



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
APLICADAS À SAÚDE

JÚLIA SANTANA LISBOA

EFEITOS ANTIOXIDANTES DOS COMPOSTOS FENÓLICOS
E INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE
***Zingiber officinale* EM *Caenorhabditis elegans*: revisão sistemática**
e análise *in vivo*.

Lagarto-SE

2024

JÚLIA SANTANA LISBOA

**EFEITOS ANTIOXIDANTES DOS COMPOSTOS FENÓLICOS
E INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE
Zingiber officinale EM *Caenorhabditis elegans*: revisão sistemática
e análise *in vivo*.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde (PPGCAS) da Universidade Federal de Sergipe (UFS) como requisito à obtenção do grau de Mestre em Ciências Aplicadas à Saúde.

Orientadora: Prof^a Dr^a Adriana Gibara Guimarães

Coorientador: Prof^o Dr^o James Almada da Silva

Lagarto-SE

2024

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO CAMPUS DE LAGARTO UNIVERSIDADE
FEDERAL DE SERGIPE**

Lisboa, Júlia Santana
L769e Efeitos antioxidantes dos compostos fenólicos e investigação do
potencial antioxidante de *Zingiber officinale* em *Caenorhabditis*
elegans: revisão sistemática e análise in vivo / Júlia Santana Lisboa
; orientadora Adriana Gibara Guimarães. – Lagarto, SE, 2024.
72f. ; il.

Dissertação (mestrado em Ciências Aplicadas à Saúde) –
Universidade Federal de Sergipe, 2024.

1. Gengibre. 2. Antioxidantes. 3. Nematoda. 4. Plantas
medicinais. 5. Fenóis. I. Guimarães, Adriana Gibara, orient. II.
Título.

CDU 615

CRB5/ 1810

JÚLIA SANTANA LISBOA

**EFEITOS ANTIOXIDANTES DOS COMPOSTOS FENÓLICOS
E INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE
Zingiber officinale EM *Caenorhabditis elegans*: revisão sistemática
e análise *in vivo*.**

Dissertação apresentada à Banca Examinadora de Defesa do Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde da Universidade Federal de Sergipe como requisito à obtenção do grau de Mestre em Ciências Aplicadas à Saúde.

Aprovada em: ____/____/____

1º Examinador: Profa. Dra. Raphaela Barroso Guedes

2º Examinador: Profa. Dra. Taís Cristina Unfer

3º Examinador: Profa. Dra. Grace Anne Azevedo Dória

PARECER

AGRADECIMENTOS

Ao Ser Divino, pelo dom da vida e por ser minha força diária e nunca ter me abandonado e nem soltado minhas mãos nos diversos momentos em que pensei em desistir. Gratidão meu bom deus por todas as bênçãos derramadas no meu caminho. Sem ti, nada seria.

A minha mãe, Telma Santana, por ser a melhor pessoa da face da terra, a você devo minha vida e tudo que sou. Gratidão por ser minha maior incentivadora, minha força diária, meu alicerce. Obrigada por sempre acreditar em mim, até mesmo nos momentos que eu duvidei da minha capacidade.

Ao meu pai, Edson Barbosa, por ser minha inspiração de força e persistência. Ver o seu caminhar me motiva a ir além. Gratidão pelas oportunidades oferecidas e por cada conselho dito nesse trilhar. Você é meu exemplo de vitória.

Aos meus avós, Antônio, Edite e Valdice, por todo ensinamento, acolhimento e carinho ao longo da vida. E uma gratidão em especial a Zeinha (*in memoriam*), sinônimo de força e amor, sempre sendo meu grande herói e guardião, onde quer que eu esteja. Hoje sua neta é mestre, meu avô.

A toda minha família, tios (as) e primos (as), por todo apoio, presença, amor e torcida, é por meio de vocês que me renovo e obtenho forças para continuar. “Ohana quer dizer família. Família quer dizer nunca abandonar ou esquecer.” Vocês sempre estarão comigo.

Aos meus sobrinhos de coração e afilhada, por me fazerem querer ser melhor a cada dia, pelo ensinamento diário e por alegrarem meus dias com o amor mais puro de criança. A tia de vocês só quer ser um ser humano que sirva de exemplo e inspiração para vocês.

Ao meu companheiro, Gabriel Silva, por ser um parceiro excepcional. Nesses últimos dois anos nada fáceis, fomos parceiros de verdade, dividimos as aflições, as responsabilidades, a casa, a vida e os sonhos. E em meio às turbulências você me acalmou, me levantou nas várias vezes que cai, enxugou cada lágrima, me tirou diversos sorrisos e aguentou cada surto. Gratidão por sempre me incentivar a ir além e acreditar no meu potencial. Somos uma bela dupla.

A minha orientadora, Profa. Dra. Adriana Gibara, por ter aberto essa grande oportunidade na minha vida, desde o início da graduação. Gratidão por ter me acolhido em seu grupo de pesquisa. Obrigada por toda paciência, aprendizado transmitido e por ter me ensinado a ser melhor. Você é um ser humano ímpar e essencial nessa minha jornada.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. James Almada da Silva, por ter cedido o seu laboratório, por seu comprometimento, disponibilidade, apoio e contribuições nesta pesquisa. Gratidão por ser um ser humano incrível, que além de professor, é amigo.

Ao LAFACE, Laboratório de Farmacologia Clínica e Experimental, por ter sido minha segunda casa nos últimos dois anos e por ter me ensinado tanto.

Aos laboratórios, NUPPNAF, LABIC e de Enzimologia, pela parceira e pela disponibilidade proporcionando a execução dos experimentos. E aos alunos que os constituem por serem sempre solícitos e pacientes.

Aos alunos do grupo de pesquisa, em especial a Vitória, Pablo, Akleyton e Annamel, por toda ajuda durante os experimentos e por toda a partilha durante essa trajetória.

Aos meus bons amigos, em especial Jamille e Mariana, por escutarem todas lamentações, por me apoiarem e, muitas vezes, me acalentarem com palavras de carinho. Vocês são essenciais em minha vida e, com certeza, tornaram este caminho mais leve.

A todos que contribuíram de forma direta e indireta para a realização deste trabalho, meu muito obrigada!

*“You’ll never know how strong you are until being
strong is the only choice you have.”
(Johnny Depp).*

RESUMO

Os produtos naturais estão sendo cada vez mais estudados para o tratamento e prevenção de diferentes patologias, a exemplo daquelas que envolvem desequilíbrio redox. Neste contexto, destaca-se o *Zingiber officinale* (gengibre), uma espécie vegetal amplamente utilizada ao redor do mundo e inserida na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde, devido ao seu alto potencial farmacológico (atividade antioxidante, anti-inflamatória e antiemética já descritas). Estas propriedades têm sido associadas à rica composição fitoquímica desta espécie, sobretudo do seu rizoma, o qual é constituído por compostos bioativos, destacando os gingeróis. Tradicionalmente, os estudos pré-clínicos destes produtos são realizados com roedores. Entretanto, considerando a necessidade de atendermos aos princípios bioéticos dos 3Rs, faz-se necessária a utilização de métodos alternativos para a realização de estudos experimentais. Assim, o *Caenorhabditis elegans* tem demonstrado ser uma poderosa ferramenta para a realização de diversos estudos, uma vez que apresenta genes e vias de sinalização semelhantes aos dos humanos. Com isso, o objetivo deste projeto é compilar evidências do efeito antioxidante dos compostos fenólicos e avaliar a atividade antioxidante de *Z. officinale* em *C. elegans*. Na revisão sistemática, foram selecionados 37 estudos testando a atividade antioxidante em compostos fenólicos utilizando esse modelo alternativo. Dentre os estudos, 61 substâncias foram testadas, e 46 mostraram-se promissoras, com redução de EROS e/ou aumento das enzimas antioxidantes; e o estado larval mais mencionado foi L4, com exposição crônica. Os testes para determinar a atividade antioxidante dos compostos foram: de determinação das espécies reativas de oxigênio (EROs), quantificação das enzimas antioxidante superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GSH) e Malonaldeído (MDA). Na parte experimental, o gengibre foi adquirido em feira livre para obtenção do extrato bruto por partição líquido-líquido, da fração rica em gingeróis por cromatografia em camada delgada e do 6-gingerol por cromatografia líquida de alta eficiência acoplado a espectrômetro de massas e ressonância magnética nuclear. Para avaliação da atividade antioxidante, os *C. elegans* foram expostos a fração rica em gingeróis (0,25, 0,5, 1, 2 e 4 mg/mL) e submetidos a determinação da taxa de sobrevivência, estresse térmico e geração de EROS. Os vermes sobreviveram em todas as concentrações da fração rica em gingeróis pré-definidos. Além disso, observou-se maior resistência ao estresse térmico e uma diminuição de EROS nos vermes que foram expostos ao substrato em comparação ao grupo controle, sem exposição. Dessa maneira, os resultados obtidos sugerem que os compostos fenólicos apresentam atividade antioxidante nos *C. elegans*, e consequentemente, o gengibre também possui tal atividade. Assim, os compostos fenólicos e os gingeróis podem influenciar/melhorar as diversas patologias que estão relacionadas ao desequilíbrio redox.

Descritores: *Zingiber officinale*; efeito antioxidante; *Caenorhabditis elegans*.

ABSTRACT

Natural products are increasingly used for the treatment and prevention of various pathologies, such as situations involving redox imbalance. In this context, *Zingiber officinale* (ginger) stands out, a plant species widely used throughout the world and included in National List of Medicinal Plants of Interest to the Unified Health System, due to its high pharmacological potential (antioxidant, anti-inflammatory, and antiemetic activities have already been described). These properties have been associated with the rich phytochemical composition of this species, especially its rhizome, which is composed of bioactive compounds, notably gingerols. Traditionally, preclinical studies of these products are conducted with rodents. However, in consideration of the need to adhere to the bioethical principles of the 3Rs, it is essential to explore alternative methods for experimental studies. Thus, *Caenorhabditis elegans* has proven to be a powerful tool for conducting various studies, given its genes and signaling pathways that are similar to those of humans. Therefore, the objective of this project is to compile evidence of the antioxidant effect of phenolic compounds and evaluate the antioxidant activity of *Zingiber officinale* in *C. elegans*. In the systematic review, 37 studies were selected testing the antioxidant activity of phenolic compounds using this alternative model. Among the studies, 61 substances were tested, and 46 showed promise, with a reduction in ROS and/or an increase in antioxidant enzymes; and the most mentioned larval state was L4, with chronic exposure. The tests to determine the antioxidant activity of the compounds were: determination of reactive oxygen species (ROS), quantification of the antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GSH) and malonaldehyde (MDA). In the experimental part, ginger was purchased at a street market to obtain the crude extract through liquid-liquid partition, the fraction rich in gingerols was isolated using thin-layer chromatography (TLC), and 6-gingerol was separated using high-performance liquid chromatography coupled to a mass spectrometer (HPLC/MS). To evaluate antioxidant activity, *Caenorhabditis elegans* were exposed to a fraction rich in gingerols (0,25, 0,5, 1, 2, and 4 mg/mL) and subjected to the determination of survival rate, thermal stress response, and ROS generation. The worms exhibited survival in all predefined concentrations of the gingerol-rich fraction. Furthermore, greater resistance to thermal stress and a decrease in ROS were observed in the worms that were exposed to the substrate compared to the control group without exposure. Thus, the results obtained suggest that phenolic compounds exhibit antioxidant activity in *C. elegans*, and consequently, ginger also possesses such activity. Consequently, phenolic compounds and gingerols can influence or improve various pathologies related to redox imbalance.

Keywords: *Zingiber officinale*; antioxidant effect; *Caenorhabditis elegans*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Parte aérea da planta herbácea <i>Zingiber officinale</i> (A) e o seu rizoma (B).	16
Figura 2: Estruturas químicas de alguns constituintes encontrados no gengibre.	17
Figura 3: Esquema simplificado ilustrando o mecanismo de geração de EROs no interior das mitocôndrias, incluindo radical hidroxil ($\bullet\text{OH}$), ânion superóxido ($\text{O}_2\bullet^-$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2); e ação dos antioxidantes enzimáticos endógenos em organismos vivos. SOD: superóxido dismutase; CAT: catalase; GPx: glutathione peroxidase; GR: glutathione reductase; GSH: glutathione reduzida; GSSG: glutathione oxidada.	20
Figura 4: Ciclo de vida do <i>C. elegans</i> a 20 °C na fase embrionária, nos estágios larvais (L1-L 4) e na fase adulta.	23
Figura 5: Processo de separação através do funil de separação (1); rotaevaporação (2) e obtenção dos extratos brutos (3).	31
Figura 6: Processo de obtenção do extrato, partição e composto puro.	32
Figura 7: Procedimento de lavagem da placa durante o protocolo de sincronização. Adição de água destilada autoclavada (1), inclinação para lavagem da placa, com o auxílio de uma pipeta Pasteur (2), retirada do líquido da extremidade inferior e pipetando na extremidade superior (3). Coleta do líquido e transferência para um tubo cônico de 15 mL (4). Fonte: próprio autor (2023).	34
Figura 8: Etapas do procedimento de sincronização e exposição do <i>C. elegans</i> ao substrato.	34
<i>Figura 9: Qualidade metodológica dos estudos selecionados.</i>	42
Figura 10: Placa cromatográfica das frações obtidas do extrato do tubérculo do gengibre após cromatografia líquida em coluna analítica. P = padrão; 2 e 3 = frações ricas de gingeróis.	49
Figura 11: Cromatogramas analíticos da FEG (em preto) e dos padrões [6]-gingerol, [8]-gingerol e [10]-gingerol (em vermelho) obtidos por HPLC com as seguintes condições: coluna C18 Shim-Pack (4,6 x 250 mm, 10 μ), vazão de 1 mL/min, detecção por UV a 280 nm, fase móvel MeOH/H ₂ O (75/25).	50
Figura 12: Cromatograma da análise em ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN 1H) da FEG.	51
Figura 13: <i>C. elegans</i> após 3 dias de repique, prontos para sincronização (1). Ovos após sincronização (2). Vermes no estágio larval L1, após 12 horas da sincronização (3).	52
Figura 14: Número de <i>C. elegans</i> sobreviventes após a exposição ao estresse térmico. Branco = tampão M9; DMSO 1%; FEG 0,25 mg/mL ; FEG 0,5 mg/mL; FEG 1 mg/mL; FEG 2 mg/mL; FEG 4 mg/mL.	54

Figura 15: Efeitos da fração enriquecida em gíngerois sobre os níveis intracelulares de EROs de nematoides N2 selvagens. Branco = tampão M9; DMSO1%; FEG 0,25 mg/mL; FEG 0,5mg/mL; FEG 1mg/mL.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Vocabulário estruturado utilizado para determinação da estratégia de busca.	27
Tabela 2. Estratégia de busca utilizadas nas bases de dados PubMed, Scopus, Science Direct e Embase.	27
Tabela 3. Critérios de inclusão e exclusão para os artigos selecionados.	29
Tabela 4: Fluxograma da seleção das publicações.	38
Tabela 5: Descrição detalhada dos estudos pré-clínicos do efeito antioxidante de composto fenólico em <i>C. elegans</i> , incluídos na revisão sistemática.	40

LISTA DE SIGLAS

SOD – Superóxido Dismutase

CAT – Catalase

CCD – Cromatografia em Camada Delgada

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

EROS – Espécies Reativas de Oxigênio

FEG – Fração enriquecida de gingeróis

NGM – *Nematode growth médium*

PRISMA - *Preferred Reporting Items for Systematic Reviews Meta-Analyses*

MeSH – *Medical Subject Headings*

DeCS – Descritores em Saúde

MDA – Malonaldeído

GST/GSH – Glutathione-S-transferase

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1	GENGIBRE E GINGEROIS	16
2.2	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	18
2.3	NOVOS MODELOS EXPERIMENTAIS:	21
3	OBJETIVOS:	25
3.1	GERAL	25
3.2	ESPECÍFICOS	25
4	MATERIAL E MÉTODO	25
4.1	REVISÃO SISTEMÁTICA	25
4.1.1	Questão focalizada	25
4.1.2	Protocolo e registo	26
4.1.3	Estratégia PICOS	26
4.1.4	Estratégia de busca e busca na literatura	26
4.1.5	Seleção dos estudos e critérios de elegibilidade	28
4.1.6	Extração de dados e avaliação do risco de viés	29
4.2	ESTUDO EXPERIMENTAL	30
4.2.1	Tipo de estudo	30
4.2.2	Obtenção da matéria prima vegetal	30
4.2.3	Obtenção do extrato do gengibre	30
4.2.3.1	Métodos Cromatográficos	32
4.2.4	Cultura, sincronização e exposição do	32
4.2.4.1	Grupos experimentais	35
4.2.4.2	Exposição ao extrato	35
4.2.5	Taxa de sobrevivência	36
4.2.6	Estresse térmico	36

4.2.7	Atividade antioxidante	36
4.2.7.1	Quantificação dos EROS	36
4.2.8	Análise estatística	37
5	RESULTADOS	37
5.1	REVISÃO SISTEMÁTICA	37
5.1.1.	Seleção dos artigos e extração dos dados	37
5.1.2.	Estudos selecionados	38
5.1.3.	Compostos fenólicos utilizados e método de extração	39
5.1.4.	Exposição e estágio larval	40
5.1.5.	Atividades antioxidantes realizadas	40
5.1.6.	Risco de viés dos estudos	41
5.2	ESTUDO EXPERIMENTAL	49
5.2.1	Obtenção da fração enriquecida de gingeróis	49
5.3	MANUTENÇÃO E SINCRONIZAÇÃO DOS	52
5.4	TAXA DE SOBREVIVÊNCIA	52
5.5	TOLERÂNCIA AO ESTRESSE TÉRMICO	53
5.6	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	54
6	DISCUSSÃO	55
7	CONCLUSÕES	58
8	PERSPECTIVAS	58
9	REFERENCIAS	59
	ANEXO I	72

1 INTRODUÇÃO

Os produtos naturais constituem uma importante fonte de compostos bioativos e estão sendo cada vez mais estudados para o tratamento e prevenção de diferentes condições patológicas (Ali et al., 2020), a exemplo do estresse oxidativo (Swain; Panda; Luyten, 2020). Neste contexto, destaca-se a *Zingiber officinale* (Zingiberaceae), uma planta herbácea com rizoma aromático e picante conhecido como gengibre (Lemos, 2010; Palmeiras et al., 2019), sendo utilizado na culinária, na indústria de cosmético, alimentícia e farmacêutica.

Os registros da utilização popular do gengibre datam de cerca de 2.000 anos atrás, para o tratamento de resfriados, vômitos, dores de estômago e dores abdominais (Zhang et al., 2020). Dado o seu potencial farmacológico, existem formulações fitoterápicas já comercializadas (Gengimin[®], Zintona[®]) para o controle de náuseas e vômitos; e desde 2009 a *Zingiber officinale* está inserida entre as 71 espécies da Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde – RENISUS (Brasil, 2009).

As propriedades farmacológicas de produtos à base de gengibre têm sido inclusive demonstradas em ensaios clínicos randomizados, com destaque para o controle dos efeitos fisiológicos induzidos pela quimioterapia (Panahi et al., 2012; Montazeri et al., 2013; Arslan; Ozdemir, 2015; Arruda et al., 2019), bem como para o combate do desequilíbrio redox associado ao câncer (Karimi; Roshan, 2013; Marmitt et al., 2020). Ademais, estudos recentes têm demonstrado o efeito do extrato de compostos extraídos do gengibre no tratamento e prevenção da artrite, dores agudas, neuropáticas e crônicas associadas a doenças inflamatórias e ao envelhecimento (Funk et al., 2016; Del Grossi et al., 2017; Mata-Bermudez et al., 2018; Borgonetti et al., 2020; Paixão; Carvalho, 2021; Ozkur et al., 2022).

Todos esses efeitos farmacológicos têm sido atribuídos à metabólitos secundários bioativos voláteis presentes no óleo essencial extraído da *Z. officinale* como canfeno, curcuneno e zingiberol. Além de componentes químicos não voláteis presentes em extratos dessa planta, com destaque dos gingeróis (Wang et al., 2014; Zhang et al., 2020). Dentre estes últimos, o 6-gingerol é encontrado em maior concentração nos rizomas de gengibre frescos (Rai et al., 2006) e possui atividade antipirética, efeitos cardiotônicos e promove a redução da biossíntese de mediadores inflamatórios como prostaglandinas, leucotrienos e citocinas (Suekawa et al., 1984; Kiuch et al., 1992; Ozkur et al., 2022).

Uma ação que merece destaque é a atividade antioxidante, a qual no estresse oxidativo, reequilibra os sistemas pró e antioxidante (Barreiros; David; David, 2006; Schmidt, 2019) por

meio da sua capacidade de doar elétrons e atuar como eliminador de radicais livres (Wang et al., 2014). Essa capacidade de oxidar ou alquilar grupos tióis ou de quelar íons metálicos (Kluth et al., 2007), bem como a de modular a atividade de enzimas antioxidantes (Chakraborty et al., 2012), justifica seu uso como agente antioxidante (Wang et al., 2014), o qual contribui para o envelhecimento e diversas patologias. Dessa forma, o gengibre tem sido estudado, *in vitro*, *in vivo* e em humanos, devido a seu alto poder antioxidante (Si et al., 2018; Sahardi; Makpol, 2019; Song et al., 2023).

Grande parte dos estudos, entretanto, foram desenvolvidos utilizando animais de experimentação. Porém, eticamente o emprego de animais tem sido discutido devido ao sofrimento e necessidade de um grande quantitativo de sujeitos para as pesquisas. Assim, a tendência mundial para os experimentos é aplicar o princípio bioético conhecido como 3R's (*Reduction, Refinement, Replacement*), o qual busca diminuir o número de animais utilizados, minimizar a dor e, o desconforto por meio do refinamento dos protocolos, além de propor alternativas para a substituição dos testes *in vivo* (Cazarin; Correa; Zambrone, 2004).

Atualmente, o *Caenorhabditis elegans*, um nematoide descoberto em 1900, tem demonstrado ser uma alternativa para estudos farmacológicos e toxicológicos, uma vez que apresenta genes e vias de sinalização semelhantes aos dos humanos, sobretudo quanto ao sistema nervoso (Amira et al., 2016; Zwirchmayr et al., 2020). O verme adulto consiste em 959 células, das quais 302 são neurônios, o que torna este modelo atrativo para estudar a nocicepção em níveis fisiológicos, além de apresentar um comportamento nocifensivo reprodutível, envolvendo uma reversão e mudança de direção para longe dos estímulos nocivos (Wittenburg; Baumeister, 1999).

Assim, *C. elegans* é considerado um modelo adequado para estudos envolvendo as ciências biológicas devido às inúmeras vantagens que esse modelo apresenta, tais como sua facilidade de manipulação, seu ciclo de vida relativamente curto e baixo custo para manutenção (Amira et al., 2016; Corsi; Wightman; Chalfie, 2015; Pun et al., 2010). Dessa forma, o objetivo desse trabalho é compilar evidências do efeito antioxidante dos compostos fenólicos e avaliar a atividade antioxidante da fração rica em gingeróis. Além disso, em nosso estudo foi utilizado, em um ensaio experimental *in vivo*, o *C. elegans*, atendendo às recomendações do princípio dos 3Rs.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 GENGIBRE E GINGERÓIS

Zingiber officinale Rosc., conhecida como gengibre, é uma planta perene e herbácea, pertencente à família Zingiberaceae (Ozkur et al., 2022), que possui um rizoma, ou seja, um caule subterrâneo, que é a parte comercial da planta, conforme Figura 1 (Varella, 2020). Nativa do nordeste da Índia, é amplamente cultivada em cerca de 50 países em todo o mundo, localizados principalmente em regiões tropicais e subtropicais (Zhang et al., 2020).

Figura 1: Parte aérea da planta herbácea *Zingiber officinale* (A) e o seu rizoma (B).



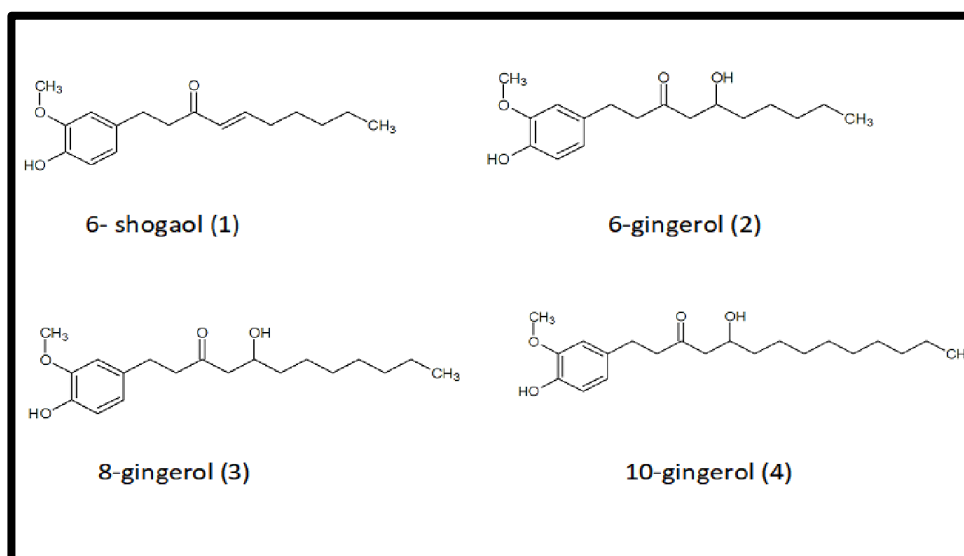
Com origem asiática, essa planta medicinal possui uma longa história de cultivo (Varella, 2020), chegando ao Brasil através dos portugueses no período da colonização, sendo cultivada predominantemente em regiões quentes e úmidas. Nesse país, tem-se o plantio desse vegetal desde o Amazonas até o Paraná (Correa, 1994; Pereira; Bezerra; Rodrigues, 2012). Recentemente, o cultivo do gengibre tem despertado o interesse do setor agrícola nacional, com o início da exportação para Europa e os Estados Unidos em 2020 (Varella, 2020).

O rizoma de gengibre possui um sabor pungente, sendo uma das especiarias alimentares mais populares, além de ser muito reconhecido como fitoterápico chinês tradicional. Até o momento, cerca de 160 substâncias foram isoladas e identificadas no gengibre, dentre elas tem-se os metabólitos secundários bioativos voláteis, como canfeno, curcuneno e zingiberol; e os componentes químicos não voláteis presentes em extratos, com destaque dos gingeróis. Além dos diarilheptanoides, fenilalcanoides, sulfonatos, esteroides e os terpenóides (Zhang et al., 2020; Wang et al., 2014).

Entretanto, vale destacar que os componentes químicos responsáveis pelo caráter pungente ou picante do gengibre, são os gingeróis e o shogaol (Grégio, 2006). Os gingeróis

correspondem aos compostos que possuem substâncias homólogas, diferenciando entre si devido ao comprimento de sua cadeia alquílica, dividindo-se em: 6-gingerol, 8-gingerol e 10-gingerol, os quais contém 10, 12 e 14 carbonos em suas cadeias alquílicas não ramificadas, respectivamente (Figura 2). Já o shogaol é um produto da quebra de uma hidroxila (reação de eliminação) do 6-gingerol, produzido durante a secagem, e é duas vezes mais pungente que os gingeróis (Negrelle; Elpo; Rucker, 2005).

Figura 2: Estruturas químicas de alguns constituintes encontrados no gengibre.



Fonte: próprio autor (2023).

Os compostos ativos do gengibre estão criticamente implicados em diferentes atividades biológicas, como atividades antiinflamatórias, antitumorais, antimicrobianas e antioxidantes (Ozkur et al., 2022). Dentre estes compostos, o 6-gingerol é encontrado em maior concentração nos rizomas de gengibre frescos (Rai et al., 2006) e possui atividade antipirética, efeitos cardiotônicos, e anti-inflamatórios por ser capaz de reduzir a biossíntese de mediadores inflamatórios como prostaglandinas, leucotrienos e citocinas (Suekawa et al., 1984; Kiuch et al., 1992).

Um estudo de Manalo e colaboradores (2022) mencionou a ação dos extratos do gengibre (GRE) nos receptores GABAérgico em *C. elegans*. Relatou que em 500 e 1.000 µg/ml agiu como depressor agudo de reversões, voltas ômega – contorção corporal –, e sensações a toques leves e no nariz. E acrescentou que, nas mesmas concentrações também aumentou a recuperação dos nematóides em 40 minutos, sugerindo uma melhora na tolerância ao estresse oxidativo e uma redução na abstinência, a qual compromete a locomoção (Manalo et al., 2022).

Tem sido sugerido que o gengibre pode auxiliar na promoção do envelhecimento saudável, reduzir a morbidade e prolongar a qualidade de vida (Ozkur et al., 2022). Diversos estudos têm demonstrado que óleos e extratos de gengibre apresentam ação inibitória sobre bactérias gram positivas e gram negativas (Majolo et al., 2014; Cunha et al., 2017; Cutrim et al., 2019). Como também, são capazes de inibir o metabolismo dos carboidratos, prevenindo a hiperglicemia ou a perpetuação da resistência à insulina (Carvalho et al., 2021). Além disso, efeito analgésico foi observada em modelos animais para dor aguda (Young et al., 2005) e dor neuropática induzida pela lesão do nervo ciático (Mata-Bermudez et al., 2018; Gauthier; Beaudry; Vachon, 2012), possivelmente pela inibição de correntes de Na^+ (Hitomi et al., 2016). Entretanto, sabe-se pouco sobre o mecanismo de ação detalhado deste composto.

Outra propriedade farmacológica do gengibre é sua capacidade antioxidante devido à presença de compostos capazes de doar os elétrons livres e atuar como eliminador de radicais livres (Wang et al., 2014) e modulares das enzimas antioxidantes, possuindo a capacidade de oxidar ou alquilar grupos tióis ou de quelar íons metais (Kluth et al., 2007; Chakraborty et al., 2012). Um estudo, *in vitro*, observou que os compostos puros de 6-gingerol, 8-gingerol, 10-gingerol e 6-shogaol foram capazes de inibir a oxidação, entretanto o 10-gingerol e 6-shogaol possui uma atividade antioxidante maior quando comparado aos 6-gingerol e 8-gingerol a 60°C, nas concentrações de 100, 200 e 400 ppm, sendo tais propriedades antioxidantes advindas da presença de grupos hidroxila e cadeias laterais contidas na estrutura química desses compostos (Si et al., 2018; Sahardi; Makpol, 2019).

Além disso, Yusof e Abdul-Aziz (2005) relatou que o extrato de gengibre tem um enorme potencial como um antioxidante, semelhante as enzimas antioxidantes: superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) e catalase (CAT), referente a eliminação de resíduos livres acumulados (EROs e peróxido de hidrogênio - H_2O_2) em uma linha celular de hepatoma. Tendo em vista que, em seu estudo foi possível observar que 200 µg/ml e 500 µg/ml do extrato de gengibre alterou a produção do quantitativo das enzimas antioxidantes nas células de linhagem cancerígenas (Yusof; Abdul-aziz, 2005; Sahardi; Makpol, 2019).

2.2 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Para determinar a atividade antioxidante de um extrato ou substância, busca-se avaliar não apenas o potencial antioxidante *in vitro* e exógeno, mas também como comportam-se, diante dele (a), as defesas enzimáticas e não enzimáticas endógenas, bem como a redução de espécies reativas de oxigênio (EROs) e/ou dano celular, *ex vivo* ou *in vivo*. Vale ressaltar que,

as EROs e as enzimas antioxidantes são produzidas no interior das células dos organismos vivos de forma natural, durante o metabolismo aeróbio primário.

Em situações de estresse oxidativo, há uma produção exagerada de EROs ou uma falha no sistema de defesa antioxidante, ocorrendo um desequilíbrio que resulta em dano oxidativo em qualquer componente da estrutura celular (lipídios, proteínas, carboidratos, DNA...) (Barreiros; David; David, 2006). Em resposta, pode-se observar, apoptose irregular de células saudáveis e necrose (Vasconcelos et al., 2007; Ozkur et al., 2022). Assim, EROs e espécies reativas de nitrogênio (ERNs), são subprodutos - altamente reativos - advindos das reações bioquímicas oxidativas das próprias células (Lee et al., 2018).

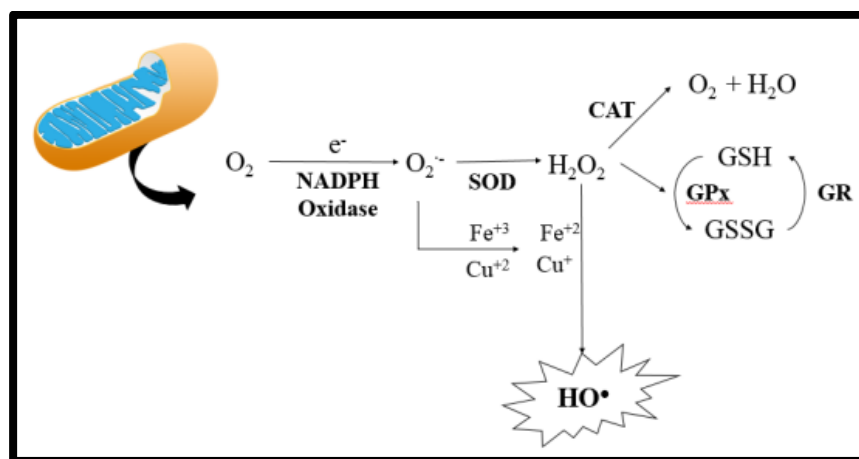
Sabe-se que, EROs e ERNs têm importantes funções biológicas, principalmente nas vias de sinalização dos processos de multiplicação e apoptose celular, também relacionados aos processos de envelhecimento (Alves et al., 2010). Dessa forma, o envelhecimento é uma consequência fisiológica e/ou patológica de reações de espécies químicas altamente reativas, com potencial resultado mutagênico e morte celular; ambas situações aqui relacionadas ao estresse oxidativo (Berlett; Stadtman, 1997; Mekheimer et al., 2012). Assim, não surpreende que, danos oxidativos causados por EROs tenham um papel significativo no desenvolvimento de patologias como as doenças neurodegenerativas, as doenças cardiovasculares e o câncer (Na; Bae, 2011; Singh; Devi; Gollen, 2015).

Dentre as principais EROs, destaca-se: oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), radical ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxil ($^{\bullet}\text{OH}$), peroxil ($\text{RO}_2^{\bullet}$) e alcoxil ($\text{RO}^{\bullet}$). Com o intuito de compensar a produção de EROs, o organismo usufrui das defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas (Figura 3) (Vasconcelos et al., 2007; Schmidt, 2019).

Referente às defesas antioxidantes enzimáticas, tem-se: a superóxido dismutase (SOD), a glutatona peroxidase (GPx) e a catalase (CAT). A SOD possui como principal função a catálise da dismutação do ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) em H_2O_2 e O_2 em meio básico; e se apresenta no citosol e no meio extracelular, na forma de SOD-cobre-zinco (CuZnSOD), enquanto na mitocôndria como SOD-manganês (MnSOD) (Halliwell; Gutteridge, 2007; Schmidt, 2019). A GPx é a enzima responsável pela detoxificação de peróxidos orgânicos e inorgânicos, cuja função depende da glutatona reduzida, que é oxidada em glutatona oxidada. A CAT é uma hemoproteína com função de remover o H_2O_2 gerado intracelularmente e é localizada, principalmente no sangue, medula óssea, mucosas, rins e fígado; entretanto, encontra-se em todo organismo (Vasconcelos et al., 2007).

Já entre as defesas não enzimáticas, têm-se vários compostos que auxiliam o organismo, sendo o principal antioxidante não-enzimático intracelular a glutathiona reduzida (GSH). Este composto tem a função de catalisar a redução do H_2O_2 ou hidroperóxidos orgânicos à água ou aos álcoois correspondentes, respectivamente, dessa forma, agente redutor para que a enzima glutathiona peroxidase (GPx), possuindo uma relevância importante no metabolismo (Brigelius-flohé; Maiorino, 2013).

Figura 3: Esquema simplificado ilustrando o mecanismo de geração de EROs no interior das mitocôndrias, incluindo radical hidroxil ($\bullet\text{OH}$), ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2); e ação dos antioxidantes enzimáticos endógenos em organismos vivos. SOD: superóxido dismutase; CAT: catalase; GPx: glutathiona peroxidase; GR: glutathiona redutase; GSH: glutathiona reduzida; GSSG: glutathiona oxidada.



Fonte: Barreiros, David e David, 2006.

Existem também compostos antioxidantes não enzimáticos exógenos que podem auxiliar o organismo no processo evitar o estresse oxidativo, a exemplo de substâncias consumidas através da dieta, como os compostos fenólicos e os carotenóides. O potencial antioxidante de um determinado composto fenólico varia de acordo com sua estrutura, concentração e o tipo de EROs avaliada. Tendo em vista que, quanto maior o número de grupos hidroxilas (OH) a molécula conter, maior a capacidade antioxidante desse elemento (Barreiros; David; David, 2006).

Assim, diversos extratos fitoquímicos, por serem ricos em compostos fenólicos, apresentam atividade antioxidante, a exemplo do gengibre. Este alimento possui essa atividade farmacológica via eliminação de EROs, como o ânion superóxido, hidroxila e óxido nítrico *in vitro* de maneira dose-dependente (Ozkur et al., 2022). Um estudo em ratos mostrou que o extrato de gengibre (350 mg/kg de peso corporal por via oral 4 dias por semana) consegue

aumentar a produção do quantitativo das enzimas antioxidantes SOD, catalase, glutathione peroxidase (GPx) e glutathione reductase (GR) (Mohamed et al., 2015; Ozkur et al., 2022).

Um estudo de Dugasani e colaboradores (2010) demonstrou a atividade antioxidante dos vários compostos do gengibre, destacando o 6-shogaol. Nesse estudo, notou-se eliminação substancial dos radicais: DPPH, superóxido e hidroxila utilizando os compostos [6]-gingerol, [8]-gingerol, [10]-gingerol e [6]-shogaol. Entretanto [6]-shogaol foi o composto com maior ação, com um valor de IC₅₀ de $8,05 \pm 1,02 \mu\text{M}$, enquanto o [6]-gingerol obteve uma menor resposta, com um valor de IC₅₀ de $26,3 \pm 1,42 \mu\text{M}$. Além disso, a produção de mediadores inflamatórios (NO e PGE₂) foi inibida significativamente e de forma dose-dependente (Gugasani et al., 2010). Assim, observa-se que a modulação dos níveis de EROs e dos sistemas de defesas antioxidantes enzimáticas (SOD, CAT e GPx), podem contribuir para o atraso da senescência (Wang et al., 2014), favorecendo uma melhora na qualidade de vida e no aumento da resistência ao estresse (Lee et al., 2018).

Dessa forma, afirma-se que o gengibre é um composto que protege, previne e pode, até mesmo, tratar muitas doenças relacionadas ao envelhecimento, modulando alvos moleculares envolvidos em sua patogênese (Mohd; Makpol, 2019). Por isso, o *Zingiber Officinale* possui um grande potencial de investigação e exploração do seu alto poder farmacológico, sendo fundamental o estudo mais detalhado para conhecer qual composto possui maior potencial farmacológico; além de ser oportuno o estudo em modelo alternativo *C. Elegans*, por abranger o princípio dos 3Rs, viabilizando a redução do número de animais e seu desconforto.

2.3 NOVOS MODELOS EXPERIMENTAIS: *Caenorhabditis elegans*

Há muitos anos, se discutia sobre os estudos utilizando animais. Em 1959, Russell e Burch publicaram os Princípios das Técnicas Experimentais Humanas, citando o conceito 3R's (*Reduction, Refinement e Replacement*), visando direcionar a ciência no caminho da redução de animais na pesquisa e ensino, criação de métodos e propostas para melhorar as condições estruturais e técnicas dos ensaios, considerando sempre o bem-estar animal (Russell; Burch, 1959; Cazarin; Correa; Zambrone, 2004).

Na década de 80, novas legislações foram criadas e adotadas para identificar e avaliar as obrigações morais e legais dos envolvidos em pesquisas com animais, na busca de aplicar os 3R's nos procedimentos *in vivo*, reconhecendo a importância do uso ético de animais na pesquisa como evidenciado por Russel e Burch. Nos últimos anos, houve um aumento na percepção sobre proteção dos animais e uma maior difusão de experimentos utilizando animais,

o que vem resultando em consideráveis e relevantes preocupações políticas e públicas (Rossi, 2019).

No Brasil, até o ano de 2008 não existia uma lei que regulamentasse especificamente a pesquisa com animais. Entretanto, nesse mesmo ano, a Lei Arouca levou o país a outro patamar, buscando proteger animais utilizados em pesquisa, reforçando os princípios dos 3R's. Essa lei foi proposta em 1995 por Sérgio Arouca, a qual regulamenta o inciso VII do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais e revoga a Lei no 6.638, de 8 de maio de 1979 (Lei de vivissecção) e dá outras providências. Seu artigo 1º afirma sobre a criação e a utilização de animais em atividades de ensino e pesquisa científica, em todo o território nacional, obedecendo aos critérios estabelecidos nesta Lei. Mediante esse movimento, houve a criação do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e a Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) (Dalben; Emmel, 2013; Krell; Lima, 2015).

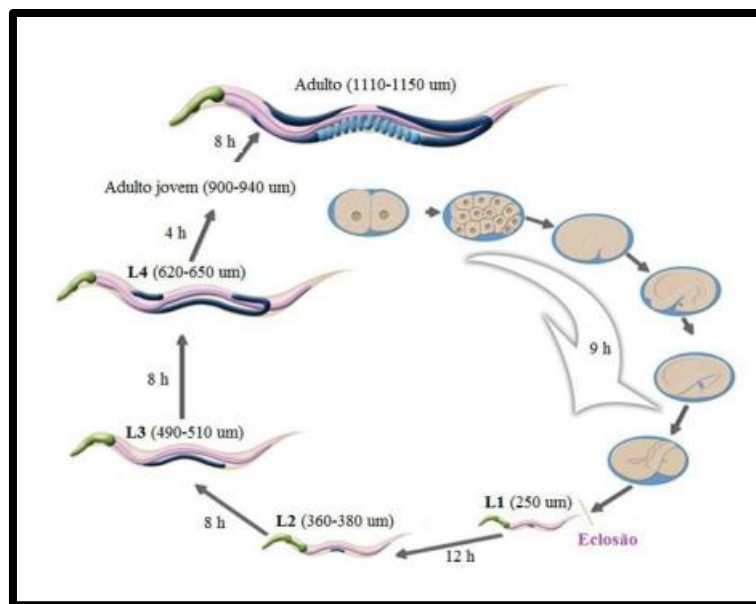
A partir daí, iniciou a busca por outras alternativas de estudos, havendo uma maior abertura de nichos científicos ao uso de animais como modelos alternativos, principalmente os invertebrados (Balls et al., 2000). Os modelos alternativos selecionados variam entre os invertebrados terrestres, como nematoides e microrganismos de água doce e vida marinha, incluindo planárias, crustáceos, moluscos, entre outros. Porém os mais utilizados são a mosca *Drosophila melanogaster* e o verme *Caenorhabditis elegans* (Wilson-Sanders, 2011).

Caenorhabditis elegans é um nematoide da família Rhabditidae, que foi descoberto e isolado por Emili Maupas em 1900 na França, e vários cientistas começaram a estudar, sendo um dos primeiros achados em cogumelos da cidade Bristol, na Inglaterra, em 1951 (Sterken et al., 2015). Entretanto, só a partir de 1966, que este verme foi utilizado como modelo biológico por Sydney Brenner, o qual recebeu o Prêmio Nobel pela identificação dos genes de desenvolvimento de órgãos e a programação da morte celular utilizando *C. elegans*, em 2002 (Brenner, 1988; Corsi; Wightman; Chalfie, 2015).

Esse nematóide é um bacteriófago, ou seja, utilizam células bacterianas como principal fonte alimentar (Corsi; Wightman; Chalfie, 2015). Nos laboratórios é cultivado em placas de petri contendo meios de cultura simples e alimentados geralmente com *Escherichia coli*, o que torna sua manipulação fácil e de baixo custo, quando comparado a outros modelos alternativos. Já na natureza, esse nematoide prospera em frutas podres e caules de plantas, onde se alimentam de bactérias e pequenos eucariotos (Guisnet et al., 2021).

Seu ciclo de vida é muito curto, dura em média 15 dias (Figura 4). A embriogênese leva em média 16 horas, já os ovos levam cerca de 9 horas para eclodirem em larvas. O hermafrodita grávido expelle os ovos, e as larvas se desenvolvem em quatro estágios (L1, L2, L3 e L4), até chegar à fase adulta. Ao final, seu ciclo reprodutivo total é de 3 dias (a 20°C), e cada adulto produz cerca de 300 descendentes. Porém, na ausência de alimento, a larva entra em uma forma mais resistente e não obrigatória, conhecida como Dauer, um estágio de dormência (Hunt, 2017; Nigon; Félix, 2017; Cassada, 1975).

Figura 4: Ciclo de vida do *C. elegans* a 20 °C na fase embrionária, nos estágios larvais (L1-L 4) e na fase adulta.



Fonte: Wormatlas, 2019.

Dessa forma, o uso de *C. elegans* como um modelo alternativo possui diversas vantagens sobre outros modelos de invertebrados. Seu comportamento de auto acasalamento e seu ciclo reprodutivo curto podem ser considerados vantagens por permitir o estabelecimento rápido e tecnicamente simples de coortes grandes, isogênicas e sincronizadas por idade (Porta-de-La-Riva et al., 2012). Além disso, seu ciclo de vida curto, em condições de laboratoriais, tornando-se um modelo atraente para pesquisas sobre envelhecimento (Altun; Hall, 2009).

Várias características tornam o *Caenorhabditis elegans* um dos animais mais utilizados como plataforma para estudos. Dentre elas, destacam-se: seu corpo transparente (Hulme, 2011), composição genética e vias de sinalização semelhantes aos dos humanos, sobretudo quanto ao sistema nervoso (Amira et al., 2016; Zwirchmayr et al., 2020). Em conjunto, tem-se o seu baixo custo na manipulação e cultivo e a simplicidade e tratabilidade em comparação com os modelos clássicos de mamíferos representa uma grande vantagem (O'reilly et al., 2014).

Quanto à sua anatomia, a ancestralidade das células de desenvolvimento e a conectividade neuronal de *C. elegans* estão totalmente mapeadas (Altun; Hall, 2009). Os adultos hermafroditas dessa espécie possuem 959 células somáticas (sendo 302 células nervosas); enquanto os machos adultos possuem 1031 células (sendo 383 células nervosas). Dessa forma, seu sistema nervoso é capaz de distinguir cheiro, gosto, temperatura e toque. Além disso, possui glândulas sensoriais na cabeça e na cauda, o que possibilita analisar as respostas a xenobióticos, como metais tóxicos e fármacos, por meio da quimiorrecepção. E, mesmo não possuindo olhos, estes vermes conseguem responder à luz (Coles, 2006).

Somado a isso, o seu tamanho (1 mm) e a sua grande capacidade de reprodução, a qual gera uma enorme quantidade de descendentes na fecundação, torna sua utilização facilitada com médio/alto rendimento, em conjunto com a necessidade de pouco consumo de materiais e amostra para estudos (O'reilly et al., 2014). Ademais, estes vermes são dotados de semelhanças com os humanos, como autofagia, regulação mitocondrial, apoptose, proteostase, controle de energia, armazenamento de gordura, sistemas de resposta ao estresse e regeneração neuronal (Zwirschmayr et al., 2020).

Outra vantagem vista é em relação à cultura de células, pois o *C. elegans* é considerado um organismo multicelular, permitindo avaliação, de forma sistêmica ou focada em determinado órgão, da ação de compostos ou a associação do verme com bactérias e outros micro-organismos (Hunt, 2017; Nigon; Félix, 2017). Vale destacar que, aproximadamente 80% dos genes de *C. elegans* têm ortólogos do sistema nervoso humano, possuindo então um alto potencial de tradução para descobertas feitas usando esse modelo (Lai, 2000).

O *C. elegans* também é explorado na manipulação genética, permitindo a obtenção de cepas mutantes, através das vias moleculares subjacentes a processos biológicos. Tais vias, quando alteradas, podem levar a doenças fisiológicas, e consequentemente, a fenótipos e comportamentos específicos, como modificações no tempo de vida, resistência ao estresse ou locomoção. Todos esses fenótipos são facilmente mensuráveis utilizando protocolos e dispositivos automatizados, permitindo o emprego destes vermes na triagem farmacológica, estudo de mecanismo de ação de fármacos, melhorando ou resgatando seus efeitos e toxicidade (Giunti et al., 2021; Apfeld; Alper, 2018).

Esse nematoide também possui o sistema redox, produzindo enzimas antioxidantes para combater as EROs e sofrem danos celulares através desse desequilíbrio. Sendo assim, o *C. elegans* é um organismo modelo em diversas áreas da biologia moderna, como estudos da genética, envelhecimento e ensaios toxicológicos (Corsi; Wightman; Chalfie, 2015). Também é utilizado para determinar a presença de contaminantes tóxicos no meio aquático e terrestre

(Hunt, 2017) e para detectar o odor de toxinas do metabolismo de células cancerígenas em amostras de urina humana através da técnica para rastreamentos oncológicos, chamada *Nematode Scint Detection Test* - NSDT (Hirotsu et al., 2015).

3 OBJETIVOS:

3.1 GERAL

3.1.1 Compilar evidências do efeito antioxidante dos compostos fenólicos e avaliar a atividade antioxidante de *Zingiber officinale* em *C. elegans*.

3.2 ESPECÍFICOS

3.2.1 Realizar levantamento sistemático do efeito antioxidante dos compostos fenólicos sobre *C. elegans*.

3.2.2 Obter a fração enriquecida com gingeróis do *Zingiber officinale* por métodos cromatográficos.

3.2.3 Analisar a fração enriquecida com gingeróis por métodos cromatográficos e espectroscópicos.

3.2.4 Avaliar a atividade antioxidante da fração enriquecida com gingeróis em *C. elegans*.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo está dividido em duas fases. A primeira fase trata-se de uma revisão sistemática a qual abrange os efeitos antioxidantes dos compostos fenólicos em *C. elegans*. Já a segunda fase envolve os ensaios clínicos experimentais referente à atividade antioxidante da fração enriquecida de gingeróis no *C. elegans*.

4.1 REVISÃO SISTEMÁTICA

4.1.1 Questão focalizada

A questão-chave a ser respondida pelo desenvolvimento desta revisão foi: Os compostos fenólicos possuem efeitos antioxidantes que possam ser evidenciados no *C. elegans*?

4.1.2 Protocolo e registo

A ferramenta *Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses* (PRISMA) foi utilizada como guia para a redação da revisão (Page et al., 2021). O registo foi realizado na base de dados internacional de revisões sistemáticas do PROSPERO.

4.1.3 Estratégia PICOS

Esta revisão foi realizada de acordo com a estratégia PICOS (Santos et al., 2007), detalhando as seguintes informações: P (problema): desequilíbrio redox; I (intervenção): tratamento com composto fenólico; C (controle): sem tratamento, veículo ou fármacos padronizados; O (desfechos): respostas antioxidantes em *C. elegans*; S (tipo de estudo): estudos pré-clínicos.

4.1.4 Estratégia de busca e busca na literatura

Os termos utilizados foram definidos a partir de consultas na enciclopédia de vocabulário controlado *National Library of Medicine's*, por meio de *Medical Subject Headings* (MeSH) e pelo vocabulário estruturado e trilingue DeCS (Descritores em Saúde). Ambos, tratam-se de um conjunto de termos denominados descritores e estão dispostos em uma estrutura hierárquica que permitiram a realização desta pesquisa em vários níveis de especificidade. As estratégias de busca seguiram os protocolos de cada base de dados, alterando as palavras, quando necessário.

O DeCS e o MeSH foram utilizados como ferramentas estratégicas na pesquisa de literatura científica, estabelecendo descritores usados como um filtro entre a linguagem utilizada pelo autor e a terminologia da área em questão, elaborando estratégias de buscas temáticas para favorecer o trabalho de pesquisa. Para a realização das buscas foram utilizados os descritores presentes na Tabela 1.

Foram utilizadas quatro bases eletrônicas para a realização da busca: PubMed, Scopus, Science Direct e Embase. Cada base de dado tem um modelo de busca específico, dessa maneira foram empregadas as estratégias de busca descritas na Tabela 2.

Tabela 1. Vocabulário estruturado utilizado para determinação da estratégia de busca.

Palavra-chave	DeCS	Mesh
Atividade antioxidante	Antioxidants	(anti-oxidant) OR (antioxidant) OR (endogenous antioxidants) OR (antioxidant activity) OR (antioxidant action) OR (antioxidant effect) OR (antioxidant effects)
Composto fenólico	phenolic compound	(Phenolic Acids) OR (Phenolic Compounds) OR (Phenols)
<i>Caenorhabditis elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>	(<i>Caenorhabditis elegans</i>) OR (<i>C. elegans</i>) OR (<i>C elegans</i> proteins)

Tabela 2. Estratégias de busca utilizadas nas bases de dados PubMed, Scopus, Science Direct e Embase (continua).

Base	Estratégia de busca
Pubmed	("antioxidants"[Pharmacological Action] OR "antioxidants"[MeSH Terms] OR "antioxidants"[All Fields] OR ("antioxidant"[All Fields] AND "effect"[All Fields]) OR "antioxidant effect"[All Fields] OR ("antioxidant s"[All Fields] OR "antioxidants"[Pharmacological Action] OR "antioxidants"[MeSH Terms] OR "antioxidants"[All Fields] OR "antioxidant"[All Fields] OR "antioxidating"[All Fields] OR "antioxidation"[All Fields] OR "antioxidative"[All Fields] OR "antioxidatively"[All Fields] OR "antioxidatives"[All Fields] OR "antioxidizing"[All Fields]) OR ("antioxidant s"[All Fields] OR "antioxidants"[Pharmacological Action] OR "antioxidants"[MeSH Terms] OR "antioxidants"[All Fields] OR "antioxidant"[All Fields] OR "antioxidating"[All Fields] OR "antioxidation"[All Fields] OR "antioxidative"[All Fields] OR "antioxidatively"[All Fields] OR "antioxidatives"[All Fields] OR "antioxidizing"[All Fields]) OR (("antioxidant s"[All Fields] OR "antioxidants"[Pharmacological Action] OR "antioxidants"[MeSH Terms] OR "antioxidants"[All Fields] OR "antioxidant"[All Fields] OR "antioxidating"[All Fields] OR "antioxidation"[All Fields] OR "antioxidative"[All Fields] OR "antioxidatively"[All Fields] OR "antioxidatives"[All Fields] OR "antioxidizing"[All Fields]) AND ("action"[All Fields] OR "action s"[All Fields] OR "actions"[All Fields])) AND ("caenorhabditis elegans"[MeSH Terms] OR ("caenorhabditis"[All Fields] AND "elegans"[All Fields]) OR "caenorhabditis elegans"[All Fields]) AND (((("phenol s"[All Fields] OR "phenolate"[All Fields] OR "phenolates"[All Fields] OR "phenolation"[All Fields] OR "phenolic"[All Fields] OR "phenolics"[All Fields] OR "phenols"[MeSH Terms] OR "phenols"[All Fields] OR "phenol"[All Fields] OR "phenol"[MeSH Terms]) AND ("acid s"[All Fields] OR "acicate"[All Fields] OR "acide"[All Fields] OR "acides"[All Fields] OR "acidics"[All Fields] OR "acidities"[All Fields] OR "acidity"[All Fields] OR "acids"[MeSH Terms] OR "acids"[All Fields] OR "acidic"[All Fields])) OR (("phenol s"[All Fields] OR "phenolate"[All Fields] OR "phenolates"[All Fields] OR "phenolation"[All Fields] OR "phenolic"[All Fields] OR "phenolics"[All Fields] OR "phenols"[MeSH Terms] OR "phenols"[All Fields] OR "phenol"[All Fields] OR "phenol"[MeSH Terms]) AND ("compound"[All Fields] OR "compound s"[All Fields] OR "compounds"[All Fields]) OR ("phenol s"[All Fields] OR "phenolate"[All Fields] OR "phenolates"[All Fields] OR "phenolation"[All Fields] OR "phenolic"[All Fields] OR "phenolics"[All Fields] OR "phenols"[MeSH Terms] OR "phenols"[All Fields] OR "phenol"[All Fields] OR "phenol"[MeSH Terms]))

Tabela 2. Estratégia de busca utilizadas nas bases de dados PubMed, Scopus, Science Direct e Embase (conclusão).

Base	Estratégia de busca
Scopus	(ALL (('caenorhabditis AND elegans OR 'caenorhabditis AND elegans' OR (('caenorhabditis'/exp OR caenorhabditis) AND elegans))) AND ALL (('antioxidant AND effect' OR (('antioxidant'/exp OR antioxidant) AND effect) OR 'antioxidant'/exp OR antioxidant OR 'antioxidants'/exp OR antioxidants OR 'antioxidant AND action' OR (('antioxidant'/exp OR antioxidant) AND ('action'/exp OR action)))) AND ALL (('phenolic AND acids' OR (phenolic AND ('acids'/exp OR acids)) OR 'phenolic AND compounds'/exp OR 'phenolic AND compounds' OR (phenolic AND compounds) OR 'phenol AND derivative'/exp OR 'phenol AND derivative')))
Science Direct	TS=((“caenorhabditis elegans”) OR “C. elegans” OR “C. elegans proteins”)) AND TS=((“Phenolic Acids”) OR (“Phenolic Compounds”) OR (“Phenols”)) AND TS=((“antioxidants”) OR (“Antioxidant Effects”) OR (“Antioxidant activity”)).
Embase	((('caenorhabditis elegans'/exp OR 'caenorhabditis elegans' OR (('caenorhabditis'/exp OR caenorhabditis) AND elegans)) AND ('antioxidant effect' OR (('antioxidant'/exp OR antioxidant) AND effect) OR 'antioxidant'/exp OR antioxidant OR 'antioxidants'/exp OR antioxidants OR 'antioxidant action' OR (('antioxidant'/exp OR antioxidant) AND ('action'/exp OR action))) AND ('phenolic acids' OR (phenolic AND ('acids'/exp OR acids)) OR 'phenolic compounds'/exp OR 'phenolic compounds' OR (phenolic AND compounds) OR 'phenol derivative'/exp OR 'phenol derivative').

4.1.5 Seleção dos estudos e critérios de elegibilidade

Para a seleção dos artigos, dois revisores (W. L. de J. e A. S.) avaliaram de forma independente os resultados da pesquisa utilizando o aplicativo Rayyan para auxiliar na elaboração de revisões sistemáticas (Ouzzani et al., 2016). Após a leitura dos títulos e resumos, estudos potencialmente relevantes foram selecionados para leitura do texto completo, de acordo com os critérios de elegibilidade e a concordância entre esses revisores foi medida por meio do teste estatístico Kappa (Landis; Koch, 1977). As discordâncias foram resolvidas por consenso ou por consulta a um terceiro revisor (J. S. L.). Os artigos indexados repetidamente em dois ou mais bancos de dados foram considerados apenas uma vez.

Foram adotados os critérios de elegibilidade dispostos na Tabela 3. Os artigos científicos selecionados abordam aspectos relacionados ao efeito antioxidante do composto fenólico em *C. elegans*. Para revisão sistemática os artigos em exclusão foram os que utilizaram a associação de outros compostos de produtos naturais, revisões, estudos de caso, relatos de casos, estudos *in vitro*, estudos que não avaliaram o efeito antioxidante dos compostos fenólicos em *C. elegans*.

As listas de referências dos artigos selecionados foram pesquisadas manualmente para identificar outros estudos que pudessem atender aos critérios de inclusão e não foram encontradas nas bases de dados pesquisadas, como em literatura cinzenta.

Tabela 3. Critérios de inclusão e exclusão para os artigos selecionados.

Critérios de inclusão	Critérios de exclusão
Estudos pré-clínicos	Revisões, estudos de caso, relatos de casos, estudos clínicos, ensaio <i>in vitro</i> .
Estudos com descritores e/ou sinônimos no título, resumo ou texto completo	Estudos que utilizaram outros compostos naturais ou compostos não isolados.
Estudos que avaliaram o efeito antioxidante dos compostos fenólicos no <i>Caenorhabditis elegans</i>	Estudos que não avaliaram o efeito antioxidante dos compostos fenólicos no <i>Caenorhabditis elegans</i>

4.1.6 Extração de dados e avaliação do risco de viés

As informações extraídas dos estudos selecionados foram: planta medicinal utilizada para obtenção do composto fenólico e o composto propriamente dito, método de extração, ensaios de atividade antioxidante realizados, dosagem/concentração e método de extração/isolamento do composto, indutor de estresse oxidativo, estado larval do *C. elegans* e resultados obtidos pelos respectivos estudos. Além disso, os autores dos estudos selecionados foram contatados quando os artigos ou dados não estavam disponíveis.

A qualidade metodológica dos estudos selecionados foi avaliada pelo protocolo SYRCLE. Dez domínios foram avaliados, incluindo: viés de seleção (geração de sequência, ocultação de alocação e acomodação aleatória), viés de desempenho (acomodação e ocultação aleatória), viés de detecção (avaliação e ocultação de resultados aleatórios), viés de atrito (resultados incompletos dos dados), viés de relato (relatório de resultados seletivos) e outras fontes de viés, como influência inadequada dos financiadores. O risco de viés foi classificado em baixo, incerto ou alto, de acordo com os critérios estabelecidos (Hooijmans et al., 2014).

4.2 ESTUDO EXPERIMENTAL

4.2.1 Tipo de estudo

Trata-se de um estudo experimental pré-clínico destinado à avaliação do efeito antioxidante da fração enriquecida em gingeróis nos modelos experimentais *C. elegans*. Não sendo necessário vinculação com Comitê de Ética por ser um animal invertebrado, considerado como modelo alternativo.

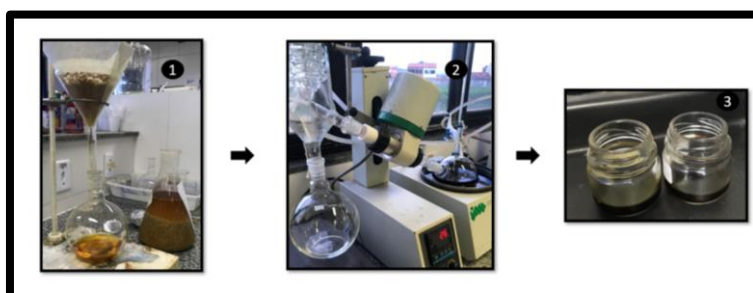
4.2.2 Obtenção da matéria prima vegetal

O gengibre foi obtido na feira livre do município de Lagarto-SE. As atividades de acesso ao Patrimônio Genético foram cadastradas no SisGen (Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado), com o número de cadastro: A2727DC, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015.

4.2.3 Obtenção do extrato do gengibre

O método de extração utilizado foi o de maceração. Inicialmente, após a aquisição de 5 quilogramas do rizoma do gengibre, colocou-o em um processo de limpeza com uma solução de hipoclorito de sódio 2,5% (2 L). Em seguida, o gengibre foi levado para a estufa à 40 °C por 7 dias e, posteriormente, triturado, utilizando um liquidificador. O solvente ficou em contato com os rizomas (232 gramas do gengibre triturado), desestabilizando e rompendo suas membranas celulares, liberando os compostos para o solvente, o qual foi rotaevaporado para obtenção do extrato (Figura 5).

Figura 5: Processo de separação através do funil de separação (1); rotaevaporação (2) e obtenção dos extratos brutos (3).

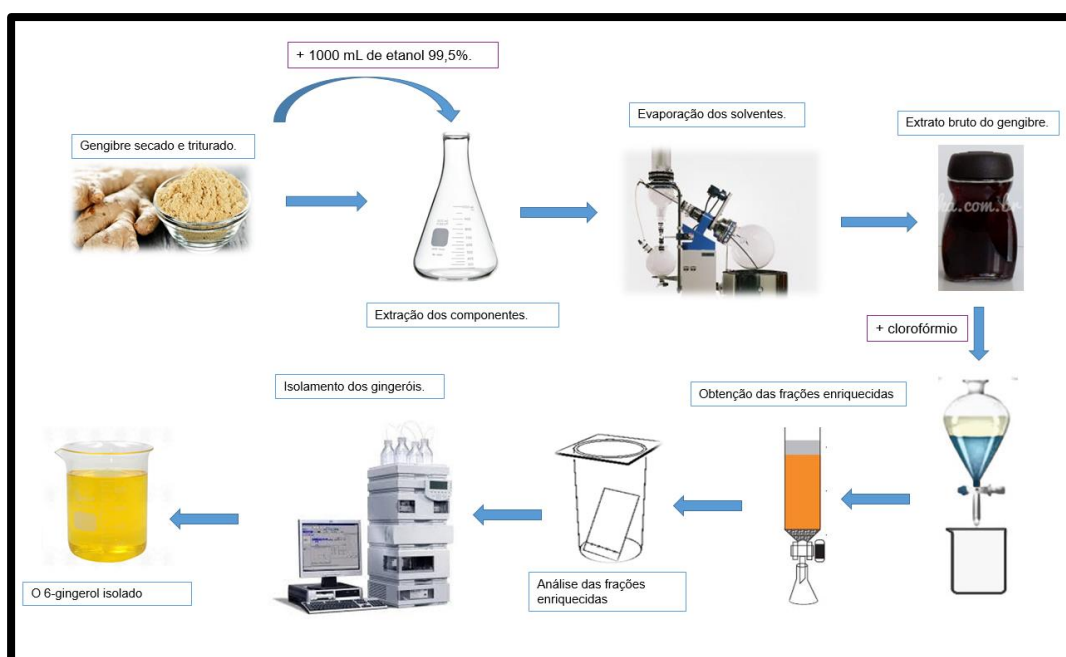


Fonte: próprio autor (2023).

Assim, adicionou-se 1000 mL de etanol 99,5% sobre o material vegetal triturado, com troca do solvente de 2 em 2 dias, durante 6 dias. Cada extrato líquido retirado foi filtrado, e em seguida, levado ao rotaevaporador para obtenção do extrato bruto, o qual resultou em 6,9 gramas. Tal extrato bruto foi dissolvido em uma mistura binária de etanol/água na proporção de 1:1 e depois particionado em funil de separação com clorofórmio na proporção de 1:3.

Ao final da partição, obteve-se duas fases: fase orgânica e fase hidroalcóolica. A fração orgânica, a qual é a rica em gingeróis, foi selecionada e aplicada em uma coluna de cromatografia líquida clássica. A coluna de vidro (20 x 5,5 cm) foi preenchida com sílica gel 60 (70-230 mesh), utilizando solventes com polaridades diferentes. Primeiramente foi empregado o hexano (1 litro), seguido por uma mistura de hexano/acetato de etila (1:1) (2,5 litros). As frações foram coletadas, e analisadas por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) para obtenção da fração enriquecida de gingeróis (Figura 6).

Figura 6: Processo de obtenção do extrato, partição e composto puro.



Fonte: Próprio autor (2019).

4.2.3.1. Métodos Cromatográficos

- **Cromatografia líquida clássica (CLC)**

A fração orgânica obtida do gengibre foi fracionada em cromatografia líquida clássica de vidro (20 x 5,5 cm), preenchida com sílica gel 60 (70-230 mesh), no Laboratório de Produtos

Naturais Bioativos. Em seguida, aplicou-se 7 gramas do extrato, dissolvido em acetato de etila e hexano 1:1, na parte superior da coluna, e posteriormente, adicionou a fase móvel (acetato de etila + hexano na proporção 1:1). Foram coletados 30 frascos com aproximadamente 10 mL, em seguida, feito a junção das frações de acordo com a similaridade dos constituintes das frações.

- **Cromatografia em camada delgada analítica (CCDA)**

As frações obtidas por cromatografia líquida em foram analisados por CCDA, feitas sobre cromatofolhas de alumínio cobertas com gel de sílica 60 F254 – Merck (espessura de 0,2 mm). O eluente utilizado nessa análise foi hexano/acetato (6:4, v/v).

A revelação das substâncias nas placas analíticas foi realizada através da exposição a uma lâmpada ultravioleta UVSL – 25 da Mineral Light, em dois comprimentos de onda (254 e 365 nm) e imersas com solução de vanilina sulfúrica.

- **Análise da fração enriquecida com gingeróis (FEG)**

A fração enriquecida com gingeróis, obtida por CCDA, foi submetida a análise cromatográfica por HPLC. O sistema HPLC (Shimadzu Prominente 20 A) utilizado, está equipado com duas bombas LC-20AR, degaseificador DGU-20A5R, detector UV-Vis SPD-M20A e controladora CBM-20A. As condições cromatográficas empregadas seguiram a metodologia desenvolvida por SILVA (2012), com algumas modificações. Para a análise da FEG, utilizou-se as seguintes condições: coluna C18 Shim-Pack (4,6 x 250 mm); fase móvel MeOH/H₂O (75:25); vazão 1 mL/min; λ = 280 nm e $V_{\text{injeção}}$ de 20 μ L.

A FEG (dissolvida em CDCl₃) foi analisada por ressonância magnética nuclear unidimensional (RMN ¹H). Utilizou-se um espectrômetro da Bruker Ascend™ 400, operado a 400 MHz, a 298 K. O tetrametilsilano (TMS) foi utilizado como referência nas análises. Essa análise foi realizada na Central de Análises de Fármacos, Medicamentos e Alimentos (CAFMA) da Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF).

4.2.4 Cultura, sincronização e exposição do *C. elegans*

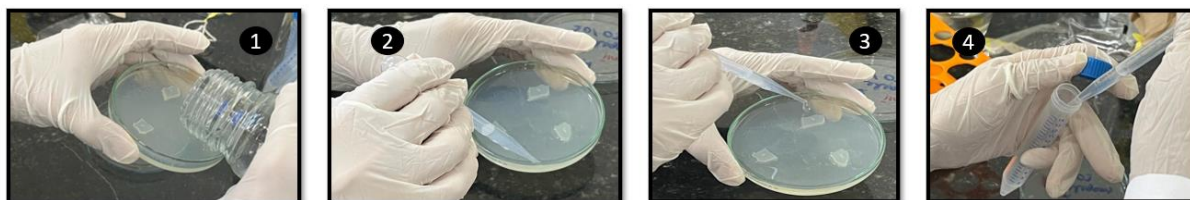
As espécies selvagens do *C. elegans* N2 foram obtidas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. As cepas foram mantidas a 20 °C em placas contendo *E. Coli* OP50 em meio NGM (*Nematode growth médium*), meio específico de crescimento para nematoides (Brenner,

1974). O crescimento aconteceu constantemente e o repique (cultivo do *C. elegans* em novas placas com alimentos) foi realizado a cada 7 dias.

O processo de sincronização foi executado com o objetivo de isolamento dos ovos para a obtenção da população L1 (primeiro estágio larvário) dos embriões hermafroditas grávidos, utilizando solução de *bleaching* para o rompimento dos *C. elegans* e obtenção dos ovos.

As placas com *C. elegans* adultos grávidos passaram por lavagem com tampão M9 (KH_2PO_4 0,02 M; Na_2HPO_4 0,04 M; NaCl 0,08 M e MgSO_4 0,001 M) para a transferência dos nematoides do meio sólido para o líquido, transferindo-os para o tubo falcon (Figura 7). Em seguida, os tubos foram colocados na centrifugação (2500 rpm por 2 minutos) por 3 vezes, utilizando tampão M9 em cada lavagem. Após a centrifugação, utilizou-se a pipeta de Pasteur para descartar o sobrenadante, deixando um volume residual de 2 mL nos tubos falcons, juntamente com vermes decantados (Gubert et al., 2022).

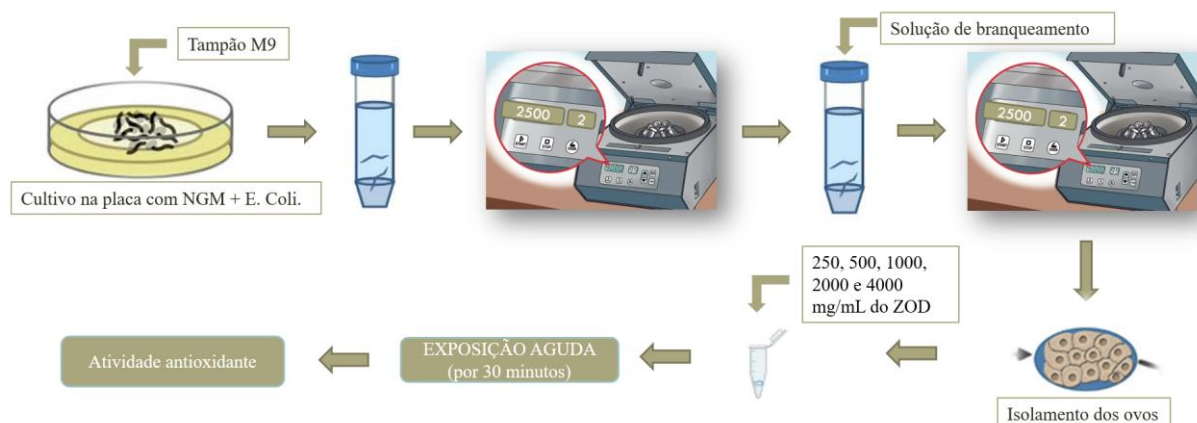
Figura 7: Procedimento de lavagem da placa durante o protocolo de sincronização. Adição de água destilada autoclavada (1), inclinação para lavagem da placa, com o auxílio de uma pipeta Pasteur (2), retirada do líquido da extremidade inferior e pipetando na extremidade superior (3). Coleta do líquido e transferência para um tubo cônico de 15 mL (4).



Fonte: próprio autor (2023).

Posterior a centrifugação, adicionou 5 mL da solução de bleaching (*bleaching solution*), a qual contém: 1000 μL de hipoclorito de Sódio (NaClO) 2%, 250 μL de hidróxido de sódio (NaOH) (10 mol/L) e 5000 μL de água destilada autoclavada, agitou-se por 10 minutos para ocorrer a ruptura da cutícula dos vermes grávidos e liberação dos ovos. Em seguida, realizou-se centrifugação (2500 rpm por 3 minutos), descartando o sobrenadante até 2mL. Em seguida, completou-se o tubo falcon até 15 mL com a solução tampão M9 e descartou novamente o sobrenadante até 2 mL, repetindo por três vezes. Ao final, os ovos foram transferidos para placas de Petri com *E. coli* e incubados por 12 h para se obter todos nematoides no estágio larval L1, como descrito na Figura 8 (Avila et al., 2012; Gubert et al., 2022).

Figura 8: Etapas do procedimento de sincronização e exposição do *C. elegans* ao substrato.



Fonte: próprio autor.

4.2.4.1 Grupos experimentais

Os ensaios foram realizados em triplicata com os grupos descritos abaixo:

- Grupo controle negativo: tampão M9 e DMSO 1%.
- Grupos experimentais:
 - Fração enriquecida de gingeróis em concentrações decrescentes (4, 2, 1, 0,5 e 0,25 mg/mL) dissolvida em DMSO 1%.

As concentrações foram determinadas com base no estudo publicado por Manalo, et al. (2022) e por Peña; Lozada-Ramízes; Regules (2020).

4.2.4.2 Exposição ao extrato

A exposição da fração enriquecida de gingeróis foi de forma aguda. Dessa forma, o substrato ficou em contato com os nematóides, no estágio larval L1, por apenas 30 minutos.

As larvas sincronizadas foram recolhidas da placa após atingirem o estágio larval L1 e transferidas para um tubo cônico de 15 mL. Em seguida, procederam 3 lavagens com a solução tampão M9 utilizando a centrifugação (2500 rpm por 3 minutos), e após a última centrifugação retirou o sobrenadante até aproximadamente 5 mL para concentrar os vermes.

Em seguida, realizou uma contagem dos vermes (técnica da gota). O tubo com 5 mL de tampão M9 e *C. elegans* foi homogeneizado suavemente e coletado 2 µL, o qual foi pipetado na lâmina por 3 vezes, obtendo 3 gotas em cada lâmina. Posterior, contou-se o número de

vermes em cada gota e estimou-se uma quantidade de vermes por microlitro e o volume de vermes necessário para a exposição, através de uma regra de 3 simples.

$$X = \frac{2 \mu\text{L} \times 1500 \text{ vermes}}{\text{Quant. De vermes encontrados na gota}}$$

Após conhecer o número de vermes a cada 1 μL , a quantidade de microlitros utilizado para cada experimento foi definida de acordo o quantitativo de vermes necessários para cada teste. Em seguida, essa quantia de *C. elegans* foi transferida para um eppendorf, e adicionado o substrato e completado com tampão M9, até 1 mL, durante os 30 minutos.

A retirada do composto foi através da lavagem com tampão M9 e centrifugação (2500 rpm por 3 minutos), durante 3 vezes. Na última lavagem deixou-se o volume de líquido até a marca acima do 0,1 mL do eppendorf de 1,5 mL e transferiu para uma placa com meio NGM contendo *E.coli*.

4.2.5 Taxa de sobrevivência

Os nematoides foram expostos ao tratamento com a FEG por 30 min a 20 °C. Após a exposição, a taxa de sobrevivência foi determinada utilizando 2500 vermes expostos aos compostos e transferidos para placas contendo meio NGM com *E. Coli*. Em seguida, foi verificado o número de vermes sobreviventes com auxílio de lupa, a cada 12 horas, por um período de 24 horas. (Avila et al., 2012).

4.2.6 Estresse térmico

Os 100 nematóides sincronizados foram expostos ao substrato – FEG nas concentrações 4, 2, 1, 0,5 e 0,25 mg/mL – e também a DMSO 1% e com tampão M9 (grupos controle), após 30 minutos, foram incubados a 100°C (35°C) por 30 minutos e por 60 hora, para o ensaio de tolerância ao estresse térmico. As taxas de sobrevivência dos vermes foram monitoradas por 24 horas e contabilizadas após esse período (Surco-Laos et al., 2012).

4.2.7 Atividade antioxidante

Após a sincronização e exposição aguda, os nematoides foram submetidos a determinação da geração de EROs. Todos os resultados foram expressos em % em comparação com o grupo controle.

4.2.7.1 Quantificação dos EROs

A geração de EROs, nos grupos descritos, foi avaliada pelo ensaio da DCFH utilizando 200 vermes. Ao final da exposição e lavagem, os vermes foram transferidos para os poços da placa, 100 µL dos vermes expostos e 100 µL do DCFH-DA (2'-7'- diacetato diclorofluoresceína) na concentração 0,05 mmol/L. O composto fluorescente formado a partir da oxidação do DCFH-DA pela ação das EROs foi quantificado em leitor de microplacas a 485 nm de excitação e 530 nm de emissão (Charão et al., 2015; Li et al., 2020), sendo medida após 60 minutos.

4.2.8 Análise estatística

Os experimentos foram realizados em triplicata das diferentes concentrações e os resultados foram expressos através da média $\pm$ erro padrão da média. Inicialmente, os resultados foram avaliados quanto à distribuição normal usando o teste de Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov. Nos casos dos resultados com padrão de normalidade (paramétricos), foram submetidos à análise de variância (ANOVA de uma via), seguido do pós-teste de Tukey para comparação de médias. Para os resultados não paramétricos foi empregado Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn. Em todos os casos foram consideradas significativas as diferenças com $p < 0,05$. Para a realização destas análises foi utilizado o programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Prism Software Inc., San Diego, CA, EUA).

5 RESULTADOS

5.1 REVISÃO SISTEMÁTICA

5.1.1. Seleção dos artigos e extração dos dados

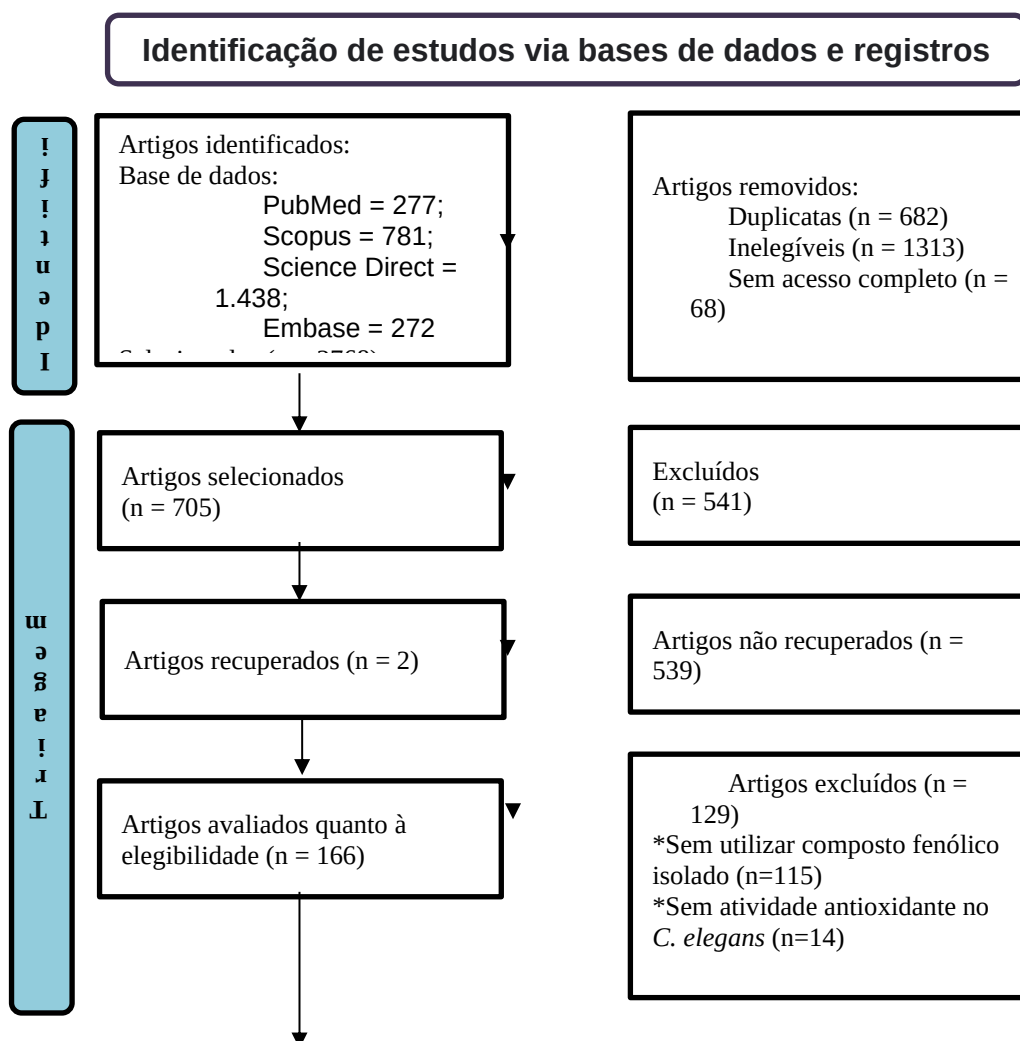
Em abril de 2023, realizou-se um levantamento de publicações sobre efeitos antioxidantes do composto fenólico em *C. elegans*, com atualização em novembro de 2023,

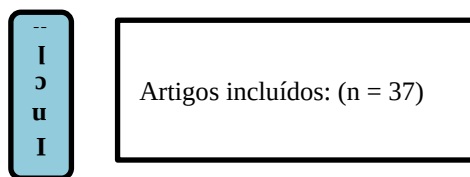
sendo encontrados 277 artigos no PubMed, 781 no Scopus, 1438 artigos no Science Direct e 272 no Embase, totalizando 2768 artigos.

Após exclusão das repetições, 705 estudos foram submetidos à leitura de títulos e resumos para seleção. Através da aplicação dos critérios de inclusão e exclusão restaram 35 artigos. Em seguida, foi realizada a busca manual entre as referências dos artigos selecionados, o que possibilitou a inclusão de mais 2 artigos, totalizando 37 estudos sobre o efeito antioxidante do composto fenólico em *C. elegans*. O nível de concordância entre os revisores foi de 0,77 sendo considerado substancial (Kappa: 0,6-0,79). A tabela 4 ilustra o processo de busca, identificação e seleção dos artigos.

As características gerais de cada estudo (planta e composto isolado, identificação, testes da atividade antioxidante, concentração, exposição, estágio larval e resultados) selecionado estão representadas nas tabelas 4 e 5. Os estudos estão dispostos pelo ano de publicação seguido por ordem alfabética, de acordo com o autor.

Tabela 4: Fluxograma da seleção das publicações.





Adaptado de: Page et al. The Prisma Group (2021).

5.1.2. Estudos selecionados

Os anos de publicação dos estudos selecionados variam de 2010 a 2023, podendo notar que ao decorrer dos anos, mais estudos foram realizados; tendo em vista que, nos primeiros quatro anos (2010, 2011, 2012 e 2013) só foram publicados, referente a temática, 5 estudos ao total. Esse quantitativo é equivalente apenas ao ano de 2022, havendo um crescimento no ano seguinte (Gráfico 1).

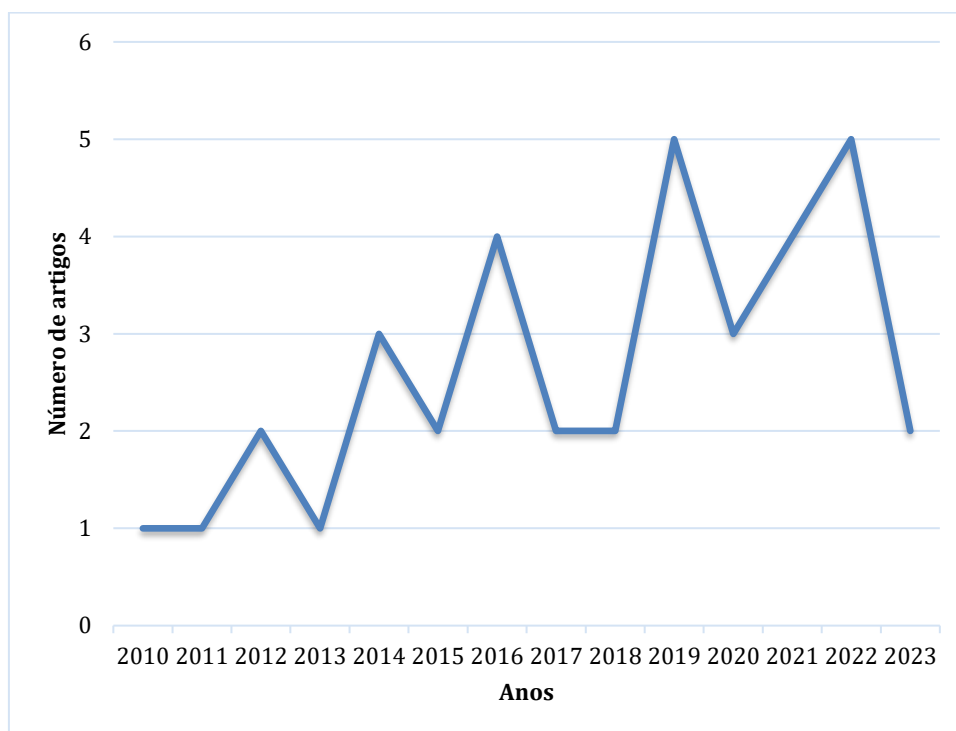


Gráfico 1: Quantidade de artigos publicados por ano.

Outro ponto a se observar é o fato de que a maioria dos estudos são publicados na China (n=18); porém tem-se também estudos na Alemanha (n=6), Taiwan (n=3), Coreia (n=4), Índia (n=3), Espanha (n=2) apenas 1 estudo no Canadá, no Brasil e na Tailândia. Além disso, tiveram países como Califórnia, Grécia e República Checa, que publicaram 1 estudo com parceria com outros países citados anteriormente.

5.1.3. Compostos fenólicos utilizados e método de identificação

Dentre os 37 artigos selecionados, foram relatados o uso de 61 compostos fenólicos, tendo em vista que, alguns artigos utilizaram mais de um composto fenólico para os testes antioxidantes. Entretanto, desses 61 compostos, apenas 46 (75,4%) compostos apresentaram resultados positivos perante a atividade antioxidante e somente 22 (59%) artigos mencionaram as plantas utilizadas para a base da extração do composto, os demais adquiriram através da compra do isolado por meio de empresa e não mencionaram qual a planta de origem.

Quanto à forma de extração dos compostos fenólicos utilizados em cada experimento, 20 estudos (24%) relataram que os compostos fenólicos foram adquiridos comercialmente das empresas, a grande maioria mencionou a empresa Sigma na sua redação. Apenas, 9 (24,3%) artigos informaram e/ou descreveram o método de extração como parte do estudo, em sua grande maioria utilizando álcool, e uma minoria utilizando água. Dos 37 estudos, 3 (8,1%) sintetizaram a substância utilizada no estudo a partir de outro composto já extraído ou adquirido. Somente 3 (8,1%) artigos não foram possíveis identificar a extração do composto (Tabela 5).

5.1.4. Exposição e estágio larval

Em relação ao tipo de exposição, 31 (83,7%) utilizaram a exposição crônica, variando entre 24 horas até 4 dias de exposição. Enquanto apenas 6 (16,3%) artigos utilizaram a exposição aguda, os quais deixaram a substância em contato com os vermes por apenas minutos, até algumas horas.

Já referente ao estágio larval utilizado em cada estudos, foi mencionado desde exposição com *C. elegans* ainda embriões/ovos até o estágio larval adulto (L4). Entretanto, o estágio larval mais utilizado dentre os estudos selecionados foi o L4, em que 20 (54%) artigos optaram por utilizar esse período. Em seguida, tem-se o estágio larval L1 com o quantitativo de 17 (46%) artigos; e os estudos com embriões e ovos, que totalizaram 2 (5%) estudos e apenas 1 (2,7%) utilizou o estágio L2. Ressalvando que alguns estudos utilizaram mais de um estágio larval.

5.1.5. Atividades antioxidantes realizadas

Dentre os estudos selecionados, notou-se a presença dos testes de determinação das espécies reativas de oxigênio (EROs), quantificação das enzimas antioxidante superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GSH) (Tabela 5). Dentre esses ensaios, o mais realizado pelos artigos selecionados foi o de determinação de EROs, o qual 36 (97%) estudos utilizaram esse teste. Com ênfase no ponto em que, 18 estudos utilizaram apenas esse tipo teste como determinante de atividade antioxidante.

Dentre os estudos que analisaram esse parâmetro, apenas os compostos: 3,4',5-tri-hidroxiestilbeno (resveratrol); *trans* -3,5-dimetoxi-4'-hidroxiestilbe (pterostilbeno); *trans* -4'-hidroxi-3,4,5-trifluoroestilbeno; *trans* -2,5-dimetoxi-4'-hidroxiestilbeno, aromadendrina, tremuloidina, triandrina, crisoeriol-7-O-glicuronídeo e o ácido rosmário não apresentaram redução das EROs; porém há outros estudos com resveratrol que apresentaram resultados positivos. Além disso, o Bisfenol A (BPA) apresentou um resultado reverso, foi detectado um aumento da quantidade de EROs, concluindo que este composto possui uma atividade oxidante.

Em sequência, tem-se o teste de determinação da quantidade de enzimas antioxidantes produzidas, em que 17 estudos realizaram a quantificação da produção de enzima SOD, enquanto 12 estudos quantificaram a produção da enzima CAT. Dos estudos envolvendo a enzima SOD, os compostos: aromadendrina, tremuloidina, salicina, isorhamnetina-3-O- β -d-rutinosídeo, triandrina, e crisoeriol-7-O-glicuronídeo não apresentaram um aumento na produção dessa enzima. Dos 12 estudos que realizaram a quantificação da enzima CAT, todos os compostos (100%) mostraram resultado no aumento através da quantificação dessa enzima antioxidante.

Ainda houve o teste para avaliar a atividade e/ou formação da GST/GSH (glutathiona-s-transferase), o qual foi realizado por 6 estudos, em conjunto aos demais testes, com o intuito de corroborar o efeito antioxidante das substâncias. Sabendo que, cada estudo que realizou esse teste, utilizou apenas um composto, diferindo dos demais testes. Dessa forma, 6 compostos responderam de forma positiva, elevando o quantitativo dessa enzima no organismo. E, por fim, tem-se o teste para avaliar a formação de MDA (malonaldeído), o qual 4 estudos executaram e os 5 compostos testados (salidroside, carnosol, OEB, DJF e HY) apresentaram resultados positivos.

5.1.6. Risco de viés dos estudos

Os estudos considerados de maior qualidade metodológica foram os que relataram a descrição clara dos objetivos, resultados, desfechos completos e mecanismo de ação dos compostos utilizados. Os artigos classificados com maior risco de viés foram aqueles que não informaram ocultação de cegamento e aleatoriedade dos grupos (n=37; 100%), não utilizaram medicamento/composto padrão (n=25; 67,5%), não relataram sobre toxicidade dos compostos nos vermes (n=17; 45,9%), não descreveram o tamanho da amostra/quantidade de vermes (n=14; 37,8%) e não detalharam o momento exato dos experimentos (n=7; 18,9%). A maioria dos estudos foram considerados com alto risco de viés (45,5%) e com risco de viés incerto (24,3%) (Figura 9).

Figura 9: Qualidade metodológica dos estudos selecionados.

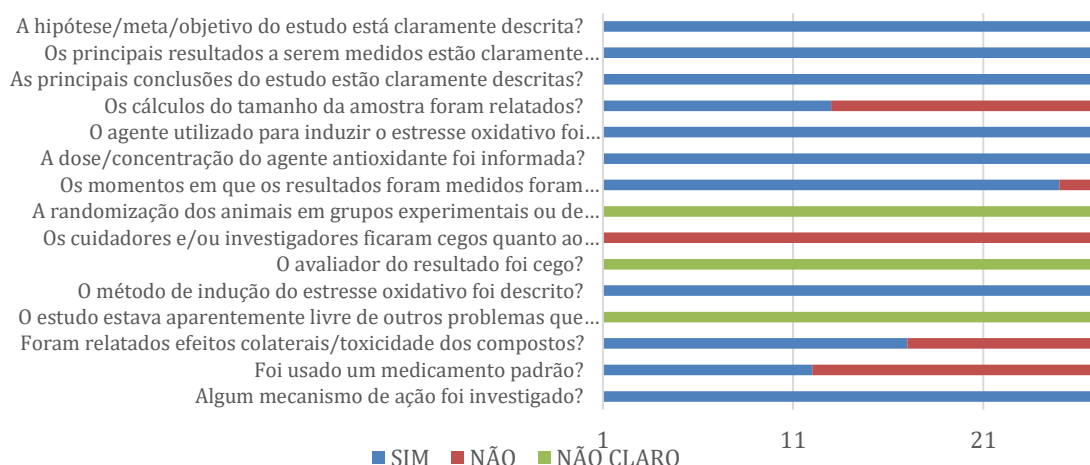


Tabela 5: Descrição detalhada dos estudos pré-clínicos do efeito antioxidante de composto fenólico em *C. elegans*, incluídos na revisão sistemática (continua).

Referência	País do estudo	Planta/ Composto	Método de obtenção	Testes	Concentração	Exposição	Indutor	Estado larval	Resultados
Ye et al., 2010	China	Resveratrol	Adquirido	Determinação de EROs e quantificação enzima antioxidante SOD	10 µM a 1 mM	Exposição crônica	Raio Gama	Estágio L1	Redução dos níveis de EROs e aumentou a expressão SOD.
Liao et al., 2011	Taiwan	Curcuma longa (curcumina)	Adquirido	Determinação de EROs	20µM	Exposição aguda	Juglona 250µM	Estágio L1 e L4.	Redução de EROs.
Chen; Rezaizadehnajafi; Wink, 2012	Alemanha	Resveratrol	Adquirido	Determinação de EROs	50, 100 ou 200 µM	Exposição crônica	Juglona 400 µm	Estágio L1	Redução de EROs.
Shi; Liao; Pan, 2012	Taiwan	Monascina (MS)	Extração e isolamento do mofo vermelho do arroz	Determinação de EROs e quantificação de enzimas antioxidantes SOD, CAT e GST.	1, 10 e 50 µM	Exposição crônica	Juglona 250 µM	Estágio L1	Redução de EROs e aumento da atividade de GST, SOD e CAT.
Kim et al., 2013	Coreia	<i>Veronica peregrina</i> – (Ácido Protocatecuico - PCA)	Maceração com álcool metílico	Quantificação de enzimas antioxidantes SOD, CAT e EROs.	100µM e 200µM	Exposição aguda	Paraquat 30 e 60 mM	Estágio L4.	Aumentou a atividade da SOD, CAT e redução de EROs.
Kim et al., 2014	Coreia do Sul	<i>Veronica peregrina</i> (ácido 4-hidroxibenzóico - 4-HBA)	Maceração com álcool metílico	Determinação de EROs e quantificação das enzimas antioxidantes SOD e CAT.	20 e 40 µM	Exposição crônica	Paraquat 30 e 60 mM	Estágio L4.	Aumento da atividade de enzimas antioxidantes SOD e CAT e redução de EROs.

Tabela 5: Descrição detalhada dos estudos pré-clínicos do efeito antioxidante de composto fenólico em *C. elegans*, incluídos na revisão sistemática (continua).

Referência	País do estudo	Planta/composto	Método de obtenção	Testes	Concentração	Exposição	Indutor	Estado larval	Resultados
Xiao et al., 2014	China	<i>Rhodiola rósea</i> (Salidroside)	Adquirido	Determinação de EROs e quantificação de enzimas antioxidantes SOD, CAT e MDA	50, 100 e 200 μ M	Exposição crônica	Paraquat 0,1M	Estágio L1.	Redução de EROs e MDA, aumento das enzimas antioxidantes SOD e CAT.
Zhang,et al., 2014	China	<i>Thalictrum</i> e <i>Kalimeris</i> (Methyl 3,4-dihydroxybenzoate - MDHB)	Adquirido	Determinação de EROs.	160 mg/L	Exposição crônica	Juglona 300 μ M	Estágio L4.	Redução do EROs.
Büchter et al., 2015	Alemanha	<i>Polygonum multiflorum</i> (2,3,5,4'-Tetrahydroxystilbeno-2-O- β -D-glicosídeo - TSG)	Extração da planta <i>Polygonum multiflorum</i>	Quantificação de enzima antioxidante SOD	50, 100 μ M	Exposição crônica	Juglona 150 μ M	Estágio L4.	Aumento de SOD.
Tan et al., 2015	China	Bisfenol A (BPA)	Adquirido	Determinação de EROs	0, 10, 25 e 50 μ M	Exposição crônica	H ₂ O ₂ 50 mM e ânions superóxido 10mM	Estágio L4	Redução de EROs e aumento de SOD.
Desjardins et al., 2016	Canadá	N-acetilcisteína, vitamina C e resveratrol.	Adquirido	Determinação de EROs	3, 6, 9 mM	Exposição crônica	0.1 e 0.0125 mM	Estágio L1/L4.	Redução de EROs.

Tabela 5: Descrição detalhada dos estudos pré-clínicos do efeito antioxidante de composto fenólico em *C. elegans*, incluídos na revisão sistemática (*continua*).

Referência	País do estudo	Planta/composto	Método de obtenção	Testes	Concentração	Exposição	Indutor	Estado larval	Resultados
Fischer et al., 2016	Alemanha	Composto (1): (resveratrol), composto(2): <i>trans</i> -3,5-dimetoxi-4'-hidroxiestilbeno (pterostilbeno), composto(3): <i>trans</i> -3,5-dimetoxi-4'-fluoro-4'-hidroxiestilbeno, composto (4): <i>trans</i> -4'-hidroxi-3,4,5-trifluoroestilbeno, composto (5): <i>trans</i> -2,5-dimetoxi-4'-hidroxiestilbeno, composto (6): <i>trans</i> -2,4',5-tri-hidroxiestilbeno.	Adquirido	Determinação de EROs	50, 100 µM	Exposição crônica	Paraquat ou juglona	Estágio L1	Apenas 3 e 6 (resveratrol) reduziu EROs.
Nidheesh et al., 2016	Índia	Quitoooligômeros (COS)	Sintetizado por hidrólise enzimática	Determinação de EROs e quantificação de enzimas antioxidantes SOD, CAT e GST.	0,75 mM	Exposição aguda	Monocrotofos (MCP) 0,2 mM	Estágio L4	Redução de EROs e de GSH e aumento da SOD e CAT

Tabela 5: Descrição detalhada dos estudos pré-clínicos do efeito antioxidante de composto fenólico em *C. elegans*, incluídos na revisão sistemática (*continua*).

Referência	País do estudo	Planta/composto	Método de obtenção	Testes	Concentração	Exposição	Indutor	Estado larval	Resultados
Yen et al., 2016	Taiwan	<i>Z. serrata</i> (-)-(1S, 4S)-7-hydroxycalamene	Hidrodestilação	Determinação de EROs.	3µM e 30µM	Exposição crônica	Juglona 250µM	Estágio L1.	Redução do EROs.
Filippopoulou et al., 2017	Alemanha, Grécia, República Checa	Silimarina (2,3-Desidrosilibina A/B)	Adquirido	Determinação de EROs e quantificação de enzimas antioxidantes SOD e CAT	0,5 µM	Exposição aguda	Juglona 80 µM	Embriões/Ovos	Aumento de SOD e CAT
Negi et al., 2017	Índia	O ácido ursólico triterpeno natural (ácido 3β-hydroxyurs-12-en-28-óico - UA)	Adquirido	Determinação de EROs	25 µM	Exposição crônica	ZnONPs (Nanopartículas de óxido de zinco)	Estágio L1	Redução de EROs
Lee et al., 2018	Coreia	<i>Z. officinale</i> 6-shogaol	Maceração com etanol	Determinação de EROs e quantificação de enzimas antioxidantes SOD e CAT.	12.5 e 25 µM	Exposição crônica	juglona 50 µM ou H ₂ O ₂ 25 mM	Estágio L4	Aumento de SOD e CAT e redução de EROs
Zhu et al., 2018	China	Brometo de 3-bis(piridin-2-ilmetil)aminometil-5-hidroxibenziltri fenil fosfônio - PAT)	Não descrito	Determinação de EROs	25, 50, 100 µM	Exposição crônica	Juglona 300 µM	Embriões/Ovos	Redução de EROs.

Tabela 5: Descrição detalhada dos estudos pré-clínicos do efeito antioxidante de composto fenólico em *C. elegans*, incluídos na revisão sistemática (*continua*).

Referência	País do estudo	Planta/composto	Método de obtenção	Testes	Concentração	Exposição	Indutor	Estado larval	Resultados
Lin et al., 2019	China	Rosmarinus officinalis L. (Ácido Rosmarínico)	Adquirido	Quantificação de enzimas antioxidantes SOD, CAT e GSH-P e GSH.	60, 120 e 180µM	Exposição crônica	Paraquat 10 mM	Estágio L4.	Aumento de CAT, SOD, GSP-Hx e GSH.
Lin et al., 2019	China	Carnosol	Adquirido	Determinação de EROs, e quantificação de enzimas antioxidantes SOD, MDA e GSH-Px	180µM	Exposição crônica	Paraquat 10mM	Estágio L4.	Redução de EROs e aumento de SOD, CAT e GSH-Px
Pandey et al., 2019	Índia	<i>Zanthoxylum armatum</i> (Tambulin)	Adquirido	Determinação de EROs	25, 50 e 100µM	Exposição aguda	Juglona 250 µm	Estágio L1.	Redução de EROs.
Tawfeek et al., 2019	Alemanha	<i>Populus alba</i> e <i>Satrix</i> (aromadendrina, tremuloidina, salicina, isorhamnetina-3-O-β-d-rutinosídeo, galocatequina, triandrina, e crisoeriol-7-O-glicuronídeo)	Extração à frio com metanol 80%.	Determinação de EROs e quantificação de enzimas antioxidantes SOD	50, 100 e 200 µg/mL	Exposição crônica	Juglona 80 µM	Estágio L1.	Redução de EROs e apenas a galocatequina induziu a SOD.

Tabela 5: Descrição detalhada dos estudos pré-clínicos do efeito antioxidante de composto fenólico em *C. elegans*, incluídos na revisão sistemática (*continua*).

Referência	País do estudo	Planta/composto	Método de obtenção	Testes	Concentração	Exposição	Indutor	Estado larval	Resultados
Wu et al., 2019	China	<i>Trillium tschonoskii</i> (Desoxitrillenosídeo Ca - DTCA e Epitrillenosídeo CA - ETCA)	Extração com etanol a 75%	Determinação de EROs	100 µM	Exposição crônica	H ₂ O ₂ 1 mM e 40 mM	Estágio L4	Redução de EROs.
Aranaz et al., 2020	Espanha	Compostos fenólicos (miricetina, kaempferol, naringina, hesperidina, apigenina, luteolina, resveratrol, curcumina, epicatequina) e ácidos fenólicos (ácidos p-cumárico, elágico, ferúlico, gálico e vanílico)	Adquirido	Determinação de EROs	100 e 200µM	Exposição crônica	NA	Estágio L1/L4.	Redução de EROs.

Tabela 5: Descrição detalhada dos estudos pré-clínicos do efeito antioxidante de composto fenólico em *C. elegans*, incluídos na revisão sistemática (*continua*).

Referência	País do estudo	Planta/composto	Método de obtenção	Testes	Concentração	Exposição	Indutor	Estado larval	Resultados
Li et al., 2020	China	<i>Oenothera erythrosepala</i> (enoteína B - OEB)	Adquirido	Determinação de EROs e quantificação de enzimas antioxidantes SOD, CAT e GPx e o conteúdo de MDA	160 µM	Exposição crônica	H ₂ O ₂ ou paraquat	Estágio L4.	Redução de EROs de MDA e aumentou a atividade da GPx, CAT e SOD.
Nobre et al., 2020	Brasil	(S)- e (R)-2,2-dimetil-4-(fenil selanilmetil)-1,3-dioxolano	Adquirido	Quantificação da enzima antioxidante CAT	1 µM e 50 µM	Exposição crônica	H ₂ O ₂ 0,4 mM	Estágio L1	Aumento da enzima CAT.
Gutierrez-Zetina et al., 2021	Espanha	Ácido cafeico (CA) e ácido dihidrocaféico (DHCA)	Adquirido	Determinação de EROs.	200, 300 µM	Exposição crônica	Estresse térmico (35°C) ou paraquat	Estágio L1/L4.	Redução de EROs.
Hong et al., 2021	China	<i>Junglas</i> (Diaphragma juglandis Fructus – DJF)	Extração com álcool	Determinação de EROs e quantificação de enzimas antioxidantes SOD, CAT e MDA.	50µM, 100µM e 200µM	Exposição aguda	Paraquat 5 mM	Estágio L4.	Redução de EROs e aumentou de SOD e CAT
Wang et al., 2021	China	Folhas de Oliveira (Hidroxitirosol - HY)	Adquirido	Determinação de EROs, MDA e quantificação de enzimas antioxidantes SOD e GSH-Px	10, 50 e 100 µM	Exposição crônica	Peróxido de Hidrogênio (H ₂ O ₂)	Estágio L4.	Redução de EROs e MDA e aumento de SOD e GSH-Px

Tabela 5: Descrição detalhada dos estudos pré-clínicos do efeito antioxidante de composto fenólico em *C. elegans*, incluídos na revisão sistemática (*continua*).

Referência	País do estudo	Planta/composto	Método de obtenção	Testes	Concentração	Exposição	Indutor	Estado larval	Resultados
Zhou et al., 2021	China	Curcumina	Sintetizado com cloreto de acila	Determinação de EROs	5µM, 10µM e 20µM	Exposição crônica	Paraquat - 5mM	Estágio L4.	Redução de EROs e aumento de SOD e GST.
Bai et al., 2022	China	Ácido elágico	Adquirido	Determinação de EROs e quantificação de enzima antioxidante SOD	10, 25, 50, 100 e 200 µM	Exposição crônica	H2O2 0,4 mM	Estágio L4	Aumento de SOD e redução de EROs.
Jattujan et al., 2022	Tailândia	<i>Holothuria scabra</i> (2-Butoxitetrahidrofuran e ácido palmítico)	Extração com acetato de etila e butanol	Determinação de EROs	5 µg/mL 2-BTHF ou 1 µg/mL de ácido palmítico	Exposição crônica	Paraquat 250 mM	Estágio L1	Redução de EROs
Li et al., 2022	China	Composto da <i>Laminaria japonica</i>	Extração com água à quente (infusão)	Determinação de MDA, EROs e SOD.	0,25mg/mL, 0,50mg/mL e 1mg/mL	Exposição crônica	H ₂ O ₂ 10uL	Estágio L4.	Redução de MDA e de EROs e aumento da SOD.
Zhang et al., 2022	China	Cannabidiol	Adquirido	Determinação de EROs	100µM	Exposição crônica	Juglona 200µM	Estágio L2.	Redução de EROs.

Tabela 5: Descrição detalhada dos estudos pré-clínicos do efeito antioxidante de composto fenólico em *C. elegans*, incluídos na revisão sistemática (*conclusão*).

Referência	País do estudo	Planta/composto	Método de obtenção	Testes	Concentração	Exposição	Indutor	Estado larval	Resultados
Zhang et al., 2022	China, Alemanha, Califórnia	Oolonghomobis flavan A (OFA) e oolonghomobis flavan B (OFB)	Adquirido	Determinação de EROs	5, 10, 25 μ M	Exposição crônica	Juglona 20 μ M	Estágio L1	Redução de EROs
Cho et al., 2023	Coreia do Sul	<i>Cirsium japonicum</i> (ácido clorogênico - CA)	Extração por refluxo com etanol a 70%	Determinação de EROs e quantificação de enzima antioxidante CAT	25 ou 50 μ g/mL	Exposição crônica	Paraquat 4.5 mM ou juglona 80 μ M	Estágio L1.	Redução de EROs e aumento de CAT.
Song et al., 2023	China	<i>Anacyclus pyrethrum</i> (H-2)	Sintetizado pela derivatização de N-Alquilamidas (NAAs) de <i>Anacyclus pyrethrum</i> (L.) DC	Determinação de EROs	25, 50 e 100 μ M	Exposição crônica	quinona encapuzada 400 μ M e 0,032% de H_2O_2	Estágio L4	Redução de EROs.

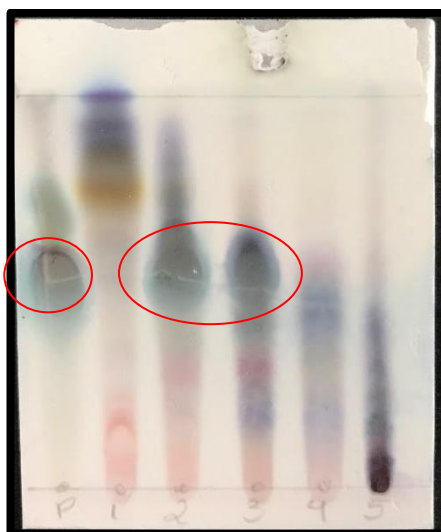
5.2 ESTUDO EXPERIMENTAL

5.2.1 Obtenção e análise da fração enriquecida de gingeróis

O rendimento do extrato bruto foi de 2,9% (6,9 gramas) após o método de maceração, no qual o solvente ficou em contato com o tubérculo (232 gramas do gengibre triturado). Na etapa posterior, referente a obtenção da fração enriquecida de gingeróis, teve-se um rendimento de 2,5% (5,9 gramas) quando comparado ao quantitativo de gengibre utilizado após trituração.

As análises em CCDA das frações obtidas a partir do fracionamento seguem abaixo (Figura 10). Na placa cromatográfica, os números 2 e 3 foram identificados como as frações enriquecidas de gingeróis; tendo em vista que, o perfil cromatográfico e o fator de retenção observado na placa estão de acordo com o padrão utilizado (identificado como P na figura) (Silva, 2012).

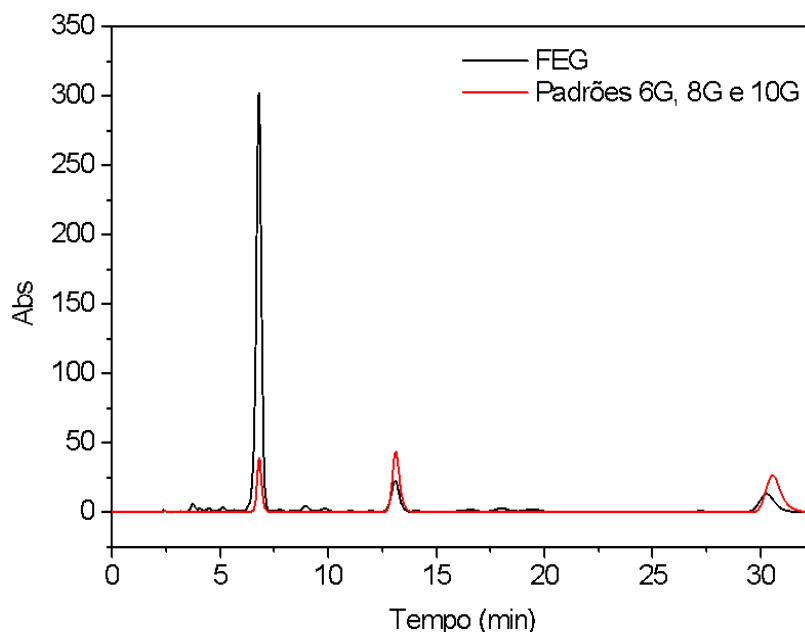
Figura 10: Placa cromatográfica das frações obtidas do extrato do tubérculo do gengibre após cromatografia líquida em coluna analítica. P = padrão; 2 e 3 = frações ricas de gingeróis.



Fonte: próprio autor (2023).

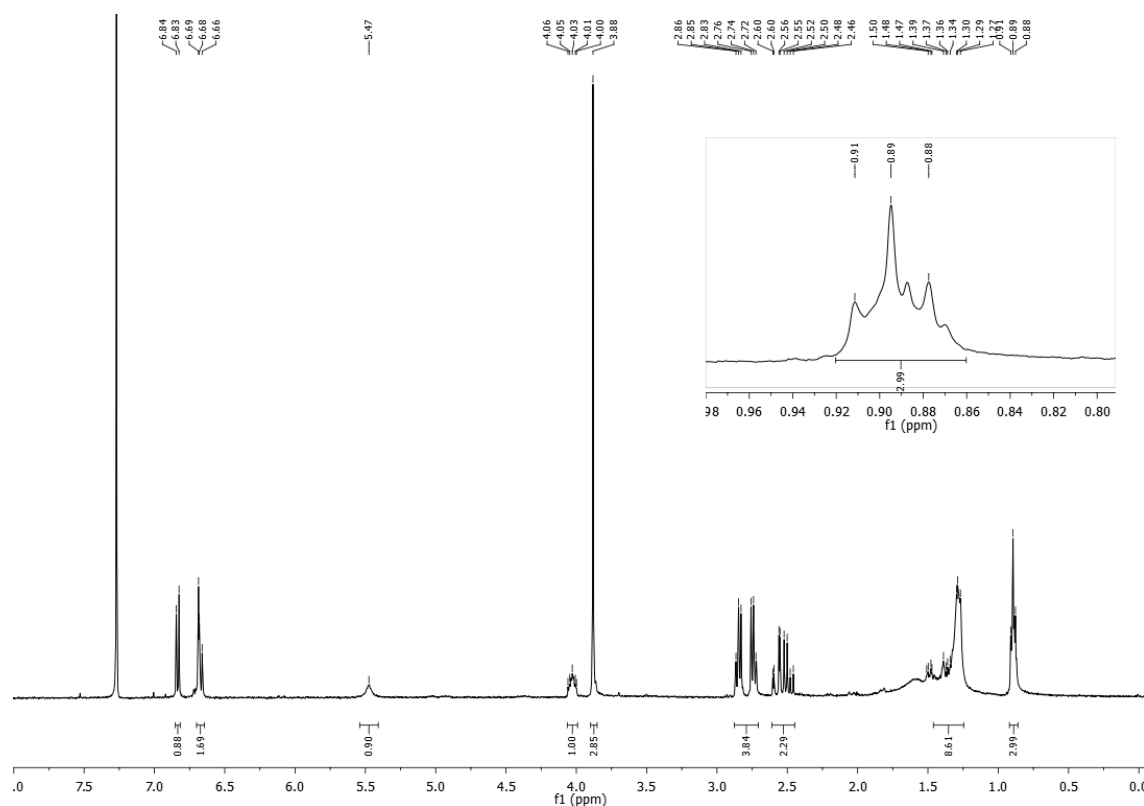
Em seguida a FEG foi analisada por HPLC como pode ser observado no cromatograma da Figura 11. Pode-se verificar que a FEG apresenta principalmente o [6]-gingerol, [8]-gingerol e [10]-gingerol, nos tempos de retenção 6,8 min, 13,1 min e 30,3 min, respectivamente. Os tempos de retenção do [6]-gingerol, [8]-gingerol e [10]-gingerol padrão, foram: 6,8 min, 13,1 min e 30,6 min, respectivamente, o que confirma a presença desses metabólitos nesta fração.

Figura 11: Cromatogramas analíticos da FEG (em preto) e dos padrões [6]-gingerol, [8]-gingerol e [10]-gingerol (em vermelho) obtidos por HPLC com as seguintes condições: coluna C18 Shim-Pack (4,6 x 250 mm, 10 μ), vazão de 1 mL/min, detecção por UV a 280 nm, fase móvel MeOH/H₂O (75/25).



Posterior, foi realizado a análise da fração enriquecida com gingeróis por ressonância magnética nuclear. O espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ¹H) da FEG (Figura 12) indica que o [6]-gingerol é o composto majoritário desta fração. Este espectro mostra que há apenas compostos da classe dos gingeróis, como: [4]-gingerol, [8]-gingerol e [10]-gingerol, que correspondem a um série homóloga dos gingeróis, pois se observa apenas sinais desses tipos de compostos, que se diferenciam unicamente pelo tamanho da cadeia lateral (Figura 2). No entanto, esses outros gingeróis se encontram como compostos minoritários desta fração.

Figura 12: Cromatograma da análise em ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN 1H) da FEG.



Fonte: próprio autor (2023).

O tripleto com deslocamento químico (δ_H) de 0,89 integrando para três hidrogênios é indicativo de hidrogênios de metila terminal de cadeias alifáticas. Um sinal largo em δ_H 1,29 integrando para oito hidrogênios indica que há hidrogênios metilênicos, como aqueles da cadeia lateral de gíngerois. Sinais em δ_H 2,40-2,60 integrando para dois hidrogênios são referentes aos hidrogênios metilênicos ligados a carbonila. Sinais em δ_H 2,6-3,0 integrando para quatro hidrogênios são indicativos de hidrogênios metilênicos benzílicos e homobenzílicos. Um singlete intenso em δ_H 3,88 integrando para três hidrogênios é característico de hidrogênios de metoxila. O quintuplete em δ_H 4,03 integrando para um hidrogênio é característico de hidrogênios oximetínicos. Na região de hidrogênios aromáticos há um conjunto de sinais (δ_H 6,66-6,88) integrando para três hidrogênios. Esses sinais apresentam um padrão típico de anel aromático 1,3,4-trissubstituído. Logo todos esses sinais indicam a presença de forma majoritária, do [6]-gingerol, principal composto fenólico presente em extratos de gengibre (Silva et al., 2012; Silva et al., 2021). Pelo menos mais um sinal, indicativo de metila terminal de cadeias alifáticas, pode ser observado no espectro da Figura 12. Este sinal e a ausência de sinais de

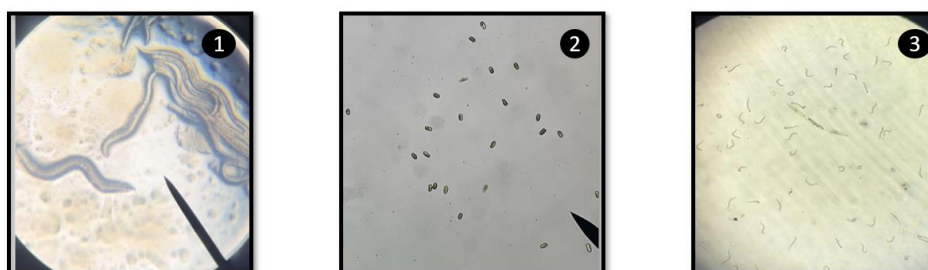
compostos diferentes dos gingeróis, sugerem a presença do [4]-, [8]- e [10]-gingerol, mas em menor quantidade do que o [6]-gingerol, como esperado (Silva et al., 2012; Silva et al., 2021).

5.3 MANUTENÇÃO E SINCRONIZAÇÃO DOS *C. elegans*

Com a chegada do *C. elegans* no Laboratório de Farmacologia Clínica e Experimental, a manutenção foi realizada com repique semanalmente nas placas de petri com o meio NGM e 10 µL de *E. coli* em cada placa e um pellet advindo de três placas distintas, totalizando 3 pellets em cada placa, para garantir a variabilidade genética dos nematoides, como pode ser observado na Figura 6 mencionada anteriormente na metodologia.

Já a sincronização foi feita após 3 dias do repique, com o intuito de ter nematoides grávidos nas placas, levando em consideração seu ciclo de vida; sendo assim possível a obtenção dos ovos. Ao finalizar a sincronização, os ovos foram colocados em placas de Petri, e esperou-se por 12 horas para começar a exposição à substância teste com o *C. elegans* no estágio larval L1 (Figura 13). Vale ressaltar que, o quantitativo de *C. elegans* em cada sincronização é muito alto, permitindo a execução de vários testes, principalmente em triplicata.

Figura 13: *C. elegans* após 3 dias de repique, prontos para sincronização (1). Ovos após sincronização (2). Vermes no estágio larval L1, após 12 horas da sincronização (3).



Fonte: próprio autor (2023).

5.4 TAXA DE SOBREVIVÊNCIA

O modelo alternativo *C. elegans* selvagem (N2) foi utilizado para investigar se as diferentes concentrações de FEG possuem toxicidade ou não para o nematoide, viabilizando a execução dos demais testes nas concentrações pré-estabelecidas, em condições padrão de laboratório.

Para isso determinou-se a taxa de sobrevivência do tipo selvagem N2, após a exposição à FEG (4, 2, 1, 0,5 e 0,25 mg/mL). Essa exposição foi de forma aguda, com duração de 30

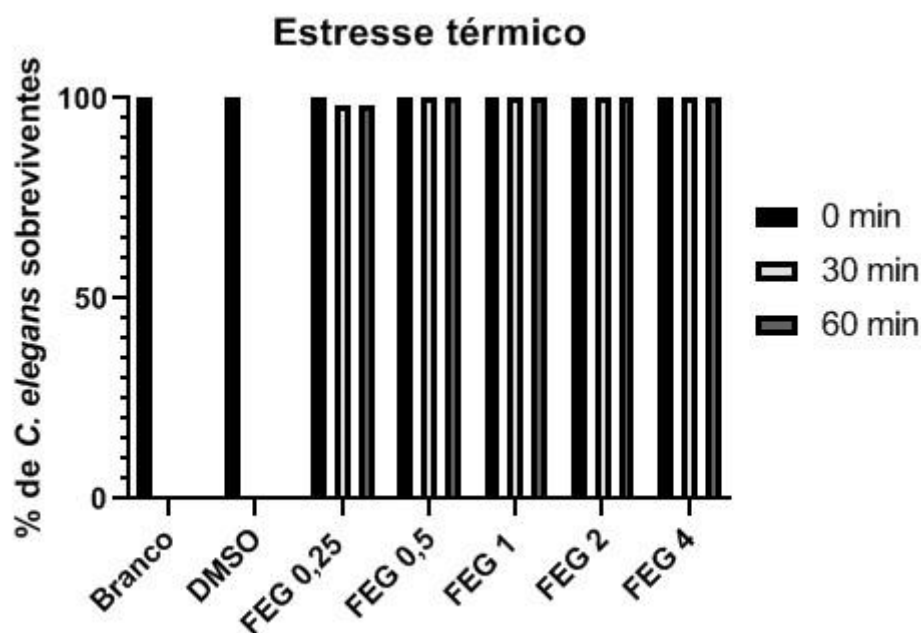
minutos. Logo após, notou-se que não houve morte dos 2500 vermes no tempo de 12 horas e 24 horas após a exposição. Dessa forma, garantiu-se que as concentrações podem ser utilizadas para os demais testes.

5.5 TOLERÂNCIA AO ESTRESSE TÉRMICO

No ensaio de estresse térmico foi aplicado aos vermes N2 do tipo selvagem para examinar o efeito da FEG sob condições de estresse. Notou-se que no tempo 0 (após a exposição, sem o estresse térmico), todos os 100 nematoides estavam vivos. Entretanto, após 24 horas da exposição, os vermes expostos no tempo 1 (30 minutos de exposição ao calor) e no tempo 2 (60 minutos de exposição ao calor), observou-se que houve mortes dos vermes do grupo controle e nenhuma morte dentre os 100 vermes sob o efeito da fração enriquecida nas concentrações 0,5 mg/mL, 1 mg/mL, 2 mg/mL e 4 mg/mL, mas houve morte de 0,2% dos vermes na presença da FEG 0,25 mg/mL.

Assim, todos os *C. elegans* expostos ao extrato de gengibre (em todas as concentrações) sobreviveram ao estresse térmico, enquanto os do grupo controle (com tampão M9 e DMSO 1%) não sobreviveram. Dessa forma, nota-se que a resistência ao estresse térmico foi adquirida após o tratamento com as concentrações (4, 2, 1, 0,5 e 0,25 mg/mL) de FEG em 100% em relação aos controles não tratados, como mostra no Figura 14.

Figura 14: Número de *C. elegans* sobreviventes após a exposição ao estresse térmico. Branco = tampão M9; DMSO 1%; FEG 0,25 mg/mL ; FEG 0,5 mg/mL; FEG 1 mg/mL; FEG 2 mg/mL; FEG 4 mg/mL.



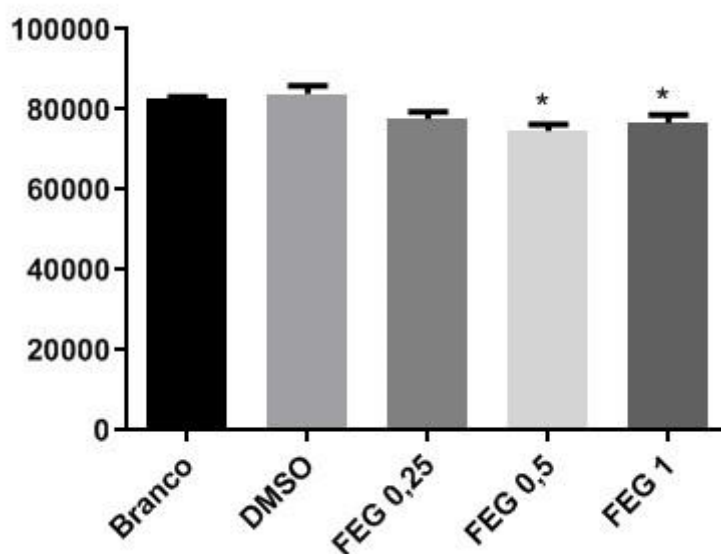
Fonte: próprio autor (2023).

5.6 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

O ensaio de vida útil e o aumento na resistência ao estresse de *C. elegans* após o tratamento com FEG forneceram informações sobre o mecanismo de longevidade, levando à investigação da sua eficácia perante a sua atividade antioxidante. Portanto, a medição espectrofotométrica foi realizada para determinar a geração das espécies reativas de oxigênio dos níveis intracelulares nos vermes tratados nas concentrações (4, 2, 1, 0,5 e 0,25 mg/mL) de FEG em comparação com os do grupo controle não tratados (branco, DMSO 1%).

No ensaio de produção de espécies reativas de oxigênio foi utilizado as menores concentrações das frações (1, 0,5 e 0,25 mg/mL). Apenas as frações de 0,5 e 1 mg/mL mostraram uma redução significativa ($p < 0,005$) das espécies reativas de oxigênio, após a exposição aguda, de 30 minutos. Notou-se que essa diminuição equivale à aproximadamente 10% da produção de EROs quando comparada ao do grupo controle (branco e DMSO), como mostra na Figura 15.

Figura 15: Efeitos da fração enriquecida em gingeróis sobre os níveis intracelulares de EROs de nematoides N2 selvagens. Branco = tampão M9; DMSO 1%; FEG 0,25 mg/mL; FEG 0,5mg/mL; FEG 1mg/mL.



Fonte: Próprio autor (2023).

6 DISCUSSÃO

A primeira etapa deste trabalho buscou compilar as evidências científicas sobre os efeitos antioxidantes dos compostos fenólicos em *C. elegans*. Através da revisão sistemática foi possível verificar que há poucos estudos com compostos fenólicos isolados abordando a atividade antioxidante no modelo alternativo *C. elegans*, o qual abrange o princípio dos 3Rs.

Vale frisar também, o quão os estudos com *C. elegans* com compostos fenólicos são recentes, sendo a primeira publicação no ano de 2010. Nos últimos anos vem crescendo o número de publicações sobre este tema, porém em um quantitativo ainda pequeno.

Dessa forma, nota-se que esse modelo alternativo é um caminho promissor de estudos. Pois, desde os anos 90, vêm sendo discutido sobre a utilização de modelos alternativos para avaliar diferentes efeitos tóxicos (Gagliano et al., 2005; Ranaldi et al., 2007; Cano-Sancho et al., 2015). Entretanto, apenas nos últimos anos vem sendo consolidado o uso de modelos alternativos, em especial o nematoide *Caenorhabditis elegans*, devido a sua eficácia em simular diferentes patologias a nível molecular, principalmente o efeito das EROs (Miranda-Vizuetea; Veal, 2017).

Outro ponto a se observar é que dos trabalhos encontrados pela revisão sistemática, em sua grande maioria, foi publicado pela China, e apenas um estudo foi realizado no Brasil, sendo um ponto crucial para a maior pesquisa nessa área. De acordo com um estudo apresentado pela

National Science Foundation (NSF) dos Estados Unidos, a China é o país que mais produz artigos científicos no mundo, chegando a ultrapassar os Estados Unidos; com o Brasil se encontrando em 12º posição nesse ranking. Nesse mesmo estudo, relatou-se que o governo chinês vem ampliando gradualmente os investimentos em Ciência, Tecnologia e Inovação, destinando cerca de US\$ 408 bilhões por ano; já o Brasil, também teve um aumento significativo, de 89% no número de artigos publicados, porém está muito abaixo das economias emergentes; ressaltando que os investimentos em ciência e tecnologia vêm caindo severamente nos últimos anos, deixando o sistema científico nacional à beira de um colapso (IPEN, 2018).

Outra perspectiva que vale frisar dentre os estudos selecionados, é a variação metodológica entre os estudos, desde a forma de extração e exposição do substrato, variando de minutos até vários dias, como também o estágio larval, indo desde embriões até o estágio L4. Diante disso, a replicabilidade assertiva da metodologia fica comprometida, implicando o resultado de viés. Isso acontece devido à possibilidade de utilização desse verme como modelo para estudos nas mais diversas áreas como: neurobiologia, biologia do desenvolvimento, farmacologia, toxicologia, genética, dentre outras. No entanto, o uso desse modelo vem crescendo na comunidade científica e, por isso, torna-se crucial o domínio das análises fisiológicas, moleculares, bioquímicas e comportamentais de *C. elegans* visando possibilitar o desenvolvimento de abordagens experimentais mais eficientes.

Vários compostos fenólicos possuem atividade antioxidante no modelo alternativo *in vivo* (*C. elegans*). Tais compostos foram capazes de reduzir as espécies reativas de oxigênio (EROs) e aumentar a produção das enzimas com atividades antioxidantes como SOD, CAT e GST, além de redução do MDA. Estudos relatam que tal propriedade se justifica pela presença do grupo hidroxila (OH); tendo em vista que, quanto maior a quantidade de OH, maior a capacidade antioxidante desses compostos (Barreiros; David; David, 2006; Vasconcelos et al., 2007; Alves et al., 2010).

Em geral, os compostos fenólicos podem ser aplicados para uma variedade de condições clínicas e em diversas patologias, devido principalmente aos seus efeitos antioxidantes. Como a exemplo da vitamina C, A, E, que agem em diversos processos antioxidantes e anti-inflamatórios (Kline et al., 2007; Frenkel et al., 2013; Pawlowska et al., 2019), bem como a curcumina, resveratrol e outros compostos que possuem grupos hidroxilos ligado diretamente a um grupo hidrocarboneto aromático que possuem atividade semelhantes (Frenkel et al., 2013).

Alguns estudos ainda relataram a relação concentração/resposta, mostrando que a grande maioria das respostas dos compostos fenólicos são dose-dependente. Como se nota em experimentos com o resveratrol, nos quais, quando se utilizou concentração de 1 mM obteve-

se redução das EROS, ao mesmo tempo que outro estudo utilizando as concentrações 50 e 100 μM não foi observado resultados positivos no experimento. Assim, corrobora-se a hipótese que as respostas produzidas pelos vermes são dose-dependentes, tendo em vista que, com concentrações maiores do composto observa-se respostas antioxidantes, enquanto com dosagens menores, não há evidência de respostas positivas. Por esta razão, mais estudos são necessários para melhor compreensão destes efeitos (Ye et al., 2010; Chen; Rezaizadehnajafi; Wink, 2012).

Diante disso e considerando o elevado potencial antioxidante dos compostos fenólicos sobre *C. elegans* (Tawfeek et al., 2019; Aranaz et al., 2020), foram realizados ensaios *in vitro* a fim de verificar o efeito antioxidante de um extrato de *Zingiber officinale* sobre *C. elegans*; tendo em vista que, os gingeróis são compostos fenólicos.

O organismo *C. elegans* foi utilizado como modelo alternativo do experimento, visando os princípios dos 3Rs e por ser um modelo bem estabelecido para a pesquisa do estresse oxidativo. Inicialmente, observou-se a sobrevivência dos vermes perante a exposição a FEG, mostrando a não toxicidade em todas as concentrações testadas. Posteriormente, os vermes da cepa N2 do tipo selvagem tratados com FEG em condições normais de cultura apresentaram maior resistência ao estresse térmico do que os vermes não tratados.

Em outro estudo observou-se que com o tratamento utilizando o 6-gingerol aumentou-se consideravelmente a meia-vida dos vermes de maneira dose-dependente, considerando a correlação entre o aumento da tolerância ao estresse e a longevidade (Kenyon, 2010). Os vermes tratados com 6-gingerol, composto majoritário da fração rica de gingeróis, exibiram um aumento significativo nas taxas de sobrevivência sob condições de estresse térmico em comparação com os vermes do grupo controle (Lee et al., 2018).

Dessa forma, os resultados sugeriram que a fração rica em gingeróis tem a capacidade de aumentar a resistência dos nematoides, sob estresse térmico, e conseqüentemente, da sua sobrevivência; visto que, o estresse influencia diretamente a sobrevivência celular. Pois, o estresse perturba a homeostase das células e induz a apoptose celular, prejudicando o funcionamento normal das células, tecidos e órgãos e levar ao desenvolvimento de diversas doenças (Desjardins et al., 2016; Song et al., 2023).

Como parte do esforço para elucidar o mecanismo do efeito antioxidante da FEG, a redução da expressão de enzimas antioxidantes que afetam os níveis de EROs foi examinada. Na cepa N2 do tipo selvagem de *C. elegans*, os níveis intracelulares de EROs foram medidos, mostrando redução no acúmulo de EROs pelo tratamento com FEG.

Estes resultados apoiaram a hipótese de que o efeito antioxidante da FEG contribui para o prolongamento da vida dos nematoides, em parte, através dos níveis de EROs, reforçando a estreita relação entre o estresse oxidativo e o envelhecimento. Levando em consideração que, a superprodução de EROs e as reações desses radicais livres com as células, são um dos causadores das mutações genéticas e morte celular, resultando em patologias e/ou envelhecimento (Kenyon, 2010; Lee et al., 2018).

Em resumo, a investigação experimental do estudo isolou a fração rica em gingeróis do *Z. officinale* e testou seu efeito antioxidante em *C. elegans*, através dos ensaios de tolerância ao estresse térmico e produção das EROs. Tais resultados confirmaram o efeito antioxidante por apresentarem a maior sobrevivência dos nematoides após exposição ao calor, e a redução na produção das EROs, apoiando o mecanismo proposto e corroborando o efeito farmacológico dessa planta.

7 CONCLUSÕES

A partir da compilação dos artigos sobre efeito antioxidante, pode-se notar que os compostos fenólicos possuem efeito antioxidante sobre *C. elegans*. Entretanto, os estudos precisam melhorar a qualidade metodológica, padronizar as metodologias, para que sejam fornecidas evidências de alta qualidade.

Os dados obtidos a partir dos ensaios *in vitro* indicam que a fração enriquecida de gingeróis (FEG) aumenta a resistência do *C. elegans* ao estresse térmico. Além disso, reduz, significativamente, os níveis de EROs intracelular.

Dessa maneira, os resultados obtidos sugerem que os compostos fenólicos apresentam atividade antioxidante sobre *C. elegans*, como pôde ser evidenciado experimentalmente, com a fração rica em gingeróis obtida do gengibre; tendo em vista que seus principais metabólitos secundários, os gingeróis, são compostos fenólicos. Dessa forma, os compostos fenólicos podem auxiliar no tratamento de diversas patologias que estão relacionadas com o desequilíbrio redox.

8 PERSPECTIVAS

Toda a metodologia e os resultados obtidos nesse trabalho possui a pretensão de ser publicado no Periódico PLOS ONE que é uma revista científica de acesso livre disponível apenas *online*, publicada pela Public Library of Science, Qualis A1, fator de impacto 2,776.

Já para a revisão sistemática, almeja-se a publicação na *Phytomedicine*, uma revista que abrange as áreas de fitoterapia, fitomedicina e toxicologia de plantas e seus extratos. Esta revista possui qualis A1 e fator de impacto 6,656.

9 REFERENCIAS

- ALI, F.; CHORSIYA, A.; ANJUM, V.; KHASIMBI, S.; ALI, A. A systematic review on phytochemicals for the treatment of dengue. **Phytother Res.** 2021 Apr;35(4):1782-1816. doi: 10.1002/ptr.6917. Epub 28 Oct 2020.
- ALTUN, Z.; HALL, D. **Introdução. Atlas do Verme.** 10.3908/wormatlas.1.1. 2009.
- ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. L.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. M. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Química Nova**, 33, 2202-2210, 2010.
- AMIRA, A.G.; KHAYRIA, M.N.; MAGDY, M.M.; HASSAN, A.A.; SOMAIA, A.N.; ABDEL-RAHMAN, B.A.; CHRIS, R.G.; KHALID, A.El.S.; Astaxanthin and Docosaehexaenoic Acid Reverse the Toxicity of the Maxi-K (BK) Channel Antagonist Mycotoxin Penitrem A. **Marine Drugs**, 14, 208, 2016.
- APFELD J.; ALPER S. O que podemos aprender sobre doenças humanas com o nematóide *C. elegans*? **Métodos Mol Biol.**; 1706: 53-75. 2018.
- ARANAZ, P.; NAVARRO-HERRERA, D.; ZABALA, M.; ROMO-HUALDE, A.; LÓPEZ-YOLDI, M.; VIZMANOS, J. L.; MILAGRO, F. I.; GONZÁLEZ-NAVARRO, C. J. Phenolic Compounds Reduce the Fat Content in *Caenorhabditis elegans* by Affecting Lipogenesis, Lipolysis, and Different Stress Responses. **Pharmaceuticals (Basel)**. 2020 Oct 30;13(11):355. doi: 10.3390/ph13110355. PMID: 33143060; PMCID: PMC7693530.
- ARRUDA, A. P. N.; ZHANG, Y.; GOMAA, H.; BERGAMASCHI, C. C.; GUIMARAES, C. C.; RIGHESSO, L. A. R.; PAGLIA, M. D. G.; BARBERATO-FILHO, S.; LOPES, L. C.; AYALA, M. A. P.; OLIVEIRA, L. D.; PAULA-RAMOS, L.; JOHNSTON, B.; EL DIB, R. Herbal medications for anxiety, depression, pain, nausea and vomiting related to preoperative surgical patients: a systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. **BMJ Open**. 2019 May 24;9(5):e023729.
- ARSLAN, M.; OZDEMIR, L. Oral intake of ginger for chemotherapy-induced nausea and vomiting among women with breast cancer. **Clin J Oncol Nurs**. 2015; 19(5):E92–97. doi:10.1188/15.CJON.E92-E97
- AVILA, D. S.; BENEDETTO, A.; AU, C. et al. Organotellurium and organoselenium compounds attenuate Mn-induced toxicity in *Caenorhabditis elegans* by preventing oxidative stress. **Free Radic Biol Med**. 52, 1903–1910, 2012.
- BAI, S.; YU, Y.; NA, L.; WANG, W.; FU, X.; CHEN, J.; MA, J. Ellagic Acid Increases Stress Resistance via Insulin/IGF-1 Signaling Pathway in *Caenorhabditis elegans*. **Molecules**.

2022 Sep 20;27(19):6168. doi: 10.3390/molecules27196168. PMID: 36234702; PMCID: PMC9571563.

BALLS, M., VAN ZELLER, A.M., HALDER, M., Progress in the reduction, refinement and replacement of animal experimentation. **Amsterdam: Elsevier**, p. 17-22, 2000.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, 29, 113-123, 2006.

BERLETT, B.S.; STADTMAN, E.R. Oxidação de proteínas no envelhecimento, doença e estresse oxidativo. **J. Bio. Química** 1997; 272 :20313–20316. doi: 10.1074/jbc.272.33.20313

BORGONETTI, V.; GOVERNA, P.; BIAGI, M.; PELLATI, F.; GALEOTTI, N. Zingiber officinale Roscoe rhizome extract alleviates neuropathic pain by inhibiting neuroinflammation in mice. **Phytomedicine**. 2020 Nov;78:153307. doi: 10.1016/j.phymed.2020.153307. Epub 2020 Aug 19.

BRADFORD, M. M. **Anal. Biochem.**, 72, 248-254, 1976.

BRASIL, Ministério da Saúde. **RENISUS – Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS Espécies vegetais** [Internet]. DAF/SCTIE/MS; 2009 fev. [cited 2022 Jun 9]. Available from: <https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2014/maio/07/renisus.pdf>

BRENNER, S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. **Genetics.**; 77, 71–94, 1974.
CANO-SANCHO, G. et al. Cytotoxicity of the mycotoxins deoxynivalenol and ochratoxin A on Caco-2 cell line in presence of resveratrol. **Toxicology in Vitro**, 29, 1639-1646, 2015.

BÜCHTER, C.; ZHAO, L.; HAVERMANN, S.; HONNEN, S.; FRITZ, G.; PROKSCH, P.; WÄTJEN, W. TSG (2,3,5,4'-Tetrahydroxystilbene-2-O- β -D-glucoside) from the Chinese Herb Polygonum multiflorum Increases Life Span and Stress Resistance of *Caenorhabditis elegans* Hindawi Publishing Corporation. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. 2015.

CARVALHO, G.N.C.; LIRA-NETO, J.C.G.; NUNES, L.C.C.; ALENCAR, A.M.P.G.; MARQUES, R.L.L.; DAMASCENO, M.M.C. Effectiveness of ginger in the treatment of Type 2 Diabetes Mellitus: A pilot study of the randomized clinical trial type. **Aquichan**. 2021;21(1):e211. DOI: <https://doi.org/10.5294/aqui.2021.21.1.5>

CASSADA, R.C.; RUSSEL R.L. The dauer larva, a post-embryonic developmental variant of the nematode *Caenorhabditis elegans*. **Development biology**. v. 46, p. 326-342, 1975.

CAZARIN, K.C.C.; CORREA, C.L.; ZAMBRONE, F.A.D.; Redução, refinamento e substituição do uso de animais em estudos toxicológicos: uma abordagem atual. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, 40, 289-299, 2004.

CHAKRABORTY, D.; MUKHERJEE, A.; SIKDAR, S.; PAULA GHOSH, S.; KHUDABUKHSH, A. R. 6-Gingerol isolated from ginger attenuates sodium arsenite induced oxidative stress and plays a corrective role in improving insulin signaling in mice. **Toxicology Letters**, 210, 34-43, 2012.

CHARÃO, M. F.; SOUTO, C.; BRUCKER, N.; BARTH, A.; JORNADA, D. S.; FAGUNDEZ, D.; ÁVILA, D. S.; EIFLER-LIMA, V. F.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R.; GARCIA, S. C. *Caenorhabditis elegans* as an alternative in vivo model to determine oral uptake, nanotoxicity, and efficacy of melatonin-loaded lipid-core nanocapsules on paraquat damage. **International Journal of Nanomedicine**, 10, 5093–5106, 2015.

CHEN, W.; REZAIZADEHNAJAFI, L.; WINK, M. Influence of resveratrol on oxidative stress resistance and life span in *Caenorhabditis elegans*. **J Pharm Pharmacol**. 2013 May;65(5):682-8. doi: 10.1111/jphp.12023. Epub 2013 Jan 31. PMID: 23600385.

CHO, M.; KIM, Y.; YOU, S.; HWANG, D. Y.; JANG, M. Chlorogenic Acid of *Cirsium japonicum* Resists Oxidative Stress Caused by Aging and Prolongs Healthspan via SKN-1/Nrf2 and DAF-16/FOXO in *Caenorhabditis elegans*. **Metabolites**. 2023 Feb 3;13(2):224. doi: 10.3390/metabo13020224. PMID: 36837843; PMCID: PMC9959019.

COLES, G.C. Drug resistance and drug tolerance in parasites. **Trends in Parasitology**. v. 22, p. 348, 2006

CORREA, J.C. Cultivo de plantas medicinais, condimentares e aromáticas. 2 ed. **Jaboticabal: FUNEP**, 1994.162 p.

CORSI, A.K.; WIGHTMAN, B.; CHALFIE, M.; A transparent window into biology: a primer on *Caenorhabditis elegans*. **Genetics**. 200, 387–407, 2015.

CUNHA, K. F. DA; SILVA, F. T. DA; OLIVEIRA, J. P. DE; ZAVAREZE, E. DA R.; DIAS, A. R. G.; FIORENTINI, Â. M. **Potencial antibacteriano do óleo essencial de gengibre (*zingiber officinale roscoe*) contra bactérias de importância em alimentos**. XIX Encontro de pós-graduação. 3º semana integrada UFPEL. 2017.

CUTRIM, E. S. M.; TELES, A. M.; MOUCHREK, A. N.; MOUCHREK FILHO, V. E.; EVERTON, G. O. Avaliação da Atividade Antimicrobiana e Antioxidante dos Óleos Essenciais e Extratos Hidroalcoólicos de *Zingiber officinale* (Gengibre) e *Rosmarinus officinalis* (Alecrim). **Rev. Virtual Quim**, 11 (1), 60-81. 2019.

DALBEN, D.; EMMEL, J. L. A Lei Arouca e os direitos dos animais utilizados em experimentos científicos. **Revista Eletrônica de Iniciação Científica**. 2013;4(4):280-91.

DEL GROSSI, M.M.; LOPES, L.C.; BIAVATTI, M.W.; KENNEDY, S.A.; OLIVEIRA, E.; SILVA, M.C.; SILVA, M.T.; BERGAMASCHI, C.C. Oral herbal medicines marketed in Brazil for the treatment of osteoarthritis: A systematic review and meta-analysis. **Phytother Res**. 2017 Nov;31(11):1676-1685. doi: 10.1002/ptr.5910. Epub 2017 Sep 5.

DESJARDINS, D.; CACHO-VALADEZ, B.; LIU, J. L.; WANG, Y.; YEE, C.; BERNARD, K.; KHAKI, A.; BRETON, L.; HEKIMI, S. Antioxidants reveal an inverted U-shaped dose-response relationship between reactive oxygen species levels and the rate of aging in *Caenorhabditis elegans*. **Aging Cell**. 2017 Feb;16(1):104-112. doi: 10.1111/accel.12528. Epub 2016 Sep 28. PMID: 27683245; PMCID: PMC5242296.

DUGASANI, S.; PICHIKA, M.R.; NADARAJAH, V.D.; BALIJEPALLI, M.K.; TANDRA, S.; KORLAKUNTA, J.N. Efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios comparativos de [6]-gingerol, [8]-gingerol, [10]-gingerol e [6]-shogaol. **Revista de Etnofarmacologia**. 2010; 127 (2): 515-520. doi: 10.1016/j.jep.2009.10.004.

FAJRIN, F.A.; PURWANDHONO, A.; CHRISTIANTY, F.M; SULISTYANINGRUM, G.D; AFIFAH, -; IMANDASARI, N.; BARKI, T. Antihyperalgesia potency of Zingiber officinale var. Rubrum in inflammatory and neuropathy-induced chronic pain condition in mice. **Pak J Pharm Sci** ; 32(4): 1663-1669, Jul. 2019.

FILIPPOPOULOU, K.; PAPAEOGENIOU, N.; LEFAKI, M.; PARASKEVOPOULOU, A.; BIEDERMANN, D.; KŘEN, V.; CHONDROGIANNI, N. 2,3-Dehydrosilybin A/B as a pro-longevity and anti-aggregation compound. **Free Radic Biol Med**. 2017 Feb;103:256-267. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.12.042. Epub 2016 Dec 28. PMID: 28039083.

FISCHERA, NA.; BUCHTER, C.; KOCHA, K.; ALBERTB, S.; CSUK, R.; WATJEN, W. The resveratrol derivatives trans-3,5-dimethoxy-4-fluoro-4'-hydroxystilbene and trans-2,4,6-trihydroxystilbene decrease oxidative stress and prolong lifespan in *Caenorhabditis elegans*. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 69, pp. 73–81, 2017.

FRENKEL, M.; ABRAMS, D.; LADAS, E.; DENG, G.; HARDY, M.; CAPODICE, J.; WINEGARDNER, M.; GUBILI, J.; YEUNG, K.; KUSSMANN, H.; BLOCK, K. Integrating dietary supplements into cancer care. **Integrative Cancer Therapies**, v. 12, p. 369-84, 2013.

FUNK, J.L.; JENNIFER, B.F.; OYARZO, J.N.; TIMMERMANN, B.N. Anti-inflammatory effects of the essential oils of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) in experimental rheumatoid arthritis. **Pharmanutrition**, 4(3),123–131. 2016.

GAGLIANO, N. et al. A-Induced Renal Cortex Fibrosis and Epithelial-to-Mesenchymal Transition: Molecular Mechanisms of Ochratoxin A-Injury and Potential Effects of Red Wine. **Molecular Medicine**, 11, 2005.

GANESH, J.; MANJESHWAR, B.; PONEMONE, V. Gengibre (*Zingiber officinale* Rosc.), um suplemento dietético, protege ratos contra letalidade induzida por radiação: mecanismo de ação. **Bioterapia e Radiofármacos do Câncer**. Agosto de 2004.422-435.<http://doi.org/10.1089/cbr.2004.19.422>

GAUTHIER, M.A.; BEAUDRY, F.; VACHON, P. Intrathecal [6]-Gingerol Administration Alleviates Peripherally induced Neuropathic Pain in Male Sprague–Dawley Rats. **Phytotherapy Research** [Internet]. 2012 Sep 12 [cited 2022 Jun 10];27(8):1251-1254. DOI <https://doi.org/10.1002/ptr.4837>.

GIUNTI, S.; ANDERSEN, N.; RAYES, D.; ROSA, M. J. DE Descoberta de medicamentos: percepções do invertebrado *Caenorhabditis elegans*. **Pharmacology Research e Perspectives**. Volume 9 , Edição 2. 2021.

GORREPATI, V. The Effect of Acetaminophen (Analgesic) and Diphenhydramine (Antihistamine) on Nociception Response of *Caenorhabditis elegans*, Heart Rate of *Eisenia fetida*, and Mortality of Both *E. fetida* and *C. elegans*. **Journal of the South Carolina Academy of Science**: Vol. 16: Iss. 2, Article 3. 2019.

GRÉGIO, A.M.T.; FORTES, E.S.M.; ROSA, E.A.R.; SIMEONI R.B.; ROSA, R.T. Antimicrobial activity from *Zingiber officinale* on oral cavity pathogens. **Estud. Biol.**, Vol. 28, n. 62, p. 61-66, 2006.

GUBERT, P.; AVILA, D. S.; COA, F.; BIANCHINI, M. C. Guia para pesquisadores iniciantes em *Caenorhabditis elegans* [livro eletrônico] / Organizadora Priscila Gubert. – Rio de Janeiro, RJ: **e-Publicar**, 2022.

GUINNET, A.; MAITRA, M.; PRADHAN, S.; HENDRICKS, M. Um habitat tridimensional para *C. elegans* enriquecimento ambiental. (2021). **PLoS ONE** 16(1): e0245139. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0245139>

GUTIERREZ-ZETINA, S. M.; GONZÁLEZ-MANZANO, S.; AYUDA-DURÁN, B.; SANTOS-BUELGA, C.; GONZÁLEZ-PARAMÁS, A. M. Caffeic and Dihydrocaffeic Acids Promote Longevity and Increase Stress Resistance in *Caenorhabditis elegans* by Modulating Expression of Stress-Related Genes. **Molecules**. 2021 Mar 10;26(6):1517. doi: 10.3390/molecules26061517. PMID: 33802064; PMCID: PMC8001149.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C.; Free radicals in biology and medicine. 4 ed., Oxford: **Oxford University Press**, 852, 2007.

HIROTSU, T.; SONODA, H.; UOZUMI, T.; SHINDEN, Y.; MIMORI, K.; MAEHARA, Y.; UEDA, N.; HAMAKAWA, M. A highly accurate inclusive cancer screening test using *caenorhabditis elegans* scent detection. **Plosone**. v. 11, p. 10-13, 2015. Disponível em: doi.org/10.1371/journal.pone.0118699. Acesso em: 12 jun 2022.

HITOMI, S.; ONO, K.; TERAWAKI, K.; MATSUMOTO, C.; MIZUNO, K.; YAMAGUCHI, K.; IMAI, R.; OMIYA, Y.; HATTORI, T.; KASE, Y.; INENAGA, K. [6]-gingerol and [6]-shogaol, active ingredients of the traditional Japanese medicine hangeshashinto, relief oral ulcerative mucositis-induced pain via action on Na⁺ channels. **Pharmacol Res**. 2017 Mar; 117:288-302. doi: 10.1016/j.phrs.2016.12.026. Epub 2016 Dec 30.

HONG, Q.; GENG, S.; JI, J.; YE, Y.; XU, D.; ZHANG, Y.; SUN, X. Separation and identification of antioxidant chemical components in *Diaphragma juglandis* Fructus and functional evaluation in *Caenorhabditis elegans*. **Journal of Functional Foods** 80. 2021.

HOOIJMANS, C. R.; ROVERS, M. M.; DE VRIES, R. B. M.; LEENAARS, M.; RITSKES-HOITINGA, M.; LANGENDAM, M. W. SYRCLE's risk of bias tool for animal studies. **BMC Med. Res. Methodol**. 14, 43. 2014.

HULME, S.E.; WHITESIDES, G.M. Chemistry and the worm: *Caenorhabditis elegans* as a platform for integrating chemical and biological research. **Angew. Chem. Int. Ed. Engl**. 50, 4774–4807 (2011).

HUNT, P.R. The *C. elegans* model in toxicity testing. **Journal of Applied Toxicology**, v. 37, n. 1, p. 50-59, 2017. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jat.3357> Acesso em: jun. 2022.

IPEN (Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares Ciência e Tecnologia a serviço da vida). **Jornal da Ciência**. Acessado: 20 de dezembro de 2023. Disponível em: <
https://www.ipen.br/portal_por/portal/interna.php?secao_id=40&campo=9964>.

JATTUJAN, P.; CHALORAK, P.; SIANGCHAM, T.; SANGPAIROJ, K.; NOBSATHIAN, S.; POOMTONG, T.; SOBHON, P.; MEEMON, K. Holothuria scabra extracts possess anti-oxidant activity and promote stress resistance and lifespan extension in *Caenorhabditis elegans*. **Exp Gerontol**. 2018 Sep;110:158-171. doi: 10.1016/j.exger.2018.06.006. Epub 2018 Jun 11. PMID: 29902502.

JEENA, K.; LIJU, V.B.; KUTTAN, R. Antioxidant, anti-inflammatory and antinociceptive activities of essential oil from ginger. **Indian J Physiol Pharmacol** ; 57(1): 51-62, 2013.

KALETSKY, R.; MURPHY, C. T. O papel da sinalização semelhante à insulina / IGF na longevidade e envelhecimento de *C. elegans*. **Biologia molecular**. Instituto Lewis-Sigler de Genômica Integrativa. 2010.

KARIMI, N.; ROSHAN, V.D. Change in adiponectin and oxidative stress after modifiable lifestyle interventions in breast cancer cases. **Asian Pac J Cancer Prev**. 2013; 14(5):2845–50. doi:10.7314/apjcp.2013.14.5.2845

KENYON, C. J. A genética do envelhecimento. **Natureza**. 2010; 464 :504–512. doi: 10.1038/nature08980.

KHALID, M.H.; AKHTAR, M.N.; MOHAMAD, A.S.; PERIMAL, E.K.; AKIRA, A.; ISRAF, D.A.; LAJIS, N.; SULAIMAN, M.R. Antinociceptive effect of the essential oil of *Zingiber zerumbet* in mice: possible mechanisms. **J Ethnopharmacol**. 137(1): 345-51, 2011 Sep 01.

KIM, Y. S.; SEO, H. W.; LEE, M. H.; KIM, D. K.; JEON, H.; CHA, D. S. Protocatechuic acid extends lifespan and increases stress resistance in *Caenorhabditis elegans*. **Arch Pharm Res**. 2014 Feb;37(2):245-52. doi: 10.1007/s12272-013-0183-6. Epub 2013 Jun 20.

KIM, D K.; JEON, H.; CHA, D. S. 4-Hydroxybenzoic acid-mediated lifespan extension in *Caenorhabditis elegans*. **Journal of functional foods**. 7. 630 – 640. 2014.

KIUCHI, F.; IWAKAMI, S.; SHIBUYA, M.; HANAOKA, F.; SANKAWA, U. Inhibition of prostaglandin and leukotriene biosynthesis by gingerols and diarylheptanoids. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin** 40, 387–391. 1992.

KLINE, K.; LAWSON, K.; YU, W.; SANDERS, B. Vitamin E and cancer. **Vitamins & Hormones**, v. 76, p. 435-61, 2007.

KLUTH, D. A. et al. Modulation of pregnane X receptor- and electrophile responsive element-mediated gene expression by dietary polyphenolic compounds. **Free Radic Biol Med**, v. 42, n3, p.315-25, 2007.

KRELL, A. J.; LIMA, M. V. C. A vedação constitucional de práticas cruéis contra animais e a correta interpretação das normas legais sobre vivissecção pelas comissões de ética no uso de animais. **Ver Bras Dir Anim.** 2015;10(19):113-53.

LAI, C. H. Identificação de novos genes humanos evolutivamente conservados em *Caenorhabditis elegans* por proteômica comparativa. **Genoma Res.** 10 (5), 2000.

LANDIS, J. R.; KOCH, G. G. A medida da concordância do observador para dados categóricos. **Biometria** 33, 159–174. 1977.

LEE, E.B.; KIM, J.H.; AN, C.W.; KIM, Y.J.; NOH, Y.J.; KIM, S.J.; KIM, J.E.; SHRESTHA, A.C.; HAM, H.N.; LEEM, J.Y.; JO, H.K.; KIM, D.S.; MOON, K.H.; LEE, J.H.; JEONG, K.O.; KIM, D.K. Longevidade e Propriedade Resistente ao Estresse de 6-Gingerol de *Zingiber officinale* Roscoe em *Caenorhabditis elegans*. **Biomoléculas & terapêuticas**, 26 (6), 568-575. 2018. <https://doi.org/10.4062/biomolther.2017.215>

LEMOIS JÚNIOR, H.P.; LEMOS, A. L. A. Gengibre. **Diagn Tratamento**. 15(4):174-8; 2010.

LIAO, V. H.; YU, C. W.; CHU, Y. J.; LI, W. H.; HSIEH, Y. C.; WANG, T. T. Curcumin-mediated lifespan extension in *Caenorhabditis elegans*. **Mech Ageing Dev.** 2011 Oct;132(10):480-7. doi: 10.1016/j.mad.2011.07.008. Epub 2011 Aug 9. PMID: 21855561.

LIN, C.; XIAO, J.; XI, Y.; ZHANG, X.; ZHONG, Q.; ZHENG, H.; CAO, Y.; CHEN, Y. Rosmarinic acid improved antioxidant properties and healthspan via the IIS and MAPK pathways in *Caenorhabditis elegans*. **Biofactors**. 2019 Sep;45(5):774-787. doi: 10.1002/biof.1536. Epub 2019 Jun 17. PMID: 31206890.

LIN, C.; ZHANG, X.; SU, Z.; XIAO, J.; LV, M.; CAO, Y.; CHEN, Y. Carnosol Improved Lifespan and Healthspan by Promoting Antioxidant Capacity in *Caenorhabditis elegans*. **Oxid Med Cell Longev.** 2019 Jun 24;2019:5958043. doi: 10.1155/2019/5958043. PMID: 31341531; PMCID: PMC6612998.

LI, J.; LIU, D.; LI, D.; GUO, Y.; DU, H.; CAO, Y. Phytochemical Composition and Anti-Aging Activity of Butanol Extract of *Hedyotis diffusa* in *Caenorhabditis elegans*. **Chem Biodivers.** 2022 Feb;19(2):e202100685. doi: 10.1002/cbdv.202100685. Epub 2022 Jan 13. PMID: 34935259.

LI, W.; LI, Z.; PENG, M.; ZHANG, X.; CHEN, Y.; YANG, Y.; ZHAI, X.; LIU, G.; CAO, Y. Oenothien B boosts antioxidant capacity and supports metabolic pathways that regulate antioxidant defense in *Caenorhabditis elegans*. **Food Funct.**, 11, 9157–9167. 2020.

LISBOA, J. S. **Biotransformação de Gingeróis por Fungos Endofíticos Isolados de *Humirianthera ampla*** [TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO]. [place unknown]: Universidade Federal de Sergipe; 2019.

MAJOLO, C.; NASCIMENTO, V.P.; CHAGAS, E.C.; CHAVES, F.C.M. Atividade antimicrobiana do óleo essencial de rizomas de açafrão (*Curcuma longa* L.) e gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) frente a salmonelas entéricas isoladas de frango resfriado. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Campinas, v.16, n.3, p.505-512, 2014.

MANALO, R. V. M.; LAPUZ, M. B. L. C.; LIM, K. K.; LEGASPI, K. E. Y.; LOTA, P. M.; LUCAS, F. M. B.; MALIPOT, A. N. M.; VINSON C.; LO C. B. O.; LICHAUCO, A. K. P.; MEDINA, P. M. B. The effects of ginger (*Zingiber officinale*) rhizome extract on ethanol-induced behaviors in *C. elegans*. **Journal of Applied Pharmaceutical Science** 12 (05); 2022.

MARMITT, D.J.; BITENCOURT, S.; SILVA, G.R.D.; REMPEL, C.; GOETTERT, M.I. RENISUS Plants and Their Potential Antitumor Effects in Clinical Trials and Registered Patents. **Nutr Cancer**. 2021;73(10):1821-1848. doi: 10.1080/01635581.2020.1810290. Epub 2020 Aug 24.

MATA-BERMUDEZ, A.; IZQUIERDO, T.; LOS MONTEROS-ZUÑIGA, E.; COEN, A.; GODÍNEZ-CHAPARRO, B. Antiallodynic effect induced by [6]-gingerol in neuropathic rats is mediated by activation of the serotonergic system and the nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate-adenosine triphosphate-sensitive K⁺ channel pathway. **Phytother Res**. 2018 Dec;32(12):2520-2530. doi: 10.1002/ptr.6191. Epub 2018 Sep 24.

MEKHEIMER, R.A.; SAYED, A.A.; AHMED, E.A. As novas 1,2,4-triazolo[1,5-a]piridinas e seus sistemas de anéis fundidos atenuam o estresse oxidativo e prolongam a vida útil de *Caenorhabditis elegans*. **J. Med. Química** 2012; 55 :4169–4177. doi: 10.1021/jm2014315.

MIRANDA-VIZUETEA, A.; VEAL, E. A. *Caenorhabditis elegans* as a model for understanding ROS function in physiology and disease. **Redox Biology**, 11, 708-714, 2017.

MOHAMED, O. I.; EL-NAHAS A. F.; EL-SAYED, Y. S.; ASHRY, K. M. O extrato de gengibre modula o estresse oxidativo hepático induzido por Pb e a expressão de transcritos de genes antioxidantes em fígado de rato, **Pharmaceutical Biology**, 54:7, 1164- 1172. 2016. DOI:10.3109/13880209.2015.1057651

MOHD SAHARDI, N.F.N.; MAKPOL, S. Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) na prevenção do envelhecimento e doenças degenerativas: revisão das evidências atuais. **Medicina Complementar e Alternativa Baseada em Evidências**. 2019; 2019 :13. doi: 10.1155/2019/5054395. 5054395

MONTAZERI, A.S.; RAEI, M.; GHANBARI, A.; DADGARI, A.; MONTAZERI, A. S.; HAMIDZADEH, A. Effect of herbal therapy to intensity chemotherapy-induced nausea and vomiting in cancer patients. **Iran Red Crescent Med J**. 2013;15(2):101–6. doi:10.5812/ircmj.4392

NA, M.K.; BAE, K.H. Compostos naturais com atividade antioxidante: descobertas recentes de estudos com plantas medicinais. **Nat. Prod. Sci**. 2011; 17 :65-79.

NEGI, H.; SAIKIA, S. K.; KANAUIA, R.; JAISWAL, S.; PANDEY, R. 3β-Hydroxy-urs-12-en-28-oic acid confers protection against ZnONPs induced adversity in *Caenorhabditis elegans*. **Environ Toxicol Pharmacol**. 2017 Jul;53:105-110. doi: 10.1016/j.etap.2017.05.004. Epub 2017 May 8. PMID: 28531761.

NEGRELLE, R.R.B.; ELPO, E.R.S.; RÜCKER, N.G.A. Análise prospectiva do agronegócio gengibre no estado do Paraná. **Horticultura Brasileira**, Brasília, Vol.23, n.4, p.1022-1028, 2005.

NIDHEESH, T.; SALIM, C.; RAJINI, P. S.; SURESH, P. V. Antioxidant and neuroprotective potential of chitooligomers in *Caenorhabditis elegans* exposed to Monocrotophos. **Carbohydr Polym.** 2016 Jan 1;135:138-44. doi: 10.1016/j.carbpol.2015.08.055. Epub 2015 Aug 21.

NIGON, V. M.; FÉLIX, M. A. History of research on *C. elegans* and other free-living nematodes as model organisms. **Wormbook**, p. 1-84, 2017. Disponível em: http://www.wormbook.org/chapters/www_nematodeshistory/nematodeshistory.pdf Acesso em: 5 jun. 2022.

NKAMBEU, B.; SALEM, J. B.; BEAUDRY, F. Capsaicin and Its Analogues Impede Nocifensive Response of *Caenorhabditis elegans* to Noxious Heat. **Neurochem Res.** 2020 Aug;45(8):1851-1859. doi: 10.1007/s11064-020-03049-4. Epub 2020 May 16.

NOBRE, P. C.; VARGAS, H. A.; JACOBY, C. G.; SCHNEIDER, P. H.; CASARIL, A. M.; SAVEGNAGO, L.; SCHUMACHER, R. F.; LENARDÃO, E. J.; ÁVILA, D. S.; JUNIOR, L. B. L. R.; PERIN, G. Synthesis of enantiomerically pure glycerol derivatives containing an organochalcogen unit: In vitro and in vivo antioxidant activity **Arabian Journal of Chemistry** 13, 883–899. 2020.

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

O'REILLY, L.P.; LUKE, C.J.; PERLMUTTER, D.H.; SILVERMAN, G.A.; PAK, S.C. *C. elegans* na descoberta de drogas de alto rendimento. **Av. Droga Entrega. Rev.** 69–70 , 247–253 (2014).

OUZZANI, M.; HAMMADY, H.; FEDOROWICZ, Z.; E ELMAGARMID, A. Rayyan-um aplicativo web e móvel para revisões sistemáticas. **Súmula Rev.** 5, 210. 2016.

OZKUR, M.; BENLIER, N.; TAKAN, I.; VASILEIOU, C.; GEORGAKILAS, A. G.; PAVLOPOULOU, A.; CETIN, Z.; SAYGILI, E. I. Gengibre para o envelhecimento saudável: uma revisão sistemática sobre as evidências atuais de suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e anticancerígenas. **Medicina oxidativa e longevidade celular.** 2022. <https://doi.org/10.1155/2022/4748447>

PAGE, M. J.; MCKENZIE, J. E.; BOSSUYT, P. M.; BOUTRON, I.; HOFFMANN, T. C.; MULROW, C. D., et al. A declaração PRISMA 2021: Uma diretriz atualizada para relatar revisões sistemáticas. **BMJ** 2020, n372. DOI:71.10/bmj.n1136

PAIXÃO, V.L.B.; CARVALHO, J.F. Essential oil therapy in rheumatic diseases: A systematic review. **Complement Ther Clin Pract.** 2021 May;43:101391. doi: 10.1016/j.ctcp.2021.101391. Epub 2021 Apr 14.

PALMEIRA, P. T. DE S. S.; LEAL, P. M.; NETO, J. DE A. F.; SIMÕES, T. M. S.; BATISTA, A. L. A.; CATÃO, M. H. C. DE V. O USO DO GENGIBRE (*Zingiber officinale*) EM ODONTOLOGIA: PROPRIEDADES E APLICAÇÕES TERAPÊUTICAS. **Braz. J. Surg. Clin. Res.** V.27, n.2, pp.110-115. Jun – Ago, 2019.

PANAHI, Y.; SAADAT, A.; SAHEBKAR, A.; HASHEMIAN, F.; TAGHIKHANI, M.;

ABOLHASANI, E. Effect of ginger on acute and delayed chemotherapy-induced nausea and vomiting: a pilot, randomized, open-label clinical trial. **Integr Cancer Ther.** 2012;11(3):204–11. doi:10.1177/1534735411433201

PANDEY, T.; SAMMI, S. R.; NOOREEN, Z.; MISHRA, A.; AHMAD, A.; BHATTA, R. S.; PANDEY, R. Anti-ageing and anti-Parkinsonian effects of natural flavonol, tambulin from *Zanthoxylum armatum* promotes longevity in *Caenorhabditis elegans*. **Exp Gerontol.** 2019 Jun;120:50-61. doi: 10.1016/j.exger.2019.02.016. Epub 2019 Feb 28. PMID: 30825547.

PAWLOWSKA, E.; SZCZEPANSKA, J.; BLASIAK, J. Pro- and Antioxidant Effects of Vitamin C in Cancer in correspondence to Its Dietary and Pharmacological Concentrations. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2019.

PEÑA M. A. G.; LOZADA-RAMÍREZ, J. D.; REGULES, A. E. O. Trolox Protection against Oxidative Stress in *Caenorhabditis elegans*. **Technology, Science and Culture - A Global Vision**, Volume II (pp.73-82). 2020.

PEREIRA, R.C.A.; BEZERRA, M.G.A.; RODRIGUES, T.H.S. **Cultivo de Gengibre em Região Litorânea do Ceará**. Comunicado Técnico 184. 2012.

PORTA-DE-LA-RIVA, M.; FONTRODONA, L.; VILLANUEVA, A.; CERÓN, J. Métodos básicos de *Caenorhabditis elegans*: sincronização e observação. **J. Vis. Exp.** 2012.

PUN, P.B.L.; GRUBER, J.; TANG, S.Y.; SCHAFFER, S.; ONG, R.L.S.; FONG, S.; FANG, N.G.L.; CHEAH, I.; HALLIWELL, B. Ageing in nematodes: do antioxidants extend lifespan in *Caenorhabditis elegans*? **Biogerontology**. 11, 17–30, 2010.

RAI, S.; MUKHERJEE, K.; MAL, M.; WAHILE, A.; SAHA, B. P.; MUKHERJEE, P. K. Determination of 6-gingerol in ginger (*Zingiber officinale*) using high-performance thin-layer chromatography. **Journal of Separation Science**, 29(15), 2292–2295. 2006.

RANALDI, G. et al. Effects of red wine on ochratoxin A toxicity in intestinal Caco-2/TC7 cells. **Toxicology in Vitro**, 21, 204-210, 2007.

ROSSI, F.M. **O uso de animais para testes de laboratórios para produção de cosméticos no brasil: uma abordagem jurídica e bioética**. Trabalho de conclusão de curso. Universidade do Extremo Sul Catarinense. Crisciuma-SC, 2019.

SAHARDI, N. F. N. M.; MAKPOL, S. "Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) in the Prevention of Ageing and Degenerative Diseases: Review of Current Evidence", **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, vol. 2019, Article ID 5054395, 13 pages, 2019.

SANTOS, C. M. D. C.; PIMENTA, C. A. D. M.; E NOBRE, M. R. C.. A estratégia PICO para a construção de questões de pesquisa e busca de evidências. **Rev. Lat. Am. Enferm.** 15, 508–511. 2007.

SHI, Y. C.; LIAO, V. H.; PAN, T. M. Monascin from red mold dioscorea as a novel antidiabetic and antioxidative stress agent in rats and *Caenorhabditis elegans*. **Free Radic Biol Med.** 2012 Jan 1;52(1):109-17. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.09.034. Epub 2011 Oct 12. PMID: 22041455.

SI, Y. P.; CHEN, J.; ZHANG, Z.; CHEN, Y.; CHUNG, H. Y. "Atividades antioxidantes do extrato de gengibre e seus constituintes em relação aos lipídios", **Food Chemistry**, vol. 239, pp. 1117–1125, 2018.

SILVA, J. A.; BECCENERI, A. B.; MUTTI, H. S.; MARTINC, A. C. B. M.; SILVAA, M. F. G. F.; FERNANDES, J. B.; VIEIRAA, P. C.; COMINETTI, M. R. Purification and differential biological effects of ginger-derived substances on normal and tumor cell lines. **J. Chromatogr. B**, Vol. 903, p. 157–162, 2012.

SILVA, J. A.; DOS SANTOS, C. Y.; MOHAMMADI, M. et al. Cathepsin K Inhibitors Isolated from Ginger Rhizome. **Rev. Bras. Farmacogn.** 31, 859–864 (2021).
<https://doi.org/10.1007/s43450-021-00223-9>.

SINGH, R.; DEVI, S.; GOLLEN, R. Papel dos radicais livres na aterosclerose, diabetes e dislipidemia: maior que a vida. **Diabetes Metab. Res. Rev.** 2015; 31 :113-126. doi: 10.1002/dmrr.2558.

SONG, X.; DU, Y.; LIU, C.; WANG, W.; HAN, J.; CHAI, X.; LIU, Y. H-2 increases oxidative stress resistance through DAF-16/FOXO pathways in *Caenorhabditis elegans*: A new approach to vitiligo treatment. **Biomed Pharmacother.** 2023 Jan;157:113924. doi: 10.1016/j.biopha.2022.113924. Epub 2022 Nov 28. PMID: 36450213.

SUEKAWA, M.; ISHIGE, A.; YUASA, K.; SUDO, K.; ABURADA, M.; HOSOYA, E. Pharmacological studies on ginger. I. Pharmacological actions of Pungent constituents, (6)-gingerol and (6)-shogaol. **Journal of Pharmacobio-Dynamics** 7, 836–848. 1984.

SURCO-LAOS, F. DUENAS, M.; GONZALEZ, S.; CABELLO, J.; SANTOS, C.; GONZALEZ, A. M. Influence of catechins and their methylated metabolites on lifespan and resistance to oxidative and thermal stress of *Caenorhabditis elegans* and epicatechin uptake. **Food Research International**. Volume 46, Issue 2, 514-521, 2012.

SWAIN, S.S.; PANDA, S.K.; LUYTEN, W. Phytochemicals against SARS-CoV as potential drug leads. **Biomed J.** 2021 Mar;44(1):74-85. doi: 10.1016/j.bj.2020.12.002. Epub 10 Dec 2020.

TAN, L.; WANG, S.; WANG, Y.; HE, M.; LIU, D. Bisphenol A exposure accelerated the aging process in the nematode *Caenorhabditis elegans*. **Toxicol Lett.** 2015 Jun 1;235(2):75-83. doi: 10.1016/j.toxlet.2015.03.010. Epub 2015 Mar 24. PMID: 25819108.

TAWFEEK, N.; SOBEH, M.; HAMDAN, D. I.; FARRAG, N.; ROXO, M.; EL-SHAZLY, A. M.; WINK, M. Phenolic Compounds from *Populus alba* L. and *Salix subserrata* Willd. (Salicaceae) Counteract Oxidative Stress in *Caenorhabditis elegans*. **Molecules.** 2019 May 24;24(10):1999. doi: 10.3390/molecules24101999. PMID: 31137712; PMCID: PMC6571762.

VARELLA, M. **Gengibre para exportação é a nova aposta de agricultores familiares do Leste de Minas**. Cultura ainda é pouco difundida no Estado e apresentou bons resultados em Aimorés [Internet]. 2020 Jun 25 [cited 2022 Jun 10]. Available from: <http://www.agricultura.mg.gov.br/index.php/component/gmg/story/3868-gengibre-para-exportacao-e-a-nova-aposta-de-agricultores-familiares-do-leste-de-minas?layout=print>.

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**, 30, 1323-1338, 2007.

XIAO, L.; LI, H.; ZHANG, J.; YANG, F.; HUANG, A.; DENG, J.; LIANG, M.; MA, F.; HU, M.; HUANG, Z. Salidroside protects *Caenorhabditis elegans* neurons from polyglutamine-mediated toxicity by reducing oxidative stress. **Molecules**. 2014 Jun 10;19(6):7757-69. doi: 10.3390/molecules19067757.

WANG, S.; ZHANG, C.; YANG, G.; YANG, Y. Biological Properties of 6-Gingerol: A Brief Review. **Natural Product Communications**, v. 9, n. 7, p. 1027 - 1030, 13 maio 2014.

WANG, Y.; LUO, S.; XU, Z.; LIU, L.; FENG, S.; CHEN, T.; ZHOU, L.; YUAN, M.; HUANG, Y.; DING, C. B. The potential antioxidant ability of hydroxytyrosol on *Caenorhabditis elegans* against oxidative damage via the insulin signaling pathway. **Arabian Journal of Chemistry** 14, 2021.

WILSON-SANDERS, S.E. Invertebrate models for biomedical research, testing, and education. **ILAR J.** v. 2, n. 2, p. 126-52, 2011. Disponível em: doi: 10.1093/ilar.52.2.126 Acesso: jun. 2022.

WITTENBURG, N., BAUMEISTER, R. **Thermal avoidance in *Caenorhabditis elegans*: an approach to the study of nociception.** Proc Natl Acad Sci U S A. 1999 Aug 31; 96 (18):10477-82. doi: 10.1073/pnas.96.18.10477.

WITTENBURG, N.; BAUMEISTER, R. Thermal avoidance in *Caenorhabditis elegans*: an approach to the study of nociception. **Proc Natl Acad Sci USA** 96(18):10477–10482. 1999. WORMATLAS. Disponível em: <http://www.wormatlas.org/>. Acesso em: 11 de dezembro de 2019.

WU, A. G.; TENG, J. F.; WONG, V. K.; ZHOU, X. G.; QIU, W. Q.; TANG, Y.; WU, J. M.; XIONG, R.; PAN, R.; WANG, Y. L.; TANG, B.; DING, T. Y.; YU, L.; ZENG, W.; QIN, D. L.; LAW, B. Y. Novel steroidal saponin isolated from *Trillium tschonoskii* maxim. exhibits anti-oxidative effect via autophagy induction in cellular and *Caenorhabditis elegans* models. **Phytomedicine**. 2019 Dec;65:153088. doi: 10.1016/j.phymed.2019.153088. Epub 2019 Sep 16. PMID: 31627105.

YAM, Y.; ABDUL-AZIZ, A., “Efeitos do *Zingiber officinale* na superóxido dismutase, glutatona peroxidase, catalase, glutatona e teor de malondialdeído na linha celular HepG2,” **Malaysian Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, vol. 11, pp. 36– 41, 2005.

YE, K.; JI, C. B.; LU, X. W.; NI, Y. H.; GAO, C. L.; CHEN, X. H.; ZHAO, Y. P.; GU, G. X.; GUO, X. R. Resveratrol attenuates radiation damage in *Caenorhabditis elegans* by preventing oxidative stress. **J Radiat Res**. 2010;51(4):473-9. doi: 10.1269/jrr.10009. PMID: 20679743.

YOUNG, H.Y.; LUO, Y.L.; CHENG, H.Y.; HSIEH, W.C.; LIAO, J.C.; PENG, W.H. Analgesic and anti-inflammatory activities of [6]-gingerol. **J Ethnopharmacol**. 2005 Jan 4;96(1-2):207-10. doi: 10.1016/j.jep.2004.09.009. PMID: 15588672.

ZHANG, M.; ZHAO, R.; WANG, D.; WANG, L.; ZHANG, Q.; WEI, S.; LU, F.; PENG, W.; WU, C. Ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) and its bioactive components are potential resources for health beneficial agents. **Wiley Online Library** [Internet]. 2020 Sep 20 [cited 2022 Jun 10];35(2):711-742. DOI <https://doi.org/10.1002/ptr.6858>.

ZHANG, Y.; LI, H.; JIN, S.; LU, Y.; PENG, Y.; ZHAO, L.; WANG, X. Cannabidiol protects against Alzheimer's disease in *C. elegans* via ROS scavenging activity of its phenolic hydroxyl groups. **Eur J Pharmacol**. 2022 Mar 15;919:174829. doi: 10.1016/j.ejphar.2022.174829. Epub 2022 Feb 16. PMID: 35181336.

ZHANG, S.; DUANGJAN, C.; TENCOMNAO, T.; WU, L.; WINK, M.; LIN, J. Oolonghomobisflavans exert neuroprotective activities in cultured neuronal cells and anti-aging effects in *Caenorhabditis elegans*. **Front Aging Neurosci**. 2022 Sep 7;14:967316. doi: 10.3389/fnagi.2022.967316. PMID: 36158534; PMCID: PMC9490402.

ZHANG, W.; CAI, L.; GENG, H. J.; SU, C. F.; YAN, L.; WANG, J. H.; GAO, Q.; LUO, H. M. Methyl 3,4-dihydroxybenzoate extends the lifespan of *Caenorhabditis elegans*, partly via W06A7.4 gene. **Exp Gerontol**. 2014 Dec;60:108-16. doi: 10.1016/j.exger.2014.10.007. Epub 2014 Oct 16. PMID: 25456844.

ZHOU, L.; LIU, J.; BU, L. L.; LIAO, D. F.; CHENG, S. W.; ZHENG, X. L. Curcumin Acetylsalicylate Extends the Lifespan of *Caenorhabditis elegans*. **Molecules**. 2021 Oct 31;26(21):6609. doi: 10.3390/molecules26216609. PMID: 34771018; PMCID: PMC8586958.

ZHU, Z.; YANG, T.; ZHANG, L.; LIU, L.; YIN, E.; ZHANG, C.; GUO, Z.; XU, C.; WANG, X. Inhibiting A β toxicity in Alzheimer's disease by a pyridine amine derivative. **Eur J Med Chem**. 2019 Apr 15;168:330-339. doi: 10.1016/j.ejmech.2019.02.052. Epub 2019 Feb 20. PMID: 30826509.

ZWIRCHMAYR, J.; KIRCHWEGGER, B.; LEHNER, T.; TAHIR, A.; PRETSCH, D.; ROLLINGER, J.M. Uma plataforma de triagem robusta e miniaturizada para estudar produtos naturais que afetam o metabolismo e a sobrevivência em *Caenorhabditis elegans*. **Sci Rep** 10, 12323 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69186-6>

ANEXO I



Ministério do Meio Ambiente

CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Comprovante de Cadastro de Acesso

Cadastro nº AB3FFE1

O Conselho de Gestão do Patrimônio Genético, no exercício da competência conferida pelo inciso IV do § 1º do art. 6º da Lei nº 13.123/2015, atesta que o acesso ao Patrimônio Genético, referente ao cadastro abaixo identificado e resumido, cumpriu os requisitos da Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos até a data de emissão deste atestado.

Número do cadastro: **A2727DC**Usuário: **Adriana Gibara Guimarães**CPF/CNPJ: **010.965.455-27**Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**Finalidade do Acesso: **Pesquisa****Espécie:** *Zingiber officinale*

Título da Atividade: Estudo bioguiado para avaliação da atividade antioxidante e antinociceptiva de *Zingiber officinale* em *Caenorhabditis elegans*.

Equipe

Adriana Gibara Guimarães**Universidade Federal de Sergipe****Júlia Santana Lisboa****Universidade Federal de Sergipe****Dennis Wesley Andrade Hohenfeld****Universidade Federal de Sergipe**

Data do Cadastro:

17/07/2023 22:03:06

Situação do Cadastro:

ConcluídoConselho de Gestão do
Patrimônio Genético

Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
ASSOCIADO - **SISGEN**