system in Alzheimer disease: It's time for reconciliation. **Neurobiology of Disease**, v. 62, p. 144–159, 1 fev. 2014.
- BASIRON, Y. In: **Bailey's Industrial Oil and Fat Products, Sixth Edition**. Disponível em: <<https://www.feedipedia.org/node/15399>>. Acesso em: 10 set. 2019.
- BATTELLI, M. G. et al. Metabolic syndrome and cancer risk: The role of xanthine oxidoreductase. **Redox Biology**, v. 21, p. 101070, 1 fev. 2019.
- BELTRÃO, N.; OLIVEIRA, M. **Oleaginosas potenciais do Nordeste para a produção de biodiesel. - Portal Embrapa**. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/277417/oleaginosas-potenciais-do-nordeste-para-a-producao-de-biodiesel>>. Acesso em: 10 set. 2019.
- BIANCHI, M. DE L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, v. 12, n. 2, p. 123–130, ago. 1999.
- BORA, P. S.; MOREIRA, R. V. R. Catolé palm (*Syagrus oleracea* Mart) fruits: fatty and amino acids composition. **Grasas y Aceites**, v. 54, n. 2, p. 145–150, 30 jun. 2003.
- BRENNER, S. The genetics of behaviour. **British Medical Bulletin**, v. 29, n. 3, p. 269–271, set. 1973.
- Caenorhabditis Genetics Center (CGC) - College of Biological Sciences**. Disponível em: <<https://cgc.umn.edu/>>. Acesso em: 29 set. 2019.

CAMERON, A. et al. THE WORLD MEDICINES SITUATION 201. n. 3rd Edition, p. 32, 1 fev. 2011.

CHEN, H. et al. A review of toxicity induced by persistent organic pollutants (POPs) and endocrine-disrupting chemicals (EDCs) in the nematode *Caenorhabditis elegans*. **Journal of Environmental Management**, v. 237, p. 519–525, 1 maio 2019.

CHISTÉ, R. C. et al. Carotenoids inhibit lipid peroxidation and hemoglobin oxidation, but not the depletion of glutathione induced by ROS in human erythrocytes. **Life Sciences**, v. 99, n. 1–2, p. 52–60, 18 mar. 2014.

CICONINI, G. et al. Biometry and oil contents of *Acrocomia aculeata* fruits from the Cerrados and Pantanal biomes in Mato Grosso do Sul, Brazil. **Industrial Crops and Products**, v. 45, p. 208–214, 1 fev. 2013.

COIMBRA, M. C.; JORGE, N. Fatty acids and bioactive compounds of the pulps and kernels of Brazilian palm species, guariroba (*Syagrus oleracea*), jerivá (*Syagrus romanzoffiana*) and macaúba (*Acrocomia aculeata*). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 92, n. 3, p. 679–684, 2012.

CORSI, A. K. A Biochemist's Guide to *C. elegans*. **Analytical biochemistry**, v. 359, n. 1, p. 1–17, 1 dez. 2006.

CULETTO, E.; SATTELLE, D. B. A role for *Caenorhabditis elegans* in understanding the function and interactions of human disease genes. **Human Molecular Genetics**, v. 9, n. 6, p. 869–877, 12 abr. 2000.

DA SILVA, B. P.; PARENTE, J. P. Chemical properties and antiinflammatory activity of a galactomannoglucan from *Arecastrum romanzoffianum*. **Phytochemistry Letters**, v. 3, n. 3, p. 109–112, 20 set. 2010.

DAI, J.; MUMPER, R. J. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 15, n. 10, p. 7313–7352, 21 out. 2010.

DE TOLEDO, C. E. M. et al. Antimicrobial and cytotoxic activities of medicinal plants of the Brazilian cerrado, using Brazilian cachaça as extractor liquid. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, n. 2, p. 420–425, 27 jan. 2011.

DEMIDCHIK, V. Mechanisms of oxidative stress in plants: From classical chemistry to cell biology. **Environmental and Experimental Botany**, v. 109, p. 212–228, 1 jan. 2015.

DINKOVA-KOSTOVA, A. T.; HOLTZCLAW, W. D.; KENSLER, T. W. The role of Keap1 in cellular protective responses. **Chemical Research in Toxicology**, v. 18, n. 12, p. 1779–1791, dez. 2005.

DONATTI, C. **Consequências da defaunação na dispersão e predação de sementes e no recrutamento...** Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/91/91131/tde-20062005-170253/pt-br.php>>. Acesso em: 10 set. 2019.

DRANSFIELD, J; MANOKARAN, N. **Plant resources of South-East Asia. No. 6.** Disponível em: <<http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=XF2015005212>>. Acesso em: 10 set. 2019.

DUARTE, M. C. T. et al. Anti-*Candida* activity of Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, n. 2, p. 305–311, 28 fev. 2005.

EDEOGA, H. O.; OKWU, D. E.; MBAEBIE, B. O. Phytochemical constituents of some Nigerian medicinal plants. **African Journal of Biotechnology**, v. 4, n. 7, p. 685-688-688, 1 jan. 2005.

FAVARETTO, V. F. et al. Differential responses of antioxidant enzymes in pioneer and late-successional tropical tree species grown under sun and shade conditions. **Environmental and Experimental Botany**, v. 70, n. 1, p. 20-28, 1 jan. 2011.

FELFILI, J. M. et al. Diversity, Floristic and Structural Patterns of Cerrado Vegetation in Central Brazil. **Plant Ecology**, v. 175, n. 1, p. 37-46, 2004.

FERREIRA, I. C.; ABREU, R. M. Stress Oxidativo, Antioxidantes e Fitoquímicos. p. 8, 2007.

FINKEL, T.; HOLBROOK, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, v. 408, n. 6809, p. 239-247, 9 nov. 2000a.

FINKEL, T.; HOLBROOK, N. J. **Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing**. Special Features. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/35041687>>. Acesso em: 1 out. 2018b.

FUMAGALI, E. et al. Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: o exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 4, p. 627-641, dez. 2008.

GALLINARI, P. et al. HDACs, histone deacetylation and gene transcription: from molecular biology to cancer therapeutics. **Cell Research**, v. 17, n. 3, p. 195-211, mar. 2007.

GBD 2013 DALYS AND HALE COLLABORATORS et al. Global, regional, and national disability-adjusted life years (DALYs) for 306 diseases and injuries and healthy life expectancy (HALE) for 188 countries, 1990-2013: quantifying the epidemiological transition. **Lancet (London, England)**, v. 386, n. 10009, p. 2145-2191, 28 nov. 2015a.

GBD 2013 DALYS AND HALE COLLABORATORS et al. Global, regional, and national disability-adjusted life years (DALYs) for 306 diseases and injuries and healthy life expectancy (HALE) for 188 countries, 1990-2013: quantifying the epidemiological transition. **Lancet (London, England)**, v. 386, n. 10009, p. 2145-2191, 28 nov. 2015b.

GIULIETTI, A. M. et al. Biodiversity and Conservation of Plants in Brazil. **Conservation Biology**, v. 19, n. 3, p. 632-639, 2005.

GÓES, P. A. DE A. **Dosagem dos níveis de anti-oxidantes enzimáticos e resistência celular ao estresse oxidativo, do sêmen de perdizes (*Rhynchotus rufescens*) criadas em cativeiro e suplementadas com selênio**. text—[s.l.] Universidade de São Paulo, 28 abr. 2008.

GOMES, M. R. F. et al. Citotoxic activity evaluation of essential oils and nanoemulsions of *Drimys angustifolia* and *D. brasiliensis* on human glioblastoma (U-138 MG) and human bladder carcinoma (T24) cell lines in vitro. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, n. 2, p. 259-267, 1 mar. 2013.

GREGORETTI, I. V.; LEE, Y.-M.; GOODSON, H. V. Molecular evolution of the histone deacetylase family: functional implications of phylogenetic analysis. **Journal of Molecular Biology**, v. 338, n. 1, p. 17-31, 16 abr. 2004.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. The importance of free radicals and catalytic metal ions in human diseases. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 8, n. 2, p. 89-193, 1985.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. [s.l.] Clarendon Press, 1989.

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

HARTMAN, P. E.; SHANKEL, D. M. Antimutagens and anticarcinogens: a survey of putative interceptor molecules. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 15, n. 3, p. 145–182, 1990.

HAWKINS, B. **Plants for Life: Medicinal Plant Conservation and Botanic Gardens**. Richmond, Surrey: Botanic Gardens Conservation International, 2008.

HIANE, P. A. et al. Bocaiúva, *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd., pulp and kernel oils: characterization and fatty acid composition. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 8, p. 256–259, 1 jan. 2005.

ITOH, K. et al. An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 236, n. 2, p. 313–322, 18 jul. 1997.

JAGANJAC, M. Possible involvement of granulocyte oxidative burst in Nrf2 signaling in cancer. **The Indian Journal of Medical Research**, v. 131, p. 609–616, maio 2010.

JIANG, T. et al. The protective role of Nrf2 in streptozotocin-induced diabetic nephropathy. **Diabetes**, v. 59, n. 4, p. 850–860, abr. 2010.

JONES, L. **Palms in Australia**. Disponível em: <<https://www.abebooks.com/book-search/title/palms-in-australia/author/jones-david/>>. Acesso em: 10 set. 2019.

JUNG, K.-A.; KWAK, M.-K. The Nrf2 system as a potential target for the development of indirect antioxidants. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 15, n. 10, p. 7266–7291, 20 out. 2010.

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.

KERR, R. Imaging the activity of neurons and muscles. **WormBook**, 2006.

KHARCHOUFA, L. et al. Profile on medicinal plants used by the people of North Eastern Morocco: Toxicity concerns. **Toxicon**, v. 154, p. 90–113, 1 nov. 2018.

KIM, H. J.; VAZIRI, N. D. Contribution of impaired Nrf2-Keap1 pathway to oxidative stress and inflammation in chronic renal failure. **American Journal of Physiology. Renal Physiology**, v. 298, n. 3, p. F662–671, mar. 2010.

KIM, J.; CHA, Y.-N.; SURH, Y.-J. A protective role of nuclear factor-erythroid 2-related factor-2 (Nrf2) in inflammatory disorders. **Mutation Research**, v. 690, n. 1–2, p. 12–23, 7 ago. 2010.

KITAZATO, K.; WANG, Y.; KOBAYASHI, N. Viral infectious disease and natural products with antiviral activity. **Drug Discoveries & Therapeutics**, v. 1, n. 1, p. 14–22, ago. 2007.

KOBAYASHI, A. et al. Oxidative and electrophilic stresses activate Nrf2 through inhibition of ubiquitination activity of Keap1. **Molecular and Cellular Biology**, v. 26, n. 1, p. 221–229, jan. 2006.

KOPPER, A et al. **UTILIZAÇÃO TECNOLÓGICA DA FARINHA DE BOCAIUVA NA ELABORAÇÃO DE BISCOITOS TIPO COOKIE**. Disponível em: <<https://docplayer.com.br/46332229-Utilizacao-tecnologica-da-farinha-de-bocaiuva-na-elaboracao-de-biscoitos-tipo-cookie.html>>. Acesso em: 10 set. 2019.

- KRISTANC, L.; KREFT, S. European medicinal and edible plants associated with subacute and chronic toxicity part I: Plants with carcinogenic, teratogenic and endocrine-disrupting effects. **Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 92, p. 150–164, jun. 2016.
- KUMAR, P.; MAURYA, P. K. Epigallocatechin-3-Gallate Protects Erythrocyte Ca(2+)-ATPase and Na(+)/K(+)-ATPase Against Oxidative Induced Damage During Aging in Humans. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 4, n. Suppl 1, p. 443–447, out. 2014.
- LAM, Y. Y.; PETERSON, C. M.; RAVUSSIN, E. Resveratrol vs. calorie restriction: data from rodents to humans. **Experimental Gerontology**, v. 48, n. 10, p. 1018–1024, out. 2013.
- LAPIDUS, K. A. B. et al. In vivo (1)H MRS study of potential associations between glutathione, oxidative stress and anhedonia in major depressive disorder. **Neuroscience Letters**, v. 569, p. 74–79, 21 maio 2014.
- LEE, K. W.; LEE, H. J. Biphasic effects of dietary antioxidants on oxidative stress-mediated carcinogenesis. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 127, n. 5, p. 424–431, maio 2006.
- LIMA, T. B. et al. **In Vivo Effects of Cagaita (Eugenia dysenterica, DC.) Leaf Extracts on Diarrhea Treatment**. Research article. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/ecam/2011/309390/>>. Acesso em: 10 set. 2019.
- LORENZI, G. M. A. C. *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd.ex Mart. - Areaceae : bases para o extrativismo sustentável /. **oai:ufpr.br:222404**, 2006.
- LUBLIN, A.; LINK, C. Alzheimer's Disease Drug Discovery: In-vivo screening using *C. elegans* as a model for β -amyloid peptide-induced toxicity. **Drug Discovery Today. Technologies**, v. 10, n. 1, p. e115–e119, 2013.
- LUSHCHAK, V. I. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. **Chemico-Biological Interactions**, v. 224, p. 164–175, 5 dez. 2014.
- MA, Q. Role of nrf2 in oxidative stress and toxicity. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 53, p. 401–426, 2013.
- MAES, M. et al. A review on the oxidative and nitrosative stress (O&NS) pathways in major depression and their possible contribution to the (neuro)degenerative processes in that illness. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 35, n. 3, p. 676–692, 29 abr. 2011.
- MANFIO, C. E. et al. Repeatability in biometric characteristics of macaw palm fruit. **Ciência Rural**, v. 41, n. 1, p. 70–76, 2011.
- MARIANO, R et al. **Partition of free fatty acids in deacidification of macaúba (Acrocomia aculeata) pulp oil by liquid-liquid extraction using ethanol/water solution as solvent. - Portal Embrapa**. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/878182/partition-of-free-fatty-acids-in-deacidification-of-macauba-acrocomia-aculeata-pulp-oil-by-liquid-liquid-extraction-using-ethanolwater-solution-as-solvent>>. Acesso em: 10 set. 2019.
- MASLOV, L. N. et al. Is oxidative stress of adipocytes a cause or a consequence of the metabolic syndrome? **Journal of Clinical & Translational Endocrinology**, v. 15, p. 1–5, 1 mar. 2019.
- MAURYA, P. K. et al. The role of oxidative and nitrosative stress in accelerated aging and major depressive disorder. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 65, p. 134–144, 4 fev. 2016.

MCDOUGALL, G. J.; STEWART, D. The inhibitory effects of berry polyphenols on digestive enzymes. **BioFactors (Oxford, England)**, v. 23, n. 4, p. 189–195, 2005.

MMA. **Ministério do Meio Ambiente - O Bioma Cerrado**. Disponível em: <<https://www.mma.gov.br/biomas/cerrado>>. Acesso em: 10 set. 2019.

MOURE, A. et al. Natural antioxidants from residual sources. **Food Chemistry**, v. 72, n. 2, p. 145–171, 1 fev. 2001.

NEHA, K. et al. Medicinal prospects of antioxidants: A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 178, p. 687–704, 15 set. 2019.

NÉMETH, I.; ORVOS, H.; BODA, D. Blood glutathione redox status in gestational hypertension. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 30, n. 7, p. 715–721, 1 abr. 2001.

NERY, R. A. et al. URIC ACID AND TISSUE REPAIR. **ABCD. Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva (São Paulo)**, v. 28, n. 4, p. 290–292, dez. 2015.

NIJHAWAN, P.; ARORA, S.; BEHL, T. Intricate role of oxidative stress in the progression of obesity. **Obesity Medicine**, v. 15, p. 100125, 1 set. 2019.

OKEMO, P. O.; OMWENGA, E. O.; MBUGUA, P. K. In vitro antimicrobial and preliminary phytochemical screening of some Samburu Anti-diarrhoeal medicinal plants - Kenya. 2012.

PACHECO, A. C.; CAMARGO, P. R.; SOUZA, C. E. G. M. Water deficit and ABA application on leaf gas exchange and flavonoid content in marigold (*Calendula officinalis* L.). **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 33, n. 2, p. 275–281, jun. 2011.

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

PNPMF. **Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. [s.l.] Ministério da Saúde (MS), 2009.

POETSCH, J; HAUPENTHAL, D. **Acrocomia aculeata – a sustainable oil crop**. Disponível em: <<https://www.rural21.com/english/news/detail/article/acrocomia-aculeata-a-sustainable-oil-crop-0000420/>>. Acesso em: 10 set. 2019.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidants used in oils, fats and fatty foods. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 755–760, jul. 2006.

RAMEL, F.; MIALOUNDAMA, A. S.; HAVAUX, M. Nonenzymic carotenoid oxidation and photooxidative stress signalling in plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 64, n. 3, p. 799–805, jan. 2013.

RAMOS, M. I. L. et al. Bocaiuva (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd) improved Vitamin A status in rats. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 8, p. 3186–3190, 18 abr. 2007.

RAMOS, M. I. L. et al. Nutritional quality of the pulp of bocaiuva *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. **Food Science and Technology**, v. 28, p. 90–94, dez. 2008.

RATTER, J. A.; RIBEIRO, J. F.; BRIDGEWATER, S. The Brazilian Cerrado Vegetation and Threats to its Biodiversity. **Annals of Botany**, v. 80, n. 3, p. 223–230, 1 set. 1997.

REED, T. T. Lipid peroxidation and neurodegenerative disease. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 51, n. 7, p. 1302–1319, 1 out. 2011.

RENJITH, R. S.; CHIKKU, A. M.; RAJAMOCHAN, T. Cytoprotective, antihyperglycemic and phytochemical properties of *Cocos nucifera* (L.) inflorescence. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 6, n. 10, p. 804–810, out. 2013.

RIZVI, S. I.; MAURYA, P. K. Markers of oxidative stress in erythrocytes during aging in humans. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1100, p. 373–382, abr. 2007.

ROSCOE, R.; RICHETTI, A.; MARANHO, E. Análise de viabilidade técnica de oleaginosas para produção de biodiesel em Mato Grosso do Sul. **Revista de Política Agrícola**, v. 16, n. 1, p. 48–59–59, 2007.

RUFINO, M. DO S. M. et al. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, v. 121, n. 4, p. 996–1002, 15 ago. 2010.

SANJINEZ-ARGANDOÑA, E. J.; CHUBA, C. A. M. Biometrical, physical and chemical characterization of bocaiuva (*Acrocomia aculeata* (jacq.) Lodd. ex Mart) Palm fruits. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 3, p. 1023–1028, set. 2011.

SARAIVA, M. E. et al. Plant species as a therapeutic resource in areas of the savanna in the state of Pernambuco, Northeast Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 171, p. 141–153, 2 ago. 2015.

SARKADI, B. et al. Human multidrug resistance ABCB and ABCG transporters: participation in a chemoimmunity defense system. **Physiological Reviews**, v. 86, n. 4, p. 1179–1236, out. 2006.

SHAHIDI, F. Nutraceuticals and functional foods: Whole versus processed foods. **Trends in Food Science & Technology**, Natural and Safe Foods. v. 20, n. 9, p. 376–387, 1 set. 2009.

SHANLEY, P.; LUZ, L. **The impacts of forest degradation on medicinal plant use and implications for health care in Eastern Amazonia**. Disponível em: <<https://www.cifor.org/library/1216/>>. Acesso em: 10 set. 2019.

SHAYE, D. D.; GREENWALD, I. OrthoList: a compendium of *C. elegans* genes with human orthologs. **PloS One**, v. 6, n. 5, p. e20085, 2011.

SIES, H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. **Redox Biology**, v. 4, p. 180–183, 2 jan. 2015.

SIES, H. On the history of oxidative stress: Concept and some aspects of current development. **Current Opinion in Toxicology**, Oxidative Toxicology: Role of Reactive Oxygen Species (ROS) in Health and Disease: Mechanisms, Target Organ Toxicities, and Biomarkers. v. 7, p. 122–126, 1 fev. 2018.

SILVA, P. **Caracterização Química e avaliação do Potencialantidiabético e Citotóxico de Oleo Extraído de *Acrocomia aculeata* (macaúba)**. [s.l.] Master's thesis. Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, 2012.

SIMÕES, C. **FARMACOGNOSIA: DA PLANTA AO MEDICAMENTO - 6ªED.** [s.l: s.n.].

STOUT, R. F.; PARPURA, V. Cell culturing of *Caenorhabditis elegans* glial cells for the assessment of cytosolic Ca²⁺ dynamics. **Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)**, v. 814, p. 153–174, 2012.

SULSTON, J. E. et al. The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. **Developmental Biology**, v. 100, n. 1, p. 64–119, nov. 1983.

TAFOLLA-ARELLANO, J. C. et al. Composición, fisiología y biosíntesis de la cutícula en plantas. **Revista fitotecnia mexicana**, v. 36, n. 1, p. 3–12, mar. 2013.

THÉRON, P et al. **Biomarkers of oxidative stress: an analytical approach : Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care**. Disponível em: <https://journals.lww.com/clinicalnutrition/Abstract/2000/09000/Biomarkers_of_oxidative_stress__an_analytical.9.aspx>. Acesso em: 10 set. 2019.

TIWARI, B. K. et al. **Markers of Oxidative Stress during Diabetes Mellitus**. Research article. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/jbm/2013/378790/>>. Acesso em: 9 set. 2019.

TUKAN, S. K.; TAKRURI, H. R.; AL-EISAWI, D. M. The use of wild edible plants in the Jordanian diet. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 49, n. 3, p. 225–235, maio 1998.

TURK, R. et al. Influence of oxidative stress and metabolic adaptation on PON1 activity and MDA level in transition dairy cows. **Animal Reproduction Science**, v. 108, n. 1–2, p. 98–106, out. 2008.

VASCONCELOS, S. M. L. et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1323–1338, out. 2007.

VILLAS BOAS, G. R. et al. Preclinical safety evaluation of the ethanolic extract from guavira fruits (*Campomanesia pubescens* (D.C.) O. BERG) in experimental models of acute and short-term toxicity in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 118, p. 1–12, 1 ago. 2018.

VOEKS, R. **Disturbance Pharmacopoeias: Medicine and Myth from the Humid Tropics: Annals of the Association of American Geographers: Vol 94, No 4**. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1111/j.1467-8306.2004.00439.x>>. Acesso em: 10 set. 2019.

WHO. (World Health Organization - 2011 The World Traditional Medicines Situation, in Traditional medicines: Global Situation, Issues and Challenges. Geneva 3:1–14. 2011.

WILLCOX, B. J.; WILLCOX, D. C. Caloric restriction, caloric restriction mimetics, and healthy aging in Okinawa: controversies and clinical implications. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 17, n. 1, p. 51–58, jan. 2014.

WU, G. et al. Glutathione metabolism and its implications for health. **The Journal of Nutrition**, v. 134, n. 3, p. 489–492, mar. 2004a.

WU, G. et al. Glutathione Metabolism and Its Implications for Health. **The Journal of Nutrition**, v. 134, n. 3, p. 489–492, 1 mar. 2004b.

WU, J. Z. et al. Pyrroloquinoline quinone enhances the resistance to oxidative stress and extends lifespan upon DAF-16 and SKN-1 activities in *C. elegans*. **Experimental Gerontology**, v. 80, p. 43–50, 1 jul. 2016.

WU, M. et al. Regulator of G protein signaling-1 modulates paraquat-induced oxidative stress and longevity via the insulin like signaling pathway in *Caenorhabditis elegans*. **Toxicology Letters**, v. 273, p. 97–105, 5 maio 2017.

YAMAMOTO, Y.; GAYNOR, R. B. Role of the NF-kappaB pathway in the pathogenesis of human disease states. **Current Molecular Medicine**, v. 1, n. 3, p. 287–296, jul. 2001.

YANG, H. et al. Role of Sirt1 in innate immune mechanisms against *Mycobacterium tuberculosis* via the inhibition of TAK1 activation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 667, p. 49–58, 30 maio 2019a.

YANG, T. et al. Ultrasonicated sour Jujube seed flavonoids extract exerts ameliorative antioxidant capacity and reduces A β -induced toxicity in *Caenorhabditis elegans*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 239, p. 111886, 15 jul. 2019b.

ZHANG, Y. et al. ROS play a critical role in the differentiation of alternatively activated macrophages and the occurrence of tumor-associated macrophages. **Cell Research**, v. 23, n. 7, p. 898–914, jul. 2013.

5. ARTIGO CIENTÍFICO

O artigo científico descrito neste trabalho será submetido à revista *Free Radical Biology and Medicine*, e as normas para submissão neste periódico encontram-se disponíveis em: < <https://www.elsevier.com/journals/free-radical-biology-and-medicine/0891-5849/guide-for-authors> >.

Estrato Qualis-Capes: Biodiversidade – A2

Fator de Impacto: 5.657

AIMS AND SCOPE

Free Radical Biology and Medicine is an international, interdisciplinary journal that publishes original contributions and reviews on a broad range of topics relating to **redox biology**, **signaling**, **biological chemistry** and medical implications of **free radicals**, **reactive species**, **oxidants** and **antioxidants**.

Manuscript Details

Manuscript number	FRBM_2019_1513
Title	Acrocomia aculeata (Jacq.) Lodd. ex Mart. LEAVES INCREASE SIRT-1 LEVELS AND IMPROVE STRESS RESISTANCE
Article type	Original article

Abstract

Oxidative stress is a metabolic disorder linked with several chronic diseases, and this condition can be improved by natural antioxidants. The fruit pulp of the palm *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart. is widely used in the treatment of various illnesses, but as far as we know, there are no reports regarding the properties of its leaves. Thus, we aimed to evaluate the antioxidant activity of *A. aculeata* leaves extracts obtained with water (EA-Aa), ethanol (EEAa) and methanol (EM-Aa) solvents. The extracts were chemically characterized and their antioxidant activity was assessed through the scavenging of the free radicals DPPH and ABTS. EE-Aa and EM-Aa showed the highest amounts of phenolic compounds and free-radical scavenging activity. However, EA-Aa was more efficient to protect human erythrocytes against AAPH-induced hemolysis and lipid peroxidation. Thus, we further show the antioxidant effect of EA-Aa in preventing AAPH-induced protein oxidation, H₂O₂-induced DNA fragmentation and ROS generation in Cos-7 cells. Increased levels of Sirt-1, catalase and activation of ERK and Nrf2 were observed in Cos-7 treated with EA-Aa. We also verify increased survival in nematodes *C. elegans*, when induced to the oxidative condition by Juglone. Therefore, our results showed a typical chemical composition of plants for all the extracts, but the diversity of compounds presented in EA-Aa, is involved in the lower toxicity, and antioxidant properties provided to the macromolecules tested, proteins, DNA and lipids. This protective effect also proven in Cos-7 and in *C. elegans*, was probably due the activation of Sirt1/Nrf2 pathway. Altogether, the low toxicity and the antioxidant properties of EA-Aa showed in all the experimental models, support its further use in the treatment of oxidative stress related diseases.

Keywords	Macaúba; bocaiúva; aging; bioprospecting; biodiversity.
Taxonomy	Western Blot, Fluorescence Assay, Antioxidant Study
Corresponding Author	Kely de Picoli Souza
Corresponding Author's Institution	Federal University of Grande Dourados
Order of Authors	Tamaeh Monteiro Alfredo, Paulo Matafome, Bianca Iacia, Katia Avila Antunes, Jéssica Maurino dos Santos, Janielle da Silva Melo da Cunha, Sara Oliveira, Alex Santos Oliveira, Jaqueline Ferreira Campos, Mariana Magalhães, Célia Cabral, Raquel Seiça, Claudia Cardoso, Caio Oliveira, Edson Santos, Kely de Picoli Souza
Suggested reviewers	Rakesh Pandey, Urszula Szymanowska, Juan C Mayo, Rafael Dutra

Submission Files Included in this PDF

File Name [File Type]

Cover letter.doc [Cover Letter]

Highlights.docx [Highlights]

Graphical Abstract.tif [Graphical Abstract]

Monteiro-Alfredo et al, manuscript.docx [Manuscript File]

Submission Files Not Included in this PDF**File Name [File Type]**

Figure 1.png [Figure]

Figure 2.png [Figure]

Figure 3.png [Figure]

Figure 4.png [Figure]

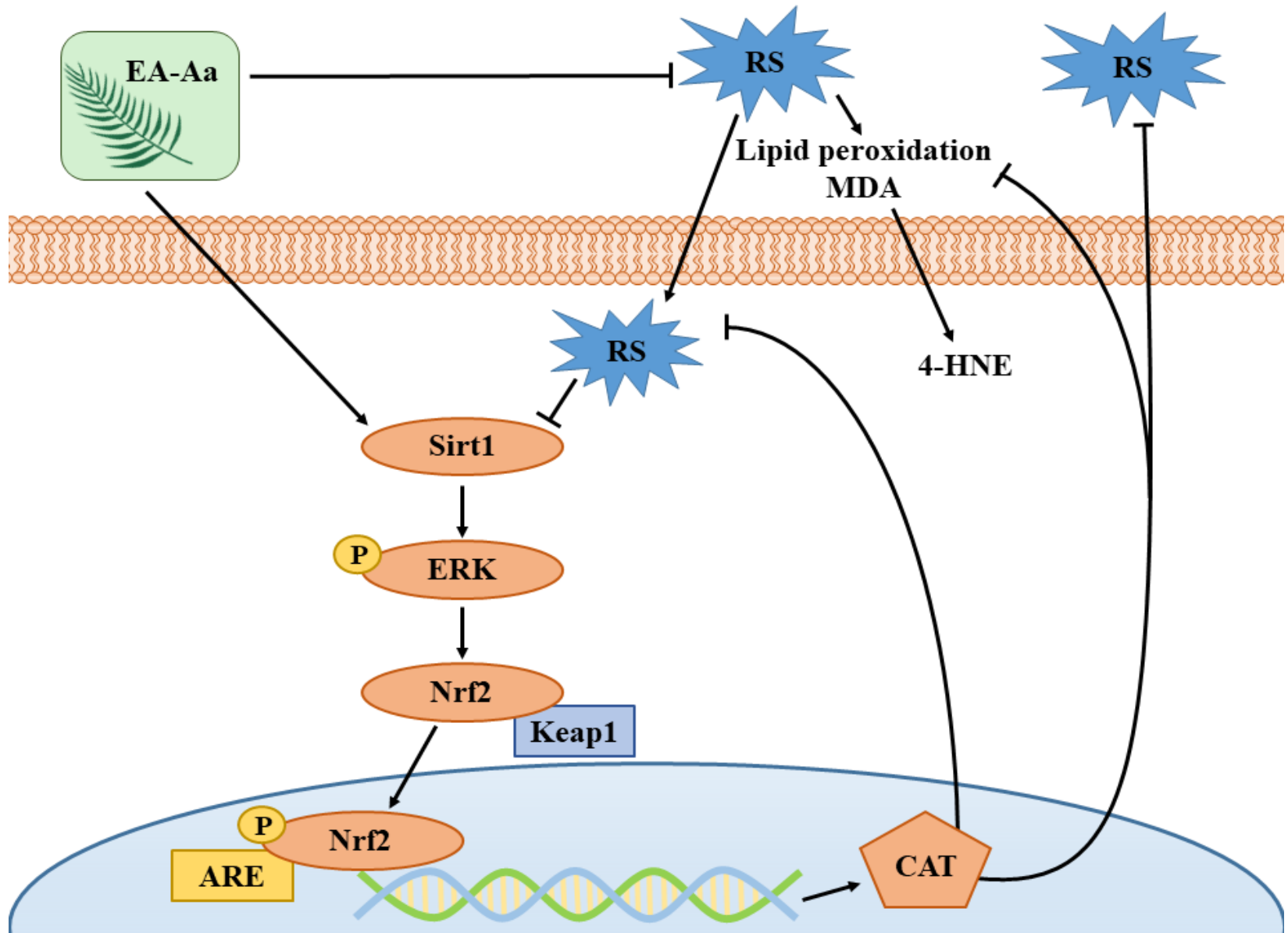
Figure 5.png [Figure]

Figure 6.png [Figure]

To view all the submission files, including those not included in the PDF, click on the manuscript title on your EVISE Homepage, then click 'Download zip file'.

HIGHLIGHTS

- Antioxidant potential of the extracts was proved from *in vitro* to *in vivo* assays;
- The aqueous extract showed no toxicity, making its future therapeutic use possible;
- The aqueous extract activates Sirt1/Nrf2 pathway, and increase catalase levels;
- *A. aculeata* reduces oxidative damage and improve *C. elegans* stress resistance.



***Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart. LEAVES INCREASE SIRT-1 LEVELS
AND IMPROVE STRESS RESISTANCE**

Tamaeh Monteiro-Alfredo^{1,2,3}, Paulo Matafome^{2,3,4}, Bianca Iacia¹, Kátia Antunes¹,
Jéssica Maurino¹, Janielle Cunha¹, Sara Oliveira^{2,3}, Alex Oliveira¹, Jaqueline Campos¹,
Mariana Magalhães³, Célia Cabral^{3,5}, Raquel Seica^{2,3}, Cláudia Cardoso⁶, Caio Oliveira¹,
Edson Lucas dos Santos¹, Kely de Picoli Souza^{1*}.

¹Research Group on Biotechnology and Bioprospecting Applied to Metabolism (GEBBAM), Federal University of Grande Dourados, Dourados, MS, Brazil

²Institute of Physiology, Faculty of Medicine, University of Coimbra, Coimbra, Portugal

³Coimbra Institute for Clinical and Biomedical Research (iCBR), Faculty of Medicine; CNC.IBILI Consortium & CIBB Consortium, University of Coimbra, 3000-548 Coimbra, Portugal

⁴Instituto Politécnico de Coimbra, Coimbra Health School (ESTeSC), Department of Complementary Sciences, Coimbra

⁵Centre for Functional Ecology, Department of Life Sciences, University of Coimbra, Calçada Martim de Freitas, 3000-456 Coimbra, Portugal

⁶Course of Chemistry, State University of Mato Grosso do Sul, Dourados, 79070-900 Mato Grosso do Sul, Brazil

***Corresponding author:**

Kely de Picoli Souza

Rodovia Dourados Itahum, Km 12, 79804-970 Dourados, MS, Brazil

+55 67 3410-2002

e-mail: kelypicoli@ufgd.edu.br.

ABSTRACT

Oxidative stress is a metabolic disorder linked with several chronic diseases, and this condition can be improved by natural antioxidants. The fruit pulp of the palm *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart. is widely used in the treatment of various illnesses, but as far as we know, there are no reports regarding the properties of its leaves. Thus, we aimed to evaluate the antioxidant activity of *A. aculeata* leaves extracts obtained with water (EA-Aa), ethanol (EE-Aa) and methanol (EM-Aa) solvents. The extracts were chemically characterized and their antioxidant activity was assessed through the scavenging of the free radicals DPPH and ABTS. EE-Aa and EM-Aa showed the highest amounts of phenolic compounds and free-radical scavenging activity. However, EA-Aa was more efficient to protect human erythrocytes against AAPH-induced hemolysis and lipid peroxidation. Thus, we further show the antioxidant effect of EA-Aa in preventing AAPH-induced protein oxidation, H₂O₂-induced DNA fragmentation and ROS generation in Cos-7 cells. Increased levels of Sirt-1, catalase and activation of ERK and Nrf2 were observed in Cos-7 treated with EA-Aa. We also verify increased survival in nematodes *C. elegans*, when induced to the oxidative condition by Juglone. Therefore, our results showed a typical chemical composition of plants for all the extracts, but the diversity of compounds presented in EA-Aa, is involved in the lower toxicity, and antioxidant properties provided to the macromolecules tested, proteins, DNA and lipids. This protective effect also proven in Cos-7 and in *C. elegans*, was probably due the activation of Sirt1/Nrf2 pathway. Altogether, the low toxicity and the antioxidant properties of EA-Aa showed in all the experimental models, support its further use in the treatment of oxidative stress related diseases.

Keywords: macaúba, bocaiúva, aging, bioprospecting, biodiversity.

1 INTRODUCTION

Rising of life expectancy and lifestyle changes are strictly related to overwhelming incidence of chronic diseases worldwide [1]. The negative economic impacts on health systems resulted from the treatment of these diseases, stimulates the development of new, cheaper and more effective therapeutic alternatives [2]. A key factor involved in the development and progression of many chronic diseases is the oxidative stress [3], which is caused by endogenous (deregulation in the body's redox balance) [4] and exogenous (environmental agents) factors [5]. At low concentrations, reactive species (RS) are physiologically important and participate of cellular signaling of biochemical and immunological processes [6]. A pro-oxidant condition of the body's redox balance is characterized by the increased RS production, especially reactive species of oxygen (ROS) and nitrogen (RNS). Under these circumstances, the antioxidant defenses are inefficient, failing to effectively neutralize the RS [7]. In excess, RS react with biomolecules such as carbohydrates, lipids, proteins, and nucleic acids, resulting in cellular dysfunction [8] and the development of chronic diseases such as diabetes [9] and cancer [10]. From the pharmacological point of view, medicinal plants are a relevant source of compounds to treat illnesses [11], in particular those related with oxidative stress. The pharmacological activities observed in several plants are due to the constitution of their secondary metabolites, such as flavonoids, tannins and mainly phenolic compounds [12]. These antioxidant compounds could act alone or in synergism [13], and the positive relationship between the consumption of vegetables rich in antioxidant compounds and the prevention of diseases related to oxidative stress imbalance, stimulates the search for plants that prompts both health maintenance and medicinal purposes [14–16].

Brazil owns an important part of the world's biodiversity [17], and exclusive biomes such as Cerrado [18], serving as an important source of raw material for the production of food and herbal medicines [19,20]. Among the native plants from Cerrado, *Acrocomia aculeata* (Jacq.)

Lodd ex Mart., commonly known as *macaúba* or *bocaiúva* [21], is a palm with economic importance due to the large variety of products derived from its fruits and kernel, which are rich in proteins, vitamins and oils [22]. In addition to its uses in cooking [22], cosmetic industry [21] and biodiesel production [23], it also has been used for ethnopharmacological purposes. In traditional medicine, *A. aculeata* has been used for the treatment of respiratory diseases, as laxative and analgesic [24], and in the decrease of serum glucose and cholesterol levels [25]. Several chemical compounds with high antioxidant potential have already been described in *A. aculeata*. The fruit pulp is known to contain oleic acid [26], β -carotene [27] and α -tocopherol, whereas the kernel has lauric and oleic acid [28]. Although fruits are more widely used and studied, the leaves are used in animal nutrition [29] and no toxicity has been reported [30]. Given the scarcity of information regards to the chemical composition, antioxidant properties and pharmacological potential, we aimed to determine the chemical composition, toxicity and the antioxidant properties of *A. aculeata* leaves with the goal to obtain accurate information about this plant part underutilized.

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 Chemicals and Antibodies

Organic solvents and salts used in all experiments were purchased from Sigma-Aldrich/Merck, Biowest and Fischer Scientific. Antibodies used were targeted to Sirt1, ERK, phospho ERK - Thr202/Tyr204 (Cell Signalling), Nrf2 (Santa Cruz Biotechnology), phospho Nrf2 - Ser40 (Invitrogen). Calnexin was used as loading control (Sicgen, Portugal).

2.2 Plant material

A. aculeata fresh leaves were collected in the morning, between July and August of 2014, in the region of Grande Dourados, Macaúba district, state of Mato Grosso do Sul (MS)

(22°07'02.4" S 54°28'36.3" W), under the permission of the Brazilian Biodiversity Authorization and Information System (Sistema de Autorização e Informação sobre Biodiversidade, SISBIO; n°. 50589). The species was identified by a plant taxonomist, and a voucher specimen was deposited in the herbarium (DDMS-UFGD) of the Federal University of Grande Dourados, Dourados (MS), Brazil, under the registration number 5103.

Leaves were washed, cut into 5 cm strips and dried in an air circulation oven at $45 \pm 5^\circ\text{C}$ until the mass of the samples was stabilized. The dried leaves were ground in a Willey-knife mill and sieved in a 10 mm mesh, and the resulting powder was stored at -20°C .

2.3 Isolation of extracts

The aqueous extract of *A. aculeata* (EA-Aa) was obtained by infusion; the powder was mixed with boiled water (100 g/L) under manual shaking until its complete cooling. After, the extract was filtered, freeze-dried, and stored at -20°C . The ethanolic (EE-Aa) and methanolic (EM-Aa) extracts were prepared adding the leaves powder in ethanol and methanol, respectively, at the same proportion of EA-Aa. The extraction occurred by maceration during 7 days, followed by the process of concentration in a rotary evaporator and freeze-dried.

2.4 Chemical composition

2.4.1 Total phenolic compounds, flavonoids and condensed tannins

Total phenolic compound of the extracts was determined by spectrophotometry (T70 UV/VIS Spectrometer, PG Instruments Ltd), using Folin-Ciocalteu reagent and the results were expressed in milligrams equivalents of gallic acid per gram of extract (mg EAG^{-1}) [31]. Total flavonoid content was determined using a 2% aluminium chloride solution in methanol as reagent, resulting in an average value expressed in milligrams equivalents of quercetin per gram of extract (mg EQ^{-1}) [32]. Amount of condensed tannins was also determined by a

spectrophotometric method, using a solution of vanillin in 8% acidified methanol [33]. The results were expressed in milligrams equivalents of catechin per gram of extract (mg EC⁻¹). All experiments were carried out in three independent experiments in triplicate.

2.4.2. Chromatographic analysis by LC-6AD

The EA-Aa, EE-Aa and EM-Aa were solubilized in water:methanol 8:2 (v:v) and evaluated in a LC analytical column (LC-6AD Shimadzu, Kyoto, Japan) with the aid of a photodiode array detector (PDA) system which was monitored between wavelengths $\lambda = 200\text{-}800$ nm, in an LC analytical apparatus, where the column was ODS HYPERSIL (C-18, 150 mm long x 4.6 mm diameter, Thermo Electron Corporation). The flow quotient and the injection volume were respectively 1 mL.min⁻¹ and 10 μ L. All the chromatographic analysis took place at a temperature of 25 °C. The eluent A was composed of a binary mobile phase of water with 6% acetic acid and 2 mM of sodium acetate, and the eluent B, composed by acetonitrile and the following gradient was applied: 0 min 5% B; 20 min 15% B; 30 min 60% B; and 40 min 100% B. Samples of vanillic acid, caffeic acid, ferric acid, rosmarinic acid, p-coumaric acid, rutin, quercetin, luteolin, apigenin and vanillin were used, prepared in methanol-water at a concentration of 1,000 μ g.mL⁻¹ in 1:1 v:v water:methanol. The identification of the compounds with the aid of PDA detector scanning in the spectral range of 200-800 nm did not reveal interferences in retention time of the samples in LC by the developed elution method. Standards were identified and quantified based on their absorption spectra in the UV region and in retention time. Standards found in extracts were unambiguously identified by performing co-injection experiments in which aliquots of the extracts and standards were mixed and diluted to a known volume and analyzed through LC. The calibration curves were determined by linear regression using LC. The linearity for standards was assessed for 10 concentration ranges. The average standard errors for the peak areas of replicated injections ($n = 5$) were less than 2%,

thus showing good repeatability of the calibration curve. The respective coefficients of determination (r^2) were 0.9994 for caffeic acid, vanillic acid, ferulic acid and gallic acid, and $r^2 = 0.9996$ for rutin and quercetin.

2.4.3. Chromatographic analysis by GC-MS

To prepare samples for GC-MS analysis, 2 mL of water and 2 mL of hexane were added separately to 100 mg of each *A. aculeata* extract (EA-Aa, EE-Aa and EM-Aa), after phase formation, the hexane fraction was separated from the aqueous fraction. To the aqueous fraction was added 2 mL of hexane and the process was repeated. After the two extractions, the hexane fractions were dried and suspended in 1,000 mL hexane. For GC-MS analysis the solution was first filtered through a 0.45 μm ultrafilter.

To identify the compounds presents in EA-Aa, EE-Aa and EM-Aa, the samples were also evaluated by mass spectrometry (GC-MS). The GC-MS analysis was performed using a GC-2010 Plus, Shimadzu, Kyoto, Japan, equipped with a mass spectrometry detector (GC-MS Ultra 2010), using LM-5 (5% phenyldimethylpolysiloxane), capillary column of fused silica (15 m length x 0.2 mm id, and 0.2 μm thick film). The analysis took place under the following conditions: helium entrainment gas (99.999% and flow rate 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$), 1 μL of injection volume, division ratio (1:20), furnace initial temperature adjusted to 150 $^\circ\text{C}$ and heating at 150 $^\circ\text{C}$ to 280 $^\circ\text{C}$ at 15 $^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ and a hold at 280 $^\circ\text{C}$ for 15 min. The injector temperature was 280 $^\circ\text{C}$ and the quadrupole detector temperature was 280 $^\circ\text{C}$. The MS scanning parameters included an electron impact ionization voltage. The identifications were performed by comparing the mass spectra obtained in the NIST21 and WILEY229 libraries. In some cases, when the identified spectra were not found, only the structural type of the corresponding component was proposed based on its mass spectral fragmentation. When possible, reference compounds were co-chromatographed to confirm GC-retention times. Standards of the stigmasterol,

campesterol, β - sitosterol, lupeol and lupeol acetate were prepared in hexane in the concentration of 1,000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. The concentrations of compounds were determined by external calibration. The linearity for standards was assessed for 5 concentration ranges. The average standard errors for the peak areas of replicated injections ($n = 5$) were less than 2%, thus showing good repeatability of the calibration curve. The respective coefficients of determination (r^2) were 0.9996 for stigmasterol, campesterol, β - sitosterol and lupeol, and $r^2 = 0.9994$ for lupeol acetate.

2.5. Free radical scavenging potential

2.5.1 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)

The antioxidant activity of the EA-Aa, EE-Aa and EM-Aa was evaluated through the capture of the free radical 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH). DPPH control solutions (0.11 mM) were incubated with positive control, ascorbic acid (AA) and extracts, prepared in different concentrations (0,1 – 2,000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) during 30 min, at room temperature, protected from light. After this period, spectrophotometer readings were performed at 517 nm. To calculate the percentage of inhibition of the free radical, the absorbance values of the samples and controls according to the equation 1 were used [34]. Three independent experiments were performed in triplicate.

$$\% \text{ DPPH inhibition} = \left(\frac{\text{Abs}_{\text{control DPPH}} - \text{Abs}_{\text{sample}}}{\text{Abs}_{\text{control DPPH}}} \right) \times 100 \quad (1)$$

2.5.2 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS)

The scavenging capacity of the extracts was also determined with the free radical 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS). The stock solution of ABTS was previously prepared (12 to 16 h) from an oxidation reaction between potassium persulfate (2.45 mM) and ABTS (7 mM). The analysis was performed at the same concentrations as the DPPH assay, the

spectrophotometer readings occurred at 734 nm after 6 min of reaction among the solution of ABTS and the extracts. The results were expressed as % of free radical scavenging, according to equation 2. Three independent experiments were performed [35].

$$\% \text{ ABTS inhibition} = \left(\frac{\text{Abs}_{\text{control ABTS}} - \text{Abs}_{\text{sample}}}{\text{Abs}_{\text{control ABTS}}} \right) \times 100 \quad (2)$$

2.6. Oxidative hemolysis assay

2.6.1 Toxicity in erythrocytes

In order to evaluate the hemolytic effect of the extracts, peripheral whole blood of a single adult healthy donor was collected and stored in tubes containing anticoagulant sodium citrate. Experiments were performed under the approval of the Research Ethics Committee CEP/UFGD n° 5160. Then, a solution of 10% of erythrocytes in physiological solution (NaCl 0.9%) was prepared. Afterwards, erythrocytes were incubated with the positive control, ascorbic acid (AA), and the extracts EA-Aa, EE-Aa and EM-Aa in different concentrations (25 – 1,000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) at 37 °C during 4 h, under constant shaking. In sequence, samples were centrifuged and the supernatant read at 540 nm. Results were expressed as percentage of hemolysis. Three independent experiments were performed in duplicate [36].

2.6.2 Oxidative hemolysis assay induced by 2,2'-Azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH)

Followed the evaluation of extracts toxicity in erythrocytes, the protective effect against oxidative hemolysis was investigated. Hence, the same conditions and concentrations of the prior assay were repeated and 50 mM of 2,2'-Azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH) was used to induce lipid peroxidation of erythrocytes membrane. Hemolysis was determined as the previous assay [36].

2.6.3. Quantification of malondialdehyde (MDA) generation

Proceed from incubation of the erythrocytes with AAPH, as described above, an aliquot of the supernatant was added to 20 nM of thiobarbituric acid (TBA) and incubated at 96 °C during 45 min. After, the tubes were placed in an ice bath during 15 min to stop the reaction and 4 mL of butanol were added to the tubes, with subsequent vortex and centrifugation at 3,000 rpm during 5 min. The absorbance of the supernatant was performed in a spectrophotometer at 532 nm. The generation of the lipid peroxidation product, MDA, was expressed by the following equation 3 [36].

$$\text{MDA nmol mL}^{-1} = \frac{\text{Abs}_{\text{sample}} (20 \times 220.32)}{\text{Abs}_{\text{standard MDA}}} \quad (3)$$

2.7 Protein oxidation

The protective effect of extracts on protein oxidation was investigated using bovine serum albumin (BSA) as standard. An amount of 3 µg of BSA was pre-incubated with 3 µL of EA-Aa in different concentrations (25 – 1,000 µg.mL⁻¹) during 30 min. Afterwards, 3 µL of 120 mM AAPH were added to each tube and further incubated at 37 °C during 1 h. At the end of incubation, the samples were mixed with sample buffer, heated at 95°C during 3 min and applied onto 12% SDS-PAGE. The gels were solved in Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad Laboratories, CA, USA) at 200V during 60 min and digitalized in Gel Doc EZ Imager (Bio-Rad Laboratories). The band volume was determined with the Image Lab software. The increase in band volume was considered as protein oxidative damage [37]. Afterwards, the difference between the BSA standard band volume and the remain bands was obtained and graphed, displaying the protection against the protein oxidative damage according with different concentrations of EA-Aa.

2.8 DNA fragmentation

The DNA damage was performed through the induction with H₂O₂. For this, plasmid DNA (50 ng.µl⁻¹) in a PBS solution was incubated with EA-Aa (25 – 1,000 µg.mL⁻¹) or standard controls, rutin (R), quercetin (Q), gallic acid (A) or catechin (C) [125 µg.mL⁻¹], and H₂O₂ 30%. Samples were incubated in a transilluminator UVT-312 at 302 nm, at room temperature during 5 min, followed by loading and electrophoresis in agarose gel 2% with ethidium bromide (10 mg.mL⁻¹). Gel was scanned by Gel Doc™ EZ System photodocumenter and the analysis were performed with Image Lab™ software. Experiments were realized in triplicate [38].

2.9 *In vitro* antioxidant activity in Cos-7

2.9.1. Cell culture

Fibroblast cell line derived from green monkey (*Cercopithecus aethiops*) kidney (Cos-7) was cultured in Dulbecco's modified Eagle medium – high glucose (DMEM-HG), supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 1% penicillin/streptomycin, at 37 °C and 5% CO₂. For the experiments, cells were used with an 80% of confluence [39].

2.9.2 Assessment of cell viability

To evaluate cell viability, 8x10⁴ Cos-7 cells were seeded in 48-well plates. After 24 h, cells were incubated with different concentrations (25 – 1,000 µg.mL⁻¹) of EA-Aa during 24 h, and cell viability was determined through the Alamar Blue assay. Briefly, the medium was replaced by a solution of DMEM-HG with 10% of resazurin (0.1 mg.mL⁻¹). After 4 h of incubation, the absorbance was measured at 570 nm and 600 nm in a BioTek microplate reader (BioTek, Instruments, Inc., Winooski, VT, USA). The data obtained by the Gen5 program were used to calculate Cos-7 viability, according to equation 4 [40].

$$\text{Cos-7 viability} = \left(\frac{(\text{Abs}_{570} - \text{Abs}_{600})_{\text{of treated cells}}}{(\text{Abs}_{570} - \text{Abs}_{600})_{\text{of control cells}}} \right) \times 100 \quad (4)$$

2.9.3 Antioxidant activity

To determine the antioxidant activity of the EA-Aa in Cos-7 cells, $8 \cdot 10^4$ cells were seeded in 96-well plates. After 24 h, cells were incubated with EA-Aa in the same concentrations as the previous assay during 30 min. After this period, the previously determined IC_{50} of the oxidative stress inductor H_2O_2 ($0,5 \mu M$) was added (data not shown). Following an incubation of 2 h. Cell viability was determined according to equation 4.

2.9.4 Fluorescence immunocytochemistry

In order to assess the role of the EA-Aa in the reduction of ROS formation, $8 \cdot 10^4$ Cos-7 cells were seeded in MilliCells[®] EZ Slide 8-well glass (Millipore, MA). After 24 h, cells were treated with EA-Aa and H_2O_2 in the same conditions used in the previous antioxidant assay. The evaluation of intracellular ROS was realized with 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H_2DCFDA), and with Dihydroethidium probe (DHE), following the manufacturer's instructions ($n=3$). DAPI was used to stain cell nucleus. Images were obtained with a fluorescence microscope (Zeiss Axio Observer Z1 with an incorporated camera (Zeiss, Germany), detected with 504 nm of excitation and 525 nm of emission for DCF, 587 nm of excitation and 610 nm of emission for DHE and 353 nm of excitation and 465 nm of emission for DAPI. The settings were kept constant for all analysis. The quantification of the images was performed with the ImageJ software.

2.10 Western Blot

For western blot analysis, $1 \cdot 10^6$ Cos-7 cells were seeded in 6-well plates during 24 h and then treated with EA-Aa ($500 - 1,000 \mu g \cdot mL^{-1}$) for 24 h. After, cells were washed with ice-cold PBS, disrupted in lysis buffer (0.25 M Tris-HCl, 125 mM NaCl, 1% Triton-X-100, 0.5% SDS, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 20 mM NaF, 2 mM Na_3VO_4 , 10 mM β -glycerophosphate, 2.5 mM

sodium pyrophosphate, 10 mM PMSF, 40 μ L of protease inhibitor), subjected to three freeze/thaw cycles in liquid nitrogen and centrifuged (14,000 rpm, 20 min, 4 °C). Protein concentration of the supernatant was measured through the BCA Protein Assay Kit [41] and the samples were mixed with Laemmli buffer (62.5 mM Tris-HCl, 10% glycerol, 2% SDS, 5% β -mercaptoethanol, 0.01% bromophenol blue). An amount of 15 μ g of total protein was loaded onto 8% SDS-PAGE, solved and electroblotted onto PVDF membrane. A rainbow marker was used as a standard weight protein marker. Membranes were blocked with TBS-T 0,01%, 5% BSA and incubated with primary antibody (against Sirt1, ERK, phospho ERK [Thr202/Tyr204], Nrf2, phospho Nrf2 [Ser40], and catalase) overnight and with secondary antibodies (anti-rabbit, anti-mouse, anti-goat) for 2 h at room temperature. Calnexin was used as the loading control. Immunoblots were detected with an ECL substrate and the Versadoc system (Biorad, USA).

2.11 *In vivo* antioxidant activity in *Caenorhabditis elegans*

The wild type N2 strain of the nematode *C. elegans*, donated by the laboratory of integrative physiology of Federal University of São Paulo, was used to access the role of EA-Aa in preventing oxidative damage *in vivo*. Nematodes were cultivated under standard conditions of 15 °C and 20 °C, in Petri dishes containing Nematode Growth Medium (NGM) agar with a coverage of *E. coli* strain OP50 [42]. To perform the antioxidant experiments, the nematode culture was synchronized through pregnant hermaphrodites and eggs already in place with 2% sodium hypochlorite and 5 M sodium hydroxide [43].

2.11.1 Evaluation of nematode survival

The acute toxicity of the EA-Aa (100 – 2,500 μ g.mL⁻¹) was carried out in L4 synchronized worms (n = 10 per group), transferred to previously filled 96-well plates with the respective

doses of the extracts and M9 buffer. The survival rate was defined after 24 h of incubation at 20 °C, with repeatedly physical stimuli with a platinum micro-spatula, under a stereomicroscope (Motic SMZ-140 & W10X/23 – British Columbia, Canada). Three independent experiments were performed in duplicate [44].

2.11.2 Oxidative stress assay induced with 5-Hydroxy-1,4-naphthoquinone (Juglone)

The evaluation of protective effect of EA-Aa against oxidative stress *in vivo* was performed in *C. elegans* treated with the EA-Aa and exposed to the inducer of intracellular ROS, 5-Hydroxy-1,4-naphthoquinone (Juglone). For this, the animals were synchronized (as described in the previous test) and developed in the presence/absence of EA-Aa (500 – 1,000 µg.mL⁻¹). At L4 stage, animals were transferred to 96-well plates containing M9 buffer and the extract or not. The animals were induced to oxidative stress with the addition of Juglone in an acute and lethal dose, defined in a dose-response-curve (data not shown) of 250 µM at 20 °C, and the survival of each group was analyzed hourly [44].

2.12 Statistical analysis

The results were expressed as mean ± standard error of the mean (SEM). We used Kolgomoronov-Smirnov test to determine normality. Analysis of variance (ANOVA) or Kruskal-Wallis test were used to access differences between groups and $p < 0.05$ was considered significant.

3. RESULTS

3.1 Chemical composition

The phytochemical screening of the extracts showed that the alcoholic extractions were responsible for a larger amount of phenolic compounds, flavonoids and tannins in relation to

aqueous extraction. The content of phenolic compounds in EA-Aa, EE-Aa and EM-Aa was 42.7 ± 2.2 , 166.5 ± 1.1 and 175.2 ± 1.8 mg GAE.g⁻¹ respectively, the flavonoid content was 16.6 ± 3.2 , 78.5 ± 10.8 and 104.5 ± 7.5 mgEG.G⁻¹ respectively and the tannins content was 0.88 ± 0.05 , 25.89 ± 1.68 and 18.17 ± 0.53 mgEC.g⁻¹ respectively. The chromatographic analysis performed with the extracts by LC-PDA has shown the same peaks 1 – 6 in all extracts, although peak 2 was only observable in the EA-Aa (Figure 1 A–C). According to the standards used, reported peaks are respectively: gallic acid, vanillic acid, caffeic acid, ferulic acid, rutin and quercetin. With exception of vanillic acid, identified only in EA-Aa, a similar content of compounds was shared among the extracts (Table 1). The GC-MS analysis was also performed in the EA-Aa, EE-Aa and EM-Aa and the following compounds were identified in EE-Aa and EM-Aa: Campesterol, stigmasterol, β -sitosterol, lupeol and lupeol acetate, as shown in Table 2. In the EA-Aa no compounds were identified.

3.2 Antioxidant activity and improvement of oxidative condition

3.2.1 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) free radical scavenging

The free radical scavenging potential was assessed using two different free radicals, DPPH and ABTS. Ascorbic acid (AA) was used as a natural and hydrophilic antioxidant positive control. As shown in Table 3, the IC₅₀ and maximum activity concentration were lower in EE-Aa and EM-Aa, when compared to EA-Aa, but higher than the AA in both tests, suggesting higher direct free radical scavenging activity of EE-Aa and EM-Aa than EA-Aa.

3.2.2 EA-Aa reduces oxidative stress in different biomolecules sources

In order to evaluate the role of the *A. aculeata* extracts in a lipid source, human erythrocytes were incubated with growing concentrations of the extracts and the positive control ascorbic

acid (AA). The hemolytic effect of EA-Aa, EE-Aa and EM-Aa was evaluated, showing hemolysis in the higher concentrations of EE-Aa and EM-Aa, as well as observed for AA (Figure 2A). Then, the protective effect of the extracts against AAPH-induced hemolysis was investigated. Figure 2 (B) shows that after 240 min of incubation, the EA-Aa promoted relevant protection with the improvement of AAPH-induced hemolysis. A reduction of 63.84% and 86.60% in relation to the group AAPH was observed in the concentrations of 500 and 1,000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Figure 2B). Both EE-Aa and EM-Aa did not promote significant protection. In order to evaluate lipid peroxidation, the generation of MDA was determined after the induction with AAPH. In accordance with the hemolysis assay, lower MDA levels were observed in group treated with EA-Aa (Figure 2C). The higher concentrations of EA-Aa (500 and 1,000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) reduced MDA levels in 83.44% and 90.87% respectively, similarly to the 250 and 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of AA, which resulted in a reduction of 84.99% and 78.77% in relation to AAPH. No significant reduction of MDA formation was observed for the EM-Aa, but EE-Aa reduced 55.10% and 61.68% at 100 and 250 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectively (Figure 2C).

Since EA-Aa promoted the highest protection against oxidative hemolysis and MDA formation this extract was selected to further antioxidant activity assays. Therefore, the role of EA-Aa in protein protection against oxidative damage induced from AAPH and DNA protection against UV-induced damage were assessed. Figure 3 (A) shows the antioxidant effect of EA-Aa against AAPH-induced protein oxidation, demonstrating a clear concentration-dependent protection, with a decrease of fuzzy bands with higher EA-Aa concentrations. Similar results were observed in the DNA fragmentation assay, shown in Figure 3 (B). A complete loss of DNA integrity was observed followed exposure to UV and H_2O_2 . Increasing concentrations of EA-Aa promoted a complete protection of plasmidial DNA, similar to the standard controls quercetin, rutin, gallic acid and catechin (Figure 3B).

3.3 EA-Aa reduces *in vitro* and *in vivo* oxidative stress and improves both cell viability and nematode survival

The antioxidant and cytoprotective effects of EA-Aa were further confirmed in higher complexity models, namely *in vitro* in the cell line Cos-7 and *in vivo* in the nematode *C. elegans*. The IC₅₀ of the inducers, H₂O₂ (Cos-7) and Juglone (*C. elegans*) were determined (data not shown). The EA-Aa-induced cytotoxicity was determined after incubation with growing concentrations during 24 h. A slight reduction of Cos-7 viability was observed with increasing concentrations of EA-Aa (Figure 4A). Up to 1,000 µg.mL⁻¹, no effects on *C. elegans* survival was noticed. To affect *C. elegans* survival was necessary to increase the EA-Aa concentration in 50, 100 and 150% (Figure 6A). In order to determine the protective role of EA-Aa *in vitro*, Cos-7 cells were incubated with 0.5 µM H₂O₂ (IC₅₀). At higher concentrations, EA-Aa was able to rescue Cos-7 cells treated with H₂O₂, displaying an increase of 26.06% (750 µg.mL⁻¹) and 33.08% (1,000 µg.mL⁻¹) in cell viability in relation to H₂O₂-treated cells (Figure 4 A). *C. elegans* survival was performed after the induction of oxidative stress with 250 µM Juglone (IC₅₀). EA-Aa led to an increase of 17.58% and 12.12% of nematode survival in the concentrations of 750 µg.mL⁻¹ and 1,000 µg.mL⁻¹ after 2 h of incubation. Following 4 h of Juglone exposure, EA-Aa increased the worms survival in 15.32% (750 µg.mL⁻¹) and 14.65% (1,000 µg.mL⁻¹).

In order to evaluate the protection against oxidative stress generation in Cos-7 cells, probes to total ROS (DCF) and to superoxide anion (DHE) were used. Increased staining to DCF (Figure 4 B, D) and DHE (Figure 4 C, E) were observed followed the incubation of the cells with 0.5 µM H₂O₂ in relation to control cells.

The incubation of EA-Aa at the concentrations that protected cells against oxidative damage induced by H₂O₂, (750 and 1,000 µg.mL⁻¹) reduced the fluorescence signal from both probes at levels observed in control cells, showing that EA-Ae was able to neutralize the formation of

ROS and superoxide anion, corroborating the previous assay of cellular viability where these concentrations increased cellular viability.

3.4 EA-Aa activates Sirt1, ERK and Nrf2 pathway

The pathways activated by the EA-Aa were further assessed in Cos-7 cells by Western blotting analysis. Followed the incubation of EA-Aa during 24 h, Sirt1 levels increased in 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ and 750 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Figure 5 A). While increased phosphorylated ERK (p-ERK) (Thr202/Tyr204) was observed in all concentrations, phosphorylated Nrf2 (p-Nrf2) (Ser40) and catalase levels were observed only in the group treated with 750 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ of EA-Aa. No changes were observed in ERK and NRF2 levels in no EA-Aa concentration (Figure 5 - A-F).

4 DISCUSSION

About 70% of the worldwide population consume medicinal plants as a therapeutic purpose [45]. In the last decades, medicinal plants have been the focus of many studies on the investigation of therapeutic potentials, which are largely related to their secondary metabolites, such as phenolic compounds [46,47]. Accordingly, this study characterizes the chemical composition of *A. aculeata* leaves, through the quantitative determination of phenolic compounds by colorimetric and chromatographic methods, as well as the determination of its antioxidant properties and the involved mechanisms.

Phenolic compounds are a class of plant secondary metabolites that act by redox chelation of metal ions, inhibiting the conversion of hydroperoxides into a RS and as a free radical scavenger by donating electrons from its hydroxyl groups [48]. Among this class, flavonoids are associated with several pharmacological benefits, widely distributed in plants, with important antioxidant activity contribution [49], already described in *A. aculeata* fruit pulp [24] and in

other palm trees [50,51]. Its potential comes from the donation of hydrogens or electrons to promote the stabilization of intermediate radical, also acting as iron chelating agent [52].

The phenolic compounds identified in *A. aculeata* extracts were gallic, caffeic, vanillic, and ferulic acids, and the flavonoids rutin and quercetin, which are likely to be linked to the potential of *A. aculeata* extracts in the antioxidant assays, as already reported in some studies with other plants [36,48,53–55]. GC-MS analysis also identified campesterol, stigmasterol and β -sitosterol, as well as the triterpenes lupeol and lupeol acetate, which are known to possess antioxidant properties [56] and inflammatory effects [57]. These molecules have been investigated with pharmacological purposes in cancer, diabetes and cardiovascular diseases [58]. Triterpenes were only identified in EE-Aa and EM-Aa, its presence might be related to lower of IC₅₀ values obtained in the free radical scavenging tests DPPH and ABTS in comparison with EA-Aa.

The protective properties of *A. aculeata* extracts on oxidative stress-induced damage was assessed in lipid, protein and DNA. Isolated erythrocytes were used to assess lipid peroxidation resulting from AAPH-mediated attack on cell membranes and ROS formation. This compound generates hydroxyl radicals [59] and a lipid peroxide radical (LOOH) after chain reactions in the polyunsaturated fatty acids (PUFAs) from cell membranes. As result of the oxidative chain reaction, α and β -aldehydes are formed, such as malondialdehyde (MDA), 4-hydroxynonenal (4-HNE) and acrolein, as well as isoprostanes [60], which are collectively named as thiobarbituric reactive species (TBARS) [61]. The accumulation of TBARS could lead to cell dysfunction because of the damage of its structure, culminating in cell death [62]. In face to check the protective effect in *A. aculeata* extracts, we analyzed the AAPH-induced oxidative hemolysis and MDA generation. In this way, the protection against oxidation is considered beneficial for the maintenance of health and prevention against the development of several diseases [53]. Similar results were also obtained in Cerrado plants [36,63]. The pro-oxidant

effect showed by EE-Aa and EM-Aa in high concentrations, is probably caused by the generation of free radicals, same as reported with AA [64]. The distinct chemical composition of EA-Aa allow no toxic outcome in the same concentrations of the other two extracts, and promoted antioxidant protection at higher concentrations, thus it was chosen to further experiments.

The protective effects of the EA-Aa was further evaluated *in vitro* and *in vivo* in Cos-7 cells and nematodes *C. elegans*, respectively. The EA-Aa was considered safe due its low toxicity (cell viability higher than 80%) even at high concentrations (1,000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). In Cos-7, the extract rescued cell viability in the presence of H_2O_2 at 750 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ and 1,000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, and we also proved that EA-Aa were able to improve H_2O_2 -induced ROS formation, assessed by the fluorescent probes H_2DCFDA and DHE [65]. This kind of oxidative protection is crucial in the protection against a lot of diseases related to this condition [3].

Although *in vitro* models are safe, like we used Cos-7, they are the same set of cells that have the same function, and the effect of the extract could be underestimated, so we decided to evaluate the potential of the extract in *in vivo* models as well. And with regard to the protection against ROS generation, the effects of EA-Aa were reproducible in *C. elegans*, where the oxidative damage is induced by Juglone, an intracellular ROS generator, that decreases viability and survival. So, the nematode survival was improved, by the prevention of Juglone-induced oxidative damage [66]. *A. aculeata* fruit pulp and kernel have shown similar results, in particular the *in vitro* antioxidant activity and absence of cytotoxicity [67], besides hypoglycemic [68] and anti-inflammatory and diuretic effects [69].

In order to understand the mechanisms involved in EA-Aa-induced prevention of oxidative damage, the levels of key enzymes involved in the response to cell stress were evaluated. EA-Aa increased the levels of Sirt1 and catalase and the activation of extracellular signal-regulated kinases (ERK) and nuclear factor (erythroid-derived-2)-like 2 (Nrf2). Sirtuins are a group of 7

enzymes which pathway plays an important role in metabolic homeostasis and redox balance [70]. They are located in the nucleus, but also in the cytoplasm, interacting with relevant cytoplasmic targets such as ERK [71]. ERK is a mitogen-activated protein kinases (MAPK) that has a crucial role in the maintenance of cellular homeostasis, acting in stress and proliferative responses [72] at least in part through Nrf2 activation [73]. Nrf2 is a crucial factor involved in oxidative stress protection mechanisms [74]. Given that, it is involved in the regulation of anti-inflammatory and cell survival genes such as phase II detoxifying/antioxidant enzymes as catalase [75]. Catalase is a key enzyme in the adaptive response against H₂O₂ [76]. Based in our results, we suggest that the pharmacological activation of Sirt1 is involved in oxidative stress response promoted by the EA-Aa, probably through the activation of ERK/Nrf2 pathway which increases Catalase-mediated antioxidant defense. Plants that have phenolic compounds as part of its constitution have already been represented as potent Sirtuin activators [77–80], and consequently the pathways associated with it.

Altogether, our results showed the composition of typical plant extract molecules, but the different composition of the molecules of EA-Aa allowed the lower toxicity compared to the others, and is related to the antioxidant capacity we show. EA-Aa has direct effect on the protection of macromolecules, proteins DNA and lipids and presented the same affect in Cos-7 cells and in *C. elegans*, by the activation of Sirt1/Nrf2 pathway. Thus, the low toxicity, the relevant potential in the maintenance of body's redox balance, allied to low cost and natural abundance, support further studies to explore the development of products based on it leaves to be used for both prevention and treatment of diseases related to oxidative stress.

AKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT), Coordenação de

Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). This work was also supported by Foundation for Science and Technology (FCT), Portugal (Strategic Projects UID/NEU/04539/2013 and UID/NEU/04539/2019).

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare no conflicts of interests.

REFERENCES

- [1] WHO. World Health Organization - Background - The global burden of chronic. World Health Organization 2019. https://www.who.int/nutrition/topics/2_background/en/ (accessed July 26, 2019).
- [2] Chang A, Cowling K, Micah A, Chapin A, Chen C, Ikilezi G, et al. Past, present, and future of global health financing: a review of development assistance, government, out-of-pocket, and other private spending on health for 195 countries, 1995–2050. *The Lancet* 2019;393:2233–60. doi:10.1016/S0140-6736(19)30841-4.
- [3] Peña-Oyarzun D, Bravo-Sagua R, Diaz-Vega A, Aleman L, Chiong M, Garcia L, et al. Autophagy and oxidative stress in non-communicable diseases: A matter of the inflammatory state? *Free Radical Biology and Medicine* 2018;124:61–78. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2018.05.084.
- [4] Ighodaro O. Molecular pathways associated with oxidative stress in diabetes mellitus. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2018;108:656–62. doi:10.1016/j.biopha.2018.09.058.
- [5] Perrone S, Laschi E, Buonocore G. Biomarkers of oxidative stress in the fetus and in the newborn. *Free Radical Biology and Medicine* 2019. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2019.03.034.
- [6] Miranda-Vizuete A, Veal E. *Caenorhabditis elegans* as a model for understanding ROS function in physiology and disease. *Redox Biology* 2017;11:708–14. doi:10.1016/j.redox.2016.12.020.
- [7] Méndez I, Vázquez-Martínez O, Hernández-Muñoz R, Valente-Godínez H, Díaz-Muñoz M. Redox regulation and pro-oxidant reactions in the physiology of circadian systems. *Biochimie* 2016;124:178–86. doi:10.1016/j.biochi.2015.04.014.
- [8] Barone E, Di Domenico F, Mancuso C, Butterfield D. The Janus face of the heme oxygenase/biliverdin reductase system in Alzheimer disease: It's time for reconciliation. *Neurobiology of Disease* 2014;62:144–59. doi:10.1016/j.nbd.2013.09.018.

- [9] Palmeira C, Teodoro J, Amorim J, Steegborn C, Sinclair D, Rolo A. Mitohormesis and metabolic health: The interplay between ROS, cAMP and sirtuins. *Free Radical Biology and Medicine* 2019;141:483–91. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2019.07.017.
- [10] Srinivas U, Tan B, Vellayappan B, Jeyasekharan A. ROS and the DNA damage response in cancer. *Redox Biology* 2018;101084. doi:10.1016/j.redox.2018.101084.
- [11] Dutra R, Campos M, Santos A, Calixto J. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. *Pharmacological Research* 2016;112:4–29. doi:10.1016/j.phrs.2016.01.021.
- [12] Piccolella S, Crescente G, Candela L, Pacifico S. Nutraceutical polyphenols: New analytical challenges and opportunities. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2019;175:112774. doi:10.1016/j.jpba.2019.07.022.
- [13] Shahidi F. Nutraceuticals and functional foods: Whole versus processed foods. *Trends in Food Science & Technology* 2009;20:376–87. doi:10.1016/j.tifs.2008.08.004.
- [14] Liu R, Cao P, Ren A, Wang S, Yang T, Zhu T, et al. SA inhibits complex III activity to generate reactive oxygen species and thereby induces GA overproduction in *Ganoderma lucidum*. *Redox Biology* 2018;16:388–400. doi:10.1016/j.redox.2018.03.018.
- [15] Tao S, Justiniano R, Zhang D, Wondrak G. The Nrf2-inducers tanshinone I and dihydrotanshinone protect human skin cells and reconstructed human skin against solar simulated UV. *Redox Biology* 2013;1:532–41. doi:10.1016/j.redox.2013.10.004.
- [16] Wallert M, Bauer J, Kluge S, Schmölz L, Chen Y-C, Ziegler M, et al. The vitamin E derivative garcinoic acid from *Garcinia kola* nut seeds attenuates the inflammatory response. *Redox Biology* 2019;24:101166. doi:10.1016/j.redox.2019.101166.
- [17] Fernandes G, Vale M, Overbeck G, Bustamante M, Grelle C, Bergallo H, et al. Dismantling Brazil's science threatens global biodiversity heritage. *Perspectives in Ecology and Conservation* 2017;15:239–43. doi:10.1016/j.pecon.2017.07.004.

- [18] Fonseca C, Venticinque E. Biodiversity conservation gaps in Brazil: A role for systematic conservation planning. *Perspectives in Ecology and Conservation* 2018;16:61–7. doi:10.1016/j.pecon.2018.03.001.
- [19] Cercato L, White P, Nampo F, Santos M, Camargo E. A systematic review of medicinal plants used for weight loss in Brazil: Is there potential for obesity treatment? *Journal of Ethnopharmacology* 2015;176:286–96. doi:10.1016/j.jep.2015.10.038.
- [20] Chukwuma C, Matsabisa M, Ibrahim M, Erukainure O, Chabalala M, Islam M. Medicinal plants with concomitant anti-diabetic and anti-hypertensive effects as potential sources of dual acting therapies against diabetes and hypertension: A review. *Journal of Ethnopharmacology* 2019;235:329–60. doi:10.1016/j.jep.2019.02.024.
- [21] César A, Almeida F, de Souza R, Silva G, Atabani A. The prospects of using *Acrocomia aculeata* (macaúba) a non-edible biodiesel feedstock in Brazil. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 2015;49:1213–20. doi:10.1016/j.rser.2015.04.125.
- [22] Costa J, Oliveira D, Costa L. Macauba Palm—*Acrocomia aculeata*. In: Rodrigues S, de Oliveira Silva E, de Brito ES, editors. *Exotic Fruits*, Academic Press; 2018, p. 297–304. doi:10.1016/B978-0-12-803138-4.00039-3.
- [23] Souza G, Scheufele F, Pasa T, Arroyo P, Pereira N. Synthesis of ethyl esters from crude macauba oil (*Acrocomia aculeata*) for biodiesel production. *Fuel* 2016;165:360–6. doi:10.1016/j.fuel.2015.10.068.
- [24] Agostini-Costa T. Bioactive compounds and health benefits of some palm species traditionally used in Africa and the Americas – A review. *Journal of Ethnopharmacology* 2018;224:202–29. doi:10.1016/j.jep.2018.05.035.
- [25] Silva P. Caracterização Química e avaliação do Potencial antidiabético e Citotóxico de Oleo Extraído de *Acrocomia aculeata* (macaúba). Master's thesis. Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, 2012.
- [26] Hiane P, Filho M, Ramos M, Macedo M. Óleo da polpa e amêndoa de bocaiúva, *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. Caracterização e composição em ácido graxos. *Brazilian Journal of Food Technology* 2005;3:256–9.

- [27] Sanjinez-Argandoña E, Chuba C. Biometrical, physical and chemical characterization of bocaiuva (*Acrocomia aculeata* (jacq.) Lodd. ex Mart) Palm fruits. *Revista Brasileira de Fruticultura* 2011;33:1023–8. doi:10.1590/S0100-29452011000300040.
- [28] Coimbra M, Jorge N. Fatty acids and bioactive compounds of the pulps and kernels of Brazilian palm species, guariroba (*Syagrus oleraces*), jervivá (*Syagrus romanzoffiana*) and macaúba (*Acrocomia aculeata*). *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2012;92:679–84. doi:10.1002/jsfa.4630.
- [29] Ciconini G, Favaro S, Roscoe R, Miranda C, Tapeti C, Miyahira M, et al. Biometry and oil contents of *Acrocomia aculeata* fruits from the Cerrados and Pantanal biomes in Mato Grosso do Sul, Brazil. *Industrial Crops and Products* 2013;45:208–14. doi:10.1016/j.indcrop.2012.12.008.
- [30] Breda C, Gasperini A, Garcia V, Monteiro K, Bataglioni G, Eberlin M, et al. Phytochemical Analysis and Antifungal Activity of Extracts from Leaves and Fruit Residues of Brazilian Savanna Plants Aiming Its Use as Safe Fungicides. *Nat Prod Bioprospect* 2016;6:195–204. doi:10.1007/s13659-016-0101-y.
- [31] Meda A, Lamien C, Romito M, Millogo J, Nacoulma O. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Faso honey, as well as their radical scavenging activity. *Food Chemistry* 2005;91:571–7. doi:10.1016/j.foodchem.2004.10.006.
- [32] Liberio S, Pereira A, Dutra R, Reis A, Araújo M, Mattar N, et al. Antimicrobial activity against oral pathogens and immunomodulatory effects and toxicity of geopropolis produced by the stingless bee *Melipona fasciculata* Smith. *BMC Complement Altern Med* 2011;11:108. doi:10.1186/1472-6882-11-108.
- [33] Rocha W, Lopes R, Silva D, Vieira R, Silva J, Agostini-Costa T. Total phenolics and condensed tannins in native fruits from Brazilian savanna. *Revista Brasileira de Fruticultura* 2011;33:1215–21. doi:10.1590/S0100-29452011000400021.
- [34] Gupta D, Gupta R. Bioprotective properties of Dragon's blood resin: *In vitro* evaluation of antioxidant activity and antimicrobial activity. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 2011;11:13. doi:10.1186/1472-6882-11-13.

- [35] Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine* 1999;26:1231–7. doi:10.1016/S0891-5849(98)00315-3.
- [36] dos Santos J, Alfredo T, Antunes K, da Cunha J, Costa E, Lima E, et al. *Guazuma ulmifolia* Lam. Decreases Oxidative Stress in Blood Cells and Prevents Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2018. doi:10.1155/2018/2935051.
- [37] Mayo J, Tan D, Sainz R, Lopez-Burillo S, Reiter R. Oxidative Damage to Catalase Induced by Peroxyl Radicals: Functional Protection by Melatonin and Other Antioxidants. *Free Radical Research* 2003;37:543–53. doi:10.1080/1071576031000083206.
- [38] Kumar A, Chattopadhyay S. DNA damage protecting activity and antioxidant potential of pudina extract. *Food Chemistry* 2007;100:1377–84. doi:10.1016/j.foodchem.2005.12.015.
- [39] COS-7 ATCC ® CRL-1651™ Cercopithecus aethiops kidney n.d. http://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CRL-1651?geo_country=pt#culturemethod (accessed July 1, 2019).
- [40] Magalhães M, Almeida M, Tavares-da-Silva E, Roleira F, Varela C, Jorge J, et al. miR-145-loaded micelleplexes as a novel therapeutic strategy to inhibit proliferation and migration of osteosarcoma cells. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2018;123:28–42. doi:10.1016/j.ejps.2018.07.021.
- [41] Matafome P, Santos-Silva D, Crisóstomo J, Rodrigues T, Rodrigues L, Sena C, et al. Methylglyoxal causes structural and functional alterations in adipose tissue independently of obesity. *Archives of Physiology and Biochemistry* 2012;118:58–68. doi:10.3109/13813455.2012.658065.
- [42] Brenner S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 1974;77:71–94.
- [43] Fabian T, Johnson T. Production of age-synchronous mass cultures of *Caenorhabditis elegans*. *J Gerontol* 1994;49:B145-156.

- [44] Asthana J, Yadav A, Pant A, Pandey S, Gupta M, Pandey R. Specioside ameliorates oxidative stress and promotes longevity in *Caenorhabditis elegans*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 2015;169:25–34. doi:10.1016/j.cbpc.2015.01.002.
- [45] WHO. (World Health Organization - 2011 The World Traditional Medicines Situation, in Traditional medicines: Global Situation, Issues and Challenges. Geneva 3:1–14 2011.
- [46] Martins N, Barros L, Ferreira I. *In vivo* antioxidant activity of phenolic compounds: Facts and gaps. *Trends in Food Science & Technology* 2016;48:1–12. doi:10.1016/j.tifs.2015.11.008.
- [47] Złotek U, Szymanowska U, Jakubczyk A, Sikora M, Świeca M. Effect of arachidonic and jasmonic acid elicitation on the content of phenolic compounds and antioxidant and anti-inflammatory properties of wheatgrass (*Triticum aestivum* L.). *Food Chemistry* 2019;288:256–61. doi:10.1016/j.foodchem.2019.02.124.
- [48] Daoud A, Malika D, Bakari S, Hfaiedh N, Mnafigui K, Kadri A, et al. Assessment of polyphenol composition, antioxidant and antimicrobial properties of various extracts of Date Palm Pollen (DPP) from two Tunisian cultivars. *Arabian Journal of Chemistry* 2015. doi:10.1016/j.arabjc.2015.07.014.
- [49] Ganeshpurkar A, Saluja A. The Pharmacological Potential of Rutin. *Saudi Pharmaceutical Journal* 2017;25:149–64. doi:10.1016/j.jsps.2016.04.025.
- [50] Che Idris C, Karupaiah T, Sundram K, Tan Y, Balasundram N, Leow S, et al. Oil palm phenolics and vitamin E reduce atherosclerosis in rabbits. *Journal of Functional Foods* 2014;7:541–50. doi:10.1016/j.jff.2014.01.002.
- [51] Zhou J, Ma Y, Jia Y, Pang M, Cheng G, Cai S. Phenolic profiles, antioxidant activities and cytoprotective effects of different phenolic fractions from oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) fruits treated by ultra-high pressure. *Food Chemistry* 2019;288:68–77. doi:10.1016/j.foodchem.2019.03.002.
- [52] Lesjak M, Beara I, Simin N, Pintać D, Majkić T, Bekvalac K, et al. Antioxidant and anti-inflammatory activities of quercetin and its derivatives. *Journal of Functional Foods* 2018;40:68–75. doi:10.1016/j.jff.2017.10.047.

- [53] Casagrande J, Macorini L, Antunes K, Santos U, Campos J, Dias-Júnior N, et al. Antioxidant and Cytotoxic Activity of Hydroethanolic Extract from *Jacaranda decurrens* Leaves. PLOS ONE 2014;9:e112748. doi:10.1371/journal.pone.0112748.
- [54] Chen L, Gnanaraj C, Arulselvan P, El-Seedi H, Teng H. A review on advanced microencapsulation technology to enhance bioavailability of phenolic compounds: Based on its activity in the treatment of Type 2 Diabetes. Trends in Food Science & Technology 2019;85:149–62. doi:10.1016/j.tifs.2018.11.026.
- [55] Kallel F, Driss D, Chaari F, Belghith L, Bouaziz F, Ghorbel R, et al. Garlic (*Allium sativum* L.) husk waste as a potential source of phenolic compounds: Influence of extracting solvents on its antimicrobial and antioxidant properties. Industrial Crops and Products 2014;62:34–41. doi:10.1016/j.indcrop.2014.07.047.
- [56] Pérez-González M, Nieto-Trujillo A, Gutiérrez-Rebolledo G, García-Martínez I, Estrada-Zúñiga M, Bernabé-Antonio A, et al. Lupeol acetate production and antioxidant activity of a cell suspension culture from *Cnidioscolus chayamansa* leaves. South African Journal of Botany 2019;125:30–8. doi:10.1016/j.sajb.2019.06.030.
- [57] Saleem M. Lupeol, A Novel Anti-inflammatory and Anti-cancer Dietary Triterpene. Cancer Lett 2009;285:109–15. doi:10.1016/j.canlet.2009.04.033.
- [58] Jiang L, Zhao X, Xu J, Li C, Yu Y, Wang W, et al. The Protective Effect of Dietary Phytosterols on Cancer Risk: A Systematic Meta-Analysis. Journal of Oncology 2019. doi:10.1155/2019/7479518.
- [59] Morita M, Naito Y, Yoshikawa T, Niki E. Plasma lipid oxidation induced by peroxynitrite, hypochlorite, lipoxygenase and peroxy radicals and its inhibition by antioxidants as assessed by diphenyl-1-pyrenylphosphine. Redox Biol 2016;8:127–35. doi:10.1016/j.redox.2016.01.005.
- [60] Gęgotek A, Skrzydlewska E. Biological effect of protein modifications by lipid peroxidation products. Chemistry and Physics of Lipids 2019;221:46–52. doi:10.1016/j.chemphyslip.2019.03.011.

- [61] Peña-Bautista C, Baquero M, Vento M, Cháfer-Pericás C. Free radicals in Alzheimer's disease: Lipid peroxidation biomarkers. *Clinica Chimica Acta* 2019;491:85–90. doi:10.1016/j.cca.2019.01.021.
- [62] Sasson S. Nutrient overload, lipid peroxidation and pancreatic beta cell function. *Free Radical Biology and Medicine* 2017;111:102–9. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2016.09.003.
- [63] dos Santos da Rocha P, de Araújo Boleti A, do Carmo Vieira M, Carollo C, da Silva D, Estevinho L, et al. Microbiological quality, chemical profile as well as antioxidant and antidiabetic activities of *Schinus terebinthifolius* Raddi. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 2019;220:36–46. doi:10.1016/j.cbpc.2019.02.007.
- [64] Putchala M, Ramani P, Sherlin H, Premkumar P, Natesan A. Ascorbic acid and its pro-oxidant activity as a therapy for tumours of oral cavity – A systematic review. *Archives of Oral Biology* 2013;58:563–74. doi:10.1016/j.archoralbio.2013.01.016.
- [65] Jung I. Soluble Extract from *Moringa oleifera* Leaves with a New Anticancer Activity. *PLOS ONE* 2014;9:e95492. doi:10.1371/journal.pone.0095492.
- [66] Tambara A, de Los Santos Moraes L, Dal Forno A, Boldori J, Gonçalves Soares A, de Freitas Rodrigues C, et al. Purple pitanga fruit (*Eugenia uniflora* L.) protects against oxidative stress and increase the lifespan in *Caenorhabditis elegans* via the DAF-16/FOXO pathway. *Food and Chemical Toxicology* 2018;120:639–50. doi:10.1016/j.fct.2018.07.057.
- [67] da Silva P, Ramiro M, Iriguchi E, Corrêa W, Lowe J, Cardoso C, et al. Antidiabetic, cytotoxic and antioxidant activities of oil extracted from *Acrocomia aculeata* pulp. *Nat Prod Res* 2019;33:2413–6. doi:10.1080/14786419.2018.1446006.
- [68] Nunes Â, Buccini D, Jaques J, Portugal L, Guimarães R, Favaro S, et al. Effect of *Acrocomia aculeata* Kernel Oil on Adiposity in Type 2 Diabetic Rats. *Plant Foods Hum Nutr* 2018;73:61–7. doi:10.1007/s11130-017-0648-8.
- [69] Lescano C, Iwamoto R, Sanjinez-Argandoña E, Kassuya C. Diuretic and Anti-Inflammatory Activities of the Microencapsulated *Acrocomia aculeata* (Arecaceae) Oil on Wistar Rats. *J Med Food* 2015;18:656–62. doi:10.1089/jmf.2014.0077.

- [70] Pirinen E, Lo Sasso G, Auwerx J. Mitochondrial sirtuins and metabolic homeostasis. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* 2012;26:759–70. doi:10.1016/j.beem.2012.05.001.
- [71] Morris B. Seven sirtuins for seven deadly diseases of aging. *Free Radical Biology and Medicine* 2013;56:133–71. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2012.10.525.
- [72] Liu F, Yang X, Geng M, Huang M. Targeting ERK, an Achilles' Heel of the MAPK pathway, in cancer therapy. *Acta Pharmaceutica Sinica B* 2018;8:552–62. doi:10.1016/j.apsb.2018.01.008.
- [73] Huang Y, Li W, Su Z, Kong A-NT. The complexity of the Nrf2 pathway: beyond the antioxidant response. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 2015;26:1401–13. doi:10.1016/j.jnutbio.2015.08.001.
- [74] Li X, Wu G, Han F, Wang K, Bai X, Jia Y, et al. SIRT1 activation promotes angiogenesis in diabetic wounds by protecting endothelial cells against oxidative stress. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2019;661:117–24. doi:10.1016/j.abb.2018.11.016.
- [75] Ferrándiz M, Nacher-Juan J, Alcaraz M. Nrf2 as a therapeutic target for rheumatic diseases. *Biochemical Pharmacology* 2018;152:338–46. doi:10.1016/j.bcp.2018.04.010.
- [76] Sepasi Tehrani H, Moosavi-Movahedi A. Catalase and its mysteries. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 2018;140:5–12. doi:10.1016/j.pbiomolbio.2018.03.001.
- [77] Ajami M, Pazoki-Toroudi H, Amani H, Nabavi S, Braidy N, Vacca R, et al. Therapeutic role of sirtuins in neurodegenerative disease and their modulation by polyphenols. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 2017;73:39–47. doi:10.1016/j.neubiorev.2016.11.022.
- [78] Chung S, Yao H, Caito S, Hwang J, Arunachalam G, Rahman I. Regulation of SIRT1 in cellular functions: Role of polyphenols. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2010;501:79–90. doi:10.1016/j.abb.2010.05.003.

[79] Dolinsky V, Cole L, Sparagna G, Hatch G. Cardiac mitochondrial energy metabolism in heart failure: Role of cardiolipin and sirtuins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 2016;1861:1544–54. doi:10.1016/j.bbalip.2016.03.008.

[80] Wang Y, He J, Liao M, Hu M, Li W, Ouyang H, et al. An overview of Sirtuins as potential therapeutic target: Structure, function and modulators. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2019;161:48–77. doi:10.1016/j.ejmech.2018.10.028.

Table 1. Chemical composition identified from the LC-PDA of the extracts of *A. aculeata* leaves ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1} \pm \text{DP}$).

Retention time (min)	Peak	Compound	EA-Aa	EE-Aa	EM-Aa
2.31	1	Gallic acid	201.6 ± 1.4	159.4 ± 0.9	192.9 ± 1.1
4.91	2	Vanillic acid	182.4 ± 0.9	-	-
6.31	3	Cafeic acid	124.6 ± 1.2	119.7 ± 0.7	123.4 ± 1.0
8.83	4	Ferulic acid	197.9 ± 1.0	182.7 ± 1.0	189.6 ± 1.3
21.75	5	Rutin	74.8 ± 0.4	77.3 ± 0.2	75.9 ± 0.5
24.42	6	Quercetin	88.7 ± 0.2	87.6 ± 0.5	89.2 ± 0.3

Table 2. Chemical composition identified from the GC-MS of the extracts of *A. aculeata* leaves ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1} \pm \text{DP}$).

Retention time (min)	Peak	Compound	Molar mass	EE-Aa	EM-Aa
16.46	1	Campesterol	400	21.0 ± 0.11	18.9 ± -0.33
17.02	2	Stigmasterol	412	25.7 ± 0.22	34.7 ± 0.29
17.72	3	β -sitosterol	414	60.1 ± 0.25	23.2 ± 0.27
18.89	4	Lupeol	426	49.4 ± 0.57	71.6 ± 0.64
21.01	5	Lupeol acetate	468	52.7 ± 0.63	55.1 ± 0.53

Table 3. Antioxidant activity of free radical scavenging DPPH and ABTS of EA-Aa, EE-Aa and EM-Aa (IC_{50} $\mu\text{g.mL}^{-1}$).

	DPPH			ABTS		
	IC_{50}	Maximum activity $\mu\text{g.mL}^{-1}$ %		IC_{50}	Maximum activity $\mu\text{g.mL}^{-1}$ %	
AA	2.68 ± 0.3	10	93.8	2.1 ± 0.2	10	98.8
EA-Aa	117.10 ± 7.3	250	82.2	47.4 ± 10.7	500	96.4
EE-Aa	12.92 ± 1.5	50	88.7	13.4 ± 0.4	100	99.8
EM-Aa	13.28 ± 1.2	100	90.8	$10.5 \pm 1,2$	50	100

IC_{50} : concentration required to capture 50% of the free radicals from the reaction.

Figure 1. Chromatography analysis of *A. aculeata* leaves by LC-6AD and GC-MS. A) EA-Aa, B) EE-Aa, C) EM-Aa by LC-6AD. D) EE-Aa and E) EM-Aa analysis by GC-MS.

Figure 2. Protective effect of *A. aculeata* extracts in human erythrocytes. A) Hemolytic effect in human erythrocytes incubated with *Aa* extracts after 240 min of incubation; no hemolytic effect was observed in EA-Aa, while higher concentrations (500 – 1,000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) of the other *Aa* extracts and the positive control AA showed hemolysis at the higher concentrations. B) Anti hemolytic effect of erythrocytes incubated with *Aa* extracts and AAPH (50 mM) after 240 min showing a protective effect of EA-Aa (500 – 1,000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) against AAPH-induced hemolysis. C) MDA produced from AAPH-induced lipid peroxidation showing higher protection against lipid peroxidation in highest concentrations (500 – 1,000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) of EA-Aa (500 – 1,000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). * vs AAPH; 1 symbol $p < 0.05$, 2 symbols $p < 0.01$, 3 symbols $p < 0.001$.

Figure 3. Antioxidant potential of EA-Aa in biomolecules. A) Protein oxidation induced with AAPH (120 mM) showing reduction of oxidation with EA-Aa (750 – 1,000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). B) Plasmid DNA fragmentation induced with H_2O_2 (30%) showing protection by EA (50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ – 1,000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) and positive controls, quercetin, rutin, A and C. * vs Control; # vs AAPH/ H_2O_2 ; 1 symbol $p < 0.05$, 2 symbols $p < 0.01$, 3 symbols $p < 0.001$.

Figure 4. Inhibition of ROS generation by EA-Aa in Cos-7 cells. A) Viability of Cos-7 cells treated with EA-Aa (500 - 1,000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) incubated with or without H_2O_2 (0.5 μM), showing presented low cytotoxicity of EA-Aa and protection (750 – 1,000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) against H_2O_2 -induced oxidative damage from. Decrease of H_2O_2 -induced ROS (stained with DCF) (B) and $\text{O}_2^{\cdot-}$ generation (stained with DHE) (C) with EA-Aa (500 – 1,000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). Representative images

of DCF and DHE are shown in (D) and (E), respectively. * vs Control; # vs H₂O₂; 1 symbol p<0.05, 2 symbols p<0.01, 3 symbols p<0.001.

Figure 5. *In vivo* antioxidant potential of EA-Aa in *C. elegans*. A) EA-Aa toxicity in the nematode showing toxicity only in concentrations higher than 1500 µg.mL⁻¹. B) Antioxidant potential of EA-Aa (500 - 1,000 µg.mL⁻¹) prevented Juglone-induced lower *C. elegans* survival after 4 h. * vs Control, # vs Juglone; 1 symbol p<0.05, 2 symbols p<0.01, 3 symbols p<0.001.

Figure 6. Mechanisms involved in EA-Aa-mediated protection of Cos-7 cells. A) Western blot analysis showing that EA-Aa increased the levels of Sirt-1 (A), ERK-Thr202/Tyr204 (C), Nrf2-Ser40 (E) and catalase (F), mostly at 750 µg.mL⁻¹. No alterations were observed in the total levels of ERK (B) and Nrf2 (D). * vs Control; 1 symbol p<0.05, 2 symbols p<0.01.

Figure 1

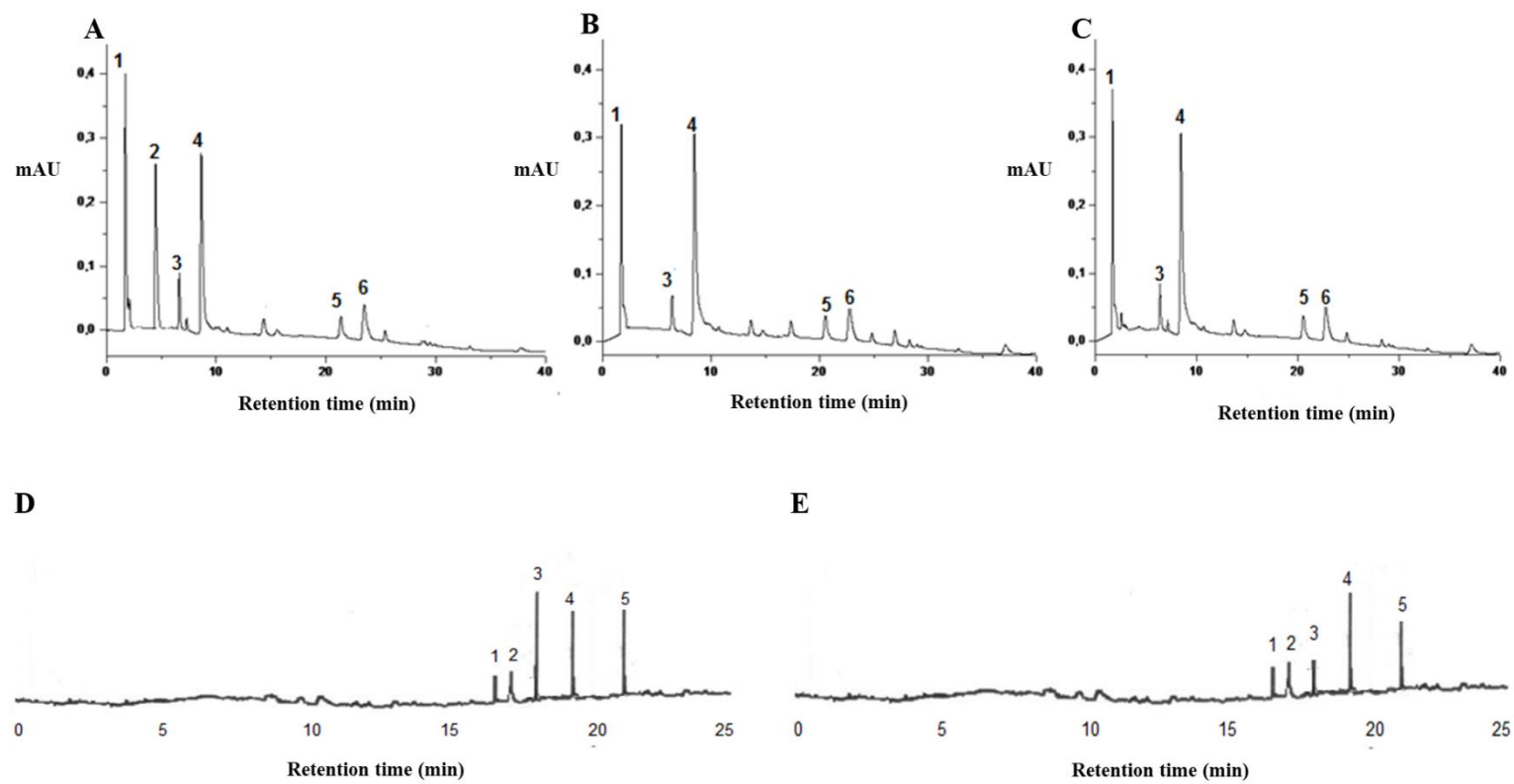


Figure 2

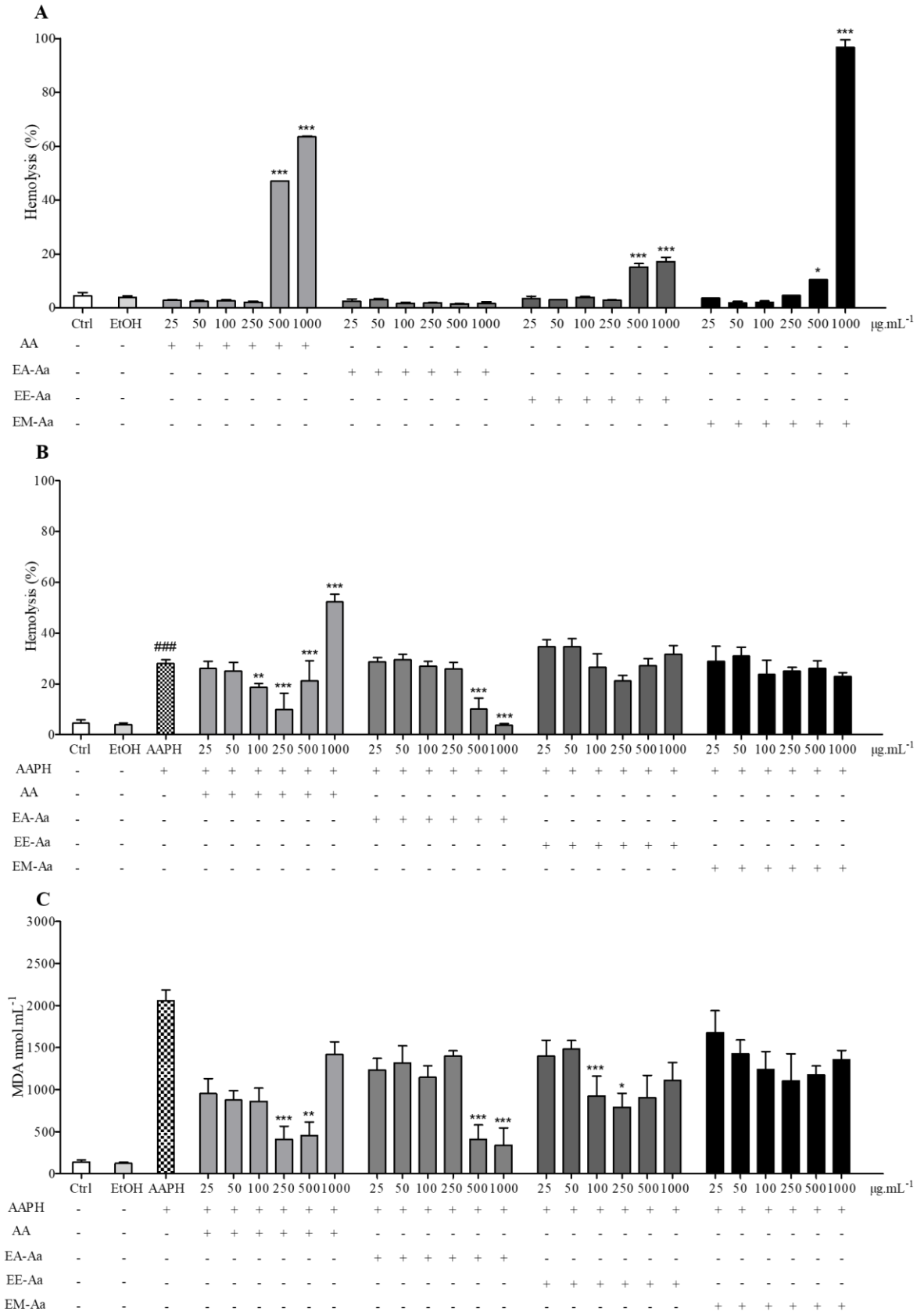


Figure 3

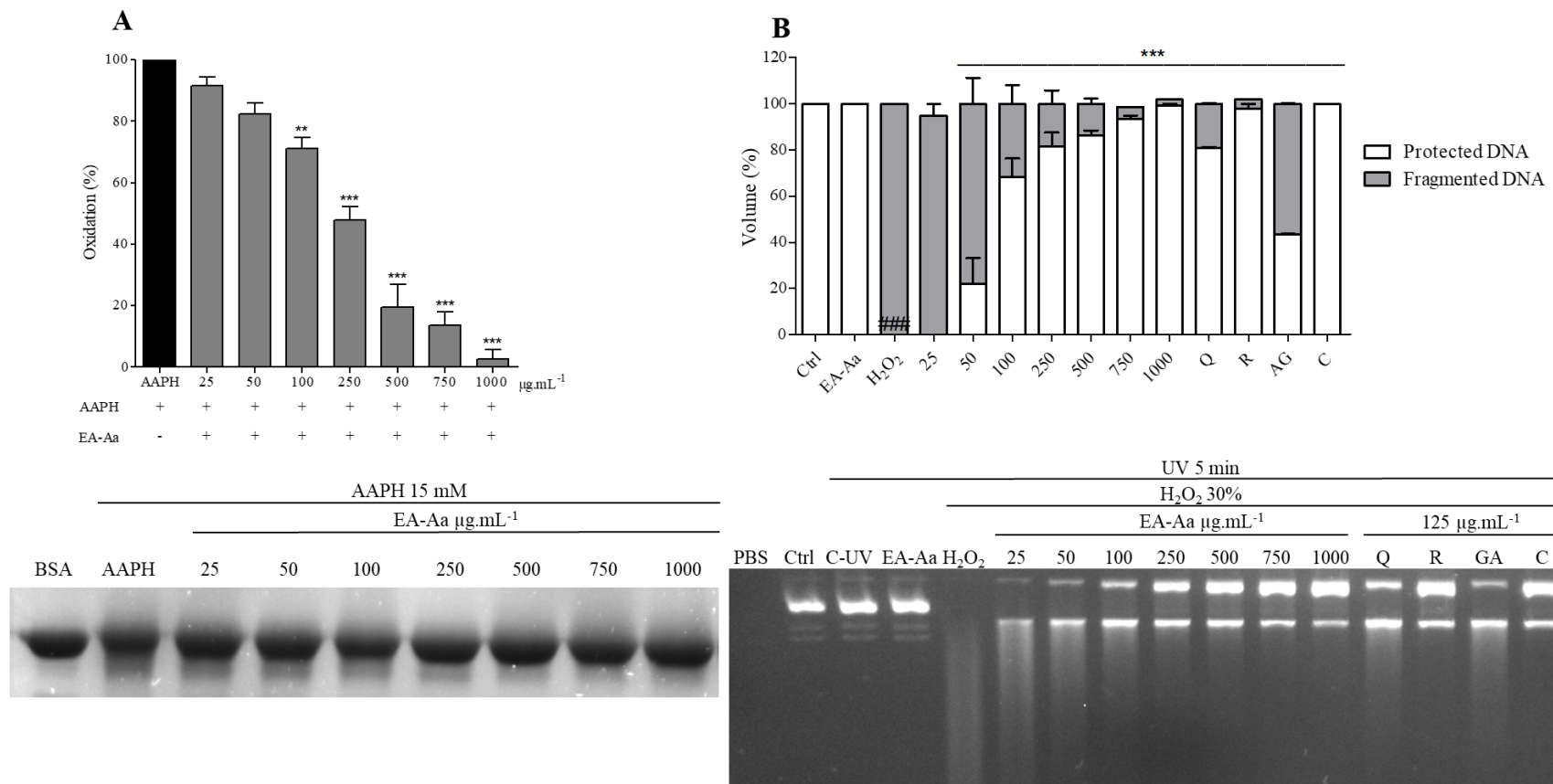


Figure 4

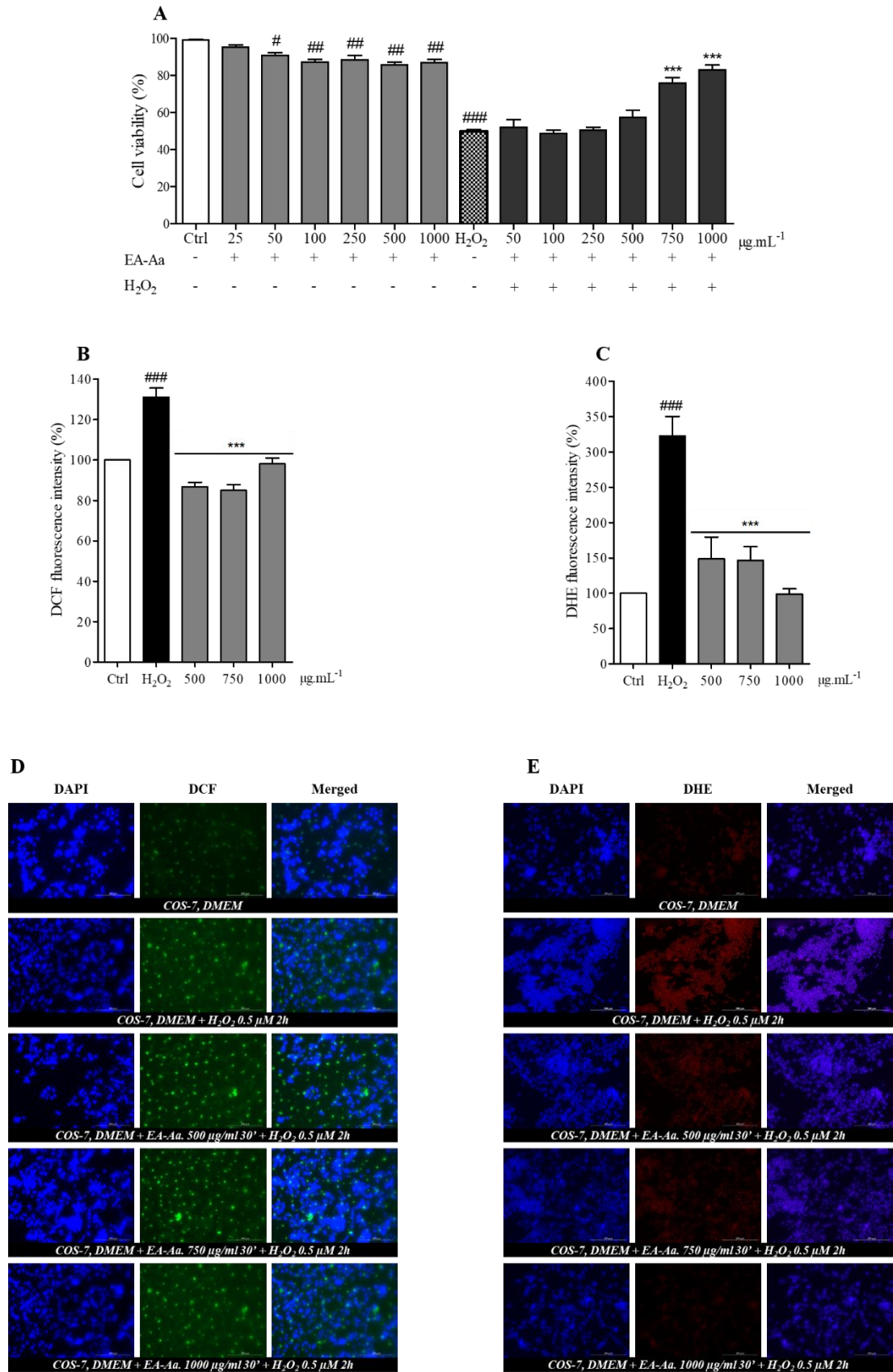


Figure 5

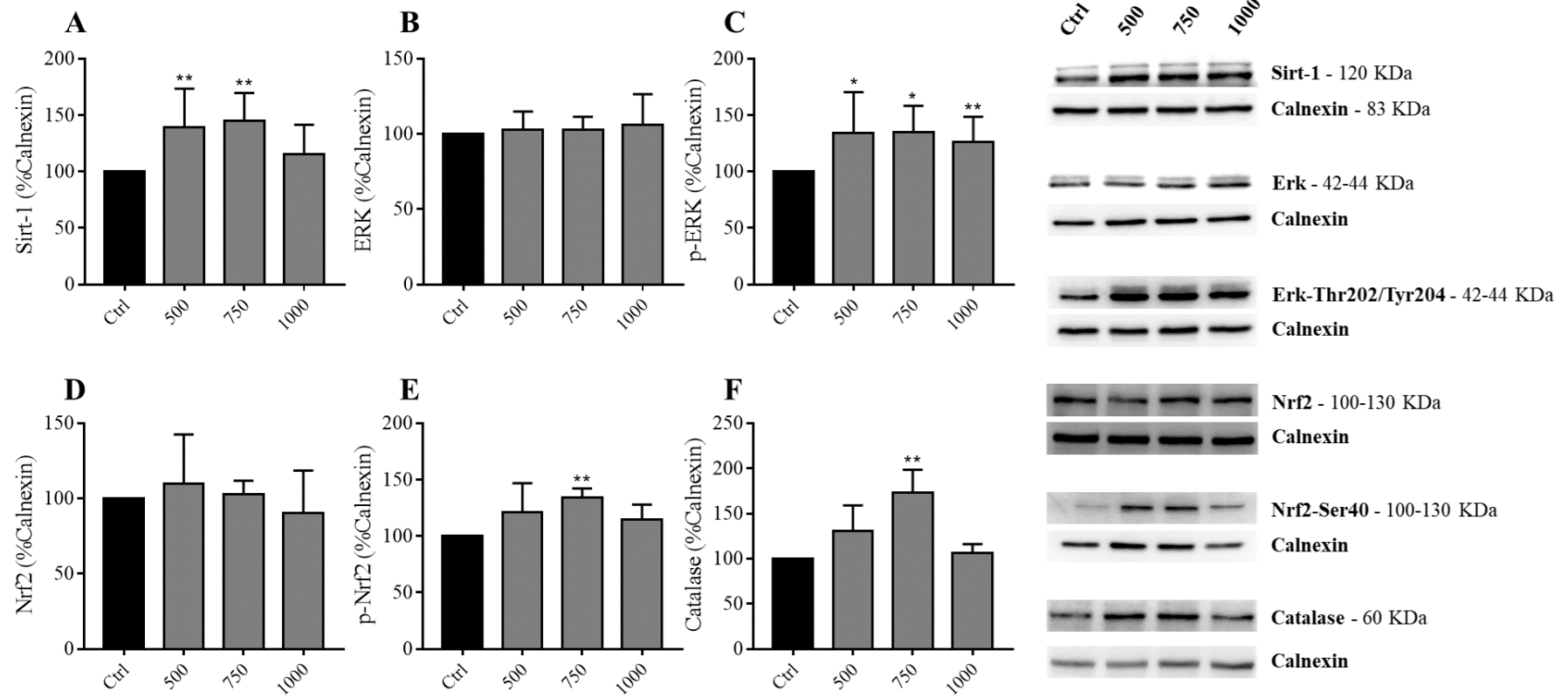
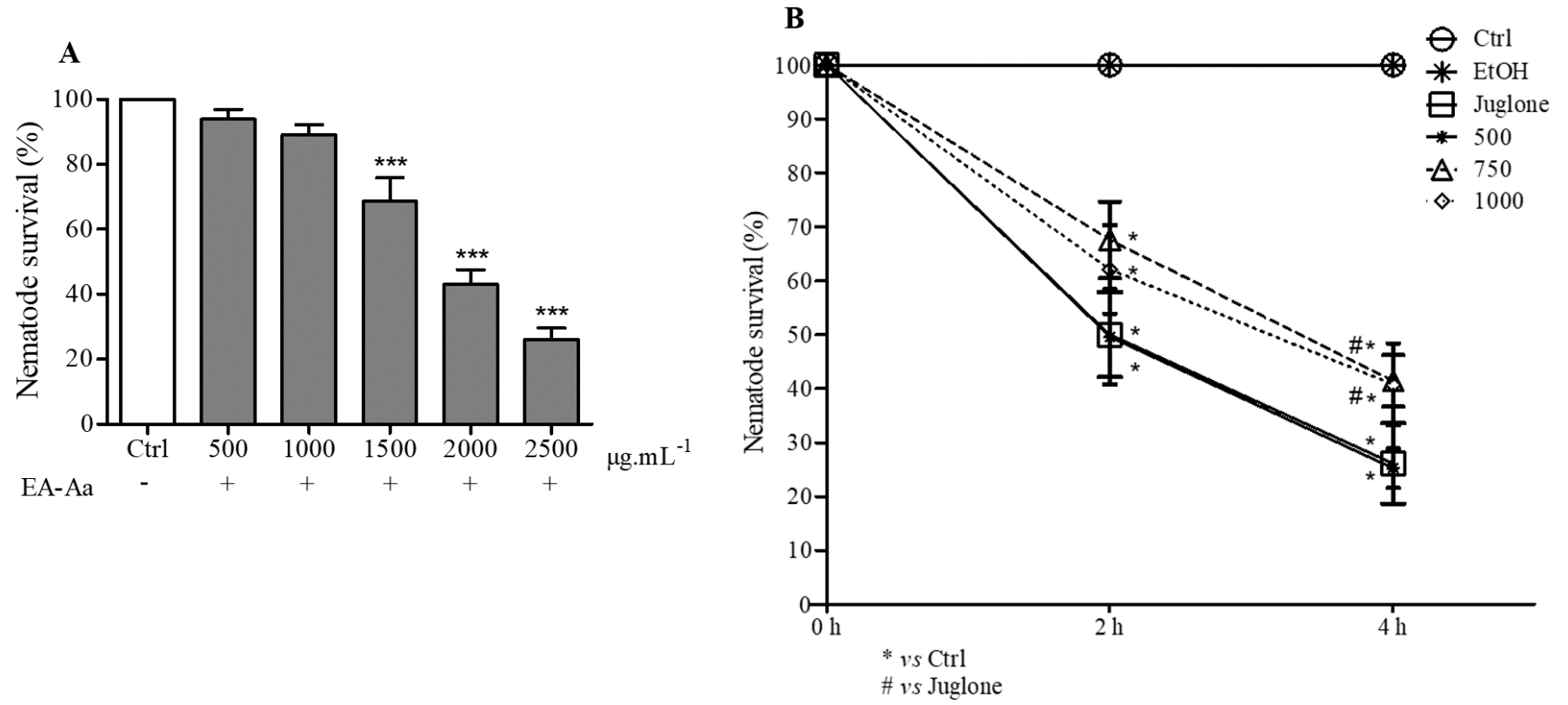


Figure 6



6. CONCLUSÃO GERAL

O presente estudo evidenciou compostos químicos importantes nas folhas de *Acrocomia aculeata*, como os ácidos cafeico, ferrúlico, quercetina e rutina, para os quais tem sido descritos diversos efeitos biológicos. A atividade antioxidante direta das folhas de *A. aculeata* foi confirmada nas macromoléculas, proteínas, DNA e lipídios, além dos diferentes ensaios *in vitro*, químicos e celulares apresentarem a ativação da via Sirt1/Nrf2. Nos ensaios *in vivo*, foi confirmada a efetividade da ação antioxidante em modelo de estresse oxidativo, aumentando a viabilidade de animais nessa condição. Assim, adicionalmente a baixa toxicidade apresentada no modelo *in vivo*, o potencial farmacológico apresentado estimula novos estudos para o desenvolvimento de produtos à base das folhas de *A. aculeata*, para serem utilizados tanto para a prevenção quanto para o tratamento de doenças associadas ao estresse oxidativo.



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Caracterização química e avaliação do potencial farmacológico de *Acrocomia aculeata*

Pesquisador: Tamaeh Monteiro Alfredo

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 50344215.2.0000.5160

Instituição Proponente: Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.402.556

Apresentação do Projeto:

Trata-se de uma pesquisa envolvendo o estudo dos potenciais terapêuticos e farmacológicos da palmeira bocaiúva (nome científico "*Acrocomia aculeata*"), nativa do cerrado e encontrada em quantidade considerável na região de Dourados. O objetivo deste estudo é avaliar composição química e o potencial farmacológico das folhas da referida planta. Para isso, as folhas obtidas serão limpas, saturadas, secas, trituradas e submetidas à extração aquosa, etanólica e metanólica. Após o processo serão avaliados compostos fenólicos e flavonóides dos

extratos. A avaliação se dará "in vitro", com sangue coletado de voluntários, será avaliado o potencial antioxidante dos extratos. Os dados gerados poderão subsidiar a elaboração de produtos nutracêuticos e farmacológicos, além de estudos acadêmicos (em nível de iniciação científica, trabalho de conclusão de curso e pós-graduação) que contribuam para a valorização da espécie e conservação da biodiversidade do Centro Oeste.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar a composição química e o potencial farmacológico dos extratos das folhas de *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lod in vitro. Como objetivos indiretos está a valorização do potencial farmacológico do Cerrado e da diversidade biológica do Centro-Oeste, o que pode fomentar políticas de proteção à esses biomas.

Endereço: Rua Melvin Jones, 940

Bairro: Jardim América

CEP: 79.803-010

UF: MS

Município: DOURADOS

Telefone: (67)3410-2853

E-mail: cep@ufgd.edu.br

Continuação do Parecer: 1.402.556

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos envolvendo seres humanos podem ser classificados como de nível baixo, já que a única exposição humana aos procedimentos é o da extração do sangue que será utilizado para os processos de avaliação. Os riscos estão bem esclarecidos no projeto. Os benefícios são claros e objetivamente apontados.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

É uma pesquisa interessante e que acarreta em benefícios diretos e indiretos e com ganhos que vão desde o avanço nos conhecimentos científicos até a preocupação com a proteção ambiental, além de melhorar o bem estar humano.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O Termo está claro e contém os itens obrigatórios, deixa claro a possibilidade dos participantes desistirem do processo a qualquer momento, bem como a previsão de que qualquer eventual dano pode ser indenizado. O documento deixa claro que não há ônus para o voluntário.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto se encontra adequado e atende aos requisitos estabelecidos. O parecer é pela aprovação do projeto.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_555379.pdf	12/01/2016 00:54:14		Aceito
Outros	00339.PDF	12/01/2016 00:53:53	Tamaeh Monteiro Alfredo	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.doc	04/01/2016 12:27:27	Tamaeh Monteiro Alfredo	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO.docx	04/01/2016 12:24:18	Tamaeh Monteiro Alfredo	Aceito
Folha de Rosto	CEP.pdf	14/10/2015 12:05:34	Tamaeh Monteiro Alfredo	Aceito

Endereço: Rua Melvin Jones, 940

Bairro: Jardim América

CEP: 79.803-010

UF: MS **Município:** DOURADOS

Telefone: (67)3410-2853

E-mail: cep@ufgd.edu.br



Continuação do Parecer: 1.402.556

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

DOURADOS, 03 de Fevereiro de 2016

Assinado por:

**Paulo Roberto dos Santos Ferreira
(Coordenador)**

Endereço: Rua Melvin Jones, 940

Bairro: Jardim América

UF: MS

Município: DOURADOS

Telefone: (67)3410-2853

CEP: 79.803-010

E-mail: cep@ufgd.edu.br