



GUSTAVO JOSÉ DE SÁ PEREIRA

**EFEITOS DA CUMARINA (4-METILDINAFETINA) NO
ESTRESSE E LONGEVIDADE DE VERMES *Caenorhabditis*
Elegans.**

**LAVRAS-MG
2021**

GUSTAVO JOSÉ DE SÁ PEREIRA.

**EFEITOS DA CUMARINA (4-METILDINAFETINA) NO
ESTRESSE E LONGEVIDADE DE VERMES *Caenorhabditis
elegans*.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, área de concentração em Alterações metabólicas, inflamação e alimentos funcionais, para a obtenção do título de Mestre.

Prof. Dr. Rodrigo Ferreira de Moura

**LAVRAS-MG
2021**

Aos meus pais José Ricardo e Aguida Maria que nunca mediram esforços para me ajudar.

A minha namorada pelo amor e cumplicidade.

A todos os professores que estiveram em minha trajetória e que despertaram minha paixão pela ciência.

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Pereira, Gustavo José de Sá.

Efeitos da cumarina (4-metildinafetina) no estresse e longevidade de vermes *Caenorhabditis Elegans*. / Gustavo José de Sá Pereira. - 2021.

44 p. : il.

Orientador(a): Rodrigo Ferreira de Moura.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Lavras, 2021.

Bibliografia.

1. *Caenorhabditis elegans*. 2. Estresse oxidativo. 3. Longevidade. I. Moura, Rodrigo Ferreira de. II. Título.

GUSTAVO JOSÉ DE SÁ PEREIRA

**EFEITOS DA CUMARINA (4-METILDINAFETINA) NO ESTRESSE E
LONGEVIDADE DE VERMES *Caenorhabditis elegans*.**

**EFFECTS OF CUMARINE (4-METHYLDINAPHETINE) ON STRESS AND
LONGEVITY OF WORMS *Caenorhabditis elegans*.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, área de concentração em Alterações metabólicas, inflamação e alimentos funcionais, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADO em 21 de maio de 2021.

Prof. Dr. Rodrigo Ferreira de Moura

Profa. Dra. Camila Aparecida de Machado Oliveira UNIFESP

Profa. Dra. Natalia Oliveira Bertolini UNILAVRAS



Prof. Dr. Rodrigo Ferreira de Moura
Orientador

**LAVRAS-MG
2021**

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me concedido a oportunidade e capacitação de contribuir com a Ciência.

Aos meus pais que me incentivaram e fizeram de tudo para que pudesse chegar até aqui, sem vocês nada disso seria se que possível.

A todos os técnicos de laboratório que estiveram presente para meu crescimento e ensinamento de técnicas laboratoriais. Um enorme abraço ao Daniel, Sula e Dirceia (Laboratório de Bacteriologia), Aline (Laboratório de Biologia Parasitária), Isaac (Laboratório de Citologia e Histologia), Vanúzia (Laboratório de Química Orgânica) vocês foram essenciais no meu caminho.

Ao Prof. Dr. Sérgio Scherrer Thomasi, do Departamento de Química (UFLA) pela síntese do composto do presente estudo, sua competência e disponibilidade devem ser exaltados. Obrigado!

Ao meu querido orientador Rodrigo Ferreira de Moura que se tornou mais que um orientador e sim um grande amigo. Você contribuiu imensamente para meu conhecimento e experiência, não tenho dúvidas de que levarei eternos aprendizados de você, continue essa pessoa ética, profissional e companheira que você é.

Agradeço a Natália Oliveira que me despertou e inseriu a pesquisa em minha vida nos primeiros períodos da graduação, tenho um enorme carinho e reconhecimento por você.

Ao Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista (ICTSJC-UNESP) que doou as cepas utilizadas no estudo.

Ao meu companheiro e amigo de mestrado Ronan Cardoso, você sem dúvidas é uma das pessoas mais puras e éticas e competentes que já conheci, não há palavras para descrever o quanto você foi importante nesta etapa de minha vida, tenho certeza de que colherá muitos frutos.

Por fim, mas não menos importante, minha querida namorada Karine Carvalho pela cumplicidade, paciência e amor que teve comigo durante todo esse período.

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém
ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”

(Arthur Schopenhauer)

RESUMO.

Com o envelhecimento, o corpo busca adaptações como forma de sobrevivência. O estresse oxidativo atua como um grande coadjuvante para o avanço do envelhecimento, causando desarmonia na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), levando a inúmeras doenças. Diversas, substâncias bioativas potencias são constantemente estudadas a fim de exprimir melhora em mecanismos envolvidos ao envelhecimento. A cumarina é uma substância da classe dos polifenóis. Inicialmente foi encontrada em feijões Tonka e graças a possibilidade de rearranjos estruturais, hoje são encontrados mais de 1500 derivados de cumarina. Apresentando efeitos antioxidante, antiviral, antibacteriano e antifúngico ela é largamente utilizada no campo farmacêutico. A partir disso, o objetivo desse estudo foi verificar a influência do uso do composto sintético de cumarina 4-metildinafetina (CM 4-MTD) nas análises de toxicidade do composto; atividade antibacteriana; atividade antioxidante, além de realizar testes de estresse, como: osmótico, térmico e oxidativo em vermes *C. elegans*. Inicialmente nos dados obtidos, o composto apresentou 92% de atividade antioxidante já em pequenas concentrações (25_{ug/ml}) através da análise de DPPH. Nos testes seguintes a CM 4-MTD não apresentou respostas antibacteriana. Os vermes não apresentaram redução do estresse nem melhora significativa da longevidade com a utilização do composto. Portanto, o composto de CM 4-MTD exprime uma alta atividade antioxidante, entretanto, não apresenta efeitos biológicos na proteção contra o estresse ou contribuição para a longevidade em vermes *C. elegans*.

Palavras chaves: *Caenorhabditis elegans*. Estresse oxidativo. Longevidade. Cumarina.

ABSTRACT

With aging, the body seeks adaptations as a way of survival. Oxidative stress acts as a great adjunct to the advancement of aging, causing disharmony in the production of reactive oxygen species (ROS), leading to numerous diseases. Several, potent bioactive substances are constantly studied to express an improvement in mechanisms involved in aging. Coumarin is a substance in the class of polyphenols. It was initially found in Tonka beans and thanks to the possibility of structural rearrangements, today more than 1500 coumarin derivatives are found. With antioxidant, antiviral, antibacterial and antifungal effects, it is widely used in the pharmaceutical field. From this, the objective of this study was to verify the influence of the use of the synthetic coumarin compound 4-methyldinafetine (CM 4-MTD) in the toxicity analyzes of the compound; antibacterial activity; antioxidant activity, in addition to performing stress tests, such as: osmotic, thermal, and oxidative in *C. elegans* worms. Initially in the obtained data, the compound showed 92% of antioxidant activity already in small concentrations (25ug/ml) through the analysis of DPPH. In the following tests, CM 4-MTD did not show antibacterial responses. The worms did not show stress reduction or significant improvement in longevity with the use of the compound. Therefore, the CM 4-MTD compound expresses a high antioxidant activity, however, it has no biological effects in protecting against stress or contributing to longevity in *C. elegans* worms.

Keywords: *Caenorhabditis elegans*. Oxidative stress. Longevity. Coumarin.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Estrutura química básica da cumarina (2H-1-benzopiran-2-ona).....	17
Figura 2- Processo químico para a síntese da Cumarina 4-metildinafetina (CM 4-MTD).....	25
Figura 3- Análise do percentual antioxidante.....	30
Figura 4- Análise estresse osmótico.....	33
Figura 5- Percentual de sobrevivência ao teste de H ₂ O ₂	34
Figura 6- Percentual de sobrevivência ao teste térmico.....	34
Figura 7: Percentual de sobrevivência ao teste de longevidade.....	35
Quadro 1- TSA do composto derivado de Cumarina 4-Metildinafetina e controle positivo.....	32
Tabela 1 Antibiograma, atividade antimicrobiana.....	31
Tabela 2 Média do tempo vida e desvio padrão.....	35

SUMÁRIO

RESUMO.....	4
Tabela 1 Antibiograma, atividade antimicrobiana.....	6
INTRODUÇÃO	11
2. REFERENCIAL TEÓRICO	12
2.1 Envelhecimento.....	12
2.2 Antioxidantes.....	15
2.3 Cumarinas.....	16
2.4 <i>Caenorhabditis elegans</i> (<i>C. elegans</i>).....	18
3. HIPÓTESE	20
4. JUSTIFICATIVA	20
5. OBJETIVO.....	21
5.1 Objetivo Geral	21
5.2 Objetivos específicos	21
6. MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
6.1 Cepas utilizadas.....	22
6.2 Manutenção das cepas	22
6.3 Sincronização e tratamento das cepas	22
6.4 Tratamento das cepas e ensaios	23
6.5 Preparos do tampão M9.....	24
6.6 Síntese da cumarina 4-metildafenetina (CM 4-MTD).....	24
6.7 Antibiograma: Análise antibacteriana da cumarina em relação a <i>E. coli</i> OP5025	
livre (DPPH)	25
6.9 Teste de toxicidade da Cumarina.....	26
6.10 Preparo da placa para os ensaios de estresse induzido.....	26
6.11 Ensaio de resistência ao estresse osmótico	27
6.12 Ensaio de resistência ao estresse induzido por H ₂ O ₂	27
6.13 Ensaio de resistência ao estresse térmico.....	28
6.13 Ensaio de longevidade	28
7. ESTATÍSTICA	28
8. RESULTADOS	29
8.1 Análise antioxidante através de DPPH	29

8.2 Antibiograma, atividade antimicrobiana	30
8.3 Teste de estresse osmótico sob a ação NaCl	32
8.4 Teste de estresse oxidativo sob a ação H ₂ O ₂	32
8.5 Teste de estresse térmico	34
8.6 Ensaio de sobrevivência	35
CONCLUSÃO.....	39
9. REFERÊNCIAS.....	39

INTRODUÇÃO

O envelhecimento é uma mudança fisiológica inevitável advinda de vários fatores. Constantes buscas no entendimento dos mecanismos envolvidos nos desfechos do envelhecimento permitiram discutir diversas hipóteses, dentre elas, a do dano ao DNA e a dos radicais livres se destacam. Postula-se, que uma menor expressão de genes específicos leva a aceleração do envelhecimento (PARK; YEO, 2013). O estresse oxidativo está relacionado a uma maior produção de espécie reativa de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (RNS) no organismo, os quais estão relacionados a doenças como câncer, diabetes, doenças neurológicas, alterando a expressão de genes (GASPAR; MILHAZES; SANTANA; URIARTE *et al.*, 2015), em adição, o estresse oxidativo pode estar intimamente relacionado há uma menor longevidade (ZAMBERLAN; AMARAL; ARANTES; MACHADO *et al.*, 2016). Assim, a busca por substâncias moduladoras do organismo se faz relevante.

A cumarina é uma substância que compõe a família de polifenóis proveniente de plantas, que através de rearranjos estruturais possibilita grande variedade de compostos derivados da mesma, demonstrando efeitos fisiológicos benéficos como sendo, antivirais, anticancerosas, citotóxica, antiacne e antioxidante. Um desses derivados é a cumarina de classe 4-metildinafetina (CM- 4MTD), entretanto, há uma lacuna pelos seus potenciais efeitos (KATSORI; HADJIPAVLOU-LITINA, 2014).

Modelos animais como ratos e camundongos, são constantemente utilizados por sua similaridade genética e metabólica com o ser humano. Contudo, os experimentos são demorados e em estudos de longevidade podem durar cerca de três anos (MAGLIONI; ARSALAN; VENTURA, 2016). Com isso, *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) surge como ferramenta de pesquisa na segunda metade do século XX, com um baixo custo de manutenção e simplicidade de manuseio.

Com até 60% de similaridade com o humano, *C. elegans* tornou-se um importante modelo para pesquisa biomédica, particularmente na caracterização funcional de novos alvos de drogas que podem ser

identificados usando tecnologias genômicas (KALETTA; HENGARTNER, 2006).

Assim, esse modelo animal se torna interessante para se verificar a influência do uso do composto sintético de CM 4-MTD, na longevidade e resistência a diferentes tipos de estresse em *C. elegans*.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Envelhecimento

A partir de uma determinada idade o corpo avança com o processo de envelhecimento, causando respostas ao organismo como forma de adaptação tendendo a reduzir tecidos celulares por apoptose ou autofagia (PINTO; SATO; DE-SOUZA; FERRAZ *et al.*, 2018).

Com a idade avançada o corpo adquire inúmeras mudanças, tais como o comprometimento do sistema nervoso central e a redução do número de células cerebrais em até 20%, fazendo com que o corpo compense com um número superior de ramificações de dendritos até uma determinada idade. Com isso na terceira etapa da vida a função cognitiva, memória e funcionamento intelectual são prejudicadas (BARJA, 2019; PARK; YEO, 2013).

Mudanças no sistema cardiovascular causam o aumento de fibras colágenas nos idosos em relação ao adulto de meia idade podendo acarretar uma menor eficiência de contração do coração, além disso, paredes arteriais tornam-se mais enrijecidas e espessas. Em consequência dessas alterações anatômicas a frequência cardíaca máxima e o volume sanguíneo circulante são reduzidos, acarretando em hipotensão ortostática, aumentando as chances de quedas dentre outros fatores (PARK; YEO, 2013; SON; LEE, 2019).

Alterações no sistema esquelético levam a propensão fraturas devido à redução da densidade mineral (MAKOWSKI; UPPUGANTI; WADEER; WHITEHEAD *et al.*, 2014).

Os rins são considerados um dos órgãos mais afetados morfofisiologicamente com o avanço da idade. Tais mudanças incluem peso,

tamanho do córtex e o enrijecimento dos glomérulos, influenciando em uma menor taxa de filtração glomerular (TGF), além da redução na função dos túbulos renais. A TGF pode reduzir cerca de 50% em indivíduos de 80 anos em comparação aos 30 anos de idade. Além disso, outras estruturas e sistemas também sofrem influência da idade, como sistema respiratório, levando a uma série de acometimentos (PARK; YEO, 2013).

O envelhecimento é acompanhado por uma série de agravamentos na saúde (SON; LEE, 2019). Entretanto, HAYFLICK (2000) afirma que os processos de idade e doenças são correlacionados, mas não dependentes, apesar do envelhecimento, as doenças desencadeadas nele não acometem todos os indivíduos. MANGO (2011) sugere que existem caminhos genéticos mutáveis para controlar a longevidade, o que explicaria a diferença de espécies tão similares terem uma expectativa de vida tão distante.

Desde modo, todas as hipótese desde a programação gênica, encurtamento dos telômeros ou aumento dos radicais livres podendo desencadear outros fatores, fica claro que o processo de envelhecimento ainda não está completamente elucidado (SHARMA; PANDEY; SALUJA, 2018; XU; GUO; LI; WANG, 2019).

Com a codificação estabelecida através do DNA, a hipótese da programação genética discute se as células seriam programadas para sobreviver um determinado período, e com a expectativa de vida aumentando essa sistema poderia ter sido afetado aspectos bioquímicos e vias metabólicas onde algumas células estão se proliferando enquanto outras estão deixando de existir devido a evolução da espécie (PARK; YEO, 2013; TROEN, 2003).

Para HAYFLICK (1998) assim como máquinas o ser humano possui um prazo médio de falha, onde a partir de um momento, órgãos e sistemas deixam de funcionar corretamente necessitando de algum ajuste. A partir disso, HAYFLICK (2000) questiona se a longevidade é determinada por nossos genes e o envelhecimento não, caracterizando a hipótese do desgaste. Entretanto as médias de expectativas de vida tem aumentado (TROEN, 2003).

A hipótese do encurtamento dos telômeros está relacionada ao desgaste de uma sequência de nucleotídeos (TTAGGG) presentes no terminal de todo

cromossomo humano a partir do momento em que há uma divisão celular, e então entre 50 e 100 vezes ocorre uma diminuição no tamanho desses telômeros (PARK; YEO, 2013). Embora células do músculo esquelético, coração e neurônios não se dividam ou muito, ou raramente se dividam, acredita-se que esta hipótese seja altamente relevante em células mitóticas como intestino e pele (BARJA, 2019).

Dentre todas as hipóteses do envelhecimento, a dos radicais livres se destaca pelo fato de poder influenciar diversos outros fatores (PARK; YEO, 2013). Naturalmente em processos metabólicos do corpo são gerados radicais livres [ânions superóxido (O_2^-) e hidroxil (OH^-), óxido nítrico (NO), peroxinitrito ($ONOO^-$)] gerando espécies reativas de oxigênio (ROS) (YANG; LEE; SHIN, 2015).

Historicamente, a mitocôndria é considerada um gerador de ATP. Porém, tem sido cada vez mais apreciada como um importante centro que transmite sinais regulatórios adaptativos para controlar uma ampla gama de funções celulares incluindo imunidade, sobrevivência e homeostase celular, com fortes implicações no envelhecimento, levando à hipótese mitocondrial dos radicais livres do envelhecimento (SON; LEE, 2019).

ROS são importantes mediadores do estresse (SON; LEE, 2019). Contudo, o excesso dessa produção, gera danos nos ácidos nucleicos, proteínas e lipídios da membrana causando uma lesão tecidual e um estado inflamatório.

O envelhecimento está relacionado a diversos fatores desde o nível molecular a fatores extrínsecos como o ambiente. A imunossenescência tem sido considerada por décadas um dos motivos pelo acometimento de doenças no envelhecimento, a qual há uma perda da memória imunológica e da capacidade do corpo para responder a infecções (CONTE; MARTUCCI; CHIARIELLO; FRANCESCHI *et al.*, 2020). Com o aumento de citocinas pró inflamatórias como TNF- α pode ocorrer uma diminuição na produção de células β , além de aumentar a disfunção mitocondrial, facilitando a imunossenescência (KOCH; LARBI; DERHOVANESSIAN; ÖZCELIK *et al.*, 2008).

2.2 Antioxidantes

Um quadro de estresse oxidativo é causado pela desarmonia entre o sistema de antioxidante e pró-oxidante. ROS estão associadas a importantes funções biológicas (WILHELM; FERREIRA; PINZ; REIS *et al.*, 2017), em condições de baixa e média concentrações podem agir contra agentes infecciosos e na função de vários sistemas de sinalização celular (VALKO; LEIBFRITZ; MONCOL; CRONIN *et al.*, 2007). Em contrapartida, o estresse oxidativo está relacionado a doenças neurológicas, como o AVC isquêmico, doença de Parkinson, doença de Alzheimer e a uma menor longevidade (XU; CHUA; KONG; KOSTRZEWA *et al.*, 2007; ZAMBERLAN; AMARAL; ARANTES; MACHADO *et al.*, 2016).

Para manter o equilíbrio, enzimas antioxidantes como a glutathione peroxidase (GPx), catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) são comumente responsáveis pela eliminação dos radicais livres (LEE; KIM; AN; KIM *et al.*, 2018) uma vez que a formação excessiva de ROS pode gerar um alto dano em células do corpo, diminuindo as funções fisiológicas naturais. Além disso, algumas vitaminas e aminoácidos podem ser conhecidos como sequestradores de radicais livres ou antioxidantes hidrofílicos, são eles os antioxidantes de baixo peso molecular como: glutathione, ascorbato (vitamina C), flavonoides, cisteína e creatinina; e também os antioxidantes hidrofóbicos, como: bilirrubina, coenzima Q, vitamina e provitamina D₃, carotenoides, tocoferóis e colesterol (KLENIEWSKA; PAWLICZAK, 2019; VALKO; LEIBFRITZ; MONCOL; CRONIN *et al.*, 2007).

Como mencionado, existem mecanismos de defesa contra estresse oxidativo. Divididos em primária, também conhecida como enzimática e secundária, ou também conhecido como não enzimática. Os elementos da função de defesa antioxidante primária visam evitar prejuízos oxidativos interceptando diretamente os ROS, na prática consiste na ação do superóxido dismutase (SOD) e a glutathione (ERUSLANOV; KUSMARTSEV, 2010). A glutathione é uma enzima que desempenham um importante fator no combate ao estresse oxidativo como a glutathione peroxidase (GPx), glutathione transferase, dentre outras, facilitando assim a desintoxicação. Além disso, a glutathione em

sua forma reduzida GSH (S-glutatioação) contribui para a retirada do radical de hidroxila e o oxigênio singleto o qual é caracterizado por ser uma molécula de oxigênio no seu estado fundamental (de menor energia), o qual apresenta dois elétrons desemparelhados nos seus orbitais moleculares de mais alta energia. A molécula de oxigênio singleto pode ser gerado a partir de reações como H_2O_2 .

O sistema secundário ou não enzimático atua por minerais e alguns metabólitos. Vitaminas como A e E conseguem se ligar diretamente a radicais de peroxila impossibilitando o desenvolvimento da cadeia oxidada. Por fim, a glutathione também pode ser capaz de reestruturar antioxidantes mais importantes, vitaminas C e E, de volta às suas formas eficazes (VALKO; LEIBFRTZ; MONCOL; CRONIN *et al.*, 2007).

O processo de defesa iniciado pela SOD desencadeia a dismutação do H_2O_2 . A partir disso, até o momento foram descobertos 4 tipos de SOD; Mn-SOD, Cu, Zn-SOD, Ni-SOD e SOD extracelular, eles são responsáveis por destruir o superóxido de radical livre. CAT e GPx convertem H_2O_2 em H_2O e O_2 (Oxigênio singleto). Entretanto, quando há enorme demanda desse processo, em resposta a esses eventos, ocorre um acúmulo de H_2O_2 pelo fato de que quando a auto oxidação é termodinamicamente possível sua velocidade é lenta na ausência de catalisadores. No entanto, metais de transição encontrados no bloco da tabela periódica, como Ferro (Fe) e Cobre (Cu) dentre outros, catalisam o excesso H_2O_2 e que tenham hidroxila (OH) em seu produto final (ERUSLANOV; KUSMARTSEV, 2010; RIBEIRO; BEDE; ROCHA; BARROSO *et al.*, 2017).

Portanto, substâncias denominadas antioxidantes são capazes de retardar significativamente ou inibir a oxidação do substrato (NASCIMENTO; LAGE; CAMARGOS; AMARAL *et al.*, 2011). Com base nisso, compostos que diminuem a atividade oxidativa têm sido estudados como uma alternativa farmacológica (WILHELM; FERREIRA; PINZ; REIS *et al.*, 2017).

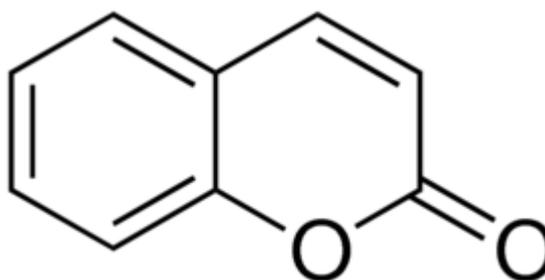
2.3 Cumarinas

Em 1820 a cumarina foi isolada a primeira vez, extraída inicialmente a partir do feijão Tonka (*Dipteryx odorata*, família *Fabaceae*), com uma característica incolor e perfumada que foi amplamente estudada (SARKER;

NAHAR, 2017). A cumarina se caracteriza na família dos polifenóis e tem demonstrado efeitos benéficos antivirais, anticancerosas, citotóxica, anti-acne e antioxidante (KATSORI; HADJIPAVLOU-LITINA, 2014).

Possuindo uma característica específica, tendo em sua estrutura química um anel benzênico ligado a um anel de pirona (figura 1), faz com que a cumarina possua seis tipos de rearranjos de substituintes estruturais. Esse fato faz com que haja uma enorme gama de compostos advindos desta forma estrutural, ultrapassando 1300 tipos de diferentes classes de cumarina (HOULT; PAYÁ, 1996; KATSORI; HADJIPAVLOU-LITINA, 2014)

Figura 1: Estrutura química básica da cumarina (2H-1-benzopiran-2-ona).



Fonte: Do autor

Com a possibilidade de variação estrutural, o anel central tem sido utilizado para uma série de atividades envolvendo as moléculas secundárias, obtendo assim, recursos e melhorias em diversas áreas (DETSI; KONTOGIORGIS; HADJIPAVLOU-LITINA, 2017) desde sua estrutura química básica apresentando características de aroma similar ao da baunilha, sendo utilizado pelas indústrias farmacêuticas e alimentícias (KATSORI; HADJIPAVLOU-LITINA, 2014), há evidências antitrombóticas, anticarcinogênicas (YU; WANG; WALZEM; MILLER *et al.*, 2005), atividades antioxidante e anticoagulante (SARKER; NAHAR, 2017). Com isso, existe grandes possibilidades para se testar os efeitos de todos esses compostos.

Sendo assim, YANG; LEE e SHIN (2015) buscaram isolar 4 derivados da cumarina: scopoleptina, 8-metoxipsoraleno, bergaptem, imperatorin, a fim de identificar efeitos antioxidantes. Em seus achados foi identificado que todas as

cumarinas testadas mostraram excelentes atividades antioxidantes nos ensaios de eliminação de radicais DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) e ABTS [2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin) 6-ácido sulfônico] em ensaios em células.

Em um estudo *in-vitro* feito por JIN; WANG; LI; TAN *et al.* (2015) foi observado uma ação antioxidante no hipocampo derivado do uso da cumarina de classe 4-metil em relação a morte celular induzida por glutamato em ratos. Em outro estudo utilizando arbutina, um composto advindo de polifenóis, foi encontrado um aumento na longevidade, diminuição ao estresse oxidativo, térmico e uma diminuição significativa de ROS em modelos *C.elegans* (ZHOU; FU; JIANG; WANG *et al.*, 2017). A cumarina 4-metilsculetina apresentou efeitos benéficos antiartrítica e anti-inflamatória em camundongos, melhorando níveis TNF- α , IL-1 β , IL-6, COX-2 e PGE. Além disso, obteve melhora em enzimas antioxidantes e ao estresse oxidativo (HEMSHEKHAR; SUNITHA; THUSHARA; SEBASTIN SANTHOSH *et al.*, 2013)

Neste panorama KATSORI e HADJIPAVLOU-LITINA (2014) classificam os potenciais efeitos das diversas estruturas da cumarina tais como: Anti-helmintico, antiasmático, antiparasitário, anti-hipertensivo, anti-inflamatorio, antitumoral, antidiabético, antifúngico, anticoagulante, antibacteriano, antiviral, antioxidante, neuroprotetor, anti-artrite, antipirético, melhora da função cardiovascular, anti-linfedema, anti-adipogênico, antiarrítmico, antiepiléptico, anti-hiperglicêmico, antiasséptico. Contudo, ressalta a pequena quantidade de artigos dos efeitos dos diferentes tipos de cumarina e a importância do teste individual de cada uma delas.

2.4 *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*)

Nematoides são amplamente encontrados em nosso planeta, podendo sobreviver ao extremo calor e frio. Dentre as diversas espécies, *Caenorhabditis elegans* se destacam apresentando boas similaridade de vias moleculares com o ser humano (COGHLAN, 2005).

C. elegans são pequenos vermes que em sua fase adulta medem cerca de 1 a 2mm, caracterizados de vida livre, não necessitando de hospedeiro. Sua descoberta se deu por volta do ano de 1900. Um pesquisador chamado Maupas descreveu e nomeou a espécie *Rhabditis elegans*, posteriormente, outro

cientista, nomeou como *Caenorhabditis elegans* (RIDDLE; BLUMENTHAL; MEYER; PRIESS, 1997). Deste modo, hoje conhecido popularmente como *C.elegans*, se tornou uma importante ferramenta de pesquisa em biomedicina (BAKER; WOOLLARD, 2019).

Em 1998 foi finalizado o projeto que mapeou completamente o genoma de um organismo multicelular *Caenorhabditis elegans*, inicialmente encontrado o genoma contendo 97Mbp (SCIENCE, 1998) mais tarde foi atualizado para 100,3 Mbp (STEIN; BAO; BLASIAR; BLUMENTHAL *et al.*, 2003). A facilidade de modulação de genes através da interferência mediada por RNA de fita dupla (RNAi) e a identificação de moléculas de RNA, torna um modelo extremamente relevante (AGUILERA; PALLADINO; ASKJAER, 2013). Todo verme adulto possui 959 células que compõem seus tecidos somáticos. Assim, devido à sua disposição genética, oferece vantagens para identificação de genes expressos em pesquisas e a respostas ao envelhecimento (AMRIT; RATNAPPAN; KEITH; GHAZI, 2014; MITANI, 2017).

Além disso, esses organismos possuem o corpo transparente podendo ser utilizado a microscopia não invasiva, baixo custo de manutenção, autofertilização e rápido tempo de fecundação, gerando até 300 descendentes em poucos dias. Assim, esse nematoide, se torna um interessante modelo de pesquisa (MAGLIONI; ARSALAN; VENTURA, 2016)

Os vermes são divididos em dois gêneros, sendo eles: hermafroditas, os quais são auto fertilizantes, e cepas machos, encontrados em menos de 1% de toda população de *C. elegans*. As cepas devem ser cultivadas em placas de ágar e também sobre meio líquido e são alimentadas com uma dieta de bactérias *Escherichia coli* (*E. coli*) (AMRIT; RATNAPPAN; KEITH; GHAZI, 2014). O processo de ciclo de vida do *C. elegans* é dividido em ovo, fase larval qual é subdivida em quatro estágios: L1, L2, L3, L4 e por fim a fase adulta. Esse processo pode ocorrer por volta de 3 a 5 dias dependendo da temperatura que os vermes são expostos. Em alguns casos pode ocorrer o chamado Dauer, onde a larva se estabiliza por falta de nutriente ou um processo anormal. Neste caso as larvas Dauer são capazes de sobreviver à fome e outras condições desfavoráveis por períodos prolongados, mantendo em hibernação até adquirir

condições adequadas, continuando seu ciclo de vida (AMRIT; RATNAPPAN; KEITH; GHAZI, 2014; MITANI, 2017).

C. elegans possuem muitos genes que se assemelham ao do ser humano. Embora possuam uma estrutura simples, apresentam semelhanças moleculares aos eucariotos superiores, sendo útil no campo da saúde. Acredita-se que mais de 83% das proteínas no proteoma de *C. elegans* possuem estruturas homólogas em humanos. Assim, a junção de benefícios, simplicidade, relação custo-benefício do cultivo, do *C. elegans* um modelo eficaz *in vivo* (MITANI, 2017).

Um estudo feito por XIONG; PEARS e WOOLLARD (2017) mostrou que *C. elegans* podem ser um importante alvo farmacológico com seus resultados já se assemelhando a de mamíferos mais evoluídos. Com base nisso, vermes *C. elegans* podem ser uma estratégia interessante afim de diminuir o número de testes em animais para análises de toxicidade de compostos.

Nos estudos de longevidade com *C. elegans* é importante ter o controle exato da quantidade de vermes por placas a fim de não ocorrer falhas metodológicas. Para isso, é necessário a infertilidade das cepas. Cepas selvagens N2 não são capazes de evitar a progênie, para isso, é feito o uso da substância 5'-fluorodeoxiuridina (FUDR), reagente que apresenta alto custo e possível interferência nos resultados. Uma alternativa são cepas capazes de inibir a progênie, como no caso do GLP-4 a qual em temperatura de 25°C tornam-se inférteis, possibilitando uma alternativa metodológica (CHUANG; KUO; LEE; CHU *et al.*, 2016; LUCANIC; GARRETT; GILL; LITHGOW, 2018; RASTOGI; BORGO; PAZDERNIK; FOX *et al.*, 2015).

3. HIPÓTESE

A ministração do composto sintético de cumarina (4-metildinafetina) pode promover respostas benéficas aos estresses induzidos e uma maior longevidade em *Caenorhabditis elegans*.

4. JUSTIFICATIVA

Com o aumento no tempo médio de vida do ser humano, estima-se que em 2050 um quarto da população mundial seja constituída por idosos (XU; GUO; LI; WANG, 2019). Com isso, muitas vezes o envelhecimento está acompanhado

de diversas doenças e complicações, como mudanças no sistema nervoso central, esquelético, metabólico dentre outros (PARK; YEO, 2013; PINTO; SATO; DE-SOUZA; FERRAZ *et al.*, 2018). Deste modo, o envelhecimento está altamente relacionado ao sistema de saúde pública, impactando em fatores socioeconômicos.

Com base nisso, nas últimas décadas pesquisadores identificaram que o acometimento dessas doenças não ocorre em todos os indivíduos idosos. Biomarcadores que levam ao desfecho das patologias ainda não são totalmente compreendidos (HAYFLICK, 2000; MAGLIONI; ARSALAN; VENTURA, 2016; XU; GUO; LI; WANG, 2019). Busca-se substâncias a fim de retardar os efeitos do envelhecimento, contribuindo não só com a longevidade, mas com a qualidade de vida. Deste modo, a cumarina poderia ser uma substância candidata a adjuvante na desaceleração desse processo.

5. OBJETIVO

5.1 Objetivo Geral

O objetivo deste estudo foi identificar influência do uso do composto sintético de cumarina 4-MTD na longevidade e resistência a diferentes tipos de estresse em vermes *C. elegans*.

5.2 Objetivos específicos

- Analisar a atividade antioxidante do composto com finalidade de definir as concentrações utilizadas;
- Analisar a toxicidade do composto para verificar se sua influência causará danos aos vermes;
- Analisar a atividade antibacteriana da CM 4-MTD com propósito de verificar a influência sobre a *E.coli*;
- Realizar testes de estresse biológico, a saber osmótico, térmico, oxidativo com intenção de identificar os possíveis efeitos causados pela Cumarina CM 4-MTD

6. MATERIAIS E MÉTODOS

6.1 Cepas utilizadas

A população do estudo foi constituída por cepas selvagens Bistol N2 e cepas mutantes GLP-4; SEK-1 provenientes do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista (ICTSJC-UNESP). Além disso, cultura de *Escherichia coli* (OP50) foram adquiridas do mesmo local. Cada grupo experimental foi constituído entre 75 vermes de cada mutação divididos em triplicata (SHARMA; PANDEY; SALUJA, 2018).

6.2 Manutenção das cepas

Para o armazenamento e manutenção dos vermes foram utilizadas placas de ágar em meio de crescimento de nematoide (NGM). Para 1L de NGM foi combinado 3g NaCl, 2.5g peptona, e 17g ágar. Posteriormente foi autoclavado por 45 min, adicionado 1 ml de colesterol (5 mg / ml em etanol), 1 ml de MgSO₄ 1M e 25ml de tampão KPO₄ 1M (estoque: 108,3g KH₂PO₄ e 35,6g K₂HPO₄ em 1000ml de H₂O destilada, autoclavado, pH 6,0). Após o processo a 55°C foi adicionado 1 ml de CaCl₂ 1M (WANG; CAO; DINH; DONG, 2013).

As estirpes foram alimentadas em uma dieta rica em bactérias *E. coli* OP50. Adaptando protocolos as cepas N2 e GLP-4; SEK-1 foram transferidas para novas placas a cada 4-5 dias, e armazenadas a 20°C a fim de evitar a contaminação progênie e verificação de mortalidade. Em contraposição, nos períodos de ensaios cepas GLP-4; SEK-1 foram armazenadas à 25°C a fim de evitar a progressão da progênie e feito a troca de placas a cada 4-5 dias. (AMRIT; RATNAPPAN; KEITH; GHAZI, 2014; BRUNQUELL; RAYNES; BOWERS; MORRIS *et al.*, 2018; LEE; KIM; AN; KIM *et al.*, 2018).

6.3 Sincronização e tratamento das cepas

Para estudos de longevidade é necessário que haja uma padronização das fases larvais. Para isso, inicialmente foram separadas três placas de Petri contendo a maior quantidade de vermes no estágio L4. Posteriormente cada placa foi lavada com 5ml de tampão M9 para retirar a maior quantidade de vermes possíveis e vertidos em um único tubo falcon de 15ml. O tubo foi então centrifugado 1500rpm por 2 minutos, seguido da remoção do sobrenadante até

a quantidade de 1ml. Este processo foi executado 3 vezes para remover resíduos de *E. coli*.

Sucessivamente foi adicionado 400µl NaClO e 100µl de 5M de NaOH e agitado por 3 minutos a fim de romper os vermes adultos e liberar os ovos. O processo foi observado em microscópio de dissecação, com o intuito de observar a ação do NaClO e NaOH para que se necessário interrompa a ação do mesmo a fim de não agredir a parede dos ovos. O mesmo se completa quando os vermes se tornam completamente imóveis com o corpo completamente estendidos ou em formato de V. A reação é interrompida com a adição de tampão M9 até a marca de 15ml. Rapidamente foi centrifugado a uma rotação de 1500rpm por 1 minuto e descartado o sobrenadante. O *pellet* foi lavado mais 3 vezes com tampão M9. O procedimento foi adaptado para o uso no laboratório utilizando as metodologias (PORTA-DE-LA-RIVA; FONTRONDA; VILLANUEVA; CERON, 2012; SALGUEIRO; XAVIER; DUARTE; CAMARA *et al.*, 2014; SUGAWARA; SAKAMOTO, 2018).

Por fim, foi feita a retirada do sobrenadante até a quantidade de 1ml, e posto em um homogeneizador *overnight* para que ocorra a eclosão dos ovos (PORTA-DE-LA-RIVA; FONTRONDA; VILLANUEVA; CERON, 2012; SUGAWARA; SAKAMOTO, 2018).

6.4 Tratamento das cepas e ensaios

Os vermes Bistol N2 não possuem a capacidade de se tornarem estéreis, sem utilização de reagentes externos. Assim, todos os testes, exceto de longevidade, puderam ser feitos com os mesmos, a fim de evitar interferência da mutação.

Em contraposição, cepas mutantes GLP-4;SEK1 foram utilizadas no ensaio de longevidade a fim de evitar equívocos na contagem e manutenção do mesmo (RASTOGI; BORGO; PAZDERNIK; FOX *et al.*, 2015)

Para uma verificação de taxa de sobrevivência a cada troca das placas de ágar os vermes foram tocados por um fio de platina por no mínimo 3 vezes consecutivas, a fim de verificar se estavam vivos ou mortos (AMRIT; RATNAPPAN; KEITH; GHAZI, 2014).

6.5 Preparos do tampão M9

O tampão M9 foi preparado com 1,5g de KH_2PO_4 , 3g de NaHPO_4 , 2,5g de NaCl e diluídos em 500ml de H_2O destilada em um frasco Erlenmeyer de 1L e autoclavado a 121°C por 15 minutos. Após esfriar, foi adicionado 500 μl de 1M de MgSO_4 e armazenado a 4°C para uso (PORTA-DE-LA-RIVA; FONTRDONA; VILLANUEVA; CERON, 2012).

6.6 Síntese da cumarina 4-metildafenetina (CM 4-MTD)

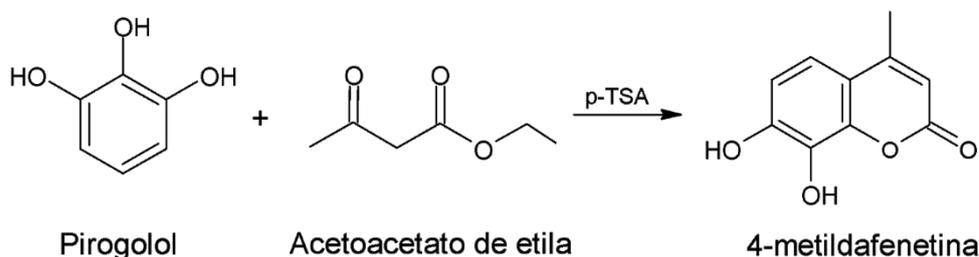
A manipulação da estrutura central da cumarina, sem a necessidade do uso de solventes, é conhecida como reação Pechmann, e utiliza de técnicas menos agressivas ao meio ambiente. Para isso, foi feita parceria com o Departamento de Química da Universidade Federal de Lavras e teve como base o uso de técnicas ambientalmente favoráveis (Química Verde).

Para o presente estudo, foi utilizado a síntese da cumarina de composição 4-metildafenetina (4-MTD) segundo os métodos de SHARMA; KUMAR e MAKRANDI (2011).

Para a reação foram utilizados o pirogólol e o acetoacetato de etila, respectivos ao componente fenol e o componente β -ceto-éster. Como catalizador, foi utilizado o ácido p-toulenesulfônico (p-TSA). Todos os componentes utilizados foram adquiridos junto a Sigma-Aldrich®.

Para síntese, em um pilão, foi adicionado o pirogólol (1 mmol) simultaneamente ao acetoacetato de etila (1 mmol) e o ácido tolueno-4-sulfônico (1 mmol) e macerado manualmente por cerca de 10 minutos até a reação passar por mudança de cor. Posteriormente, a mistura foi mantida à temperatura ambiente durante 50 minutos para a conclusão da reação. Após o término da reação foi adicionada água gelada (10°C) formando um precipitado sólido, que foi filtrado a vácuo, lavado com água e recristalizado a partir de etanol, dando origem a CM 4-MTD pura e em alta eficiência.

Figura 2: Processo químico para a síntese da Cumarina 4-metildinafetina (CM 4-MTD).



Fonte: Do autor.

6.7 Antibiograma: Análise antibacteriana da cumarina em relação a *E. coli* OP50

Para o teste antibacteriano foi utilizado o protocolo por meio da difusão de discos através da sensibilidade antimicrobiana.

Sendo assim, utilizando ágar Mueller-Hinton em placas petri foi espalhado uma cultura de *E. coli* OP50 frescas nas placas contendo discos de papel (4mm), os quais foram umedecidos com 5µl do composto de cumarina na concentração de 50µl/ml. Para o controle positivo foram utilizados agentes antimicrobianos, sendo: ampicilina (10µg), norfloxacin (10µg) e nitrofurantoina (300µg). Em seguida, as placas foram incubadas a 37° por 24 horas. Após esse período as placas foram analisadas através da inibição do crescimento em mm. O teste foi realizado em triplicata seguindo os procedimentos propostos por HOELZER; CUMMINGS; WARNICK; SCHUKKEN *et al.* (2011); PHOTOLO; MAVUMENGWANA; SITOLE e TLOU (2020).

6.8 Análise da atividade antioxidante da cumarina pela estabilização de radical livre (DPPH)

Para a análise da atividade antioxidante foi utilizado o método DPPH qual se destaca pela precisão e preço em relação aos demais. O teste é baseado na estabilização de radicais livres através da transferência de elétrons após a redução pelo antioxidante. Após a estabilização, os radicais DPPH tornam-se

moléculas estáveis de DPPH, ocasionando uma mudança na coloração entre violeta e amarelo.

Para realizar o experimento em tubos de ensaio foi utilizado um volume de 0,03ml nas respectivas concentrações do composto 25, 50, 100, 150, 200, 250 e 500 µg/ml e completados com 2,7ml de solução etanoica de DPPH.

Para a maior fidedignidade do resultado foi utilizado o grupo controle positivo feito com hidroxitolueno butilado (BHT), um antioxidante sintético, e controle negativo realizado apenas com solução etanoica.

Após as amostras terem sido homogeneizadas, foram mantidas por 60 minutos em ambiente escuro e temperatura ambiente a fim de não ocorrer reações adicionais.

Finalizado esse tempo, a absorbância (A) das amostras foi analisada por espectrofotômetro a um comprimento de onda de 515-520nm. Todas as análises foram realizadas em triplicata (GARCIA; OLDONI; ALENCAR; REIS *et al.*, 2012; SIRIVIBULKOVIT; NOUANTHAVONG; SAMEENOI, 2018)

6.9 Teste de toxicidade da Cumarina.

Para se realizar o teste de toxicidade, foi definido um número de 12 vermes por placa de 30mm a fim de se ter um completo panorama de todos os vermes. Os testes foram realizados em triplicata. Os vermes foram sincronizados e pegos no estágio L1 e transportados para as placas de 30mm contendo *E.coli* (OP50) nas diferentes concentrações do composto. A taxa de sobrevivência dos vermes foi analisada todos os dias até o início de sua progênie, com o objetivo de verificar se haveria mudanças em seu comportamento (XIONG; PEARS; WOOLLARD, 2017).

6.10 Preparo da placa para os ensaios de estresse induzido

Inicialmente, 10mg do composto de cumarina foi diluído em 500µl de dimetilsulfóxido (DMSO) e posteriormente completado até o volume de 1ml com água destilada. Logo em seguida, para uma melhor homogeneização, o mesmo foi submetido ao vórtex à 2500 rpm por 1 minuto. Após isto, 100µl foi retirado dessa solução e dissolvida de 9,9ml de água destilada, para assim se obter uma concentração de 100ug/ml. Em seguida foram feitas as respectivas diluições para as concentrações de 50, 25 e 10ug/ml.

Todas as concentrações ficaram abaixo de 1% de DMSO para uma melhor taxa de sobrevivência dos vermes de acordo com KATIKI; FERREIRA; ZAJAC; MASLER *et al.* (2011).

Posteriormente em uma placa de 24 poços foi vertido 2ml de NGM por cada poço, após 24h foi colocado 50µl de *E. coli* OP50 por poço e deixado *overnight* para secar, posteriormente foi aplicado 50µl de composto.

6.11 Ensaio de resistência ao estresse osmótico

O teste foi realizado em triplicata com uma amostra por grupo de 25 vermes. Os vermes foram dispostos em grupos, sendo: grupo controle; com uma concentração de 50µl/ml de DMSO + *E. coli* e grupo tratado; com concentrações de 10, 25, 50 µl/ml de cumarina + *E. coli*. Além disso foi utilizada uma segunda população de vermes para o controle negativo onde os mesmos foram expostos ao tampão M9 como uma forma de comparação de estresses.

Os vermes foram sincronizados e tratados desde o primeiro dia de vida com o composto e solução controle e transferidos todos os dias até o primeiro dia de vida adulta. Para o ensaio do estresse osmótico, em placas de 30mm contendo apenas NGM foi posto 2000µl de 500 mM NaCl, assim os vermes foram mantidos a 20°C e observados depois de 24 horas, os vermes receberam estímulo de um fio de platina afim de verificar taxa de sobrevivência (LEE; KIM; AN; KIM *et al.*, 2018; LEE; XING; KIM, 2017).

6.12 Ensaio de resistência ao estresse induzido por H₂O₂

Vermes síncronos e tratados com os compostos, no início da vida adulta, foram transferidos para placa de 30mm com NGM contendo 2000µl de 0,3% de H₂O₂ e mantidos a 20° C. Ao total 25 vermes foram avaliados por triplicata. Sendo grupo controle (tratado com *E. coli* + solução veículo de DMSO na concentração de 50 µl/ml) e grupo tratado (sendo tratado com *E. coli* + o composto na concentração de 10-25-50 µl/ml).

A taxa de sobrevivência após a transferência foi definida como 100% e avaliada a cada hora após um tempo inicial de 2 horas de estresse. O teste foi realizado em triplicata (SUGAWARA; SAKAMOTO, 2018).

6.13 Ensaio de resistência ao estresse térmico

Os grupos foram divididos como nos testes anteriores e feito em triplicata. Entretanto, os vermes foram sincronizados e transferidos todos os dias até o quarto dia de vida adulta afim de evitar a progênie e o esgotamento de alimento e composto.

No quarto dia de vida adulta os vermes foram transferidos a placas contando somente meio ágar com ausência de alimento e composto e logo em seguida submetidos a uma incubadora a uma temperatura de 35° e observados a cada 2 horas ao estímulo de um fio de platina afim de verificar taxa de sobrevivência. O processo foi adaptado seguindo o estudo base (SUGAWARA; SAKAMOTO, 2018).

6.13 Ensaio de longevidade

Em conjuntos de 25 vermes, feitos em triplicata, obtendo 75 vermes totais. Foram divididos os grupos em: grupo de controle negativo sendo alimentado com uma concentração de 50µl/ml de DMSO + *E. coli* e grupo tratado; com concentrações de 10, 25, 50 µl/ml de cumarina + *E. coli*.

Foram utilizados vermes GLP-4; SEK-1 síncronos mantidos a 25° para evitar a progênie. Após esse período a cada 4 dias era feito a troca de placa por meio de transferência com um fio de platina.

Os vermes mortos eram retirados da placa dia após dia até o último sobrevivente. As placas foram mantidas em temperatura 20° durante todo o experimento.

7. ESTATÍSTICA

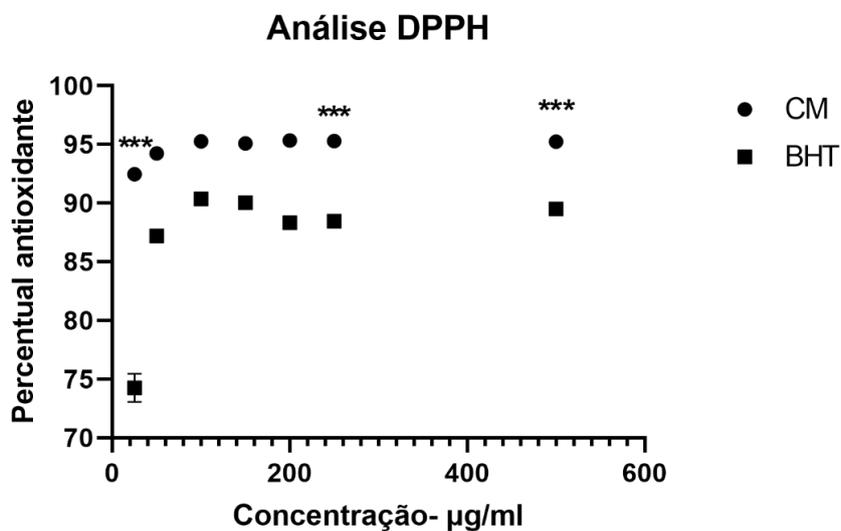
Em nossas análises foi utilizado o software estatístico *GraphPrism 8* para ANOVA Two way com amostras independentes com pós teste de comparações múltiplas de Sidak. Para as análises de taxa de sobrevivência foi utilizado curva de sobrevivência com o teste de Log-rank para tendência. Em todas as análises o nível de significância pré-estabelecido foi $p < 0.05$.

8. RESULTADOS

8.1 Análise antioxidante através de DPPH

Na análise de potencial antioxidante foi encontrado um resultado significativo entre o composto de cumarina 4-MTD e composto controle BHT. O mesmo foi encontrado com diferença significativa nas concentrações 25ug/ml ($p<0,01$) 250ug/ml ($p<0,05$) e 500ug/ml ($p<0,05$) (Figura 3).

Figura 3: Análise do percentual antioxidante.



Fonte: Dados da coleta.

8.2 Antibiograma, atividade antimicrobiana

Não foi encontrado nenhuma produção de halo nas amostras de cumarina 4-MTD (tabela 1).

Tabela 1

Controle de antibióticos

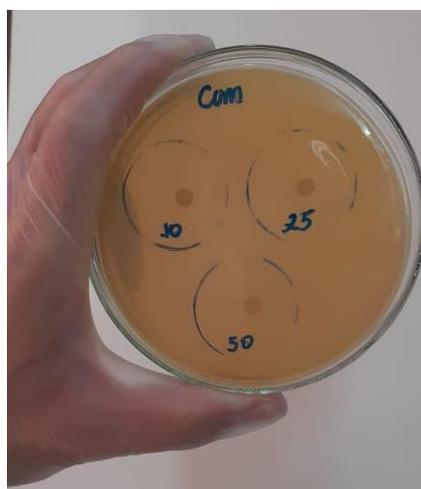
	Resistente	Intermediário	Sensível	Resultado	Classificação
Ampicilina (10µg)	≤13	14-16	≥17	26mm	Sensível
Norfloxacina (10µg)	≤12	13-16	≥17	30mm	Sensível
Nitrofurantoina (300µg)	≤14	15-16	≥17	38mm	Sensível
Cumarina 4-Metildinafetina (10µg)	--	--	--	0mm	Resistente
Cumarina 4-Metildinafetina (25µg)	--	--	--	0mm	Resistente
Cumarina 4-Metildinafetina (50µg)	--	--	--	0mm	Resistente

Fonte: Dados da coleta.

Quadro 1- TSA do composto derivado de Cumarina 4-Metildinafetina e controle positivo.



Controle Positivo (Ampicilina, Norfloxacin e Nitrofurantoina, respectivamente)



CM 4-MTD

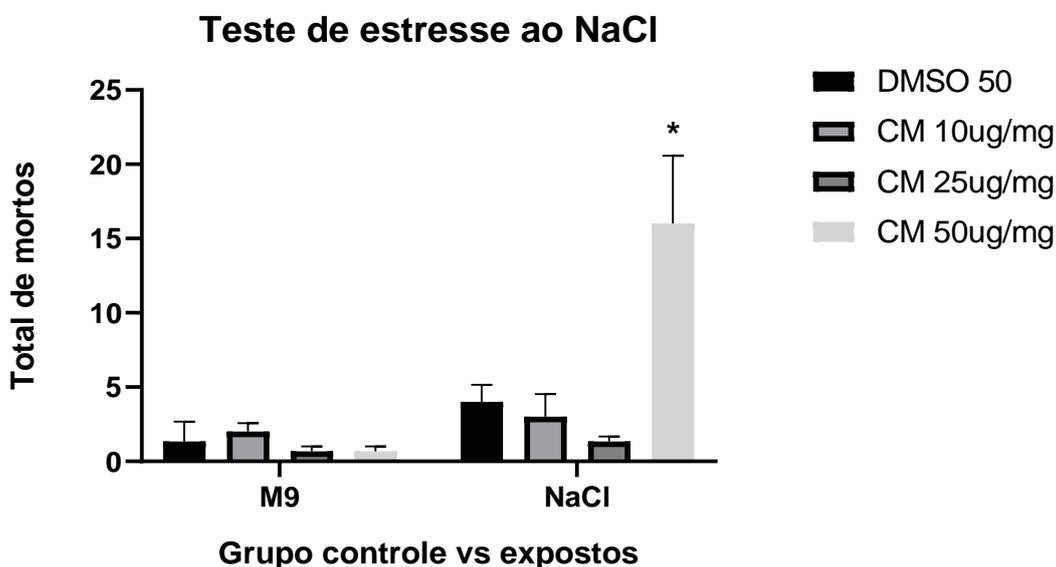
Fonte: Do autor (2020)

8.3 Teste de estresse osmótico sob a ação NaCl

No teste de estresse sob a influência do NaCl (figura 4), no grupo de controle negativo (M9), não foi encontrada diferença significativa entre as concentrações.

Na comparação entre o grupo expostos ao NaCl foi obtido um resultado significativo negativo no grupo de CM 50ug/ml ($P < 0,001$) em relação aos demais.

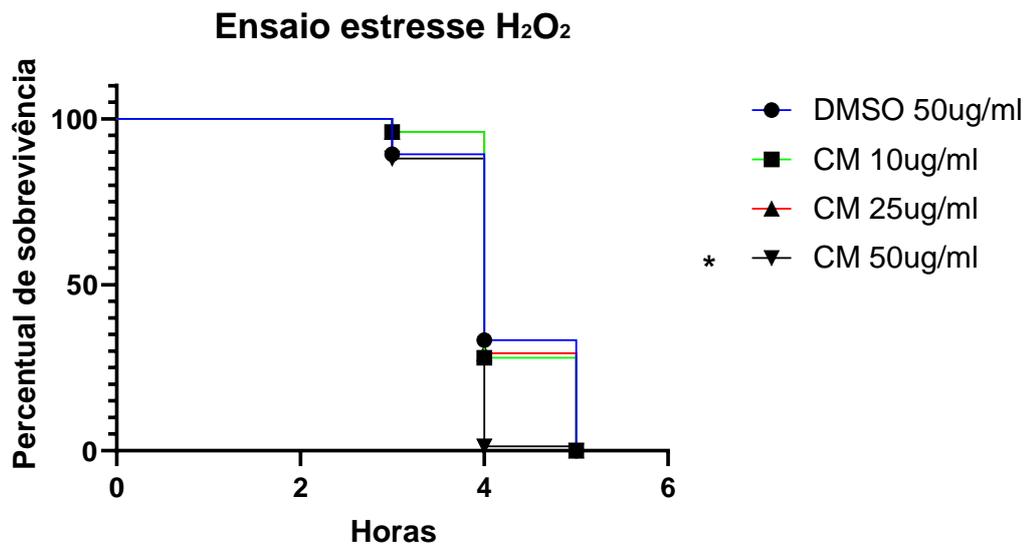
Figura 4: Análise estresse osmótico



Fonte: Coleta de dados.

8.4 Teste de estresse oxidativo sob a ação H₂O₂

No teste de estresse ao peróxido de hidrogênio (Figura 5) foi encontrada uma diferença significativa apenas na concentração de 50ug/ml do composto de cumarina ($P < 0,0001$) que mostrou uma maior taxa de mortalidade.

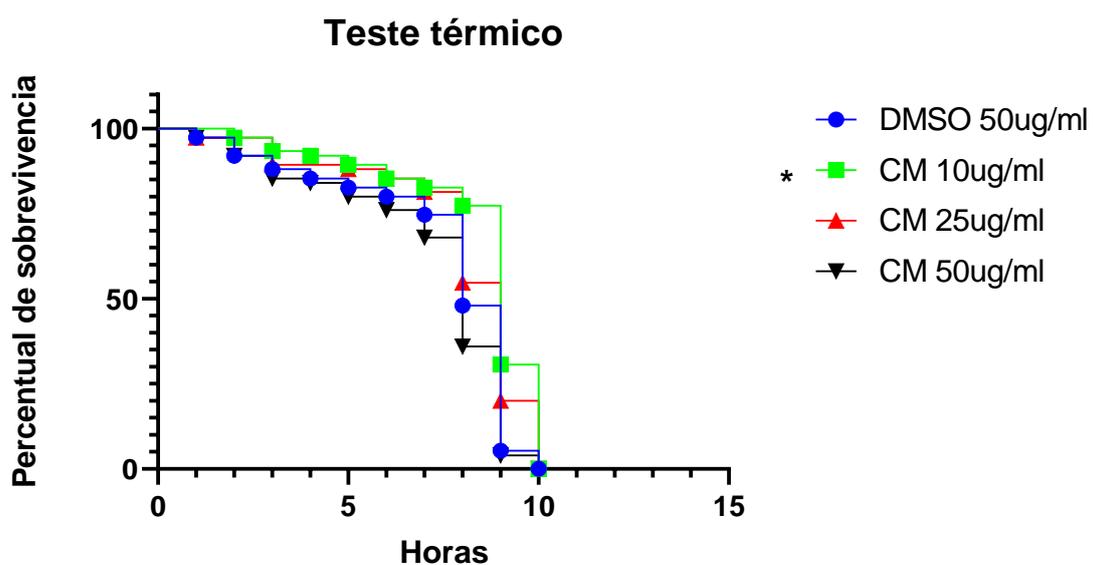
Figura 5: Percentual de sobrevivência ao teste de H₂O₂.

Fonte: Coleta de dados.

8.5 Teste de estresse térmico

Foi encontrada uma diferença significativa ($P < 0,0001$) da concentração de CM na concentração de 10 ug/ml em comparação ao DMSO 50 ug/ml, havendo uma maior resistência na taxa de morte ao estresse térmico (Figura 6).

Figura 6: Percentual de sobrevivência ao teste térmico.

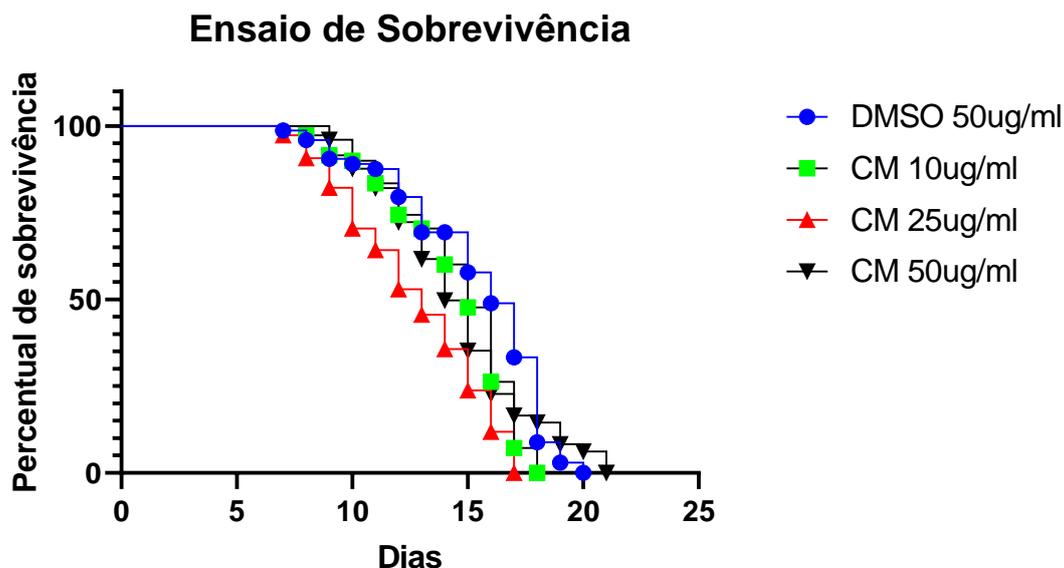


Fonte: Coleta de dados.

8.6 Ensaio de sobrevivência

No teste de sobrevivência (Figura 7) foi encontrado um resultado significativo na concentração de 25ug/ml demonstrando uma menor sobrevivência em relação aos demais.

Figura 7: Percentual de sobrevivência ao teste de longevidade.



Fonte: Coleta de dados.

Tabela 2

Média do tempo vida e desvio padrão

Cepa	Tratamento	Média de vida e \pm D.P
GLP-4;SEK-1	DMSO 50ug/ml	13,76 \pm 2,98
GLP-4;SEK-1	CM 10ug/ml	12,84 \pm 2,75
GLP-4;SEK-1	CM 25ug/ml	11,77 \pm 2,38
GLP-4;SEK-1	CM 50ug/ml	13,37 \pm 2,49

Fonte: Dados da coleta.

DISCUSSÃO

O presente estudo teve como objetivo identificar a influência do uso do composto sintético de cumarina 4-metildinafetina (CM 4-MTD) na longevidade e na resistência a diferentes tipos de estresse.

Caenorhabditis elegans são uma importante ferramenta metodológica para a farmacologia. A ausência de algumas características em relação a mamíferos como a falta de transporte de sangue, barreira hematoencefálica, metabolismo químico de filtração nos rins e fígado dentre outras características poderia ser um empecilho (WEINHOUSE; TRUONG; MEYER; ALLARD *et al.*, 2018). Entretanto, no estudo de HUNT (2017) foi descrito uma alta semelhança em análises de toxicidade da dose letal mediana (LD_{50}) entre *C. elegans* e camundongos. Sua similaridade a respostas de intervenções são compatíveis a mamíferos mais evoluídos (XIONG; PEARS; WOOLLARD, 2017). Isso torna o modelo uma excelente opção para testes iniciais de compostos.

Vários estudos como KATSORI e LITINA (2014); AL-MAJEDY; AL-DUHAIHAHAWI; AL-AZAWI; AL-AMIERY *et al.* (2016) SARKER e NAHAR (2017) descrevem uma alta atividade antioxidante dentre os efeitos da cumarina. Todavia, a base molecular da cumarina é capaz de gerar até 1300 compostos distintos, entretanto, CM 4-MTD ainda havia sido testada nessas condições.

Em nossos achados, o composto de cumarina de classe 4-metildinafetina corroboram com os estudos da literatura. A análise antioxidante mostrou ação acima IC_{50} em todas as concentrações utilizadas (Figura 3). Através das pesquisas feitas nos últimos anos foram identificadas melhor qualidade e manutenção do organismo através do uso de alimentos com alto potencial antioxidante (ERUSLANOV; KUSMARTSEV, 2010). A elevada produção de ROS pode causar danos a mitocôndria aumentando o desgaste da célula e diminuindo sua vida útil, e por conseguinte acelerando o envelhecimento (SON; LEE, 2019). Entretanto não observamos uma maior longevidade significativa (Figura 7) em relação ao grupo controle. Há relatos na literatura de que a altas taxas antioxidantes possam influenciar negativamente. PISOSCHI e POP (2015) descrevem que a ingestão de alimentos ou suplementos que contenham excesso de atividade antioxidante pode atuar negativamente para a ação da ROS endógenos causando um quadro conhecido como “estresse antioxidativo”. Em resposta a restrição de alimento, hipoxia e estresse oxidativo, o corpo tende a ativar vias autofágicas como AMPK e ATGs, para levar a uma melhor manutenção das células (ZHANG; SOWERS; REN, 2018). Diante disso, acreditamos que a alta ação antioxidante da CM 4-MTD pode inibir vias que

levariam a uma regulação ótima do organismo, assim, futuras pesquisas devem investigar a utilização de doses menores e mais elevadas para elencar sua ação na ativação de vias autofágicas e controle metabólico.

Simultaneamente, atividade antibacteriana se torna um controle de longevidade e essencial resultado. Vermes *C. elegans* alimentam-se da bactéria *E. coli* OP50, estudos prévios apresentam que o uso de bactérias mortas para alimentação dos vermes é menos tóxico, aumentando sua longevidade. Com isso, caso a CM 4-MTD apresentasse atividade antibacteriana, o resultado em relação ao grupo controle poderia ser discutível diante de um possível efeito na longevidade já que poderia ter advindo das bactérias mortas e não de um efeito metabólico do composto (HWANG; CHOI; WEI; PARK *et al.*, 2018; SUTPHIN; KAEBERLEIN, 2009). Além disso, um dos possíveis efeitos ao uso de derivados de cumarina é a ação antibacteriana (KATSORI; LITINA, 2014). Entretanto, não foi encontrado nenhuma taxa antibacteriana do composto.

ROS podem desempenhar um importante papel para regulação na defesa de patógenos e sinalização sistêmica. Promove a fosforilação de proteínas específicas, ativação de fatores de transcrição, modulação e estimulação do crescimento celular (POLJSAK; MILISAV, 2012). A maioria das células geram ROS e as utilizam como uma forma de sinalização química (RHEE; MEDICINE, 1999; VALKO; LEIBFRITZ; MONCOL; CRONIN *et al.*, 2007). Assim, compostos como a CM 4-MTD através dessa hipótese poderiam ter desempenhado uma ação antioxidante acima do ideal, causando um efeito negativo. Contudo, há a necessidade de mais dados e estudos para tal suposição sobre a CM 4-MTD.

A hipótese acima se relaciona ao teste de estresse térmico (figura 6), no qual foi encontrado uma diferença significativa no grupo de 10_{ug/ml} em maior resistência a morte dos vermes. Os grupos de maiores concentrações inibiriam completamente o estresse hormese, caracterizado como pequenos estresses que causam benefícios ao sistema de defesa do organismo evitando o acúmulo de proteínas mal dobradas (KUMSTA; CHANG; SCHMALZ; HANSEN, 2017).

No teste de longevidade, identificamos resultados semelhantes a outro estudo utilizando a mesma cepa. Com uma média aproximada de 14 dias de vida em cepas mutantes SEK-1 (RATHOR; PANDEY, 2018)

No do estudo de HENDERSON; BONAFÈ e JOHNSON (2006) é descrito que o excesso de alimento pode levar a uma ativação da via de sinalização semelhante à insulina / IGF (IIS) e alvo da rapamicina (mTOR) regulada pelo DAF-16 e conseqüentemente uma diminuição na vida do nematoide através da super expressão das vias da insulina. ZHANG; SOWERS e REN (2018) em sua revisão, analisam as cascatas de reações pela via relacionada a insulina mostrando que uma superexposição a nutrientes pode levar a uma diminuição da autofagia benéfica e conseqüentemente a uma menor longevidade.

A partir disso, o presente estudo foi feito com um pequeno grupo de nematoides por placas podendo ter ocorrido uma alta disponibilidade de alimento para os vermes. No artigo de HENDERSON; BONAFÈ e JOHNSON (2006), animais famintos apresentaram uma maior expressão da enzima antioxidante SOD:3. Assim, a escassez de alimento pode ativar vias dependentes da DAF-16 aumentando a longevidade (KOGURE; UNO; IKEDA; NISHIDA, 2017), enquanto vias relacionadas a autofagia são inibidas através de excesso de alimento (ZHANG; SOWERS; REN, 2018).

Apesar de todas as hipóteses apresentadas em busca de uma maior longevidade através do uso da Cumarina 4-MTD, um estudo utilizando outros compostos de cumarina como a 4-hidroxycumarina demonstrou efeito contrário ao de longevidade, sendo utilizado para tratamento alternativo de gliomas, levando a uma antiangiogênese e maiores níveis apoptóticos através da inibição da expressão anti-apoptótica de Bcl-2 (SUMOREK-WIADRO; ZAJĄC; BĄDZIUL; LANGNER *et al.*, 2020).

C. elegans possuem altas adaptações epigenéticas, sendo que pequenas mudanças na temperatura, e na concentração dos sais e nutrientes podem desencadear mudanças significativas a diversas progênies (HUNT, 2017). As respostas a repetidos estímulos externos podem gerar uma mudança em como as proteínas foram formadas, este fenômeno pode ser passado para progênies seguintes, sendo caracterizado como quadro epigenético, alterando a susceptibilidade à doenças metabólicas ou a um determinado estímulo (D'AQUILA; ROSE; BELLIZZI; PASSARINO, 2013). Estudos adicionais são necessários para verificar se a exposição a cumarina de classe 4-MTD poderia desempenhar efeitos epigenéticos na prole de C. elegans.

CONCLUSÃO

Conclui-se que a cumarina de classe 4-metildinafetina (CM 4-MTD), apresenta uma alta taxa antioxidante, abrindo novos olhares de pesquisa. Entretanto, o composto não apresentou efeitos biológicos na proteção contra estresses ou contribuição para a longevidade em vermes *C. Elegans*. Ademais, não foram evidenciadas propriedades antibacterianas.

9. REFERÊNCIAS

AGUILERA, C. G.; PALLADINO, F.; ASKJAER, P. C. *elegans* epigenetic regulation in development and aging. **Brief Funct Genomics**, 13, n. 3, p. 223-234, May 2013.

AL-MAJEDY, Y. K.; AL-DUHAIHAHAWI, D. L.; AL-AZAWI, K. F.; AL-AMIERY, A. A. *et al.* Coumarins as potential antioxidant agents complemented with suggested mechanisms and approved by molecular modeling studies. 21, n. 2, p. 135, 2016.

AMRIT, F. R.; RATNAPPAN, R.; KEITH, S. A.; GHAZI, A. The *C. elegans* lifespan assay toolkit. **Methods**, 68, n. 3, p. 465-475, Aug 1 2014.

BAKER, E. A.; WOOLLARD, A. How Weird is The Worm? Evolution of the Developmental Gene Toolkit in *Caenorhabditis elegans*. **J Dev Biol**, 7, n. 4, Sep 28 2019.

BARJA, G. Towards a unified mechanistic theory of aging. **Experimental Gerontology**, 124, p. 110627, Sep 2019.

BRUNQUELL, J.; RAYNES, R.; BOWERS, P.; MORRIS, S. *et al.* CCAR-1 is a negative regulator of the heat-shock response in *Caenorhabditis elegans*. **Aging Cell**, 17, n. 5, p. e12813, Oct 2018.

CHUANG, H.-S.; KUO, W.-J.; LEE, C.-L.; CHU, I.-H. *et al.* Exercise in an electrotactic flow chamber ameliorates age-related degeneration in *Caenorhabditis elegans*. **Scientific reports**, 6, p. 28064, 2016.

COGHLAN, A. Nematode genome evolution. **WormBook**, ed. **The C. elegans Research Community**, 07/07/2005 2005.

CONTE, M.; MARTUCCI, M.; CHIARIELLO, A.; FRANCESCHI, C. *et al.* Mitochondria, immunosenescence and inflammaging: a role for mitokines? **Seminars in Immunopathology**, p. 11, 2020. Review; Early Access.

D'AQUILA, P.; ROSE, G.; BELLIZZI, D.; PASSARINO, G. Epigenetics and aging. **Maturitas**, 74, n. 2, p. 130-136, 2013/02/01/ 2013.

DETSI, A.; KONTOGIORGIS, C.; HADJIPAVLOU-LITINA, D. Coumarin derivatives: an updated patent review (2015-2016). **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, 27, n. 11, p. 1201-1226, Nov 2017.

ERUSLANOV, E.; KUSMARTSEV, S. Identification of ROS using oxidized DCFDA and flow-cytometry. **Methods Mol Biol**, 594, p. 57-72, 2010.

GARCIA, E. J.; OLDONI, T. L. C.; ALENCAR, S. M. d.; REIS, A. *et al.* Antioxidant activity by DPPH assay of potential solutions to be applied on bleached teeth. **Brazilian Dental Journal**, 23, p. 22-27, 2012.

GASPAR, A.; MILHAZES, N.; SANTANA, L.; URIARTE, E. *et al.* Oxidative stress and neurodegenerative diseases: looking for a therapeutic solution inspired on benzopyran chemistry. **Curr Top Med Chem**, 15, n. 5, p. 432-445, 2015.

HAYFLICK, L. How and why we age. **Experimental Gerontology**, 33, n. 7, p. 639-653, 1998/11/01/ 1998.

HAYFLICK, L. The future of ageing. **Nature**, 408, n. 6809, p. 267-269, 2000/11/01 2000.

HEMSHEKHAR, M.; SUNITHA, K.; THUSHARA, R. M.; SEBASTIN SANTHOSH, M. *et al.* Antiarthritic and antiinflammatory propensity of 4-methylesculetin, a coumarin derivative. **Biochimie**, 95, n. 6, p. 1326-1335, 2013/06/01/ 2013.

HENDERSON, S. T.; BONAFÈ, M.; JOHNSON, T. E. daf-16 Protects the Nematode *Caenorhabditis elegans* During Food Deprivation. **The Journals of Gerontology: Series A**, 61, n. 5, p. 444-460, 2006.

HOELZER, K.; CUMMINGS, K. J.; WARNICK, L. D.; SCHUKKEN, Y. H. *et al.* Agar disk diffusion and automated microbroth dilution produce similar antimicrobial susceptibility testing results for *Salmonella* serotypes Newport, Typhimurium, and 4, 5, 12: i-, but differ in economic cost. **Foodborne pathogens and disease**, 8, n. 12, p. 1281-1288, 2011.

HOULT, J. R. S.; PAYÁ, M. Pharmacological and biochemical actions of simple coumarins: Natural products with therapeutic potential. **General Pharmacology: The Vascular System**, 27, n. 4, p. 713-722, 1996/06/01/ 1996.

HUNT, P. R. J. J. o. A. T. The *C. elegans* model in toxicity testing. 37, n. 1, p. 50-59, 2017.

HWANG, S.-B.; CHOI, J.-g.; WEI, S.; PARK, B.-J. *et al.* In vivo screening platform for shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) using *Caenorhabditis elegans* as a model. 13, n. 2, p. e0193277, 2018.

JIN, X.; WANG, Y.; LI, X.; TAN, X. *et al.* 7, 8-Dihydroxy-4-methylcoumarin provides neuroprotection by increasing hippocalcin expression. **Neurotoxicity research**, 27, n. 3, p. 268-274, 2015.

KALETTA, T.; HENGARTNER, M. O. Finding function in novel targets: *C. elegans* as a model organism. **Nature Reviews Drug Discovery**, 5, n. 5, p. 387-399, 2006/05/01 2006.

KATIKI, L. M.; FERREIRA, J. F. S.; ZAJAC, A. M.; MASLER, C. *et al.* *Caenorhabditis elegans* as a model to screen plant extracts and compounds as natural anthelmintics for veterinary use. **Veterinary Parasitology**, 182, n. 2, p. 264-268, 2011/12/15/ 2011.

KATSORI, A.-M.; HADJIPAVLOU-LITINA, D. Coumarin derivatives: an updated patent review (2012–2014). **Expert opinion on therapeutic patents**, 24, n. 12, p. 1323-1347, 2014.

KATSORI, A. M.; LITINA, D. H. <Coumarin derivatives an updated 2012 2014.pdf>. **Expert opinion on therapeutic patents**, 2014.

KLENIEWSKA, P.; PAWLICZAK, R. The influence of apocynin, lipoic acid and probiotics on antioxidant enzyme levels in the pulmonary tissues of obese asthmatic mice. **Life Sci**, 234, p. 116780, Aug 17 2019.

KOCH, S.; LARBI, A.; DERHOVANESSIAN, E.; ÖZCELİK, D. *et al.* Multiparameter flow cytometric analysis of CD4 and CD8 T cell subsets in young and old people. **Immunity & Ageing**, 5, n. 1, p. 6, 2008/07/25 2008.

KOGURE, A.; UNO, M.; IKEDA, T.; NISHIDA, E. The microRNA machinery regulates fasting-induced changes in gene expression and longevity in *Caenorhabditis elegans*. **J Biol Chem**, 292, n. 27, p. 11300-11309, Jul 7 2017.

KUMSTA, C.; CHANG, J. T.; SCHMALZ, J.; HANSEN, M. J. N. c. Hormetic heat stress and HSF-1 induce autophagy to improve survival and proteostasis in *C. elegans*. 8, n. 1, p. 1-12, 2017.

LEE, E. B.; KIM, J. H.; AN, C. W.; KIM, Y. J. *et al.* Longevity and Stress Resistant Property of 6-Gingerol from *Zingiber officinale* Roscoe in *Caenorhabditis elegans*. **Biomolecules & therapeutics**, 26, n. 6, p. 568-575, 2018.

LEE, E. B.; XING, M. M.; KIM, D. K. Lifespan-extending and stress resistance properties of brazilin from *Caesalpinia sappan* in *Caenorhabditis elegans*. **Arch Pharm Res**, 40, n. 7, p. 825-835, Jul 2017.

LUCANIC, M.; GARRETT, T.; GILL, M. S.; LITHGOW, G. J. A Simple Method for High Throughput Chemical Screening in *Caenorhabditis Elegans*. **J Vis Exp**, n. 133, Mar 20 2018.

MAGLIONI, S.; ARSALAN, N.; VENTURA, N. C. *elegans* screening strategies to identify pro-longevity interventions. **Mech Ageing Dev**, 157, p. 60-69, Jul 2016.

MAKOWSKI, A. J.; UPPUGANTI, S.; WADEER, S. A.; WHITEHEAD, J. M. *et al.* The loss of activating transcription factor 4 (ATF4) reduces bone toughness and fracture toughness. **Bone**, 62, p. 1-9, 2014.

MANGO, S. E. Generations of longevity. **Nature**, 479, p. 302, 11/16/online 2011.

MITANI, S. Comprehensive functional genomics using *Caenorhabditis elegans* as a model organism. **Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci**, 93, n. 8, p. 561-577, 2017.

NASCIMENTO, J. C.; LAGE, L. F. O.; CAMARGOS, C. R. D.; AMARAL, J. *et al.* Determinação da atividade antioxidante pelo método DPPH e doseamento de flavonóides totais em extratos de folhas da *Bauhinia variegata* L. **Revista Brasileira de Farmácia**, 92, n. 4, p. 327-332, 2011.

PARK, D. C.; YEO, S. G. Aging. **Korean journal of audiology**, 17, n. 2, p. 39, 2013.

PHOTOLO, M. M.; MAVUMENGWANA, V.; SITOLE, L.; TLOU, M. G. Antimicrobial and Antioxidant Properties of a Bacterial Endophyte, *Methylobacterium radiotolerans* MAMP 4754, Isolated from *Combretum erythrophyllum* Seeds. **International journal of microbiology**, 2020, 2020.

PINTO, S.; SATO, V. N.; DE-SOUZA, E. A.; FERRAZ, R. C. *et al.* Enoxacin extends lifespan of *C. elegans* by inhibiting miR-34-5p and promoting mitohormesis. **Redox Biol**, 18, p. 84-92, Sep 2018.

PISOSCHI, A. M.; POP, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 97, p. 55-74, 2015/06/05/ 2015.

POLJSAK, B.; MILISAV, I. The Neglected Significance of "Antioxidative Stress". **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2012, p. 480895, 2012/05/08 2012.

PORTA-DE-LA-RIVA, M.; FONTRONDONA, L.; VILLANUEVA, A.; CERON, J. Basic Caenorhabditis elegans methods: synchronization and observation. **J Vis Exp**, n. 64, p. e4019, Jun 10 2012.

RASTOGI, S.; BORGIO, B.; PAZDERNIK, N.; FOX, P. *et al.* Caenorhabditis elegans glp-4 Encodes a Valyl Aminoacyl tRNA Synthetase. **G3 (Bethesda)**, 5, n. 12, p. 2719-2728, Oct 13 2015.

RATHOR, L.; PANDEY, R. Age-induced diminution of free radicals by Boeravinone B in Caenorhabditis elegans. **Exp Gerontol**, 111, p. 94-106, Oct 1 2018.

RHEE, S. G. J. E.; MEDICINE, m. Redox signaling: hydrogen peroxide as intracellular messenger. 31, n. 2, p. 53-59, 1999.

RIBEIRO, V. M.; BEDE, T. P.; ROCHA, G. S.; BARROSO, S. *et al.* High fat diet and high polyphenols beverages effects in enzymatic and non-enzymatic antioxidant activity. **Nutr Hosp**, 35, n. 1, p. 169-175, Nov 24 2017.

RIDDLE, D. L.; BLUMENTHAL, T.; MEYER, B. J.; PRIESS, J. R. **C. elegans II**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997. 0879695323.

SALGUEIRO, W. G.; XAVIER, M. C.; DUARTE, L. F.; CAMARA, D. F. *et al.* Direct synthesis of 4-organylsulfenyl-7-chloro quinolines and their toxicological and pharmacological activities in Caenorhabditis elegans. **Eur J Med Chem**, 75, p. 448-459, Mar 21 2014.

SARKER, S. D.; NAHAR, L. Progress in the chemistry of naturally occurring coumarins. *In: Progress in the Chemistry of Organic Natural Products 106*: Springer, 2017. p. 241-304.

SCIENCE, C. e. S. C. J. Genome sequence of the nematode C. elegans: a platform for investigating biology. 282, n. 5396, p. 2012-2018, 1998.

SHARMA, D.; KUMAR, S.; MAKRANDI, J. K. Modified Pechmann condensation using grinding technique under solvent-free condition at room temperature. **Green Chemistry Letters and Reviews**, 4, n. 2, p. 127-129, 2011/06/01 2011.

SHARMA, M.; PANDEY, R.; SALUJA, D. ROS is the major player in regulating altered autophagy and lifespan in sin-3 mutants of *C. elegans*. **Autophagy**, 14, n. 7, p. 1239-1255, 2018.

SIRIVIBULKOVIT, K.; NOUANTHAVONG, S.; SAMEENOI, Y. Paper-based DPPH Assay for Antioxidant Activity Analysis. **Anal Sci**, 34, n. 7, p. 795-800, 2018.

SON, J. M.; LEE, C. Mitochondria: multifaceted regulators of aging. **BMB Reports**, 52, n. 1, p. 13-23, 2019.

STEIN, L. D.; BAO, Z.; BLASIAR, D.; BLUMENTHAL, T. *et al.* The Genome Sequence of *Caenorhabditis briggsae*: A Platform for Comparative Genomics. **PLOS Biology**, 1, n. 2, p. e45, 2003.

SUGAWARA, T.; SAKAMOTO, K. Killed *Bifidobacterium longum* enhanced stress tolerance and prolonged life span of *Caenorhabditis elegans* via DAF-16. **British Journal of Nutrition**, 120, n. 8, p. 872-880, 2018.

SUMOREK-WIADRO, J.; ZAJĄC, A.; BĄDZIUL, D.; LANGNER, E. *et al.* Coumarins modulate the anti-glioma properties of temozolomide. **European Journal of Pharmacology**, 881, p. 173207, 2020/08/15/ 2020.

SUTPHIN, G. L.; KAEBERLEIN, M. Measuring *Caenorhabditis elegans* life span on solid media. **J Vis Exp**, n. 27, May 12 2009.

TROEN, B. R. The biology of aging. **The Mount Sinai Journal Of Medicine, New York**, 70, n. 1, p. 3-22, 2003.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M. T. *et al.* Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Int J Biochem Cell Biol**, 39, n. 1, p. 44-84, 2007.

WANG, D.; CAO, M.; DINH, J.; DONG, Y. Methods for creating mutations in *C. elegans* that extend lifespan. *In: Biological Aging*: Springer, 2013. p. 65-75.

WEINHOUSE, C.; TRUONG, L.; MEYER, J. N.; ALLARD, P. J. E. *et al.* *Caenorhabditis elegans* as an emerging model system in environmental epigenetics. 59, n. 7, p. 560-575, 2018.

WILHELM, E. A.; FERREIRA, A. T.; PINZ, M. P.; REIS, A. S. D. *et al.* Antioxidant effect of quinoline derivatives containing or not selenium: Relationship with antinociceptive action quinolines are antioxidant and antinociceptive. **An Acad Bras Cienc**, 89, n. 1 Suppl 0, p. 457-467, May 2017.

XIONG, H.; PEARS, C.; WOOLLARD, A. An enhanced *C. elegans* based platform for toxicity assessment. **Sci Rep**, 7, n. 1, p. 9839, Aug 29 2017.

XU, K.; GUO, Y.; LI, Z.; WANG, Z. Aging Biomarkers and Novel Targets for Anti-Aging Interventions. **Adv Exp Med Biol**, 1178, p. 39-56, 2019.

XU, X.; CHUA, C. C.; KONG, J.; KOSTRZEWA, R. M. *et al.* Necrostatin-1 protects against glutamate-induced glutathione depletion and caspase-independent cell death in HT-22 cells. **Journal of neurochemistry**, 103, n. 5, p. 2004-2014, 2007.

YANG, I. J.; LEE, D. U.; SHIN, H. M. Anti-inflammatory and antioxidant effects of coumarins isolated from *Foeniculum vulgare* in lipopolysaccharide-stimulated macrophages and 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-stimulated mice. **Immunopharmacol Immunotoxicol**, 37, n. 3, p. 308-317, Jun 2015.

YU, J.; WANG, L.; WALZEM, R. L.; MILLER, E. G. *et al.* Antioxidant Activity of Citrus Limonoids, Flavonoids, and Coumarins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 53, n. 6, p. 2009-2014, 2005/03/01 2005.

ZAMBERLAN, D.; AMARAL, G.; ARANTES, L.; MACHADO, M. *et al.* *Rosmarinus officinalis* L. increases *Caenorhabditis elegans* stress resistance and longevity in a DAF-16, HSF-1 and SKN-1-dependent manner. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 49, n. 9, 2016.

ZHANG, Y.; SOWERS, J. R.; REN, J. J. N. R. E. Targeting autophagy in obesity: from pathophysiology to management. 14, n. 6, p. 356-376, 2018.

ZHOU, L.; FU, X.; JIANG, L.; WANG, L. *et al.* Arbutin increases *Caenorhabditis elegans* longevity and stress resistance. **PeerJ**, 5, p. e4170, 2017.