

Universidade Federal de Ouro Preto  
Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas  
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

**Associação de métodos espectrofotométricos e eletroanalítico para avaliação do potencial antioxidante de isobenzofuran-1(3H)-onas sobre culturas primárias de neurônios hipocampais**

Aniely dos Reis Teixeira

OURO PRETO  
2020

Aniely dos Reis Teixeira

**Associação de métodos espectrofotométricos e eletroanalítico para avaliação do potencial antioxidante de isobenzofuran-1(3H)-onas sobre culturas primárias de neurônios hipocâmpais.**

Dissertação de Mestrado apresentada  
Programa de Pós-graduação em  
Biotecnologia da Universidade Federal de  
Ouro Preto como requisito parcial para  
obtenção do Título de Mestre em  
Biotecnologia.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Katiane de Oliveira  
Pinto Coelho Nogueira  
Co-orientador: Prof. Dr. Laser Antônio  
Machado Oliveira

OURO PRETO  
2020

## SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

T266a Teixeira, Aniely dos Reis.

Associação de métodos espectrofotométricos e eletroanalítico para avaliação do potencial antioxidante de isobenzofuran-1(3H)-onas sobre culturas primárias de neurônios hipocâmpais. [manuscrito] / Aniely dos Reis Teixeira. - 2020.

67 f.: il.: color., gráf..

Orientadora: Profa. Dra. Katiane de Oliveira Pinto Coelho Nogueira.

Coorientador: Prof. Dr. Laser Antônio Machado Oliveira.

Dissertação (Mestrado Acadêmico). Universidade Federal de Ouro Preto. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas. Programa de Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia Aplicada à Saúde Humana e Animal.

1. Stress oxidativo. 2. Antioxidantes. 3. Oxidação. 4. Voltametria. I. Nogueira, Katiane de Oliveira Pinto Coelho. II. Oliveira, Laser Antônio Machado. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU 606:61



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
BIOTECNOLOGIA**



**ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO**

Aos 20 dias do mês de fevereiro do ano de 2020, às 13:30 horas, nas dependências Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas (Nupeb), foi instalada a sessão pública para a defesa de dissertação da mestranda Aniely dos Reis Teixeira, sendo a banca examinadora composta pela Profa. Dra. Katiane de Oliveira Pinto Coelho Nogueira (Presidente - UFOP), pelo Prof. Dr. Orlando David Henrique dos Santos (Membro - UFOP), pela Profa. Dra. Sirlene Souza Rodrigues Sartori (Membro - Externo). Dando início aos trabalhos, a presidente, com base no regulamento do curso e nas normas que regem as sessões de defesa de dissertação, concedeu à mestranda 40 minutos para apresentação do seu trabalho intitulado "Associação de Métodos Espectrofotométricos e Eletroanalítico para Avaliação do Potencial Antioxidante de Isobenzofuran-1(3h)-Onas Sobre Culturas Primárias de Neurônios Hipocampais", na área de concentração: Biotecnologia Aplicada à Saúde Humana e Animal. Terminada a exposição, a presidente da banca examinadora concedeu, a cada membro, um tempo para perguntas e respostas à candidata sobre o conteúdo da dissertação, na seguinte ordem: Primeiro Profa. Dra. Sirlene Souza Rodrigues Sartori; segundo Prof. Dr. Orlando David Henrique dos Santos; terceiro Profa. Dra. Katiane de Oliveira Pinto Coelho Nogueira. Dando continuidade, ainda de acordo com as normas que regem a sessão, a presidente solicitou aos presentes que se retirassem do recinto para que a banca examinadora procedesse à análise e decisão, anunciando, a seguir, publicamente, que a mestranda foi aprovada, sob a condição de que a versão definitiva da dissertação deva incorporar todas as exigências da banca, devendo o exemplar final ser entregue no prazo máximo de 60 (sessenta) dias à Coordenação do Programa. Para constar, foi lavrada a presente ata que, após aprovada, vai assinada pelos membros da banca examinadora e pela mestranda. Ouro Preto, 20 de fevereiro de 2020.

Profa. Dra. Katiane de Oliveira Pinto Coelho Nogueira

Presidente

Prof. Dr. Orlando David Henrique dos Santos

Profa. Dra. Sirlene Souza Rodrigues Sartori

Mestranda

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Ele todos os dias, o principal responsável por minhas conquistas e por ter me permitido chegar até aqui. Obrigada a Deus por estar sempre me guiando pelos melhores caminhos.

À minha orientadora Dr<sup>a</sup>. Katiane Nogueira pela paciência e pela melhor orientação que eu poderia receber garantindo a qualidade deste trabalho.

À minha família querida, meus pais em especial, por todo apoio e incentivo, por não me deixar desistir de iniciar a pós-graduação e me dando todo suporte emocional para terminar. Aos meus irmãos, Ariany e Alipío, meus melhores presentes de Deus, por estarem ao meu lado, sempre fazendo lembrar da minha capacidade e nunca me deixar desistir dos meus objetivos. Eu amo muito vocês!

Ao laboratório de Biomateriais e Patologia Experimental, à doutoranda Iara, às alunas de iniciação científica pela ajuda e pelo envolvimento no desenvolvimento deste projeto, vocês foram essenciais!

Ao meu co-orientador Dr. Laser Antônio por contribuir e sempre me apoiar na execução deste projeto.

Ao Dr. Robson Teixeira, que além de sintetizar os compostos testados, contribuiu de forma significativa para compreensão dos resultados.

À Dr<sup>a</sup>. Taíse Matte Manhabosco pela contribuição na voltametria cíclica, permitindo a aprendizagem da técnica, e obtenção de resultados seguros e precisos.

Aos laboratórios da UFOP, Laboratório de Biologia e Tecnologia de micro-organismos e o Laboratório de Eletroquímica e Difusão, por disponibilizar os equipamentos para a realização dos ensaios.

Aos meus amigos, em especial a Bárbara, por escutarem e tolerarem os meus maiores desabafos, minhas lamentações e raivas quando algo não saía como o previsto. Vocês deixaram meus dias mais leves!

Às funcionárias terceirizadas, principalmente à Maria, pelos seus mais sinceros e fraternos “Bom dias” tirando toda a tensão de um longo dia de trabalho pela frente.

À CAPES pela disponibilização das bolsas que permitiram minha dedicação exclusiva e meu maior empenho neste trabalho.

À FAPEMIG pelo financiamento.

E a todos que mesmo não citados aqui, participaram de alguma forma da execução deste trabalho, nada disso seria possível se não tivesse vocês por perto, meu sincero obrigada!

## RESUMO

O sistema nervoso central, principal sistema de regulação das atividades fisiológicas, pode ser fortemente acometido por processos patológicos gerados pelo desequilíbrio redox que culminam no desenvolvimento de doenças neurodegenerativas. Dentre essas, a mais prevalente, a doença de Alzheimer, acomete um grande número de pessoas impactando fortemente nos recursos públicos destinados à saúde. O desequilíbrio redox gera acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs), que interferem diretamente na viabilidade das células nervosas. Estudos do nosso grupo de pesquisa mostraram que uma classe de compostos conhecidos como isobenzofuran-1-(3H)-onas (F12) apresentam ação antioxidante capaz de reduzir os danos ocasionados pelo desequilíbrio redox induzido. Neste trabalho avaliamos o efeito antioxidante de isobenzofuran-1-(3H)-onas sintéticas estruturalmente semelhantes (F15 e F16) sobre culturas primárias de neurônios do hipocampo obtidos de embriões E17 de camundongos C57BL/6, assim como seus potenciais de oxidação através da voltametria cíclica (VC). Para isto as culturas foram pré-tratadas com diferentes concentrações de isobenzofuran-1-(3H)-onas e submetidas ao desequilíbrio redox utilizando o peróxido de hidrogênio. Após a indução foram realizados ensaios de viabilidade celular, mensuração de EROs e peroxidação lipídica das membranas para avaliar a ação dos compostos sobre a cultura primária de neurônios hipocampais. De forma a complementar e confirmar os ensaios espectrofotométricos foi realizada a VC, método eletroanalítico para determinação do potencial de oxidação ( $E_o$ ) e conseqüentemente a capacidade antioxidante. O composto F15 foi capaz de reduzir as EROs e os danos causados aos lipídeos da membrana. Os resultados dos ensaios espectrofotométricos foram corroborados pela VC que permitiram caracterizar o composto F15 como potencial antioxidante. Assim, outros estudos devem ser realizados para melhor caracterizar a ação antioxidante desses compostos e torná-los possíveis candidatos a fármacos para uso na terapia de doenças neurodegenerativas.

**Palavras-chaves:** Desequilíbrio redox; isobenzofuran-1(3H)-onas; culturas primárias; antioxidante; potencial de oxidação; voltametria cíclica.

## ABSTRACT

The central nervous system, the main system for regulating physiological activities, can be strongly affected by pathological processes generated by redox imbalance that culminates in neurodegenerative diseases development. Among these, the Alzheimer's disease is the most prevalent, affecting a large number of people and strongly impacting on public health resources. The redox imbalance leads to reactive oxygen species (ROS) accumulation, which directly interferes in the viability of nerve cells. Previous studies from our research group revealed a class of chemical compounds known as isobenzofuran-1-(3H)-ones (F12) with antioxidant action, capable of reducing the damage caused by induced redox imbalance. In this work, we evaluated the antioxidant effect of structurally similar synthetic isobenzofuran-1-(3H)-ones (F15 and F16) on primary cultures of hippocampal neurons from E17 embryos of C57BL/6 mice, as well as their oxidation potentials through cyclic voltammetry (CV). For this, the cultures were pre-treated with different concentrations of isobenzofuran-1-(3H)-ones and subjected to redox imbalance using hydrogen peroxide. After induction, assays for cell viability, ROS measurements and membrane lipid peroxidation were performed to evaluate the action of the compounds on the primary cultured hippocampal neurons. In order to complement and confirm the spectrophotometric tests, the CV was performed, which is an electroanalytical method to determine the oxidation potential ( $E_o$ ) and consequently the antioxidant capacity. Compound F15 was able to reduce ROS and damage to membrane lipids. The results of the spectrophotometric tests were corroborated by the CV, which allowed characterizing the compound F15 as a potential antioxidant. Thus, future studies should be carried out to better characterize the antioxidant action of the compounds and make them possible drug candidates for use in neurodegenerative diseases therapy.

**Keywords:** Redox imbalance; isobenzofuran-1-(3H)-ones; primary cultures; antioxidant; oxidation potential; cyclic voltammetry.



## LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA – Análise de Variância

AACE –  $\alpha$ -Secretase

*ASAP-1* – Gene ArfGAP com domínios SH3 domain, repetições de anaquirina e domínio PH 1

BACE –  $\beta$ -Secretase

BODIPY – Boro-dipirrometeno

$\beta$ A – Beta Amilóide

CAT – Catalase

CCA – Centro de Ciência Animal

CEUA – Comissão de Ética para o Uso de Animais

$\text{CO}_3^{\bullet -}$  - Radical de carbonato

DA – Doença de Alzheimer

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

DNase – Desoxirribonuclease

$E_o$  – Potencial de oxidação

ERs – Espécies Reativas

EROs – Espécies reativas de oxigênio

ERNs – Espécies reativas de nitrogênio

GACE –  $\gamma$ -Secretase

GABA – Ácido gama-aminobutírico

GPX – Glutationa peroxidase

GPXO – Glutationa peroxidase oxidada

GPXR – Glutationa peroxidase reduzida

GSR – Glutationa redutase

GSSG – Dissulfeto de glutaciona

GSH – Glutationa reduzida

$\text{H}_2\text{DCFDA}$  – Diacetato de 2,7-diclorofluoresceína

$\text{H}_2\text{O}_2$  – Peróxido de hidrogênio

HOCl – Ácido hipocloroso

HOMO – Orbital Molecular Mais Alto Ocupado

ITO – Indium Tin Oxide

IUPAC – União Internacional de Química Pura e Aplicada  
LUMO – Orbital Molecular Mais Baixo Desocupado  
MEM – Meio mínimo essencial para cultivo  
MTT – Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio  
NO<sup>•</sup> - Radical óxido nítrico  
NO<sub>2</sub><sup>•</sup> - Radical dióxido de nitrogênio  
NADH – Nicotinamida adenina dinucleótido  
NADPH – Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato  
NMDA - N-metil-D-aspartato  
O<sub>2</sub><sup>•</sup> - Radical superóxido  
OH<sup>•</sup> - Radical hidroxila  
OMS – Organização Mundial da Saúde  
ONOO<sup>-</sup> - Peroxinitrito  
ONOOH - Ácido peroxinitrito  
PPA – Proteína precursora amilóide  
*PRKCD* – Gene da proteína quinase tipo C delta  
PSEN – Proteína presenilina  
RO<sup>•</sup> - Radical alcóxil  
ROO<sup>•</sup> - Radical alquil peróxil  
SEM – Erro padrão da média  
SOD – Superóxido dismutase  
UFOP – Universidade Federal de Ouro Preto  
VASP – Gene da fosfoproteína estimulada por vasodilatador  
VC – Voltametria cíclica

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Alterações macroscópicas e microscópicas no cérebro de um paciente com DA devido ao acúmulo do peptídeo  $\beta$ A e emaranhados neurofibrilares de proteína tau. ....15**
- Figura 2. Formação da placa  $\beta$ A a partir da proteína precursora amiloide (PPA). ....16**
- Figura 3. Transmissão sináptica e a formação da placa  $\beta$ A extracelular. ....17**
- Figura 4. Formação das ERs e sua eliminação pelo sistema antioxidante enzimático. ....23**
- Figure 5. Exemplo de isobenzofuranonas e suas atividades biológicas. ....25**
- Figura 6. Isobenzofuran-1(3H)-onas sintéticas denominadas de F15 e F16. ....26**
- Figura 7. Imagens com contraste evidenciando características fenotípicas de um neurônio piramidal durante a fase de desenvolvimento nos primeiros 4 dias de cultura. ....27**
- Figura 8. Fases de desenvolvimento de nerônios hipocampais em uma cultura celular. ....28**
- Figura 9. Cultura primária de neurônios hipocampais a partir do isolamento do cérebro de embrião com 17 dias de desenvolvimento (E17). ....34**
- Figura 10. Reação de formação do cristal de formazan a partir do MTT. ....35**
- Figura 11. Mecanismo de ação do diacetato de 2, 7-diclorodihidrofluorosceína (H<sub>2</sub>DCF-DA). ....37**
- Figura 12. Esquema do funcionamento de um sistema de pilha eletroquímica. ....40**

<b>Figura 13. Célula eletroquímica contendo o eletrodo de trabalho e contra-eletrodo de platina. ....</b>	<b>40</b>
<b>Figura 14. Potenciostato/Galvanostato modelo PGSTAT 128N da marca Metrohm-Autolab, utilizado para leitura da voltametria cíclica. ....</b>	<b>41</b>
<b>Figura 15. Avaliação da viabilidade celular em neurônios do hipocampo. ....</b>	<b>42</b>
<b>Figura 16. Viabilidade celular em neurônios hipocampais submetidos ao desequilíbrio redox. ....</b>	<b>43</b>
<b>Figura 17. Mensuração das EROs. ....</b>	<b>44</b>
<b>Figura 18. Quantificação das EROs após o desequilíbrio redox. ....</b>	<b>45</b>
<b>Figura 19. Peroxidação lipídica das membrana das células hipocampais. ....</b>	<b>46</b>
<b>Figura 20. Peroxidação lipídica das membrana das células hipocampais após indução do desequilíbrio redox. ....</b>	<b>47</b>
<b>Figura 21. Voltamograma cíclico Densidade de corrente (<math>A/cm^2</math>) vs Potencial (E) para o filme do composto F12. ....</b>	<b>48</b>
<b>Figura 22. Voltamograma cíclico densidade de corrente (<math>A/cm^2</math>) vs Potencial (V) para o filme do composto F15. ....</b>	<b>49</b>
<b>Figura 22. Voltamograma cíclico densidade de corrente (<math>A/cm^2</math>) vs Potencial (V) para o filme do composto F16. ....</b>	<b>50</b>
<b>Figura 24. Isobenzofuranonas F12, F15, F16. ....</b>	<b>50</b>
<b>Figura 25. Mecanismo proposto para ação antioxidante dos compostos. ....</b>	<b>51</b>
<b>Figura 26. Segundo mecanismo proposto para ação antioxidante dos compostos. ....</b>	<b>52</b>

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	14
1.1 Doenças Neurodegenerativas .....	14
1.2 Desequilíbrio Redox .....	19
1.3 Defesas Antioxidantes.....	21
1.4 Isobenzofuran-1(3H)-onas .....	24
1.5 Cultura celular.....	26
1.6 Voltametria Cíclica.....	29
2. OBJETIVO .....	32
2.1 Objetivo Geral.....	32
2.2 Objetivos Específicos .....	32
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	33
3.1 Reagentes.....	33
3.2 Cultura Primária de Neurônios Hipocampais.....	33
3.3 Tratamento das células com as isobenzofuranonas .....	35
3.4 Ensaio de Viabilidade celular .....	35
3.5 Mensuração de espécies reativas de oxigênio (EROs).....	36
3.6 Peroxidação Lipídica.....	37
3.7 Voltametria cíclica .....	38
3.7.1 Preparação do substrato .....	38
3.7.2 Verificação da passagem de corrente de elétrica.....	39
3.7.3 Deposição do composto .....	39

3.7.4	Leitura no Potenciostato/Galvanostato .....	39
3.8	Análise Estatística .....	41
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
4.1	Ensaio de Viabilidade Celular .....	42
4.2	Ensaio para Mensuração de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) ..	43
4.3	Ensaio para Avaliação da Peroxidação Lipídica.....	45
4.4	Voltametria Cíclica .....	47
4.5	Relação estrutura e atividade .....	50
4.6	Biodisponibilidade e atividade antioxidante.....	53
4.7	Perspectivas .....	54
5.	CONCLUSÃO .....	56
6.	REFRÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	57

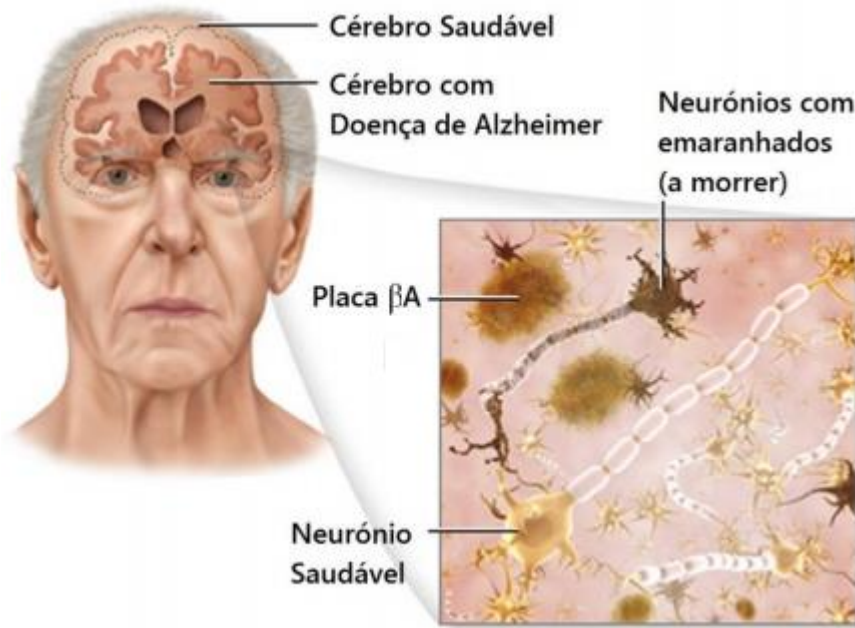
# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Doenças Neurodegenerativas

As doenças neurodegenerativas são um grupo de desordens que afetam o sistema nervoso central caracterizadas pela perda progressiva das células neuronais e das funções cognitivas (APPOLINÁRIO et al., 2011). Atualmente, essas desordens contribuem de forma significativa para aumentar as taxas de morbidade e mortalidade da população. A doença de Alzheimer (DA) e a doença de Parkinson são as mais incidentes, seguidas pelas esclerose lateral amiotrófica e a doença de Huntington (HUANG et al., 2018). Essas patologias são condições incuráveis de rápido progresso, e altamente debilitantes que têm aumentado sua prevalência em todo o mundo tornando-se um grave problema social e econômico (GEMELLI et al., 2013; HUANG et al., 2018). Apesar das inúmeras pesquisas na área, ainda não se conhecem todos os processos, fisiológicos ou não, que levam ao desenvolvimento dessas patologias. Sabe-se que todas essas apresentam semelhanças na patogênese sendo desencadeadas por fatores como o desequilíbrio redox, apoptose anormal, disfunção da autofagia e neuroinflamação (LEAL et al., 2012).

Dentre as principais doenças neurodegenerativas, a doença de Alzheimer é a mais comum, afetando aproximadamente 36 milhões de pessoas no mundo, e a expectativa é que esse número aumente para 115 milhões em 2050 (BOZZALI et al., 2015). Algumas das características da DA são a presença da demência amnésica progressiva com déficits cognitivos graduais, perda de localização espacial, ausência da capacidade de tomada de decisões, agressividade e mudanças comportamentais, impossibilitando atividades diárias e o próprio cuidado (REED, 2011). Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) a DA é a forma mais comum de demência e pode contribuir para 60 a 70% dos casos, sendo uma das principais causas de dependência e incapacidade entre os idosos. A demência é uma doença neurológica comum e esporádica, que tem como fator de risco o envelhecimento, promove perda de memória e de outras funções cognitivas. Ainda de acordo com a OMS, cerca de 50 milhões de pessoas sofrem de algum tipo de demência e há quase 10 milhões de novos casos por ano, em todo o mundo (KUCA et al., 2016). Esse fato se agrava com o envelhecimento da população mundial, estima-se que o número de pessoas acima de 60 anos será quatro vezes maior nos próximos 30 anos aumentando também o número de casos de demência (HUANG et al., 2016; ROTERMUND et al., 2018).

Na DA a progressiva e irreversível neurodegeneração leva à perda dos neurônios hipocampais, resultando na disfunção cognitiva que atinge inicialmente a memória e posteriormente outras funções mentais (TROMPIER et al., 2014). A perda neuronal e consequente perda sináptica são decorrentes do acúmulo intracelular de emaranhados neurofibrilares de proteína tau hiperfosforilada e da deposição anormal do peptídeo  $\beta$ -amiloide ( $\beta$ A) formando as placas senis extracelulares (Figura 1) (ARIMON et al., 2015).

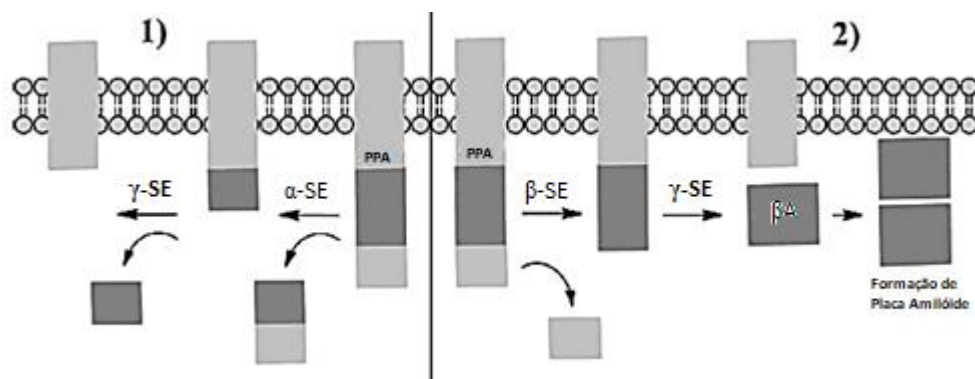


**Figura 1.** Alterações macroscópicas e microscópicas no cérebro de um paciente com DA devido ao acúmulo do peptídeo  $\beta$ A e emaranhados neurofibrilares de proteína tau. (Modificado de: MEDICAL ENCYCLOPEDIA, 2011).

O peptídeo  $\beta$ A é secretado constitutivamente por células de mamíferos e é encontrado no plasma e no líquido cefalorraquidiano em condições normais. Sua produção é decorrente da clivagem da proteína precursora amiloide (PPA), uma proteína transmembrana abundante nas membranas das sinapses, onde está envolvida no desenvolvimento neuronal, na aderência dos neurônios à matriz extracelular, na regulação da plasticidade sináptica, da excitabilidade celular e nas funções da memória (TURNER et al., 2003; KORTE et al., 2012; MATOS, 2013). O processamento da PPA é realizado por pelo menos três diferentes tipos de enzimas específicas, denominadas  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ -secretases. A PPA pode ser clivada pela sequência  $\alpha$ -secretase e  $\gamma$ -secretase ou  $\beta$ -secretase e  $\gamma$ -secretase (Figura 2). A partir da clivagem da PPA peptídeos  $\beta$ A de comprimentos que variam de 39 a 43 aminoácidos podem ser formados. O peptídeo de 42 aminoácidos,  $\beta$ A-42 é extremamente citotóxico e pode formar as placas amiloides e consequentes modificações na plasticidade sináptica e na integridade neuronal (MATOS, 2013). Ainda

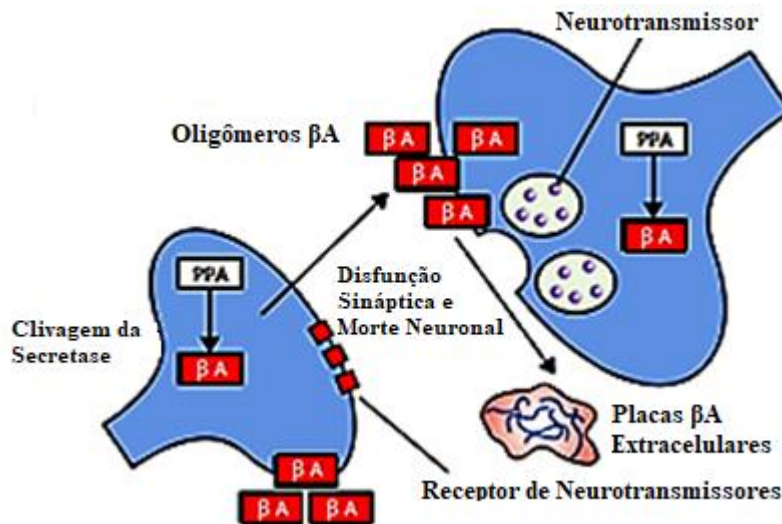


não é bem compreendido o porquê da prevalência do  $\beta$ A-42 sobre os demais peptídeos em pacientes com DA (POHANKA, 2014).



**Figura 2. Formação da placa  $\beta$ A a partir da proteína precursora amiloide (PPA).** Ações das enzimas e  $\alpha$ -secretase ( $\alpha$ -SE),  $\beta$ -secretase ( $\beta$ -SE) e  $\gamma$ -secretase ( $\gamma$ -SE) são representadas (Modificada de: POHANKA, 2014).

Além da formação das placas amiloides (Figura 2), a formação de emaranhados neurofibrilares intracelulares também é um importante marcador da DA. O principal constituinte dos emaranhados é a tau, uma proteína solúvel presente nos axônios que participa do conjunto de proteínas que se associam e estabilizam microtúbulos (BALLARD et al., 2011). Em condições fisiológicas, a afinidade da proteína tau pelos microtúbulos é controlada por sua fosforilação e desfosforilação que reduz ou aumenta, respectivamente, sua ligação aos microtúbulos (REEDY, 2011). Segundo a hipótese da cascata amiloide, a hiperfosforilação da proteína tau e a consequente formação de emaranhados neurofibrilares são resultados do desequilíbrio redox desencadeado por concentrações tóxicas do peptídeo  $\beta$ A (SMALL et al., 2008). Durante a formação de emaranhados neurofibrilares, agregados insolúveis da proteína tau são produzidos interferindo na estrutura e na função dos neurônios (Figura 3) (BALLARD et al., 2011; CARVALHO et al., 2015).



**Figura 3. Transmissão sináptica e a formação da placa  $\beta$ A extracelular.** (Modificado de: BALLARD et al.,2011).

A DA é considerada uma patologia multifatorial na qual somente 5 a 10% dos casos são oriundos de causas genéticas (LUCATELLI et al., 2009). De acordo com Marlatt e Lucassen (2010), três genes contendo mutações associadas a mecanismos moleculares e celulares subjacentes à DA foram identificados. Essas mutações podem ser encontradas em genes que codificam a proteína precursora amiloide (PPA), a proteína presenilina-1 (PSEN1) e a proteína presenilina-2 (PSEN2) e são fundamentais para as formas familiar e esporadicamente adquirida (FRIDMAN et al., 2004). As PSEN1 e PSEN2 são subunidades catalíticas do complexo  $\gamma$ -secretase que realizam proteólise intramembranar (NIXON, 2017). Alterações genéticas nas proteínas PSEN1 reduzem a clivagem da PPA, diminuindo a produção do peptídeo  $\beta$ A, entretanto, promovendo o aumento da proporção de  $\beta$ A-42 para  $\beta$ A-40, fato considerado crítico para a toxicidade de  $\beta$ A na DA (NIXON, 2017; KUMAR et al., 2006).

Atualmente inúmeras pesquisas mostram a diversidade de genes envolvidos na fisiopatologia da DA. Avanços significativos nas tecnologias genômicas permitiram a identificação de moduladores genéticos e sua suscetibilidade a doenças em humanos (DUNN; O'CONNELL; KACZOROWSKI, 2019). Segundo estudos realizados por Park et al. (2019) para análise da expressão gênica envolvida na patologia da DA, foram identificados os genes *ASAP1*, *PRKCD* e *VASP* significativamente expressos na DA, sendo o *PRKCD* diretamente associado a funções cognitivas. Com métodos mais avançados a descoberta de genes envolvidos na fisiopatologia da DA será um campo de

investimento cada vez mais promissor, como o método transcriptoma e outras técnicas computacionais (MORADI et al., 2019).

Apesar do diagnóstico da DA não ser possível de forma conclusiva durante a vida do paciente, alguns testes podem ser realizados de forma multidisciplinar, como testes neuropsicológicos, análises de sangue, do líquido cefalorraquidiano, eletroencefalograma ou técnicas de diagnóstico que poderão excluir outras demências com sinais e sintomas semelhantes (ASHBURNER; FRISTON, 2005). Para diagnóstico pós-morte é necessário a identificação dos marcadores específicos da DA, isto é, os emaranhados neurofibrilares e as placas amiloides extracelulares presentes no encéfalo do paciente (ROTERMUND et al 2018).

Mesmo sendo considerada um problema significativo de saúde pública existem apenas alguns tratamentos médicos aprovados para a DA. Esses envolvem duas classes de medicamentos, os inibidores da acetilcolinesterase (donepezil, a rivastigmina e a galantamina), que melhoram a neurotransmissão da acetilcolina no cérebro, fato considerado essencial para a cognição; e a memantina, um antagonista dos receptores NMDA (N-metil-D-aspartato) de afinidade moderada, não competitivo (ROBINSON; KEATING, 2006; OBOUDIYAT et al., 2013). Ambos os medicamentos atuam apenas no controle dos sintomas, sem alterar o curso do processo neurodegenerativo. Ensaios clínicos com novos medicamentos têm sido realizados na última década, no entanto, sem resultados promissores, já que 99,6% falharam no controle da DA (BRIGGS, 2016). A falta de medicamentos efetivos que atuem diretamente no curso da doença e não apenas nos sintomas reflete os desafios do desenvolvimento de um agente terapêutico com potencial para modificar o curso da DA (SALOMONE et al., 2012). Embora a patogênese dessa e de outras doenças neurodegenerativas não ser completamente entendida, muitos estudos têm se baseado no desequilíbrio redox para fundamentar o desencadeamento das mesmas. O desequilíbrio redox na DA, por exemplo, se manifesta através da presença de proteínas oxidadas, de produtos de glicosilação avançada, da peroxidação lipídica e da formação de espécies reativas tóxicas, como peróxidos, álcoois, aldeídos, carbonilas e cetonas, e de modificações oxidativas no DNA nuclear e mitocondrial (GEMELLI et al., 2013; GELLA et al., 2009).

## 1.2 Desequilíbrio Redox

Em condições fisiológicas, as células se encontram em um estado de homeostase redox, o qual é mantido pelo equilíbrio entre a geração contínua de espécies reativas e vários mecanismos envolvidos na atividade antioxidante (ŁUCZAJ; GĘGOTEK; SKRZYDLEWSKA, 2017). Por meio de processos metabólicos normais, como a respiração, a sinalização celular e transferência de elétrons, são produzidos constantemente radicais livres, que participam da produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas (HALLIWELL, 2006). O termo radical livre pode ser definido como átomo ou molécula que possui na sua última camada eletrônica um número ímpar de elétrons desemparelhados que contribui para sua reatividade (BERG, YODIM, RIEDERER, 2004). A formação desses radicais está diretamente relacionada com o ganho ou perda de elétrons, definidos como processos de redução e oxidação. Dessa forma, os radicais livres podem ser formados durante reações de óxido-redução, ou ainda favorecer essas reações, a depender do processo bioquímico envolvido (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). De acordo com suas características químicas podem ser classificadas em espécies radicalares e não radicalares. Dentre as radicalares encontram-se o óxido nítrico ( $\text{NO}^{\bullet}$ ), ânion superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet -}$ ), radical hidroxila ( $\text{OH}^{\bullet}$ ), ânion radical de carbonato ( $\text{CO}_3^{\bullet -}$ ), dióxido de nitrogênio ( $\text{NO}_2^{\bullet}$ ) e alcóxil/alquil peróxil ( $\text{RO}^{\bullet}/\text{ROO}^{\bullet}$ ). E as principais espécies não radicalares como peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ )/ácido peroxinitrito ( $\text{ONOOH}$ ) e ácido hipocloroso ( $\text{HOCl}$ ) que não possuem pares de elétrons desemparelhados, apresentando em geral mais estabilidade e menos reatividade (ZHANG et al., 2019).

As principais fontes dos radicais livres são as organelas citoplasmáticas responsáveis pelo metabolismo do oxigênio, nitrogênio e cloro, resultando em grandes quantidades de metabólitos. Na mitocôndria acontecem importantes processos metabólicos como a respiração aeróbica, armazenamento de cálcio e regulação da apoptose. Além disso, participam de outras atividades fundamentais para o funcionamento celular como a proliferação, autofagia, sinalização redox e imunidade. Uma disfunção mitocondrial pode ocasionar várias patologias como a neurodegeneração, câncer, distúrbio metabólico, diabetes, acidente vascular cerebral e envelhecimento (MENG et al., 2017).

A mitocôndria é a principal fonte geradora de espécies reativas a partir do deslocamento de elétrons durante a respiração através da cadeia transportadora de

elétrons. Essa cadeia de transferência de elétrons localizada na região intermembranar da mitocôndria é formada por complexos de proteínas, denominados complexo I (NADH desidrogenase), complexo II (succinato desidrogenase), complexo III (citocromo c redutase) e o complexo IV (citocromo c oxidase), que transferem os elétrons para o oxigênio molecular ( $O_2$ ) reduzindo-o a  $H_2O_2$  no complexo IV. Os portadores de elétrons podem ser auto-oxidados e gerar o  $O_2^{\cdot-}$ , na reação catalisada pela enzima SOD (superóxido dismutase) para produzir  $H_2O_2$ . Em seguida o  $H_2O_2$  é convertido em  $OH^{\cdot}$  por meio da reação de Fenton. Os principais  $O_2^{\cdot-}$  são gerados a partir do Complexo I e III na mitocôndria (MENG et al., 2017). Durante o metabolismo celular aeróbico, na mitocôndria a água ( $H_2O$ ) é formada a partir da redução tetravalente do oxigênio molecular ( $O_2$ ), formando os radicais  $O_2^{\cdot-}$ , hidroperoxila ( $HO_2^{\cdot}$ ) e  $OH^{\cdot}$  e o  $H_2O_2$ . O radical  $OH^{\cdot}$ , espécie mais reativa, reage rapidamente com metais ou mesmo com outros radicais, podendo levar a inativação ou mutação do DNA quando este estiver fixado a um metal.

Um outro processo que pode ser desencadeado pelo aumento da radical  $OH^{\cdot}$ , é a peroxidação lipídica, que ocorre a partir da oxidação dos ácidos graxos poli-insaturados das membranas celulares. A espécie reativa  $H_2O_2$  é um metabólito do oxigênio que participa da reação de formação do radical hidroxila, extremamente deletério para as células, principalmente na presença do ferro, atravessando as camadas lipídicas podendo reagir com a membrana eritrocitária e com as proteínas ligadas ao ferro (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

Os metais de transição atuam de forma essencial em vários processos fisiológicos, como na síntese de determinadas enzimas, transporte de oxigênio e reações do tipo redox. Participam diretamente da formação de EROs convertendo o  $H_2O_2$  em  $OH^{\cdot}$ , ou na decomposição de peróxidos lipídicos em radicais reativos peroxil ( $ROO^{\cdot}$ ) e alcoxil ( $RO^{\cdot}$ ). Dessa forma, podem ser tóxicos para o organismo devido à capacidade de auto-oxidação. Os metais, principalmente os íons ferro (altamente disponível no organismo) e íons cobre, catalisam reações de oxidação de biomoléculas, por meio da reação de Fenton e Haber-Weiss, favorecendo a formação de  $OH^{\cdot}$  a partir de  $H_2O_2$  (BERG et al., 2004). O cobre (Cu) está disponível em todo organismo, inclusive no cérebro, pois atravessa a barreira hematoencefálica na forma de um complexo associado a metaloproteínas. O cobre apresenta função enzimática envolvida na síntese de proteínas e neurotransmissores importantes para a função nervosa. Todo o processo de absorção, distribuição e eliminação do metal é controlado por proteínas capazes de prevenir danos ocasionados pelas suas formas livres (LEAL et al., 2012).

Assim como o Fe e Cu, outros metais como o manganês (Mn) são essenciais para a homeostase fisiológica, sendo essencial para as enzimas superóxido dismutase (SOD), arginase, hidrolase e carboxilase. No entanto, segundo Berg et al., (2004) o Mn pode promover a oxidação da dopamina no cérebro causando a destruição do tecido cerebral; além disso, pode reduzir os níveis das enzimas peroxidase e catalase. Em contrapartida, o metal zinco (Zn) na presença do ferro, pode atuar como antioxidante, removendo os íons do ferro dos seus locais de ligação e inibindo reações dependentes de ferro (CUAJUNGO; LEES 1997; MENDEZ-ALVAREZ et al. 2002). O Zn participa de processos enzimáticos e na estabilização da estrutura molecular dos componentes da membrana, presente em tecidos e fluidos corporais e em níveis elevados no cérebro (LEAL et al., 2012).

O magnésio (Mg), assim como o Zn, pode atenuar o dano oxidativo, uma vez que ele atua como cofator para múltiplas enzimas. Assim, os metais, principalmente a nível cerebral, podem contribuir para o desequilíbrio redox uma vez que podem atuar na produção de EROs e de espécies reativas de nitrogênio (ERNs) (BERG et al., 2004).

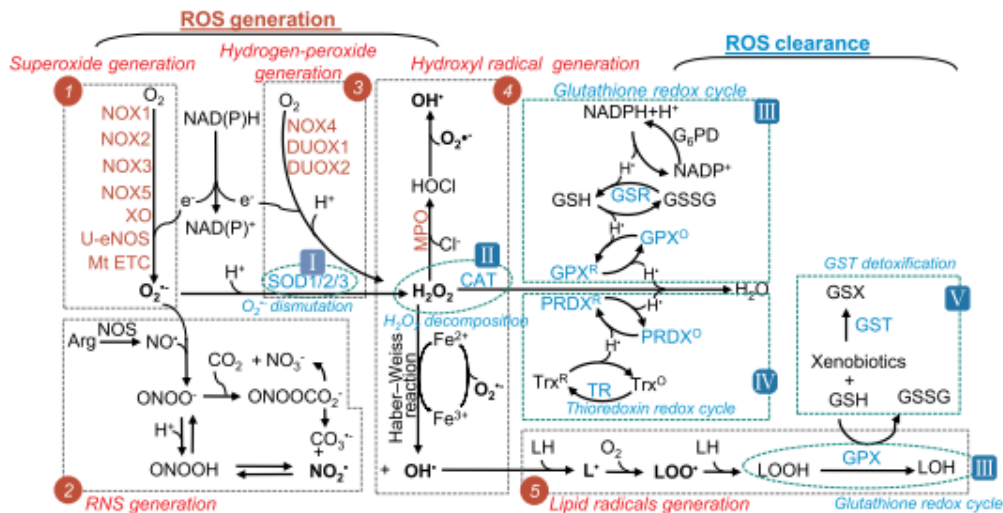
Assim, alterações na homeostase celular metálica podem desencadear o desequilíbrio redox e promover alterações fisiológicas intimamente relacionadas a processos patológicos como os distúrbios neurodegenerativos (KWON et al., 2015).

### **1.3 Defesas Antioxidantes**

O equilíbrio observado na homeostase dos organismos está intimamente relacionado à capacidade dos antioxidantes em eliminar o excesso de ERs. Estes compostos, presentes em baixas concentrações, são capazes de competir com outros substratos oxidáveis, de forma a atrasar ou inibir sua oxidação (ŁUCZAJ; GEGOTEK; SKRZYDLEWSKA, 2017). Os mecanismos de defesa antioxidante abarcam a remoção de espécies reativas, eliminação de seus precursores, inibição da formação de EROs, ligação de íons metálicos necessários para a catálise da geração de EROs e regulação positiva das defesas antioxidantes endógenas. Além disso, a eficácia protetora dos antioxidantes depende do tipo de EROs e do local de geração, uma vez que barreiras corporais, como a barreira hematoencefálica, reduz a permeabilidade da maioria dos antioxidantes (GILGUN-SHERKI et al., 2001). No entanto, além de conter o aumento das ERs, as defesas antioxidantes devem atuar de forma a permitir que as ERs mediem papéis importantes na sinalização celular e na regulação redox, processos que promovem o aumento da expressão dos genes de várias proteínas antioxidantes (HALLIWELL,

2011). No equilíbrio homeostático redox a interação entre as ERs e os antioxidantes é responsável por produzir respostas metabólicas a sinais endógenos e exógenos, que induzem a ativação de mecanismos de morte celular. Dessa forma, a homeostase redox celular realiza um papel fundamental nos processos fisiológicos e na maioria dos fisiopatológicos (ŁUCZAJ; GEGOTEK; SKRZYDLEWSKA, 2017).

As defesas antioxidantes incluem sistemas antioxidantes enzimáticos (Figura 4), compostos por enzimas como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPX), e sistemas não enzimáticos, compostos pela glutathione, ácido úrico, coenzima Q, ácido lipoico, ácido ascórbico e  $\alpha$ -tocoferol (HALLIWELL, 2011). A enzima SOD, responsável pela dismutação do radical  $O_2^{\bullet}$ , possui três isoformas dependentes de metais para exercer sua atividade, a SOD1 (contendo Cu/Zn), SOD2 (Mn) e SOD3 (Cu/Zn) (FUKAI; USHIO-FUKAI, 2011). A SOD1 e SOD2 são amplamente distribuídas em todos os tecidos e células. A SOD1 é a principal para depuração de  $O_2^{\bullet}$  que foi gerado no citosol e no espaço intermembranar das mitocôndrias, evitando a apoptose dos neurônios da medula espinhal; e sua deficiência acarreta na esclerose lateral amiotrófica (PEDRINI et al., 2010). A SOD2 atua na liberação de  $O_2^{\bullet}$  na matriz mitocondrial, protegendo as células, principalmente os neurônios contra apoptose, e sua deficiência está diretamente ligada às doenças neurodegenerativas. Já a SOD3 é mais expressa nos vasos, pulmões e rins, sendo secretada nos espaços extracelulares, com isso, é a única isoforma que atua protegendo contra o  $O_2^{\bullet}$  extracelular (ZHANG et al., 2019).



**Figura 4.** Formação das ERs e sua eliminação pelo sistema antioxidante enzimático. (ZHANG et al., 2019).

A enzima CAT, peroxidase contendo ferro, catalisa a decomposição de  $H_2O_2$  em  $H_2O$  e  $O_2$ . É expressa no fígado e eritrócitos, principalmente nos peroxissomos, um dos locais de formação do  $H_2O_2$  (REIMER; BAILLEY; SINGH, 1994). A CAT promove a catálise do  $H_2O_2$  no citosol quando esse encontra-se muito acima dos níveis fisiológicos. Atua também no metabolismo do etanol, formando o acetaldeído a partir do álcool. Essa peroxidase encontra-se menos expressa quando comparada a GPX que também participa da catálise do  $H_2O_2$  (ZHANG et al., 2019).

A GPX, peroxidase contendo selênio, também é capaz de transformar  $H_2O_2$  em  $H_2O$ , ou converter o hidroperóxido (ROOH) em álcool (ROH). Apresenta-se em oito isoformas, GPX1-8, que podem variar de acordo com sua distribuição, alvos e atividades biológicas (TOPPO et al., 2008). A GPX1 por exemplo é usada principalmente para a depuração de  $H_2O_2$ , sendo a mais abundante e expressa na maioria dos tecidos, localizada principalmente na matriz citosólica e mitocondrial. No processo redox envolvendo a oxidação e redução da glutathione, a GPX atua na redução do  $H_2O_2$  adquirindo a forma oxidada (GPXO) e inativa. A GPXO por meio da glutathione reduzida (GSH) pode voltar à sua forma reduzida (GPXR). A GSH se transforma em dissulfeto de glutathione (GSSG), podendo ser reduzida novamente a GSH, depois que um hidreto ( $H^-$ ) é transferido do NADPH (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato) catalisado pela glutathione redutase (GSR) (ZHANG et al., 2019; ŁUCZAJ; GEGOTEK; SKRZYDLEWSKA, 2017).



Além das defesas antioxidantes enzimáticas, antioxidantes não-enzimáticos exógenos como  $\alpha$ -tocoferol e ácido ascórbico também protegem as células do excesso de radicais livres. O  $\alpha$ -tocoferol, antioxidante lipofílico, atua eliminando os radicais hidropoxila em um ambiente lipídico. Assim, estudos sugerem que sua capacidade antioxidante atua principalmente na oxidação inicial de ácidos graxos, interrompendo a reação em cadeia da peroxidação lipídica, conferindo proteção das membranas eritrocitárias e dos tecidos nervosos (TRABER; STEVENS, 2011).

Assim como  $\alpha$ -tocoferol, o ácido ascórbico tem a capacidade de proteger contra a peroxidação lipídica e outros danos celulares, eliminando as EROs através da neutralização dos radicais hidropoxil lipídicos, em uma reação dependente do ciclo redox da vitamina E (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). Durante uma revisão sobre a captação celular e reciclagem, Harrison e May (2009) inferiram funções neuroprotetoras da vitamina C no cérebro. Dessa forma, diversos autores enfatizam o papel do ácido ascórbico na prevenção do desequilíbrio redox no cérebro em desenvolvimento (TRABER; STEVENS, 2011).

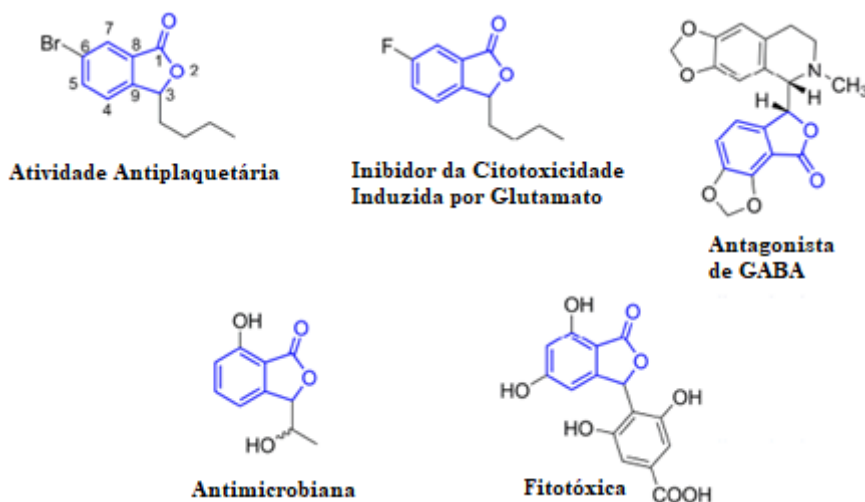
Estudos sugerem que uma dieta suplementar rica em ácido ascórbico,  $\alpha$ -tocoferol e outras substâncias naturais como os polifenóis, atualmente considerados os principais antioxidantes exógenos, podem ser utilizados como preventivos ou mesmo em tratamentos terapêuticos de muitas doenças crônicas associadas ao desequilíbrio redox (MEGANATHAN; FU, 2016).

Apesar do grande número de dados que confirmem os efeitos terapêuticos dos antioxidantes naturais contra os danos oxidativos, alguns antioxidantes apresentaram resultados negativos durante os ensaios clínicos, mostrando seu limitado potencial terapêutico. Assim, é evidente a necessidade de novos estudos e desenvolvimento de novos compostos antioxidantes capazes de atuar no tratamento de patologias que envolvam o desequilíbrio redox (PISOSCHI; POP, 2015).

#### **1.4 Isobenzofuran-1(3H)-onas**

Os compostos naturais conhecidos como ftalídeos foram identificados a partir de plantas, mas podem ser encontrados em fungos e bactérias. As plantas contendo os ftalídeos foram usadas mundialmente tempos atrás por apresentar inúmeros efeitos terapêuticos, sendo utilizadas em medicamentos tradicionais e em suplementos alimentares (LIN et al., 2005).

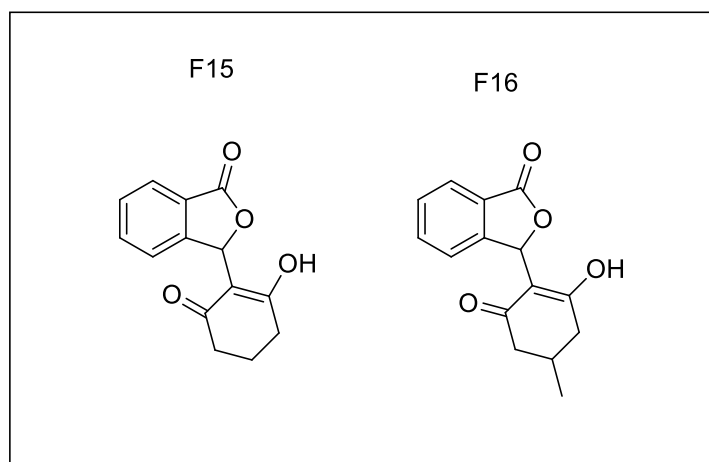
A classe de compostos conhecida como isobenzofuran-1-(3H)-onas, derivadas dos ftalídeos, são caracterizadas por apresentarem em sua fórmula estrutural uma fração  $\gamma$ -lactona fundida a um anel aromático. As isobenzofuran-1-(3H)-onas funcionalizadas na posição C-3 se destacam por suas atividades biológicas, antiplaquetária (MA et al., 2011), antagonista do receptor GABA (JOHNSTON, 2013), citotoxicidade (TEIXEIRA et al., 2013) antimicrobiana (RAHMAN; GRAY, 2005) e antioxidante (MELO et al., 2006) (Figura 5).



**Figure 5. Exemplo de isobenzofuranonas e suas atividades biológicas.** A parte estrutural em azul caracteriza os compostos como ftalídeos (isobenzofuranonas) (Modificado de: PEREIRA et al., 2015).

Apesar desses compostos serem derivados de origem natural, de fungos em sua maioria, podem ser encontrados também de forma sintética, ou seja, alterados quimicamente para desenvolver uma atividade biológica específica, como realizado no estudo de Teixeira et al (2013), em que uma série de isobenzofuranonas foram desenvolvidas e utilizadas contra uma linhagem celular comprovando sua citotoxicidade.

Dessa forma, essa classe de compostos por apresentar propriedades terapêuticas diversificadas, se tornou alvo de diversos estudos. Em pesquisas anteriores realizada por Ribeiro (2018) uma isobenzofuranona sintética denominada de F12, apresentou características antioxidantes. Diante disso, duas isobenzofuranonas sintetizadas por Teixeira et al (2013), denominadas de compostos F15 e F16 (Figura 6) foram avaliadas quanto a sua capacidade antioxidante, frente às EROs produzidas pela quebra do  $H_2O_2$  em células neuronais. Tais compostos apresentam fórmulas estruturais semelhantes, mas com um grupo metil substituinte que as diferencia.



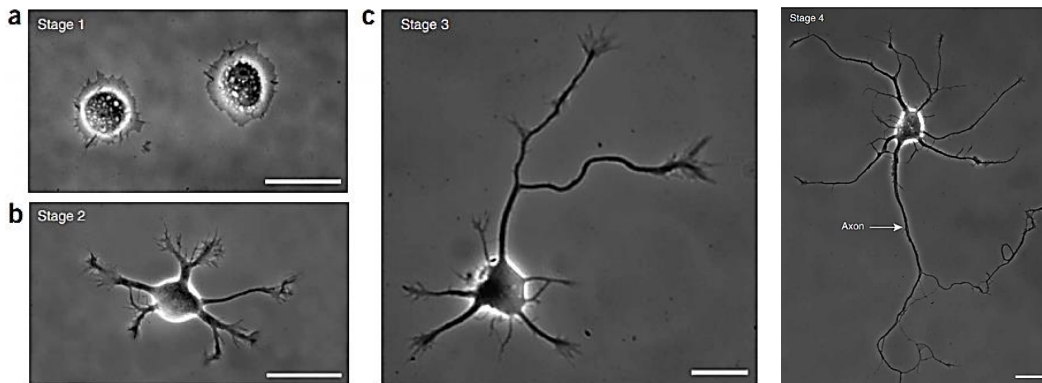
**Figura 6. Isobenzofuran-1(3H)-onas sintéticas denominadas de F15 e F16.**

### **1.5 Cultura celular**

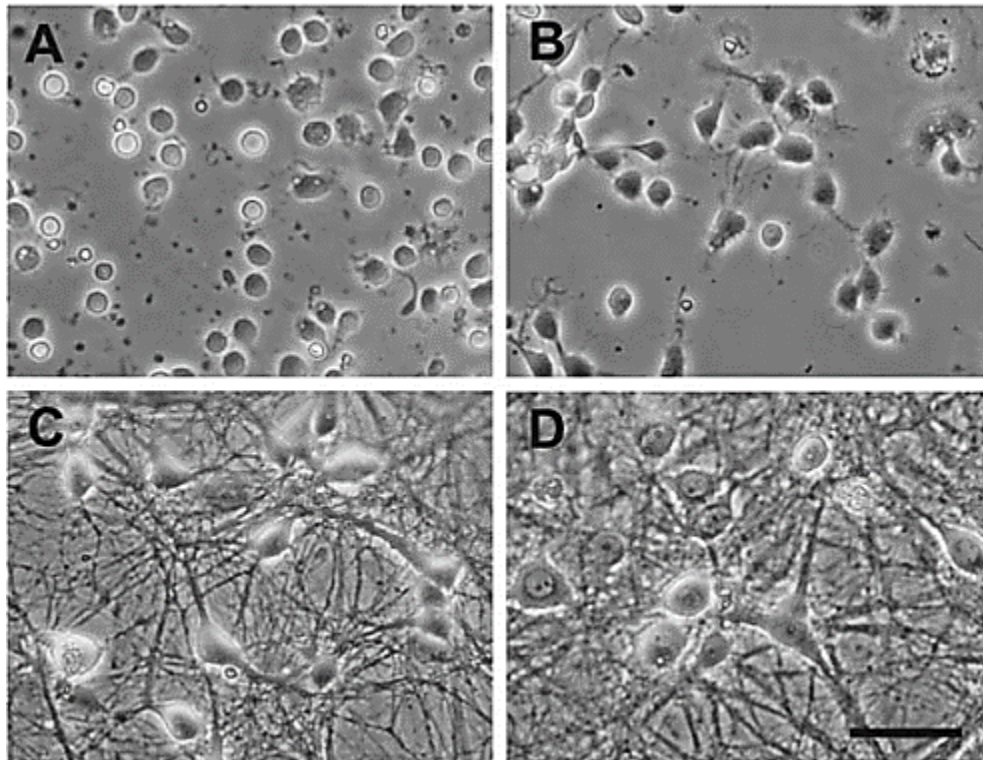
Muitos avanços importantes nas pesquisas têm sido feitos devido a utilização de culturas primárias, ou seja, o isolamento de células a partir do tecido que se deseja estudar (LANGE et al., 2012). É um importante modelo para estudos que requerem condições bem definidas e controladas, permitindo análises sobre a sinalização celular, bem como as alterações morfológicas e bioquímicas das células. As culturas primárias de células nervosas permitem o estudo dessas em condições basais, fisiológicas e neurotóxicas, otimizando as pesquisas em áreas neurológicas. As culturas realizadas a partir de células isoladas do tecido cerebral, especificamente do hipocampo, região associada a funções cognitivas superiores, como aprendizado e memória, tem grande importância no desenvolvimento de novos fármacos utilizados no tratamento de doenças neurodegenerativas (GALLAND et al., 2019; NYLANDER et al., 2020). As culturas primárias de neurônios hipocampais também podem ser utilizadas em outros estudos como o de localização subcelular de proteínas endógenas ou expressas. Nestas culturas, os neurônios tornam-se polarizados, com axônios e dendritos desenvolvidos, permitindo a formação de conexões sinápticas funcionais, o que não pode ser observado em linhagens celulares do sistema nervoso central (BENSON et al., 1994; KAECH; BANKER, 2006). Essas características as tornam grandes aliadas para conhecer os mecanismos de doenças neurodegenerativas como a doença de Alzheimer e a doença de Parkinson (KANDEL, 2006; ALBERIO et al., 2012).

A região do hipocampo é formada por vários tipos celulares, sendo os neurônios piramidais as principais células. Além dessas, células como os interneurônios também fazem parte do hipocampo, presentes relativamente em menor número que os piramidais.

Os estágios do desenvolvimento dos neurônios do hipocampo em cultura foram bem caracterizados por Kaech e Banker (2006) e podem ser observados nas figuras 7 e 8.



**Figura 7.** Imagens com contraste evidenciando características fenotípicas de um neurônio piramidal durante a fase de desenvolvimento nos primeiros 4 dias de cultura. O axônio e os dendritos são facilmente distinguíveis a partir do estágio 3 (KAECH & BANKER, 2006).



**Figura 8.** Fases de desenvolvimento de nerônios hipocampais em uma cultura celular. (DOERING, 2010).

As células neuronais em um primeiro estágio (Figura 8A), apresentam o corpo celular arredondado sem a presença de prolongamentos, que só poderão ser observados a partir do segundo estágio. Nesta fase os prolongamentos ainda são muito pequenos, com um tamanho proporcional entre um e outro, de modo que não é possível fazer uma clara distinção entre axônios e dendritos. Isso se deve ao fato de que, nesta fase, os

prolongamentos não apresentam ainda uma diferenciação definida e por isso qualquer um desses prolongamentos poderá se tornar um axônio ou um dendrito (Figura 8B) (DOERING, 2010). A célula permanecerá no segundo estágio por um período que varia entre 12 a 36 horas. Após esse período, ocorre uma rápida transição, onde um dos prolongamentos apresenta desenvolvimento bem maior do que os outros, fato que caracteriza o início da terceira fase do desenvolvimento da célula. Nessa fase, um dos prolongamentos continuará a se desenvolver mais do que os demais, adquirindo características típicas dos axônios (Figura 8C). O início do estágio quatro acontece entre o quarto e o quinto dia de cultura e é caracterizado pela ocorrência de redes sinápticas bem definidas entre os neurônios (Figura 8D).

Para estudo de propriedades fisiológicas dos neurônios ou de outros estudos mais complexos que envolvam mecanismos patogênicos de doenças neurodegenerativas, tem sido amplamente utilizadas culturas primárias de neurônios do hipocampo de ratos ou camundongos, como um método de estudo da neurotoxicidade de radicais livres para compreender a interação entre espécies reativas de oxigênio e os efeitos protetores dos antioxidantes (GORDON et al., 2013; CATLIN et al., 2016). Assim sendo, a cultura celular é uma ferramenta poderosa para explorar a função celular.

Apesar das inúmeras vantagens e possibilidades de se trabalhar com culturas primárias, este método ainda está sujeito a grandes dificuldades e contratemplos que podem atrasar e dificultar a realização do estudo, uma vez que os neurônios maduros não sofrem divisão celular. Para superar essa questão, são utilizadas culturas de linhagens de células tumorais imortalizadas, no entanto, essas células apresentam maior resistência a fármacos e maior proliferação celular quando comparadas às primárias, ocasionando diferenças nos estudos realizados com ambas (GORDON et al., 2013).

Mesmo com todas as pesquisas atuantes na área, o estudo do sistema nervoso central é uma tarefa árdua que exige modelos experimentais complexos para o avanço do conhecimento a respeito de doenças neurodegenerativas. Notoriamente, apenas cerca de 8% dos fármacos aprovados em ensaios pré-clínicos conseguem chegar em fases posteriores (MILLER, 2010). Dessa forma, a utilização de culturas primárias de neurônios hipocampais se torna uma ferramenta valiosa para a crescente necessidade de se desenvolver metodologias mais eficientes e precisas na identificação e avaliação de novos compostos.

## 1.6 Voltametria Cíclica

Vários métodos espectrofotométricos são utilizados para determinar atividade antioxidante *in vitro* de substâncias naturais e sintéticas, como a quantificação de espécies reativas de oxigênio e produtos da peroxidação lipídica. Além desses, métodos eletroanalíticos também tem sido usados para determinar a atividade antioxidante, como é o caso da voltametria cíclica (VC). A VC é uma técnica eletroanalítica que tem a função de analisar o potencial redox em uma ampla faixa de varredura de potencial se baseando na varredura linear de potencial no tempo como forma de onda triangular (FONSECA; PROENÇA; CAPELO, 2014). Sua utilização é comum para avaliar a capacidade de redução e oxidação de substâncias puras ou presentes em diferentes soluções (PISOSCHI et al., 2015).

Essa técnica eletroanalítica apresenta inúmeras vantagens como baixo custo, alta sensibilidade, instrumentação simples e relativamente barata, rápida e de fácil execução. Além disso, é necessário apenas um pequeno volume de amostra para se realizar a técnica, apresentando resultados rápidos e de alta confiabilidade. Uma outra vantagem em se utilizar esta técnica é que a maioria dos antioxidantes apresentam alta eletroatividade, caracterizada pela transferência de elétrons nas reações envolvendo os radicais livres, permitindo assim, a seleção rápida de uma série de compostos orgânicos para testes de capacidade antioxidante. Dessa forma, essa técnica eletroquímica se apresenta como método alternativo ou mesmo complementar às técnicas espectrofotométricas (JARA-PALACIOS et al., 2017).

A voltametria cíclica, método eletroanalítico amplamente utilizado em muitas áreas da química, analisa os processos redox em determinações qualitativas e quantitativas. Essa técnica baseia-se na variação do potencial aplicado em um eletrodo de trabalho, nas direções direta e reversa numa determinada taxa de varredura e monitoramento da corrente elétrica circulante numa célula eletroquímica. É necessário a utilização de uma célula contendo três eletrodos, sendo um eletrodo de trabalho, um de referência e um eletrodo auxiliar. Os eletrodos são conectados a um potenciostato responsável por aplicar a diferença de potencial entre os eletrodos de trabalho e de referência a uma taxa constante, que por sua vez é controlado por um computador onde serão gerados os resultados em forma de curvas denominada voltamograma. A corrente é transferida do eletrodo auxiliar para o eletrodo de trabalho de forma que não haja passagem de corrente pelo eletrodo de referência, sendo o potencial mantido constante (GANDRA et al., 2004).

A curva do voltamograma é formada pela intensidade de corrente ( $i$ ) *versus* potencial ( $E$ ) aplicado, em uma varredura feita de um potencial inicial ( $E_i$ ) até um potencial final ( $E_f$ ) invertendo o sentido da varredura para a direção do potencial inicial. De acordo com as normas da União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC) as curvas podem gerar potencial anódico ( $E_a$ ), quando o valor de potencial se desloca no sentido dos potenciais mais positivos, devido a processos de oxidação, e potencial catódico ( $E_c$ ) quando se desloca no sentido dos potenciais mais negativos, associado a processos de redução. Os voltamogramas cíclicos podem apresentar um ou mais picos relacionados com o processo redox baseado na equação:



Sendo O e R as espécies oxidada e reduzida, e  $n$  representa o número de elétrons envolvidos no processo redox. Além dos potenciais de picos anódicos ( $E_a$ ) e catódicos ( $E_c$ ) um outro parâmetro importante é o valor da corrente de pico ( $i_p$ ), que compõe a análise dos resultados e formação da curva do voltamograma, variação da corrente (eixo  $y$ ) *versus* a variação de potencial (eixo  $x$ ) (FONSECA et al., 2015).

A VC analisa a transferência de elétrons entre moléculas e eletrodos. Os picos analíticos (sinais resultantes da  $i \times E$ ) são resultados da depleção oxidativa das moléculas antioxidantes no eletrodo à medida que os valores específicos dos potenciais formais são atingidos. A avaliação do potencial de oxidação de um composto ou de uma amostra pode refletir sua capacidade antioxidante determinada pela VC, sendo que os antioxidantes podem doar elétrons diretamente às EROs, funcionando como agentes redutores. Os potenciais de oxidação de diferentes compostos como os ácidos benzoicos, ácidos hidroxicinâmicos e flavonoides, com distinção entre tipos de substratos têm sido estudados através da VC, de forma que valores baixos de potenciais de oxidação exibem atividade antioxidante significativa (GANDRA et al., 2004).

De acordo com Pisoschi et al (2015) as técnicas voltamétricas apresentam vantagens como rapidez e baixo custo, além do fato do valor do potencial de oxidação de cada componente específico da solução poder ser avaliado com a mesma precisão, independentemente do poder antioxidante, em boas condições separação de pico. Entretanto, apresenta algumas limitações recomendando-se a associação com outros métodos para assegurar a qualidade dos resultados. Dessa forma, os estudos *in vitro* (espectrofotométricos) e estudos eletroanalíticos são importantes ferramentas para

permitir a análise de características antioxidantes de compostos antes de se iniciar estudos em modelos *in vivo*.

Tendo em vista a ausência de fármacos disponíveis para tratamento de doenças neurodegenerativas e o crescente número de pessoas acometidas por essas doenças, é de grande necessidade o desenvolvimento de compostos candidatos a fármacos com capacidade de conter o progresso ou mesmo solucionar essas doenças, atuando de forma complementar às defesas endógenas. O desenvolvimento de compostos antioxidantes que sejam capazes de conter a neurodegeneração é imprescindível, sendo assim, este trabalho propõe um estudo *in vitro* para avaliar o potencial antioxidante de isobenzofuranonas sintéticas, analisando sua capacidade de conter as EROs, principais desencadeadoras do desequilíbrio redox.

Assim, esperamos que as isobenzofuranonas sintéticas analisadas sejam capazes de proteger os neurônios hipocámpais contra as EROs desencadeadas pela indução do desequilíbrio.



## **2. OBJETIVO**

### **2.1 Objetivo Geral**

Avaliar a capacidade antioxidante de isobenzofuranonas sintéticas sobre culturas primárias de neurônios hipocampais submetidas ao desequilíbrio redox por meio das técnicas espectrofotométrica e eletroanalítica.

### **2.2 Objetivos Específicos**

Estabelecimento de culturas primárias de neurônios hipocampais de camundongos C57/BL E17;

Analisar o efeito antioxidante de isobenzofuranonas sintéticas *in vitro* por meio de métodos espectrofotométricos:

- Ensaio de viabilidade celular;
- Mensuração de níveis intracelulares de espécies reativas de oxigênio (EROs);
- Ensaio de peroxidação lipídica.

Avaliar o comportamento eletroquímico de isobenzofuranonas sintéticas por meio da técnica eletroanalítica de voltametria cíclica.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Reagentes**

Acetona (Proquimios)  
Ácido clorídrico (Imprex)  
Álcool etílico (Vetec)  
BODIPY- C11 (Sigma-Aldrich)  
Diclorofluorceína (Sigma-Aldrich)  
DMSO – Dimetilsulfóxido (Vetec)  
L-glutamina (Gibco, Life Technologies)  
Meio MEM - Minimum Essential Medium (Gibco, Life Technologies)  
Meio Neurobasal (Gibco, Life Technologies)  
MTT - Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (Invitrogen)  
Peróxido de hidrogênio 30% (Sigma-Aldrich)  
Piruvato de sódio (Sigma-Aldrich)  
Poli-L-lisina (Sigma-Aldrich)  
Solução de DNase (Desoxirribonuclease) (Sigma-Aldrich)  
Solução de glicose (Gibco Life Technologies)  
Solução de Penicilina (Sigma-Aldrich)  
Solução de tripsina (Sigma-Aldrich)  
Solução detergente 10% (Orion)  
Solução Salina de Hank livre de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  (HBSS) (Gibco, Life Technologies)  
Soro Fetal Bovino (LGC- Biotecnologia)  
Suplemento B-27 (Gibco)

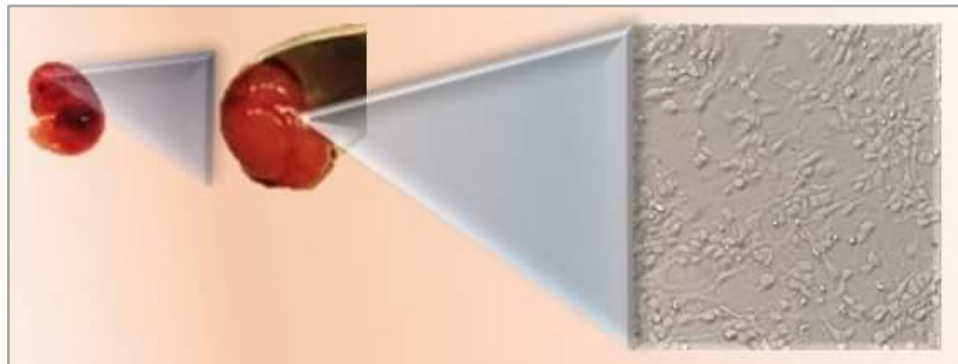
#### **3.2 Cultura Primária de Neurônios Hipocampais**

O estabelecimento da cultura primária de neurônios foi realizado com algumas adaptações, baseado em protocolos pré-estabelecidos na literatura, como descrito por Ahlemeyer e Baumgart-vogt (2005).

Os experimentos com animais foram realizados após a aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP) com o protocolo vigente de número 9659240418. Os animais foram cedidos pelo Centro de Ciência Animal (CCA), também da UFOP, após a aprovação do protocolo.

Os animais utilizados foram camundongos isogênicos da linhagem C57BL/6 do sexo feminino e masculino. Estes foram mantidos no Biotério do CCA em caixas de polietileno com comida e água *ad libitum*. As condições de alojamento foram monitoradas observando fatores como ciclo claro e escuro e ventilação. Os experimentos foram realizados no laboratório de Biomateriais e Patologia Experimental (LBPE) da UFOP.

Os animais com 8 a 10 semanas foram colocados em uma caixa para o acasalamento, sendo colocadas duas fêmeas para cada macho em uma caixa. Após a comprovação do acasalamento pela observação do plug vaginal as fêmeas foram acompanhadas por 17 dias de gestação. Após este período as fêmeas foram eutanasiadas por deslocamento cervical e os embriões retirados das placentas e mergulhados em solução salina de Hank gelada. Com auxílio de pinças e tesouras esterilizadas os cérebros dos embriões foram removidos e o hipocampo isolado (Figura 9). Posteriormente, e sob condições estéreis, foi realizada a dissociação do hipocampo em tripsina a 0,25%. Após 20 minutos a tripsina foi substituída pelo meio de plaquear composto de MEM, soro fetal bovino, glicose 20%, piruvato de sódio (10mM) e pen/strep (10000 U e 10000 UG). Em seguida, o meio de plaquear foi substituído por meio de plaquear contendo DNase a 1% para reduzir a aglomeração de células e minimizar a presença de fragmentos de DNA flutuantes.



**Figura 9. Cultura primária de neurônios hipocâmpais a partir do isolamento do cérebro de embrião com 17 dias de desenvolvimento (E17).**

As células foram plaqueadas a uma densidade de  $5 \times 10^4$  por poço em placas de 96 poços previamente tratadas com poli-L-lisina. As placas foram incubadas por quatro horas em estufa a  $37^\circ\text{C}$  e 5 % de  $\text{CO}_2$ . Após quatro horas o meio de cultura foi substituído pelo meio de manutenção (meio neurobasal, pen/strep, B27 e L-glutamina), sendo este trocado a cada 48 horas. Os experimentos foram iniciados após cinco dias, quando as culturas de neurônios hipocâmpais já haviam alcançado o quarto estágio de

desenvolvimento de células nervosas, principalmente no que se refere à morfologia, aspecto que possui grande ligação com as respostas dadas pelas células em cultura.

### 3.3 Tratamento das células com as isobenzofuranonas

Após o estabelecimento das culturas primárias, os neurônios apresentavam prolongamentos e estavam prontos para início dos ensaios *in vitro*. Uma solução estoque 2mM das isobenzofuranonas (F15 e F16) foi preparada utilizando 20% de DMSO, em seguida tal solução foi diluída em meio de manutenção para se obter as concentrações de 50, 100 e 150 $\mu$ M. O diluente escolhido, DMSO, é um composto anfipático que pode atuar como veículo de drogas terapêuticas fazendo o transporte através das membranas e como solvente em estudos biológicos (FLORÃO et al., 2007). As células foram então tratadas com os compostos e levadas para estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> por duas horas, posteriormente receberam o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 100 $\mu$ M por três horas para assim, ocorrer a indução do desequilíbrio redox. O grupo controle recebeu apenas meio de manutenção das células, enquanto o grupo controle de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> recebeu meio de manutenção contendo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

### 3.4 Ensaio de Viabilidade celular

A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio), um ensaio colorimétrico baseado na atividade enzimática mitocondrial, que é correlacionada à viabilidade celular. Como resultado da atividade de desidrogenases mitocondriais são formados os cristais de formazan (Figura 10) (JAKŁTYS et al., 2015; REGUEIRO et al., 2015).

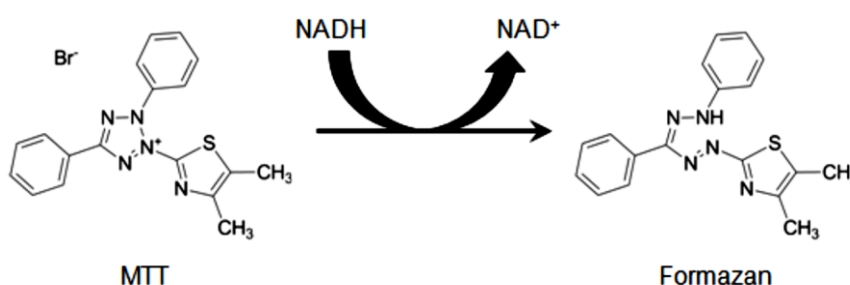


Figura 10. Reação de formação do cristal de formazan a partir do MTT. (RISS et al.,2013).

Inicialmente, para avaliar a toxicidade das isobenzofuranonas sobre as culturas celulares, os ensaios foram realizados sem a adição do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Os grupos controle de meio receberam apenas o meio de manutenção, os grupos controle de DMSO receberam uma

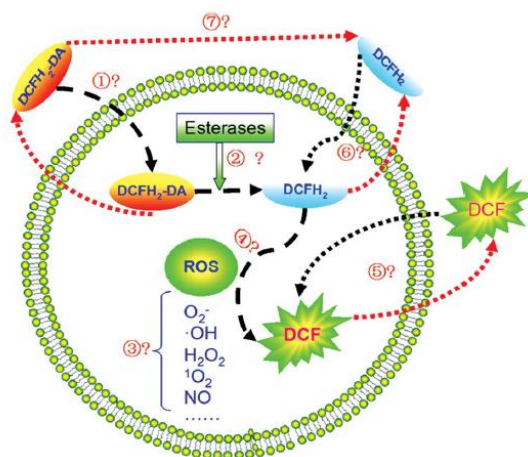
solução de DMSO em uma concentração final de 150 $\mu$ M diluído em meio de manutenção. Os demais poços receberam o tratamento com as isobenzofuranonas nas concentrações 50, 100 e 150 $\mu$ M por duas horas. Em seguida foi realizado o teste de MTT sem a adição do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Para o ensaio de MTT o meio de manutenção foi retirado dos poços e as células foram tratadas com as isobenzofuranonas nas concentrações 50 $\mu$ M, 100 $\mu$ M, e 150 $\mu$ M, exceto nos grupo controle. Os poços utilizados como controle receberam apenas meio de manutenção, os poços controle de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> receberam meio de manutenção contendo o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Os demais poços foram pré-tratados com as diferentes concentrações de izobenzofuranonas para depois ser adicionado o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, o que ocorreu em todas as culturas utilizadas para a realização de todos os testes espectrofotométricos.

Após duas horas de pré-tratamento, o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na concentração de 100 $\mu$ M foi adicionado às células e estas mantidas na estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> por três horas. Após esse tempo, o meio contendo o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi retirado e adicionado uma solução de MTT 2,5mg/mL em todos os poços da placa. No dia seguinte, os cristais de formazan formados foram solubilizados com uma solução de SDS 10% (p/v), por uma hora. Em seguida foi realizada a leitura da absorbância no comprimento de onda de 530nm no leitor de placas VICTOR™ X3.

### **3. 5 Mensuração de espécies reativas de oxigênio (EROs)**

Para mensurar a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) foi utilizado o diacetato de 2, 7-diclorodihidrofluorosceína (H<sub>2</sub>DCF-DA). Esta sonda penetra nas células devido à ação de esterases intracelulares e é transformada em 2,7-diclorodihidrofluorosceína (H<sub>2</sub>DCF). No processo de oxidação, o H<sub>2</sub>DCF gera um produto fluorescente DCF (diclorofluorosceína) que atua como um marcador das espécies reativas intracelulares, permitindo sua detecção pela fluorescência emitida (Figura 11) (LÓPEZ et al., 2006).



**Figura 11. Mecanismo de ação do diacetato de 2, 7-diclorodihidrofluoresceína (H<sub>2</sub>DCF-DA).** (CHEN et al., 2010).

Em uma nova cultura primária de neurônios hipocâmpais inicialmente, o meio de manutenção foi substituído por meio contendo as isobenzofuranonas em três diferentes concentrações, 50µM, 100µM e 150µM por duas horas nos demais poços que não foram considerados grupos controle. Novamente, assim como no teste de MTT, foi também realizado o teste de mensuração de EROs sem a adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Após o período de incubação, o meio foi novamente substituído por uma solução de H<sub>2</sub>DCF-DA na concentração de 2µM por 45 minutos. Em seguida os poços foram lavados três vezes com solução de HBSS a 37°C para a adição da solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na concentração de 100µM. Então, a leitura da absorbância com filtros de comprimentos de onda de 485nm de excitação e 535nm de emissão foi iniciada e mantida por três horas no leitor de placas VICTOR™ X3. Após três horas de leitura obteve-se os valores das absorbâncias para posterior análises e construção dos gráficos.

### 3.6 Peroxidação Lipídica

A peroxidação lipídica resulta de uma cadeia de reações mediada por radicais livres derivados do oxigênio, envolvendo a interação destes com ácidos graxos poli-insaturados das membranas celulares. A oxidação resultante pode ser analisada e quantificada pela formação de aldeídos eletrofílicos altamente reativos (REED, 2011). Para realização do ensaio utilizou-se o marcador BODIPY-C11 (diacetato de 5-(e-6)-clorometil-2',7'-diclorodi-hidrofluoresceína), uma sonda fluorescente hidrofóbica, análoga aos ácidos graxos poli-insaturados, que pode ser incorporada à membrana celular dos neurônios (SAKHAROV et al., 2005).

Após o estabelecimento de uma nova cultura primária foi realizado o tratamento dos neurônios com a substituição do meio de manutenção pelo meio contendo as isobenzofuranonas nas concentrações 50 $\mu$ M, 100 $\mu$ M, e 150 $\mu$ M em todos os poços exceto nos grupos controle de meio e controle de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Para melhor análise dos resultados o teste de peroxidação lipídica foi também realizado sem a adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Os neurônios foram incubados por duas horas em estufa a 37° C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após este tempo o meio foi substituído por uma solução de BODIPY na concentração de 10% por 45 minutos. Em seguida a solução de BODIPY foi retirada e as placas lavadas com HBSS a 37°C para a subsequente adição da solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na concentração de 100 $\mu$ M. Então, as leituras das absorbâncias com filtros de comprimentos de onda de 485nm de excitação e 535nm de emissão na fluorescência verde foram iniciadas e mantidas por três horas no leitor de placas VICTOR™ X3. Foram avaliadas as absorbâncias finais obtidas após 3 horas de leitura.

### **3.7 Voltametria cíclica**

#### **3.7.1 Preparação do substrato**

Os compostos foram depositados sobre substratos de vidro contendo em sua superfície uma camada de *Indium Tin Oxide* (ITO), óxido de índio dopado com estanho que permite a condução de corrente elétrica. O preparo do substrato foi feito anteriormente à deposição do composto para garantir uma boa aderência do filme de isobenzofuranonas e qualidade dos resultados.

Inicialmente foi realizada a limpeza do substrato já contendo o ITO, seguindo o protocolo como se segue:

O substrato foi imerso em uma solução de detergente na concentração de 10% v/v em temperatura ambiente por 10 minutos. Em seguida os substratos foram enxaguados com água destilada e secos com gás nitrogênio. Posteriormente, os substratos foram imersos em acetona e sonificados por 15 minutos no aparelho de ultrassom Ultra Cleaner 1400. Logo após os substratos foram imersos em álcool etílico e levados ao ultrassom por mais 15 minutos. Em seguida os Os substratos foramseguida colocados em água destilada a 90°C por 5 minutos. Posteriormente os substratos foram imerso em dimetilsulfóxido (DMSO), solvente utilizado para diluição das isobenzofuranonas, por 10 minutos, e, em seguida, lavados com água destilada. Por último, os substratos foram secos com gás nitrogênio de forma que toda superfície se encontrasse seca e limpa.

### 3.7.2 Verificação da passagem de corrente de elétrica

Para assegurar a deposição na superfície correta do substrato, ou seja, na superfície contendo o ITO, local onde haverá passagem de corrente elétrica, foi utilizado um multímetro digital da marca Iminipa.

### 3.7.3 Deposição do composto

Após a limpeza dos substratos, os compostos foram depositados. A área de deposição foi então delimitada com uma fita (Masterfix) para, posteriormente à secagem do filme, ter sua área medida utilizando um paquímetro. Os substratos contendo as amostras foram então levados para estufa a 28°C para secagem total e formação do filme de isobenzofuranona. Após a secagem, foram feitas as medidas da superfície para cálculo da área ocupada pelo filme.

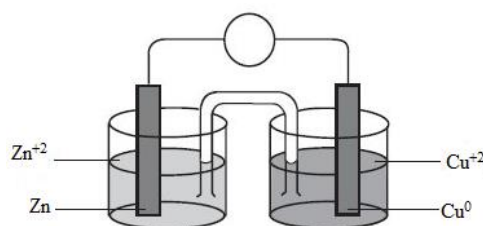
### 3.7.4 Leitura no Potenciostato/Galvanostato

Anteriormente à leitura foi preparada uma solução de ácido clorídrico (HCl) 0,1M usada como solução eletrolítica. O comportamento eletroquímico dos compostos foi analisado por um potenciostato/galvanostato ligado a uma célula eletroquímica (figuras 13 e 14) contendo três eletrodos; o eletrodo de trabalho contendo a amostra (filme de isobenzofuranona depositado sobre o ITO), contra-eletrodo, utilizado um fio de platina no formato espiral e um eletrodo de referência de calomelano saturado. Os eletrodos foram imersos em solução de HCl 0,1M para início da transferência de corrente entre os eletrodos.

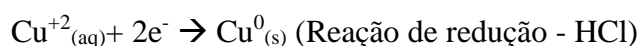
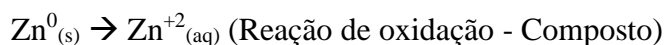
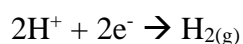
A voltametria cíclica consiste na transferência de elétrons que ocorre em uma célula eletrolítica contendo eletrodos e uma solução eletrolítica (Figura 12). Os eletrodos são imersos em soluções diferentes para que haja perda e ganho de elétrons (oxidação e redução). O eletrodo de zinco ( $Zn^0$ ) imerso em uma solução de  $Zn^{2+}$  e um outro eletrodo de cobre ( $Cu^0$ ) imerso em uma solução de  $Cu^{2+}$ . O eletrodo de  $Zn^0$  perde elétrons para a solução de  $Zn^{2+}$  permitindo que o elétron se movimente em direção ao eletrodo de  $Cu^0$  (figura 12). De forma comparativa ao funcionamento da pilha eletroquímica, infere-se que, durante a VC a isobenzofuranona se comporta como o  $Zn^0$ , perdendo elétrons no processo de oxidação. E a célula contendo a solução eletrolítica de HCl tem um excesso de  $H^+$  no meio, que se comporta de forma semelhante ao cobre, ou seja, recebendo os elétrons provenientes da isobenzofuranona. Com essa transferência de elétrons entre a



isobenzofuranona e a solução eletrolítica gera-se uma corrente elétrica e os potenciais podem ser detectados.



**Figura 12. Esquema do funcionamento de um sistema de pilha eletroquímica.** Modificada de (RUSSELL, J. B. 1994).



Para controle e monitoramento do potenciostato/galvanostato (Figura 14) foi utilizado o software NOVA versão 1.10, através do procedimento *staircase cyclic voltammetry potentiostatic* utilizando uma faixa de varredura de -1,8V a 0V com uma velocidade de varredura de 0,1V/segundo, e os seguintes parâmetros de *Lower Vertex Potential*: -1.600V; *Stop Potential*: -1.600V; *Number of stop crossings*: 2, (número de vezes que o potencial vai passar pelo potencial final (*stop potential*)); *Scan rates*: 0,1V/s.



**Figura 13. Célula eletroquímica contendo o eletrodo de trabalho e contra-eletrodo de platina.**

Após a leitura e a obtenção dos voltamogramas, os resultados foram salvos e plotados no programa Origin 6.0 para obtenção dos potenciais de oxidação. Para construção dos voltamogramas foi calculada a área de aplicação do filme de cada substrato para cada composto.

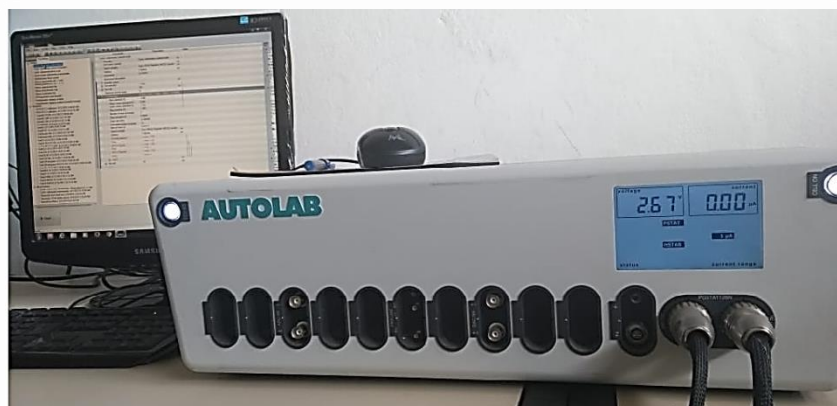


Figura 14. Potenciostato/Galvanostato modelo PGSTAT 128N da marca Metrohm-Autolab, utilizado para leitura da voltametria cíclica.

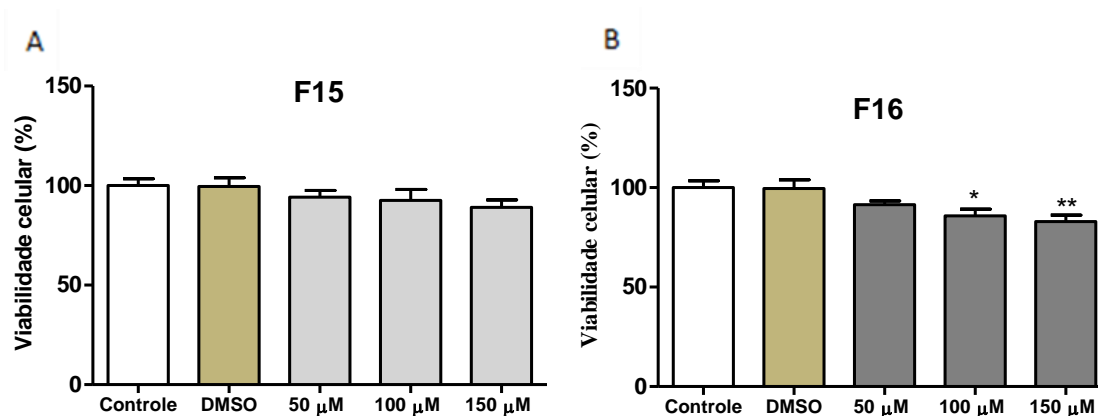
### 3.8 Análise Estatística

Após realização dos ensaios espectrofotométricos os dados foram analisados e comparados pela análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste Tukey para os dados considerados paramétricos. Para os não-paramétricos, a análise foi realizada pelo teste Kruskal-Wallis seguido pelo teste Dunn. A diferença entre os dados foi considerada significativa para  $p \leq 0,05$ . Os valores numéricos foram colocados sob a forma média  $\pm$  erro padrão da média (SEM) (GraphPad Prism 5.0).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

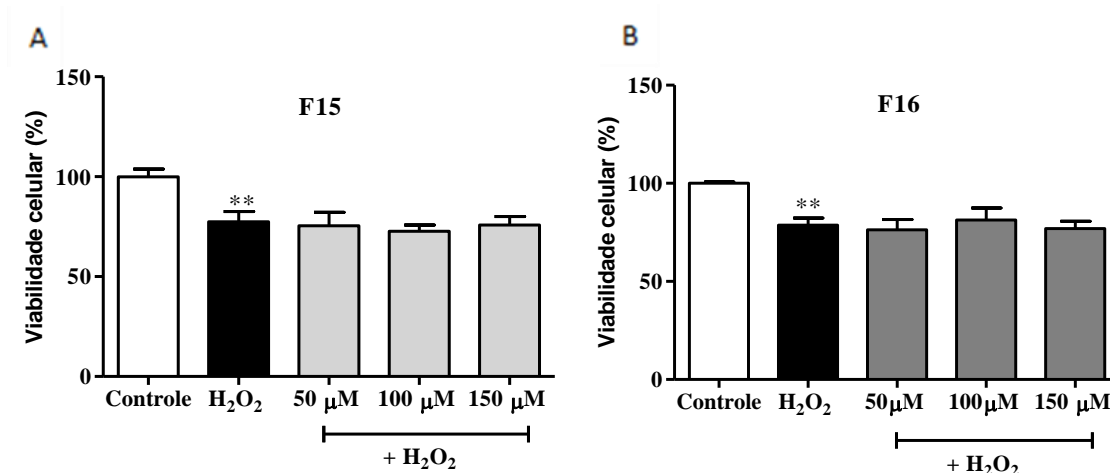
### 4.1 Ensaio de Viabilidade Celular

Os compostos F15 e F16 foram inicialmente avaliados quanto à sua possível toxicidade sobre as culturas de neurônios hipocampais. Para isso foi realizado o ensaio de viabilidade celular utilizando o MTT. Os resultados mostraram comportamentos distintos entre os dois compostos testados. O composto F15 não apresentou diferença estatística entre o grupo controle e as diferentes concentrações, indicando que o mesmo não reduziu o metabolismo neuronal. No entanto, apesar da similaridade estrutural ao composto F15, o composto F16 causou uma redução significativa no metabolismo dos neurônios nas concentrações de 100 e 150  $\mu\text{M}$  (Figura 15).



**Figura 15. Avaliação da viabilidade celular em neurônios do hipocampo.** Neurônios do hipocampo após o tratamento com isobensofuran-1(3H)-onas (F15 e F16) nas concentrações 50, 100 e 150  $\mu\text{M}$ . Os gráficos apresentam a porcentagem de células vivas após o tratamento com os compostos. (\*)(\*\*) Diferença estatística entre o grupo controle que recebeu apenas meio de manutenção e os grupos que foram tratados com as concentrações 100 e 150  $\mu\text{M}$ . Análise estatística teste *One-Way ANOVA* com pós-teste Tukey, com  $p \leq 0.05$ . Barras: média  $\pm$  SEM.

A avaliação da atividade protetiva dos compostos F15 e F16 como pré-tratamento sobre a cultura de neurônios submetidos ao desequilíbrio redox também foi realizada utilizando o método colorimétrico MTT. Através desse ensaio avaliou-se a capacidade dos compostos de manter a viabilidade celular diante do desequilíbrio redox induzido. Nas figuras 16A e 16B é possível observar que o  $\text{H}_2\text{O}_2$  reduziu de maneira significativa a viabilidade neuronal, no entanto, o pré-tratamento com os compostos F15 e F16 não foi capaz de manter a viabilidade celular dos neurônios.



**Figura 16. Viabilidade celular em neurônios hipocâmpais submetidos ao desequilíbrio redox.** Células neuronais do hipocampo tratadas com isobenzofuran-1(3H)-onas (F15 e F16) nas concentrações 50, 100 e 150  $\mu\text{M}$  por duas horas e em seguida induzidas ao desequilíbrio redox com 100 $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  por três horas. (\*\*) Diferença estatística entre o grupo controle que recebeu apenas meio de manutenção e o grupo que recebeu apenas  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Análise estatística teste *One-Way ANOVA* com pós-teste Tukey, com  $p \leq 0.05$ . Barras: média  $\pm$  SEM.

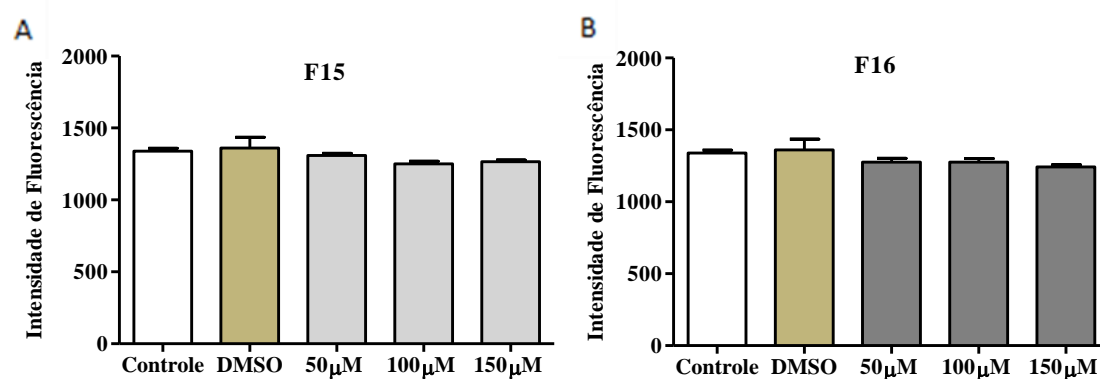
#### 4.2 Ensaio para Mensuração de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)

As doenças neurodegenerativas estão intimamente relacionadas ao desequilíbrio redox. Nesta condição o aumento das EROs torna-se tóxico para o organismo, ocasionando a morte das células nervosas (UTTARA et al., 2009). As células neuronais do hipocampo, na doença de Alzheimer por exemplo, são fortemente afetadas pelo processo de desequilíbrio redox, provocando perdas cognitivas (ROY et al., 2016). O hipocampo codifica a formação da memória de curto e longo prazo e navegação espacial, além de ter grande importância na aprendizagem (BREWER et al., 2013). A produção excessiva de EROs promove inúmeros efeitos conhecidos nos sistemas biológicos (SIES, 1991; DORNAS et al., 2008) e a utilização de isobenzofuranonas como pré-tratamento é uma estratégia que vem sendo explorada para a contenção do desequilíbrio redox induzido. Estudos realizados por Gao et al. (2010) mostraram o efeito neuroprotetor da 3-butil-6-bromo-1(3H)-isobenzofuranona (Br-NBP) sobre células PC12 as quais foram expostas ao  $\text{H}_2\text{O}_2$  para indução do dano oxidativo.

Para reproduzir condições fisiológicas bem aproximadas às dos organismos, culturas primárias de neurônios hipocâmpais foram utilizadas para avaliar a ação das isobenzofuranonas contra o desequilíbrio redox induzido. Através de ensaios realizados utilizando a diclofluoresceína ( $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ ), avaliou-se inicialmente a capacidade dos compostos F15 e F16 de gerar EROs e, conseqüentemente, influenciarem no resultado após a indução do desequilíbrio redox. Após tratamento dos neurônios somente com os

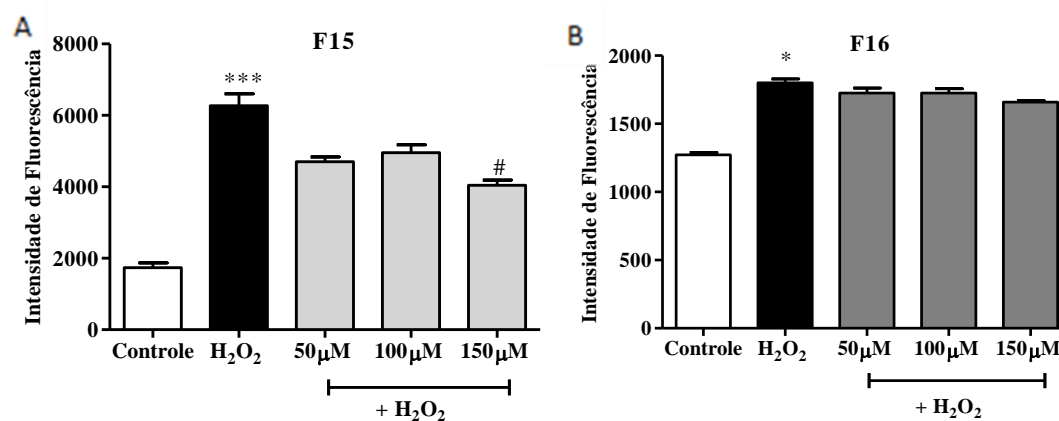
compostos F15 e F16 não houve diferença estatística entre o grupo controle e os grupos tratados. Como esperado, esses resultados mostraram que os compostos testados não são capazes de induzir a formação de EROs (Figuras 17A e 17B).

A partir desses resultados, novos ensaios com H<sub>2</sub>DCF-DA foram realizados, no entanto, os neurônios foram pré-tratados com os compostos F15 e F16 e, após duas horas, o desequilíbrio redox foi induzido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nessas células (Figuras 18A e 18B).



**Figura 17. Mensuração das EROs.** As células do hipocampo foram submetidas ao tratamento com as isobensofuran-1(3H)-onas (F15 e F16) nas concentrações 50, 100 e 150 µM por duas horas e em seguida adicionado a sonda H<sub>2</sub>DCF-DA para detecção das espécies reativas. Análise estatística feita pelo *One-way ANOVA* seguido pelo teste *Dunn's Multiple Comparison*, com significância de  $p \leq 0,05$ . Barras: média  $\pm$  SEM.

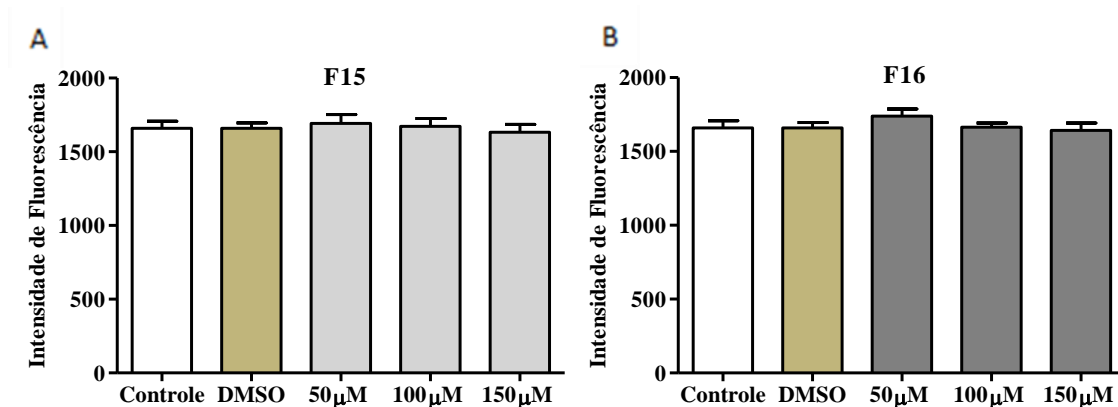
Os resultados desses ensaios mostraram que o composto F15 nas concentrações de 50 e 100µM não alteraram a concentração intracelular de EROs, mas na concentração de 150µM, o composto apresentou uma significativa redução dos níveis de EROs geradas quando comparado ao grupo controle tratado somente com o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Assim, na concentração de 150µM o composto F15 foi capaz de proteger os neurônios do desequilíbrio redox (Figura 18A). No entanto, para o composto F16 nenhuma das concentrações levou à redução intracelular de EROs quando comparadas ao controle (Figura 18B), indicando que apesar da semelhança estrutural, esses compostos não atuam da mesma maneira no meio intracelular.



**Figura 18. Quantificação das EROs após o desequilíbrio redox.** As células do hipocampo foram submetidas ao tratamento com as isobensofuran-1(3H)-onas (F15 e F16) nas concentrações 50, 100 e 150 μM por duas horas e em seguida adicionado a sonda H<sub>2</sub>DCF-DA por 45 minutos para detecção das espécies reativas. Minutos antes da leitura o desequilíbrio redox foi induzido com 100 μM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. (\*\*\*)(\*) Diferença estatística do grupo controle que recebeu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> com o grupo controle que recebeu apenas meio de manutenção. (#) Diferença estatística do grupo controle contendo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para o grupo tratado com 150 μM de F15. Análise estatística feita pelo *One-way ANOVA* seguido pelo teste *Dunn's Multiple Comparison*, com significância de  $p \leq 0,05$ . Barras: média  $\pm$  SEM.

### 4.3 Ensaio para Avaliação da Peroxidação Lipídica

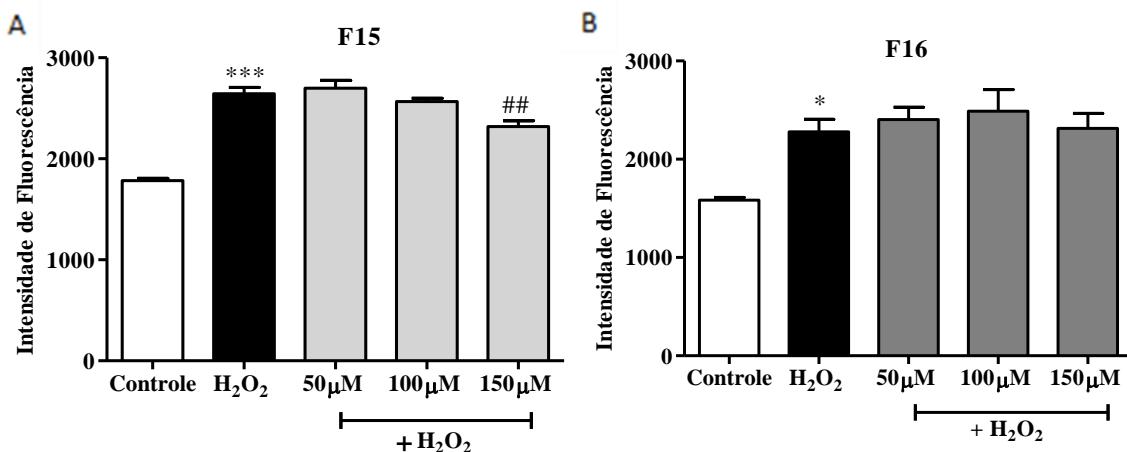
O desequilíbrio redox ocasionado pelo excesso de EROs promove danos aos neurônios, uma vez que essas células possuem em suas membranas grandes quantidades de ácidos graxos poli-insaturados (LIMA et al., 2001; FORET et al., 2019). As EROs como o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, radicais superóxido e hidroxila provocam a peroxidação lipídica resultando na perda da integridade da membrana celular e disfunção mitocondrial (GAO et al., 2010). Para avaliar a atividade dos compostos F15 e F16 as culturas de neurônios foram inicialmente expostas a esses compostos isoladamente. Como explicitado nos métodos, utilizou-se a sonda fluorescente BODIPY-C11 para a quantificação da peroxidação lipídica na membrana plasmática das células e foi observado que os compostos F15 e F16 não apresentaram diferença estatística em relação ao grupo controle nas três concentrações testadas (Figuras 19A e 19B). Esses resultados mostraram que os compostos F15 e F16 não promovem a peroxidação dos lipídeos das membranas dos neurônios. Excluindo a interferência sobre a peroxidação lipídica os compostos F15 e F16 foram utilizados como pré-tratamento às células que foram então submetidas ao desequilíbrio redox induzido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.



**Figura 19. Peroxidação lipídica das membranas das células hipocâmpais.** As células do hipocampo foram submetidas ao tratamento com as isobenzofuran-1(3H)-onas (F15 e F16) nas concentrações 50, 100 e 150 μM por duas horas e em seguida adicionado o BODIPY por 45 minutos, para detecção da peroxidação lipídica da membrana causada pelo aumento das EROs. Análise estatística feita pelo *Oneway ANOVA* seguido pelo pós-teste Tukey com significância de  $p \leq 0,05$ . Barras: média ± SEM.

A análise dos resultados corrobora os achados de Gao et al. (2010) e Xu et al. (2011) para 3-butil-6-bromo-1(3H)-isobenzofuranona e 3-butil-6-fluor-1(3H)-isobenzofuranona respectivamente, e mostra que o composto F15, novamente na concentração de 150 μM, apresentou uma significativa redução na peroxidação lipídica quando comparado ao controle tratado apenas com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (figura 20A). Essa contenção dos danos à membrana possivelmente está correlacionada à capacidade deste composto de reduzir as EROs, características desejáveis no screening de compostos candidatos a agentes farmacológicos para serem usados na prevenção e tratamento de doenças neurodegenerativas (DORNAS et al., 2008).

Contrariamente ao composto F15, o pré-tratamento com composto F16 não apresentou eficácia na contenção da peroxidação lipídica em nenhuma das três concentrações testadas (Figura 20B).



**Figura 20. Peroxidação lipídica das membranas das células hipocâmpais após indução do desequilíbrio redox.** As células do hipocampo foram submetidas ao tratamento com as isobenzofuran-1(3H)-onas (F15 e F16) nas concentrações 50, 100 e 150  $\mu\text{M}$  por duas horas e em seguida adicionado o BODIPY por 45 minutos, para detecção das espécies reativas. Minutos antes da leitura o desequilíbrio redox foi induzido por 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . (\*\*\*) Diferença estatística do grupo que recebeu  $\text{H}_2\text{O}_2$  com o grupo controle. (#) Diferença estatística do grupo controle contendo  $\text{H}_2\text{O}_2$  para o grupo tratado com 150  $\mu\text{M}$  de F15. Análise estatística feita pelo *One-Way ANOVA* seguido pelo pós-teste Tukey com significância de  $p \leq 0,05$ . Barras: média  $\pm$  SEM.

#### 4.4 Voltametria Cíclica

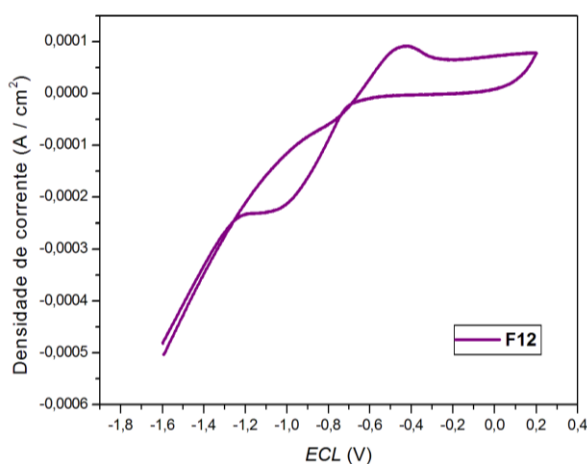
Apesar da grande semelhança estrutural entre os compostos F15 e F16 foram observados, a partir das análises espectrofotométricas, resultados divergentes no que tange à atividade desses compostos sobre as culturas primárias de neurônios hipocâmpais. Para tentar elucidar a capacidade antioxidante desses compostos foi realizada a voltametria cíclica (VC). Voltamogramas cíclicos foram obtidos como resultados dos processos redox envolvendo espécies que sofrem oxidação, e que são reduzidas quase reversivelmente, durante o percurso catódico em determinados intervalos de velocidade de varredura (FONSECA et al., 2014). Os picos analíticos obtidos como resposta do sistema cíclico são o resultado da depleção oxidativa das moléculas antioxidantes no eletrodo, uma vez que os valores específicos dos potenciais são atingidos. Dessa forma, os potenciais de oxidação possibilitam uma análise comparativa da capacidade antioxidante de diferentes compostos, mesmo que esses apresentem grande semelhança estrutural. Valores baixos de potenciais de oxidação encontrados refletem a alta capacidade de uma determinada molécula em doar elétrons, e assim ter significativa atividade antioxidante (PISOSCHI et al., 2015).

O potencial redox dos compostos F15 e F16 foi avaliado utilizando um terceiro composto, a isobenzofuranona F12, como padrão positivo. O composto F12 foi

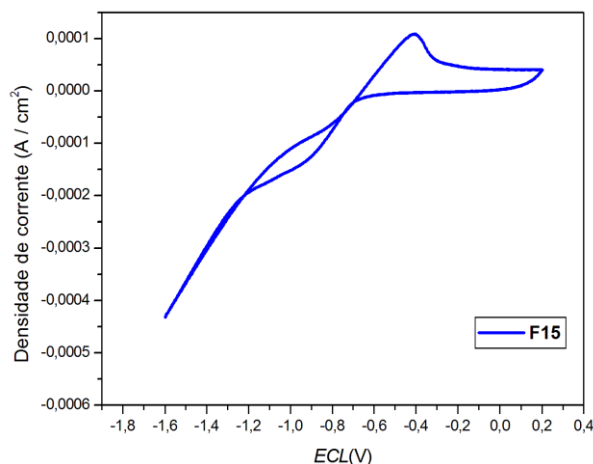


previamente testado pelo nosso grupo de pesquisa e apresentou alto poder antioxidante sobre neurônios hipocampus (RIBEIRO, 2018). Os compostos F12, F15 e F16 apresentam semelhanças químicas e estruturais que os classificam como ftalídicos devido à presença do anel aromático ligado à fração lactona ( $C_8H_6O_2$ ), que serve como estrutura química principal para inúmeros compostos químicos sintéticos. O voltamograma do composto padrão F12, mostrado na figura 21, foi obtido a partir da leitura realizada na faixa de varredura de -1,8 a 0V e 0,1V/segundo como velocidade de varredura.

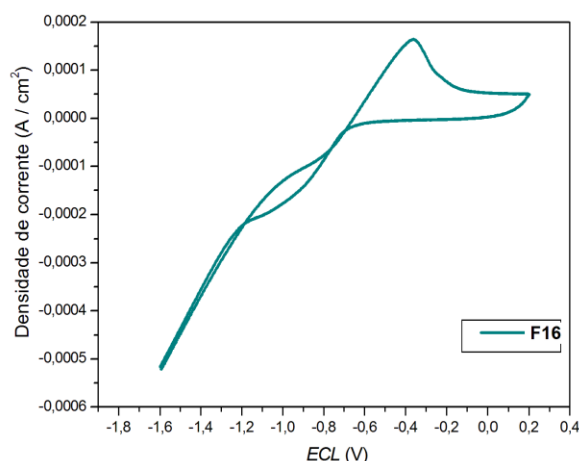
Por meio da análise observou-se um potencial de pico anódico negativo ou potencial de oxidação do composto em -0,43V. Mesmo após o aumento da faixa de varredura não se detectou outro pico, comprovando a existência de apenas um pico de oxidação originando o potencial de oxidação. Os voltamogramas dos compostos F15 e F16 (Figuras 22 e 23), obtidos sob as mesmas condições estabelecidas para o composto F12, apresentaram potenciais de oxidação de -0,41V e -0,36V, respectivamente. Assim, os voltamogramas mostraram que o composto F12 apresentou menor potencial e, conseqüentemente, dentre os compostos avaliados apresentou a maior capacidade antioxidante. O composto F15 apresentou um potencial de oxidação muito próximo ao observado para o composto F12. Já o composto F16 apresentou maior potencial de oxidação comparados aos demais compostos, o que reflete em um menor poder antioxidante. Esses resultados corroboram os ensaios espectrofotométricos realizados *in vitro* e com os resultados apresentados por Ribeiro (2018) para o composto F12.



**Figura 21.** Voltamograma cíclico Densidade de corrente ( $A/cm^2$ ) vs Potencial (E) para o filme do composto F12. A isobensofuran-1(3H)-ona (F12) foi diluída em DMSO formando uma solução  $10.000\mu M$ , em seguida depositada sobre o substrato na superfície contendo o ITO. Após a secagem do filme foi feita a voltametria cíclica utilizando HCl 0,1M como solução eletrolítica e detecção do pico e corrente anódicos. Foi utilizado o programa Origin 6.0 para obtenção dos gráficos.



**Figura 22.** Voltamograma cíclico densidade de corrente ( $A/cm^2$ ) vs Potencial (V) para o filme do composto **F15**. A isobensofuran-1(3H)-ona (F15) foi diluída em DMSO formando uma solução  $10.000\mu M$ , em seguida depositada sobre o substrato na superfície contendo o ITO. Após a secagem do filme foi feita a voltametria cíclica utilizando HCl  $0,1M$  como solução eletrolítica e detecção do pico e corrente anódicos. Foi utilizado o programa Origin 6.0 para obtenção dos gráficos.



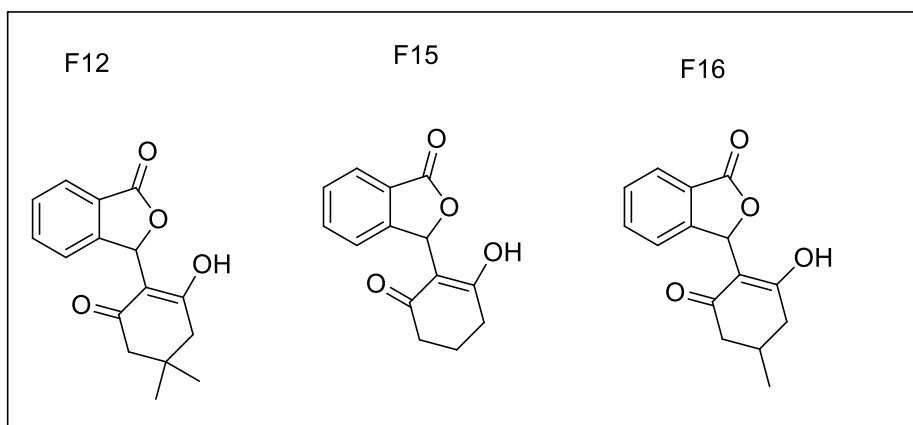
**Figura 23.** Voltamograma cíclico Densidade de corrente ( $A/cm^2$ ) vs Potencial (V) para o filme do composto **F16**. A isobensofuran-1(3H)-ona (F16) foi diluída em DMSO formando uma solução  $10.000\mu M$ , em seguida depositada sobre o substrato na superfície contendo o ITO. Após a secagem do filme foi feita a voltametria cíclica utilizando HCl  $0,1M$  como solução eletrolítica e detecção do pico e corrente anódicos. Foi utilizado o programa Origin 6.0 para obtenção dos gráficos.

Assim, os testes eletroanalíticos (VC) complementaram, por meio dos valores do potencial de oxidação de cada composto, os testes espectrofotométricos realizados para avaliar a capacidade antioxidante desses compostos. Essa associação de técnicas possibilitou uma avaliação mais precisa da atividade neuroprotetiva dos compostos sobre as culturas primárias de neurônios hipocámpais tornando essa conjunção de técnicas uma

possibilidade recomendável e viável em estudos que avaliam o desequilíbrio redox de diferentes compostos.

#### 4.5 Relação estrutura e atividade

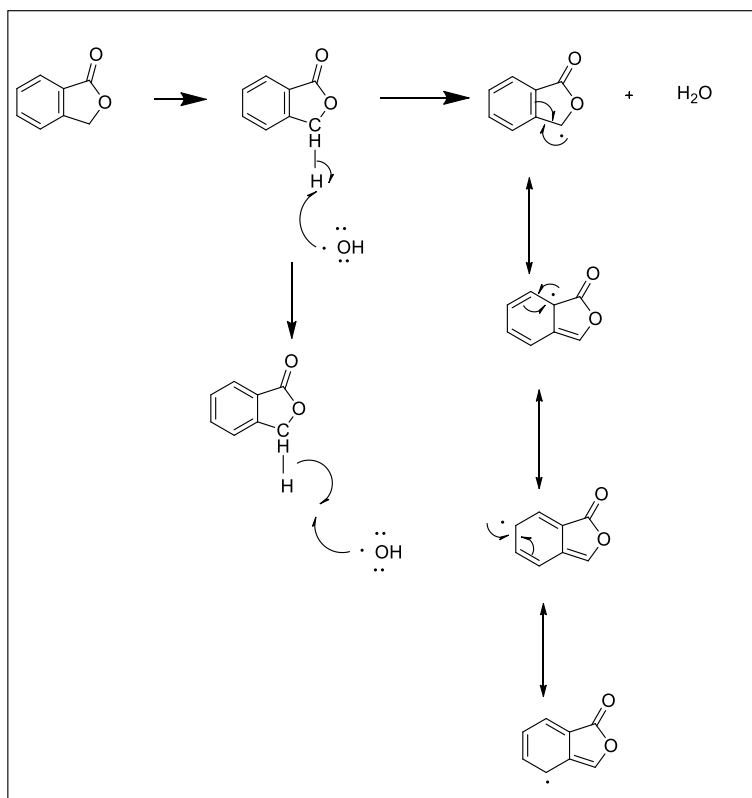
As isobenzofuranonas, principalmente as funcionalizadas na posição C-3 do anel  $\gamma$ -lactona, são uma classe de compostos conhecidos pelas diversificadas atividades biológicas. Estas podem variar conforme a adição de grupos funcionais a locais específicos na molécula, conferindo à mesma atividades antiplaquetária, citotóxica, antagonista do receptor GABA, antimicrobiana, antifúngica e antioxidante (PEREIRA et al., 2015). As isobenzofuranonas estudadas apresentam fórmulas estruturais semelhantes, mas com diferentes substituintes, o que pode acarretar mecanismos de ação distintos. O composto F12, utilizado como padrão positivo para atividade antioxidante, apresenta na posição C-3 do anel lactona um ciclohexeno com duas metilas no C-4' (Figura 24), diferente do composto F15 que não apresenta nenhum substituinte ligado ao C-4', e do composto F16, que apresenta uma metila (R) na posição C-4'.



**Figura 24.** Isobenzofuranonas F12, F15, F16. As moléculas com os substituintes que as diferenciam.

Embora não seja possível correlacionar de forma acurada a capacidade antioxidante dos compostos às suas características estruturais algumas considerações devem ser feitas sobre os mecanismos de ação das isobenzofuranonas sobre o desequilíbrio redox induzido por  $H_2O_2$ . A primeira delas se refere ao grupo benzila, presente em todos os compostos. O grupo benzila apresenta papel importante na atividade antioxidante dos compostos, uma vez que pode reagir principalmente com a forma radicalar hidroxila, altamente tóxica para o organismo. O excesso de radical  $OH^{\bullet}$ ,

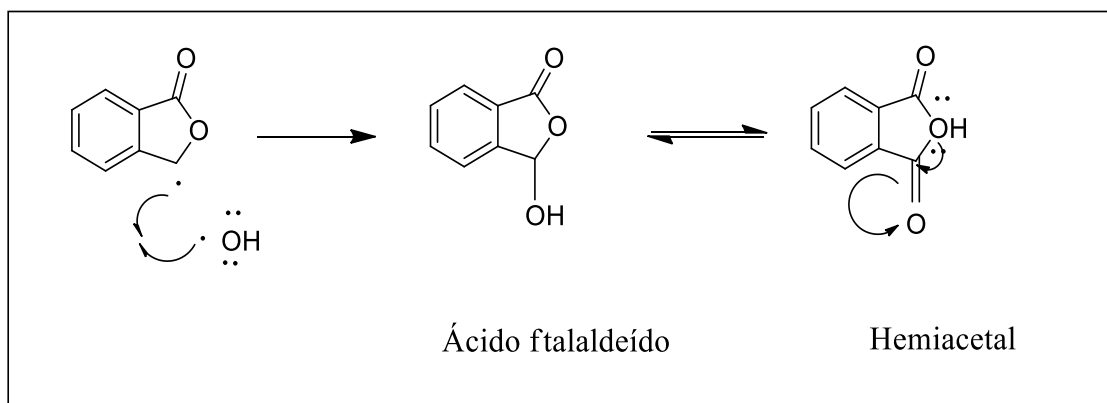
resultante da quebra do  $\text{H}_2\text{O}_2$  *in vitro*, reage diretamente com o grupo benzila em uma reação de compartilhamento de elétrons, formando uma molécula de água e uma estrutura estável que continua realizando o mecanismo de ressonância com o restante da molécula (Figura 25). Dessa forma, a isobenzofuranona conseguiria neutralizar parte dos radicais  $\text{OH}^\bullet$  em excesso no meio intracelular.



**Figura 25. Mecanismo proposto para ação antioxidante dos compostos.** Reação de neutralização do radical  $\text{OH}^\bullet$  gerado a partir da quebra do  $\text{H}_2\text{O}_2$ , levando a formação de uma molécula de água, com consequente diminuição da toxicidade. Também é apresentado o mecanismo de ressonância que promove a estabilidade da molécula.

Outra possibilidade de reação com a forma radicalar  $\text{OH}^\bullet$  seria uma reação de adição nucleofílica (Figura 26). Os aldeídos, presentes nas isobenzofuranonas, são especificamente suscetíveis à adição nucleofílica devido às características estruturais da carbonila ( $\text{C}=\text{O}$ ). Através da reação de adição nucleofílica, o ácido ftalaldeídico formado se encontraria em constante equilíbrio formando uma molécula cíclica, o hemiacetal, que é caracterizado pela presença de um grupo  $-\text{OH}$  e um grupo  $-\text{OR}$  ligados a um mesmo átomo de carbono (SOLOMONS et al., 2000). Assim, o excesso de  $\text{OH}^\bullet$  produzido pela indução do desequilíbrio redox sobre os neurônios, seria utilizado na reação de adição nucleofílica e acoplado à molécula ftalídica.

Além dessas possibilidades o potencial antioxidante dos compostos pode estar associado também à presença de grupos doadores de elétrons na molécula. De acordo com o estudo realizado por Varejão et al. (2014) sobre a capacidade antioxidante de uma classe de rubrolídeos, os compostos que apresentam substituintes com capacidade de retirar elétrons e átomos de hidrogênio do anel benzênico quando substituídos por grupos doadores de elétrons, como hidroxil e metoxil, apresentavam valores de potenciais de redução mais negativos. As isobenzofuranonas também apresentam tais grupos doadores de elétrons que poderiam estar associados à sua atividade antioxidante.



**Figura 26. Segundo mecanismo proposto para ação antioxidante dos compostos.** Reação de neutralização do radical  $\text{OH}^\bullet$  gerado a partir da quebra do  $\text{H}_2\text{O}_2$ , levando à formação do hemiacetal, mais estável e menos tóxico ao organismo.

Diante das considerações baseadas na estrutura química dos compostos, é possível observar que a presença de diferentes substituintes químicos entre os compostos sustenta os diferentes potenciais encontrados e, conseqüentemente, a atividade antioxidante observada *in vitro*. Para relacionar índices eletroquímicos e atividade antioxidante, Yakovleva et al. (2007) subdividiram polifenóis de acordo com suas características estruturais enfatizando a presença de grupos hidroxila e observaram que os compostos que apresentavam um ou mais grupos hidroxil em diferentes posições no anel aromático seriam mais facilmente oxidáveis eletroquimicamente. O mesmo não pôde ser observado entre as isobenzofuranonas estudadas, pois elas não apresentam variação no número de grupos hidroxila, no entanto, acredita-se que devido a sua conhecida influência na cinética das moléculas, os grupos hidroxila atuaram de forma a facilitar a oxidação, protegendo os neurônios dos danos oxidativos. Com isso, podemos endossar a importância da análise cuidadosa de cada composto de acordo com suas modificações

estruturais, pois sua atividade antioxidante é resultado de uma série de efeitos estéricos, mesoméricos e indutivos (SOCHOR et al., 2013; TEIXEIRA et al., 2013).

Considerando os dados obtidos por meio dos métodos espectrofotométricos e eletroanalítico foi observado que um diferencial entre os compostos analisados é a presença de dois grupos metis no C-4' no composto F12. Assim, esse padrão de substituição provavelmente estaria atuando como responsável por potencializar a atividade antioxidante.

#### **4.6 Biodisponibilidade e atividade antioxidante**

Para comparação e análise dos efeitos encontrados *in vitro* e na VC foram utilizados cálculos *in silico* baseados em estudos realizados por Teixeira et al. (2013). Esses cálculos realizados para determinação dos aspectos farmacocinéticos dos compostos corroboraram os resultados encontrados neste trabalho. Um dos parâmetros avaliados foi o valor de cLogP. O cLogP é uma das propriedades moleculares indicativas da determinação da absorção ou baixa permeação, diminuindo a biodisponibilidade da molécula (SANTOS et al., 2017). Para atravessar a membrana celular de forma eficaz deve haver um equilíbrio entre a lipofilicidade e a hidrofilicidade. Moléculas mais lipofílicas tendem a interagir com os fosfolípidios presentes na membrana facilitando o seu transporte para o interior da célula. Moléculas mais hidrofílicas podem não ter a capacidade de atravessar a membrana estando mais propícias a serem degradadas antes de serem metabolizadas e promoverem sua ação farmacológica esperada (GONÇALO, 2011).

Segundo Teixeira et al. (2013), os compostos F12, F15 e F16 apresentaram respectivamente os valores 2,25; 1,78 e 1,98 para cLogP. Esses valores indicam que o composto F12 apresenta maior facilidade para atravessar a membrana plasmática e, conseqüentemente maior biodisponibilidade no interior da célula quando comparado aos compostos F15 e F16, respectivamente. O cLogP de F15 e F16 revelam o caráter mais polar dessas moléculas, o que dificulta a travessia pela membrana plasmática e, conseqüentemente, sua atividade intracelular. Assim, como os três compostos apresentam semelhanças estruturais em suas fórmulas químicas, mas respostas diferentes diante do desequilíbrio redox induzido, acreditamos que a maior ação neuroprotetiva do composto F12 sobre culturas primárias está relacionada à sua biodisponibilidade intracelular. Como o composto F16 e F15 possui o menores valores para cLogP, devido às suas características

mais polares, o mesmo não estaria biodisponível em concentrações adequadas para garantir um efeito antioxidante neuroprotetor.

Os ensaios espectrofotométricos e eletroanalítico foram importantes e complementares na determinação do efeito neuroprotetor dos compostos, de forma que os resultados obtidos pela VC corroboraram os ensaios *in vitro*. Apesar de não ser possível até o momento relacionar de forma precisa as estruturas com seus potenciais de oxidação e sua capacidade antioxidante, foram propostos mecanismos que sugerem essa relação. Com isso, serão necessários novos estudos para melhor compreensão dos mecanismos antioxidantes dos composto analisados.

Diante do que foi exposto, a descoberta de novos compostos com potenciais efeitos antioxidantes é cada vez mais importante para o tratamento de doenças neurodegenerativas. O grupo de compostos estudados, as isobenzofuranonas, apresentaram características favoráveis que os classificam como possíveis candidatos a potenciais antioxidantes. Por essa razão, novos ensaios *in vitro* serão necessários para melhor compreensão dos mecanismos de captação de EROs no meio intracelular com o intuito de acentuar o efeito neuroprotetor assegurando melhores resultados.

#### **4.7 Perspectivas**

Diferentes tempos e concentrações: De acordo com Sánchez-Moreno et al. (1998) deve-se avaliar a atividade antioxidante de uma substância levando em conta a concentração e o tempo necessário que o antioxidante requer para sequestro dos radicais. Por isso, é importante avaliar o antioxidante em concentrações e tempo de ação diferentes. Dessa forma, seria interessante a realização de novos ensaios que avaliem o efeito protetor das isobenzofuranonas em concentrações e tempo de exposição diferentes às células, uma vez que o composto F15 não apresentou toxicidade às células da cultura primária.

Diferença de energia entre os orbitais HOMO e LUMO: Apesar dos resultados das análises espectrofotométricas e eletroanalítica se complementarem, uma abordagem mais completa na compreensão da função de cada substituinte seria por meio da quantificação da diferença de energia entre os orbitais HOMO e LUMO (BRITO et al., 2018). O Orbital Molecular Mais Alto Ocupado (HOMO) e o Orbital Molecular Mais Baixo Desocupado (LUMO) determinam a maneira como uma molécula interage com outras espécies facilitando o estudos de suas atividades biológicas (MAIA et al., 2016).

Espectroscopia de Absorção Óptica: Neste estudo, não foi possível explicar através da VC como esses grupos atuam em cada composto. Mas, através da

espectroscopia de absorção óptica na região do ultravioleta e visível (UV-Vis) pode-se estimar o valor da energia do *gap* óptico para determinar o valor do orbital LUMO. A partir do método descrito por Legnani, (2006), o orbital HOMO, orbital molecular mais alto ocupado, pode ser determinado de forma aproximada através da VC.



## 5. CONCLUSÃO

Diante da análise dos resultados encontrados conclui-se que a isobenzofuranona F15 apresentou características que a classifica como potencial antioxidante com possível ação neuroprotetiva. Embora estruturalmente muito semelhante, o composto F16 não apresentou efeitos neuroprotetores. Essa discordância de atividade biológica pode estar relacionada ao potencial de oxidação de cada composto e, conseqüentemente, ao mecanismo de interação de diferentes substituintes químicos com as espécies reativas de oxigênio geradas pelo desequilíbrio redox.

A associação dos métodos espectrofotométricos convencionais ao método eletroanalítico permitiu a avaliação criteriosa da capacidade antioxidante das isobenzofuranonas F15 e F16. Assim, a conjugação dos diferentes métodos demonstrou ser uma importante estratégia nos estudos que visam avaliar o desequilíbrio redox de compostos candidatos à fármacos para serem usados no tratamento ou prevenção de doenças neurodegenerativas.

Após maiores investigações *in vitro* e *in vivo* sobre ação desses compostos, e avaliação dos parâmetros farmacocinéticos e farmacodinâmicos, espera-se que os compostos sejam candidatos à fármacos para uso no tratamento ou prevenção de doenças neurodegenerativas.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHLEMEYER, B.; BAUMGART-VOGT, E. Optimized protocols for the simultaneous preparation of primary neuronal cultures of the neocortex, hippocampus and cerebellum from individual newborn (P0.5) C57Bl/6J mice. **Journal Of Neuroscience Methods**, [s.l.], v. 149, n. 2, p.110-120, dez. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jneumeth.2005.05.022>.

ALBERIO T.; LOPIANO, L.; FASANO, asanoM. Cellular models to investigate biochemical pathways in Parkinson's disease. **FEBS J** 279:1146-1155, 2012

ALVES, C.Q.; JORGE M. et al. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Química Nova**, Salvador, v. 33, n. 10, p.2202-2210, 20 out. 2010.

ANDREI, V. et al. Simple DPPH-Based Electrochemical Assay for the Evaluation of the Antioxidant Capacity: a Thorough Comparison with Spectrophotometric Assays and Evaluation with Real-World Samples. **Electroanalysis**, [s.l.], v. 26, n. 12, p.2677-2685, 16 out. 2014. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/elan.201400376>.

APPOLINÁRIO, P.P. et al. Metabolismo, oxidação e implicações biológicas do ácido docosahexaenoico em doenças neurodegenerativas. **Química Nova**, [s.l.], v. 34, n. 8, p.1409-1416, 2011. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422011000800021>.

ARIMON, M. et al. Oxidative stress and lipid peroxidation are upstream of amyloid pathology. **Neurobiology Of Disease**, [s.l.], v. 84, p.109-119, dez. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nbd.2015.06.013>. (6)

ASHBURNER, J.; FRISTON, K.J.. Unified segmentation. **Neuroimage**, [s.l.], v. 26, n. 3, p.839-851, jul. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroimage.2005.02.018>.

AYALA, A.; MUÑOZ, M. F.; ARGÜELLES, S. Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. Volume 2014. Doi.org/10.1155/2014/360438.

BALLARD, S. et. al. “Alzheimer’s disease.,” **Lancet**, vol. 377, no. 9770, pp. 1019–31, Mar. 2011.

BENSON, D.L.; WATKINS, F.H.; STEWARD, O.; BANKER, G. Characterization of GABAergic neurons in hippocampal cell cultures. **J. Neurocytol.** 23, 279–295 (1994).

BERG, D.; YOUDIM, M.B.H.; RIEDERER, P. Redox imbalance. **Cell and Tissue Research**, [s.l.], v. 318, n. 1, p.201-213, 10 set. 2004. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00441-004-0976-5>.

BREWER, G. J. et al. . Toward a self-wired active reconstruction of the hippocampal trisynaptic loop: DG-CA3. **Frontiers in Neural Circuits**, v. 7. 165. doi: 10.3389/fncir.2013.00165. Maryland, 2013

BRIGGS, R. Drug treatments in Alzheimer’s disease. **Clinical Medicine**, [si], v. 16, n. 3, p.247-253, set. 2016.

BRITO, A.C.F. de et al. Synthesis, crystal structure, photophysical properties and theoretical studies of a novel bis(phenylisoxazolyl) benzene derivative. **Journal of Molecular Structure**, [s.l.], v. 1163, p.197-204, jul. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molstruc.2018.03.009>.

BRITO, A.C.F. de. Síntese, caracterização e estudo das propriedades fotofísicas de um novo análogo de isoxazol com potencial de aplicação em dispositivos orgânicos optoeletrônicos. 91 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Departamento de Física, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2017.

CARVALHO, T.; REAL, H. Papel da tiamina nas leguminosas vegetais para a prevenção e progressão da doença de Alzheimer. **Revista Nutricias**, Porto, n. 24, p.18-23, mar.

2015.

Disponível em: <[http://www.scielo.mec.pt/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S2182-72302015000100004&lng=pt&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.mec.pt/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S2182-72302015000100004&lng=pt&nrm=iso&tlng=en)>. Acesso em: 08 jun. 2019.

CATLIN, Rachel et al. Using Cultured Mammalian Neurons to Study Cellular Processes and Neurodegeneration: A Suite of Undergraduate Lab Exercises. **The Journal of Undergraduate Neuroscience Education** (june, Geneva, v. 2, n. 14, p.132-137, maio 2016).

CHEN, X. et al. 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein as a fluorescent probe for reactive oxygen species measurement: Forty years of application and controversy. **Free Radical Research**, [s.l.], v. 44, n. 6, p.587-604, Jan, 2010. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.3109/10715761003709802>.

CHOI, J. et al. Oxidative damage of DJ-1 is linked to sporadic Parkinson and Alzheimer diseases. **J. Biol. Chem.** 281, 10816–10824, 2006

CUAJUNGCO, M.P.; LEES, G.J. Zinc metabolism in the brain: relevance to human neurodegenerative disorders. **Neurobiol Dis**, 4:137–169, 1997

DOERING, L. Protocols for Neural Cell Culture. Springer Protocols Handbooks, [s.l.], p.1-395, 2010. **Humana Press**. <http://dx.doi.org/10.1007/978-1-60761-292-6>.

DORNAS, W. C. et al. Flavonóides: potencial terapêutico no estresse oxidativo. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, Ouro Preto, v. 28, n. 3, p.241-249, mar. 2008.

DUNN, A.R.; O'CONNELL, K.M.S.; KACZOROWSKI, C.C. Gene-by-environment interactions in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, [s.l.], v. 103, p.73-80, ago. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neubiorev.2019.06.018>.

EAL, M.F.C. et al. Especificação de cobre e zinco em urina importância dos metais em doenças neurodegenerativas. **Química Nova**, Porto, v. 35, n. 10, p.1985-1990, 31 ago. 2012.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S.. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, [s.l.], v. 43, n. 1, p.61-68, mar. 1997. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1590/s0104-42301997000100014>.

FLORÃO, A. et al. Efeitos do Dimetilsulfóxido sobre a Proliferação de Linfócitos Humanos in vitro. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 26, n. 2, p. 215- 223, 2007.

FONSECA, L. et al. A voltametria cíclica e de varrimento linear unidirecional: suas potencialidades na caracterização de processos de corrosão. **Corros. Prot. Mater**, Lisboa, v. 34, n. 1, p.12-21, jul. 2014.

FORET, M.K. et al. Effect of antioxidant supplements on lipid peroxidation levels in primary cortical neuron cultures. **Free Radical Biology and Medicine**, [s.l.], v. 130, p.471-477, jan. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.11.019>.

FRIDMAN, C. et al. Alterações genéticas na doença de Alzheimer. **Revista Psiquica Clínica**, [si], v. 31, n. 1, p.19-25, set. 2004.

FUKAI, T.; USHIO-FUKAI, M. Superoxide Dismutases: Role in Redox Signaling, Vascular Function, and Diseases. **Antioxidants & Redox Signaling**, [s.l.], v. 15, n. 6, p.1583-1606, 15 set. 2011. Mary Ann Liebert Inc. <http://dx.doi.org/10.1089/ars.2011.3999>.

GALLAND, F. et al. Astrocyte culture models: Molecular and function characterization of primary culture, immortalized astrocytes and C6 glioma cells. **Neurochemistry International**, [s.l.], v. 131, p.104538-104547, dez. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuint.2019.104538>.

GAO, Y. et al. Protective effect of 3-butyl-6-bromo-1(3H)-isobenzofuranone on hydrogen peroxide-induced damage in PC12 cells. **Brain Research**, [s.l.], v. 1358, p.239-247, out. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2010.08.043>.

GEMELLI, T. et al. Estresse oxidativo como fator importante na fisiopatologia da doença de alzheimer. **Revista Uniara**, Porto Alegre, v. 16, n. 1, p.67-78, jun. 2013.

GILGUN-SHERKI, Y. et al. Oxidative stress induced-neurodegenerative diseases: the need for antioxidants that penetrate the blood brain barrier. **Neuropharmacology**, [si], v. 40, n. 1, p.959-975, fev. 2001.

GLADKOV, A. et al. (2017). Design of Cultured Neuron Networks in vitro with Predefined Connectivity Using Asymmetric Microfluidic Channels. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–14.

GONÇALO, C. Estudo comparativo de procedimentos experimentais e computacionais para cálculo da lipofilia molecular. **Saúde & Tecnologia**, São Paulo, v. 1, n. 5, p.29-34, maio 2011.

GORDON J, A.S.; WHITE, M.K. (2013) General overview of neuronal cell culture. **Methods in Mol Biol** 1078:1-8. Doi: 10.1007/978-1-62703-640-51.

HALLIWELL B. Free radicals and antioxidants - quo vadis? **Trends Pharmacol Sciences** 2011;32 :125- 30.

HALLIWELL, B.; GUTTERUDGE, J.M. Free radicals in biology and medicine. Oxford University Press, New York; 1999.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants quo vadis? **Trends In Pharmacological Sciences**, [s.l.], v. 32, n. 3, p.125-130, mar. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tips.2010.12.002>.

HALLIWELL, B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? **Journal Of Neurochemistry**, [s.l.], v. 97, n. 6, p.1634-1658, jun. 2006. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.03907.x>.

HARRISON, F. E.; MAY, J. M. Vitamin C function in the brain: vital role of the ascorbate transporter SVCT2. **Free Radic. Biol. Med.** 46:719–730; 2009.

HUANG, L. et al. From stroke to neurodegenerative diseases: The multi-target neuroprotective effects of 3-n-butylphthalide and its derivatives. **Pharmacological Research**, [s.l.], v. 135, p.201-211, set. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phrs.2018.08.007>.

HUANG, W.J.; ZHANG, X.; CHEN, W.W. Role of oxidative stress in Alzheimer's disease. **Biomedical Reports**, [s.l.], v. 4, n. 5, p.519-522, 15 mar. 2016. Spandidos Publications. <http://dx.doi.org/10.3892/br.2016.630>.

JAKŁTYS, B. et al. Different Cell Viability Assays Reveal Inconsistent Results After Bleomycin Electrotransfer In Vitro. **The Journal Of Membrane Biology**, [s.l.], v. 248, n. 5, p.857-863, 16 jun. 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00232-015-9813-x>.

JOHNSTON, G. A. Advantages of an antagonist: bicuculline and other GABA antagonists. **British Journal of Pharmacology**, [s.l.], v. 169, n. 2, p.328-336, 25 abr. 2013. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/bph.12127>.

KAECH, S.; BANKER, G. Culturing hippocampal neurons. **Nature Protocols**, [s.l.], v. 1, n. 5, p.2406-2415, dez. 2006. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2006.356>.

KANDEL, E.R. In search of memory: the emergence of a new science of mind. New York: Norton. 2006

KORTE, M. et. al. The role of APP and APLP for synaptic transmission, plasticity, and network function: lessons from genetic mouse models. **Exp. Brain Res.**, 2012, 217, (3-4), 435-440.

KUCA, K. et al. Current Approaches Against Alzheimer's Disease in Clinical Trials. **Journal Of The Brazilian Chemical Society**, [s.l.], p.641-649, 2016. Sociedade Brasileira de Quimica (SBQ). <http://dx.doi.org/10.5935/0103-5053.20160048>.

KUMAR-SINGH, S. et al. A idade média de início da doença de alzheimer familiar causada por mutações na presenilina se correlaciona com o aumento da Abeta42 e com a diminuição da Abeta40. **Cantarolar. Mutat**, 2006 27, 686–695.

KWON, S.H. et al. 3',4',7-Trihydroxyflavone prevents apoptotic cell death in neuronal cells from hydrogen peroxide-induced oxidative stress. **Food And Chemical Toxicology**, [s.l.], v. 80, p.41-51, jun. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2015.02.014>.

LANGE, S.C.; BAK, L.K.; WAAGEPETERSEN, H.S.; SCHOUSBOE, A.; NOREMBERG, M.D. 2012. Primary cultures of astrocytes: their value in understanding astrocytes in health and disease. **Neurochem. Res.** 37, 2569–2588. <https://doi.org/10.1007/s11064-012-0868-0>.

LEAL, MFC. et al. Especificação de cobre e zinco em urina: importância dos metais em doenças neurodegenerativas. **Química Nova**, [s.l.], v. 35, n. 10, p.1985-1990, 2012. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422012001000018>.

LÓPEZ, E. et al. Cadmium induces reactive oxygen species generation and lipid peroxidation in cortical neurons in culture. **Free Radical Biology And Medicine**, [s.l.], v. 40, n. 6, p.940-951, mar. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2005.10.062>.

LEGNANI, C. Produção e caracterização de dispositivos orgânicos eletroluminescentes (OLEDs) baseados em complexos supramoleculares. 213 f. Tese (Doutorado em Física). Departamento de Física, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2006.



LIMA, E., SAES, D., ABDALLA, P. & ABDALLA, D. (2001). Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Revista Brasileira Ciências Farmacêuticas**. 37.

LIN, G. et al. Chemistry and biological activities of naturally occurring phthalides. *Bioactive Natural Products (part L)*, [s.l.], p.611-669, 2005. Elsevier. [http://dx.doi.org/10.1016/s1572-5995\(05\)80065-1](http://dx.doi.org/10.1016/s1572-5995(05)80065-1).

LUCATELLI, J.F. Influência genética sobre a doença de Alzheimer de início precoce. **Revista Psiquica Clínica**, [si], v. 36, n. 1, p.25-30, maio 2009.

ŁUCZAJ, W.; GĘGOTEK, A.; SKRZYDLEWSKA, E. Antioxidants and HNE in redox homeostasis. **Free Radical Biology And Medicine**, [s.l.], v. 111, p.87-101, out. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.11.033>.

MA, F. et al. Antiplatelet activity of 3-butyl-6-bromo-1(3H)-isobenzofuranone on rat platelet aggregation. **Journal of Thrombosis and Thrombolysis**, [s.l.], v. 33, n. 1, p.64-73, 6 nov. 2011. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11239-011-0647-9>.

MAIA, A.F.S. et al. Synthesis, molecular properties prediction and cytotoxic screening of 3-(2-aryl-2-oxoethyl)isobenzofuran-1(3 H )-ones. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, [s.l.], v. 26, n. 12, p.2810-2816, jun. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2016.04.065>.

MARLATT, M.; LUCASSEN, P. Neurogenesis and Alzheimers Disease: Biology and Pathophysiology in Mice and Men. **Current Alzheimer Research**, [s.l.], v. 7, n. 2, p.113-125, 1 mar. 2010. Bentham SciencePublishersLtd.. <http://dx.doi.org/10.2174/15672051079069136>.

MATOS, A.M. Detecção das Alterações Estruturais e Funcionais para a doença de Alzheimer. 2013. 110 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Física, Departamento de Física, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Coimbra, 2013.

MEDICAL ENCYCLOPEDIA, "Alzheimer's disease," PubMed Health, 2011.[Online]. Available:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMH000176>. [Accesso em: 05 Jun 2013].

MEGANATHAN, P.; FU, J. Biological Properties of Tocotrienols: Evidence in Human Studies. **International Journal Of Molecular Sciences**, [s.l.], v. 17, n. 11, p.1682-1693, 26 out. 2016. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms17111682>.

MEHANNA, C.; BAUDOUIN, C.; BRIGNOLE-BAUDOUIN, F. Spectrofluorometry assays for oxidative stress and apoptosis, with cell viability on the same microplates: A multiparametric analysis and quality control. **Toxicology In Vitro**, [s.l.], v. 25, n. 5, p.1089-1096, ago. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2011.03.007>.

MENDEZ-ALVAREZ E.; SOTO-OTERO R; HERMIDA-AMEIJEIRAS A.; LOPEZ-REAL A.M.; LABANDEIRA-GARCIA J.L. (2002). Effects of aluminum and zinc on the oxidative stress caused by 6-hydroxydopamine autoxidation: relevance for the pathogenesis of Parkinson's disease. **Biochim Biophys Acta** 1586:155–168.

MENG, D. et al. Detection of cellular redox reactions and antioxidant activity assays. **Journal Of Functional Foods**, [s.l.], v. 37, p.467-479, out. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2017.08.008>.

MILLER G. (2010), Is pharma running out of brainy ideas? **Science** 329: 502–504.

MOHAMMAD, N.; BABAK, P.; GHOLAMREZA-NIKBAKHT, B. Evaluation of a new lymphocyte proliferation assay based on cyclic voltammetry; an alternative method. **Scientific Reports**, 9:4503. 2019.

MORADI, E. et al. Supervised pathway analysis of blood gene expression profiles in Alzheimer's disease. **Neurobiology Of Aging**, [s.l.], v. 84, p.98-108, dez. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2019.07.004>.

NIXON, R.A. Amyloid precursor protein and endosomal–lysosomal dysfunction in Alzheimer’s disease: inseparable partners in a multifactorial disease. **The FASEB Journal**, [s.l.], v. 31, n. 7, p.2729-2743, jul. 2017. FASEB. <http://dx.doi.org/10.1096/fj.201700359>.

NYLANDER, E. et al. Growth hormone increases dendritic spine density in primary hippocampal cell cultures. **Growth Hormone & Igf Research**, [s.l.], v. 50, p.42-47, fev. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ghir.2019.12.003>

OBOUDIYAT, C. et al. Alzheimer's Disease. *Seminars in Neurology*, [s.l.], v. 33, n. 04, p.313-329, 14 nov. 2013. **Georg Thieme Verlag KG**. <http://dx.doi.org/10.1055/s-0033-1359319>.

PARK, Y.H. et al. Dysregulated Fc gamma receptor–mediated phagocytosis pathway in Alzheimer's disease: network-based gene expression analysis. **Neurobiology Of Aging**, [s.l.], p.1-9, dez. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2019.12.001>.

PEDRINI, S. et al. ALS-linked mutant SOD1 damages mitochondria by promoting conformational changes in Bcl-2. **Human Molecular Genetics**, [s.l.], v. 19, n. 15, p.2974-2986, 11 maio 2010. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/hmg/ddq202>.

PEREIRA, W. et al. The Antileishmanial Potential of C-3 Functionalized Isobenzofuranones against Leishmania (Leishmania) Infantum Chagasi. *Molecules*, [s.l.], v. 20, n. 12, p.22435-22444, 14 dez. 2015. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules201219857>.

PISOSCHI, A.M.; CIMPEANU, C.; PREDOI, G. Electrochemical Methods for Total Antioxidant Capacity and its Main Contributors Determination: A review. **Open Chem.**, Romania, v. 13, n. 13, p.824-856, maio 2015.

PISOSCHI, A.M.; POP, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 97, p.55-74, jun. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.04.040>.

POHANKA\*, M. Alzheimer's Disease and Oxidative Stress: A Review. **Current Medicinal Chemistry**, Republic Czech, v. 21, n. 3, p.356-364, 2014.

RAHMAN, M. M.; GRAY, A.I. A benzoisofuranone derivative and carbazole alkaloids from *Murraya koenigii* and their antimicrobial activity. **Phytochemistry**, [s.l.], v. 66, n. 13, p.1601-1606, Jul. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2005.05.001>.

REED, T. T. Lipid peroxidation and neurodegenerative disease. **Free Radical Biology And Medicine**, [s.l.], v. 51, n. 7, p.1302-1319, out. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.06.027>.

REEDY, P.H. Abnormal tau, mitochondrial dysfunction, impaired axonal transport of mitochondria, and synaptic deprivation in Alzheimer's disease. **Brain Res.**, 2011, 1415, 136-148.

REGUEIRO, J. et al. Toxicity evaluation of new agricultural fungicides in primary cultured cortical neurons. **Environmental Research**, [s.l.], v. 140, p.37-44, jul. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envres.2015.03.013>.

REIMER, D. L.; BAILLEY, J.; SINGH, S. M. Complete cDNA and 5' Genomic Sequences and Multilevel Regulation of the Mouse Catalase Gene. **Genomics**, [s.l.], v. 21, n. 2, p.325-336, maio 1994. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1006/geno.1994.1273>.

RIBEIRO, I.M.L. Avaliação in vitro da atividade protetora de isobenzofuran-1 (3h)-onas sintéticas sobre cultura primária de neurônios hipocámpais submetidos ao estresse oxidativo. 2018. 75 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Enfermagem, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2018.

RISS T.L.; MORAVEC R.A.; NILES A.L.; et al. Cell Viability Assays. 2013 May 1 [Updated 2016 Jul 1]. In: Sittampalam GS, Coussens NP, Brimacombe K, et al., editors. Assay Guidance Manual [Internet]. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004.

ROBINSON, D. M; KEATING, G. M. M. a review of its use in Alzheimer's disease. **Drugs**, [s.l.], v. 66, n. 11, p.1515-1534, 2006. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.2165/00003495-200666110-00015>.

ROTERMUND, C.; MACHETANZ, G.; FITZGERALD, J. C.. The Therapeutic Potential of Metformin in Neurodegenerative Diseases. **Frontiers In Endocrinology**, [s.l.], v. 9, p.1-26, 19 jul. 2018. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fendo.2018.00400>

ROY, D. S. et al. (2016). Memory retrieval by activating engram cells in mouse models of early Alzheimer's disease. **Nature**, v. 531, n. 7595, p. 508–512.

RUSSELL, J. B. **Química geral**. 2. ed. São Paulo: Makron Books, 1994. V. 1,2.

SALOMONE, S. et al. New pharmacological strategies for treatment of Alzheimer's disease: focus on disease modifying drugs. **British Journal Of Clinical Pharmacology**, [s.l.], v. 73, n. 4, p.504-517, 12 mar. 2012. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2125.2011.04134.x>.

SÁNCHEZ-MORENO, C.; LARRAURIarrauri, J. A.; SAURA-CALIXTOaura-Calixto, F.; **J. Sci. Food Agric**. 1998, 76, 270; Sánchez-Moreno, C.; Larrauri, J. A.; **Food Sci. Technol. Int.** 1998, 4, 391.

SANTOS, V.; GONSALVES, A.; ARAÚJO, C. Abordagem didática para o desenvolvimento de moléculas bioativas: regra dos cinco de lipinski e preparação de heterociclo 1,3,4-oxadiazol em forno de micro-ondas doméstico. **Química Nova**, [s.l.], p.110-115, 2017. Sociedade Brasileira de Química (SBQ). <http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170135>.

SIES H. Oxidative stress: From basic research to clinical application. **Am J Med** 1991; 91:31S-8S.

SIES, H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. **Redox Biology**, [s.l.], v. 4, p.180-183, abr. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2015.01.002>.

SILVA, L.R. da; FERREIRA, M.M.C. Estudo do coeficiente de partição octanol-água de bifenilas policloradas (PCBs) utilizando parâmetros topológicos. **Química Nova**, [s.l.], v. 26, n. 3, p.312-318, maio 2003. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422003000300005>.

SKEVA, E.; GIROUSI, S. A study of the antioxidative behavior of phenolic acids, in aqueous herb extracts, using a dsDNA biosensor. **Open Chemistry**, [s.l.], v. 10, n. 4, p.1280-1289, 1 Jan. 2012. Walter de Gruyter GmbH. <http://dx.doi.org/10.2478/s11532-012-0051-0>.

SMALL S.A.; DUFF, K. Linking Abeta and tau in late-onset Alzheimer's disease: a dual pathway hypothesis. **Neuron** 2008; 60: 534–42.

SOCHOR, J. et al. Electrochemistry as a Tool for Studying Antioxidant Properties. **International Journal of Electrochemical Science**, Czech Republic, v. 4, n. 8, p.8464-8489, jun. 2013.

SOLOMONS, T.W.G.; FRYHLE, C.B. **Química Orgânica**, vol. 1 e 2, 7ª edição, Editora LTC, 2000.

TAMBUNAN, U.S.F.; BRAMANTYA, N.; PARIKESIT, A.A. In silico modification of suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) as potential inhibitor for class II histone deacetylase (HDAC). **BMC Bioinformatics** 2011, 12, S13–S23.

TEIXEIRA, J. et al. Hydroxycinnamic Acid Antioxidants: An Electrochemical Overview. **Biomed Research International**, [s.l.], v. 2013, p.1-11, 2013. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/251754>.

TEIXEIRA, R. et al. Synthesis and Antiproliferative Activity of C-3 Functionalized Isobenzofuran-1(3H)-ones. **Molecules**, [s.l.], v. 18, n. 2, p.1881-1896, 1 fev. 2013. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules18021881>.

TOPPO, S. et al. Evolutionary and Structural Insights Into the Multifaceted Glutathione Peroxidase (Gpx) Superfamily. **Antioxidants & Redox Signaling**, Italy, v. 10, n. 9, p.1501-1513, set. 2008.

TRABER, M. G.; STEVENS, J. F. Vitamins C and E: Beneficial effects from a mechanistic perspective. **Free Radical Biology And Medicine**, [s.l.], v. 51, n. 5, p.1000-1013, set. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.05.017>.

TROMPIER, D. et al. Brain peroxisomes. **Biochimie**, [s.l.], v. 98, p.102-110, mar, 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2013.09.009>.

UTTARA, B. et al. Oxidative Stress and Neurodegenerative Diseases: A Review of Upstream and Downstream Antioxidant Therapeutic Options. **Current Neuropharmacology**, Itália, v. 7, n. 1, p.65-74, maio 2009.

VAREJAO, J. O.S. et al. Voltammetric and Theoretical Study of the Redox Properties of Rubrolide Analogues. **Electrochimica Acta**, [s.l.], v. 120, p.334-343, fev. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.electacta.2013.12.053>.

VIEZBICKE, B. D. et al. Evaluation of the Tauc method for optical absorption edge determination: ZnO thin films as a model system. **Physica Status Solidi (B)**, v. 252, n. 8, p. 1700-1710, 2015.

XU, L. et al. 3-butyl-6-fluoro-1 (3H)-isobenzofuranone, a derivative of dl-n-butylphthalide, attenuates hydrogen peroxide-induced damage in PC12 cells. **Drug Development Research**, [s.l.], v. 72, n. 3, p.259-264, 7 out. 2010. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/ddr.20393>.

YAKOVLEVA, K. E. et al. Characterization of plant phenolic compounds by cyclic voltammetry. **Applied Biochemistry and Microbiology**, [s.l.], v. 43, n. 6, p.661-668, nov. 2007. Pleiades Publishing Ltd. <http://dx.doi.org/10.1134/s0003683807060166>.

ZHANG, Lixiao et al. Biochemical basis and metabolic interplay of redox regulation. **Redox Biology**, [s.l.], v. 26, p.101-284, set. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2019.101284>.