

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

LARISSA MAURA DE MELO MATTOS

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE COMPLEXOS DE
COORDENAÇÃO CONTENDO OS METAIS DE TRANSIÇÃO FERRO, COBRE
E MANGANÊS.

RIO DE JANEIRO

2021

Larissa Maura de Melo Mattos

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE COMPLEXOS DE
COORDENAÇÃO CONTENDO OS METAIS DE TRANSIÇÃO FERRO, COBRE
E MANGANÊS

Dissertação de Mestrado
apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Bioquímica,
como requisito parcial à obtenção
do título de Mestre em Ciências

Orientador: Marcos Dias Pereira

Rio de Janeiro
2021

CIP - Catalogação na Publicação

MM444a Mattos, Larissa Maura de Melo
Avaliação da atividade antioxidante de complexos de coordenação contendo os metais de transição ferro, cobre e manganês / Larissa Maura de Melo Mattos. -- Rio de Janeiro, 2021.
112 f.

Orientador: Marcos Dias Pereira.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Química, Programa de Pós Graduação em Bioquímica, 2021.

1. Antioxidantes. 2. Complexos de coordenação. 3. Estresse oxidativo. 4. *Saccharomyces cerevisiae*. 5. *Galleria mellonella*. I. Pereira, Marcos Dias, orient. II. Título.

Larissa Maura de Melo Mattos

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE COMPLEXOS DE
COORDENAÇÃO CONTENDO OS METAIS DE TRANSIÇÃO FERRO, COBRE
E MANGANÊS

Dissertação de Mestrado
apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Bioquímica,
Universidade Federal do Rio de
Janeiro, como requisitos parcial à
obtenção do título de Mestre em
Bioquímica

Aprovada em

Prof. Dr. Marcos Dias Pereira,
Departamento de Bioquímica, Instituto de Química,
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof(a). Dr. Regina Menezes Echaniz
Instituto de Tecnologia Química e Biológica (ITQB), Centro de Estudos de
Doenças Crônicas (CEDOC)
Universidade Lusófona de Lisboa

Prof. Dr. Fábio Cesar Sousa Nogueira
Departamento de Bioquímica, Instituto de Química,
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Aos meus pais, Aluizo e Laura, por
sempre acreditarem em mim e por me
apoiarem em todas das realizações.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe e ao meu pai deixo um agradecimento especial, por todas as lições de amor, companheirismo, amizade, caridade, dedicação, compreensão e perdão que vocês me dão a cada novo dia. Sinto-me orgulhosa e privilegiado por ter pais tão especiais.

Ao meu orientador Marcos Dias Pereira, pela orientação, competência, profissionalismo e dedicação tão importantes. Obrigado por acreditar em mim e por todo o incentivo. Tenho certeza que não chegaria neste ponto sem o seu apoio.

A todos os amigos do LaCiGen, especialmente: Daniela Dias, Julliana Muniz, Andreia Carneiro, Hyan Hottum e Daniele Cabral por todo o apoio, aprendizado e pelas conversas que auxiliaram na execução e discussão desse trabalho.

Ao meu ex-professor Frederico Castro, por acreditar em mim e me colocar em contato com meu atual orientador.

Aos membros da banca examinadora, Prof^a Regina Menezes Echaniz e Prof. Fábio César Sousa Nogueira, que tão gentilmente aceitaram participar e colaborar com esta dissertação.

Por fim, a todos aqueles que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização desta dissertação, o meu sincero agradecimento.

*“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

MATTOS, Larissa Maura de Melo. **Avaliação da atividade antioxidante de compostos de coordenação contendo os metais de transição ferro, cobre e manganês.** Rio de Janeiro, 2021. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2021.

As espécies reativas de oxigênio (EROs) desempenham um papel fundamental no metabolismo celular. No entanto, quando em excesso, superando a capacidade do sistema antioxidante, ou pela deficiência do mesmo podem gerar estresse oxidativo. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é um dos melhores modelos de sistema eucariótico unicelular para estudos sobre estresse oxidativo. Possui mecanismos próprios de ativação metabólica e de detoxificação, que não estão presentes em bactérias, permitindo ensaios para avaliação da atividade antioxidante de inúmeros compostos de forma rápida, econômica e reprodutível. Além das leveduras *S. cerevisiae*, larvas de *Galleria mellonella* vêm se apresentando como um ótimo modelo de estudo em substituição dos modelos de experimentação animal devido a sua facilidade de manipulação, semelhança entre seu sistema imune inato ao dos mamíferos, reprodução dos resultados encontrados em animais de experimentação e inexistência de regulamentação ética. Os compostos de coordenação contêm um ou mais átomos ou íons centrais, aos quais estão ligados moléculas neutras ou carregadas, além disso o átomo central é, geralmente, um metal de transição, capaz de formar ligações coordenadas com seus ligantes. As interessantes propriedades medicinais destes compostos têm motivado a síntese e caracterização de novos compostos antitumorais e/ou antioxidantes. Este trabalho teve por objetivo estudar o potencial antioxidante de três complexos de coordenação com os metais ferro, cobre e manganês. A atividade antioxidante foi analisada *in vitro* pela redução do DPPH e *in vivo* através do uso de *Saccharomyces cerevisiae* e *Galleria mellonella*. Em *S. cerevisiae* a atividade antioxidante foi realizada em células de metabolismo fermentativo, e tratadas por 1h com cada composto por adição direta à cultura celular. Após os tratamentos, as células foram coletadas por centrifugação, lavadas com H₂O estéril, ressuspensas em meio YPD 2% e depois estressadas com 1,0mM de H₂O₂ ou 30mM de menadiona por 1h. Para a peroxidação

lipídica foi utilizado o método de TBARS, que consiste na detecção do malondialdeído formado durante o processo de peroxidação lipídica nas células. Para indução e ativação da Hsp104-GFP as células foram tratadas com os compostos durante 1h e, então foi realizada a visualização em microscópio de fluorescência. A análise da ativação da catalase e SOD foram realizadas através do acompanhamento da decomposição do H_2O_2 e da inibição da redução do azul de nitrotetrazólio (NBT) à formazan, respectivamente, na presença ou ausência do tratamento com os compostos de coordenação. Para os experimentos de envelhecimento cronológico as células cresceram até a fase estacionária, e submetidas ao tratamento (ou não) com os compostos, e mantidas a 28°C a 160rpm durante 28 dias. A absorção do composto foi realizada por ICP-MS. Para analisar a atividade antioxidante em *Galleria mellonella*, as larvas de *G. mellonella* foram tratadas com os compostos através de injeção diretamente na hemocele e depois estressadas com 5M de H_2O_2 . A sobrevivência das larvas foi acompanhada durante 7 dias. O ensaio DPPH indicou uma atividade antioxidante moderada com um valor de $\text{EC}_{50}(\mu\text{M})$ de 64,3, 67,1 e 30,81 para os compostos de coordenação contendo os metais Fe, Cu e Mn, respectivamente. Nos testes *in vivo* os compostos apresentaram maior proteção nas concentrações de 12,5, 25 e 50 μM . Os compostos reduziram entre 25% e 68% os valores de peroxidação lipídica quando comparados com o dano causado pelo H_2O_2 . Foi observado que os compostos induziram a expressão da proteína de choque térmico Hsp104, mas não sua ativação. O tratamento com os compostos não ativou a catalase, porém foi capaz de ativar a Sod. Além disso, o tratamento com os compostos também foi capaz de prolongar o tempo de vida cronológico das células. Foi observado um aumento na absorção dos metais Fe, Mn e Cu com o aumento da concentração à que as células foram expostas, além de alterações na concentração de outros metais. As larvas de *G. mellonella* tratadas com os compostos apresentaram maior sobrevivência após o estresse provocado por 5M de H_2O_2 , além disso, o tratamento não afetou a diferenciação entre as fases do ciclo de vida das larvas.

Palavras-chave: Antioxidantes. Complexos de coordenação. Estresse oxidativo. *Saccharomyces cerevisiae*. *Galleria mellonella*.

ABSTRACT

MATTOS, Larissa Maura de Melo. **Evaluation of the antioxidant activity of coordination compounds containing the transport metals iron, copper and manganese.** Rio de Janeiro, 2021. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2021.

Reactive oxygen species (ROS) play a key role in cell metabolism. However, when in excess, surpassing the capacity of the antioxidant system, or due to its deficiency, it can generate oxidative stress. The yeast *Saccharomyces cerevisiae* is one of the best models of the unicellular eukaryotic system for studies on oxidative stress. The active components of metabolic activation and detoxification, which are not present in bacteria, allow tests to assess the antioxidant activity of compounds in a fast, economical and reproducible way. In addition to the *S. cerevisiae* yeasts, additional *Galleria mellonella* larvae expand as an excellent study model to replace animal experimentation models due to their ease of handling, similarity between their innate immune system to that of mammals, reproduction of those found in animals. experimentation and lack of ethical religion. Coordination compounds combine one or more central atoms or ions, to which neutral or charged molecules are attached, in addition the central atom is generally a transition metal, capable of forming coordinated bonds with its ligands. The medicinal properties of the compounds have motivated the synthesis and characterization of new antitumor and/or antioxidant compounds. This work aimed to study the antioxidant potential of three coordination complexes with metals iron, copper and manganese. Antioxidant activity was analyzed in vitro by DPPH reduction and in vivo through the use of *Saccharomyces cerevisiae* and *Galleria mellonella*. In *S. cerevisiae* the antioxidant activity was performed in fermentative metabolism cells, and treated for 1h with each compound by direct addition to the culture cell phone. After treatments, cells were collected by centrifugation, washed with sterile H₂O, resuspended in 2% YPD medium and then stressed with 1.0mM H₂O₂ or 30mM menadione for 1h. For lipid peroxidation, the TBARS method is used, which consists of detecting malondialdehyde formed during the lipid peroxidation process in cells. For induction and activation of Hsp104-GFP, the

cells were treated with the compounds for 1h and then visualized under a fluorescence microscope. The analysis of catalase and SOD activation was performed by monitoring the decomposition of H₂O₂ and the inhibition of the reduction of nitrotetrazolium blue (NBT) to formazan, respectively, in the presence or absence of treatment with coordination compounds. For the chronological aging experiments how cells were grown to the stationary phase, and subjected to treatment (or not) with the compounds, and kept at 28°C at 160rpm for 28 days. Compound absorption was performed by ICP-MS. To analyze the antioxidant activity in *Galleria mellonella*, *G. mellonella* larvae were treated with the compounds through injection directly into the hemocoel and then stressed with 5M H₂O₂. The larvae were followed for 7 days. The DPPH assay indicates moderate antioxidant activity with an EC₅₀ (μM) value of 64.3, 67.1 and 30.81 for coordination compounds containing the metals Fe, Cu and Mn, respectively. In in vivo tests they provide greater protection in the 12.5, 25 and 50μM standards. The compounds reduced between 25% and 68% the values of lipid peroxidation when compared to the damage emitted by H₂O₂. It was observed that the compounds induced the expression of the heat shock protein Hsp104, but not its activation. Treatment with compounds not active to catalase, however, was able to activate Sod. Furthermore, treatment with the compounds was also able to prolong the chronological lifespan of cells. An increase in the absorption of Fe, Mn and Cu metals was observed with the increase in the concentration to which the cells were exposed, in addition to changes in the concentration of other metals. *G. mellonella* larvae treated with the main compounds after stress caused by 5M H₂O₂, in addition, the treatment did not affect the differentiation between the stages of the larvae's life cycle.

Keywords: Antioxidants. Coordination compounds. *Galleria mellonella*. Oxidative stress. *Saccharomyces cerevisiae*.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Aumento da produção de EROs e estresse oxidativo. | 20 |
| Figura 2. Principais sítios de produção de ROS na CTE | 23 |
| Figura 3. Efeito das espécies reativas de oxigênio (EROs) sobre o funcionamento celular..... | 25 |
| Figura 4. Etapas da redução completa do O ₂ a H ₂ O. | 28 |
| Figura 5. Esquema geral do mecanismo de oxidação lipídica. | 32 |
| Figura 6. Ciclo catalítico da superóxido dismutase citosólica (SOD-Cu/Zn) e mitocondrial (SOD-Mn). | 35 |
| Figura 7. Estruturas tridimensionais das isoformas da enzima superóxido dismutase e seus respectivos centros catalíticos. | 37 |
| Figura 8: Ciclo catalítico da catalase (Cat)..... | 39 |
| Figura 9. Estrutura da catalase citoplasmática | 41 |
| Figura 10: Ciclo catalítico da glutathione peroxidase (GPx) | 43 |
| Figura 11. Gráfico demonstrando o número de artigos publicados nos últimos anos. | 45 |
| Figura 12. Imagem da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> através de Microscopia Eletrônica..... | 49 |
| Figura 13. Características da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como modelo eucariótico. | 50 |
| Figura 14. Esquema representativo de condições de estresse | 53 |
| Figura 15. Larvas de <i>Galleria mellonella</i> | 55 |
| Figura 16. Esquema da placa de 96 poços utilizada no ensaio | 62 |
| Figura 17. Estrutura química dos compostos de coordenação | 64 |
| Figura 18. Atividade antioxidante <i>in vitro</i> dos compostos de coordenação FeH ₂ , CuH ₂ e MnH ₂ | 73 |
| Figura 19. Toxicidade dos compostos de coordenação FeH ₂ , CuH ₂ e MnH ₂ em <i>S. cerevisiae</i> | 76 |
| Figura 20. Proteção conferida pelos compostos de coordenação FeH ₂ , MnH ₂ e CuH ₂ contra o estresse oxidativo. | 78 |
| Figura 21. Proteção conferida pelos compostos após o estresse com 30mM de menadiona na cepa BY4741 | 80 |

| | |
|--|----|
| Figura 22. Proteção conferida pelos compostos após o estresse com 30 mM de menadiona na cepa com ausência da enzima Sod1 | 82 |
| Figura 23. Redução da peroxidação lipídica promovida pelo tratamento com os complexos FeH ₂ , MnH ₂ e CuH ₂ | 84 |
| Figura 24. Efeito dos compostos de coordenação FeH ₂ , CuH ₂ e MnH ₂ na atividade da enzima catalase..... | 86 |
| Figura 25. Atividade da Sod endógena após o tratamento com os compostos FeH ₂ , CuH ₂ e MnH ₂ | 87 |
| Figura 26. Indução e ativação da expressão da Hsp104-GFP | 89 |
| Figura 27. Aumento da longevidade de células de BY4741 após tratamento com os compostos e o envelhecimento cronológico..... | 91 |
| Figura 28. Sobrevivência de larvas de <i>G. mellonella</i> após o tratamento com os compostos e o estresse causado por 5,0M de H ₂ O ₂ | 94 |
| Figura 29. Complexos não afetam a continuidade do ciclo de vida de <i>G. mellonella</i> | 96 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1. Cepas de <i>S. cerevisiae</i> utilizadas neste trabalho | 63 |
| Tabela 2. Valores de EC ₅₀ dos complexos após resultados da atividade antioxidante pelo método do DPPH | 74 |
| Tabela 3. Análise da concentração intracelular de metais em <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 92 |

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

8-oxo-G - 7,8-dihidro-8-oxo-guanina

Acetil-CoA – acetil coenzima A

ADP – adenosine difosfato

APOX – ascorbato peroxidase

ATP – adenosine trifosfato

Cat - catalase

CO₂ – dióxido de carbono

CTE – cadeia transportadora de elétrons

CTT1 - Gene da catalase T

Cu - cobre

Cu/Zn-Sod1 - Cu/Zn-Superóxido dismutase

CuSO₄ – sulfato de cobre

DNA – ácido desoxirribonucleico

DPPH – 2,2-difenil-1-picril-hidrazil

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

ERN – espécies reativas de nitrogênio

EROs – espécies reativas de oxigênio

FADH₂ - Dinucleótido de flavina e adenina

Fe - ferro

Fis1 - proteína de fissão mitocondrial 1

GFP - *green fluorescent protein*

GPx – glutathione peroxidase

GR - glutathione reductase

GSH - glutathione reduzida

GSTs - glutathione S-transferases

GSSG - glutathione oxidada

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio

HCl – ácido clorídrico

HNO₂ - ácido nitroso

HSPs – *Heat Shock Protein*

ICP-MS – Espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplada

LOOH - hidroperóxido lipídico

MDA - malondialdeído

Mn - manganês

Mn-Sod – Mn-Superóxido dismutase

NADH - Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo

NADPH - nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NaOH – hidróxido de sódio

NBT - Nitrotetrazólio (Nitro blue tetrazolium)

NO• - óxido nítrico

NO₂⁻ - nitrito

NO₃⁻ - nitrato

O₂⁻ - ânion superóxido

OH• - radical hidroxila (•)

ONOO⁻ - peróxinitritos

PBS - phosphate buffered saline (*Tampão* fosfato-salino)

Pep4 – gene da Aspartil protease vacuolar (proteínase A)

PNR – Produtos não radicais

Sod – Superoxido dismutase

Sod1 – Cu/Zn-Superoxido dismutase

SOD1 – Gene da Cu/Zn-Superoxido dismutase

SOD2 – Gene da Mn-Superoxido dismutase

Sod2 – Mn-Superoxido dismutase

STRE – *Stress Respose Elemente* (elementos de resposta ao estresse)

TBARS - Thiobarbituric Acid Reactive Substances (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico)

TEMED - Tetrametil etileno diamina

TRX – gene da tiorredoxina

Tyr – tirosina

YPD 2% - Meio de cultura com extrato de levedo, peptona e glicose

Zn - zinco

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO | 19 |
| 1.1 ESTRESSE OXIDATIVO | 19 |
| 1.2 AS ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E OS DANOS OXIDATIVO .. | 26 |
| 1.3 SISTEMA ANTIOXIDANTE..... | 33 |
| 1.4 COMPOSTOS DE COORDENAÇÃO COMO UMA ALTERNATIVA PARA O ESTRESSE OXIDATIVO | 44 |
| 1.5 A LEVEDURA <i>Saccharomyces cerevisiae</i> COMO MODELO DE ESTUDO | 47 |
| 1.5.1.1 Resposta de <i>S. cerevisiae</i> ao estresse oxidativo | 51 |
| 1.6 <i>Galleria mellonella</i> COMO MODELO DE ESTUDO | 54 |
| 2. JUSTIFICATIVA | 58 |
| 3. OBJETIVOS | 60 |
| 3.1 OBJETIVO GERAL | 60 |
| 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 60 |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS..... | 61 |
| 4.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE <i>IN VITRO</i> PELO MÉTODO DO DPPH | 61 |
| 4.1.1 Preparo do DPPH (0,3mM). | 61 |
| 4.1.2 Preparo das amostras. | 61 |
| 4.1.3 Preparo da placa..... | 61 |
| 4.1.4 Cálculo da atividade antioxidante | 62 |
| 4.2 CEPAS DE <i>S. cerevisiae</i> UTILIZADAS..... | 63 |
| 4.3 COMPLEXOS E CONDIÇÕES DE TRATAMENTO DAS CÉLULAS DE <i>S. cerevisiae</i> | 63 |
| 4.4. CONDIÇÕES DE EXPOSIÇÃO AO ESTRESSE OXIDATIVO | 65 |
| 4.5 DETERMINAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DOS COMPLEXOS EM <i>S. cerevisiae</i> | 65 |
| 4.6 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO E ATIVAÇÃO DA PROTEÍNA DE CHOQUE TÉRMICO HSP104..... | 66 |
| 4.7 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA..... | 67 |
| 4.8 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES | |

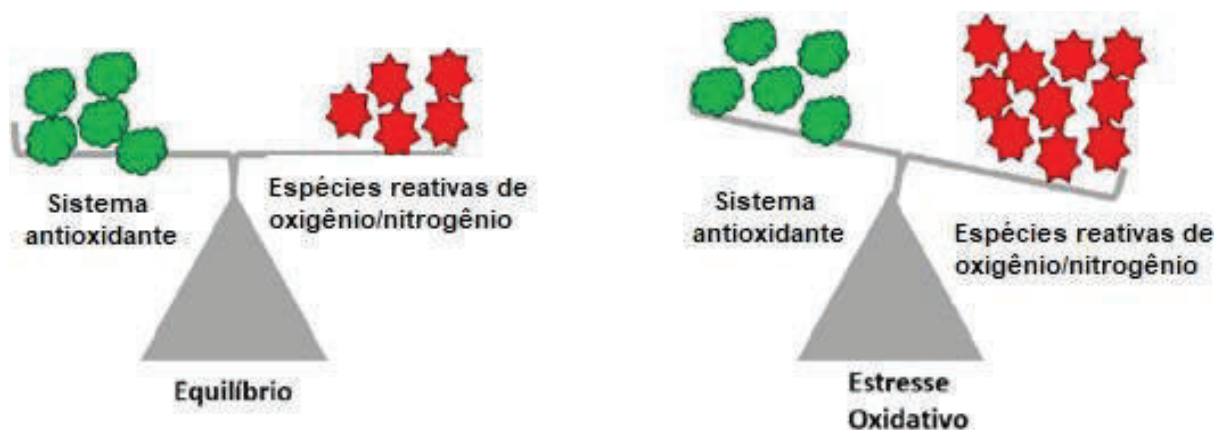
| | |
|---|------------|
| CATALASE (CAT) E SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD)..... | 67 |
| 4.8.1 Obtenção do extrato livre de células para dosagem enzimática | 67 |
| 4.8.2 Determinação da atividade de catalase | 68 |
| 4.8.3 Determinação da atividade Sod..... | 68 |
| 4.9 DETERMINAÇÃO DA SOBREVIVÊNCIA APÓS O ENVELHECIMENTO CRONOLÓGICO | 69 |
| 4.10 DETERMINAÇÃO DA ABSORÇÃO DOS COMPOSTOS DE COORDENAÇÃO PELAS CÉLULAS DE <i>S. cerevisiae</i> | 70 |
| 4.11 SOBREVIVÊNCIA DE <i>G. mellonella</i> APÓS A EXPOSIÇÃO AO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO | 71 |
| 4.11.1.1 Criação dos insetos. | 71 |
| 4.11.1.2 Condições de exposição ao peróxido de hidrogênio..... | 71 |
| 4.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA..... | 72 |
| 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 72 |
| 5.1 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE <i>IN VITRO</i> | 72 |
| 5.2 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS COMPLEXOS EM <i>S. cerevisiae</i> | 74 |
| 5.3 TRATAMENTO COM OS COMPLEXOS DIMINUI OS DANOS AOS LIPÍDIOS DE MEMBRANA..... | 83 |
| 5.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE CAT E SOD ENDÓGENAS | 85 |
| 5.5 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO E ATIVIDADE DA PROTEÍNA HSP104 APÓS O TRATAMENTO COM OS COMPOSTOS | 88 |
| 5.6 AUMENTO DA LONGEVIDADE CELULAR APÓS O TRATAMENTO COM OS COMPLEXOS FeH ₂ , MnH ₂ E CuH ₂ | 90 |
| 5.7 COMPLEXOS ALTERAM A CONCENTRAÇÃO DE METAIS EM <i>S. cerevisiae</i> | 92 |
| 5.8 TRATAMENTO COM OS COMPLEXOS FeH ₂ , MnH ₂ E CuH ₂ AUMENTA A SOBREVIVÊNCIA DE <i>G. mellonella</i> APÓS O ESTRESSE OXIDATIVO | 93 |
| 6 DISCUSSÃO | 97 |
| 7 CONCLUSÕES | 105 |
| REFERENCIAS..... | 106 |

1 INTRODUÇÃO

1.1 ESTRESSE OXIDATIVO

O estresse oxidativo caracteriza-se pelo desequilíbrio entre a produção das espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN) e a presença de antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos (ZANUTO et al., 2011). A etiologia do estresse oxidativo é multifatorial e relacionada a fatores endógenos e fontes exógenas. Enquanto fontes externas, tais como a exposição ao tabaco, medicamentos, radiação ultravioleta e/ou ionizante, dentre outras podem levar ao estabelecimento do estresse oxidativo, esta condição também pode ser proveniente de fontes endógenas, tais como a mitocôndria e a atividade das enzimas xantina oxidase, citocromo P450 oxidase e monoaminoxidases (VASCONCELOS et al., 2006) (MAGALHÃES, 2013). Normalmente, estas defesas antioxidantes são capazes de neutralizar as EROs que são produzidas na respiração celular, principalmente. Porém, quando há uma produção exagerada, o organismo perde sua capacidade de neutralização das EROs o que acaba gerando um quadro de estresse oxidativo (**Figura 1**) (MIRON, 2018).

Figura 1. Aumento da produção de EROs e estresse oxidativo. Pode-se observar no primeiro esquema o sistema antioxidante em equilíbrio com a produção das EROs e/ou ERNs. No segundo esquema pode-se observar o desequilíbrio gerado pelo excesso das EROs e/ou ERNs, ou por problemas no sistema antioxidante.



Fonte: Adaptado de MIRON (2018).

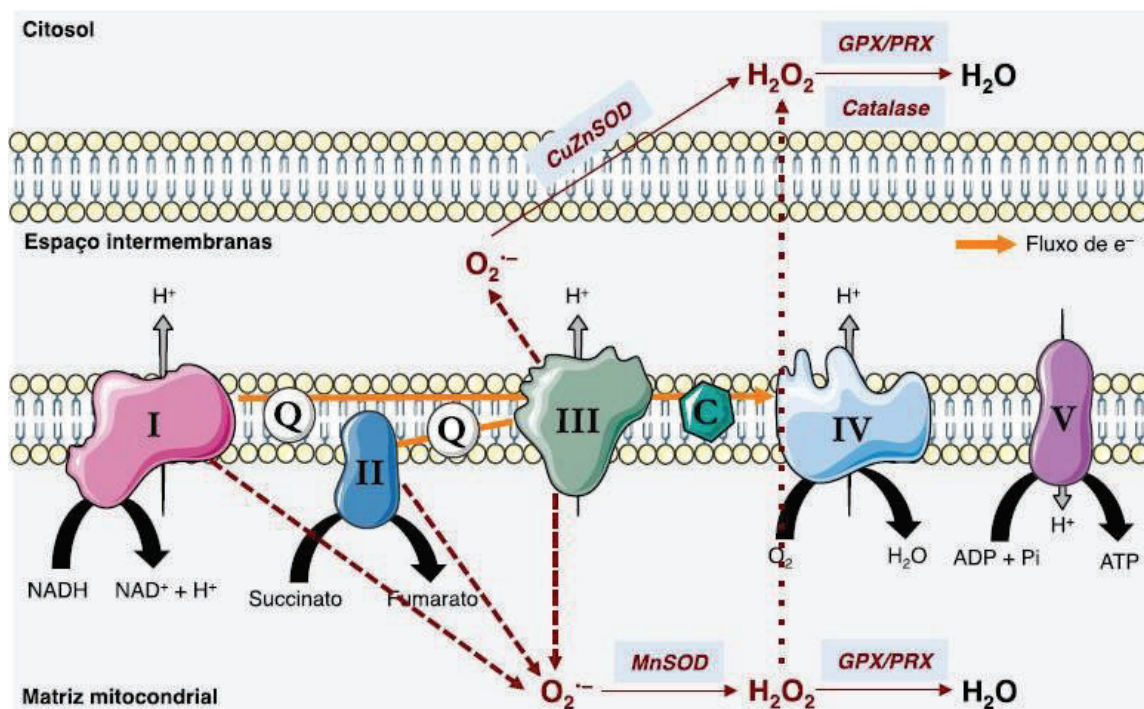
Nas mitocôndrias, a cadeia transportadora de elétrons é a principal fonte de energia do organismo, e durante a transferência de elétrons pelos complexos I e III pode ocorrer uma pequena fuga de elétrons que levam a redução parcial do oxigênio formando o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$). Neste contexto, estima-se que 5% de todo o oxigênio consumido pela respiração celular seja convertido em uma ERO (ZANUTO et al., 2011). Embora o oxigênio molecular seja pouco reativo, quando parcialmente reduzido, recebendo 1, 2 ou 3 elétrons, forma espécies de grande reatividade [ex. ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), e o radical hidroxila (OH^{\cdot})].

Mitocôndrias são organelas especializadas, encontradas somente em células eucariontes, sendo responsáveis por várias funções celulares, como modulação da atividade neuronal, morfogênese, neuroplasticidade e produção energética, sendo também cruciais no processo de morte celular programada (apoptose). As mitocôndrias são constituídas por dois complexos de membranas, separados por um espaço intermembrana, o qual possui inúmeras invaginações que formam as cristas mitocondriais, em que estão presentes as proteínas da cadeia transportadora de elétrons, cujo número e morfologia refletem a demanda de energia (DING et al., 2012).

Enquanto as etapas iniciais do metabolismo (ex. carboidratos e lipídeos) acontecem fora da mitocôndria, a geração das EROs ocorre na matriz mitocondrial. Inicialmente, a glicose é convertida em piruvato e, então, transportada para a matriz mitocondrial. Já os ácidos graxos são quebrados fora da mitocôndria, a oxidação destes nutrientes se processa no interior da matriz mitocondrial. No interior da mitocôndria, o ATP é produzido mediante três etapas interconectadas (CYRINO et al., 2020): na primeira, o piruvato e os ácidos graxos são convertidos em moléculas conhecidas como acetil-CoA por meio de enzimas presentes na matriz; na segunda etapa, o acetil-CoA torna-se a base para a cadeia de reações químicas conhecida como ciclo de Krebs (PEI; WALLACE; 2018), constituído por uma série de reações químicas em que o CO_2 , NADH e o $FADH_2$ são produzidos; na terceira etapa, os elétrons do NADH e $FADH_2$ são transferidos para a cadeia transportadora de elétrons (CTE), o que leva à produção de ATP. Para a execução desse processo, o complexo I e o II recebem elétrons do NADH e $FADH_2$, respectivamente

(ENRÍQUEZ, 2016). Ambos complexos proteicos transferem esses elétrons para a Coenzima Q10, essencial em virtude das suas propriedades redox e antioxidantes. A coenzima Q10 transfere os elétrons para o complexo III, quando são transportados para o complexo IV pelo citocromo C (ALVAREZ- PAGGI et al., 2017). No complexo IV, elétrons são transferidos para o oxigênio molecular formando água (MILENKOVIC et al., 2017; ENRÍQUEZ, 2016). No decorrer do processo de transferência de elétrons pelos complexos I, III e IV, existe um bombeamento de prótons (H^+) da matriz mitocondrial para o espaço intermembranas. Finalmente, os H^+ são transportados pelo complexo V, também chamado de ATP sintase, de volta à matriz mitocondrial, resultando na formação de ATP por meio do ADP e do fosfato inorgânico. O ATP alimenta várias funções da célula e do organismo como um todo (**Figura 2**) (CYRINO et al., 2020).

Figura 2. Principais sítios de produção das EROs na CTE. Na mitocôndria, EROs são formados pela reação prematura de elétrons com o O_2 . Os complexos I e III são os principais locais de redução parcial do O_2 . O complexo II e reações do ciclo do ácido cítrico também produzem EROs. O superóxido produzido é dismutado pelas enzimas superóxido dismutases na matriz (MnSOD) ou no espaço intermembranas (CuZnSOD). A dismutação do $O_2^{\bullet -}$ produz o peróxido de hidrogênio, que é consumido por catalases ou peroxidases (e.g. glutationa peroxidase e peroxiredoxinas).



Fonte: MOREIRA (2017).

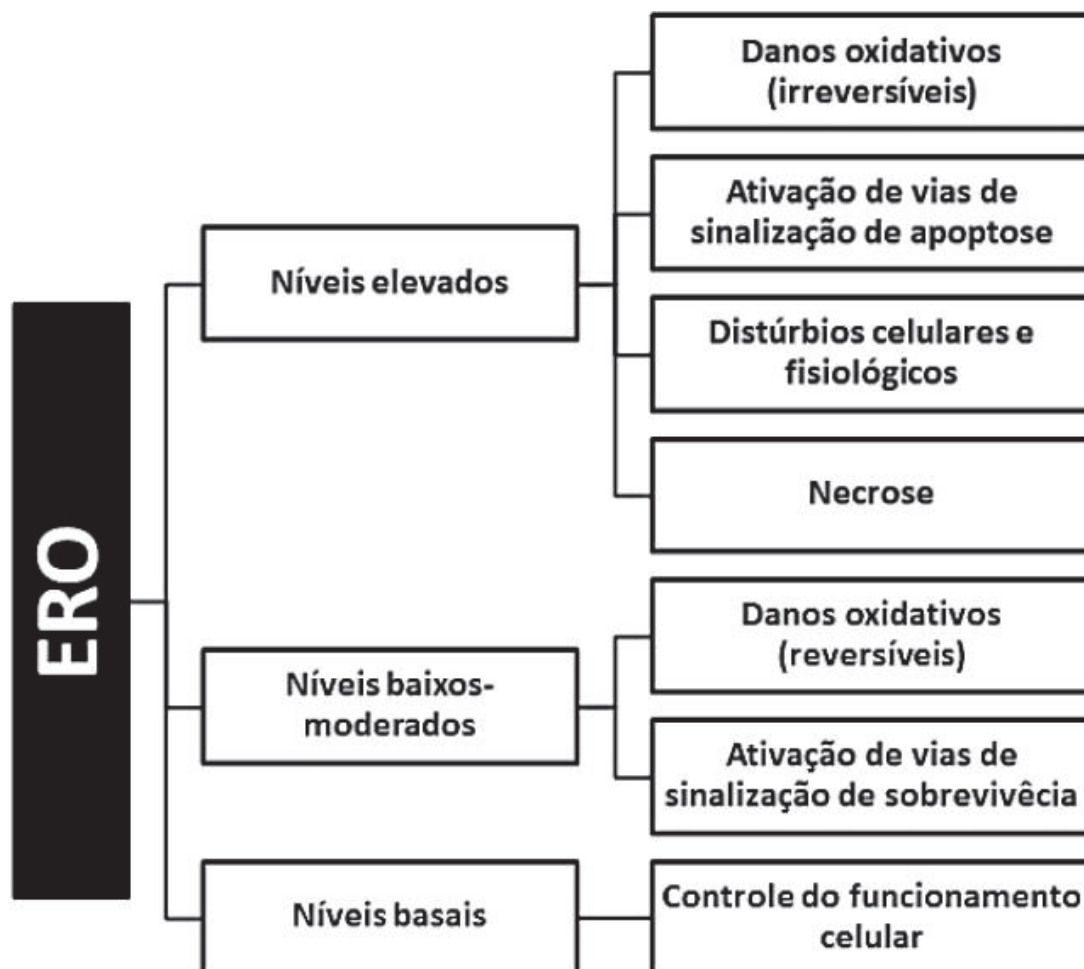
Os organismos aeróbicos são constantemente expostos as EROs, geradas durante o metabolismo normal ou pela exposição a condições ambientais. Tais agentes tóxicos podem causar sérios danos em uma variedade de componentes celulares, tais como por exemplo membrana plasmática, proteínas e material genético, resultando em peroxidação lipídica, oxidação de proteínas, e danos genéticos causados pela modificação ou quebra do DNA (DEMASI et al., 2006; HERRERO et al. 2007; BOONE et al, 2017). O estresse oxidativo pode estar relacionado com mais de 50 enfermidades, tais como a artrite, diabetes, câncer e doenças neurodegenerativas (IANOSKI, 2019). A regulação negativa e/ou mutações nos genes que codificam enzimas antioxidantes, tais como as SODs, e proteínas anti-apoptóticas (Fis1 ou Pep4) estão implicadas em diversas doenças (ex. neurodegenerativas) associadas à idade (SUDHARSHAN et al., 2018).

As EROs estão presentes nos animais, nas plantas e nos microrganismos, sendo fundamentais na defesa contra infecções, por exemplo. Contudo, quando essas espécies reativas estão presentes em altas concentrações podem causar inúmeros efeitos deletérios aos seres vivos, tanto reversíveis quanto irreversíveis, podendo inclusive resultar em necrose e apoptose (**Figura 3**) (IANOSKI, 2019).

O estresse oxidativo é a consequência dos danos produzidos pelo acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs), como ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila (OH^{\cdot}) ou por alterações do estado redox celular levando a depleção do sistema antioxidante (SMART, 2008).

Por fim, o estresse oxidativo não ocorre apenas devido as ERO, surge também em consequência do aumento dos níveis das espécies reativas de nitrogênio (ERN), que incluem o óxido nítrico (NO^{\cdot}), ácido nitroso (HNO_2), nitrito (NO_2^-), nitrato (NO_3^-) e peróxinitritos ($ONOO^-$) (MAGALHÃES, 2013).

Figura 3. Efeito dos diferentes níveis de formação das EROs sobre o funcionamento celular. As EROs participam normalmente de diversos processos fisiológicos. Porém, quando produzidas de maneira descontrolada podem causar danos oxidativos e regulação de vias de sinalização relacionadas com sobrevivência. Já uma produção contínua de altos níveis das EROs podem acarretar em efeitos adversos como distúrbios fisiológicos e necrose.



Fonte: IANOSKI, 2019.

1.2 AS ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E OS DANOS OXIDATIVOS.

A respiração, através do processo da cadeia transportadora de elétrons é uma das principais fontes das EROs nas células eucariontes. Para gerar ATP, elétrons são transportados até o aceptor final, o oxigênio molecular, ao longo de complexos de proteínas que constituem a cadeia transportadora de elétrons (MURPHY, 2009).

Níveis celulares elevados de EROs são formados quando células são expostas aos agentes redox e à radiação ionizante, induzindo danos no DNA, os quais incluem oxidação de bases, formação de sítios abásicos e quebras de fita dupla e simples de DNA, os quais podem ser mutagênicos e/ou citotóxicos (QUEIROZ *et al.*, 2011).

Os principais elementos participantes de reações de óxido-redução no organismo humano são o oxigênio (O₂) e o nitrogênio (N) (VASCONCELOS *et al.*, 2007). Os produtos formados nessas reações nem sempre apresentam elétrons desemparelhados em sua última camada, mas ainda assim podem ser altamente reativos, como por exemplo, o oxigênio singleto e o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (RIBEIRO *et al.*, 2005). Por este motivo, tais moléculas são atualmente denominadas “espécies reativas”, evitando-se o termo “radical livre”. As espécies reativas de oxigênio (ERO's, ou ROS – “*reactive oxygen species*”), bem como as espécies reativas de nitrogênio (ERN's, ou RNS – “*reactive nitrogen species*”), são moléculas altamente instáveis, quimicamente, muito reativas e apresentam meia-vida curta (MCCORD, 2000).

A estrutura molecular e atômica dos radicais livres possui normalmente elétrons associados em pares, onde cada par de elétrons tem um número quântico associado de + $\frac{1}{2}$ ou - $\frac{1}{2}$. Os radicais podem formar-se através da quebra de ligações covalentes, onde um elétron de cada um dos pares permanece em cada átomo, sendo este processo designado de cisão homolítica (ANDRÉ *et al.*, 2006).

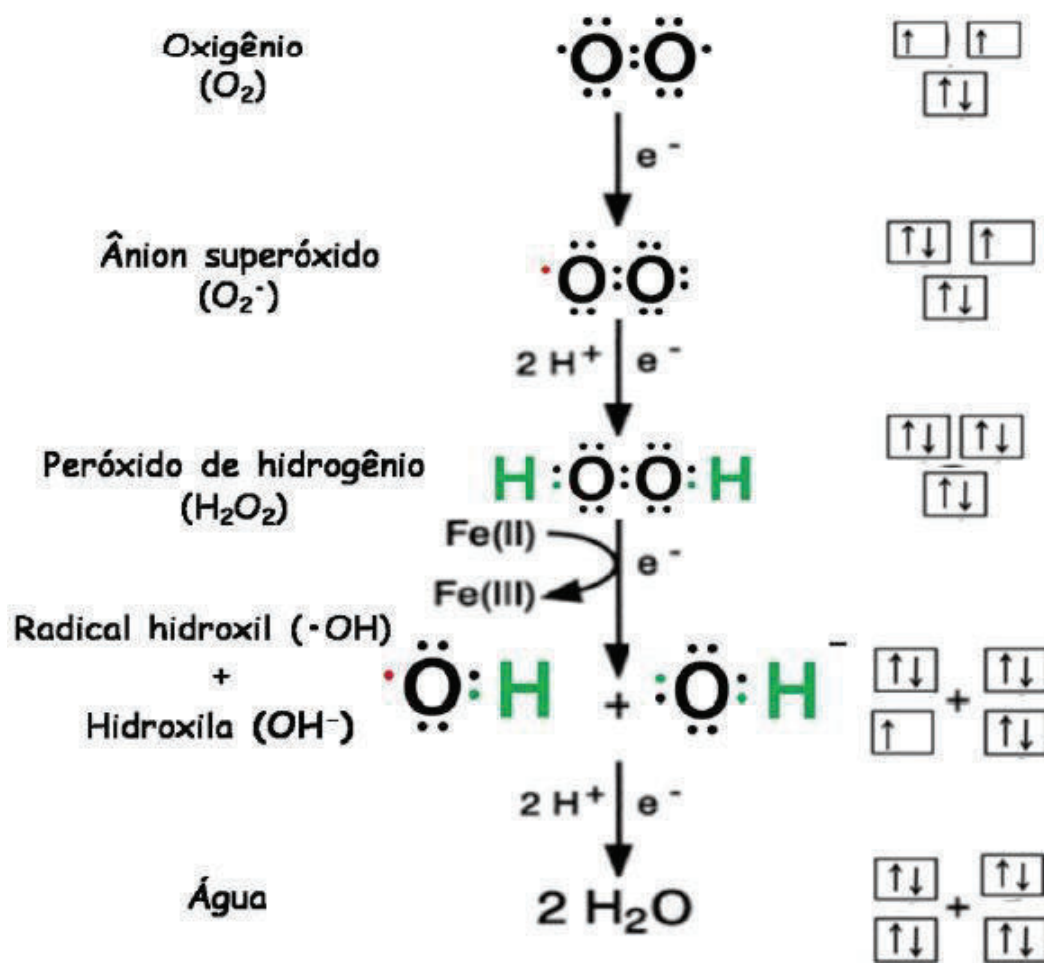
As espécies reativas de oxigênio exercem tanto efeitos biológicos benéficos, tais como o controle da expressão gênica e mitogênese, como efeitos deletérios ocasionando danos aos componentes celulares,

desencadeando respostas inflamatórias e reações que podem levar à morte celular (QUEIROZ *et al.*, 2011).

O radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) é formado a partir da redução do O_2 com transferência de apenas um elétron (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007). Em condições fisiológicas, o $O_2^{\bullet-}$ é gerado principalmente na membrana mitocondrial através de componentes da cadeia respiratória e nos peroxissomas (DROGE, 2002). A formação do peróxido de hidrogênio ocorre através da dismutação espontânea do $O_2^{\bullet-}$ ou pela reação catalisada pelas enzimas superóxido dismutases (SODs) (SILVA *et al.*, 2021). Uma outra fonte de geração do radical $O_2^{\bullet-}$ é através do peptídeo angiotensina II que estimula a produção de ânion $O_2^{\bullet-}$ pela enzima NADP oxidase levando ao aumento dos níveis das ERO. Por fim, a enzima xantina oxidase está envolvida na produção do ânion $O_2^{\bullet-}$. Esse estresse e desbalanço oxidativo pode ativar uma série de respostas inflamatórias importantes no sistema cardiovascular, aumentando a resposta imune adaptativa, e, conseqüentemente, lesionando tecidos e órgãos, podendo causar morte celular (VELLOSA *et al.*, 2020)

Apesar de não possuir elétrons desemparelhados no orbital de maior energia, e por isso não sendo tratado com um radical, o H_2O_2 é uma espécie reativa de oxigênio bastante reativa, pois além de participar de reações de oxidação, também participa de reações que produzem o radical hidroxila, como por exemplo, a reação de Fenton (HERMES-LIMA, 2004; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

Figura 4. Etapas da redução completa do O_2 a H_2O . É possível observar que durante a redução do O_2 a H_2O pode ocorrer a formação das EROs, quando essa redução é parcial.



Fonte: Adaptado de (CRISTINA; NINA; ELE, 2012).

O radical hidroxila é o radical mais reativo e tóxico que se conhece nos sistemas biológicos, pois possui uma meia-vida muito curta, de aproximadamente 10^{-9} segundos (MENDONÇA, 2012). Assim, quando produzido reage rapidamente com resíduos de aminoácidos, DNA e RNA causando oxidação em regiões muito próximas ao local onde foi gerado.

Uma forma mais reativa do oxigênio conhecido como oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) pode ser gerada por um acréscimo de energia. Nela, a restrição da regra de conservação do spin é removida. Sendo assim, o oxigênio singlete é muito mais oxidante que o oxigênio molecular no seu estado fundamental. O $^1\text{O}_2$ pode interagir com as biomoléculas de duas maneiras: através de reações químicas ou transferindo sua energia de excitação para as biomoléculas e retornando ao estado fundamental (MASCIO & MARTINEZ, 2006). A reação do $^1\text{O}_2$ com resíduos de tirosina em peptídeos gera como produto principal um hidroperóxido no carbono C_1 , que, em baixas temperaturas, decai lentamente para seu álcool correspondente. Os hidroperóxidos de proteínas gerados a partir do $^1\text{O}_2$ podem sofrer decomposição térmica ou catalisada por íons metálicos, gerando radicais peroxila (HAWKINS & DAVIES, 2007).

Espécies reativas de oxigênio também desempenham o papel de moléculas sinalizadoras durante o envelhecimento celular e na indução do processo de apoptose, ambos induzidos pela mitocôndria e relacionados à idade (SANTOS, 2013). Outro mecanismo subjacente ao envelhecimento celular é o desgaste dos telômeros. Os telômeros estão localizados no final dos cromossomos e cada divisão está associada a uma diminuição no comprimento dos telômeros. Já está bem estabelecido que um nível elevado de estresse oxidativo encurta os telômeros e desencadeia o envelhecimento (PARSONS, 2003).

O dano oxidativo pode caracterizar-se como sendo um ataque direto por parte das EROs a moléculas biológicas importantes, tais como lipídios, proteínas e DNA (BERBECKI et al., 2011). Assim elevadas concentrações das EROs podem promover danos oxidativos às estruturas do DNA, RNA, proteínas e componentes lipídicos, acarretando em alterações funcionais bem como prejuízo das suas funções (ZANUTO et al., 2011). As ERO podem reagir com as macromoléculas podendo degradá-las automaticamente ou dar início a

uma série de reações onde o radical livre é transferido entre as macromoléculas originando a inviabilização dos genes e consequentemente formação de proteínas não funcionais, inativação de enzimas, bem como alteração das funcionalidades de algumas estruturas celulares nomeadamente das membranas (STEBBENS, 2004). As macromoléculas, tais como proteínas, lipídios, DNA e glicídios, podem, no entanto, apresentar diferentes graus de suscetibilidade, dependendo da sua estrutura química bem como do ambiente celular que pode estar mais ou menos preparado para enfrentar o estresse oxidativo (SANTOS *et al.*, 2007).

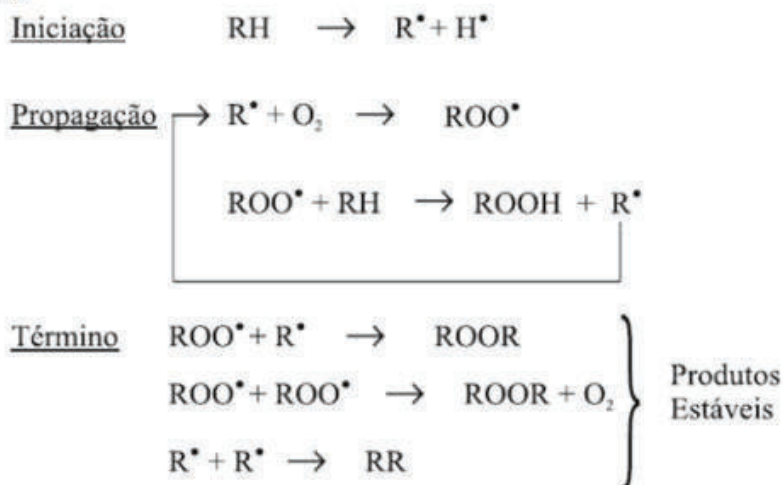
A peroxidação lipídica compreende um processo de oxidação dos fosfolipídios de membranas celulares e subcelulares, e esse processo faz parte do metabolismo celular, pois exerce importante função na regulação do processo de renovação das membranas (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999). A análise da formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) é o principal método para quantificar os produtos finais da peroxidação lipídica, utilizada para aferir o estresse oxidativo de tecidos e células (GUTTERIDGE, 1995; SCOCCIA *et al.*, 2001). A peroxidação de ácidos graxos poliinsaturados presentes nas membranas celulares resulta na formação de eletrófilos, tais como aldeídos e, hidroxialdeídos/cetoaldeídos- α,β -insaturados e/ou seus respectivos epóxidos (HUBER, ALMEIDA e FÁTIMA, 2008).

O mecanismo da peroxidação lipídica ocorre em três etapas: o primeiro estágio, *iniciação*, envolve o ataque das EROs, aos ácidos graxos poli-insaturados, capazes de abstrair um átomo de hidrogênio de um ácido graxo poli-insaturado. Rapidamente uma molécula de oxigênio adiciona-se a este radical lipídico levando, posteriormente, à formação de um radical peróxi-lipídico. Este, por sua vez, pode abstrair um átomo de hidrogênio de outro ácido graxo poli-insaturado (MOREIRA, 2011; TRAVASSOS, 2021). O próximo estágio é chamado de *propagação*, resulta na conversão de várias moléculas de ácidos graxos poli-insaturados à lipídeos hidroperóxidos. Os radicais livres, que são prontamente susceptíveis ao ataque do oxigênio, são convertidos em outros radicais, aparecendo os produtos primários de oxidação (peróxidos e hidroperóxidos) cujas estruturas dependem da natureza dos ácidos graxos presentes. Os radicais livres formados atuam como propagadores da reação,

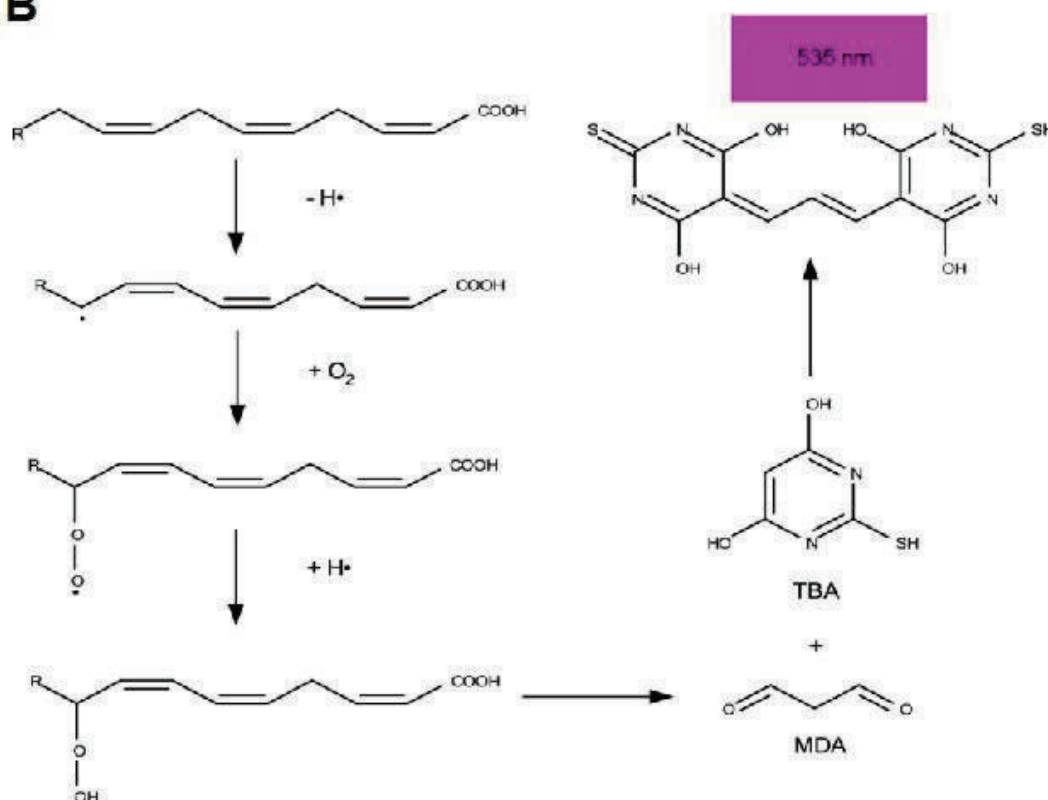
resultando em um processo auto catalítico. O hidroperóxido lipídico (LOOH) é o primeiro produto da reação de peroxidação lipídica. No último estágio, chamado *terminação*, ocorre a formação de produtos não radicais (PNR), dois radicais combinam-se, com a formação de produtos estáveis (produtos secundários de oxidação) obtidos por cisão e rearranjo dos peróxidos (epóxidos, compostos voláteis e não voláteis). Estes produtos (PNR), conhecidos como produtos secundários, não são inócuos, pelo contrário, são bastante reativos e podem atacar outras proteínas, lipídeos e o DNA (**Figura 5**) (MOREIRA, 2011; TRAVASSOS, 2021).

Figura 5. Esquema geral do mecanismo de oxidação lipídica. Em A, pode-se observar o esquema geral do mecanismo de peroxidação lipídica. Em B, pode-se observar a reação de peroxidação lipídica de um ácido graxo e consequente reação com ácido tiobarbitúrico, caracterizando o teste de TBARS. RH- Ácido graxo insaturado; R• - Radical livre; ROO• - Radical peróxido e Hidroperóxido.

A



B



Fonte: Adaptado de Mafra et al. 1999; Antolovich et al. 2002; Travassos, 2021.

Na presença de metais de transição, o LOOH pode aumentar a geração de radicais e reiniciar a peroxidação de lipídeos pelo ciclo redox de alguns metais. Os hidroperóxidos lipídicos, na ausência ou presença de metais também podem gerar uma grande variedade de produtos, incluindo aldeídos de cadeias curtas e longas (MOREIRA, 2011).

As alterações nas bases nitrogenadas estão dentre os danos oxidativos mais perigosos pois são frequentemente associadas à formação de mutações e à perda da integridade do DNA. A formação de sítios abásicos (sítios com perda de bases nitrogenadas) é outro dano oxidativo frequentemente encontrado em DNA e que pode levar à quebra de fitas simples. Diferentes estudos relacionam a perda da integridade genômica de células humanas com o processo de envelhecimento, doenças degenerativas e câncer (MOREIRA, 2011). O dano ao DNA mais frequente induzido pelas EROs é a formação de 7,8-dihidro-8-oxo-guanina (8-oxo-G), que se trata de um importante marcador de estresse oxidativo. O baixo potencial redox da guanina (G) faz com que esta base nitrogenada seja mais vulnerável ao ataque de EROs (LOON *et al.*, 2010).

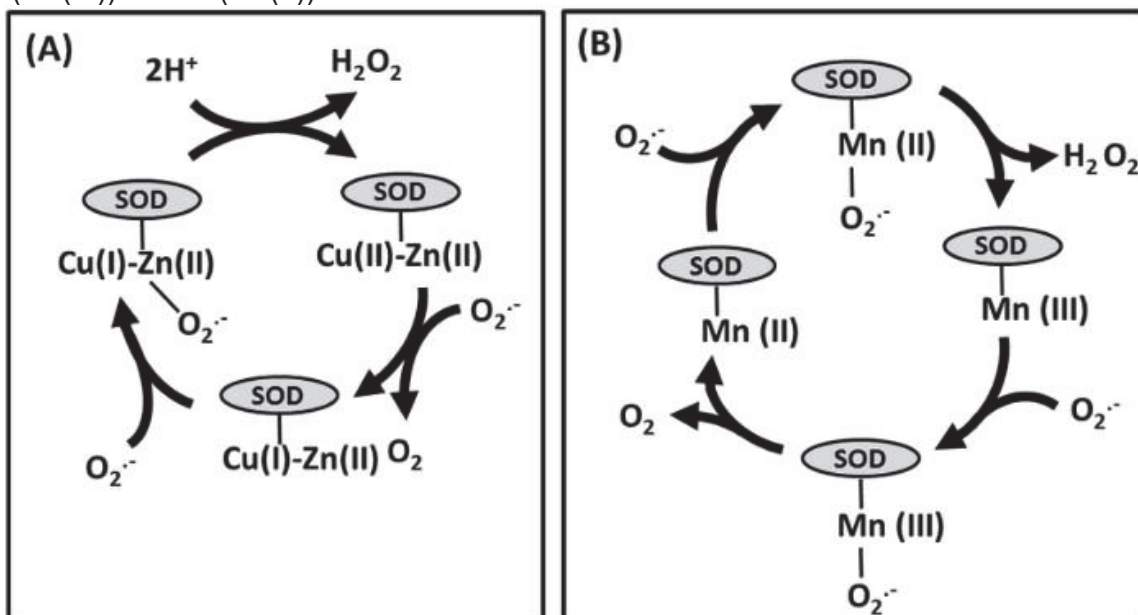
1.3 SISTEMA ANTIOXIDANTE.

O sistema antioxidante é composto por fatores enzimáticos, compreendido por enzimas, tais como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione redutase e peroxirredoxina e, também, por enzimas de reparo de DNA (por exemplo, metionina sulfóxido redutase, OGG1, MUTYH e MTH) e fatores não-enzimáticos que incluem a glutathione (GSH), vitamina C, vitamina E, vitamina A, e os flavonóides (ZHANG *et al.*, 2007). Dentre os aspectos preventivos a condição de estresse oxidativo, é interessante ressaltar a correlação existente entre a atividade antioxidante e a capacidade de inibir ou retardar o envelhecimento das células, além de evitar o aparecimento de células cancerígenas (CARVALHO, 2016).

A Sod faz parte de uma família de enzimas, com algumas isoformas, entre as quais as diferenças fundamentais estão na constituição do centro ativo, além da localização na célula (MIRIYALA *et al.*, 2012). A SOD faz parte de um grupo de metaloenzimas que tem a função de proteger as células

aeróbicas contra a ação do $O_2^{\bullet-}$ (HERMES-LIMA, 2004; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007). Por meio da reação de dismutação (reação de redução e oxidação em sequência), a SOD catalisa a geração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio (O_2) a partir do radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) (BARBOSA *et al.*, 2010). A Cu/Zn-Superóxido dismutase (Cu/Zn-Sod ou Sod1) é uma isoforma encontrada no citoplasma, núcleo, peroxissoma e no espaço intermembranar da mitocôndria de células eucarióticas, no periplasma de bactérias gram-negativas, e em plastídeos de plantas (BARONDEAU, *et al.*, 2004). Esta isoforma é um homodímero e possui um átomo de cobre e um de zinco no sítio ativo de cada subunidade (SANJAY, *et al.*, 2011). Uma segunda isoforma da Sod, a Mn-Superóxido dismutase (Mn-Sod ou Sod2), é encontrada nas mitocôndrias de todas as células de mamíferos e também em *E. coli*, sendo responsável pela dismutação do $O_2^{\bullet-}$ produzido no interior dessa organela. A Sod está organizada na forma de um tetrâmero que apresenta em seu sítio ativo um cátion manganês por subunidade (JOMOVA & VALKO, 2011; XIANG, *et al.*, 2011). Apesar das diferenças estruturais, ambas as isoformas da Sod catalisam a mesma reação (MIRIYALA, *et al.*, 2012).

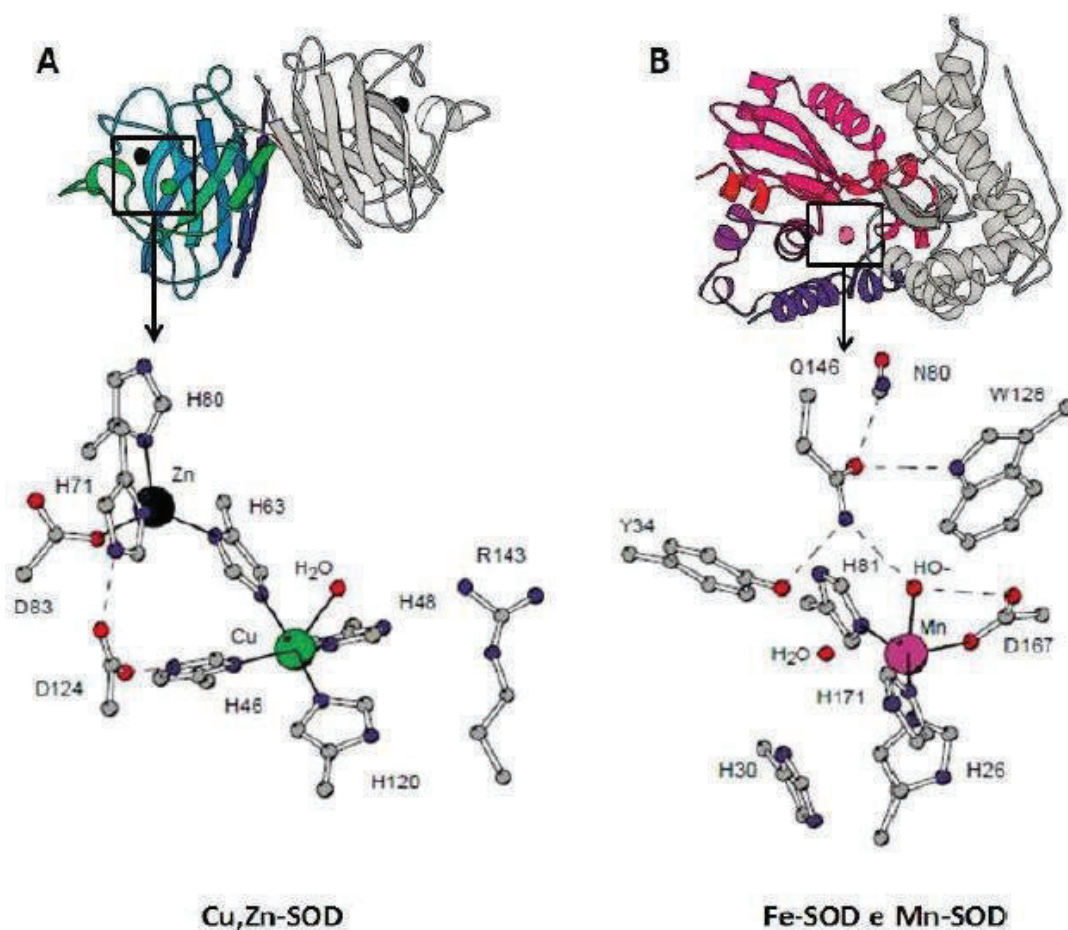
Figura 6. Ciclo catalítico da superóxido dismutase citosólica (SOD-Cu/Zn) e mitocondrial (SOD-Mn). (A) Contendo Cu e Zn no sítio catalítico, a SOD realiza a transformação do ânion superóxido ($O_2^{\cdot -}$) a O_2 através da redução do Cu^{2+} ($Cu(II)$) a Cu^+ ($Cu(I)$) em seu sítio ativo. Em seguida, outra molécula de $O_2^{\cdot -}$ causa a oxidação do $Cu(I)$ a $Cu(II)$, gerando 1 molécula de H_2O_2 ao fim do processo. O zinco não atua no ciclo catalítico, apenas auxilia na estabilização da enzima. (B) O mecanismo da SOD (Mn) é semelhante, exceto pela utilização de Mn nas reações de oxidoredução, transitando entre os estados Mn^{3+} ($Mn(III)$) e Mn^{2+} ($Mn(II)$).



Fonte: Adaptado de Trevisan, 2014.

A catalase é uma enzima presente em todos organismos aeróbios. Devido a sua alta conservação evolutiva e sua capacidade de degradar o peróxido de hidrogênio, de forma rápida e eficiente, essa enzima tem sido apontada como um dos principais fatores que permitiu os organismos sobreviverem em ambientes aeróbios, utilizando o oxigênio no metabolismo celular (DAY, 2009; RAUEN *et al.*, 2004). A catalase é uma hemoproteína que possui quatro grupos heme, um em cada sub-unidade do tetrâmero. A alta especificidade para o H_2O_2 , faz da catalase a enzima com o maior poder catalítico dentre todas as enzimas conhecidas (Reação 7) (VALKO *et al.*, 2006). O mecanismo da ação da catalase é dividido em dois estágios: o primeiro estágio inicia com a reação do peróxido de hidrogênio em que o ferro (FeIII) do grupo heme é oxidado, formando um composto I (Comp I) intermediário, sendo um cátion radical porfirina (Por^+) e a espécie ($FeIV=O$). No segundo estágio, o composto I altamente oxidante reage com outra molécula de peróxido de hidrogênio, que reduz o composto e, assim, regenera a enzima (Enz), formando também água e oxigênio. (**Figura 7**) (COSTA, 2020)

Figura 7. Estruturas tridimensionais das isoformas da enzima superóxido dismutase e seus respectivos centros catalíticos. Comparação das formas enoveladas das Sod1 (Cu/Zn-Sod) e Sod2 (Mn-Sod ou Fe-Sod). **A.** Cu/Zn-Sod é um homodímero com subunidades contendo 154 aminoácidos cada. Os íons cobre e zinco aparecem destacados em verde e preto, respectivamente. **B.** Mn-Sod ou Fe-Sod possuem monômeros com aproximadamente 200 aminoácidos, e podem ser encontradas como dímeros ou tetrâmeros. O íon metálico (que pode ser Mn ou Fe) aparece destacado em rosa.

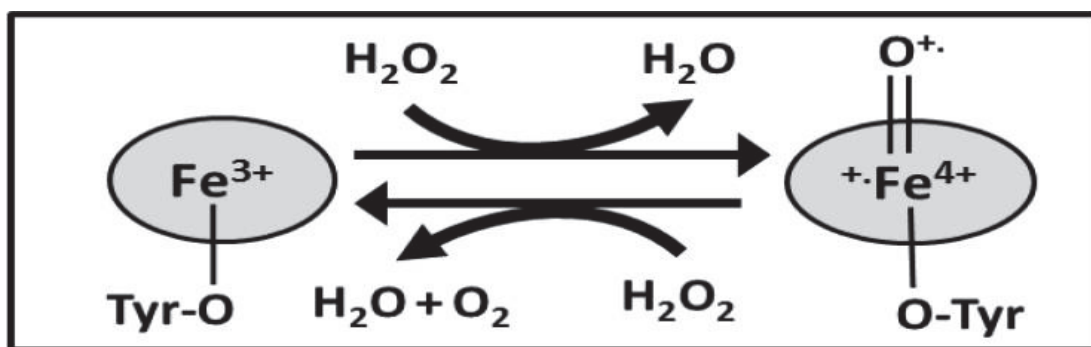


Fonte: QUEIROZ, 2017.

As enzimas CAT e GPx se integram para impedir o acúmulo de H_2O_2 que, apesar de não ser um radical livre, é igualmente reativo e capaz de promover danos potenciais. O acúmulo dessa espécie reativa (H_2O_2) possibilita, por meio das reações de Fenton e Haber-Weiss, a geração do radical hidroxila ($OH\bullet$), contra o qual não existe defesa enzimática (BARBOSA *et al.*, 2010)..

A catalase é um antioxidante cuja principal função é catalisar a conversão do peróxido de hidrogênio em oxigênio e água (**Figura 8**). A deficiência de catalase ou seu funcionamento inadequado está relacionada ao surgimento de diversas doenças, tais como diabetes mellitus, hipertensão arterial, anemia, câncer, Alzheimer, Parkinson dentre outras (VELLOSA *et al.*, 2021).

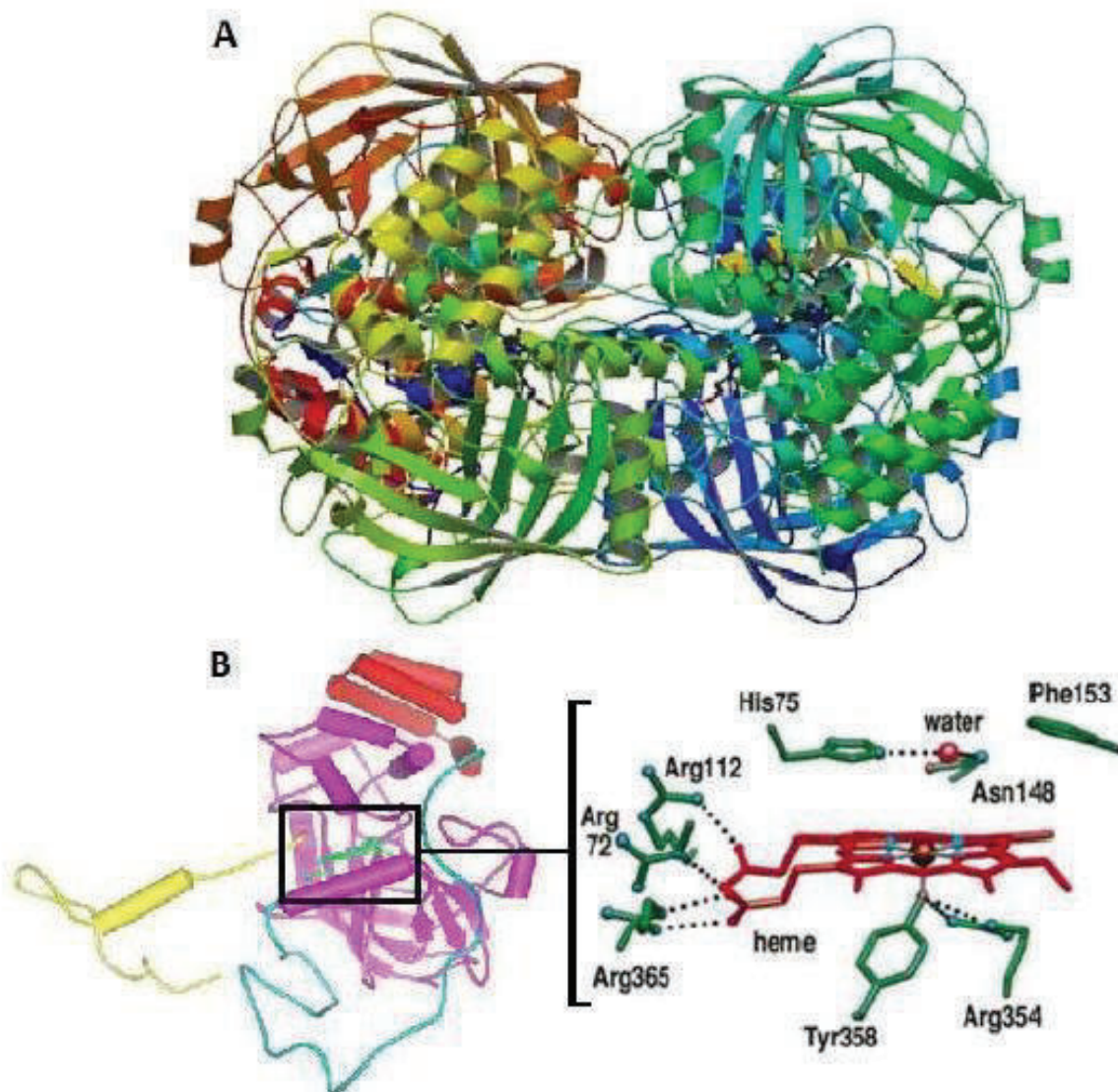
Figura 8: Ciclo catalítico da catalase (Cat). Contendo um grupo heme ligado à proteína por um resíduo de tirosina (Tyr), a Cat realiza a dismutação de duas moléculas de H_2O_2 a uma molécula de O_2 e duas de H_2O . Inicialmente, uma molécula de H_2O_2 é reduzida a água oxidando o Fe^{3+} do grupo heme a Fe^{4+} (com uma oxidação adicional de um elétron no grupo heme ($^+\text{Fe}^{4+}$)). Em seguida, outra molécula de H_2O_2 é oxidada a H_2O e O_2 , retornando grupo heme ao estado inicial Fe^{3+} .



Fonte: TREVISAN (2014).

Em mamíferos, a catalase é uma proteína homotetramérica contendo um grupo heme e uma molécula de NADPH por subunidade (**Figura 9**), seu mecanismo de ação envolve a reação entre o Fe^{3+} (ligado ao grupo heme da enzima) e uma molécula de H_2O_2 , formando um intermediário contendo íon ferro de alta valência, denominado composto I. Uma vez formado, o composto I reage com outra molécula de H_2O_2 , produzindo água e O_2 (MOREIRA, 2017).

Figura 9. Estrutura da catalase citoplasmática. **A.** Estrutura tridimensional da enzima catalase citoplasmática humana tetramérica, mostrando também a estrutura secundária adotada pela interação entre os aminoácidos que se encontram próximos uns aos outros na cadeia peptídica. **B.** Estrutura do sítio ativo da enzima, representando o grupo heme (vermelho) e os resíduos que participam da catálise.

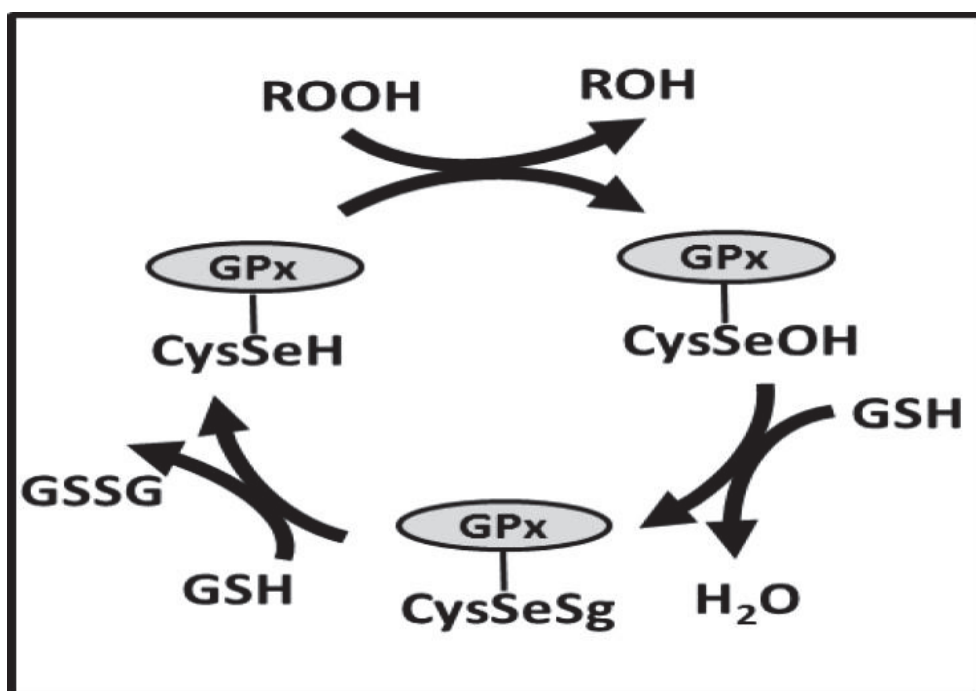


Fonte: RIBEIRO, 2016.

A glutathione (GSH) é um tri-peptídeo formado pelos aminoácidos glutamato, cisteína e glicina, e está presente no citosol, na mitocôndria e no núcleo da maioria das células eucarióticas (BANERJEE *et al.*, 2007; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007; RICHARD, 2008). A GSH exerce funções essenciais à célula por meio da doação de átomos de hidrogênio durante a redução de peróxidos pela GPx, transformando-se em glutathione oxidada (GSSG) (HERMES-LIMA, 2004; RICHARD, 2008). Quando ocorre estresse oxidativo, ocorrem mudanças no estado redox da glutathione, ocorrendo um desequilíbrio entre a produção e o consumo de GSH, desta forma a magnitude do estresse oxidativo pode ser controlada pelas dosagens de GSSG e/ou pela razão GSSG/GSH (BARBOSA *et al.*, 2008).

O H_2O_2 também pode ser decomposto pela glutathione peroxidase (GPx). Esta selenoproteína é capaz de reduzir peróxidos orgânicos e de hidrogênio e é encontrada no citosol, mitocôndria, plasma sanguíneo e nos fluídos extracelulares, além de existir uma GPx que degrada peróxidos lipídicos localizada na membrana celular (COSTA, 2020). O selênio se encontra presente na forma de selenocisteína no sítio ativo (**Figura 10**), enquanto que a GSH fornece os equivalentes redutores para a remoção de peróxido (TREVISAN, 2014). A GPx reduz o H_2O_2 à água, convertendo a glutathione reduzida (GSH) em oxidada (GSSG). A glutathione redutase (GR), responsável pela recuperação da glutathione reduzida (GSH), possibilita a manutenção da integralidade do ciclo redox da GSH e, conseqüentemente, do equilíbrio adequado entre os sistemas de defesa enzimáticos (BARBOSA *et al.*, 2010).

Figura 10: Ciclo catalítico da glutathiona peroxidase (GPx). A GPx possui uma selenocisteína no seu sítio ativo, que quando reduzida encontra-se na forma de selenol (CysSeH). O selenol é oxidado por peróxidos (ROOH) a ácido selênico (CysSeOH). Em sequência, uma glutathiona (GSH) reage com o ácido selênico, formado o selenil dissulfeto (CysSeSg). Uma segunda molécula de GSH ataca o enxofre desse grupamento, gerando dissulfeto de glutathiona (GSSG) e regenerando o selenol, completando o ciclo catalítico.



Fonte: TREVISAN (2014).

O sistema tioredoxina (TRX) também constitui um importante sistema antioxidante. As tioredoxinas são proteínas que contêm dois resíduos de cisteína, estes reduzem grupos dissulfetos a tióis, doando elétrons ao átomos de enxofres de cisteína. A TRX age em conjunto com o NADPH e a tioredoxina redutase, formando um sistema redutor eficiente que, em cooperação com TRX peroxidases promove a remoção do H_2O_2 intracelular (DEMASI et al., 2005). O sistema Tiorredoxina apresenta atividade dissulfeto redutase, regulando o equilíbrio de dissulfetos, fornecendo elétrons para as peroxidases dependentes de tiol (peroxirredoxinas), para remoção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (RNS) e apresentando uma taxa de reação rápida (VELLOSA et al., 2021).

S. cerevisiae contém duas Trx citosólica (Trx1 e Trx2) e uma mitocondrial (Trx3). Além disso, apresentam duas Trx redutase uma citosólica e mitocondrial, Trx1 e Trx2 respectivamente (DEMASI et al., 2005).

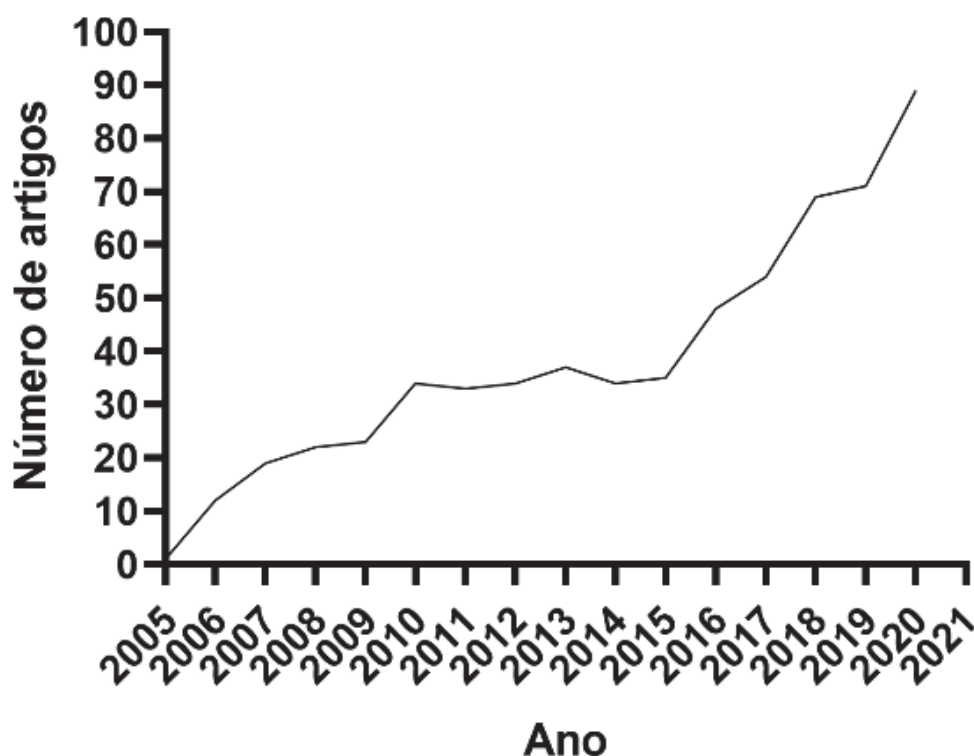
1.4 COMPOSTOS DE COORDENAÇÃO COMO UMA ALTERNATIVA PARA O ESTRESSE OXIDATIVO.

A química de coordenação tem foco no estudo dos compostos de coordenação, onde um átomo metálico (ácido de Lewis) está coordenado a um conjunto de ligantes (bases de Lewis) (AZEREDO, 2013). Neste caso, estabelece-se uma relação ácido-base de Lewis, denominada de ligação coordenada. A formação de complexos é comum com metais de transição, os quais possuem orbitais atômicos livres, disponíveis para se ligar aos elétrons dos ligantes (FARIAS et al., 2009). Os ligantes são os íons e moléculas que se coordenam ao centro metálico e são capazes de doar um par de elétrons. O número de átomos de ligantes coordenados ao centro metálico é denominado número de coordenação e depende da natureza do metal (ATKINS et al., 2010).

Compostos à base de metal têm se mostrado uma possível alternativa às drogas orgânicas clássicas (CHAKRABORTY et al., 2021). As potenciais atividades terapêuticas apresentadas por estes compostos têm motivado à síntese, caracterização e subseqüentes investigações biológicas e bioquímicas.

Este interesse pode ser percebido pelo crescente número de artigos publicados em diversas revistas nos últimos anos (HORN,et al., 2013; PALANIMUTHU,et al., 2013; FLOREA, et al., 2011). Podemos observar uma crescente no número de artigos publicados ao realizar uma busca no Pubmed pelo termo “metal-based drugs” (**Figura 11**).

Figura 11. Gráfico demonstrando o número de artigos sobre a utilização de complexos metálicos publicados nos últimos 15 anos. Gráfico mostra o número de artigos publicados entre 2005 e 2021, gráfico foi obtido após realizar a busca por “metal-based drugs”.



Fonte: Pubmed (2021).

As propriedades redox atribuídas aos íons metálicos presentes nos compostos de coordenação atuam de forma complementar as atividades exibidas por compostos orgânicos usados como fármacos. Vários metais têm papel importante nos sistemas vivos, uma vez que estão associados às proteínas, e apresentam afinidade por moléculas cruciais para a vida, como a de oxigênio (O_2). Estes elementos são classificados segundo a sua abundância no organismo em: majoritário, essencial, traço, micro-traço, entre outros de essencialidade discutida. O ferro é um elemento traço, vital para todos os

organismos vivos com exceção de lactobacilos. Os elementos presentes em quantidades não determinada, não possuem sua função biológica muito bem compreendida (THOMPSON, et al., 2006).

Em 1965, Barnett Rosenberg descobriu as propriedades antitumorais do $\text{cis}[(\text{diaminodicloro})\text{platina(II)}]$, $\text{cis}[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2]$, o chamado “cisplatina”. Após essa descoberta abriu-se uma nova visão, houve surgimento de vários trabalhos dedicados a investigar o mecanismo de ação do complexo “cisplatina” no organismo, contribuindo para talvez o maior sucesso da Química Inorgânica Medicinal (BERALDO, 2005). Havia então o interesse sobre a inclusão de complexos metálicos como possíveis agentes terapêuticos, aumentando assim as aplicações da Química Inorgânica em Medicina, que continua a crescer graças à busca por novos compostos que contribuam para avançar os conhecimentos de participação da Química de Coordenação na Química Medicinal (BERALDO, 2005).

Cabe ressaltar que esta área da Química possui diversas aplicações, dentre elas, estudo de agentes quelantes, interação de íons metálicos com biomoléculas, desenvolvimento de radiofármacos, antitumorais e antioxidantes (ALMEIDA, 2010). Dentre as várias aplicações, o emprego de complexos como antioxidantes catalíticos tem surgido como uma excelente proposta para substituição de proteínas antioxidantes. Neste cenário, Compostos SOD miméticos de Mn porfirinas exibiram eficácia terapêutica em diversos estudos celulares e animais, alguns dos exemplos são lesões do sistema nervoso central, câncer, lesão por radiação, distúrbios imunológicos, como diabetes e distúrbios neurodegenerativos. Os estudos com *E. coli* e *S. cerevisiae* deficientes em SOD têm mostrado que quanto mais potente for o composto SOD mimético, maior é a proteção oferecida a esses organismos. (ARMSTRONG & STRATTON, 2016).

Os complexos com funções biológicas mais conhecidas são as moléculas de metaloporfirina. Em geral, metaloporfirinas que apresentam elevada atividade Sod mimética, também possuem uma maior atividade mimética a catalase, sendo capazes de proteger as células a partir de uma quantidade tóxica de H_2O_2 (PATEL & DAY, 1999). No contexto histórico, a cisplatina foi a primeira molécula puramente inorgânica a ser utilizada como

fármaco no tratamento do câncer e hoje é um medicamento oncológico de primeira linha para o tratamento de câncer de ovário e esôfago. Os complexos de vanádio têm sido objeto de pesquisas para o desenvolvimento de novas moléculas para o tratamento do diabetes, além disso, um campo de aplicação de complexos organometálicos é o uso como contraste para exames de diagnóstico de imagem (SANTOS, 2019).

1.5 A LEVEDURA *Saccharomyces cerevisiae* COMO MODELO DE ESTUDO.

Leveduras são fungos unicelulares e eucariontes, heterotróficos, e com parede celular definida. Pertencem majoritariamente ao grupo dos Ascomicetos, e exibem uma grande heterogeneidade com relação ao tamanho celular, forma, cor e divisão sexual, mesmo entre indivíduos da mesma linhagem, essas características são sensíveis às condições ambientais (FERNANDES et al., 2009).

As leveduras pertencentes ao gênero *Saccharomyces* são classificadas como fungos do filo Ascomycota, ordem Saccharomycetalia, família Saccharomycetacea e gênero *Saccharomyces*. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é reconhecida como um organismo modelo, e é um eucarioto simples cujo genoma já sequenciado pode ser facilmente manipulado. Estudos sobre a função de genes de mamíferos são frequentemente realizados em *S. cerevisiae*, que ao contrário da maioria dos microrganismos, pode ser tanto haplóide, diplóide ou mesmo poliploide (SANT'ANA, 2009).

A *S. cerevisiae* é responsável direta pela decomposição do açúcar em álcool etílico e dióxido de carbono. Justamente por isso, este microorganismo é utilizado há milênios na produção de pães e bebidas alcoólicas, e por isso se fazem presentes nas casas de milhões de famílias no mundo todo (FERNANDES et al., 2009). Amplamente utilizada nos processos fermentativos da indústria alimentícia e sucroalcooleira, a levedura *S. cerevisiae* também se destaca na pesquisa científica como um importante modelo de estudo eucariótico. Um dos fatores que fortalece sua aplicação como modelo ideal de estudo deve-se ao fato deste organismo possuir características fisiológicas conservadas, tais como a síntese de antioxidantes, regulação da apoptose e vias de envelhecimento, e genéticas. Dado ao alto grau de homologia com o

genes humano, o uso deste modelo permite a construção e utilização de mutantes deficientes em determinados genes (AZARIAS, 2015; SUDHARSHAN et al., 2018).

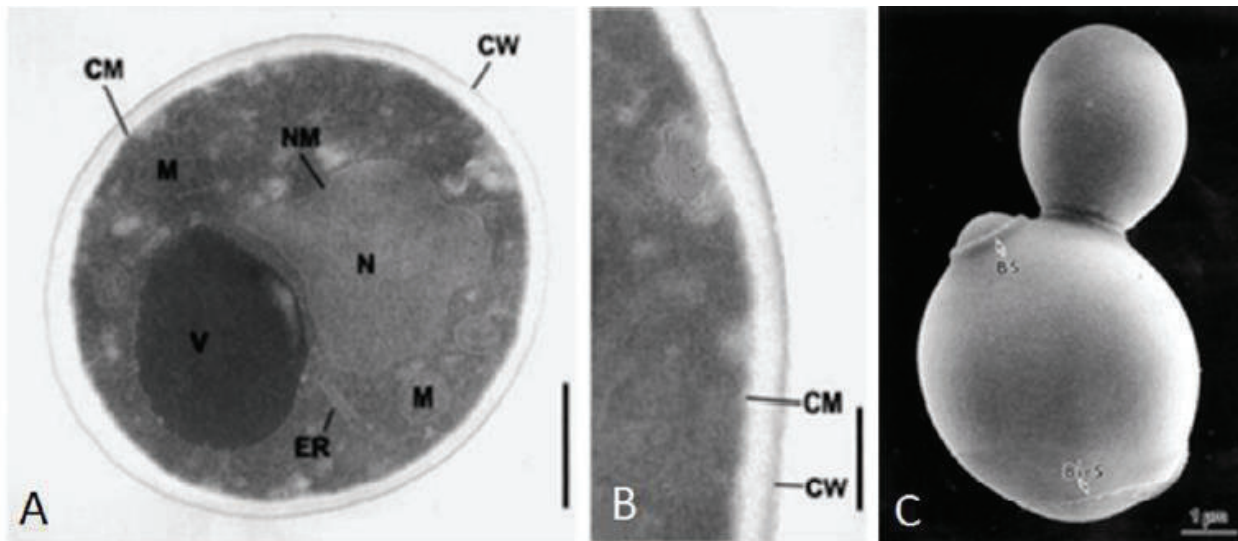
Os ensaios realizados com microrganismos, em geral, são mais fáceis, rápidos, reprodutíveis e passíveis de serem correlacionados ao observado em humanos quando comparados com animais. O genoma totalmente elucidado da *S. cerevisiae* auxilia no entendimento da sua função celular, além disto, há a possibilidade da utilização de um elevado número de células mutantes, que são deficientes na síntese de um determinado gene (SOARES; ANDREAZZA; SALVADOR, 2004, 2005). Estas características viabilizam a sua utilização como modelo eucariótico em diversas investigações, dentre elas, as que avaliam autofagia e como modelo em doenças neurodegenerativas e os danos celulares causados pelas EROs por agentes xenobióticos (AZARIAS, 2015; SANTOS; SÁ-CORREIA, 2015; SIQUEIRA JUNIOR, 2013).

Algumas propriedades que tornam as leveduras bastante adequadas para estudos biológicos incluem o rápido crescimento celular, segurança na manipulação e facilidade na obtenção de mutantes bastante versátil (GOFFEAU et al., 1996; HUGHES et.al., 2004; STAMBUK, 1999). *S.cerevisiae* foi o primeiro organismo eucarioto em que o genoma foi completamente sequenciado e depositado em bancos de dados públicos como <http://www.yeastgenoma.org>, o que permitiu a clonagem de diferentes genes, sua rápida identificação e caracterização, bem como a melhor compreensão da sua função celular.

Segundo Ianoski (2019), esse microrganismo apresenta um abundante número de proteínas com funcionalidade altamente conservadas com proteínas homólogas humanas. Para este autor estudos que utilizam a levedura *Saccharomyces cerevisiae* colaboram com a elucidação da relação entre as EROs e doenças relacionadas a este fenômeno. Nesse contexto, Os mecanismos antioxidantes são diversos e, em geral atuam de forma simultânea em levedura, prevenindo, sinalizando, eliminando e regenerando os danos celulares causados pelas EROs. Nas leveduras, as proteínas Yap1, Skn7, Msn2 e Msn4 são os principais fatores de transcrição que controlam a

expressão de genes relacionados ao sistema antioxidante (MENG et al, 2017, FARRUGIA, BALZAN 2012).

Figura 12. Imagem da levedura *Saccharomyces cerevisiae* através de microscopia eletrônica. A) e B) Corte de microscopia de transmissão mostrando diversas organelas da levedura: CM: Membrana plasmática; N: Núcleo; ER: Retículo Endoplasmático; M: Mitocôndria; CW: Parede celular; V: Vacúolo; NM: Membrana Nuclear. C) Imagem de microscopia de Varredura mostrando a parede celular da levedura, BS: Cicatriz de nascimento.



Fonte: Adaptado de: OSUMI, 2012; COSTA, 2017.

S. cerevisiae representa um microrganismo eucarionte, não patogênico, unicelular e, embora algumas vias metabólicas sejam distintas em relação aos eucariontes superiores, as suas vantagens como organismo modelo superam as suas desvantagens (**Figura 13**) (IANOSKI, 2019).

Figura 13. Características da levedura *Saccharomyces cerevisiae* como modelo eucariótico. Esquema citando vantagens e desvantagens da utilização de *S. cerevisiae* como modelo de estudo



Fonte: IANOSKI, 2019.

Uma grande diversidade de linhagens de *S. cerevisiae* ocorre na natureza. Curiosamente, apesar de serem da mesma espécie, podem ser muito diferentes umas das outras quanto ao seu genótipo e fenótipo. Apresentam ampla dispersão no meio ambiente, podendo ser encontradas em folhas, flores, frutos em decomposição, e em ambientes naturais, como solo e água, e possuem como característica a capacidade de se adaptar à fonte energética e ao papel ecológico em cada habitat que ocupam (NEVOIGT, 2008).

As leveduras, assim como os demais organismos, precisam de energia química necessária à manutenção da vida, crescimento e reprodução, sendo que a maior parte da energia utilizada pelas células provém da energia química contida na molécula de adenosina trifosfato (ATP). No processo de degradação, que correspondem às vias catabólicas, os substratos são degradados pelas células gerando energia na forma de ATP, sendo acoplado a geração de intermediários e poder redutor na forma de NADH e NADPH. Já na biossíntese, que representa as vias anabólicas, as células utilizam os produtos

intermediários, o poder redutor e a energia que produziram para síntese de novos componentes celulares (FERNANDES et al, 2009; TARGINO, 2009).

A levedura *S. cerevisiae* apresenta fases distintas de crescimento, sendo que a primeira fase corresponde a uma fase de adaptação fisiológica das células ao novo ambiente no qual elas foram introduzidas, nesta fase o metabolismo das células está ativo criando condições ideais para a divisão celular. Na segunda fase de crescimento, a presença da glicose reprime a expressão dos genes que codificam enzimas da via respiratória e de genes que codificam enzimas envolvidas no catabolismo de outras fontes de carbono, e então a célula utiliza a fermentação da glicose como única via energética e a taxa de crescimento passa a ser alta. Ao ser consumida toda a glicose, o ciclo celular é interrompido e genes envolvidos na via aeróbica do metabolismo celular são induzidos. Começa então a segunda fase exponencial ou fase respiratória. Durante esta fase, a célula utiliza outras fontes de carbono para gerar energia. O etanol e outros subprodutos da fermentação servem como importante fonte de carbono para que as células continuem seu crescimento. Quando todas as fontes de carbono se esgotam, as células entram na fase estacionária e nessa fase as células acumulam açúcares de reserva como glicogênio e trealose, além de proteínas de defesa (FELDMAN, 2012).

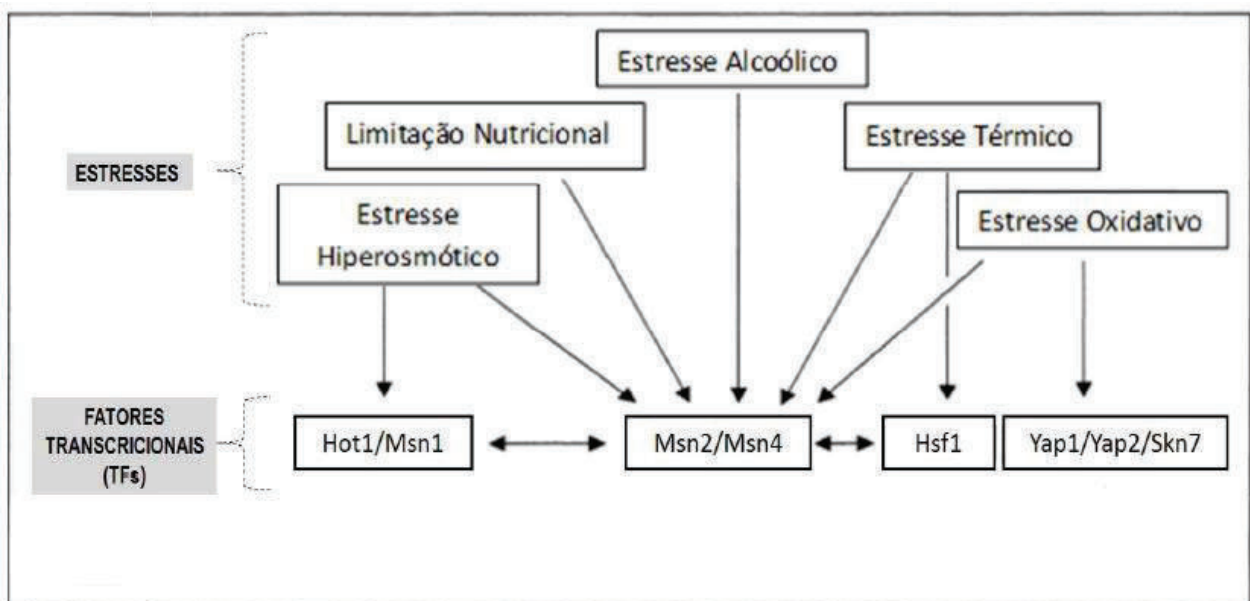
Portanto, este microrganismo representa uma importante ferramenta para pesquisas que abordem os mecanismos antioxidantes protetores das células e do DNA quando estas são expostas a condições de estresse ambiental (COSTA; MORADAS-FERREIRA, 2001; GASPARRI, 2010).

1.5.1 Resposta de *S. cerevisiae* ao estresse oxidativo

As células sintetizam suas moléculas protetoras em decorrência: (a) de estímulos que podem ser dados por variadas condições de estresse; (b) da transição do metabolismo fermentativo para o respiratório; (c) aumento da atividade mitocondrial; e (d) diminuição da capacidade de defesa antioxidante devido ao aumento das EROs (PEREIRA, 2003).

Os mecanismos de resposta adaptativa ao estresse oxidativo em *S. cerevisiae* são regulados principalmente pelos fatores de transcrição Yap1, Skn7, Msn2 e Msn4. Uma série de estudos em levedura identificou um elemento que possui sequência comum nas regiões promotoras dos genes induzidos por estresse, esse elemento ficou conhecido como Elemento Responsivo ao Estresse (STRE), sugerindo fortemente que os genes são co- regulados por um fator comum. Em *S. cerevisiae*, genes como *CTT1*, *HSP12*, *GDP1* e *TPS2* possuem a sequência consenso AGGGG, que determina a sequência de nucleotídeos denominada STRE. Os fatores de ligação à STRE são dois fatores de transcrição denominados Msn2 e seu e seu homólogo Msn4, são ativados e translocados para o núcleo, onde induzem genes que apresentam na sequência promotora o elemento responsivo ao estresse (STRE).

Figura 14. Esquema representativo de condições de estresse. Representação das condições de estresses mais frequentes e mais estudadas e os fatores de transcrição mais relevantes envolvidos no controle da expressão de genes de resposta a estresse em *S.cerevisiae*.



Fonte: Adaptado de Costa (2017).

As proteínas de choque térmico (HSPs- *Heat Shock Proteins*) são um exemplo já bem estabelecido de proteínas de estresses que cumprem funções homeostáticas e controlam o dobramento de proteína (possuindo papel de chaperonas), sendo induzidas por uma variedade de fatores estressantes. Em *S. cerevisiae*, as HSPs incluem Hsp104p (família Hsp100), membros do tipo Hsp82 (família Hsp90), membros da família Hsp70, a família Hsp60, a família Hsp40, e as pequenas HSPs, que inclui as proteínas Hsp30, Hsp26, Hsp12, e Hsp10 (COSTA, 2017). As proteínas dessas famílias podem ser distinguidas entre elas com relação a sua estrutura e função, mas a maior parte dessas moléculas forma uma rede proteica necessária para estabilização de peptídeos além de suprimir a agregação de proteínas e facilitar seus dobramentos (FELDMANN, 2012).

1.6 *Galleria mellonella* COMO MODELO DE ESTUDO.

Os insetos são a classe de organismos dominante na Terra, ultrapassando em número todos os outros animais terrestres, podendo ser encontrados, praticamente, em todos os lugares. *Galleria mellonella* é membro do filo Arthropoda, pertencem à classe *Insecta* e a ordem *Lepidoptera* (VIEIRA, 2015). *G. mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) vive na maioria dos casos em colmeias de abelhas e se alimenta com cera e pólen. Pode ser considerado uma praga em colmeias. Seu ciclo de vida é de aproximadamente 7–8 semanas: depois de emergir do ovo, as larvas passam por 6 estágios larvais antes de atingir o último instar. Isso leva aproximadamente 5-6 semanas a 25- 28 °C. Em seguida, pre-pupas e pupas são formadas e, após mais 2 semanas, aparecem as mariposas adultas (WOJDA, 2016).

Na apicultura, *G. mellonella*, também conhecida como a grande traça da cera, é globalmente considerada praga das colônias de mel de abelha (*Apis mellifera*). As lagartas fazem galerias nos favos, alimentando-se de cera, pólen e mel, podendo destruí-los totalmente, impedindo sua reutilização, além da destruição dos favos os adultos da traça podem, através das fezes, ser responsáveis pela transmissão de importantes patógenos para as larvas das abelhas. A importância econômica de traças de cera levou a uma série de

investigações sobre seu ciclo de vida, biologia, comportamento, ecologia, biologia molecular, fisiologia e controle (VANDENBERG & SHIMANUKI, 1990). Com isso começaram a surgir criatórios dessa lagarta para melhorar o estudo em relação a genética molecular e fisiologia ou também para simplesmente alimentação de réptil, comida de passarinho e isca de peixe (ELLIS et al., 2013).

Figura 15. Larvas de *Galleria mellonella*.



Fonte: próprio autor

Com a crescente utilização de insetos como modelo experimental em laboratórios, houve a necessidade de se criar esses animais para obtenção de quantidade padronizada para os estudos. As lagartas de *G. mellonella* têm sido empregadas como um modelo experimental de infecções bacterianas e fúngicas, A procura por esse modelo de estudo tem aumentado largamente, entretanto, ainda há pouca oferta para o uso desse inseto para fins de uso como modelo de estudo.

As larvas de *G. mellonella* são fáceis de manter e manipular em laboratório, e seu uso possui um baixo custo quando comparado aos modelos animais de experimentação. A sua utilização pode reduzir a necessidade de alguns testes em mamíferos, com uma redução concomitante no sofrimento dos animais mamíferos (REEVES et al., 2004; MYLONAKIS, 2008; RENWICK et al., 2006).

A criação em laboratório de *G. mellonella* segue uma série de eventos, sendo eles: a) colocar os ovos sobre a dieta; b) coletar lagartas ou pupa e colocar em um segundo recipiente; c) deixar que a larva em último instar transforme-se em pupa ou pupa para emergir como adultos; d) acasalamento dos adultos; e) depois permitir que as fêmeas ponham ovos e colocar os ovos novamente na dieta (ELLIS et al., 2013).

Os insetos expressam muitos enzimas antioxidantes, incluindo superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APOX), glutathione peroxidase (GPx) e glutathione S-transferases (GSTs). A capacidade antioxidante dos insetos também emprega antioxidantes não enzimáticos, como a glutathione e o ascorbato.

A resposta celular dos insetos a infecção bacteriana e/ou fúngica inclui fagocitose, nodulação, e encapsulamento e a resposta imune humoral consiste em diversos processos, incluindo a melanização, coagulação da hemolinfa, e a produção de inúmeros peptídeos antimicrobianos potentes em grande escala (KAZEK et al., 2020). Os insetos têm um sistema antimicrobiano relativamente avançado, pois possuem um sistema imune inato complexo e são capazes de encapsular ou fagocitar invasores microbianos, além disso, também são capazes de respostas adaptativas que incluem a produção induzida de lisozima e pequenos peptídeos antimicrobianos (RAMARAO et al., 2012). As lagartas *G. mellonella* possuem características que as tornam particularmente úteis para o estudo de agentes patogênicos humanos. Elas são relativamente grandes em tamanho (12-20 mm), o que permite uma manipulação fácil e fácil obtenção de tecido e amostras de hemolinfa para análise, além do sistema imunológico com um elevado grau de estruturas, sendo parecido estrutural e funcionalmente com sistema imune inato de vertebrados (LIONAKIS, 2011). A resposta imune de insetos, tais como *G. Mellonella*, é semelhante à dos mamíferos e consiste em barreiras estruturais e passiva, com geração de respostas celulares e humorais através de hemócitos dentro da hemolinfa (CYTRYNSKA et al., 2007).

Além disso, as lagartas *G. mellonella* podem ser mantidas a 37 °C, um atributo importante quando se estuda agentes patogênicos humanos. O desenvolvimento de organismos modelo como ferramentas de investigação em

pesquisas tem sido crucial para o avanço do conhecimento em várias áreas, e para o sucesso de qualquer modelo experimental como uma ferramenta de pesquisa, é necessária a padronização dos métodos de experimentação com o modelo e das condições de manutenção para produzir organismos com a menor variação possível (ANKENY & LEONELLI, 2011).

As barreiras estruturais a primeira linha de defesa dos insetos, tais como o rígido exoesqueleto, o sistema digestório e as barreiras respiratórias que constituem. Os insetos cicatrizam rapidamente as suas feridas causadas por trauma ou invasão por parasitas, impedindo a perda de fluidos corporais e a penetração de patógenos oportunistas que em muitos casos podem ser fatal para o inseto. O tegumento e o trato digestivo representam barreiras físicas importantes contra a infecção e quando estas barreiras são ultrapassadas, os invasores tornam-se expostos a uma variedade de mecanismos celulares que interagem na defesa do hospedeiro. Os hemócitos constituem a barreira final do sistema de defesa dos insetos e atuam na cicatrização e na fagocitose, em respostas do tipo encapsulação e nodulação, fatores antimicrobianos naturais (síntese induzida de peptídeos e proteínas antimicrobianas) e fatores bioquímico-fisiológicos, que são respostas coordenadas direta ou indiretamente pelos vários tipos de hemócitos, dependente do número e dos tipos de hemócitos presentes na hemolinfa, garantindo o sucesso do sistema imunológico (BULET et al., 1999; LAVINE & STRAND, 2002; RUSSO; BREHELIN; CARTON, 2001).

Além disso, *G. mellonella* tem se mostrado um modelo eficaz para estudar patogênese fúngica, as larvas tem sido utilizada para investigar o papel da filamentação (FUCHS et al., 2010) e beta-glucanas (MOWLDS et al., 2010) em *Candida albicans*. Os pesquisadores têm mostrado uma correlação significativa entre a virulência de *C. albicans* em *G. mellonella* e em camundongos (BRENNAN et al., 2002).

2 JUSTIFICATIVA

Quando um organismo não consegue acompanhar a rápida formação das EROs, o estresse oxidativo é formado. Então, o excesso das EROs pode causar oxidação de componentes celulares, ou seja, lipídios, proteínas, ácidos nucleicos, levando a distúrbios no funcionamento de vias metabólicas, danos celulares ou, eventualmente, morte celular. A consequência disso é a ocorrência de inúmeras doenças cardiovasculares, câncer ou doenças neurodegenerativas. Diante do exposto, o uso de complexos antioxidantes pode contribuir para a manutenção do equilíbrio redox do organismo por meio de uma reação com o excedente de EROs que não foram inativados pelo sistema antioxidante endógeno. Portanto, se faz imperioso a busca por novos antioxidantes catalíticos que neutralizem de forma eficaz o excedente das EROs (PIECHOWIAK & BALAWEJDER, 2019).

Atualmente existe um grande interesse no estudo de antioxidantes devido, principalmente, às descobertas sobre os efeitos das EROs no organismo. A oxidação é parte fundamental da vida aeróbica e do nosso metabolismo e, assim, as EROs são produzidas seja por um processo endógeno e natural ou por alguma disfunção metabólica (CARVALHO, 2016). Encontram-se envolvidos com a produção de energia, fagocitose, regulação da divisão e crescimento celular, sinalização intracelular e síntese de substâncias biológicas ativas. No entanto, seu excesso pode levar a diversos prejuízos, tais como a peroxidação dos lipídios de membrana e danos oxidativos a proteínas, enzimas, carboidratos e DNA. Além disso, por encontram-se relacionados, como causa ou fator agravante, com diversas patologias, tais como artrite, choque hemorrágico, doenças cardiovasculares, catarata, disfunções cognitivas, câncer e doenças neurodegenerativas (CAMPOS & LEME, 2017).

Nos últimos anos vem crescendo o interesse na busca por complexos sintéticos capazes de mimetizar a ação de enzimas antioxidantes. Tais complexos podem, futuramente, servir como modelos para a produção de novas drogas que tenham por finalidade atuar como antioxidantes catalíticos. O estudo desses complexos tendo como característica o potencial de diminuir

lesões provocadas pelas EROs se torna de grande importância para, inclusive, melhorar a qualidade de vida dos indivíduos.

Em estudos anteriores nosso grupo mostrou a capacidade antioxidante de compostos de coordenação com atividade mimética às enzimas superóxido dismutase e catalase, mostrando que esses compostos conseguiram aumentar a tolerância de *Saccharomyces cerevisiae* ao estresse oxidativo, além de reduzir os marcadores de dano oxidativo após o estresse oxidativo. Além disso, também foi mostrado que a captação destes compostos interferiu na dinâmica das partículas lipídicas (lipid droplets), bem como na homeostase de metais e na sobrevivência após o envelhecimento cronológico (Ribeiro *et al.*, 2015; Ribeiro, *et al.*, 2017). Com base na relevância do estudo, nas evidências apresentadas pelo nosso grupo e na validação da *S. cerevisiae* como eficiente modelo de estudo, esses dados mostram a relevância da continuidade dos estudos com antioxidantes sintéticos, bem como na identificação de novos complexos que apresentem atividade antioxidante. Além disso, Esta busca torna-se relevante para o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas, que visem combater os danos causados pelo estresse oxidativo.

Sendo assim, este trabalho se propõe a investigar o potencial antioxidante de compostos de coordenação em células de *Saccharomyces cerevisiae* e larvas de *Galleria mellonella*. como uma alternativa de elucidar o potencial antioxidante e antienvhecimento de complexos com os metais ferro, cobre e manganês

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Através do uso dos modelos de estudo *S. cerevisiae* e *Galleria mellonella*, este trabalho teve como objetivo investigar o potencial antioxidante de três complexos contendo os metais de transição ferro (Fe^{3+}), cobre (Cu^{2+}) e manganês (Mn^{2+}).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar o potencial antioxidante *in vitro* dos complexos através do método do DPPH;
- Avaliar a capacidade antioxidante dos complexos em *S. cerevisiae*, através da análise da sobrevivência das células após o tratamento com os compostos e exposição ao estresse oxidativo causado pelo peróxido de hidrogênio ou menadiona;
- Determinar os níveis de peroxidação lipídica e das enzimas catalase e SOD em células tratadas com os complexos e expostas ou não ao estresse oxidativo causado pelo peróxido de hidrogênio;
- Avaliar a expressão e ativação da Hsp-104 em células que foram tratadas com os complexos durante 1 hora;
- Avaliar a longevidade das células após o tratamento com os compostos e a exposição ao envelhecimento cronológico;
- Determinar a absorção dos complexos pelas células que foram tratadas com os complexos;
- Avaliar a sobrevivência e a desenvolvimento do ciclo de vida de *G. mellonella* expostas ao estresse oxidativo (H_2O_2) com ou sem o tratamento com os complexos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO* PELO MÉTODO DO DPPH.

4.1.1 Preparo do DPPH (0,3mM)

O DPPH (1,18 mg) foi dissolvido em 10 mL de álcool etílico (EtOH) (PA) e a solução mantida em recipiente protegido da luz foi armazenada em geladeira por até uma semana.

4.1.2 Preparo das amostras

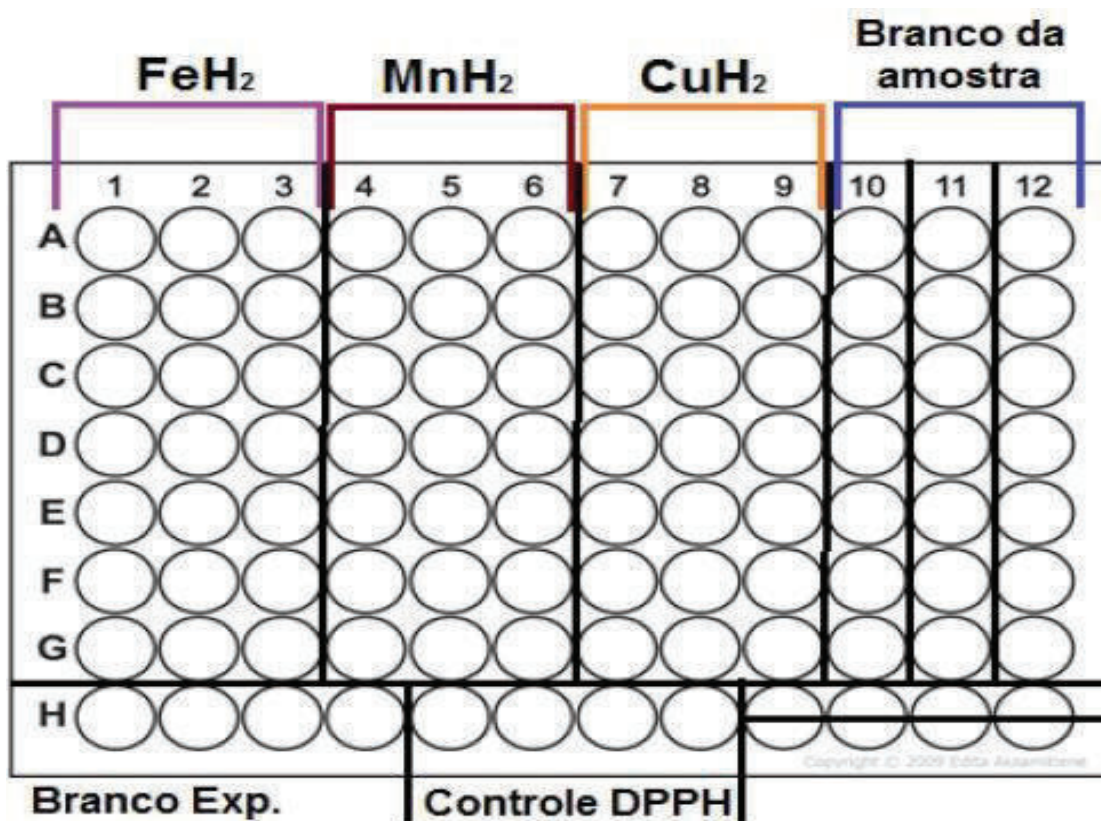
As amostras foram preparadas para uma concentração inicial de 250 μ M e, em seguida foram diluídas sucessivamente em etanol para concentrações finais de 125, 62,5, 31,25, 15,63, 7,82 e 3,91 μ M.

4.1.3 Preparo da placa

A placa de 96 poços foi dividida para o experimento conforme mostra a **Figura 16**. Para análise em espectrofotômetro todos os poços continham o mesmo volume (175 μ L). O ensaio foi realizado em triplicata para cada concentração dos complexos testados. Nos poços da linha A foram adicionados a amostra a ser testada, diluída em EtOH na concentração de 250 μ M. Nos demais poços (linhas de B – G), foram adicionados 125 μ L de EtOH e, em seguida, uma diluição seriada (125 μ L) a partir do primeiro poço da linha A para os poços seguintes, até da linha G, foi realizada. Em seguida, foi adicionado a solução de DPPH (125 μ L) em todos os poços ajustando o volume final da reação para 250 μ L. O controle do branco que foi utilizado para zerar o equipamento no momento da leitura da placa continha apenas o EtOH (250 μ L). Como os complexos apresentavam coloração característica, foi necessário fazer um branco da amostra contendo os complexos em cada concentração testada, para isso foi adicionado no poço o complexo e EtOH

para as concentrações finais utilizadas. Para o controle do DPPH foi adicionado 125 μL de EtOH, e o mesmo volume da solução de DPPH, esse controle foi utilizado para avaliar no final a porcentagem antioxidante. Após a diluição seriada e preparo dos controles, foi adicionado 50 μL de DPPH em todos os poços, excluindo apenas todos os controles. Após a adição do DPPH, a placa foi mantida protegida da luz em temperatura ambiente e após 30 min de reação a absorbância foi medida em espectrofotômetro a 518 nm de comprimento de onda.

Figura 16. Esquema da placa de 96 poços utilizada no ensaio. Os poços das linhas de A a G foram utilizados para diluição dos complexos, as colunas de 1 a 3 foram utilizados para o complexo de FeH_2 , os poços de 4 a 6 foram utilizados para o complexo de MnH_2 , e os poços de 7 a 9 foram utilizados para o complexo de CuH_2 , devido a coloração dos compostos, os poços 10, 11 e 12 foram utilizados para o branco da amostra. Os poços de H1 até H4 foram utilizados para branco do experimento e os poços de H5 até H8 foram utilizados como controle do DPPH.



Fonte: próprio autor.

4.1.4 Cálculo da atividade antioxidante

A atividade antioxidante (AA) foi calculada de acordo com a equação:

$$\text{AA}\% = 100 - \left\{ \frac{(\text{Abs}_{\text{amostra}} - \text{Abs}_{\text{branco}}) \times 100}{\text{Abs}_{\text{controle DPPH}}} \right\}, \text{ Sendo: Abs}_{\text{branco}}:$$

média das absorbâncias do controle do branco (apenas EtOH); $Abs_{controle\ DPPH}$: média das absorbâncias do controle de DPPH; $Abs_{amostra}$: média das absorbâncias de cada concentração dos complexos na mesma diluição; e $Abs_{branco\ amostra}$: média das absorbâncias do controle das amostras na mesma diluição. Os valores de EC_{50} foram calculados por regressão linear a partir de uma curva utilizando o Microsoft Excel 2013.

4.2 CEPAS DE *S. cerevisiae* UTILIZADAS.

As cepas de *S. cerevisiae* que foram utilizadas para a avaliação do potencial antioxidante dos complexos e a indução da resposta celular ao estresse estão descritas na Tabela 1. As cepas foram estocadas em meio YPD 2% sólido (1% de extrato de lêvedo, 2% de glicose, 2% de peptona e 2% de ágar) em condições apropriadas. Os estoques destas cepas foram mantidos em meio sólido YPD 2% (1% extrato de lêvedo, 2% glicose, 2% peptona e 2% ágar) em condições apropriadas.

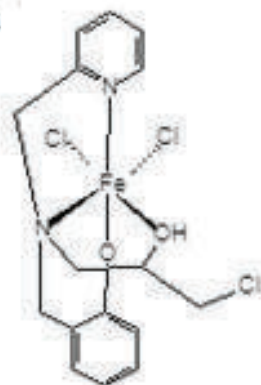
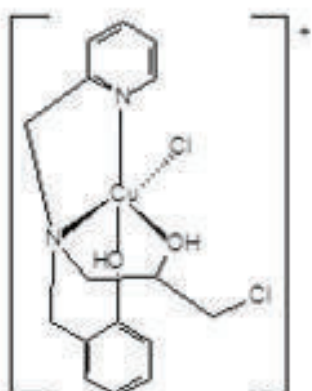
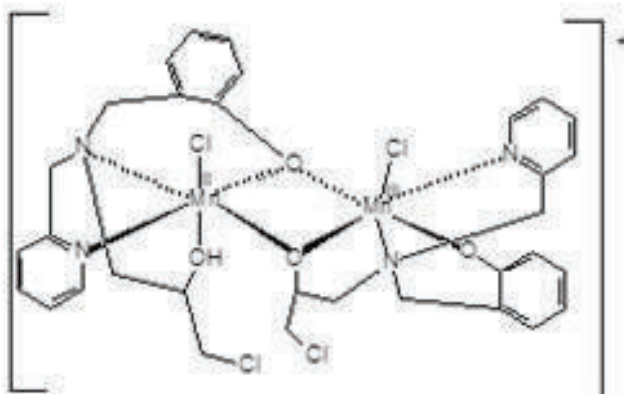
Tabela 1. Cepas de *S. cerevisiae* utilizadas neste trabalho.

| Cepas | Genótipos |
|--------------------------|---|
| BY4741 | <i>MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0</i> |
| <i>HSP104-GFP</i> | <i>MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0, [RNQ+], HSP104-GFP-His3MX</i> |
| <i>sod1Δ</i> | BY4741, except <i>YJR104c::kanMX4</i> |

4.3 Complexos e condições de tratamento das células de *S. cerevisiae*

A síntese, bem como a estrutura dos complexos $[FeIII(HBPCINOL)(Cl_2)] \cdot H_2O$, $[CuII(H_2BPCINOL)Cl]Cl \cdot H_2O$ e $[(HBPCINOL)Mn(II)Mn(III)(BPCINOL)(Cl)](ClO_4) \cdot 2H_2O$ que serão chamados nesse trabalho de FeH_2 , CuH_2 e MnH_2 , respectivamente, já foram descritos na literatura e suas estruturas podem ser visualizadas na **Figura 17**, (Fernandes *et al.*, 2010; Costa *et al.*, 2018).

Figura 17. Estrutura química dos compostos de coordenação. Os complexos FeH_2 , CuH_2 e MnH_2 foram sintetizados e gentilmente cedidos pelo grupo dos professores Christiane Fernandes e Adolfo Horn Júnior da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

A**B****C**

Para o preparo das soluções de trabalho dos complexos, inicialmente foi feita uma solução estoque a 25 mM, de cada um dos compostos (FeH_2 , MnH_2 e CuH_2) em água. A partir da solução estoque de cada composto foram feitas as diluições necessárias, diretamente, ao meio de cultivo que continha as células, para que fossem obtidas as concentrações (6,25 μM , 12,5 μM , 25 μM , 50 μM e 100 μM) de tratamento das células. O tratamento com os compostos foi realizado em placas de 6 poços e incubados em shaker com temperatura ajustada para 28°C/160 rpm por 1h.

4.4. CONDIÇÕES DE EXPOSIÇÃO AO ESTRESSE OXIDATIVO.

Para a realização dos experimentos todas as cepas foram cultivadas em meio líquido sintético YPD 2% (1% extrato de lêvedo, 2% glicose, 2% peptona) e mantidas a 28°C em incubadora com agitação ajustada para 160 rpm. As células foram coletadas em metabolismo fermentativo, ou seja, na metade da primeira fase exponencial do crescimento celular na concentração entre 0,8-1,0 mg de células (peso seco)/mL. Parte da cultura foi exposta, através da adição direta ao meio de cultura, aos agentes oxidantes (1 mM de H_2O_2 ou com 30 mM de menadiona) e incubada em shaker ajustado a 28°C e 160 rpm por uma hora. A viabilidade celular foi monitorada antes e após a condição de estresse oxidativo. A fim de analisar o potencial antioxidante dos complexos, as células foram previamente tratadas com os complexos e, em seguida submetidas ao estresse oxidativo causado pelo H_2O_2 ou menadiona. Assim, as células com ou sem o tratamento com os complexos foram incubadas durante 1h com 1 mM de H_2O_2 ou com 30 mM de menadiona.

4.5 DETERMINAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DOS COMPLEXOS EM *S. cerevisiae*.

Com a finalidade de avaliar o nível de toxicidade dos complexos, as células crescendo exponencialmente em glicose a 28°C e 160 rpm foram submetidas, por uma hora, ao tratamento conforme descrito em 4.3.

Para a análise da capacidade antioxidante dos complexos, as células, cultivadas em meio YPD 2% líquido até a metade do crescimento exponencial, foram tratadas com concentrações crescentes dos complexos a serem

estudados por uma hora, a 28 °C e 160 rpm. Em seguida, as células foram lavadas duas vezes com água estéril e ressuspensas em meio original da cultura previamente centrifugada, e então submetidas a estresse oxidativo por uma hora a 28 °C e 160 rpm. Por fim, foi verificada a viabilidade das mesmas. A viabilidade celular foi determinada antes e após as condições de estresse oxidativo com ou sem o tratamento com os complexos. A viabilidade celular foi determinada através da técnica de plaqueamento, em triplicata, em meio YPD 2% sólido, após coleta de 40 µg de células e diluição de 1000 vezes. Após o plaqueamento, as células foram incubadas a 28°C por 72 h e as colônias contadas. A tolerância celular foi calculada através da razão entre o número de unidades formadoras de colônia presentes após o estresse oxidativo e a condição controle. O controle do experimento foi definido como as células coletadas diretamente do meio de cultura a 28°C e 160rpm antes do processo de estresse oxidativo. Os resultados de tolerância foram expressos em porcentagem de sobrevivência celular.

4.6 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO E ATIVAÇÃO DA PROTEÍNA DE CHOQUE TÉRMICO HSP104

A expressão e ativação da proteína Hsp104 foi acompanhada por microscopia de fluorescência da cepa de *S. cerevisiae*, BY4741, modificada geneticamente para expressar a proteína de choque térmico Hsp104 (Heat shock protein 104) fusionada a proteína verde fluorescente GFP (Green Fluorescent Protein). A proteína Hsp104 atua na resposta das células de levedura a diferentes forma de estresse, incluindo o estresse térmico e oxidativo. Como controle positivo para expressão e ativação da proteína Hsp104, as células foram submetidas a um tratamento térmico a 40°C/1h. A expressão e ativação da proteína Hsp104 também foi investigada em células submetidas aos tratamentos com os complexos. A expressão da Hsp104 foi determinada através do cálculo da porcentagem de células fluorescentes, tratadas a 40°C ou com os complexos, contadas em relação ao controle sem tratamento. A ativação da Hsp104 foi determinada através do cálculo da porcentagem de células com formação de *punctas*, referentes a Hsp104 associadas aos agregados proteicos produzidos pelo aumento da temperatura.

A expressão e ativação da Hsp104 foram determinados através da contagem de grupos de 100 células e realizado o cálculo das médias a partir de experimentos realizados em triplicata.

4.7 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA.

A determinação da peroxidação lipídica foi realizada através do método TBARS (do inglês, Thiobarbituric Acid Reactive Substances) de determinação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (Steels *et al*, 1994). As substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) são compostas de diversos produtos finais de baixo peso molecular formados via decomposição de certos produtos primários e secundários da peroxidação lipídica. Após o estresse e tratamentos realizados conforme descrito anteriormente, os extratos celulares foram preparados após a centrifugação de 50 mg de células que foram posteriormente lavadas 2 vezes com água destilada gelada. Ao sobrenadante previamente separado, adicionou-se 10% ácido tricloracético (TCA), 1,5 g de pérolas de vidro e a suspensão foi agitada em velocidade máxima em vortex durante 6 ciclos de 20 segundos (intercalando 20 segundos no gelo). Após agitação em vortex, a amostra foi centrifugada (4.000 rpm por 4 minutos) e foram retirados 150 µL do sobrenadante e misturados a solução de 1% de ácido tiobarbitúrico preparado em NaOH 0,05 M, EDTA 0,1 M e água destilada. Após aquecimento a 100°C por 15 minutos, as amostras foram deixadas à temperatura ambiente para resfriamento e, em seguida, a absorbância medida espectofotometricamente a 532 nm. A peroxidação lipídica foi expressa em picomoles de malondialdeído (produto da peroxidação lipídica) por miligrama de células (peso seco) (picomoles MDA/mg células).

4.8 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES CATALASE (CAT) E SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD).

4.8.1 Obtenção do extrato livre de células para dosagem enzimática.

A atividade das enzimas Sod e Cat foram determinadas em células coletadas em metabolismo fermentativo antes e após o estresse oxidativo causado pela exposição das células a 1 mM de H₂O₂ com ou sem os tratamentos com os complexos. Os extratos livres de células foram preparados

após a coleta de 50 mg de células, através de centrifugação a 5.000 rpm, e lavagem (duas vezes) das células com água destilada gelada. As células foram ressuspensas em 500 μ L de tampão fosfato pH 7,8 e, em seguida adicionou-se 1,5 g de pérolas de vidro. Os extratos celulares foram obtidos através de 3 ciclos de agitação em velocidade máxima em vórtex por 1 minuto intercalados com 1 minuto no gelo. Os extratos celulares obtidos foram então centrifugados a 13.000 rpm durante 5min e o sobrenadante utilizado para as determinações da concentração de proteína e dosagens enzimáticas. A determinação da concentração de proteínas dos extratos foi realizada utilizando o método descrito por Stickand (Stickland, 1951). Em 4,9 mL de água foi adicionado um volume de 100 μ L de extrato bruto livre de células, 0,9 mL de uma solução contendo 20% de NaOH e 150 μ L de solução contendo 25% de CuSO₄. A absorbância do sobrenadante foi medida em espectrofotômetro a 550nm. Os cálculos da concentração de proteínas dos extratos foram realizados a partir da construção de uma curva padrão com albumina bovina (10 mg/mL). Desta curva padrão foi retirado o valor do fator de conversão estabelecido para conversão da absorbância em unidade de concentração, mg de proteína/mL.

4.8.2 Determinação da atividade de catalase

A determinação da atividade da enzima Cat foi realizada em células tratadas ou não com os complexos e, em seguida, estressadas com H₂O₂. A dosagem da atividade de Cat foi realizada por cinética enzimática, acompanhando a curva de progresso de consumo de H₂O₂ em espectrofotômetro a 240 nm. O branco de reação foi composto por 2,9 mL de tampão fosfato de sódio 50 mM e 0,1 mL do extrato de proteína. A reação foi disparada pela adição de 36 μ L de H₂O₂ na concentração de 880 mM. A curva de progresso foi acompanhada em espectrofotômetro modelo *Beckman Coulter DU 700* durante 3 minutos, com leituras realizadas de 10 em 10 segundos. Os resultados foram expressos como atividade específica (U/mg ptn), onde 1,0 U corresponde à degradação de 1 μ mol de H₂O₂ por minuto.

4.8.3 Determinação da atividade Sod

A determinação da atividade Sod foi realizada através da reação de inibição da redução do NBT utilizando a técnica de zimograma. O gel de resolução 10% foi preparado misturando-se, em um erlenmeyer, 4 mL de solução estoque de

acrilamida-bisacrilamida 30%, 2,25 mL de tampão Tris/HCl 2 M pH 8,9, 6,6 mL de H₂O, 12,0 µL de TEMED e 120 µL de PSA 10%. A mistura foi suavemente agitada e aproximadamente 8mL foram adicionados entre as placas de vidro do sistema de eletroforese vertical Mini-PROTEAN Tetra Cell, da BioRad, até que o topo fosse atingido. Imediatamente após a adição da mistura, o pente para a criação de poços foi colocado, e o sistema deixado em repouso por aproximadamente 1h a temperatura ambiente. Ao final da polimerização, o gel foi armazenado na geladeira, envolto em filme plástico, com uma pequena camada de água para evitar o ressecamento. Para a realização da eletroforese, o gel foi submerso em tampão de corrida 25 mM Tris/HCl, 192 mM Glicina, pH 8,3. Foi preparado 20 µL de amostra, com o volume de extrato correspondente a 75,0 µg de proteína, 5,0 µL de tampão de amostra (125 µL de Tris/HCl 1 M pH 6,8, 800,0 µL de glicerol, 20 µL 1% azul de bromofenol e 55 µL de água) e o restante de H₂O até completar o volume de 20µL. Foi aplicado no gel 20 µL de amostra. Após a eletroforese, o gel foi cuidadosamente removido das placas de vidro e imerso em uma solução contendo 2,5 mM NBT em 36 mM de tampão fosfato (pH 7,8) por 15 minutos. Após este tempo, o gel foi removido da solução de NBT e imerso em uma solução contendo 86 µM de riboflavina, 28 mM de TEMED em 100 mL de tampão fosfato 7.8 por 15 minutos, sendo em seguida exposto à luz. Após a revelação, o gel de poliacrilamida foi digitalizado em fotodocumentador EC3 (UVP Bioimaging Systems) e as bandas de Sod foram analisadas levando-se em consideração a densidade por área com o uso do software ImageJ. A atividade visualizada foi expressa em vezes de aumento em relação à condição controle. A determinação da atividade de superóxido dismutase foi acompanhada pela inibição da redução do NBT após geração de radicais O₂^{•-}, pela fotoreação da riboflavina. A atividade Sod foi determinada através de uma relação entre a atividade Sod de células tratadas e não tratadas com os compostos. Desta forma, a atividade Sod foi expressa através do número de vezes de aumento em relação ao controle.

4.9 DETERMINAÇÃO DA SOBREVIVÊNCIA APÓS O ENVELHECIMENTO CRONOLÓGICO

O envelhecimento cronológico foi determinado segundo Subramaniyan et al (2019) . Após atingirem a fase estacionária, 3 dias em cultura, as células

foram submetidas aos tratamentos com 25, 50 e 100 μM dos complexos e, imediatamente, voltaram para o shaker a 160rpm/28°C. O tratamento das células com os complexos foram realizados diretamente no meio de cultivo. As células permaneceram no shaker a 160rpm/28°C durante 28 dias e a cada 4 dias foram coletadas amostras de células para plaqueamento conforme descrito no item 4.5. Como controle, células que não receberam nenhum tipo de tratamento também foram envelhecidas utilizando o mesmo procedimento descrito para as células que receberam o tratamento. Para calcular o aumento da longevidade das células foi feita uma relação entre as células tratadas ou não com os complexos do dia analisado e as células não tratadas que foram plaqueadas no dia 0 do experimento (células em fase estacionária após 3 dias de crescimento).

4.10 DETERMINAÇÃO DA ABSORÇÃO DOS COMPOSTOS DE COORDENAÇÃO PELAS CÉLULAS DE *S. cerevisiae*

Estas análises foram conduzidas em colaboração com o Prof. Ricardo Erthal Santelli, do Instituto de Química da UFRJ. Foram realizados os tratamentos conforme descrito no item 4.4. Após 1h de tratamento com os complexos, 100mg de células foram coletadas e lavadas 2 vezes com PBS estéril e guardadas em freezer para a continuidade do experimento. Para a determinação da concentração dos elementos inorgânicos (Mg, Ca, Mn, Fe, Co, Cu, Zn) as amostras foram previamente digeridas através de tratamento ácido. Para isso o conteúdo total das amostras foi tratado com 2mL de ácido nítrico concentrado subboiling e aquecido até 200°C em digestor assistido por micro-ondas em frascos de teflon. O extrato obtido foi diluído utilizando água ultrapura e o mesmo foi analisado pela técnica de Espectrometria de Massa com Fonte de Plasma. Para isso foi utilizado um espectrômetro de massa com fonte de plasma indutivamente acoplado (ICP-MS), marca Thermo Scientific, modelo iCAP Qc (Bremen, Alemanha), equipado com câmara de nebulização ciclônica com sistema de resfriamento do tipo Peltier, micronebulizador concêntrico de teflon, amostrador automático modelo AS 421 e software operacional QTegra para aquisição dos dados. A quantificação foi realizada por interpolação utilizando curva analítica com seis soluções-padrão para a

calibração. As soluções de calibração foram geradas a partir de diluição de solução-padrão estoque SpecSol de concentração 1.000 ou 10.000 mg L⁻¹ (Quimlab Química & Metrologia®, Jardim Califórnia, Jacareí, São Paulo, Brasil até obtenção das concentrações desejadas utilizando assemelhamento de matriz e água ultrapura obtida de um sistema Milli-Q®, modelo Direct 8 (Merck Millipore, Billerica, Massachusetts, EUA).

4.11 SOBREVIVÊNCIA DE *G. mellonella* APÓS A EXPOSIÇÃO AO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO

4.11.1 Criação dos insetos

A criação dos animais foi realizada no insetário do Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da UFRJ. As larvas foram mantidas em recipientes de plástico tipo tupperware, facilitando sua visualização, com furos na tampa e contenção com gaze para evitar a fuga das larvas. Ao atingir a fase de mariposa as larvas foram transferidas para potes plásticos tipo tupperware altos contendo furos pequenos na tampa e pedaços de papel para deposição dos ovos. A dieta das larvas foi padronizada, contendo 100g de leite em pó, 50 g de gérmen de trigo, 50 g de farelo de trigo grosso, 50 g de farinha de trigo, 30 g de açúcar mascavo, 30 g de levedo de cerveja, 30 g de mel e 30 g de glicerol. Uma vez por semana foi feita a limpeza e troca dos potes, onde os animais foram retirados e colocados em um pote limpo e com ração fresca. Para a realização dos experimentos foram coletadas larvas com peso mínimo de 0,2 g e sem qualquer marca de melanização.

4.11.2 Condições de exposição ao peróxido de hidrogênio

Para analisar a sobrevivência e a diferenciação entre larvas, pupa e mariposa, as larvas de *Galleria mellonella* foram submetidas ao tratamento prévio com diferentes concentrações dos complexos (50 mg.kg⁻¹, 125 mg.kg⁻¹ e 250 mg.kg⁻¹) e após 3h de tratamento foram expostas ao estresse oxidativo. A exposição ao estresse oxidativo foi feita através da injeção, utilizando uma seringa Hamilton de 10 µl, de H₂O₂ 5 M na última pró-leg esquerda diretamente

na hemocele das larvas de *G. mellonella*. Em todos os experimentos realizados, todos os grupos foram formados por um n igual a 10 larvas, e todos os grupos foram realizados em triplicata. O acompanhamento da sobrevivência foi feito em intervalos de 24 h até o fim do ciclo de vida dos insetos. Foram consideradas mortas as larvas que não respondiam a estímulo realizado ao toque com o uso de uma ponteira. Como controle de lesão mecânica, em todos os experimentos foi utilizado um grupo onde cada larva recebeu injeção, como descrito acima, com 10 μ l de água destilada estéril.

4.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise estatística dos resultados, foi feito o Teste T de Student, a fim de verificar as diferenças entre os vários grupos. Para a realização dos testes utilizou-se o software GraphPad Prism 8.0.

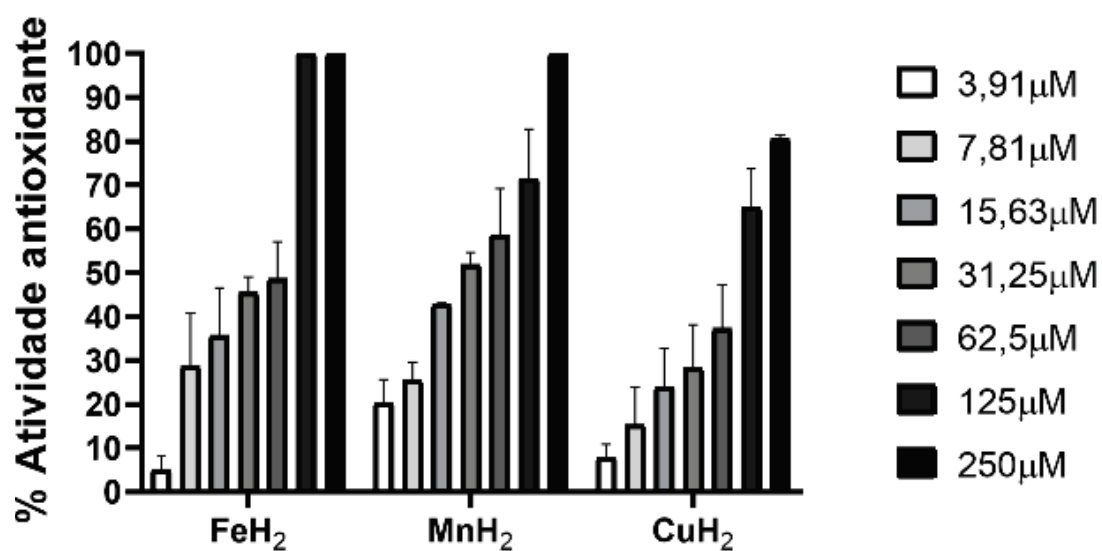
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO*

A atividade antioxidante *in vitro*, determinada através do método do DPPH, mostrou que os complexos apresentaram um potencial antioxidante dose dependente. As concentrações mais baixas dos complexos apresentaram uma pequena atividade antioxidante (10-20%). Por outro lado, os complexos atingiram 100% de atividade antioxidante quando a maior concentração (250 μ M) foi utilizada. Nas demais concentrações dos complexos, foi observado que o aumento da concentração dos complexos também levou ao aumento na atividade antioxidante (efeito dose dependente).

O complexo de FeH_2 , nas duas maiores concentrações (125 μ M e 250 μ M) utilizadas, atingiu 100% de atividade antioxidante, enquanto o complexo MnH_2 só atingiu 100% de atividade antioxidante na concentração de 250 μ M. O composto CuH_2 , embora tenha mostrado um potencial antioxidante dose dependente, não atingiu 100% de atividade antioxidante em nenhuma concentração testada (**Figura 18**).

Figura 18. Atividade antioxidante *in vitro* dos complexos de coordenação FeH_2 , CuH_2 e MnH_2 . A avaliação do percentual da atividade antioxidante *in vitro* foi determinada pelo método do DPPH. Os resultados foram expressos em porcentagem de capacidade de reduzir o radical DPPH e representam uma média de três experimentos independentes desvio padrão. *p valor < 0,05.



Com as curvas de dose *versus* atividade antioxidante obtidas foi possível calcular os valores de EC₅₀ (concentração necessária para obter 50% do efeito antioxidante) dos complexos (**Tabela 2**). Como podemos observar, os valores de EC₅₀ para os complexos FeH₂ e CuH₂ foram bastante semelhantes, 64,2 µM e 67,1 µM, respectivamente. Apesar do composto CuH₂ não ter atingido 100% de atividade antioxidante na maior concentração testada, este complexo conseguiu obter o mesmo EC₅₀ do complexo FeH₂ que apresentou 100% de atividade antioxidante nas duas maiores concentrações. O EC₅₀ para o complexo MnH₂ foi o menor EC₅₀ entre os três complexos. 30,8 µM, cerca da metade do valor de EC₅₀ obtido para os compostos FeH₂ e CuH₂, (**Tabela 2**).

| Compostos | EC ₅₀ |
|------------------|------------------|
| FeH ₂ | 64,2µM 0,01 |
| MnH ₂ | 30,8µM 0,02 |
| CuH ₂ | 67,1µM 0,03 |

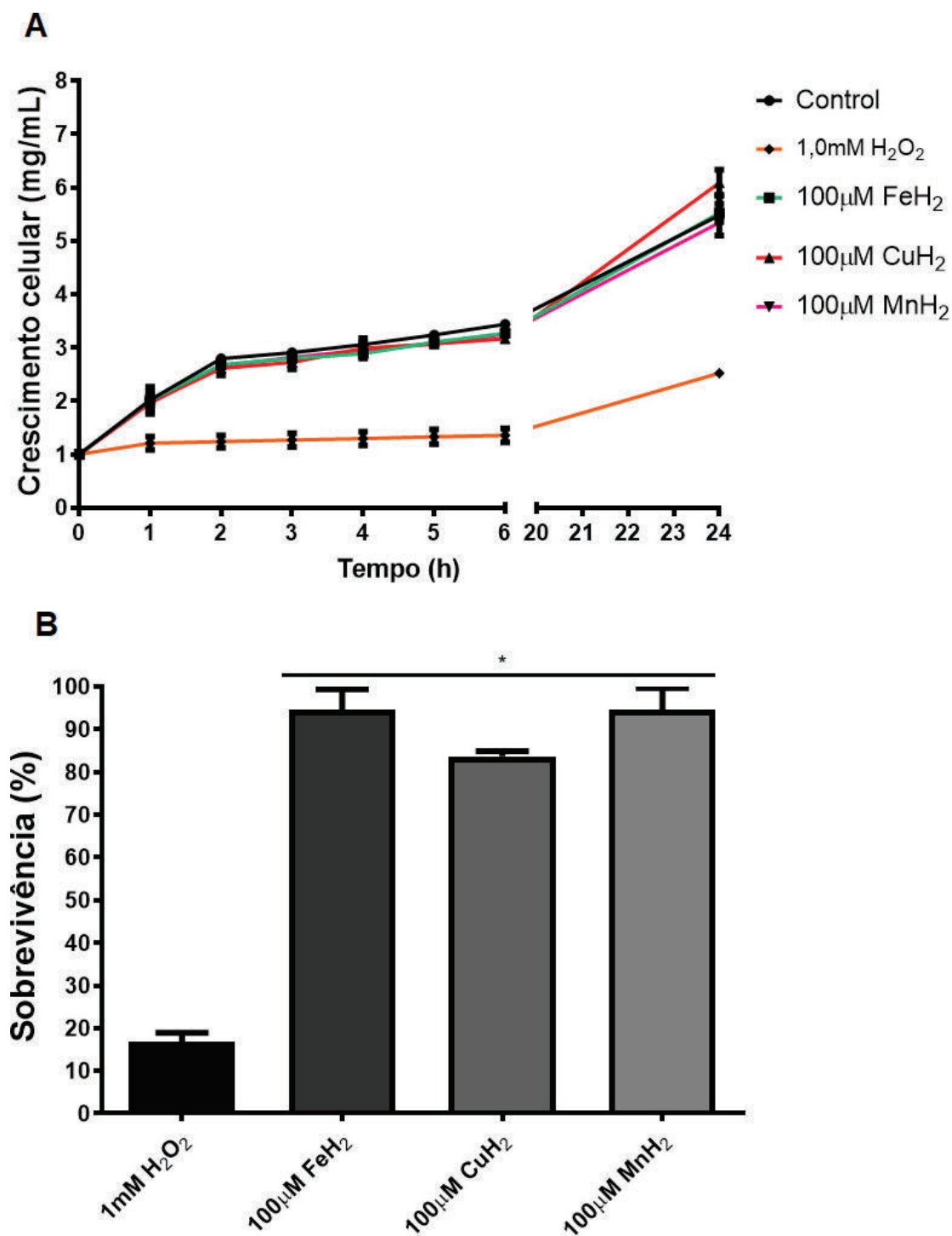
Tabela 2. Valores de EC₅₀ dos complexos. Os resultados de EC₅₀ foram obtidos a partir das curvas dose versus atividade antioxidante determinada pelo método do DPPH. Valores de EC₅₀ dos complexos de ferro, manganês e cobre foram obtidos a partir de uma média ± desvio padrão de 3 experimentos independentes.

5.2 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS COMPLEXOS EM *S. cerevisiae*

A toxicidade dos compostos em *S. cerevisiae*, foi avaliada apenas na concentração de 100 µM dos compostos. Na **Figura 19A**, podemos observar que na presença dos compostos o crescimento celular, acompanhado através da leitura em espectrofotômetro a 570nm, foi semelhante ao do grupo controle. Como controle positivo, as células foram expostas ao H₂O₂ (1 mM) adicionado diretamente no meio de cultivo, e podemos observar que a adição do H₂O₂ afetou significativamente o crescimento celular (**Figura 19A**). Portanto, diante dos resultados obtidos podemos concluir que os complexos não foram tóxicos quando as células foram expostas a 100 µM dos complexos por um período de 24 h. Em paralelo, a toxicidade dos compostos também foi avaliada por plaqueamento das células após exposição aos compostos (100 µM) por 1h. Na **Figura 19B**, ao avaliar a sobrevivência das células após o tratamento de 1 hora

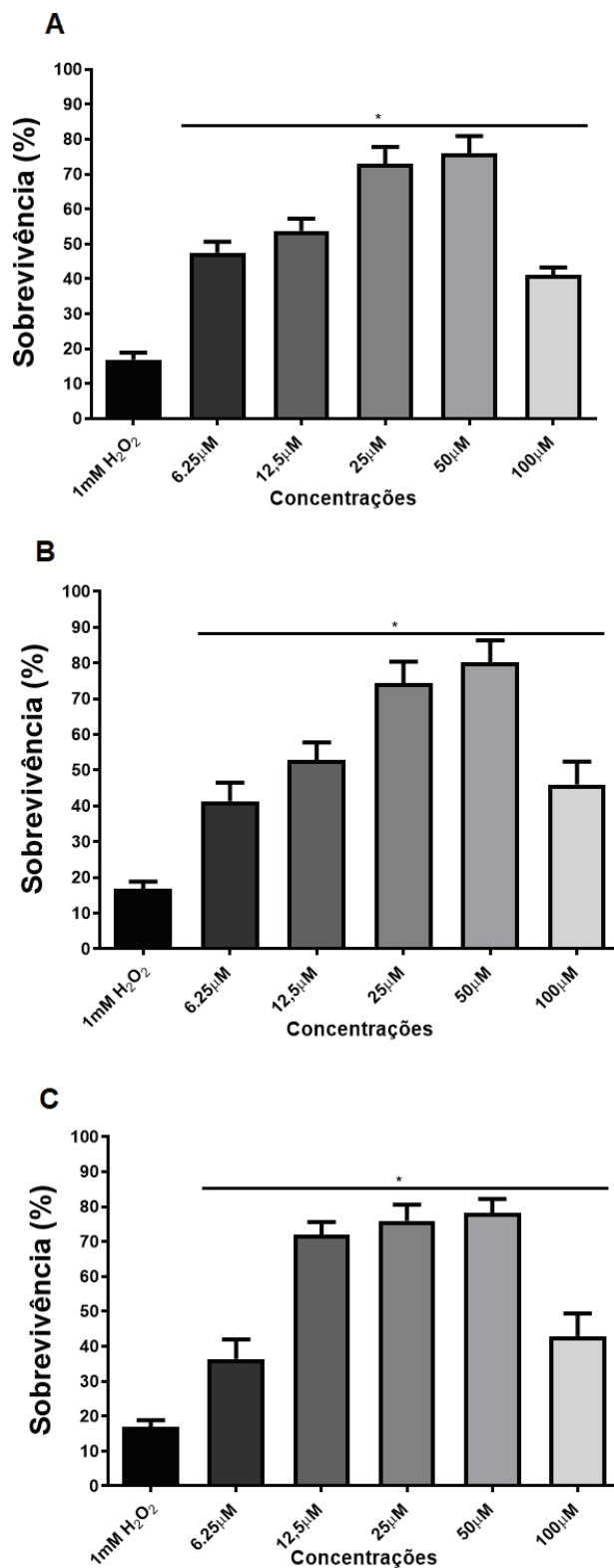
com os compostos, podemos observar as sobrevivências de 94,6%, 83,6% e 94,6% para os complexos FeH_2 , CuH_2 e MnH_2 , respectivamente, mostrando assim que os compostos não afetaram a sobrevivência das células.

Figura 19. Toxicidade dos complexos de coordenação FeH_2 , CuH_2 e MnH_2 em *S. cerevisiae*. Células da cepa BY4741 foram crescidas em meio YPD 2% e, em seguida ajustadas para uma concentração de 1,0 mg/mL para avaliação do crescimento celular na presença e ausência dos compostos. (A) Curva de crescimento das células da cepa BY4741 após adição de 100 μM dos compostos de coordenação ou 1,0 mM de H_2O_2 ; (B) Sobrevivência da cepa BY4741 após o tratamento com 100 μM dos compostos por 1 h. Os resultados são expressos em porcentagem de sobrevivência e representam uma de três experimentos independentes desvio padrão. *representa resultados significativamente diferentes em relação ao controle positivo (1,0 mM H_2O_2 , $p < 0,05$).



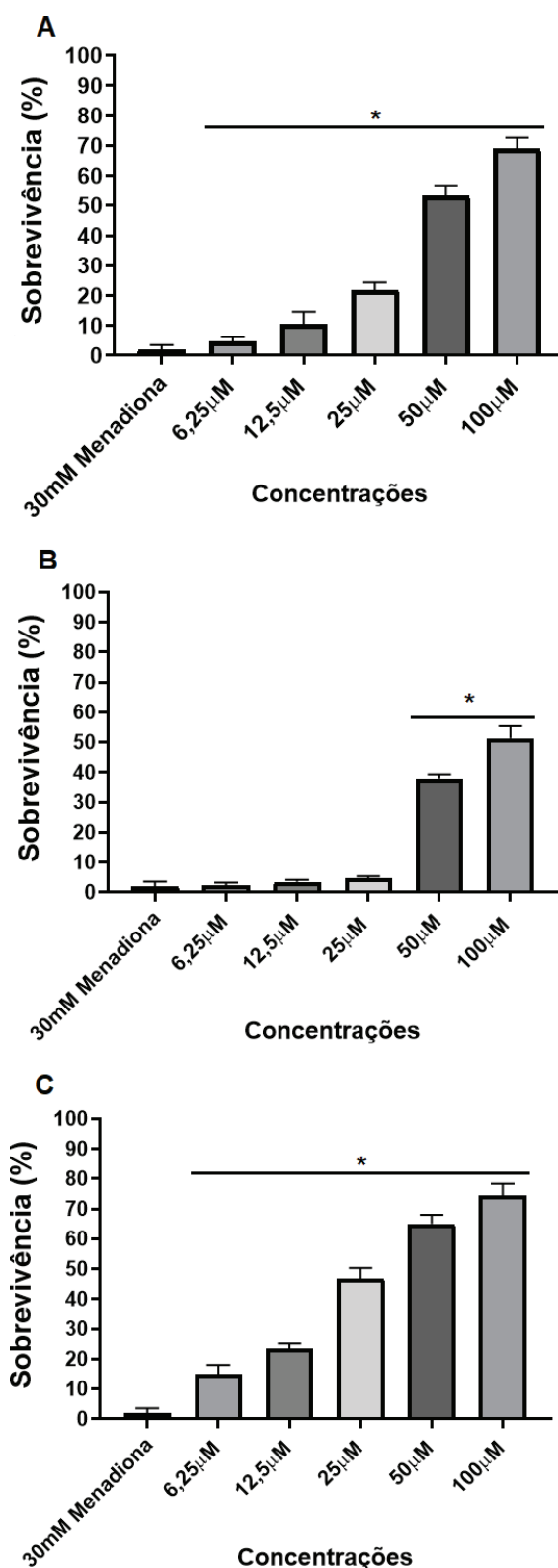
Com relação ao potencial antioxidante dos complexos FeH_2 , MnH_2 e CuH_2 , todos os compostos apresentaram um padrão de variação da sobrevivência celular similar com o aumento da concentração dos compostos testados. De acordo com os resultados mostrados na **Figura 20** podemos observar que a menor concentração ($6,25 \mu\text{M}$) dos compostos testada já foi capaz de proteger as células contra o estresse gerado pelo H_2O_2 , enquanto a sobrevivência das células expostas a $1,0 \text{ mM}$ de H_2O_2 foi de $16,9\%$, o tratamento com $6,25 \mu\text{M}$ dos complexos FeH_2 , MnH_2 e CuH_2 aumentou para $47,5\%$, $41,4\%$ e $36,4\%$, respectivamente. As concentrações de $25 \mu\text{M}$ e $50 \mu\text{M}$ dos complexos FeH_2 e MnH_2 promoveram a maior proteção contra a exposição ao H_2O_2 , enquanto o composto CuH_2 já na concentração de $12,5 \mu\text{M}$ também foi capaz de proteger as células sem apresentar diferença estatística com as concentrações de $25 \mu\text{M}$ e $50 \mu\text{M}$ dos demais complexos. Decidimos então, para testes posteriores de dano oxidativo e cat e sod utilizar as concentrações de $25 \mu\text{M}$ e $50 \mu\text{M}$. Para a concentração de $100 \mu\text{M}$ em todos os complexos testados podemos observar uma diminuição na proteção quando comparada ao grupo que foi tratada com $50 \mu\text{M}$, entretanto, a sobrevivência das células do tratamento com $100 \mu\text{M}$ foi superior à das células que foram estressadas com H_2O_2 (1 mM).

Figura 20. Proteção contra o estresse oxidativo conferida pelos complexos FeH_2 , MnH_2 e CuH_2 . Células da cepa BY4741, tratadas ou não por 1h com diferentes concentrações dos complexos FeH_2 (A), MnH_2 (B) e CuH_2 (C) foram submetidas a 1,0 mM H_2O_2 /1h. Os resultados são expressos em porcentagem de sobrevivência, e representam uma média de três experimentos independentes. * representa resultados significativamente diferentes em relação ao controle positivo (1mM H_2O_2) ($p < 0,05$).



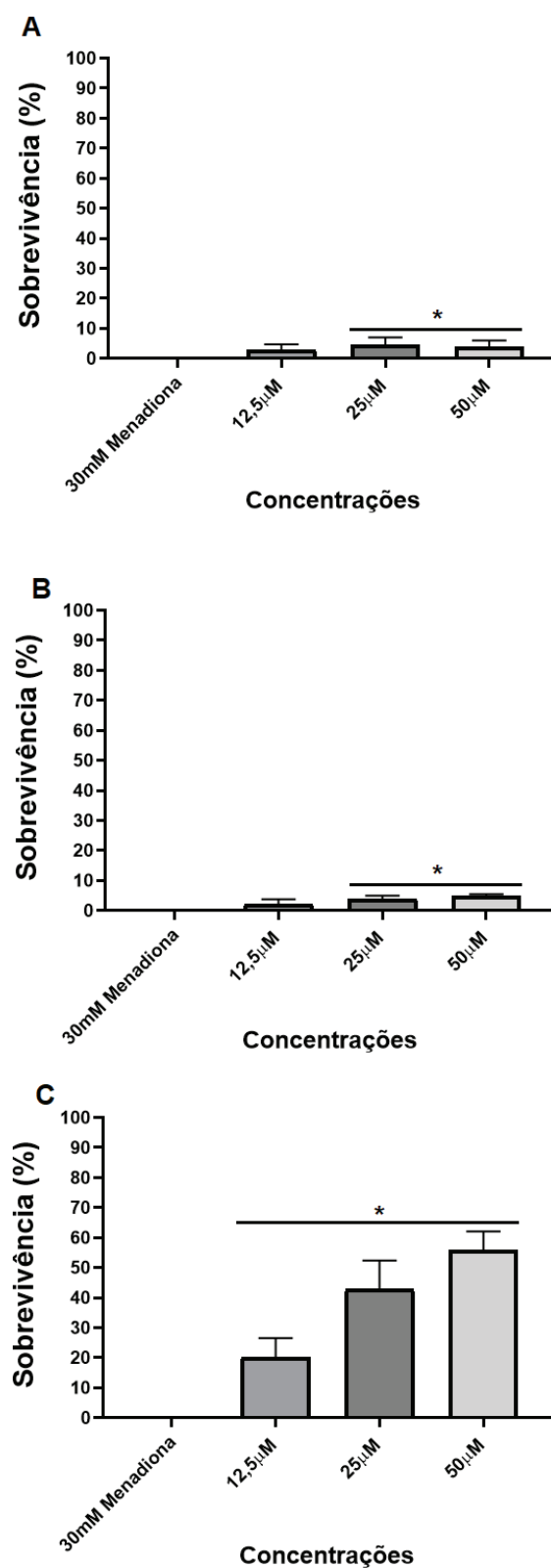
Como todos os compostos apresentaram proteção contra o estresse causado pelo H_2O_2 , decidimos investigar a proteção contra o estresse gerado pela menadiona (30mM). Após o estresse com menadiona as células tiveram sobrevivência de apenas 2,0%, enquanto o tratamento com os complexos FeH_2 e CuH_2 aumentaram a sobrevivência de forma dose dependente. Com o complexo de manganês observamos que o tratamento até a concentração de 25 μM não havia promovido proteção significativa às células. No entanto, após o tratamento com as concentrações de 50 μM e 100 μM observamos um aumento expressivo da proteção quando comparado com a exposição direta das células a menadiona.

Figura 21. Proteção conferida pelos compostos após o estresse com 30 mM de menadiona na cepa BY4741. Células da cepa BY4741, tratadas ou não por 1h com diferentes concentrações dos complexos. FeH_2 (A), MnH_2 (B) e CuH_2 (C) foram submetidas a condições de estresse oxidativo (30 mM de menadiona/1h). Os resultados são expressos em porcentagem de sobrevivência, e representam uma média de três experimentos independentes. * representam resultados diferentes em relação ao estresse com menadiona (30 mM) ($p < 0,05$).



Como os complexos foram capazes de proteger as células da cepa selvagem contra o estresse oxidativo causado pela menadiona, e sendo esta droga uma fonte geradora de radicais $O_2^{\cdot-}$ decidimos investigar se os complexos também seriam capazes de conferir proteção contra o estresse gerado pela menadiona (30 mM) em células deficientes na síntese da enzima Sod1. Após o estresse com menadiona (30 mM) as células deficientes em Sod1 alcançaram valores de sobrevivência abaixo de 1%. O tratamento das células com os complexos FeH_2 e MnH_2 não conferiu proteção contra a menadiona. Por outro lado, o complexo CuH_2 foi capaz de aumentar a sobrevivências das células nas três concentrações testadas (12,5 μM , 25 μM e 50 μM) conferiu um aumento da proteção das células deficientes em Sod1 quando comparadas com as células diretamente estressadas com 30 mM de menadiona (**Figura 22**).

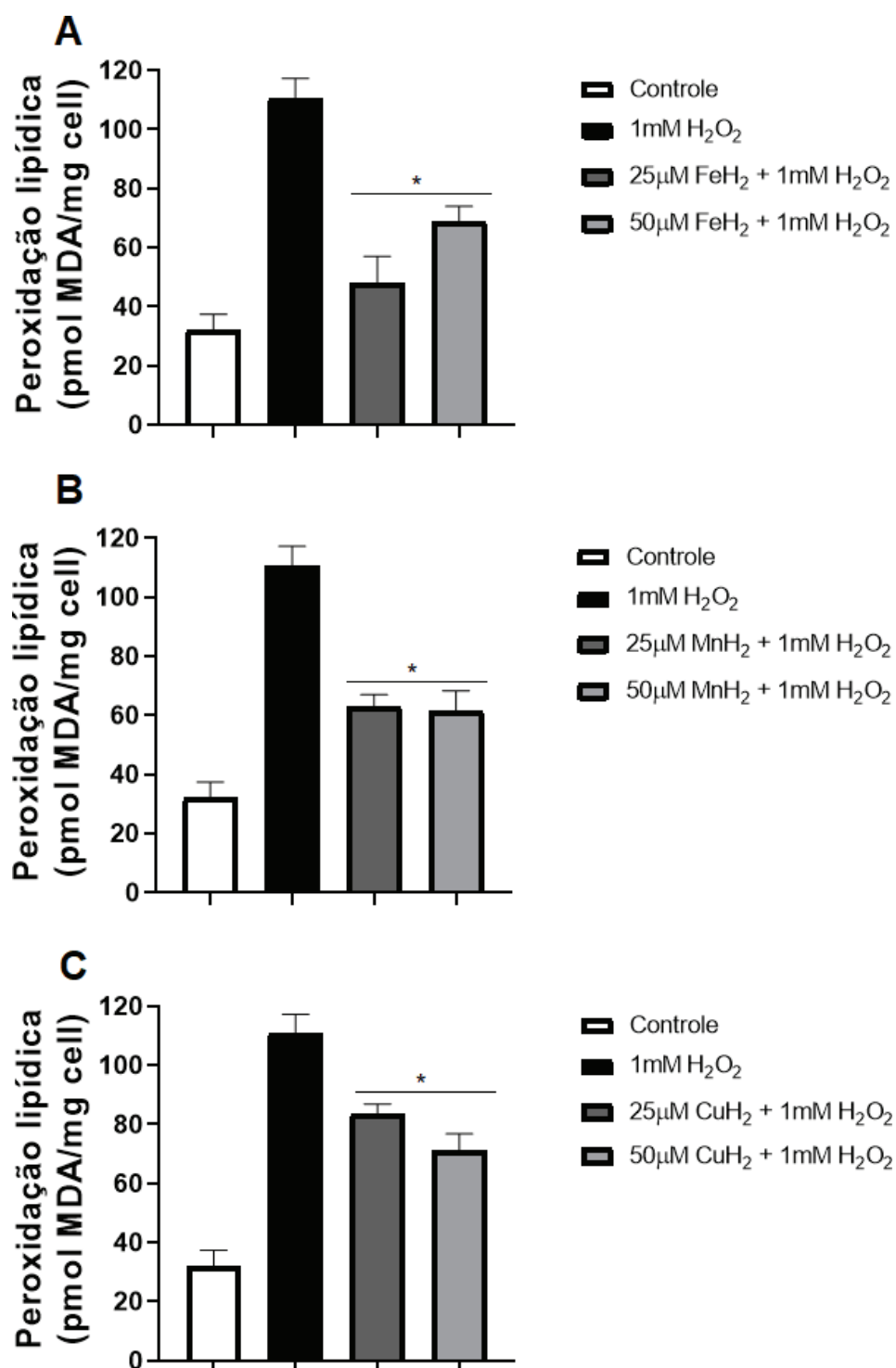
Figura 22. Proteção conferida contra menadiona pelos complexos na cepa com ausência da enzima Sod1. Células da cepa com ausência da enzima Sod1, tratadas ou não por 1h com diferentes concentrações dos compostos de coordenação. FeH₂ (A), MnH₂ (B) e CuH₂(C) foram submetidas a condições de estresse oxidativo (30mM de menadiona/1h). Os resultados são expressos em porcentagem de sobrevivência, e representam uma média de três experimentos independentes. * representam resultados diferentes em relação ao estresse com menadiona (30 mM) ($p < 0,05$).



5.3 TRATAMENTO COM OS COMPLEXOS DIMINUI OS DANOS AOS LIPÍDIOS DE MEMBRANA

O dano oxidativo causado aos lipídeos de membrana foi determinado pelo método de TBARS. É possível observar que após o estresse oxidativo causado pela adição de 1,0 mM de H_2O_2 houve um aumento da peroxidação lipídica em cerca de 3,4 vezes em relação ao grupo controle (**Figura 23**). Após o tratamento com os compostos podemos observar uma redução nos níveis de peroxidação lipídica, porém essa redução não foi capaz de reduzir a peroxidação lipídica aos níveis do grupo controle, mostrando assim que houve uma redução do dano oxidativo após o tratamento com os compostos, porém esse tratamento não foi capaz de restaurar os valores normais da célula.

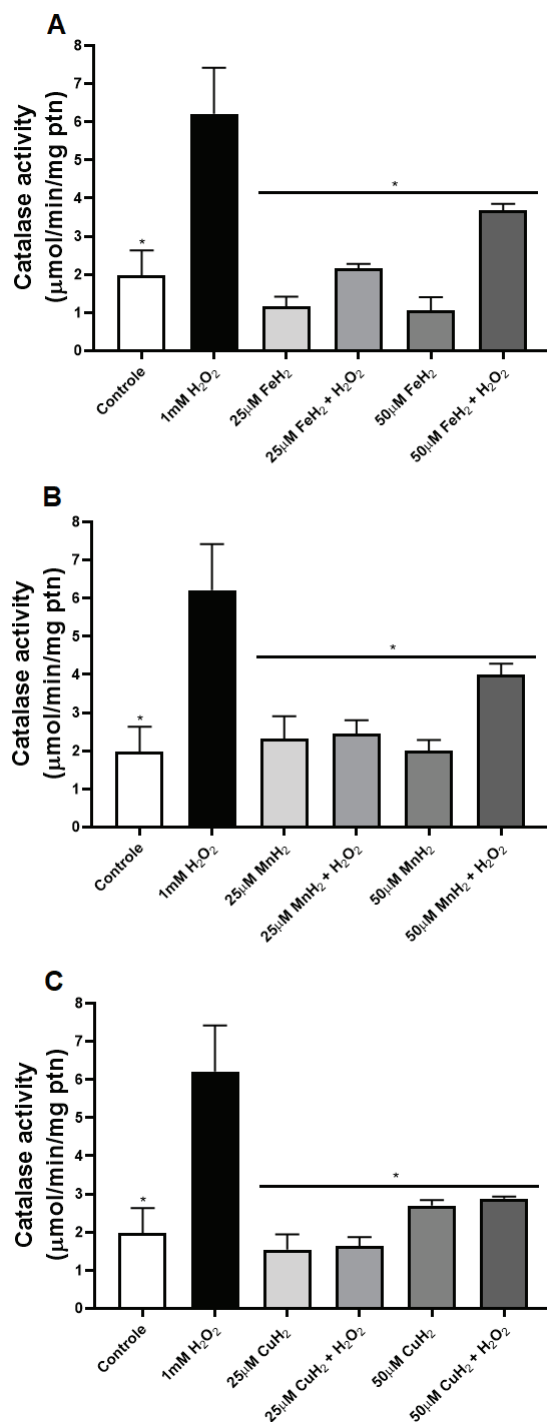
Figura 23. Redução da peroxidação lipídica promovida pelo tratamento com os complexos FeH_2 , MnH_2 e CuH_2 . Células da cepa BY4741, tratadas ou não por 1h com diferentes concentrações dos compostos de coordenação, FeH_2 (A), MnH_2 (B) e CuH_2 (C), foram submetidas a condições de estresse oxidativo (ex. 1,0 mM H_2O_2), e em seguida preparadas para determinação da peroxidação lipídica. Foram utilizadas as concentrações que apresentaram maior percentual de sobrevivência (25 μM e 50 μM). * representa resultados significativamente diferentes em relação ao controle ($p < 0,05$).



5.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE CAT E SOD ENDÓGENAS

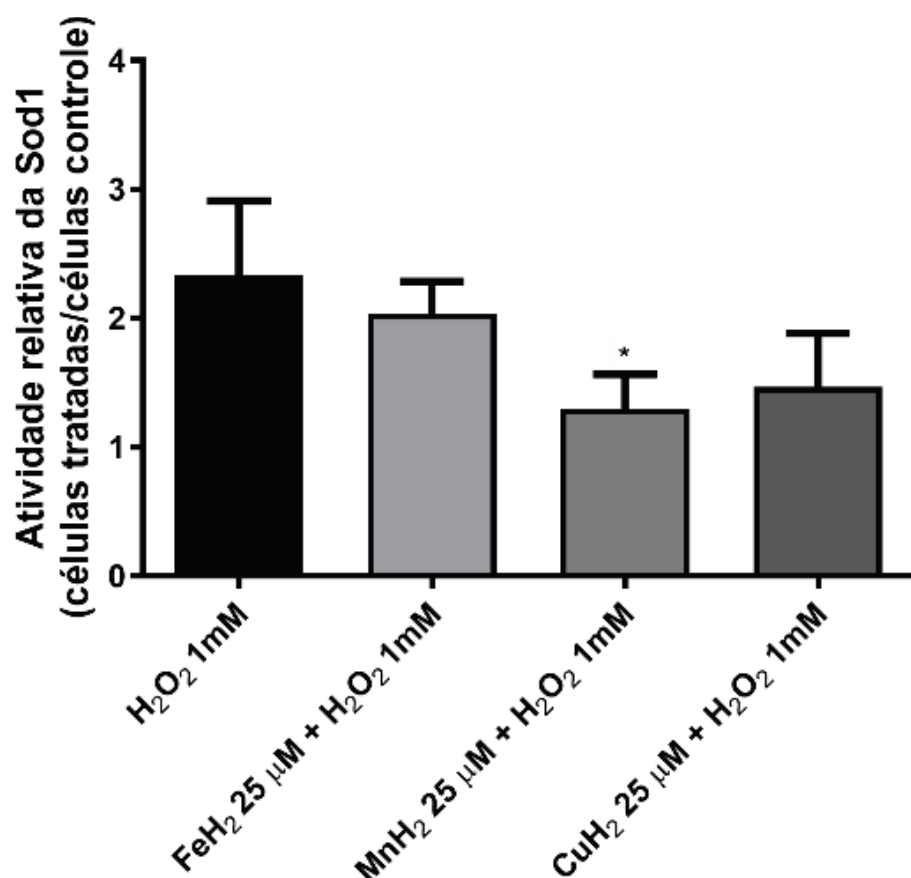
A atividade da Cat foi investigada a fim de saber se os tratamentos com os complexos seriam capazes de aumentar a atividade da enzima Cat. Como esperado, as células em metabolismo fermentativo apresentaram baixos níveis de atividade Cat. No entanto, após a exposição das células ao estresse oxidativo (1mM H₂O₂/1h), podemos observar um aumento significativo, cerca de 3,2 vezes em relação ao controle, da atividade Cat. No tratamento das células com os complexos verificou-se que não houve aumento da atividade Cat em nenhuma das duas concentrações (25 µM e 50 µM) testadas quando comparado com o grupo controle. Após o tratamento com os compostos e posterior exposição ao estresse com 1,0mM de H₂O₂ podemos observar uma redução nos valores de catalase, mostrando que a atividade Cat retornou aos níveis ao controle, com exceção de 50µM dos complexos de ferro e manganês (**Figura 24**).

Figura 24. Efeito dos complexos de coordenação FeH_2 , CuH_2 e MnH_2 na atividade da enzima catalase. Efeito de tratamentos adaptativos na atividade da catalase. Extratos de células foram preparados para determinação enzimática imediatamente antes e após os tratamentos com H_2O_2 e os compostos de coordenação, FeH_2 (A), MnH_2 (B) e CuH_2 (C). Uma unidade (U) da enzimas catalase é definida como a quantidade de enzima que catalisa a conversão de $1\ \mu\text{M}$ de H_2O_2 em 1 minuto, nas condições do ensaio. Os resultados foram expressos em atividade específica (U/mg de proteína). * representam resultados estatisticamente diferentes em relação ao estresse $1\ \text{mM}$ de H_2O_2 ($p < 0,05$).



Com relação à atividade Sod, após o estresse com 1mM de H_2O_2 a atividade aumentou 2,4 vezes em relação ao controle (células não tratadas e não estressadas). Em células tratadas com os complexos de ferro e cobre durante 1h e depois estressadas com 1,0mM de H_2O_2 observamos resultados semelhantes ao grupo de células que foi submetido ao estresse oxidativo causado pelo H_2O_2 . Após o tratamento com os compostos e o estresse com H_2O_2 podemos observar que a atividade Sod permaneceu aumentada mesmo na presença dos três compostos.

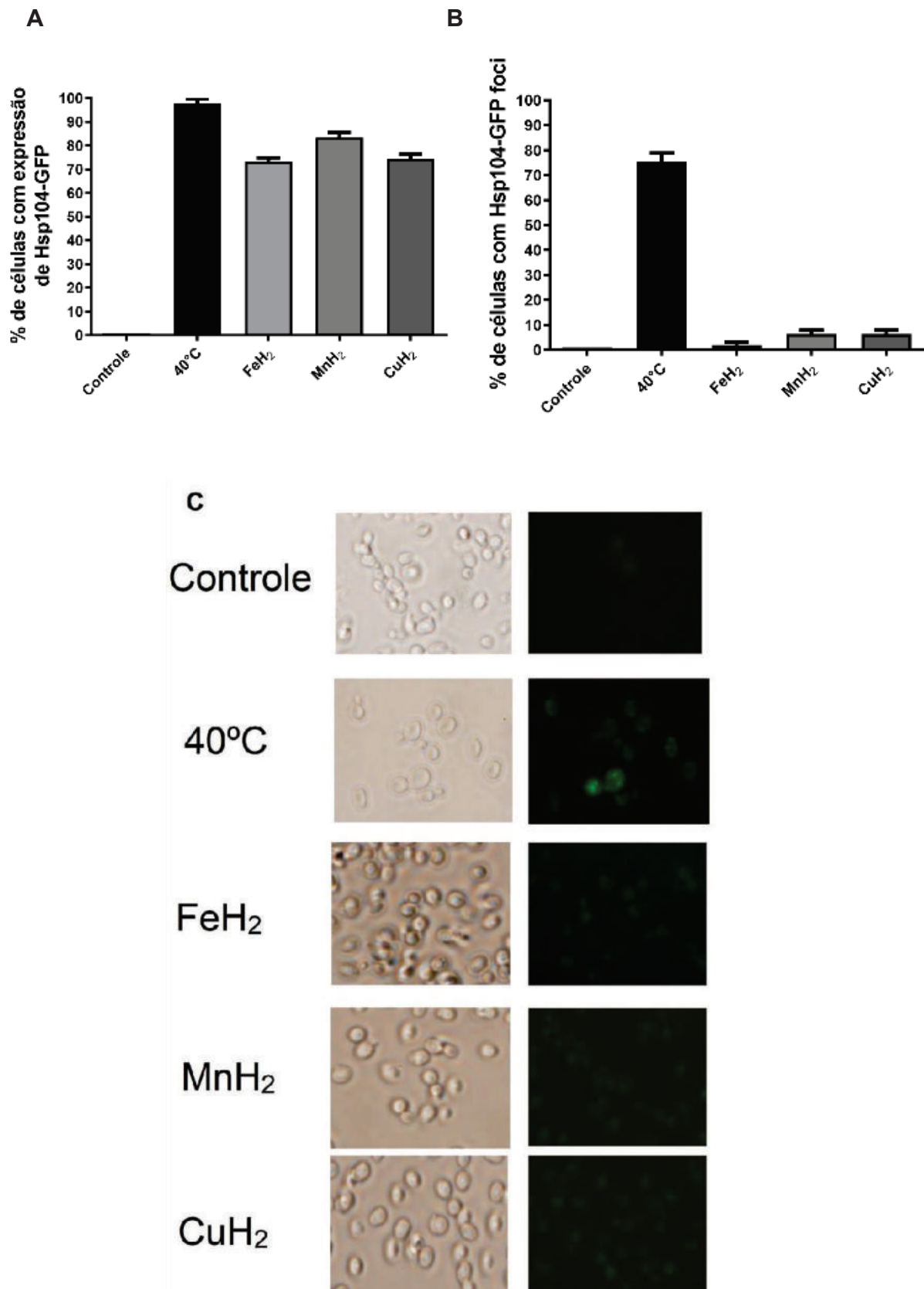
Figura 25. Efeitos dos complexos de coordenação na atividade da Sod endógena. Células em crescimento exponencial foram submetidas ao tratamento com os compostos na concentração de 25 μM e/ou estresse com 1 mM de H_2O_2 . Os resultados estão representados pela razão da atividade de Sod entre as células tratadas com os diferentes compostos e a atividade da Sod na condição controle. * representa resultado diferente em relação ao estresse com 1mM de H_2O_2 ($p < 0,05$).



5.5 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO E ATIVIDADE DA PROTEÍNA HSP104 APÓS O TRATAMENTO COM OS COMPOSTOS

Para determinar a expressão da proteína Hsp104 após o tratamento com os compostos de coordenação foi utilizada a cepa BY4741 modificada geneticamente para expressar a proteína Hsp104 fusionada a proteína verde fluorescente, GFP (Hsp104-GFP). Esta construção permitiu analisarmos através de microscopia de fluorescência a indução da expressão e ativação desta proteína após os tratamentos com os compostos FeH_2 , MnH_2 e CuH_2 . De acordo com a **Figura 26**, podemos observar que na condição controle não foi possível visualizar nenhuma expressão da proteína Hsp104. Entretanto, quando as células foram submetidas ao estresse térmico a $40^\circ\text{C}/1\text{h}$, usado como controle positivo do experimento, foi possível observar tanto o aumento da expressão da Hsp104-GFP como também a ativação desta proteína. A expressão foi detectada pelo aumento de fluorescência das células em relação a condição controle. Após os tratamentos com os complexos FeH_2 , MnH_2 e CuH_2 podemos observar a indução da expressão da proteína Hsp104, sugerindo que os mesmos induzem a expressão de proteínas de choque térmico em células de levedura, porém não foram capazes de ativar esta proteína (**Figura 26**).

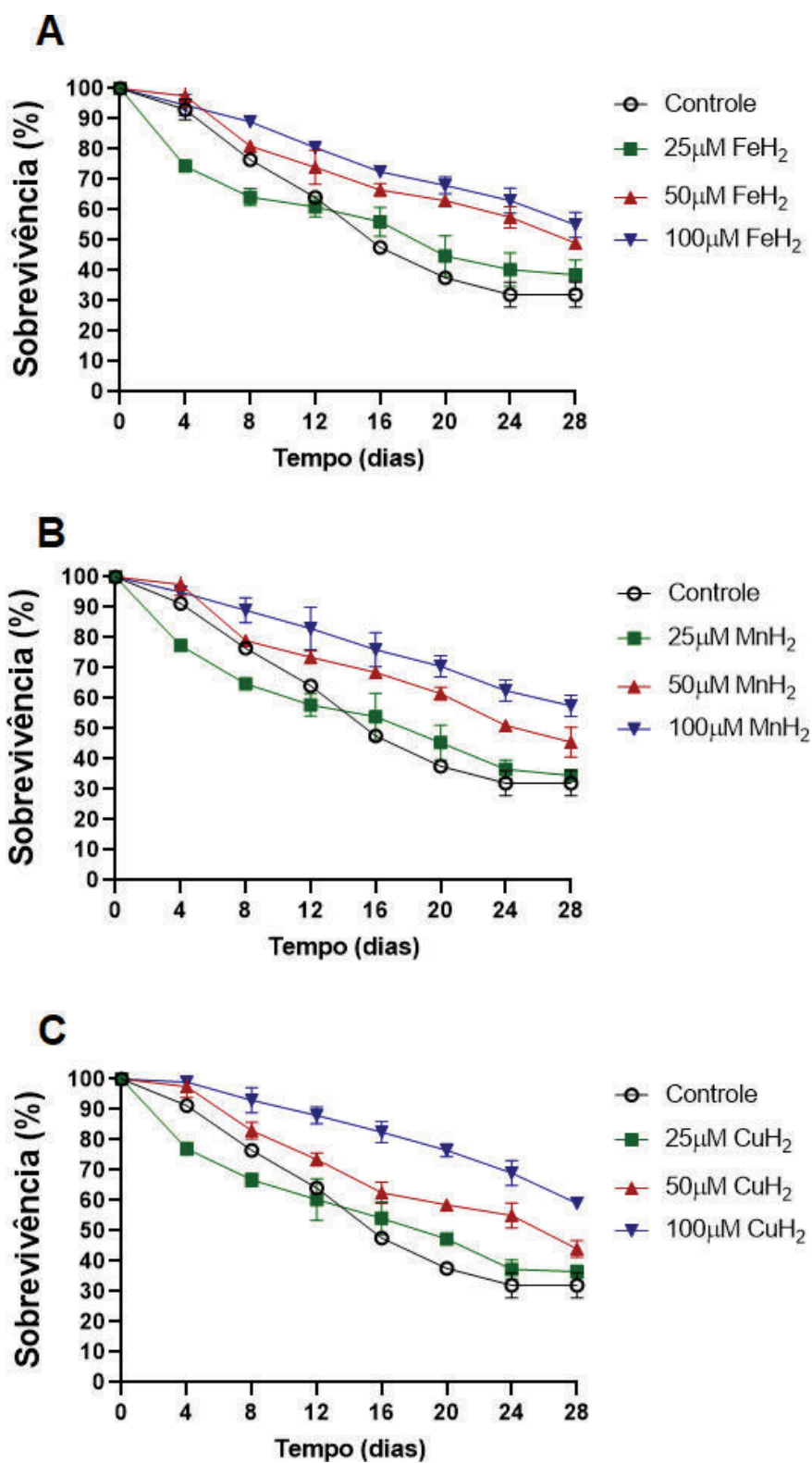
Figura 26. Indução e ativação da expressão da Hsp104-GFP. As células foram tratadas com 50 μ M dos compostos durante uma hora ou submetidas ao estresse térmico (40°C por 1 h) e depois observadas em microscópio de fluorescência. Em A podemos observar a porcentagem de células com expressão de Hsp104. Em B podemos ver a porcentagem de células com ativação da Hsp104. Em C, podemos observar imagens de microscopia de Hsp104-GFP.



5.6 AUMENTO DA LONGEVIDADE CELULAR APÓS O TRATAMENTO COM OS COMPLEXOS FeH_2 , MnH_2 e CuH_2

A longevidade de *S. cerevisiae* frente ao envelhecimento cronológico foi avaliada em células da cepa BY4741 que receberam o tratamento com os complexos (25 μM , 50 μM e 100 μM). O envelhecimento cronológico foi acompanhado durante 28 dias, e a cada 4 dias as células foram coletadas, e plaqueadas em meio YPD 2% para avaliação da longevidade celular (**Figura 27**). Podemos observar que todas as concentrações testadas prolongaram a longevidade das células durante o envelhecimento cronológico. Ao final do experimento de envelhecimento cronológico (28 dias), As células diretamente envelhecidas apresentaram uma longevidade celular de 32%, enquanto as células que receberam o tratamento com 50 μM e 100 μM do complexo FeH_2 , a longevidade celular aumentou para 49% e 55%, respectivamente. Para o composto MnH_2 observamos um aumento na longevidade celular para 45,5% e 57,5% para as concentrações de 50 μM e 100 μM , respectivamente. Com relação ao complexo CuH_2 , observamos um aumento na longevidade para 44% e 59% para as concentrações de 50 μM e 100 μM , respectivamente.

Figura 27. Aumento da longevidade de células de BY4741 após tratamento com os compostos e o envelhecimento cronológico. Células da cepa BY4741, tratadas ou não com diferentes concentrações dos complexos FeH_2 (A), MnH_2 (B) e CuH_2 (C) foram submetidas ao envelhecimento cronológico por 28 dias.



5.7 COMPLEXOS ALTERAM A CONCENTRAÇÃO DE METAIS EM *S. cerevisiae*

As concentrações intracelulares dos metais pertencentes aos complexos, bem como de outros elementos importantes para a homeostase celular foram analisados por Espectrometria de Massas Indutivamente Acoplada (ICP-MS). Considerando que os compostos são formados por íons metálicos (Fe^{3+} , Mn^{2+} e Cu^{2+}) complexado a um ligante orgânico, o ensaio teve o objetivo de comparar as concentrações intracelulares destes metais, antes e após o tratamento com os complexos. Outros metais considerados importantes para o metabolismo da célula também foram avaliados. Assim, as alterações nas concentrações do metal referente a cada complexo, indicaria os níveis de absorção para cada um dos complexos.

Para esse propósito, as células foram tratadas com 6,25, 25 e 100 μM de cada um dos complexos, durante 1 hora a 28°C , conforme descrito no subitem 4.3. Essas concentrações foram escolhidas a fim de obter uma variação entre a menor e a maior concentração testada nas células durante o tratamento. Logo após o tratamento com os compostos, as células foram então coletadas e preparadas para análise. Os resultados podem ser observados na **Tabela 3**.

Tabela 3. Análise da concentração intracelular de metais em *S.cerevisiae* tratadas com os complexos FeH_2 , MnH_2 e CuH_2 . Células de *S. cerevisiae* tratadas ou não (controle) com os complexos foram submetidas a 1h de tratamento com os complexos FeH_2 , MnH_2 e CuH_2 e depois foram preparadas para análise em ICP-MS. Os Resultados foram expressos em mg/kg.

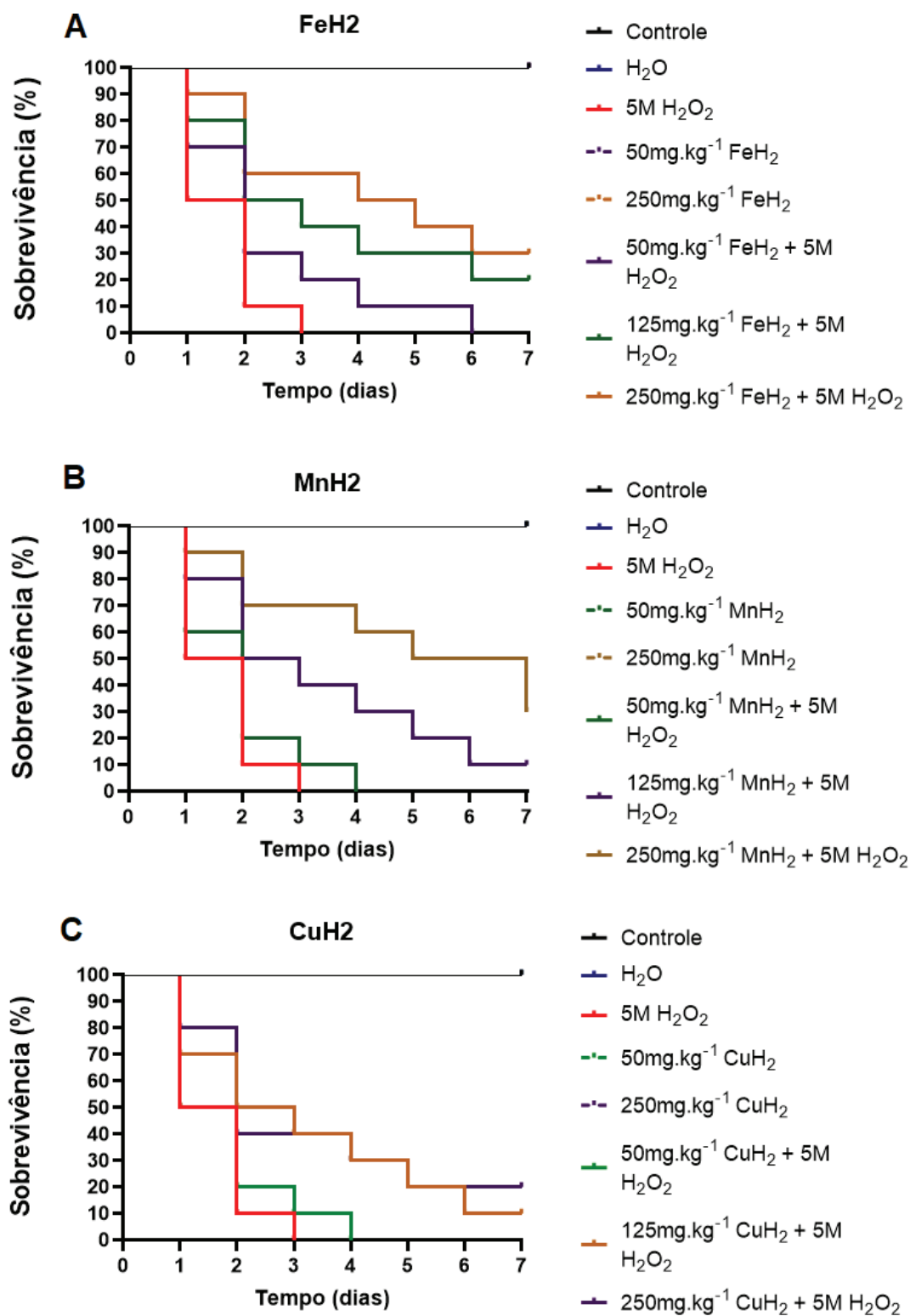
| Amostra | Mg | Ca | Mn | Fe | Co | Cu | Zn |
|-----------------------|--------------------|------------------|------------------|--------------------|------------------|------------------|-------------------|
| Controle | 230,91 \pm 34,8 | 11,66 \pm 1,34 | 0,80 \pm 0,08 | 66,50 \pm 2,12 | 0,39 \pm 0,07 | 0,75 \pm 0,10 | 47,80 \pm 5,30 |
| 6,25uM FeH_2 | 344,92 \pm 5,65 | 13,64 \pm 0,34 | 1,10 \pm 0,11 | 59,16 \pm 2,18 | 0,54 \pm 0,03 | 1,03 \pm 0,06 | 81,89 \pm 1,02 |
| 25uM FeH_2 | 341,46 \pm 29,27 | 11,16 \pm 1,22 | 3,03 \pm 0,04 | 198,03 \pm 10,32 | 0,46 \pm 0,04 | 0,93 \pm 0,05 | 91,78 \pm 2,73 |
| 100uM FeH_2 | 347,37 \pm 14,20 | 14,59 \pm 1,16 | 1,02 \pm 0,02 | 53,16 \pm 11,44 | 0,57 \pm 0,07 | 5,82 \pm 0,41 | 80,69 \pm 4,01 |
| 6,25uM MnH_2 | 341,54 \pm 17,80 | 13,97 \pm 2,25 | 1,09 \pm 0,067 | 65,87 \pm 5,83 | 0,41 \pm 0,037 | 1,01 \pm 0,20 | 80,52 \pm 4,16 |
| 25uM MnH_2 | 346,21 \pm 2,68 | 13,0 \pm 2,85 | 9,50 \pm 1,65 | 58,78 \pm 1,20 | 0,49 \pm 0,065 | 1,15 \pm 0,28 | 93,08 \pm 0,52 |
| 100uM MnH_2 | 293,39 \pm 20,45 | 12,68 \pm 0,48 | 1,00 \pm 0,31 | 0,56 \pm 0,18 | 0,42 \pm 0,05 | 3,64 \pm 2,68 | 75,70 \pm 5,10 |
| 6,25uM CuH_2 | 317,03 \pm 14,92 | 10,44 \pm 2,23 | 0,95 \pm 0,05 | 17,53 \pm 3,26 | 0,31 \pm 0,01 | 0,75 \pm 0,04 | 70,76 \pm 3,04 |
| 25uM CuH_2 | 305,51 \pm 2,34 | 11,65 \pm 1,04 | 10,09 \pm 2,20 | 56,49 \pm 9,59 | 0,47 \pm 0,03 | 0,72 \pm 0,03 | 69,11 \pm 2,10 |
| 100uM CuH_2 | 416,55 \pm 7,12 | 14,29 \pm 2,35 | 1,19 \pm 0,13 | 99,65 \pm 13,46 | 0,56 \pm 0,06 | 10,40 \pm 1,84 | 80,93 \pm 12,01 |

Podemos observar que após o tratamento com todos os complexos houve um aumento significativo na concentração de Mg. Para o complexo FeH_2 podemos observar que houve um aumento na concentração de Fe intracelular nas concentrações de 6,25 e 25 μM e uma queda após o tratamento com 100 μM , perfil bastante similar ao obtido para o complexo MnH_2 . Já para o complexo CuH_2 , podemos observar um aumento significativo do cobre apenas após a concentração de 100 μM do complexo. Quanto as concentrações de Ca e Co, não observou-se diferença entre os tratamentos com o complexo e o grupo controle.

5.8 TRATAMENTO COM OS COMPLEXOS FeH_2 , MnH_2 e CuH_2 AUMENTA A SOBREVIVÊNCIA DE *G. mellonella* APÓS O ESTRESSE OXIDATIVO

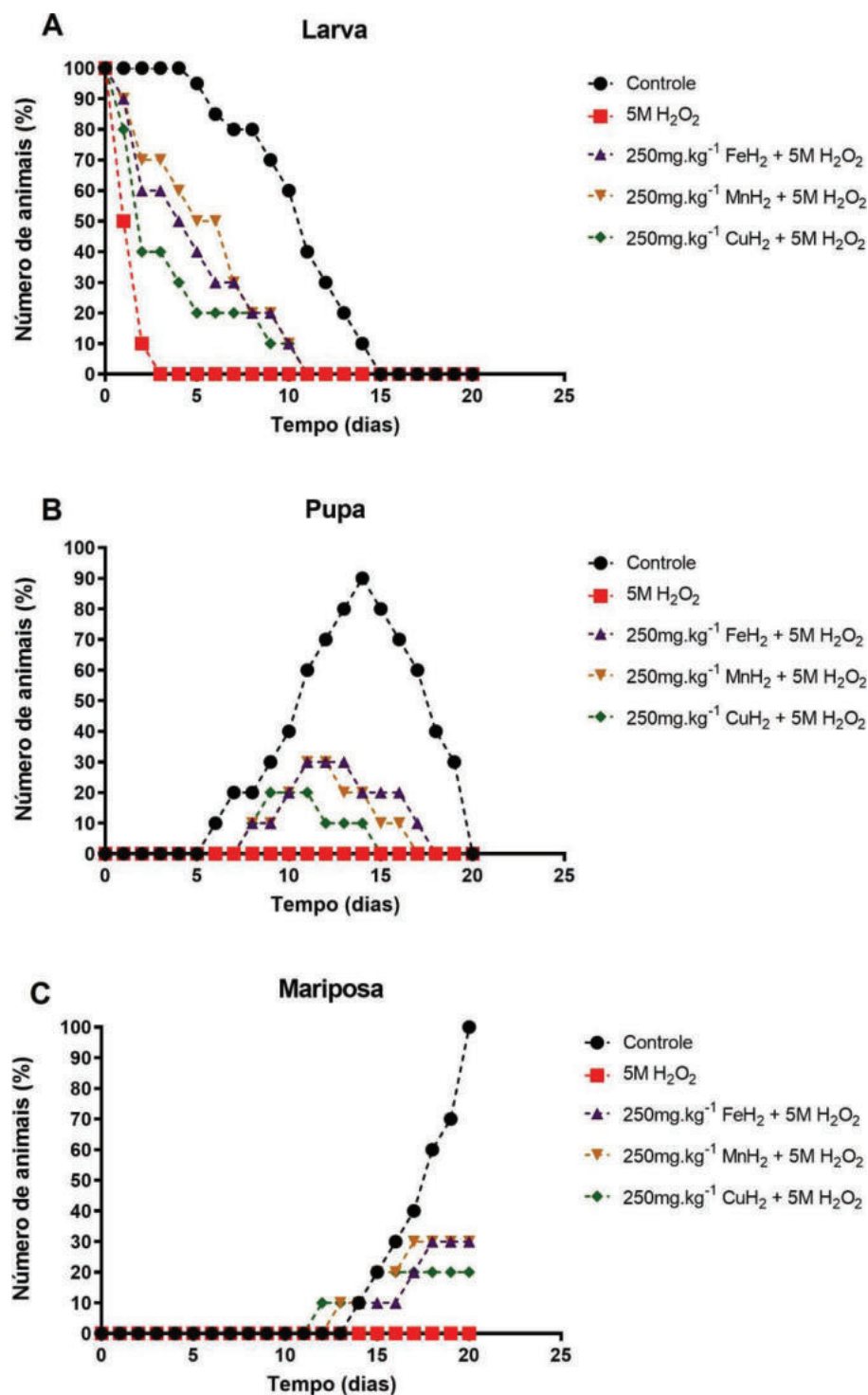
Larvas de *Galleria mellonella* receberam o tratamento com os complexos e, após 3h da injeção, as larvas foram expostas ao estresse oxidativo causado pela injeção de 5,0 M de H_2O_2 . A sobrevivência das larvas foi acompanhada durante 7 dias através de estímulo físico. Podemos observar que não houve mortes das larvas de *G. mellonella* após 7 dias no dois grupos que foram usados como controle: sem qualquer injeção e com injeção de H_2O . Entretanto, no grupo que foi estressado com 5,0 M de H_2O_2 podemos observar a morte de todas as larvas no terceiro dia após a injeção com H_2O_2 (**Figura 28**). Com relação ao tratamento das larvas com os complexos antioxidantes, as larvas foram, primeiramente, tratadas com as concentrações de 50 mg.kg^{-1} e 125 mg.kg^{-1} . No tratamento com a concentração de 50 mg.kg^{-1} , nenhum complexo conseguiu proteger os animais para que as larvas conseguissem sobreviver 7 dias após a injeção de H_2O_2 . No entanto, os animais tratados com os complexos FeH_2 , MnH_2 e CuH_2 aumentaram em mais 3, 1 e 1 dias, respectivamente, a sobrevivências das larvas expostas ao H_2O_2 . Ao aumentar a concentração para 125 mg.kg^{-1} foi possível observar um aumento da sobrevivência, alcançando 20% de sobrevivência para o complexo FeH_2 , e 10% de sobrevivência para os complexos MnH_2 e CuH_2 . Larvas tratadas com 250 mg.kg^{-1} de FeH_2 e MnH_2 mostraram 30% de sobrevivência após 7 dias, enquanto as larvas tratadas com a mesma concentração do complexo CuH_2 mostraram 20% de sobrevivência no mesmo período.

Figura 28. Sobrevivência ao estresse causado pelo H_2O_2 em larvas de *G. mellonella* tratadas com os complexos e o. Larvas de *Galleria mellonella* expostas ao tratamento com os complexos FeH_2 (A), MnH_2 (B) e CuH_2 (C) foram submetidas ao estresse com 5 M H_2O_2 durante 1 hora. Os gráficos acompanham a sobrevivência das larvas ao longo de 7 dias.



Além da sobrevivência das larvas de *G. mellonella* as condições expostas, também foi feito um acompanhamento do processo de diferenciação/desenvolvimento do modelo de estudo, onde foi avaliado se as larvas deste invertebrado que sobreviveram ao estresse oxidativo quando tratadas com os complexos seriam capazes de prosseguir com o ciclo de vida, atingindo a fase adulta, mariposa. Podemos observar que nos grupos controle todas as larvas alcançaram o último estágio, atingindo em 20 dias de acompanhamento a fase em que houve a diferenciação das larvas em pupa e, em seguida, mariposa. Entretanto, no grupo que foi estressado com 5,0 M de H_2O_2 podemos observar a morte de todas as larvas no terceiro dia após exposição ao H_2O_2 , não sendo possível ter larvas que atingissem a fase adulta, mariposa. Por outro lado, todas as larvas tratadas com 250 mg.kg⁻¹ de FeH_2 , MnH_2 e CuH_2 que sobrevieram ao estresse oxidativo causado pelo H_2O_2 alcançaram o último estágio do ciclo, atingindo a forma de mariposa (**Figura 29**).

Figura 29. Complexos não afetam a continuidade do ciclo de vida de *G mellonella*. Larvas de *Galleria mellonella* expostas ao tratamento com os complexos e o estresse causado por 5,0 M de H_2O_2 . Podemos observar as três fases: larva (A), pupa (B) e mariposa (C). Os gráficos acompanham a continuidade do ciclo de vida dos animais ao longo de 21 dias.



6 DISCUSSÃO

O potencial antioxidante de uma substância, molécula ou composto é caracterizado pela sua capacidade de inibir a ação das EROs que são produzidas a partir de fontes exógenas e/ou endógenas (SANTOS, 2020). Diante da necessidade de avaliar a atividade antioxidante surgiram diversos métodos de estudo e avaliação, dentre estes métodos, a captura do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) tem sido largamente utilizado para avaliar o potencial antioxidante de uma amostra (SANTOS, 2020).

Através desta técnica, diversos autores têm estabelecido o potencial antioxidante de substâncias naturais ou sintéticas através da determinação dos valores de EC_{50} (concentração que induz metade do efeito máximo). Neste contexto, o EC_{50} de substâncias naturais conhecidas, tais como ácido ascórbico ($EC_{50}=36,035 \mu\text{g.mL}^{-1}$), quercetina ($EC_{50} = 1,600,17 \mu\text{g.mL}^{-1}$), rutina ($EC_{50} = 8,130,13 \mu\text{g.mL}^{-1}$), isoquercetina ($11,80 \pm 1,1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) já foram reportados na literatura (BIANCO & SANTOS, 2010; SILVA et al., 2009). Além disso, também já foi reportado o EC_{50} de complexos sintéticos derivados do ácido isoferúlico contendo os metais Mg(II) e Mn(II)/Na(I), cujos valores de EC_{50} obtidos foram $153,50 \mu\text{M}$ e $149,00 \mu\text{M}$, respectivamente (KALINOWSKA et al., 2021). Esses valores de EC_{50} para os complexos sintéticos são bem superiores aos obtidos nesse trabalho, demonstrando que os complexos FeH_2 , MnH_2 e CuH_2 apresentaram maior capacidade antioxidante. Por outro lado, o EC_{50} dos complexos FeH_2 , MnH_2 e CuH_2 são inferiores aos valores obtidos com complexos macrocíclicos com Fe^{3+} ($193 \pm 5 \mu\text{M}$). Com relação aos complexos com Mn^{2+} e Cu^{2+} não foi detectada atividade antioxidante suficiente para calcular o EC_{50} (SOBERANES et al., 2019). Em outro estudo, foram reportados o EC_{50} de $29.63 \pm 2.76 \mu\text{M}$, $31.13 \pm 1.41 \mu\text{M}$, $35.16 \pm 2.45 \mu\text{M}$, $43.53 \pm 3.12 \mu\text{M}$, $57.71 \pm 2.61 \mu\text{M}$ para os complexos com os metais Cu, Zn, Mn, Co e Ni, respectivamente (JAMIL et al., 2015).

Nesse estudo foi demonstrado que além de possuir capacidade antioxidante *in vitro*, os complexos FeH_2 , MnH_2 e CuH_2 também apresentaram atividade antioxidante *in vivo* em ambos os modelos testados, *Saccharomyces cerevisiae* e *Galleria mellonella*. A atividade antioxidante foi determinada

através da exposição de *S. cerevisiae* ao estresse oxidativo provocado pela adição de H_2O_2 (1 mM) ou menadiona (30 mM) ao meio de cultura. Com relação ao modelo *G. mellonella*, o estresse oxidativo foi administrado através da injeção de H_2O_2 (5 M) diretamente na hemolinfa das larvas.

Nesse contexto, nosso grupo de pesquisa tem avaliado com sucesso o potencial antioxidante de diversos complexos de Fe^{3+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} e Ag^{2+} (THORNTON et al., 2016; Ribeiro et al., 2015; RIBEIRO et al., 2017). Nossos resultados têm mostrado que células tratadas com complexos das séries HPCINOL ($\{[\text{Fe}(\text{HPCINOL})\text{Cl}_2]\text{NO}_3$, $[\text{Cu}(\text{HPCINOL})(\text{CH}_3\text{CN})](\text{ClO}_4)_2$ and $\text{Mn}(\text{HPCINOL})(\text{Cl})_2\}$) e Phen ($[\text{Ag}_2(\text{phen})_x(\text{OOC}-(\text{CH}_2)_y-\text{COO})]\cdot z\text{H}_2\text{O}$) foram capazes de aumentar a sobrevivência de *S. cerevisiae* expostas ao estresse oxidativo. Nossos resultados apontam que o complexo de ferro da série HPCINOL apresentou a maior capacidade em proteger as células do que os complexos contendo cobre e manganês da série HPCINOL. Aqui neste trabalho, o complexo da série H_2 que apresentou maior capacidade antioxidante foi o complexo CuH_2 , sendo seguido pelos complexos FeH_2 e MnH_2 , apresentando estes últimos perfis muito semelhantes. Com relação ao complexo de Ag publicado pelo nosso grupo, os complexos estudados nesse trabalho se mostraram piores quando a cepa BY4741 foi tratada com os complexos e estressa com H_2O_2 ou menadiona, porém para a cepa deficiente em *sod1* e estressada com menadiona o complexo CuH_2 apresentou uma proteção mais eficaz do que o complexo de Ag.

A busca por antioxidantes sintéticos e a avaliação de sua capacidade antioxidante em *S. cerevisiae* também tem sido foco de diversos estudos. Kerdsoomboon et al. (2015) que estudou o efeito protetor de extrato de *Moringa oleifera* em células selvagens de BY4742 e deficientes na síntese da enzima Sod1 mostrou que o tratamento foi capaz de aumentar a sobrevivência das células após o estresse oxidativo com H_2O_2 , porém não sendo capaz de recuperar a sobrevivência na cepa mutante. Em nosso estudo, embora não tenha sido avaliado o efeito do estresse causado pelo H_2O_2 na mutante Sod1, foi mostrado que, exceto o complexo de CuH_2 , os complexos FeH_2 e MnH_2 não foram capazes de resgatar a sensibilidade da mutante Sod1 após o estresse com menadiona. A capacidade protetora do resveratrol também já foi testada

pelo nosso grupo. Empregando a levedura *S. cerevisiae* mostramos a capacidade do resveratrol em recuperar a viabilidade de células tratadas (com resveratrol) e estressadas com 2,5 mM de H₂O₂ em aproximadamente 30% (DANI et al., 2008). Estudos anteriores com quercetina e isoquercetina também mostraram atividade antioxidante em *S. cerevisiae*, quando estressadas com H₂O₂ e menadiona (SILVA et al., 2009). Em comparação com esses estudos previamente publicados, os complexos estudados nesse trabalho apresentaram atividade similar quando as células foram estressadas com menadiona, porém no estresse com H₂O₂ os complexos se mostraram superiores ao tratamento com quercetina e isoquercetina. Além disso, Subramaniyan et al. (2019) demonstrou a capacidade protetora do magnolol (20 µM) em cepas selvagem e deficiente em *sod1*, estressadas com H₂O₂ (1 mM). Os autores observaram que em ambas as cepas testadas, o magnolol foi capaz de proteger as células, alcançando um aumento, em relação a células que não foram tratadas, de aproximadamente 15% e 18,73% para as cepas selvagem e *sod1*Δ, respectivamente. Esses valores obtidos com magnolol se mostraram inferiores aos valores obtidos nesse estudo com os complexos FeH₂, MnH₂ e CuH₂.

A peroxidação lipídica pode contribuir de maneira significativa para a perda da função celular em situações de estresse oxidativo. Estudos mostram que produtos da peroxidação lipídica podem ser tóxicos ao organismo, e estão relacionados com o envelhecimento e diversas patologias (SOUZA, 2013). As modificações em proteínas e no DNA são alvos muito comuns dos produtos da peroxidação lipídica e, além disso, facilmente detectáveis em condições de estresse oxidativo. Dentre os produtos da peroxidação lipídica, o malondialdeído (MDA) tem sido o biomarcador mais utilizado para determinação da oxidação dos lipídios, e pode ser medido como uma substância reativa ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).

A peroxidação lipídica causada por condições de estresse oxidativo, bem como a redução deste processo por substâncias antioxidantes tem sido acompanhada pelo nosso grupo de pesquisa (RIBEIRO et al., 2015; RIBEIRO et al., 2017). O uso de complexos antioxidantes como uma alternativa de reduzir a peroxidação lipídica já foi abordada em um estudo prévio do nosso grupo, cujo resultado mostrou que o tratamento de *S. cerevisiae* com 25 µM de

cada complexo da série HPCINOL foi suficiente para reduzir em quase 50% os valores de peroxidação lipídica, mostrando, inclusive, que o composto de Fe(III) foi mais eficiente em reduzir os danos oxidativos, o que também aconteceu nesse trabalho. Nesse trabalho mostramos que os complexos FeH₂, MnH₂ e CuH₂, para a concentração de 25 µM, também conseguiram diminuir os danos oxidativos, apresentando redução de 56,3%, 43,6% e 21%, respectivamente. .

Outros complexos antioxidantes também têm mostrado um efeito positivo na redução da peroxidação lipídica de células, compostos MnSalen foram capazes de diminuir danos de peroxidação lipídica em quase 50% em cérebros de camundongos submetidos ao envelhecimento durante 11 meses (LIU et al., 2003). Além disso, um outro estudo mostrou que o tratamento com compostos MnSalen diminuiu os níveis de peroxidação lipídica em camundongos submetidos a uma dieta que provocou esteatohepatite não alcoólica (REZAZADEH et al., 2012)

A busca por antioxidante naturais também tem recebido grande atenção, uma vez que diversas substâncias oriundas do metabolismo secundário de plantas e fungos tem mostrado capacidade em proteger os lipídios da oxidação. Dentre as diversas substâncias testadas destacamos o magnolol, astaxantina, isoquercetina e resveratrol, que mostraram reduzir os níveis de peroxidação lipídica em 41,5%, 46,7%, 21,8% e 57,7%, respectivamente (DANI et al., 2008; SILVA, et al., 2009; SUDHARSHAN et al., 2018; SUBRAMANIYAN et al., 2019) Esses resultados mostram que, embora substâncias naturais tenham capacidade antioxidantes, tais substâncias não são capazes, muitas vezes de restaurar os níveis basais de oxidação de lipídios após o estresse severo.

A ativação de enzimas antioxidantes é um importante mecanismo para a aquisição de resistência do estresse oxidativo. É conhecido que as enzimas antioxidantes, em *S. cerevisiae*, têm sua síntese aumentada em resposta ao aumento dos níveis das EROs (XAVIER, 2018). Essa indução da expressão de RNAm e síntese das enzimas/proteínas antioxidantes é controlada por proteínas que recebem a denominação de fatores de transcrição (PITA, 2014). Dentre os fatores de transcrição envolvidos na resposta de *S. cerevisiae* a condições de estresse, o fator de transcrição Yap1 é o principal sensor e

transdutor de sinais que regulam a expressão genica em resposta ao estresse oxidativo (XAVIER, 2018). Nesse contexto, buscamos determinar a atividade das enzimas catalase e sod, responsáveis pela eliminação do peróxido de hidrogênio e do radical superóxido, respectivamente. Cabe ressaltar que em um estudo anterior, o complexo MnH₂ apresentou *in vitro* atividade mimética às enzimas catalase e sod *in vitro* (COSTA et al., 2018). Nossos estudos demonstram que, como não houve o aumento da atividade de catalase e sod após o tratamento com os complexos e estresse causado por H₂O₂ (1 mM), eles poderiam estar realizando atividade similar a catalase e sod, não sendo, assim, necessário a expressão e ativação dessas enzimas para proteger as células, devido a presença dos compostos, também podemos observar que as células após apenas o tratamento com compostos apresentaram níveis similares ao controle para atividade da catalase, o que indica que apenas o tratamento não foi capaz de gerar estresse para necessitar da ativação dessa enzima.

Em muitos estudos foi relatado que as HSPs desempenham papéis cruciais no estresse oxidativo devido aos seus efeitos moduladores em cascatas de inflamação que controlam a geração de ROS e apoptose, possivelmente por meio de suas atividades de acompanhamento de proteínas mal dobradas de redobramento, ou via inibição de citocinas pró-inflamatórias em condições patológicas (HAUET-BROERE et al., 2006). Sob condições estressantes é sugerido que HSPs desempenham um papel importante ligando-se aos lipídios de membranas, mantendo assim a estabilidade da membrana lipídica, bem como prevenindo deficiências funcionais da membrana lipídica. A alteração da funcionalidade da membrana tem sido associada ao câncer, a doenças neurodegenerativas e diabetes, sugerindo um possível papel das HSPs como alvos terapêuticos no manejo dessas doenças (IKWEGBUE et al., 2017). Nesse trabalho, a expressão de Hsp104 foi detectada pelo aumento de fluorescência das células em relação a condição controle. Com relação a ativação da Hsp104, só foi possível perceber a formação de *puncta (foci)* referentes a proteína Hsp104-GFP tentando desagregar aglomerados proteicos em células tratadas a 40°C. As proteínas de choque térmico possuem a síntese mediada pela ativação de Hsf1, e exercem

um papel essencial na manutenção de estruturas proteicas, reparando lesões estruturais, mantendo a atividade das proteínas, e evitando também a formação de agregados proteicos (MORANO et al., 2012).

Sabe-se que altos níveis das EROs aumentam o acúmulo de danos oxidativos, e que estes danos estão fortemente associados com o envelhecimento e com doenças relacionadas à idade em humanos, tais como doenças neurodegenerativas e câncer (UTTARA et al. 2009). Portanto, tem havido um interesse crescente em moléculas antioxidantes que sejam capazes de atenuar o efeito do estresse oxidativo, e consequentemente retardar o envelhecimento, que por sua vez pode levar a doenças relacionadas. Neste contexto, a levedura *S. cerevisiae* tem sido muito usada como um modelo eucariótico para estudar o envelhecimento (RODRIGUES et al. 2007). Algumas das substâncias naturais antioxidantes (ex. resveratrol, quercetina, hesperidina e astaxantina), inclusive, já citadas nesse trabalho, foram testadas em *S. cerevisiae* e mostraram proteção a *S. cerevisiae*, cepas selvagens e mutantes com deficiência em genes que codificam fatores antioxidantes, aumentando a longevidade das células submetidas ao envelhecimento cronológico (RODRIGUES et al. 2007; SALVADOR et al. 2008; QI et al. 2012; SJ et al. 2019). Em nosso estudo, observamos que células tratadas com cada um dos complexos foram capazes de prolongar a longevidade celular.

Foi testada também a sobrevivência de células BY4741 após o envelhecimento cronológico durante 18 dias e com o tratamento com magnolol, realizado coletas de amostra para plaqueamento a cada 3 dias, eles observaram um aumento na sobrevivência após o tratamento (SUBRAMANIYAN et al., 2019), o mesmo ocorreu com a astaxantina que após testada a sobrevivência após o envelhecimento cronológico durante 21 dias, com cepas deficientes em enzimas antioxidantes e tratadas eles observaram um aumento na sobrevivência de todas as cepas após o tratamento (SUDHARSHAN et al., 2018).

A análise da absorção de metais por ICP-MS é um excelente fator para tentar entender mecanismos de resposta ao estresse ativados pelo tratamento com os complexos. Com as análises realizadas podemos observar o aumento na concentração dos metais Fe, Cu e Mn, quando as células foram tratadas

com 25 μM dos complexos FeH_2 , CuH_2 e MnH_2 , respectivamente, em relação com as células tratadas com 6,25 μM .

O cobre é um dos metais de transição essenciais mais importantes, pois uma variedade de enzimas requer cobre como cofator para as reações de transferência de elétrons (DE FREITAS et al. 2003). No entanto, quando em excesso, o cobre pode ser muito tóxico, principalmente, na forma livre por causa de sua capacidade de produzir EROs ao se alternar entre o estado iônico Cu^{2+} oxidado e o Cu^{1+} reduzido (RUTA et al., 2016). A absorção, o armazenamento e o tráfego de cobre em *S. cerevisiae* já foram extensivamente estudados e revisados (NEVITT et al. 2012), e mostram que em condições de alta concentração, o Cu^{2+} é transportado pelos transportadores de membrana plasmática de baixa afinidade Fet4 (HASSETT et al. 2000) e Smf1 (COHEN et al. 2000), que também podem transportar Mn^{2+} , Fe^{2+} e Zn^{2+} para atender a demanda celular por esses cátions. Além disso, Pho84, um transportador de fosfato inorgânico de alta afinidade, também atua como um transportador de baixa afinidade para cátions divalentes, incluindo Cu^{2+} (JENSEN et al. 2003). Os íons Cu^{2+} também são transportados pelo sistema de absorção de ferro de alta afinidade Fet3 / Ftr1 da superfície celular, que também atuam como um transportador Cu^{1+} oxidase (Fet3) e Cu^{2+} (Ftr1), sendo induzido por alto teor de cobre (Labbé et al. 1999; Gross et al. 2000; RUTA et al., 2016).

Em todos os tratamentos realizados com os três complexos na concentração de 100 μM podemos observar um aumento significativo de cobre em relação a células que não foram tratadas com os complexos, coincidentemente essa concentração de tratamento para o estresse provocado por H_2O_2 (1 mM) não apresentou proteção superior àquela conferida pelo tratamento com 50 μM .

Foi relatado que os níveis extracelulares de Mn^{2+} que são considerados moderadamente tóxicos (8 mM) induzem a apoptose; e níveis extracelulares de Mn^{2+} superiores a 12 mM induzem necrose (SAITO et al., 2016). Com relação ao tratamentos realizados com os três complexos na concentração de 25 μM podemos observar um aumento significativo de manganês em relação a células que não foram tratadas com os complexos.

Um dos modelos de experimentação animal mais comumente usados é o modelo murinho, no entanto, existem obstáculos éticos, orçamentais e logísticos associados ao uso de roedores como modelos para fins de experimentação. Em primeiro lugar, manter um número suficiente de animais necessários para obter dados estatisticamente relevantes é caro e muitas vezes considerado eticamente questionável. Em segundo lugar, mamíferos têm longos tempos de reprodução, que retardam o progresso da experimentação (TSAI et al., 2016).

Portanto, a seleção de modelos alternativos é fundamental para a ciência, e algumas alternativas para o uso de roedores já foram propostas, muitos, inclusive, com grande sucesso; o nematóide *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) foi o primeiro modelo de invertebrado, seguido pela mosca das frutas, *Drosophila melanogaster* (*D. melanogaster*), e, mais recentemente, as larvas de *Galleria mellonella* (*G. mellonella*). Este último organismo tem sido o modelo de escolha de muitos pesquisadores e, por isso, atualmente tem sido amplamente empregado para o estudo da patogênese bacteriana e fúngica, mecanismos de virulência, resposta imune e para a avaliação do potencial de compostos antimicrobianos. O seu uso oferece ainda vantagens econômicas e éticas em comparação aos modelos mamíferos, e seu curto ciclo de vida útil o torna adequado para estudos de alto rendimento (CUTULI et al., 2019).

Com o objetivo de estabelecer um novo modelo de organismo para o estudo da resposta ao estresse oxidativo, este trabalho também buscou avaliar os efeitos do tratamento com os complexos para proteger *G. mellonella* do estresse causado por H₂O₂ (5 M). Outros autores, tal como Coates et al (2019) demonstraram que os resultados quanto à toxicidade de outras substâncias em *G. mellonella* são semelhantes aos de outros animais, como roedores, o que pode sugerir seu uso em detrimento de outros animais de manejo mais difícil e complexo. Além disso, o estresse oxidativo causado por infecção fúngica, como *Conidiobolus coronatus*, e administração de substâncias tóxicas, como o ácido ocaídoico (COATES et al., 2019; KAZEK et al., 2021) vem sendo testados.

Nesse trabalho foi testada a proteção dos complexos em larvas expostas ao estresse provocado por H₂O₂ (5 M), podemos observar que o tratamento

com os complexos foi capaz de prolongar a sobrevivência das larvas tratadas, bem como de garantir a continuidade do ciclo de vida dos animais, com todas as larvas sobreviventes alcançando o estágio de vida de mariposa. A exposição de *G. mellonella* ao estresse oxidativo provocado por H_2O_2 (5 M) ainda não foi descrito na literatura, bem como o tratamento com complexos para este tipo de estresse.

7 CONCLUSÕES

Em primeiro lugar, mostramos que os complexos FeH_2 , CuH_2 e MnH_2 apresentaram atividade antioxidante *in vitro*, e avançando para a investigação da atividade antioxidante *in vivo*, concluímos que os complexos se mostraram eficazes na proteção de *Saccharomyces cerevisiae* expostas ao estresse oxidativo causado pelo H_2O_2 e pela menadiona. Além disso, as larvas de *Galleria mellonella* tratadas com os complexos também apresentaram maior capacidade de sobreviver ao severo estresse oxidativo causado pelo H_2O_2 . Cabe ressaltar que os complexos não foram tóxicos e não promoveram alterações no ciclo de vida de *G. mellonella*.

Com relação a modulação da resposta ao estresse oxidativo, os complexos foram capazes de reduzir a peroxidação lipídica nas células de levedura, porém não foram capazes de ativar as enzimas catalase e superóxido dismutase, ainda que tenham sido capazes de induzir a expressão da Hsp104, mas sua ativação;

Por fim, o presente estudo mostra que os complexos aumentam a longevidade de *S. cerevisiae* quando submetidas ao envelhecimento cronológico.

REFERENCIAS

- ALMEIDA, A.O.; MENEZES, D.C. **Perfil farmacológico de complexos metálicos: Tema interdisciplinar para aulas de Química Inorgânica**. Monografia. 2010.
- ANDRÉ L. *et al.* Oxidative Stress: Relations between the formation of reactive species and the organism's defense. **Quim Nova**, 29, 113-23. 2006
- ANKENY R.A., LEONELLI S. What's so special about model organisms? **Stud Hist Philos Sci**. 2011 Jun;42(2):313–23. doi:10.1016/j.shpsa.2010.11.039
- ATKINS, P. W.; OVERTON, T.; ROURKE, J.; WELLER, M.; ARMSTRONG, F.; HAGERMAN, M. Shriver & Atkins: inorganic chemistry, 5th ed., **Oxford University Press**, 2010.
- AZARIAS, G. D. S. **Análise proteômica da levedura *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 cultivada em diferentes concentrações de sacarose**. 2015. 102f. Dissertação (Mestrado em biotecnologia) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2015.
- BARBOSA, *et al.* Estresse oxidativo: avaliação de marcadores. **Nutrire: rev. Soc. Bras. Alim**, 33,p. 111-28. 2008.
- BARBOSA, K.B.F.; COSTA, N.M.B.; ALFENAS, R.C.G.; DE PAULA, S.O.; MINIM, V.P.R.; BRESSAN, J. Estresse Oxidativo: conceitos, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, Campinas. 23 (4): 629-643. 2010
- BARONDEAU D. P., KASSMANN C. J., BRUNS C. K., TAINER J. A., GETZOFF E. D.; Nickel Superoxide Dismutase Structure and Mechanism, **Biochemistry**, v. 43, p. 8038-8047, 2004.
- BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas de oxigênio e defesa do organismo. **Química Nova**. 29 (1): 113-123. 2006
- BERALDO, H. **Contribuições da Química Inorgânica para a Química Medicinal**. QNEsc. V.6, p.4 – 6. 2005.
- BERGAMINI, C.M.; GAMBETTI, S.; DONDI, A. *et al.* Oxygen, reactive oxygen species and tissue damage. **Current Pharmaceutical Design**. 10 (14): 1611-1626, 2004.
- BRENNAN M, THOMAS DY, WHITEWAY M, KAVANAGH K. Correlation between virulence of *Candida albicans* mutants in mice and *Galleria mellonella* larvae. **FEMS Immunol Med Microbiol**. 2002 Oct 11;34(2):153-7.

BULET, P, HETRU, C, DIMARCQ, JL, HOFFMANN, D. Antimicrobial peptides in insects; structure and function. **Dev Comp Immunol**. Jun-Jul;23(4-5):329-44. 1999.

COSTA, V.; MORADAS-FERREIRA, P. Oxidative stress and signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*: Insights into ageing, apoptosis and diseases. **Molecular Aspects of Medicine**, v.22, pp. 217-246, ago. 2001.

CRISTIANA, F.; NINA, Z.; ELE, A. Homocysteine in Red Blood Cells Metabolism - Pharmacological Approaches. In: **Blood Cell - An Overview of Studies in Hematology**. [s.l.] InTech, 2012. p. 32–68.

CYTRYNSKA, M, MAK, P, ZDYBICKA-BARABAS, A, SUDER, P, JAKUBOWICZ, T. Purification and characterization of eight peptides from *Galleria mellonella* immune hemolymph. **Peptides**. Mar;28(3):533-46. 2007. damage. **Clinical Chemistry**. 1995; 41(12):1819 -1828.

DARENSBOURG, D. J. ; HORN, Jr. A.; MONCADA, A. I. A facile catalytic synthesis of trimethylene carbonate from trimethylene oxide and carbon dioxide. **Green Chemistry**, v. 12, p. 1376-1379, 2010.

DAY, B. J. Catalase and glutathione peroxidase mimics. **Biochemical Pharmacology**, v. 77, n. 3, p. 285–296, 2009.

DEMASI, A. P. D.; PERREIRA, G. A. G.; NETTO, L. E. S. Influences of cytosolic thioredoxin peroxidase I and of the mitochondrial functional state. **FEBS Journal**, v. 273, p. 805-816, 2006.

DROGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiol Rev**, v.82, n. 1, p. 47-95, Jan 2002.

ELLIS J.D., GRAHAM J.R., MORTENSEN A. Standard methods for wax moth research. **Journal of Apicult Res**. 2013 Nov;52(1):1-17.

FARIAS, R. F.; FERREIRA, R.; FARIA, P.; GALHIANE, M. S.; LEITE, F.; PASQUINI, C.; CHAGAS, A. P. **Química de Coordenação**: fundamentos e atualidades. 2ª Ed., São Paulo: Editora Átomo, 2009.

FELDMANN, H. (Ed.). **Yeast: molecular and cell biology**. (2. ed) John Wiley & Sons, v.1, 2012.

FERNANDES, P. M. B et al. **Levedura: do pão à biotecnologia**. Vitória, ES: Edufes, 2009.

FLOREA, A. M.; BÜSSELBERG, D.; Cisplatin as an Anti-Tumor Drug: Cellular Mechanisms of Activity, Drug Resistance and Induced Side Effects. **Cancers**, v. 3, p. 1351-1371, 2011.

FRIEDBERG, E. C., MCDANIEL, L. D., SCHULTZ, R. A. The role of endogenous and exogenous DNA damage and mutagenesis. **Curr. Opin. Genet. Dev.** 14: 5 -10, 2004.

FUCHS BB, EBY J, NOBILE CJ, EL KHOURY JB, MITCHELL AP, MYLONAKIS E. Role of filamentation in *Galleria mellonella* killing by *Candida albicans*. **Microbes Infect.** 2010 Jun;12(6):488-96.

GASPARRI, S. **Estudo das atividades antioxidante emutagênica/antimutagênica induzidas pelo extrato vegetal da *Costus spicatus***. 2005. 79f. Dissertação (Mestrado em Diagnóstico Genético e Molecular) – Universidade Luterana do Brasil, Canoas, 2005.

GROTTO, D.; VALENTINI, J.; FILLION, M.; PASSOS, C.J.S.; GARCIA, S.C.; MERGLER, D.; BARBOSA Jr., F. Mercury exposure and oxidative stress in communities of brazilian Amazon. **Science of the Total Environmental.** 408: 806-811. 2009

GUTTERIDGE JMC. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. HALLIWELL B, GUTTERIDGE JMC. Free radical in biology and medicine. 3rd ed. **Oxford: University Press**, 1999.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Free Radicals in Biology and Medicine. 4th ed., Clarendon Press, Oxford, England, 2006.

HERMES-LIMA, M. Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. In: STOREY, K. B. (Ed.). **Functional Metabolism: Regulation and Adaptation**. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, 2004. p.319-368.

HERRERO, E.; ROS, J.; BELLÍ, G.; CABISCOL, E. Redox control and oxidative stress in yeast cells. **BBA**, v. 1780, p. 1217-1235, 2007.

HOFFMANN JA. Innate immunity of insects. **Cur. Opinion in Immunol.** 1995 Feb;7(1):4-10.

HORN, A.; FERNANDES, C.; PARRILHA, G. L. ; KANASHIRO, M. M. ; BORGES, F. V. ; DE MELO, E. J.T. ; Schenk, G. ; Terenzi, H.; PICH, C. T. . Highly efficient synthetic iron-dependent nucleases activate both intrinsic and extrinsic apoptotic death pathways in leukemia cancer cells. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 128, p. 38-47, 2013.

HUBER, P.C.; ALMEIDA, W.P.; FÁTIMA, A. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Química Nova.** 31 (5): 1170-1179. 2008

HUGHES, T.; ROBINSON, M. D.; MITSAKAKIS, N.; Johnston, M. (2004). The promise of functional genomics: completing the encyclopedia of a cell. **Cur. Opin. Microbiol.** 7, 546-554.

JOMOVA, K.; VALKO, M. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. **Toxicology**, v. 283, n. 2-3, p. 65–87, 2011.

KITAGAWA, S.; NORO, S. Em Comprehensive Coordination Chemistry II- From The Molecular to Nanoscale: Synthesis, Structure and Properties; McCleverty, J. A.; Thomas J. M., eds.; **Elsevier Pergamon: United Kingdom**, 2003, chap. 7.15.

LAVINE M.D., STRAND M.R. Insect hemocytes and their role in immunity. **Insect Biochem Mol Biol**. Oct;32(10):1295-309. 2002.

LIONAKIS MS. *Drosophila* and *Galleria* insect model hosts: new tools for the study of fungal virulence, pharmacology and immunology. **Virulence**. Nov-Dec;2(6):521-7. doi: 10.4161/viru.2.6.18520. 2011.

MARIUTTI, L. R. B.; NOGUEIRA, G. C.; BRAGAGNOLO, N. Lipid and cholesterol oxidation in chicken meat are inhibited by sage but not by garlic. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 6, 2011.

MCCORD, J.M. The evolution of free radicals and oxidative stress. **The American Journal of Medicine**. 108: 652–659. 2000

MIRIYALA, S. *et al.* Manganese superoxide dismutase, MnSOD and its mimics. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, v. 1822, n. 5, p. 794– 814, 2012.

MORROW, J.D. *et al.* Increase in circulating products of lipid peroxidation (F2-isoprostanes) in smokers. Smoking as a cause of oxidative damage. **N Engl J Med**, 332, pp.1198-203. 1995.

MOWLDS P, COATES C, RENWICK J, KAVANAGH K. Dose-dependent cellular and humoral responses in *Galleria mellonella* larvae following beta-glucan inoculation. **Microbes Infect**. 2010 Feb;12(2):146-53.

MURPHY, M. P. How mitochondria produce reactive oxygen species. **Biochem. J.**, v.417, p.1–13, 2009.

MYLONAKIS E. *Galleria mellonella* and the study of fungal pathogenesis: making the case for another genetically tractable model host. **Mycopathologia**. 2008 Jan;165(1):1-3.

NEVOIGT, E. Progress in Metabolic Engineering of *Saccharomyces cerevisiae*, **Microbiol. Molec. Biol. Rev.**, v. 72, n. 3, p. 379–412, 2008.

PALANIMUTHU, D.; SHINDE, S. V.; SOMASUNDARAM, K.; SAMUELSON, A. G. In Vitro and in Vivo Anticancer Activity of Copper Bis(thiosemicarbazone) Complexes. **Journal of Medicinal Chemistry**. V. 56, p. 722-734, 2013.

PARSONS HA. Telomeros, telomerase e câncer. **Rev. Fac. Cienc. Med.** Sorocaba. 2003;5 (1):54-9.

PEREIRA, M. D. *et al.* Targets of oxidative stress in yeast sod mutants. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1620, n. 1-3, p. 245–251, 2003.

PORTELA, R. ; TESSINARI, R.F. ; SUÁREZ, S. ; RASMUSSEM, S.B. ; HERNÁNDEZ-ALONSO, M.D. ; CANELA, M.C. ; Ávila, P.; SÁNCHEZ, B. Photocatalysis for Continuous Air Purification in Wastewater Treatment Plants: From Lab to Reality. **Environmental Science & Technology**, v. 46, p. 5040-5048, 2012.

RAMARAO N, NIELSEN-LEROUX C, LERECLUS D. The insect *Galleria mellonella* as a powerful infection model to investigate bacterial pathogenesis. **J Vis Exp**. Dec 11;(70):e4392. doi: 10.3791/4392. 2012.

RAUEN, U. *et al.* Protection against iron- and hydrogen peroxide-dependent cell injuries by a novel synthetic iron catalase mimic and its precursor, the iron-free ligand. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 37, n. 9, p. 1369–1383, 2004.

REEVES EP, MESSINA CG, DOYLE S, KAVANAGH K. Correlation between gliotoxin production and virulence of *Aspergillus fumigatus* in *Galleria mellonella*. **Mycopathologia**. 2004 Jul;158(1):73-9.

RENWICK, J., DALY, P., REEVES, E.P., KAVANAGH, K. Susceptibility of larvae of *Galleria mellonella* to infection by *Aspergillus fumigatus* is dependent upon stage of conidial germination. **Mycopathologia**. Jun;161(6):377-84. 2006

RIBEIRO, SMR.; QUEIROZ, JH.; PELÚZO, MCG.; COSTA, NMB.; MATTA, SLP.; QUEIROZ, MELR. A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. **Bioscience Journal**. 21 (3): 133-149. 2005

RIBEIRO, T. P. *et al.* Iron, copper, and manganese complexes with in vitro superoxide dismutase and/or catalase activities that keep *Saccharomyces cerevisiae* cells alive under severe oxidative stress. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 80, p. 67–76, 2015.

RIBEIRO, T.P.; FONSECA, F.L.; CARVALHO M.D.C.; GODINHO, R.M. DA C.; ALMEIDA F.P.; SAINT'PIERRE, T.D., REY, N.A.; FERNANDES, C.7; HORN, JR. A.; PEREIRA, M.D. Metal-based superoxide dismutase and catalase mimics reduce oxidative stress biomarkers and extend life span of *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochemical Journal**, p. 301-315, 2017.

RICHARD J, B. Effect Of Exercise On Oxidative Stress Biomarkers. In: GREGORY, S. M. (Ed.). **Advances in Clinical Chemistry**: Elsevier, v. Volume 46, 2008. p.1-50.

RUSSO J, BREHELIN M, CARTON Y. Haemocyte changes in resistant and susceptible strains of *D. melanogaster* caused by virulent and avirulent strains

of the parasitic wasp *Leptopilina boulardi*. **J Insect Physiol.** Feb 1;47(2):167- 72. 2001.

SANJAY, M. K. et al. Copper, Zinc-Superoxide Dismutase from Clinically Isolated *Escherichia coli*: Cloning, Analysis of *sodC* and Its Possible Role in Pathogenicity. **Indian journal of microbiology**, v. 51, n. 3, p. 326–31, jul. 2011.

SANTOS, D., FERNANDES A. e PEIXOTO F. **Stress oxidativo em sistemas biológicos. Princípios básicos e mecanismos de defesa.** (Ed.). Stress oxidativo em sistemas biológicos. Princípios básicos e mecanismos de defesa. Vila Real, Serviços gráficos da UTAD, p.8-31.2007.

SANTOS, J. A. F.G. dos. **Exercício físico, radicais livres, espécies reativas de oxigênio, envelhecimento e doenças neurodegenerativas.** Monografia (Especialista em Fisiologia do Exercício). Universidade Federal do Paraná – UFPR. Curitiba –PA. 2013.

SANTOS, S. C.; SÁ-CORREIA, I. Yeast toxicogenomics: Lessons from a eukaryotic cell model and cell factory. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 33, pp.183-191, mar. 2015.

SCOCCIA AE, MOLINUEVO MS, MCCARTHY AD, COORTIZO AMA. simple method to assess the oxidative susceptibility of low density lipoproteins. **BMC Clinical Pathology**.2001; (1): 1 - 5.

SIQUEIRA JUNIOR, E. F. D. **Perfil de expressão protéica de leveduras comerciais do gênero *Saccharomyces* e o papel das proteínas na seleção de espécies com potencial biotecnológico.** 2013. 168f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2013.

SMART, K. Brewing Yeast Oxidative Stress Responses: Impact of Brewery Handling. In: **Brewing Yeast Fermentation Performance.** 2 nd ed. [s.l.] Blackwell Science Ltd., 2008.

SOARES D. G.; ANDREAZZA A. C.; SALVADOR M. Avaliação de compostos com atividade e antioxidante em células da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.41, pp.95-100, mar. 2005.

SOARES, D. G.; ANDREAZZA, A. C.; SALVADOR, M. *Saccharomyces cerevisiae* como modelo biológico para avaliação da capacidade antioxidante de compostos. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 85, pp. 45-47, mar. 2004.

STAMBUK, B. U. A. Simple experiment illustrating metabolic regulation: induction versus repression of yeast α -glucosidase. **Biochem. Educ.** 27, 177- 180. 1999.

STEELS, E.L., LEARMONTH, R.P. & WATSON, K. **Stress tolerance and membrane lipid unsaturation in *Saccharomyces cerevisiae* grown aerobically or anaerobically.** *Microbiology* 140, 569-576. 1994.

STEBBENS, W.E. Oxidative stress in viral hepatitis and AIDS. *Exp Mol Pathol*, 77, pp.121-32. 2004

TARGINO, B. N. **Influência da variedade de cana-de-açúcar e do tipo de fermento na qualidade da cachaça de alambique.** Viçosa, 2009. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa.

THOMPSON, K.H.; ORVIG, C.; Metal complexes in medicinal chemistry: new vistas and challenges in drug design. *Journal of Inorganic Biochemistry*, v. 100, 1925-35, 2006.

VALKO, M.; RHODES, C.J.; MONCOL, J., IZAKOVIC, M.; MAZURA, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*. 160: 1–40. 2006

VASCONCELOS, S. *et al.* Reactive oxygen and nitrogen species, antioxidants and markers of oxidative damage in human blood: main analytical methods for their determination. *Quim. Nova*, 30, pp.1323-38. 2006.

VASCONCELOS, SML.; GOULART, MOF.; MOURA, JBF.; MANFREDINI, V.; BENFATO, MS.; KUBOTA, LT. 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 (5): 1323-1338. 2007

XIANG, L. *et al.* Anti-aging effects of phloridzin, an apple polyphenol, on yeast via the SOD and Sir2 genes. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, v. 75, n. 5, p. 854–858, 2011.

ZANUTO R. *et al.* Metabolismo celular. *In*: Loyelo T. (Ed). **Biologia e Bioquímica bases aplicadas às Ciências da Saúde.** Brasil, Phorte editora, pp. 209-10. 2011

ZHANG, F-Q.; WANG, Y-S.; LOU, Z-P.; DONG, J-D. Effect of heavy metal stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of two mangrove plant seedlings (*Kandelia candel* and *Bruguiera gymnorrhiza*). *Chemosphere*. 67: 44–50, 2007.