

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO

INSTITUTO DE QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

DISSERTAÇÃO

AValiação DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE
DERIVADOS TRIAZÓLICOS INIBIDORES DA
ACETILCOLINESTERASE EM CÉLULAS DE *Saccharomyces*
cerevisiae

Daniel Cosme Neves Grillo

Seropédica

2022



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

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE
DERIVADOS TRIAZÓLICOS INIBIDORES DA
ACETILCOLINESTERASE EM CÉLULAS DE
*Saccharomyces cerevisiae***

DANNIEL COSME NEVES GRILLO

Orientador

Prof. DSc. Cristiano Jorge Riger

Co-orientador

Prof. DSc. Arthur Eugen Kümmerle

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Química**, no Programa de Pós-Graduação em Química, Área de concentração Química

Seropédica, RJ
Setembro de 2022

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro Biblioteca Central / Seção de
Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

G859a Grillo, Danniel Cosme Neves, 1992-
Avaliação do potencial antioxidante de derivados
triazólicos inibidores da acetilcolinesterase em células de
Saccharomyces cerevisiae / Danniel Cosme Neves Grillo. -
Seropédica, RJ: 2022. 89 f.: il.

Orientador: Cristiano Jorge Riger.
Coorientador: Arthur Eugen Kümmerle. Dissertação(Mestrado).
-- Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Programa de
Pós-Graduação em Química, 2022.

1. Doença de Alzheimer. 2. Antioxidante. 3. *Saccharomyces
cerevisiae*. 4. Derivados triazóis. 5. Estresse Oxidativo. I. Riger,
Cristiano Jorge, 1972-,orient. II. Kümmerle, Arthur Eugen, 1979-
coorient. III Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
Programa de Pós-Graduação em Química. IV. Título.

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

DANNIEL COSME NEVES GRILLO

Dissertação submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Química, no Programa de Pós-Graduação em Química, Área de concentração Química.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 15/09/2022

Membros da banca:

Cristiano Jorge Riger
(Dr.) UFRRJ

Daniela Cosentino Gomes
(Dr^a) UFRRJ

Marcos Dias Pereira
(Dr.) UFRJ



Emitido em 16/09/2022

TERMO Nº 1002/2022 - PPGQ (12.28.01.00.00.60)

(Nº do Protocolo: NÃO PROTOCOLADO)

(Assinado digitalmente em 17/09/2022 17:13)

CRISTIANO JORGE RIGER
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DBQ (11.39.00.24)
Matrícula: 1844240

(Assinado digitalmente em 19/09/2022 08:47)

DANIELA COSENTINO GOMES
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DBQ (11.39.00.24)
Matrícula: 3145590

(Assinado digitalmente em 17/09/2022 13:19)

MARCOS DIAS PEREIRA
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 070.325.537-10

Para verificar a autenticidade deste documento entre em <https://sipac.ufrrj.br/documentos/> informando seu número:
1002, ano: **2022**, tipo: **TERMO**, data de emissão: **16/09/2022** e o código de verificação: **f16a8808b0**

AGRADECIMENTOS

Ao longo da minha graduação aprendi que não nos formamos sozinhos. Durante o mestrado constatei que uma dissertação não é uma realização solitária. Por trás de um trabalho acadêmico, existe o esforço desmedido dos pais; o apoio e paciência da parceira(o); o incentivo e curiosidade dos amigos; a ajuda e companheirismo dos colegas de laboratório; e os ensinamentos e generosidade do orientador. Sou um privilegiado por ter pessoas incríveis ao meu lado nessa dura e difícil caminhada que é a pós-graduação, ainda mais em um país que insiste em maltratar a educação e a ciência.

Gostaria de agradecer à minha família por todo carinho e afeto que recebi sempre. Meus padrinhos, Rita e João; minha tia Hortência e meus primos Eduardo, Daniele, Alex, Aline, Beatriz, Flora e Livia sempre presentes e grandes incentivadores dessa jornada, mas em especial agradecer aos meus pais, Inês e Luís que além de incrivelmente amorosos, me ensinaram a dedicação máxima, a resiliência e o respeito seja para quem ou para o que amamos. Sem vocês não teria chegado tão longe. Tenho orgulho de tê-los como pais. Não posso deixar de mencionar minha querida vó Glória que deixa muita saudade. Penso em você todos os dias.

À minha esposa, Madalena, que sempre acreditou em mim, enxergou meu potencial e nos momentos mais difíceis esteve do meu lado. Obrigado por dividir sua jornada comigo e me ensinar tanto em todos esses anos. Sou cada dia mais forte com você ao meu lado.

Às crianças da minha vida: minha sobrinha Giovana e meus afilhados Heitor e Maria Eduarda. Obrigado por tornar minha vida mais leve.

Aos meus amigos de longa data: Hilton, Ivan, Priscila, Victor, Dandara, Sara, Matheus, Thiane, Marlos, Jonathan e Danielle. A amizade de vocês e a alegria sincera que recebo a cada passo que dou na minha vida é fundamental para que eu continue na luta.

Aos amigos que conquistei na graduação e no maravilhoso laboratório 24: Rafael, Nathally, Lucas, William, Rodrigo, Edlene, Nathália, Tamires, Aline, Jéssica, João, Douglas, Marina, Karine, Bárbara e Marcos. Meu crescimento e amadurecimento científico só foram possíveis observando e aprendendo a cada apresentação, a cada experimento e a cada conselho. Obrigado por tudo.

Ao meu querido orientador e amigo Cristiano Jorge Riger, obrigado por ser esse mestre incrivelmente inteligente, humano e generoso em compartilhar e ouvir. Com você aprendi muito mais do que pesquisa científica. Se um dia eu for 10% do professor que você é, serei um grande profissional. Tenho orgulho de ser seu aluno.

Ao meu co-orientador Arthur Eugen Kümmerle por sempre apoiar e acreditar em mim e neste trabalho.

Agradeço às agências de fomento CAPES e CNPq por apoiar o Programa de Pós-Graduação em Química da UFRRJ.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

RESUMO

GRILLO, Dannel Cosme Neves. **Avaliação do potencial antioxidante de derivados triazólicos inibidores da acetilcolinesterase em células de *Saccharomyces cerevisiae***. 2022. 89p. Dissertação de mestrado (Mestrado em Química, Química Medicinal e Biológica). Instituto de Química. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2022.

A Doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurodegenerativa progressiva conhecida pela perda de memória e dificuldade com a linguagem. Ela é formada por um conjunto de fatores patológicos e dentre eles destacam-se o déficit colinérgico e o estresse oxidativo. O estresse oxidativo é caracterizado pelo desequilíbrio entre a geração de radicais livres e/ou espécies reativas não radicalares e a atuação dos sistemas de defesa antioxidante. Atualmente, o principal tratamento da doença de Alzheimer consiste no uso de inibidores das enzimas colinesterásicas. Entretanto, devido à natureza multifatorial da doença e de muitos candidatos a fármacos não terem sido bem-sucedidos, uma nova abordagem tem se destacado, os chamados compostos “multialvos”. Portanto, este trabalho avaliou a proteção antioxidante de quatro compostos novos contendo o núcleo 3-amino-1,2,4-triazol-N-1,5-trissubstituídos inibidores de colinesterases em duas cepas de *Saccharomyces cerevisiae* (BY4741 e $\Delta gsh1$) com estresse oxidativo induzido por peróxido de hidrogênio. Analisou-se inicialmente a toxicidade dos compostos através do ensaio semi-qualitativo com resazurina e de curvas de crescimento celular. Os ensaios antioxidantes foram TBARS e oxidação intracelular por 2,7'-diclorofluoresceína. No ensaio da resazurina não houve toxicidade dos compostos nas duas cepas em concentrações inferiores a 250 μM . As curvas de crescimento confirmaram essa não toxicidade na concentração de 20 μM dos compostos por 24h. Na cepa BY4741 todos os compostos reduziram os níveis de MDA entre 30-40%, entretanto na cepa $\Delta gsh1$ apenas os compostos contendo substituintes fenólicos foram ativos (25%). Na avaliação de proteção ao ambiente intracelular, apenas na cepa $\Delta gsh1$ em fase fermentativa do crescimento houve redução significativa de espécies oxidantes promovidas pelos compostos, com destaque ao composto com substituinte nitro (27%). No ensaio de consumo de oxigênio não foi possível concluir a capacidade de proteção mitocondrial das substâncias, pois não houve diferença estatística entre os tratamentos, em ambas as cepas. Os resultados demonstraram que os triazóis não foram tóxicos e forneceram proteção antioxidante mesmo com ausência de glutatona em células de *S. cerevisiae*.

Palavras-chave: Doença de Alzheimer, antioxidante, *Saccharomyces cerevisiae*, derivados triazóis, estresse oxidativo

ABSTRACT

GRILLO, Dannel Cosme Neves. **Evaluation of the antioxidant potential of acetylcholinesterase inhibitory triazole derivatives in *Saccharomyces cerevisiae* cells.** 2022. 89p. Dissertation (Master of Science in Chemistry, Medicinal and Biological Chemistry). Chemistry Institute. Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2022.

Alzheimer's Disease (AD) is a progressive neurodegenerative disease known for memory loss and difficulty with language. It is formed by pathological factors, among which the cholinergic deficit and oxidative stress stand out. Oxidative stress is characterized by the imbalance between the generation of free radicals and/or non-radical reactive species and the action of antioxidant defense systems. Currently, the primary treatment for Alzheimer's disease is the use of inhibitors of cholinesterase enzymes. However, due to the multifactorial nature of the disease and the fact that many drug candidates have not been successful, a new approach has emerged, the so-called "multi-target" compounds. Therefore, this work evaluated the antioxidant protection of four new compounds containing the core 3-amino-1,2,4-triazole-N-1,5-trisubstituted cholinesterase inhibitors in two strains of *Saccharomyces cerevisiae* (BY4741 and $\Delta gsh1$) with oxidative stress induced by hydrogen peroxide. The toxicity of the compounds was initially analyzed through the semi-qualitative assay with resazurin and cell growth curves. Antioxidant assays were TBARS and intracellular oxidation by 2,7'-dichlorofluorescein. In the resazurin assay, there was no toxicity of the compounds in the two strains at concentrations below 250 μM . The growth curves confirmed this non-toxicity in the concentration of 20 μM of the compounds for 24h. In strain BY4741 all compounds reduced MDA levels between 30-40%, however in strain $\Delta gsh1$ only compounds containing phenolic substituents were active (25%). In the evaluation of protection to the intracellular environment, only in the $\Delta gsh1$ strain in the fermentative phase of growth, there was a significant reduction of oxidant species promoted by the compounds, with emphasis on the compound with nitro substituent (27%). In the oxygen consumption test, it was not possible to conclude the mitochondrial protection capacity of the substances, as there was no statistical difference between treatments, in both strains. The results demonstrated that triazoles were not toxic and provided antioxidant protection even in the absence of glutathione in *S. cerevisiae* cells.

Keywords: Alzheimer's disease, antioxidant, *Saccharomyces cerevisiae*, triazole derivatives, oxidative stress.

ÍNDICE DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Projeção mundial de portadores de demência. (SAWYER II, 2018, adaptado).	4
Figura 2. Projeção dos custos da demência causada pelo Alzheimer nos Estados Unidos (ALZHEIMER'S ASSOCIATION <i>et al.</i> , 2021).	5
Figura 3. Processamento da Proteína Precursora Amiloide (APP). BACE-1: β -secretase; APP: proteína precursora amiloide; β -CTF: fragmento do terminal C (DELANOGARE <i>et al.</i> , 2009).	7
Figura 4. Processo de hiperfosforilação da proteína tau (CÂMARA, 2018).....	8
Figura 5. Síntese e reciclagem da acetilcolina na sinapse (Disponível em: < https://escolaeducacao.com.br/acetilcolina/ >. Acesso em: 20/04/2022).	9
Figura 6. Sinapse colinérgica na presença de um inibidor colinesterásico (FRANCO, 2020).	10
Figura 7. Estrutura química dos 1,2,3-triazóis e 1,2,4-triazóis e respectivos tautômeros (SILVA, 2013).	13
Figura 8. Estratégias sintéticas descritas para a síntese de 3-amino-1,2,4-triazóis-N-1,5-trissubstituídos (FRANCO, 2020).	16
Figura 9. Planejamento da série dos 3-amino-1,2,4-triazóis-N-1,5-trissubstituídos (89a-d) (SANTOS <i>et al.</i> , 2019; FRANCO, 2020).	16
Figura 10. Planejamento estrutural da nova série dos 3-amino-1,2,4-triazóis-N-1,5-trissubstituídos (90a-aa) (SANTOS <i>et al.</i> , 2019; FRANCO, 2020).	17
Figura 11. Compostos avaliados no presente estudo: 90B (superior esquerdo); 90C (superior direito); 90N (inferior esquerdo) e 90R (inferior direito) (FRANCO, 2020).	17
Figura 12. Esquematização da produção de espécies reativas de oxigênio pela cadeia de transporte (LAMBERTUCCI, 2009).	18
Figura 13. Ação antioxidante da quercetina (KATZ; DOUGHTY; ALI, 2011). ...	24
Figura 14. Fases de crescimento da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (BUSTI <i>et al.</i> , 2010, adaptado).	25
Figura 15. Representação esquemática da conversão por oxirredução do corante resazurina para resorufina por células metabolicamente ativas (CANABARRO, 2017).	30
Figura 16. Reação entre malonaldeído (MDA) e o ácido tiobarbitúrico (TBA) formando o complexo MDA-TBA detectável no espectrofotômetro a 532 nm (DESAI FARRIS; RAY, 2014).	32
Figura 17. Reação geral da formação da diclorofluoresceína (DCF) detectável através do fluorímetro (NG; OOI, 2021, adaptado).	33

Figura 18. Exemplo de gráfico de consumo de oxigênio obtido neste trabalho. Ensaio com células da cepa BY4741 (Autoria própria).	34
Figura 19. Teste de toxicidade com a resazurina utilizando a cepa BY4741. Diferentes concentrações em micromolar na parte superior da imagem dos compostos 90B (A); 90C (B) 90N (C) e 90R (D). Poço controle com células com metabolismo ativo (F12).	35
Figura 20. Teste de toxicidade com a resazurina utilizando a cepa <i>Δgsh1</i> . Diferentes concentrações em micromolar na parte superior da imagem dos compostos 90B (A); 90C (B) 90N (C) e 90R (D). Poço controle com células com metabolismo ativo (F12).	36
Figura 21. Curvas de crescimento utilizando as cepas BY4741 e <i>Δgsh1</i> . Concentrações celulares obtidas após a exposição das células aos compostos 90B, 90C, 90N e 90R na concentração de 20 μM durante 24 horas. Os resultados representam a média de pelo menos três experimentos independentes, com $p < 0,05$ na análise de ANOVA <i>one way</i> seguida de pós teste de Tukey.	39
Figura 22. Quantificação da peroxidação lipídica nas cepas BY4741 e <i>Δgsh1</i> em metabolismo respiratório. Os compostos 90B, 90C, 90N, 90R e quercetina nas concentrações de 20 μM permaneceram em contato com as células de <i>S. cerevisiae</i> por 2 horas antes de um estresse oxidativo por peróxido de hidrogênio (1,0 mM) por mais 1 hora. Tratamento controle são células não estressadas encubadas em solução tampão fosfato. Os resultados representam a média de pelo menos três experimentos independentes e foram expressos em porcentagem em função do tratamento com H ₂ O ₂ (células estressadas sem tratamento com os compostos). Hashtags iguais mostram resultados estatisticamente semelhantes ($p < 0,05$) na análise de ANOVA <i>one way</i> seguida de pós teste de Tukey.	42
Figura 23. Quantificação da peroxidação lipídica na cepa BY4741 em metabolismo fermentativo. Os compostos 90B, 90C, 90N, 90R e quercetina nas concentrações de 20 μM permaneceram em contato com as células de <i>S. cerevisiae</i> por 2 horas antes de um estresse oxidativo por peróxido de hidrogênio (1,0 mM) por mais 1 hora. Tratamento controle são células não estressadas encubadas em solução tampão fosfato. Os resultados representam a média de pelo menos três experimentos independentes e foram expressos em porcentagem em função do tratamento com H ₂ O ₂ (células estressadas sem tratamento com os compostos). Hashtags iguais mostram resultados estatisticamente semelhantes ($p < 0,05$) na análise de ANOVA <i>one way</i> seguida de pós teste de Tukey.	43

Figura 24. Quantificação da peroxidação lipídica na cepa *Δgsh1* em metabolismo fermentativo. Os compostos 90B, 90C, 90N, 90R e quercetina nas concentrações de 20 μM permaneceram em contato com as células de *S. cerevisiae* por 2 horas antes de um estresse oxidativo por peróxido de hidrogênio (1,0 mM) por mais 1 hora. Tratamento controle são células não estressadas encubadas em solução tampão fosfato. Os resultados representam a média de pelo menos três experimentos independentes e foram expressos em porcentagem em função do tratamento com H₂O₂ (células estressadas sem tratamento com os compostos). Hashtags iguais mostram resultados estatisticamente semelhantes ($p < 0,05$) na análise de ANOVA *one way* seguida de pós teste de Tukey. 44

Figura 25. Níveis de oxidação intracelular avaliados na cepa BY4741 em metabolismos fermentativo e respiratório. Os compostos 90B, 90C, 90N, 90R e quercetina nas concentrações de 20 μM permaneceram em contato com as células de *S. cerevisiae* por 2 horas antes de um estresse oxidativo por peróxido de hidrogênio (2,0 mM) por mais 1 hora. Tratamento controle são células não estressadas encubadas em solução tampão fosfato. Os resultados representam a média de pelo menos três experimentos independentes e foram expressos em porcentagem em função do tratamento com H₂O₂ (células estressadas sem tratamento com os compostos). Hashtags diferentes mostram resultados estatisticamente distintos ($p < 0,05$) na análise de ANOVA *one way* seguida de pós teste de Tukey. 47

Figura 26. Níveis de oxidação intracelular avaliados na cepa *Δgsh1* em metabolismos fermentativo e respiratório. Os compostos 90B, 90C, 90N, 90R e quercetina nas concentrações de 20 μM permaneceram em contato com as células de *S. cerevisiae* por 2 horas antes de um estresse oxidativo por peróxido de hidrogênio (2,0 mM) por mais 1 hora. Tratamento controle são células não estressadas encubadas em solução tampão fosfato. Os resultados representam a média de pelo menos três experimentos independentes e foram expressos em porcentagem em função do tratamento com H₂O₂ (células estressadas sem tratamento com os compostos). Hashtags diferentes mostram resultados estatisticamente distintos ($p < 0,05$) na análise de ANOVA *one way* seguida de pós teste de Tukey. 48

Figura 27. Cadeia transportadora de elétrons da levedura *S. cerevisiae* (MONTEIRO, 2017). 51

Figura 28. Consumo de oxigênio expresso em nmol O₂ x min⁻¹ x mg⁻¹ nas células das cepas BY4741 e *Δgsh1* após adição de glicose. Os compostos 90B, 90C, 90N, 90R e quercetina nas concentrações de 20 μM permaneceram em contato com as células de *S. cerevisiae* por 2 horas antes de um estresse oxidativo por peróxido de hidrogênio (2,0 mM) por mais 1 hora. Tratamento controle são células não estressadas encubadas em solução tampão fosfato. Os resultados representam a média de pelo menos três experimentos independentes. Hashtags iguais mostram resultados estatisticamente semelhantes ($p < 0,05$) na análise de ANOVA *one way* seguida de pós teste de Tukey. 52

Figura 29. Consumo de oxigênio em $\text{nmol O}_2 \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$ nas células das cepas BY4741 e Δgsh1 após adição de FCCP. Os compostos 90B, 90C, 90N, 90R e quercetina nas concentrações de $20 \mu\text{M}$ permaneceram em contato com as células de *S. cerevisiae* por 2 horas antes de um estresse oxidativo por peróxido de hidrogênio ($2,0 \text{ mM}$) por mais 1 hora. Tratamento controle são células não estressadas encubadas em solução tampão fosfato. Os resultados representam a média de pelo menos três experimentos independentes. Hashtags iguais mostram resultados estatisticamente semelhantes ($p < 0,05$) na análise de ANOVA *one way* seguida de pós teste de Tukey..... 53

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> utilizadas no trabalho.....	28
Tabela 2. Resultado do ensaio de toxicidade das amostras no ensaio da resazurina nas cepas BY4741 e $\Delta gsh1$: (+) toxicidade significativa e (-) toxicidade baixa ou inexistente.....	36

SIGLAS E ABREVIATURAS

8-OHdG	8-hidroxidesoxiguanosina
ACh	acetilcolina
AChE	acetilcolinesterase
ApoE	apolipoproteína E
APP	proteína precursora do amiloide
ATP	adenosina tri-fosfato
A β	β -amiloide
BACE1	β -secretases
BuChE	butirilcolinesterase
CAT	catalase
CCL	comprometimento cognitivo leve
ChAT	colina acetiltransferase
CUPRAC	íon cúprico reduzindo a capacidade antioxidante
DA	Doença de Alzheimer
DCF	2',7'-diclorofluorescência oxidada
DHR	dihidrorodamina 123
DMSO	dimetilsulfóxido
DOK	queratinócitos displásicos humanos
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
EeAChE	acetilcolinesterase de enguia-elétrica
EMA	European Medicines Agency
ERN	espécies reativas de nitrogênio
EROs	espécies reativas de oxigênio
F2-IsoPs	isoprostano
FCCP	cianeto de carbonila 4-(trifluorometoxi)fenil-hidrazona

FDG	fluorodesoxiglicose
FRAP	capacidade redutora férrica do plasma
GCL	glutamato cisteína ligase
γGluCys	γ-glutamilcisteína
GPX	glutathione peroxidase
GR	glutathione reductase
GSH	glutathione
GSSG	glutathione oxidada
H ₂ DCF	2',7'-diclorofluoresceína
H ₂ DCFDA	2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato
hBChE	butirilcolinesterase de soro de cavalo
HNE	4-hidróxi-2-nonenal
HPLC	cromatografia líquida de alta eficiência
LCR	líquido cefalorraquidiano
MAO-B	monoamina oxidase B
MDA	malonaldeído
MRI	ressonância magnética
MTDLs	ligantes direcionados a múltiplos alvos
nAChR	receptores nicotínicos da acetilcolina
Nde1	NADH desidrogenase externa 1
Nde2	NADH desidrogenase externa 2
Ndi1	NADH desidrogenase interna 1
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido
NFT	emaranhados neurofibrilares
PET	tomografia por emissão de pósitrons
SOD	superóxido dismutase
TBARS	substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TEAC	capacidade antioxidante equivalente de trolox
XO	xantina oxidase

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1	Doença de Alzheimer	3
2.2	Cascata Amiloide	6
2.3	Proteína Tau	7
2.4	Sistema Colinérgico	9
2.5	Inibidores da Acetilcolinesterase	10
2.6	Fármacos Multi-alvos	11
2.7	Triazol	12
2.7.1	Derivados 1,2,4-triazólicos no tratamento de Alzheimer	13
2.7.2	Derivados 1,2,4-triazólicos com atividade antioxidante	15
2.7.3	1,5-diaril-3-amino 1-2-4-triazóis	15
2.8	Estresse Oxidativo	18
2.8.1	Estresse oxidativo e o Alzheimer	20
2.9	Sistema Antioxidante	21
2.9.1	Sistema antioxidante enzimático	22
2.9.1.1	Superóxido dismutase (SOD)	22
2.9.1.2	Catalase (CAT)	22
2.9.2	Sistema antioxidante não-enzimático	23
2.10	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	24
3	OBJETIVO	27
3.1	Objetivos Específicos	27
4	MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1	Material	28

4.1.1	Meios de cultura	28
4.1.2	Microrganismos e condições de cultivo.....	28
4.1.3	Preparação de repique e inóculo	28
4.1.4	Preparo das substâncias testadas e do padrão.....	29
4.2	Métodos	30
4.2.1	Teste da resazurina	30
4.2.2	Curva de crescimento	30
4.2.3	Pré-tratamento com as substâncias e peróxido de hidrogênio.....	31
4.2.4	Peroxidação lipídica	31
4.2.5	Oxidação Intracelular	32
4.2.6	Consumo de oxigênio	33
4.3	Análise estatística.....	34
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
5.1	Teste da Resazurina	35
5.2	Curvas de Crescimento	38
5.3	Ação dos triazóis sobre os níveis de peroxidação lipídica.....	41
5.4	Avaliação do ambiente redox intracelular	46
5.5	Impacto dos compostos sobre a respiração celular	50
6	CONCLUSÕES.....	54
7	PERSPECTIVAS FUTURAS	55
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56

1 INTRODUÇÃO

A Doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurodegenerativa progressiva conhecida pela perda de memória, dificuldade com a linguagem e alterações no comportamento e personalidade. O principal fator de risco é a idade. Projeções apontam que até 2060 o número de idosos com Alzheimer nos Estados Unidos pode dobrar em relação ao total de pacientes atualmente com esta demência (ALZHEIMER'S ASSOCIATION *et al.*, 2021). A origem exata da doença de Alzheimer permanece desconhecida, contudo, é sabido que a doença é formada por um conjunto de patologias celulares que dentre as mais estudadas destacam-se o déficit colinérgico, a agregação de peptídeos β -amiloide ($A\beta$), hiperfosforilação da proteína tau e o estresse oxidativo (BRIGGS; KENNELLY; O'NEILL, 2016).

O estresse oxidativo é caracterizado pelo desequilíbrio entre a geração de radicais livres e/ou espécies reativas não radicais resultantes do metabolismo celular e a atuação dos sistemas de defesa antioxidante (BARBOSA *et al.*, 2010). O estresse oxidativo associado à perda da função mitocondrial, acumulação de metais e redução da efetividade das defesas antioxidantes, que combatem a ação dos radicais livres, afetam diretamente a atividade sináptica, levando à disfunção cognitiva. Além disso, alvos moleculares afetados pelas espécies reativas de oxigênio (EROs) incluem DNA nuclear e mitocondrial, lipídios e proteínas, resultando na produção e acúmulo de β -amiloide ($A\beta$) e proteína tau hiperfosforilada, que poderiam aumentar a disfunção mitocondrial e a produção de EROs, contribuindo assim para progressão da doença (TÖNNIES; TRUSHINA, 2017).

Atualmente, o principal tratamento da doença de Alzheimer consiste no uso de inibidores das enzimas colinesterásicas (acetilcolinesterase e butirilcolinesterase) como, por exemplo, donepezil, rivastigmina e galantamina. O objetivo desses inibidores baseia-se em bloquear as enzimas colinesterásicas impedindo a hidrólise da acetilcolina ou da butirilcolina, aumentando a concentração desses neurotransmissores na fenda sináptica, permitindo uma maior probabilidade de ocorrência das transmissões colinérgicas (VAZ; SILVESTRE, 2020). Entretanto, devido à natureza multifatorial da doença e pelo fato de muitos candidatos a fármacos visarem a diminuição dos sintomas relacionados à DA e ao seu efetivo tratamento não terem sido bem-sucedidos, uma nova abordagem tem ganhado mais atenção em estudos recentes que é o desenvolvimento dos chamados “fármacos multialvos”. O princípio aliado a essa estratégia consiste no uso de compostos híbridos sintéticos que apresentam pelo menos duas subunidades farmacofóricas diferentes, tendo dessa maneira a capacidade de atuar em mais de um quadro patológico e consequentemente aumentar sua eficácia (MATOS, 2021).

Na busca por desenvolver multialvos eficientes para o tratamento da doença de Alzheimer, compostos contendo núcleos triazólicos (anéis de cinco membros, que contêm dois átomos de carbono e três átomos de nitrogênio) têm se tornado cada vez mais objetos de estudo devido sua ampla diversidade de atividades biológicas que abrangem propriedades antimicrobiana, anti-inflamatória, analgésica, antiepiléptica, antiviral, anti-hipertensiva, antimalárica, antidepressiva, anti-histamínica, antituberculose, anti-Parkinson, antidiabéticas, antiobesidade, assim como, antiacetilcolinesterases e antioxidantes (KHARB; SHARMA; YAR, 2010), em especial sua isoforma 1-2-4 triazol (CETIN; GEÇIBESLER, 2015; BULUT *et al.*, 2018;

GULTEKIN *et al.*, 2018; PENG *et al.*, 2021). Diante disso, compostos inéditos contendo o núcleo 3-amino-1,2,4-triazol-*N*-1,5-trissubstituídos foram planejados e avaliados como inibidores de colinesterases apresentando bons resultados. Esses compostos tiveram sua atividade antioxidante *in vitro* avaliadas e também apresentaram bons resultados (FRANCO, 2020).

Entretanto, os métodos *in vitro* desconsideram fatores, como interações metabólicas e condições fisiológicas, que podem influenciar na capacidade antioxidante das substâncias testadas. Uma alternativa muito utilizada que permite a obtenção de resultados mais precisos para ensaios de avaliação antioxidante é o uso das células da levedura *Saccharomyces cerevisiae* como modelo biológico. Estes seres unicelulares e eucarióticos possuem organelas e enzimas do sistema de defesa antioxidante semelhantes às células de mamíferos superiores, permitindo a extrapolação dos resultados. Além disso, o fato de o genoma dessa levedura ter sido completamente sequenciado admite a formação de cepas mutantes, grupos de células com modificações genéticas como, por exemplo, a ausência de algum componente antioxidante, simulando uma célula teoricamente mais sensível a danos celulares (GOFFEAU *et al.*, 1996; SOARES; ANDREAZZA; SALVADOR, 2005; DUINA; MILLER; KEENEY, 2014).

Nesse contexto, foram selecionados quatro compostos contendo o núcleo 3-amino-1,2,4-triazol-*N*-1,5-trissubstituídos inibidores de colinesterases para avaliar suas potenciais ações antioxidantes, discriminados por compostos 90B (fenólico na orientação *para*); 90C (fenólico na orientação *orto*); 90N (nitro) e 90R (pirimidina) em células de *Saccharomyces cerevisiae*.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Doença de Alzheimer

A doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurodegenerativa progressiva caracterizada pela manifestação da perda de memória, linguagem prejudicada, desorientação espacial, mudanças drásticas no comportamento e a dificuldade na execução de tarefas práticas do dia a dia; o que pode levar a pessoa ao afastamento do trabalho e das atividades sociais, e até mesmo a uma situação de total dependência de familiares e/ou cuidadores (TANZI; BERTRAM, 2005). É muito comum a confusão relacionada à caracterização e denominação sobre a Doença de Alzheimer e a demência. Demência é um termo usado para generalizar um conjunto de sintomas que caracterizam o declínio das funções cognitivas, compreendendo todos os citados acima; portanto, o Alzheimer é um exemplo de causa de demência, representando cerca de 60–80% dos casos, o que o classifica como a causa mais comum. Dentre outras causas de demência encontra-se a demência dos corpos de Lewy, doença cerebrovascular, degeneração lobar frontotemporal, doença de Parkinson e esclerose hipocampal (ALZHEIMER'S ASSOCIATION *et al.*, 2021).

A DA foi descrita pela primeira vez pelo psiquiatra alemão Alois Alzheimer em 1907, quando relatou o caso de Auguste Deter, que apresentava memória prejudicada, dificuldade de se expressar, incapacidade em reter conhecimento, além de distúrbios comportamentais. Após o falecimento da paciente, uma avaliação histopatológica do cérebro foi realizada e constatou-se atrofia cerebral e alterações específicas nas células corticais, como a formação de placas neuríticas e emaranhados neurofibrilares (MAURER; VOLK; GERBALDO, 1997). Na época, os resultados contribuíram para a conclusão de que essas alterações encontradas no cérebro de Auguste Deter representavam uma condição patológica particular.

A doença de Alzheimer apresenta um quadro característico representado por uma série de alterações cerebrais, que dentre as mais relevantes estão o acúmulo de fragmentos da proteína β -amiloide ($A\beta$) formando as conhecidas placas β -amiloide presentes fora dos neurônios; o acúmulo da forma hiperfosforilada da proteína tau presente dentro dos neurônios; perda sináptica; neuroinflamação; estresse oxidativo e atrofia (diminuição do volume cerebral) marcada pela perda significativa de neurônios. Essas anomalias, embora descritas por Alzheimer, começaram a ser identificadas somente em meados da década de 1980 (BRION *et al.*, 1985; GRUNDKE-IQBAL *et al.*, 1986), adquirindo a partir daquele momento um papel importante no diagnóstico da DA atuando como biomarcadores da doença.

Em 1984, o National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke (NINCDS) e a Alzheimer's Disease and Related Disorders Association (ADRDA) uniram-se para estabelecer critérios de diagnóstico clínico para a doença de Alzheimer. Entre esses critérios destacava-se a importância de testes neuropsicológicos visando a observação de sintomas, como a perda de memória, a atuação em atividades rotineiras prejudicadas, desempenho na comunicação e percepção; assim como que a doença só seria confirmada histopatologicamente por uma biópsia ou autópsia (MCKHANN *et al.*, 1984).

Em 2011, o National Institute on Aging fez várias mudanças e atualizou os critérios de 1984 (Alzheimer's Association *et al.*, 2021). Os novos critérios propostos incluíam a importância da detecção dos biomarcadores, dividindo-os em duas categorias: (a) marcadores de amiloide cerebral, como tomografia por emissão de pósitrons (PET) e líquido cefalorraquidiano (LCR); e (b) marcadores de lesão neuronal como tau do líquido cefalorraquidiano, fluorodesoxiglicose (FDG) para atividade neural e ressonância magnética (MRI) para medição de atrofia (NEUGROSCHL; WANG, 2011). No entanto, essas metodologias ainda geram debates e discussões devido a resultados não compatíveis entre o conteúdo de A β em LCR e em PET (TIWARI *et al.*, 2019).

Com o passar do tempo a DA foi tornando-se cada vez mais conhecida e gerando inúmeros impactos sociais e econômicos, relacionado com custos com assistência médica, assistência social e cuidados informais. Com o aumento da expectativa de vida da população mundial é evidente o crescimento no número de casos de DA, onde cerca de 44 milhões de pessoas vivem com a doença (ALZHEIMER NEWS TODAY, 2021). A situação ainda é mais preocupante quando observamos as projeções para os anos de 2030 e 2050 (Figura 1) com crescimentos significativos, podendo alcançar 74,7 e 131,5 milhões, respectivamente, de pessoas com demência no mundo, formado majoritariamente por pacientes de DA. É também interessante observar a predominância de casos no continente asiático, englobando metade dos casos mundiais; e o avanço da doença nos próximos anos no continente americano (SAWYER II, 2018).

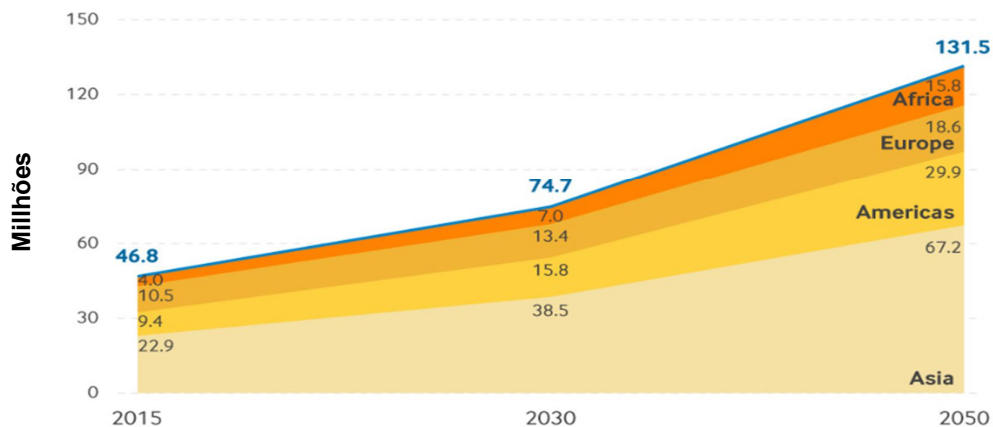


Figura 1. Projeção mundial de portadores de demência. (SAWYER II, 2018, adaptado).

Naturalmente, o aumento no número de pacientes impacta diretamente nos custos com a doença. O custo global já está estimado em US\$ 605 bilhões, equivalente a um por cento do PIB mundial. Só nos Estados Unidos (Figura 2), estima-se que em 2050 os custos totais com a DA podem alcançar até US\$ 1,1 trilhão (ALZHEIMER NEWS TODAY, 2021).

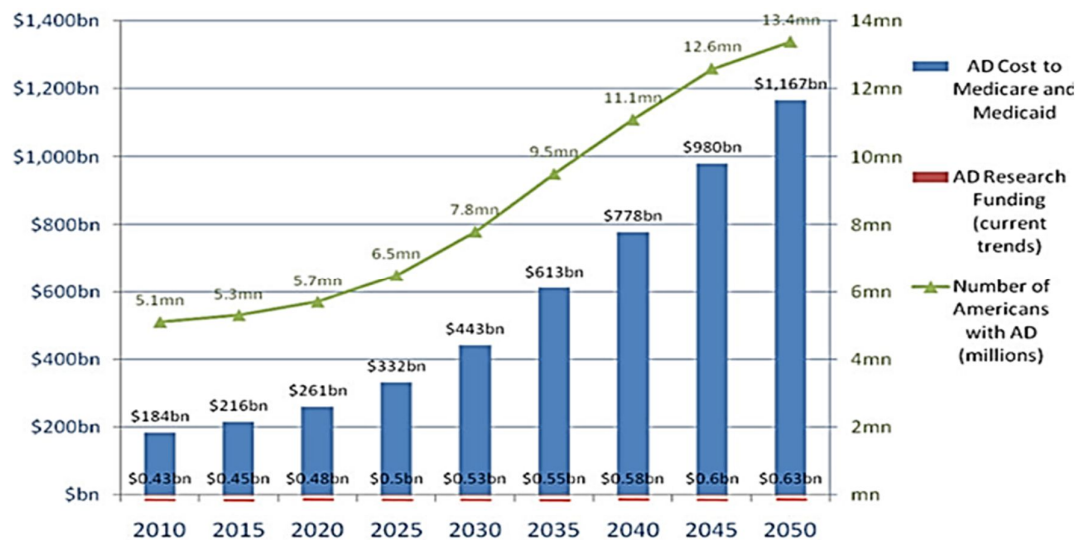


Figura 2. Projeção dos custos da demência causada pelo Alzheimer nos Estados Unidos (ALZHEIMER'S ASSOCIATION *et al.*, 2021).

O principal fator de risco que caracteriza o Alzheimer é o envelhecimento, evidenciado pela alta incidência na população idosa. Nos EUA, estima-se que cerca de 96% das pessoas que tenham a DA têm 65 anos ou mais. A porcentagem de pessoas com demência por Alzheimer aumenta drasticamente com a idade: 5,3% das pessoas de 65 a 74 anos, 13,8% de 75 a 84 anos e 34,6% com 85 anos ou mais têm demência por Alzheimer (RAJAN *et al.*, 2021). No Brasil, as internações por doença de Alzheimer aumentaram 87,7% de 2010 a 2019, apresentando o maior crescimento em número absoluto comparada com outras doenças crônicas não transmissíveis; representando um maior aumento entre homens (97,4%), pardos (224%), 80 anos ou mais velhos (115,1%), e nas regiões Nordeste (172,1%) e Centro-Oeste (144,2%) (FETER *et al.*, 2021).

Outro fator de risco que também desempenha um papel importante no Alzheimer é a genética. A apolipoproteína E (ApoE) participa do transporte de lipídios relacionado ao seu metabolismo (BELLOY; NAPOLIONI; GREICIUS, 2019). ApoE tem três alelos identificados, E2, E3 e E4, que se diferem pela estrutura e função da proteína. Localizado no cromossomo 19, o alelo APOE E4 foi encontrado em 50 a 60% dos pacientes com DA (comparado em 20 a 25% dos idosos saudáveis), independentemente de terem ou não histórico familiar de demência. Um alelo E4, portanto, não é determinístico, mas aumenta o risco ao longo da vida em 2 a 4 vezes, enquanto ser homocigoto para o alelo eleva o risco de 8 a 12 vezes (STRITTMATTER *et al.*, 1993; KATZMAN, 1994; ROSES, 1996).

Alguns estudos apontam uma relação mais estreita entre alguns fatores de risco comumente associados a doenças cardiovasculares a maiores probabilidades de apresentar os sintomas da DA (SAMIERI *et al.*, 2018). Podem-se destacar tabagismo (OHARA *et al.*, 2015; CHOI; CHOI; PARK, 2018), diabetes (BAGLIETTO-VARGAS *et al.*, 2016; SHIEH; HUANG; LIN 2020), obesidade (principalmente na meia-idade) (HU *et al.*, 2013; PICONE; DI CARLO; NUZZO, 2020), hipertensão (CARNEVALE *et al.*, 2016; LENNON; KONCZ; SACHDEV, 2021) e colesterol elevado (LOERA-VALENCIA *et al.*, 2019; SONG *et al.*, 2021). Essa relação pode ser explicada

pela oxigenação e fornecimento de nutrientes aos neurônios ser suprida pelo batimento cardíaco de um coração saudável, portanto um coração doente pode comprometer o funcionamento cerebral.

Consequentemente essa relação também reflete em fatores de proteção, resultando em redução nos riscos de desenvolver a doença de Alzheimer. Dentre os fatores conhecidos de proteção podemos destacar a atividade física (STEPHEN *et al.*, 2017; KOŠČAK TIVADAR, 2017) e uma dieta rica em frutas, nozes, vegetais, grãos, peixe, frango e leguminosas, além de evitar o consumo de alimentos gordurosos (MORRIS *et al.*, 2015; HARDMAN *et al.*, 2016).

2.2 Cascata Amiloide

A proteína precursora do amiloide (APP) é uma proteína transmembrana que ainda não possui sua função fisiológica bem conhecida, porém alguns estudos apontaram a relação da superexpressão da APP com o crescimento neuronal em ratos (OH *et al.*, 2009); e em linhagens celulares transfectadas transitoriamente, a APP atua no crescimento de neuritos, assim como no crescimento e sobrevivência celulares. Essas funções estariam relacionadas aos ectodomínios liberados oriundos das clivagens da APP no seu estado “normal” (THINAKARAN; KOO, 2008). Existem duas vias de clivagens: a via não amiloidogênica (estado normal ou saudável) e a via amiloidogênica (estado patológico).

Na via não amiloidogênica a APP é clivada pela enzima α -secretase entre os resíduos dos aminoácidos 16-17, resultando em precursores solúveis e não patogênicos conhecidos como p3 (Figura 3). Dentre esses precursores encontra-se o ectodomínio solúvel APPs α , que atua na neuroproteção, na plasticidade sináptica adequada, aprendizado, memória, comportamento emocional e sobrevivência neuronal (TIWARI *et al.*, 2019; GALANIS *et al.*, 2021).

Na via amiloidogênica (Figura 3) a APP é clivada por β -secretases (BACE1) e γ -secretases resultando em fragmentos β -amiloides insolúveis e neurotóxicos, que se oligomerizam e se depositam em fendas sinápticas formando as placas amiloides comprometendo a sinalização sináptica (CHEN; YAN, 2010). Esses fragmentos originados na via amiloidogênica, diretamente relacionados à formação de placas, são encontrados em duas formas de polímeros β -amiloides, A β 40 e A β 42. O comprimento do peptídeo A β depende de onde a γ -secretase cliva a APP. Destaque para o A β 42 que por ser mais insolúvel que o A β 40 possui mais facilidade em formar placas potencializando sua neurotoxicidade (SELKOE; HARDY, 2016; MAKIN, 2018).

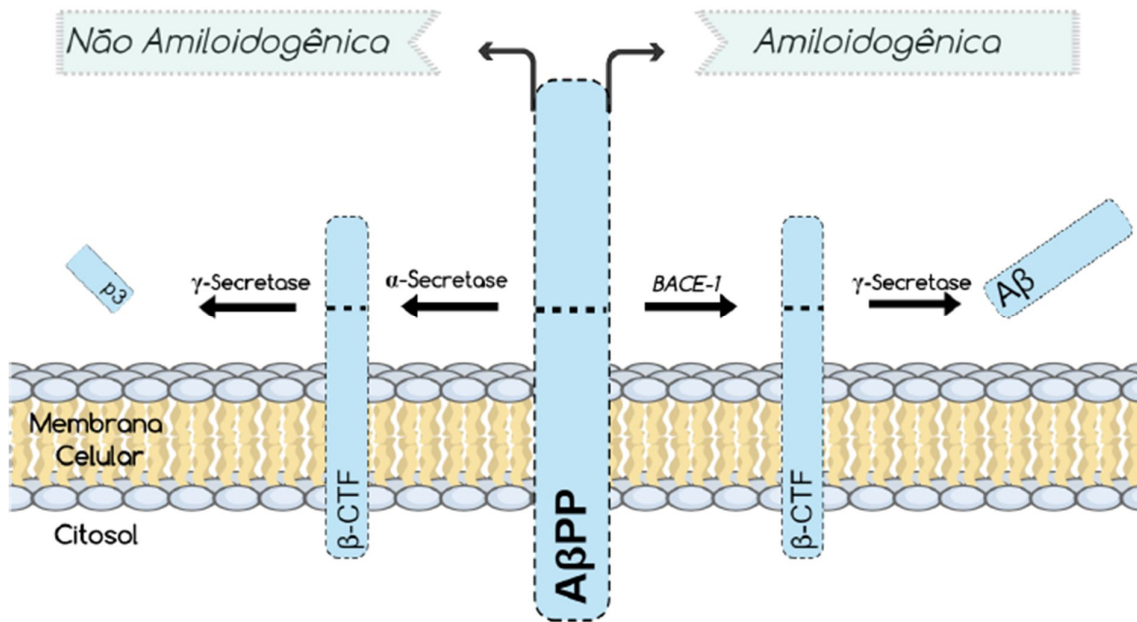


Figura 3. Processamento da Proteína Precursora Amiloide (APP). BACE-1: β-secretase; APP: proteína precursora amiloide; β-CTF: fragmento do terminal C (DELANOGARE *et al.*, 2009).

Compreendendo os impactos causados pelo acúmulo de placas amiloides como a principal causa da neurodegeneração na DA, muitos pesquisadores procuraram desenvolver tratamentos de combate à doença visando a redução dos níveis de β-amiloides e sua consequente deposição. A partir desse objetivo, três estratégias emergiram: I) inibidores de BACE1 (verubecestat, lanabecestat) e γ-secretases (Semagacestat, Avagacestat) de modo a reduzirem a produção de Aβ; II) anti-agregadores de Aβ (cilo-inositol e tramiprosato); e III) promoção da depuração de Aβ podendo ser por meio da imunoterapia ativa (vacinas como o UB-311) e a imunoterapia passiva (anticorpos monoclonais como bapineuzumab e solanezumab) (VAZ; SILVESTRE, 2020). No entanto, todas as tentativas de tratamento anti-amiloide mostraram-se ineficazes em alguma fase dos testes clínicos.

2.3 Proteína Tau

Tau é uma proteína encontrada abundantemente em neurônios, exercendo a função de conferir estabilização e polimerização aos microtúbulos. Por possuir em sua estrutura uma abundância de resíduos aceitadores de fosfato, resultando em um alto número de sítios de fosforilação, a proteína tau torna-se altamente suscetível a ação de diferentes tipos de quinases (CLEVELAND; HWO; KIRSCHNER, 1977; ŠERY *et al.*, 2013).

Como decorrência de uma hiperfosforilação, a proteína tau perde afinidade com o microtúbulo, resultando no desprendimento da proteína, comprometendo sua função e ocasionando a desintegração do microtúbulo. Além disso, filamentos helicoidais insolúveis são produzidos e acabam por agregar-se, constituindo os emaranhados neurofibrilares (NFT) (Figura 4). Os NFT aumentam a neurotoxicidade estando diretamente relacionados com a neurodegeneração na DA (MOHANDAS;

RAJMOHAN; RAGHUNATH, 2009; MEDEIROS; BAGLIETTO-VARGAS; LAFERLA 2011).

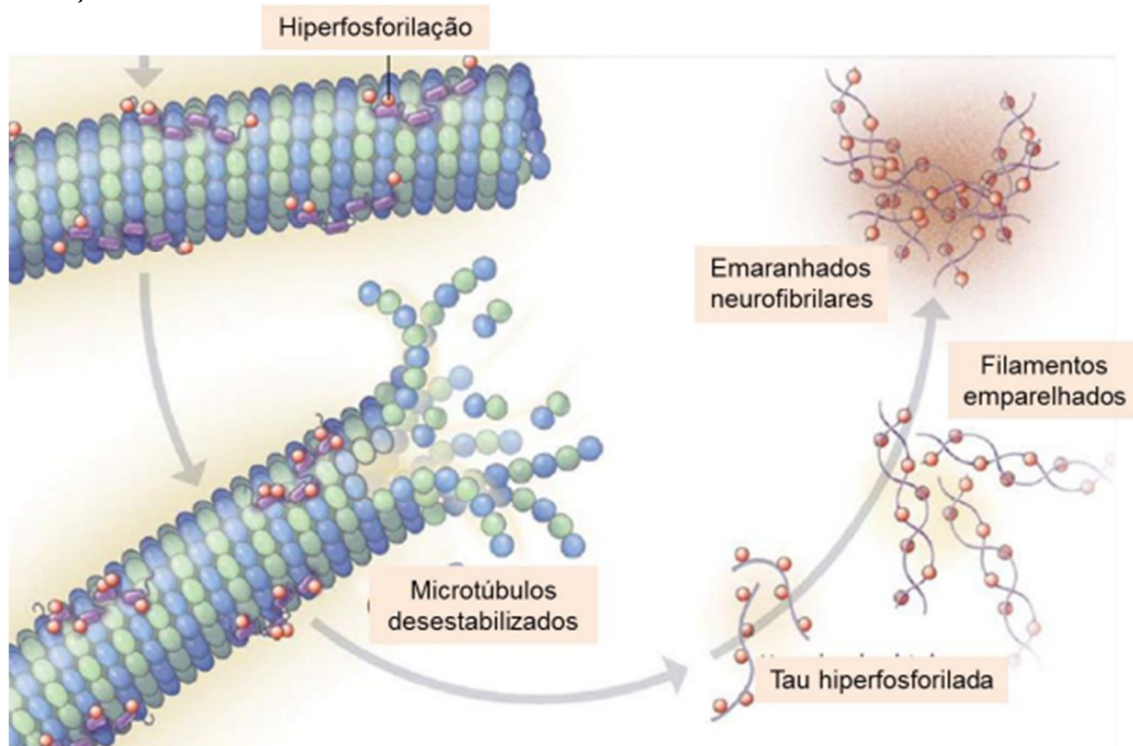


Figura 4. Processo de hiperfosforilação da proteína tau (CÂMARA, 2018).

No entanto, alguns estudos apontaram que a formação dos NFT não é condição necessária para a neurodegeneração encontrada na DA, e que o principal agente causador da neurotoxicidade seria a tau solúvel hiperfosforilada. As evidências que corroboram essa hipótese podem ser observadas nos estudos feitos com camundongos que tiveram a expressão de tau inibidas, e mesmo na presença de NFT apresentaram melhoras na memória (SANTACRUZ *et al.*, 2005; VAN DER JEUGD *et al.*, 2012). Contudo, ainda falta compreender o mecanismo pelo qual a tau solúvel aumentaria a neurotoxicidade e quais espécies estariam envolvidas (GAO *et al.*, 2018).

Reconhecendo a contribuição da hiperfosforilação da proteína tau na DA, estratégias terapêuticas visando a diminuição dos efeitos neurotóxicos provocados por ela foram desenvolvidas, tais como: (1) inibir a hiperfosforilação anormal da tau através da modulação de proteínas quinases (GSK-3 β , CDK5, caseína quinase-1 (CK-1), (2) induzir a desmontagem de agregados de tau (azul de metileno e antraquinonas), (3) estimular a estabilização de microtúbulos (docetaxel e paclitaxel), (4) imunoterapia com tau (vacina) e (5) terapia anti-inflamatória (PMX205 e atorvastatin) (VAZ; SILVESTRE, 2020). Contudo, apesar de apresentarem resultados promissores em estudos, nenhum candidato anti-hiperfosforilação demonstrou eficácia em testes clínicos.

2.4 Sistema Colinérgico

Os neurônios colinérgicos estão presentes em diversas regiões do cérebro, explicando a participação do sistema colinérgico em importantes funções fisiológicas, como a regulação do sono, aprendizagem, atenção e memória. A acetilcolina (ACh) é o principal neurotransmissor do sistema colinérgico, portanto responsável pela neurotransmissão colinérgica.

A síntese da acetilcolina (Figura 5) ocorre no citoplasma dos neurônios colinérgicos por uma enzima chamada colina acetiltransferase (ChAT), a partir de colina e acetil-coenzima A (acetil-CoA), esta última originada pelo metabolismo mitocondrial. Após a sua formação, a ACh é transportada, por meio do transportador vesicular de acetilcolina (VAcHT), para as vesículas sinápticas, que envolvem o neurotransmissor e o transporta pelo neurônio. Como resultado do influxo de íons cálcio e a despolarização do neurônio colinérgico, a ACh é exocitada das vesículas sinápticas e liberada na fenda sináptica, onde é responsável pela ativação dos receptores muscarínicos e nicotínicos, concretizando a neurotransmissão colinérgica. Em seguida, entra em ação a enzima acetilcolinesterase (AChE) que hidrolisa a ACh resultando na liberação dos compostos moleculares colina e acetato. A colina é recaptada pelo neurônio pré-sináptico, onde será reutilizada gerando um ciclo (FERREIRA-VIEIRA *et al.*, 2016).

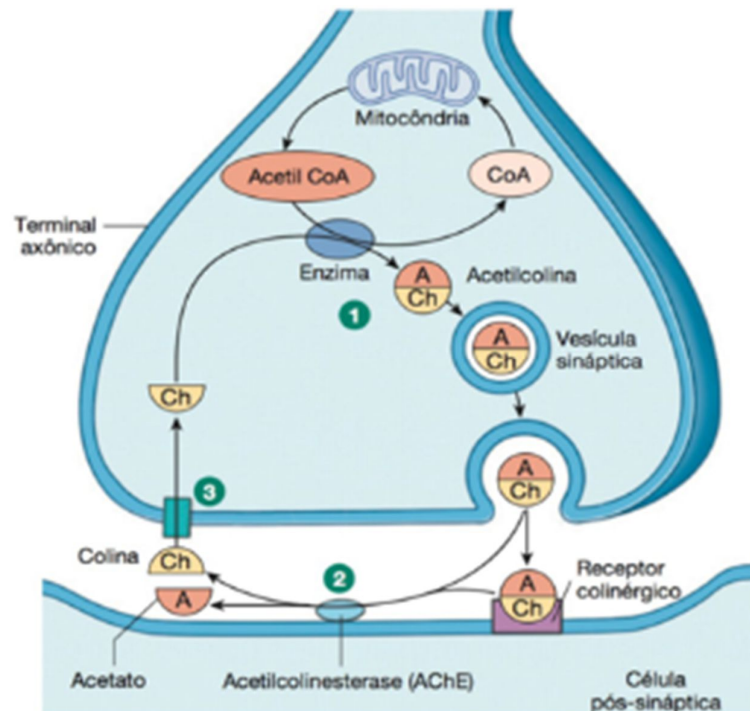


Figura 5. Síntese e reciclagem da acetilcolina na sinapse (Disponível em: <<https://escolaeducacao.com.br/acetilcolina/>>. Acesso em: 20/04/2022).

Desde os anos 70 até agora, a relação entre o comprometimento do sistema colinérgico e a neurodegeneração na DA vem se estabelecendo; seja através da conexão entre a destruição dos neurônios colinérgicos presentes no núcleo basal de Meynert e a perda de memória dos pacientes com Alzheimer (HAMPEL *et al.*, 2018);

ou pela associação entre as alterações nos receptores muscarínicos e nicotínicos, o aumento da hiperfosforilação de tau, formação de NFT, metabolismo alterado de APP e aumento da produção de A β , possivelmente levando à DA (BABIC, 1999; SIVAPRAKASAM, 2006).

Com base nessas descobertas, estratégias visando o aumento na função colinérgica foram desenvolvidas usando agonistas de receptores colinérgicos e, com maior sucesso, usando inibidores de AChE (AChEIs).

2.5 Inibidores da Acetilcolinesterase

As colinesterases são uma família de enzimas do tipo serina hidrolases que atuam na degradação do neurotransmissor acetilcolina, processo fundamental que possibilita um neurônio colinérgico, após a sua ativação, retornar ao seu estado de repouso. A colinesterase é encontrada em duas formas diferentes: a acetilcolinesterase e a butirilcolinesterase (também conhecida como “pseudo” colinesterase) (BuChE, EC 3.1.1.8) (MASSOULIÉ *et al.*, 1993).

A enzima acetilcolinesterase hidrolisa predominantemente a acetilcolina, encontrada em altas concentrações principalmente nas hemácias, nas junções neuromusculares e nas sinapses colinérgicas do cérebro. Em contrapartida, a enzima BuChE hidrolisa diferentes tipos de ésteres de colina e existe proporcionalmente no fígado humano, soro sanguíneo, pâncreas, sistema nervoso central e está fortemente associada a células gliais e endoteliais do cérebro (MUSHTAQ *et al.*, 2014).

Em pacientes portadores de DA, as células que usam ou produzem acetilcolina são danificadas, ou destruídas, comprometendo diretamente o transporte de mensagens entre neurônios; portanto, os fármacos inibidores da colinesterase surgem na tentativa de manter os níveis de acetilcolina através da diminuição da sua taxa de degradação e, dessa maneira, recuperar a neurotransmissão colinérgica (Figura 6) (COLOVIC *et al.*, 2013).

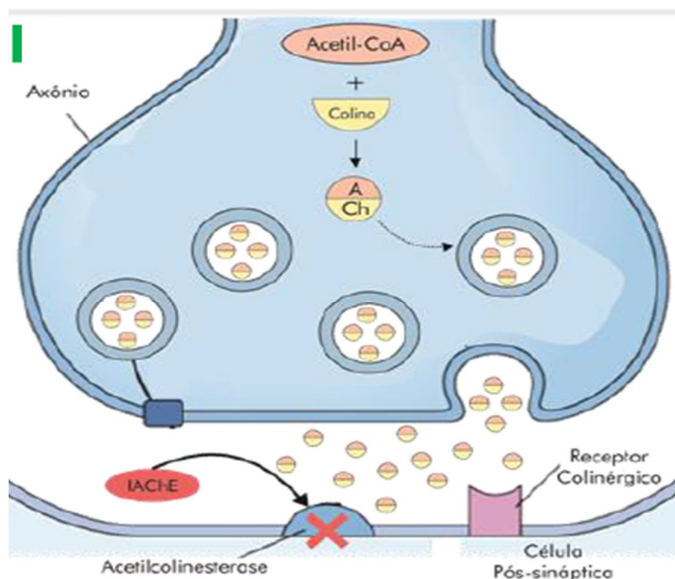


Figura 6. Sinapse colinérgica na presença de um inibidor colinesterásico (FRANCO, 2020).

Em 1993, o primeiro inibidor de colinesterase aprovado para o tratamento de DA foi a tacrina, mas devido aos diversos efeitos colaterais, incluindo hepatotoxicidade, seu uso foi descontinuado (WATKINS *et al.*, 1994). Atualmente existem três fármacos inibidores de colinesterases aprovados pelas agências reguladoras como a US Food and Drug Administration (FDA) e a European Medicines Agency (EMA): donepezil, rivastigmina e galantamina (WALCZAK-NOWICKA; HERBET, 2021).

O donepezil é um inibidor seletivo reversível da AChE e sua indicação é para os casos de demência leve, moderada e grave na DA melhorando a capacidade cognitiva de pacientes. A principal vantagem deste fármaco deve-se ao fato de sua farmacocinética ser mantida em interações com outros medicamentos e com refeições (ADLIMOGHADDAM *et al.*, 2018). Em pacientes com DA, o donepezil mostrou-se eficiente na redução da atrofia hipocampal (DUBOIS *et al.*, 2015) e dos sintomas neuropsiquiátricos; e algumas pesquisas também apontaram potencial inibição da agregação da proteína tau e de A β (MA *et al.*, 2018; NAJAR-AHMADI *et al.*, 2021).

A rivastigmina pertence aos inibidores de carbamato que inibem temporariamente tanto AChE quanto BChE, formando um complexo através de uma ligação covalente nas regiões aniônicas e esteráticas do sítio ativo (CASTILLO-ORDOÑEZ; CAJAS-SALAZAR, 2020). O seu uso é indicado para casos de demência leve a intermediária em pacientes com DA. No entanto, também mostrou-se eficaz na DA grave, mas na forma de adesivo transdérmico, melhorando a capacidade cognitiva dos pacientes. Além disso, a rivastigmina foi eficiente na redução dos níveis de A β (BIRKS; EVANS, 2015; SADEGHI *et al.*, 2016; RAY *et al.*, 2020).

A galantamina é um alcaloide originado de plantas da família Amaryllidaceae e inibidor seletivo da AChE. Este medicamento é recomendado para uso em pacientes com casos leves a moderadas de DA. A galantamina conseguiu atrasar o declínio cognitivo e reduziu significativamente a mortalidade em pacientes com DA leve a moderada (LOY; SCHNEIDER, 2006; ARONSON *et al.*, 2009; LIN *et al.*, 2019).

Apesar de todos os benefícios abordados dos atuais inibidores de colinesterases, os diversos efeitos colaterais que englobam distúrbios gastrointestinais, vasculares e psiquiátricos, perda de peso, reações alérgicas na pele, arritmias cardíacas (WALCZAK-NOWICKA; HERBET, 2021), somados a incapacidade de interromper completamente a progressão da DA, gera a necessidade do surgimento de novos fármacos. Além disso, pelo fato de muitos medicamentos de alvos únicos não serem tão eficazes em tratar a DA, o desenvolvimento de fármacos multialvos que consigam diminuir os níveis de ACh, reduzir a agregação A β associada, a hiperfosforilação da proteína tau e o estresse oxidativo vem se tornando cada vez mais interessante (REIS *et al.*, 2018).

2.6 Fármacos Multi-alvos

Busca-se aumentar a eficácia e/ou melhorar a segurança nos tratamentos de doenças multifatoriais, como no caso da DA, por compostos conhecidos como ligantes direcionados a múltiplos alvos (MTDLs) projetados para atuar em mais de um quadro patológico relevante a uma doença. Essa estratégia é conhecida como

“polifarmacologia” (MORPHY; KAY; RANKOVIC., 2004). Apesar de nenhum fármaco multialvo ter sido aprovado em testes clínicos, muitos estudos vêm demonstrando a superioridade da eficácia da “polifarmacologia” (BOLOGNESI, 2019; ZHANG *et al.*, 2019).

Além de preservar os mesmos benefícios em relação aos demais tratamentos, entre as principais vantagens na utilização dos multialvos destacam-se os menores riscos de interação com outros medicamentos e a maior aceitação dos pacientes devido ao menor número de dosagens, simplificando o tratamento (BOLOGNESI, 2013). Por outro lado, equilibrar as afinidades de uma molécula de um fármaco em relação a diversos alvos e simultaneamente obter propriedades físico-químicas e farmacocinéticas consistentes é a principal barreira para o desenvolvimento da polifarmacologia (MORPHY; RANKOVIC, 2009).

Estes estudos iniciam-se com a escolha dos fatores fisiopatológicos que serão alvo do fármaco. A combinação de alvos é uma etapa desafiadora, pois nem sempre o efeito sinérgico desejado é alcançado. Tendo os alvos escolhidos, a etapa seguinte é a de selecionar as estruturas farmacofóricas previamente conhecidas por serem eficazes no combate aos alvos específicos. Portanto, cada domínio estrutural interage com determinado alvo (BENEK; KORABECNY; SOUKUP, 2020). Esta estratégia se faz presente na síntese de diversos compostos candidatos anti-Alzheimer utilizando principalmente inibidores colinesterásicos estabelecidos, como, por exemplo, os híbridos de donepezil-tacrina (CAMPS *et al.*, 2008), ácido tacrino-ferúlico (PI *et al.*, 2012) e tacrina-8-hidroxiquinolina (FERNÁNDEZ-BACHILLER *et al.*, 2010); todos compostos inibidores de colinesterases e da agregação de A β mais eficientes que os compostos originais.

De acordo com alguns estudos, as características das estruturas dos compostos possuem relação com seu potencial de inibição multialvo. Dentre as características elenca-se a presença de um átomo de nitrogênio com carga positiva (XIE *et al.*, 2013) de um átomo de oxigênio capaz de formar ligações hidrogênio (KHOBI *et al.*, 2013); de grupos doadores de elétrons (ALI *et al.*, 2009); e de cadeias alquílicas pequenas ligadas ao átomo de nitrogênio (CATTO *et al.*, 2013).

Apesar de promissores, nenhum fármaco até o momento passou em todos os testes clínicos, sendo que o ladostigil, um inibidor de AChE e monoamina oxidase B (MAO-B), atingiu os ensaios clínicos de Fase II (SCHNEIDER *et al.*, 2019). No entanto, a tendência de fármacos multialvos continuarem sendo planejados e estudados para o tratamento da DA é alta; e a busca continua crescente por diferentes estruturas farmacologicamente ativas na inibição da doença como evidenciado pela exploração de cumarinas (STEFANACHI *et al.*, 2018), flavonoides (ESTRADA-VALENCIA *et al.*, 2019), ácido ferúlico (BARONE; CALABRESE; MANCUSO, 2009.), ácido cafeico (OBOH *et al.*, 2013) e os mais relevantes para este estudo, os triazóis.

2.7 Triazol

Os triazóis são anéis de cinco membros, que contêm dois átomos de carbono e três átomos de nitrogênio, possuindo alta densidade eletrônica. Devido à importância biológica relacionada à eficiência desses derivados sintéticos, os mesmos

têm sido objeto de diversos estudos farmacológicos, resultando em bons efeitos curativos, baixa toxicidade, prevenção à resistência ao fármaco e propriedades farmacocinéticas no tratamento da doença de Alzheimer (XU *et al.*, 2019). Conforme a posição dos átomos de nitrogênio, os triazóis existem em duas formas isostéricas, o 1,2,3-triazol e o 1,2,4-triazol. Cada um destes possui dois tautômeros que diferem pela posição em que o hidrogênio encontra - se ligado ao nitrogênio (Figura 7) (FERREIRA *et al.*, 2013; SILVA, 2013).

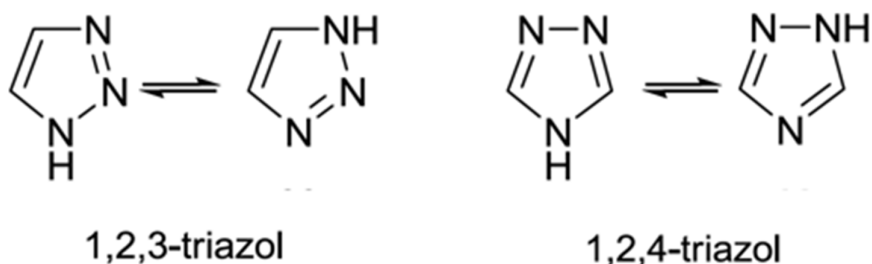


Figura 7. Estrutura química dos 1,2,3-triazóis e 1,2,4-triazóis e respectivos tautômeros (SILVA, 2013).

Os compostos 1,2,4-triazóis são conhecidos por conferir melhorias nas propriedades farmacocinéticas como absorção, distribuição, metabolismo e excreção de drogas (LAVERDIERE *et al.*, 2014), fornecendo uma ampla diversidade de atividades biológicas evidenciado pelo grande número de medicamentos à base de triazol presentes na literatura. A ribavirina®, por exemplo, é um agente antiviral de amplo espectro utilizado principalmente no combate do vírus da hepatite C (TAN *et al.*, 2002), enquanto o rizatriptano é um analgésico indicado para o tratamento agudo de enxaquecas (MACHADO; BARROS; PALMEIRA, 2006). O fluconazol é um antifúngico indicado para o tratamento de candidíase vaginal aguda e para pacientes com transplante alogênico de células-tronco (TROKE *et al.*, 1985; SUN *et al.*, 2020). O ravuconazol demonstrou potencial no tratamento da doença de Chagas, exibindo potente atividade *in vivo* e *in vitro* contra o *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença (BERN, 2011). Anastrozol é um fármaco indicado para o tratamento do câncer de mama em mulheres na pós-menopausa, pois foi demonstrado que este composto conseguiu reduzir os níveis de estradiol circulante resultando em um efeito benéfico nas pacientes (MEHTA *et al.*, 2012); e o miratapide que é um medicamento hipolipemiante, ou seja, capaz de controlar o colesterol, usado em casos de obesidade canina (PEÑA *et al.*, 2014).

Diante de tantos casos bem-sucedidos, muitos estudos envolvendo síntese e avaliação biológica de compostos derivados de 1,2,4-triazólicos visando o tratamento de diversas doenças têm se tornado cada vez mais comum. Em seguida algumas abordagens de alguns casos com potencial para o tratamento da doença de Alzheimer e com potencial antioxidante, ambas propriedades relevantes para o presente estudo.

2.7.1 Derivados 1,2,4-triazólicos no tratamento de Alzheimer

Uma nova classe de triazolotiadiazol e triazolotiadiazina foi avaliada quanto à sua atividade inibitória *in vitro* contra acetilcolinesterase de enguia-elétrica (EeAChE) e butirilcolinesterase de soro de cavalo (hBChE). Dentre os híbridos avaliados, o

composto 5b (fenil na orientação *para*) foi mais ativo contra EeAChE, em comparação a neostigmina e donepezil como compostos padrão. Comparando-se os resultados do 5b e do 5d (metil na orientação *para*) frente a EeAChE os pesquisadores argumentaram que o forte poder inibitório do primeiro pode ser atribuído ao grupo doador de elétrons hidroxila na posição *para* do anel ariloxila, tendo em vista que a substituição pelo grupo metila na mesma posição mostrou uma pequena queda na atividade. No entanto, a inibição do 5d foi mais eficiente que a neostigmina (KHAN *et al.*, 2014).

Cinco novos compostos de piridina contendo híbridos bis-1,2,4-triazol/tiossemicarbazida foram avaliados por sua atividade inibitória de AChE e antioxidante *in vitro*. Todos os compostos sintetizados demonstraram inibição significativa da AChE em comparação com os inibidores conhecidos, como a tacrina. Dentre os compostos triazólicos o composto 4c (radical 3-metóxfenil) mostrou excelente atividade inibidora de AChE, bem inferior ao controle. Na avaliação antioxidante, o composto 4a (radical fenil) mostrou eficiente eliminação de radicais DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil). O estudo concluiu que todos os compostos apresentavam potencial para o tratamento de DA (BULUT *et al.*, 2018).

Uma classe de novos derivados de 1,2,4-triazol trissubstituídos foi avaliada frente a várias bioatividades, incluindo atividade inibitória de AChE e antioxidante por três métodos diferentes, como FRAP (capacidade redutora férrica do plasma) ($\mu\text{mol Trolox/g}$), DPPH (mg/mL) e CUPRAC (íon cúprico reduzindo a capacidade antioxidante) ($\mu\text{mol Trolox/g}$). Todos os derivados mostraram uma inibição promissora da AChE; no entanto, o composto que mostrou a melhor combinação de resultados unindo os três testes antioxidantes e a inibição da AChE foram os compostos 4 (acetohidrazida) e 5b (tiossemicarbazida). O estudo concluiu, portanto, que os compostos apresentaram resultados satisfatórios em relação à atividade antioxidante e moderadas em relação à atividade anti-AChE (GULTEKIN *et al.*, 2018).

Outro estudo onde os pesquisadores desenvolveram uma série de fenol-triazol multialvos para abordar várias propriedades da doença, abrangendo a capacidade antioxidante, afinidade de ligação ao Cu, interação com o peptídeo A β e modulação da agregação do peptídeo A β , e a capacidade de limitar a neurotoxicidade induzida por A β 1-42 (JONES *et al.*, 2017). Dentre os três compostos sintetizados, o 2-(1-(3-hidroxipropil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)fenol (POH) exibiu um número maior de interações distribuídas ao longo do comprimento do peptídeo A β , alterando o perfil de agregação do peptídeo A β e conseqüentemente limitando a formação das placas, resultando em um efeito protetor contra a neurotoxicidade induzida por A β 1-42 em cultura neuronal humana. Ademais, foi demonstrado através do ensaio de capacidade antioxidante equivalente de trolox (TEAC) a capacidade antioxidante eficiente do POH, por outro lado, o mesmo não conseguiu limitar a ciclagem redox Cu^{2+/*} e impedir a formação de radicais livres gerados pelo cobre. Portanto, esses resultados foram considerados promissores e sugeriram que o núcleo fenol-triazol tem capacidades multifuncionais apropriadas contra a doença de Alzheimer.

2.7.2 Derivados 1,2,4-triazólicos com atividade antioxidante

Uma série de hidrazonas de 1,2,4-triazol foram sintetizadas e suas atividades antioxidantes avaliadas através de um ensaio de eliminação de radicais livres (PENG *et al.*, 2021). Todos os compostos testados possuíam uma potente atividade de eliminação de radicais DPPH em comparação com o ácido ascórbico, utilizado como controle positivo. O estudo destacou que a presença dos grupos -SH, -OH e -NH₂ em 1,2,4-triazóis poderia melhorar a atividade antioxidante dos compostos. Esses resultados foram condizentes com outro estudo envolvendo a avaliação antioxidante de derivados triazólicos substituídos por grupos fenol e piridina sintetizados e testados contra vários parâmetros de atividade antioxidante. Dentre estes, o composto G(2-(5-mercapto-4H-1,2,4-triazol-3-il) fenol), que contém os grupos -SH e -OH na sua estrutura, apresentou alto potencial de atividade antioxidante total; atividade de eliminação de radical catiônico 2,2-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) (ABTS) e radical DPPH razoavelmente boas. Portanto, concluíram que grupos doadores de elétrons tendem a aumentar a atividade antioxidante de triazóis (CETIN; GEÇIBESLER, 2015). Essa mesma conclusão foi observada em um estudo de relação estrutura atividade (SAR) de 1,2,4-triazol onde a introdução de substituintes metil como grupos doadores de elétrons na posição *para* do anel aromático pode aumentar a atividade antioxidante (KUMARI *et al.*, 2021).

2.7.3 1,5-diaril-3-amino 1-2-4-triazóis

Na literatura, a síntese do núcleo 1,5-diaril-3-amino-1-2-4-triazóis não é muito explorada. A primeira metodologia adaptada à síntese em fase sólida por Houghten (YU; OSTRESH; HOUGHTEN, 2003) descreve a obtenção de compostos 1,5-diaril-3-amino-1,2,4-triazóis por uma reação de ciclização entre uma espécie eletrofílica (N-acilguanidinas derivadas do benzotriazol ou N-acil carbamidotioato) e outra nucleofílica (alquil ou aril hidrazinas substituídas) (Figura 8A) (KATRITZKY *et al.*, 2001). A segunda metodologia lança mão da reação entre o núcleo 1,3,4-oxadiazólium perclorato e cianamida (Figura 8B) (BOZO; SZILÁGYI; JANÁKY, 1989). O terceiro procedimento descreve a arilação do carbono na posição 1 de amino-triazóis por um acoplamento Negish (Figura 8C) (SHEN; WONG; ZHANG, 2015). E por último a síntese regioseletiva para obtenção de 1,5-diaril-3-amino-1,2,4-triazoles N-protegidos ou desprotegidos, através da otimização do procedimento de Katritzky usando N-acil-N-Boc-carbamidotioatos sob radiação de micro-ondas (Figura 8D) (SANTOS *et al.*, 2019).

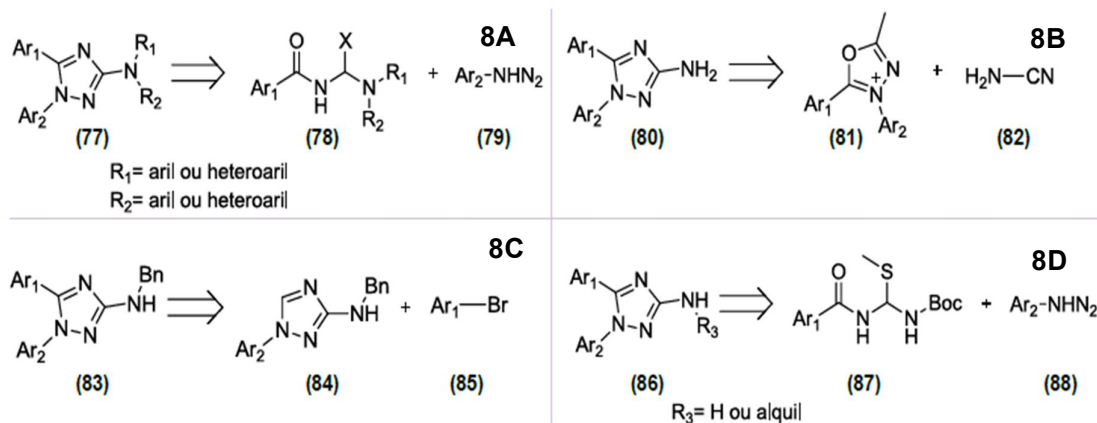


Figura 8. Estratégias sintéticas descritas para a síntese de 3-amino-1,2,4-triazóis-N-1,5-trissubstituídos (FRANCO, 2020).

Portanto, foram desenvolvidos uma série de compostos 3-amino-1,2,4-triazóis-N-1,5-trissubstituídos (89a-d), que consistiu na troca isostérica do núcleo triazínico (53) pelo 1,2,4-triazol, utilizando a estratégia de bioisosterismo (LIMA; BARREIRO, 2005); e utilizando a estratégia de hibridização molecular (BARREIRO; FRAGA, 2014), na união entre a subunidade benzilpiperazina (roxo) (5), mimetizado do medicamento donepezil, e o grupamento diaril vicinal (azul) (53), descrito como capaz de interagir com a AChE (Figura 9). Os compostos (89a-d) mostraram-se capazes de inibir as colinesterases com bons valores de IC_{50} de até $1,0 \mu\text{M}$ (FRANCO, 2020).

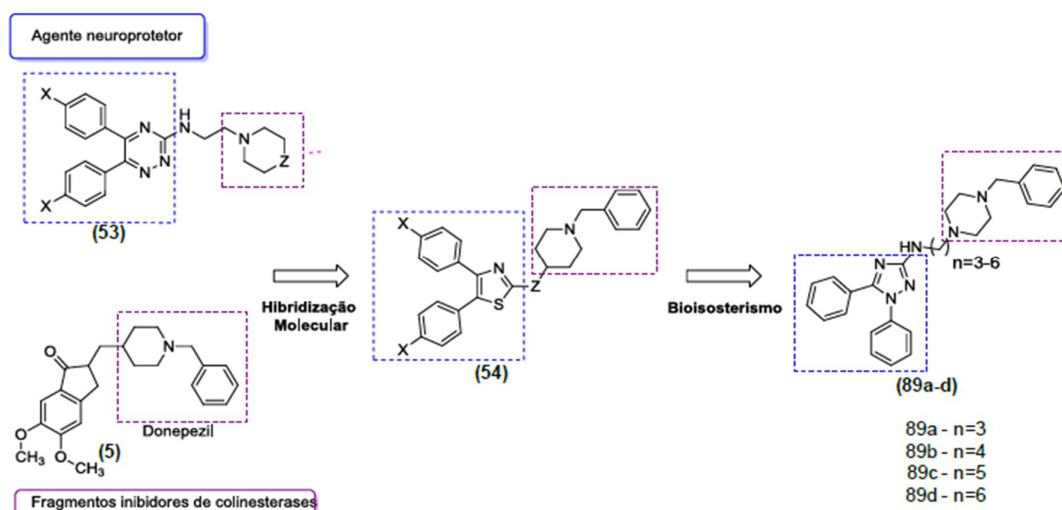


Figura 9. Planejamento da série dos 3-amino-1,2,4-triazóis-N-1,5-trissubstituídos (89a-d) (SANTOS et al., 2019; FRANCO, 2020).

Mediante o sucesso do estudo anterior, os compostos avaliados no presente estudo foram desenvolvidos visando continuar o estudo de relação estrutura atividade (SAR) dos 3-amino-1,2,4-triazóis-N-1,5-trissubstituídos. O planejamento da nova série baseou-se na manutenção do núcleo 1,5-diaril-3-amino-1,2,4-triazol ligado a subunidade benzilpiperazina por grupo alquil (Figura 10). O aromático substituído 90N (Figura 11) foi planejado de modo a explorar as propriedades físico-químicas deste substituinte: grupo retirador de elétrons,ceptor de ligação hidrogênio e lipofílicos; os compostos 90B, 90C e 90R (Figura 11) foram planejados em decorrência da

capacidade de formação de um provável sítio de complexação com metais e, conseqüentemente, a possibilidade de serem empregados no tratamento da DA com a finalidade de restabelecer a homeostase metálica. Ademais, os compostos 90B e 90C também pertencem aos grupos dos fenóis aos quais são frequentemente relacionados a atividades antioxidantes, podendo assim desempenhar um importante papel na neutralização de espécies reativas de oxigênio, atuando na redução do estresse oxidativo, um dos aspectos patológicos envolvidos na DA.

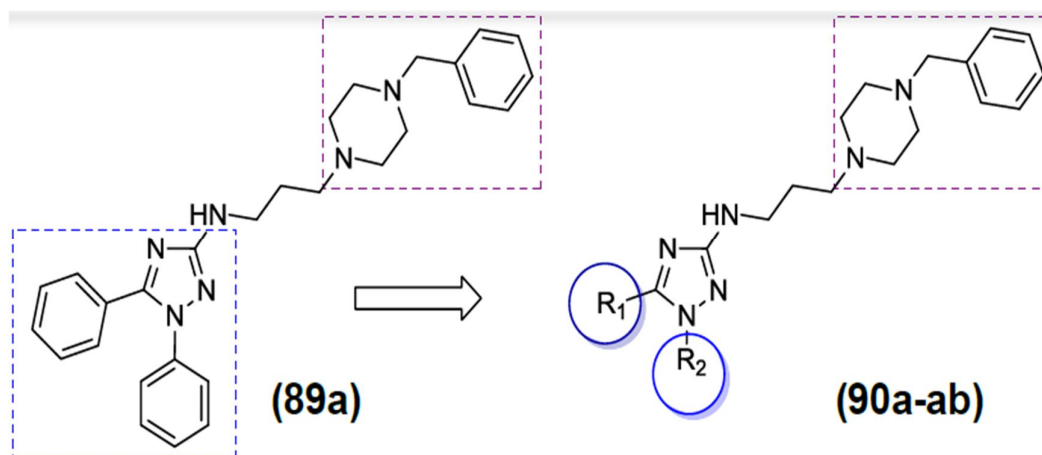


Figura 10. Planejamento estrutural da nova série dos 3-amino-1,2,4-triazóis-N-1,5-trissubstituídos (90a-aa) (SANTOS *et al.*, 2019; FRANCO, 2020).

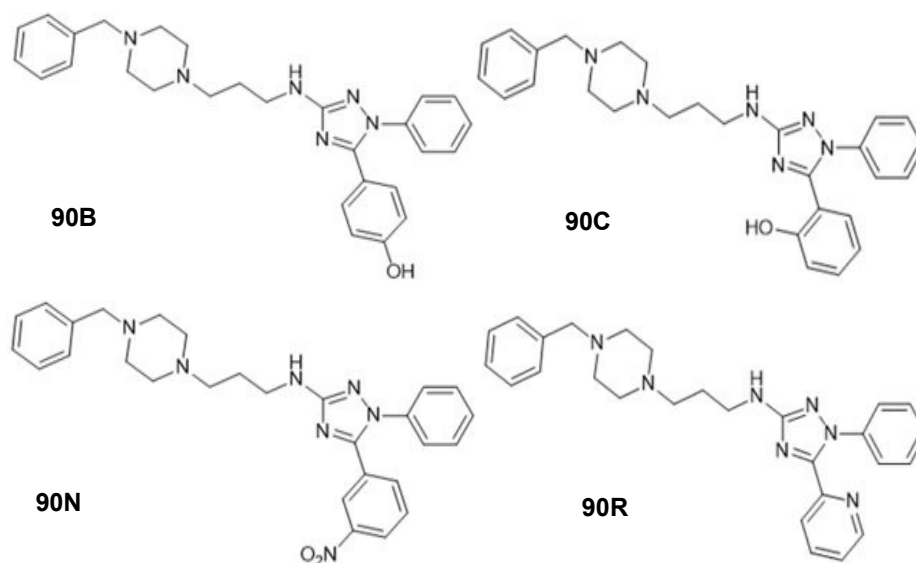


Figura 11. Compostos avaliados no presente estudo: 90B (superior esquerdo); 90C (superior direito); 90N (inferior esquerdo) e 90R (inferior direito) (FRANCO, 2020).

2.8 Estresse Oxidativo

Os radicais livres podem ser definidos como moléculas ou fragmentos moleculares contendo um, ou mais elétrons desemparelhados, o que geralmente confere um grau considerável de reatividade a um radical livre (VALKO *et al.*, 2007). Entretanto, radical livre é um termo que não abrange todo o conjunto dos agentes reativos patogênicos, pois alguns deles não apresentam elétrons desemparelhados em sua última camada, embora participem das reações de oxirredução. Assim, esses agentes podem ser divididos em dois subgrupos: as espécies reativas de oxigênio (EROs) que incluem oxigênio singlete, radical ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical peróxil (ROO^{\bullet}) e hidroxil (OH^{\bullet}) e as espécies reativas de nitrogênio (ERN) que incluem óxido nítrico (NO^{\bullet}) e ânion peroxinitrito (ONOO^-) (DRÖGE, 2002; VICTOR; ROCHA; DE LA FUENTE, 2004; VAN DEN ENDE; PESHEV; DE GARA, 2011). Essas espécies possuem origens exógenas à célula como radiação, drogas, xenobióticos, toxinas e origens endógenas (VAN DEN ENDE; PESHEV; DE GARA, 2011).

As mitocôndrias são a principal fonte de produção endógena de EROs. Durante o processo do transporte de elétrons da cadeia respiratória, o oxigênio molecular é reduzido a duas moléculas de água. No entanto, alguns elétrons “escapam” precocemente, resultando na conversão de cerca de 1 – 2% do oxigênio molecular em radical ânion superóxido. A reatividade do radical superóxido é relativamente fraca tendo em vista sua incapacidade de atravessar a membrana lipídica e pela sua conversão, devido à ação da enzima superóxido dismutase (SOD), em peróxido de hidrogênio. Contudo, o H_2O_2 produzido pode reagir com cobre ou ferro livres, ou fracamente ligados. Eles podem ser reduzidos a Cu(I) ou Fe(II) por redutores fisiológicos como glutatona ou ascorbato e reagirem com oxigênio molecular ou peróxido de hidrogênio formando radicais superóxido e hidroxila, respectivamente (Figura 12) (DRÖGE, 2002; VICTOR; ROCHA; DE LA FUENTE, 2004; HALLIWELL, 2006).

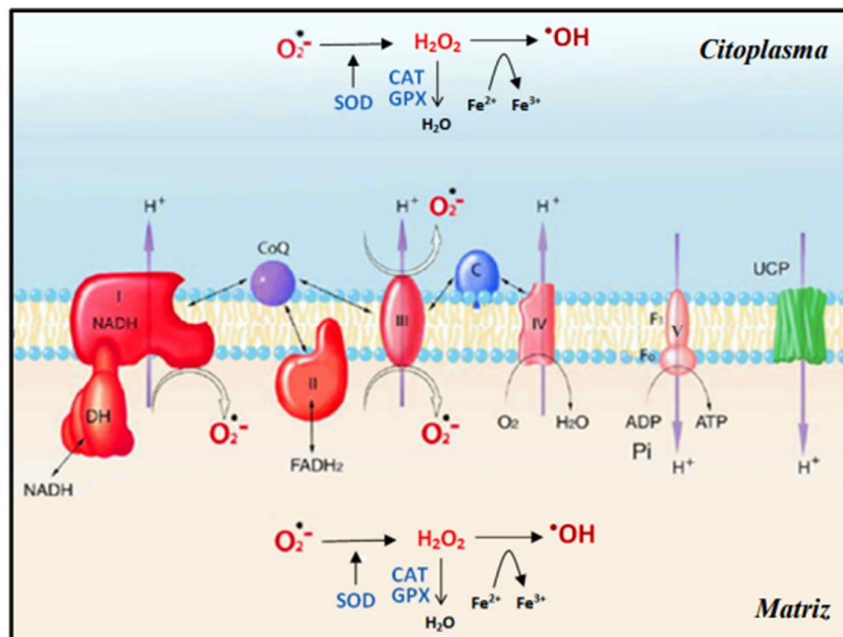


Figura 12. Esquematização da produção de espécies reativas de oxigênio pela cadeia de transporte (LAMBERTUCCI, 2009).

Além da mitocôndria, o radical ânion superóxido pode ser gerado pela ação de enzimas oxidases, como, por exemplo, a NAD(P)H oxidase (família NOX) e a xantina oxidase (XO). As enzimas NOX são encontradas nos linfócitos, fibroblastos, células endoteliais, miócitos e condrócitos e quando ativadas a respiração celular é acelerada resultando no aumento do consumo de oxigênio, na utilização de glicose e aumento da produção de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido (NADPH) pela via das pentoses-fosfato, aumentando a probabilidade de formação de EROs. Por outro lado, XO encontrada no citosol, especialmente durante condições hipóxicas, apresenta a capacidade de produzir diretamente superóxido e peróxido de hidrogênio usando oxigênio como aceptor de elétrons (DRÖGE, 2002; RAY; SHAH, 2005).

Os efeitos benéficos das EROs englobam a fosforilação de proteínas, ativação de vários fatores de transcrição, apoptose, imunidade e processos de diferenciação celular. Entretanto, quando um aumento na concentração de espécies reativas é causado pela ativação de fatores endógenos e exógenos e/ou a inativação, ou diminuição da produção de enzimas antioxidantes, um desequilíbrio entre substâncias pró-oxidantes e o sistema de defesa antioxidante é gerado resultando em danos às estruturas celulares, incluindo lipídios e membranas, proteínas e ácidos nucleicos; interrupção da sinalização e controle redox (BARBOSA *et al.*, 2010). Esse desequilíbrio é chamado estresse oxidativo, que muitos estudos apontam estar associado a diversas doenças como câncer, *diabetes mellitus*, doenças arteriais, renais e neurodegenerativas como a DA (PISOSCHI *et al.*, 2021).

As cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos das proteínas são suscetíveis à oxidação pela ação do radical hidroxila e por metais de transição associados ao peróxido de hidrogênio ou de oxidantes mais simples. O radical hidroxila reage diretamente com resíduos de aminoácidos promovendo a retirada de um átomo de hidrogênio da cadeia polipeptídica da proteína formando um radical centrado no carbono. Na sequência, esse radical, em condições aeróbicas, reage com o oxigênio molecular para formar radicais peroxila, convertidos em peróxidos de alquila por reações com a forma protonada do superóxido (HO_2^\bullet). O dano catalisado por metal às proteínas envolve cisão oxidativa, perda de resíduos de histidina, introdução de grupos carbonil (um dos mais importantes marcadores da oxidação proteica) e a formação de radicais alquil (R^\bullet), alcóxil (RO^\bullet) e alquilperóxil (ROO^\bullet) centrados em proteínas. Acredita-se que a oxidação mediada por metais redox pode ser um processo específico do local de uma proteína pelo fato de resíduos como prolina, histidina, arginina, lisina e cisteína serem altamente sensíveis à oxidação (STADTMAN, 2004; VALKO *et al.*, 2006).

O dano ao DNA induzido por EROs envolve quebras das fitas duplas, modificações de purina, pirimidina ou desoxirribose e ligações cruzadas de DNA resultando em interrupção ou indução da transcrição, indução de vias de transdução de sinal, erros de replicação e instabilidade genômica. O principal marcador de dano oxidativo ao DNA é a formação do composto 8-hidróxidesoxiguanosina (8-OHdG) (COOKE *et al.*, 2003).

As membranas celulares, assim como as mitocondriais e peroxissomais, são ricas em ácidos graxos poli-insaturados suscetíveis a oxidação. A peroxidação lipídica, portanto, é o processo de deterioração oxidativa dos lipídios poli-insaturados em peróxidos (NIKI *et al.*, 2005). O processo global de peroxidação lipídica consiste

em três etapas: iniciação, propagação e terminação. Uma vez formados, os radicais peróxil (ROO•) podem ser rearranjados através de uma reação de ciclização para endoperóxidos com os produtos do processo de peroxidação sendo o malonaldeído (MDA) e o 4-hidróxi-2-nonenal (HNE). O HNE é fracamente mutagênico comparado ao MDA, mas parece ser o principal produto tóxico da peroxidação lipídica. A peroxidação de lipídios é um processo autocatalítico que é encerrado, por exemplo, pela recombinação de radicais ($R\bullet + R\bullet \rightarrow$ produto não radical) ou depleção do substrato (MARNETT, 1999; KOHEN; NYSKA, 2002).

2.8.1 Estresse oxidativo e o Alzheimer

A hipótese da cascata amiloide foi o primeiro fator patológico da DA a ser abordado e dominou o campo da pesquisa da doença por muitos anos. Na busca por mecanismos alternativos, diversos estudos demonstraram conexões entre a disfunção mitocondrial e o aumento da produção de EROs ao desenvolvimento da DA (KELLER *et al.*, 2005; LOVELL; MARKESBERY, 2007). Estabeleceu-se que a atividade das enzimas antioxidantes é alterada durante o desenvolvimento da doença, contribuindo assim para o acúmulo irrestrito de danos oxidativos (KIM *et al.*, 2006), o que fica evidenciado pela identificação de diferentes marcadores do estresse oxidativo em pacientes com DA amplamente demonstrado nos últimos anos. Os produtos da oxidação de lipídios, proteínas e ácidos nucleicos já são considerados biomarcadores sanguíneos para o diagnóstico precoce da DA (SKOUMALOVÁ; HORT, 2012).

O aumento do nível de proteína carbonilada, um marcador de dano oxidativo às proteínas, foi demonstrado no cérebro com DA (KELLER *et al.*, 2005). As reações de várias espécies reativas de oxigênio e nitrogênio com tirosina resultam na produção de 3-nitrotirosina e ditirosina. Além disso, a nitração de proteínas é um evento precoce na patogênese da DA. Por exemplo, os níveis de nitração proteica total no lóbulo parietal inferior e no hipocampo de pacientes com comprometimento cognitivo leve (MCL) são muito mais elevados do que os de indivíduos controle saudáveis (BUTTERFIELD *et al.*, 2007; CENINI *et al.*, 2008).

O nível de 8-OHdG no DNA mitocondrial isolado do córtex parietal de pacientes com DA está significativamente aumentado (três vezes) em comparação com indivíduos controle (MECOCCI; MACGARVEY; BEAL, 1994). Outra maneira de medir a oxidação do DNA é determinar a quebra da fita de DNA. Foi relatado que o nível de quebra de DNA no córtex cerebral de pacientes com DA é duas vezes maior do que nos controles (MULLAART *et al.*, 1990). Vários estudos confirmaram um aumento dos níveis de MDA e 4-HNE no cérebro de pacientes com DA e comprometimento cognitivo leve (CCL) (CHEN; ZHONG, 2014). A produção de isoprostano (F2-IsoPs) é outro resultado da peroxidação lipídica que é produzido a partir de ácido araquidônico via esterificação. Na DA, níveis aumentados de F2-IsoPs foram detectados no líquido cefalorraquidiano (LCR) (PRATICÒ *et al.*, 2000).

Portanto, a hipótese da cascata mitocondrial não só se estabeleceu como um mecanismo associado à DA como ainda evidências apontam a sua relação com outros fatores. Na DA esporádica de início tardio, a perda da função mitocondrial somada à idade afeta a expressão e o processamento de APP iniciando o acúmulo de A β (SWERDLOW; BURNS; KHAN, 2014). Ademais, acredita-se que a homeostase alterada de metais bioativos envolvida na produção de radicais livres e estresse

oxidativo influencia a agregação de A β e tau (GREENOUGH; CAMAKARIS; BUSH, 2013).

Regiões do cérebro de pacientes com DA como o hipocampo e a amígdala apresentam níveis anormais de cobre, zinco e ferro (DEIBEL; EHMANN; MARKESBERY, 1996) estabelecendo um quadro de vulnerabilidade ao estresse oxidativo, tendo em vista o fato de metais conseguirem interagir com A β . Placas A β ligam-se ao Cu²⁺ com alta afinidade, formando um complexo tipo cuproenzima. Durante este processo, o elétron é transferido de A β para Cu²⁺, convertendo Cu²⁺ em Cu⁺ e formando o radical A β (A β +•). Além disso, Cu⁺ pode doar dois elétrons para o oxigênio, gerando H₂O₂ e produzindo radicais hidroxila (reação do tipo Fenton) (HUANG, 2002). Utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae* como modelo biológico, França e colaboradores concluíram que o estresse oxidativo é consequência da indução amiloide. A β aumenta a produção de EROs por afetar os complexos III e IV da cadeia transportadora de elétrons (FRANÇA; LIMA; ELEUTHERIO, 2017).

Existe uma relação direta entre o estresse oxidativo induzido por A β s e a diminuição das sinapses colinérgicas. Os A β s danificam e matam os neurônios, possivelmente por um efeito na peroxidação lipídica da membrana, tornando as células nervosas vulneráveis aos efeitos excitotóxicos do glutamato (PEDERSEN *et al.*, 1998). A correlação entre o estresse oxidativo e a perda da subunidade α 4 de receptores nicotínicos da acetilcolina (nAChR) foi investigada no córtex temporal de pacientes com DA, e mostraram que o aumento dos níveis de peroxidação lipídica e diminuição do número de proteínas da subunidade α 4 nAChR em cérebros com DA estão de fato relacionados (YU *et al.*, 2003); sugerindo que a peroxidação lipídica induzida por A β pode desencadear a perda de nAChR na DA (GUAN *et al.*, 2001).

Evidências acumuladas sugerem que o estresse oxidativo também contribui para a patologia da proteína Tau na DA. A oxidação dos ácidos graxos acelera a polimerização da Tau, portanto, serve como uma possível ligação entre o estresse oxidativo e o desenvolvimento de patologia fibrilar na DA (GAMBLIN *et al.*, 2000). A proteína quinase ativada por mitógeno p38, uma quinase responsável pela fosforilação da tau, é ativada pelo estresse oxidativo *in vitro* (GOEDERT *et al.*, 1997).

2.9 Sistema Antioxidante

Contra as espécies reativas, os organismos vivos desenvolveram vários mecanismos efetivos para combater os efeitos deletérios causados por oxidantes. Todos os compostos que conseguem retardar ou inibir a ação de EROs, evitando o início ou propagação, agindo pela eliminação de espécies reativas, convertendo-as em espécies mais estáveis ou em não radicais são chamados antioxidantes (DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ, 2004). Antioxidantes podem ser divididos em enzimáticos e não enzimáticos (MANSON, 2003; LUBERDA, 2005; MACHADO *et al.*, 2008; POWERS; JACKSON, 2008).

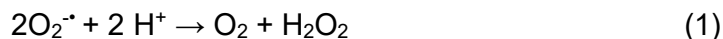
Antioxidantes enzimáticos incluem enzimas como a superóxido dismutase (SOD), glutatona peroxidase (GPX) e catalase (CAT); enquanto os antioxidantes não enzimáticos incluem o tripeptídeo glutatona, ácido úrico, ácido alfa-lipoico, ubiquinonas, bilirrubina, quelantes de metais (como ferritina, lactoferrina), vitamina C,

carotenoides, tocoferóis e compostos fenólicos (flavonoides e não flavonoides) (PISOSCHI *et al.*, 2021).

2.9.1 Sistema antioxidante enzimático

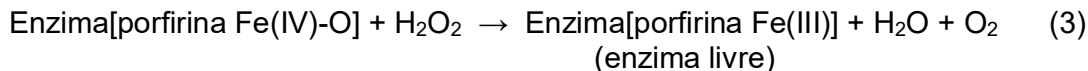
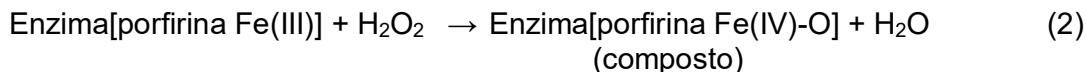
2.9.1.1 Superóxido dismutase (SOD)

A superóxido dismutase (EC 1.15.1.1) é uma metaloproteína que catalisa a dismutação do radical ânion superóxido em oxigênio molecular e peróxido de hidrogênio. Em mamíferos, o termo superóxido dismutase engloba três isoformas: SOD citosólico, SOD extracelular (ambos contendo cobre e zinco) e SOD mitocondrial contendo manganês. As enzimas CuZnSOD desempenham um papel fundamental na primeira linha de defesa antioxidante, ou seja, atua prevenindo processos oxidativos, suprimindo a formação de espécies radicais. Principalmente a SOD extracelular confere proteção contra a inativação do NO pelo superóxido, evitando assim a disfunção endotelial (PISOSCHI *et al.*, 2021).



2.9.1.2 Catalase (CAT)

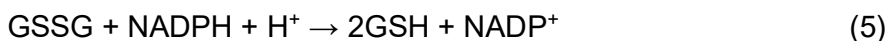
Catalase (E.C. 1.11.1.6) é uma das enzimas antioxidantes mais importantes presente e na maioria dos organismos aeróbicos. A catalase quebra duas moléculas de peróxido de hidrogênio em uma molécula de oxigênio e duas moléculas de água em uma reação de duas etapas. A primeira etapa do mecanismo de reação envolve a formação de um composto intermediário que é uma espécie covalente de oxiferril (FeIVO) com um radical, porfirina π -cátion, através da redução de uma molécula de peróxido de hidrogênio. Na segunda etapa da reação, o composto é reduzido por reações redox por uma transferência de dois elétrons de um doador de elétrons (a segunda molécula de peróxido de hidrogênio) para produzir a enzima livre, oxigênio e água (DEISSEROTH; DOUNCE, 1970; VON OSSOWSKI; HAUSNER; LOEWEN, 1993; NANDI *et al.*, 2019).



2.9.2 Sistema antioxidante não-enzimático

2.9.2.1 Glutationa (GSH)

O antioxidante glutaciona (GSH) é um tripeptídeo tiol resultado de uma combinação de três aminoácidos – glutamina, cisteína e glicina. Conferido pela presença do grupamento sulfidrílica (SH), este tiol desempenha um papel de destaque na desintoxicação; atuando na manutenção do estado redox intracelular, bem como na proteção e prevenção dos danos oxidativos. A glutaciona existe em duas formas: a forma reduzida (GSH) e a forma oxidada (GSSG). GSH reage diretamente com radicais hidroxila ($\cdot\text{OH}$) e superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$), e também atua como doador de elétrons para a redução de H_2O_2 e peróxidos orgânicos em uma reação mediada pelas enzimas glutaciona peroxidase (GPx) e glutaciona redutase (GR). A GPx catalisa a redução do peróxido de hidrogênio e do peróxido lipídico na presença de GSH, convertida em GSSG, enquanto GSSG é reduzida pela GR na presença de NAD(P)H. A razão GSH/GSSG fornece uma medida extremamente sensível do estado redox celular (ADEOYE *et al.*, 2018).



A primeira etapa de formação da glutaciona é formada pela enzima glutamato cisteína ligase (GCL) responsável pela catálise da condensação de cisteína e glutamato para formar o dipeptídeo γ -glutamilcisteína (γGluCys) (FARINA; ASCHNER, 2019). A deleção desta enzima em células de *Saccharomyces cerevisiae* resulta em uma cepa que não possui a expressão de *GSH1* (Δgsh1). Foi demonstrado que cepas com ausência de glutaciona são sensíveis ao estresse oxidativo induzido por peróxidos e ânion superóxido, bem como aos produtos tóxicos da peroxidação lipídica, indicando a GSH como uma molécula antioxidante essencial em levedura necessária para manter a homeostase redox intracelular (GRANT; PERRONE; DAWES, 1998).

2.9.2.2 Flavonoides

Os flavonoides são antioxidantes naturais derivados de plantas e comumente encontrados em alimentos, como frutas e vegetais. O potencial antioxidante dos flavonoides está associado à localização e ao número total dos grupos $-\text{OH}$, assim como aos efeitos de conjugação, ressonância e ao mecanismo antioxidante particular para um composto (ZHENG *et al.*, 2019). O potencial antioxidante de muitos flavonoides é maior que a vitamina C e a vitamina E, os antioxidantes suplementados mais utilizados (PROCHÁZKOVÁ; BOUŠOVÁ; WILHELMOVÁ, 2011), evidenciando a importância da ingestão de alimentos ricos em flavonoides na dieta.

A quercetina, um importante representante da subclasse de flavonóis, representa 60-75% da ingestão de flavonoides (BOUKTAIB; ATMANI; ROLANDO, 2002). A quercetina aumenta a capacidade antioxidante do corpo induzindo e regulando os níveis de GSH. Essa molécula é considerada um forte antioxidante devido à sua capacidade de eliminar radicais livres, inclusive sendo muito utilizada

como um padrão do potencial antioxidante. Seu mecanismo (Figura 13) consiste na doação de um próton tornando-se um radical, contudo o elétron desemparelhado resultante é deslocalizado por ressonância, tornando o radical quercetina pouco reativo. Além disso, os grupos funcionais podem doar elétrons aos anéis, aumentando o número de formas de ressonância disponíveis além daquelas fornecidas pela estrutura do benzeno (MARIANI *et al.*, 2008; BENTZ, 2017).

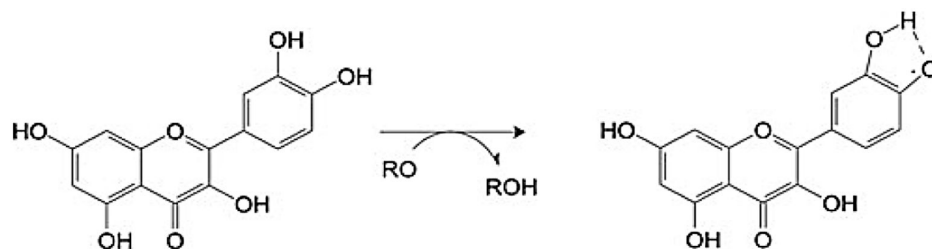


Figura 13. Ação antioxidante da quercetina (KATZ; DOUGHTY; ALI, 2011).

2.10 *Saccharomyces cerevisiae*

Apesar de indícios de sua utilização datarem de 10.000 anos a.c. para o processo de crescimento de pães, as leveduras foram isoladas pela primeira vez no século XIX pelo pesquisador dinamarquês Emil Christian Hansen, trabalhando no Laboratório da cervejaria Carlsberg, permitindo na época uma melhora significativa na qualidade de produção da cerveja. Impulsionado pelo trabalho do pesquisador francês Louis Pasteur, que demonstrou que a formação de álcool na produção de cerveja e vinho não era um processo de conversão química espontânea, mas sim um processo que demandava células vivas; a abordagem para o isolamento de espécies de leveduras, desenvolvida por Hansen, resultou tanto no estabelecimento da levedura como modelo biológico para o estudo de células eucarióticas quanto no isolamento de *Saccharomyces cerevisiae* (NIELSEN, 2019).

Saccharomyces cerevisiae é uma levedura pertencente ao reino Fungi, filo Ascomycota, e unicelular que, em 1996, foi o primeiro organismo a ter seu genoma eucariótico totalmente sequenciado (GOFFEAU *et al.*, 1996), fornecendo informações sobre vários aspectos da organização e evolução do genoma. Suas células apresentam semelhanças com células de mamíferos (DUINA; MILLER; KEENEY, 2014); afinal, 47% dos 414 genes essenciais dessa levedura com um ortólogo humano 1:1 podem ser substituídos por seus ortólogos humanos (KACHROO *et al.*, 2015). Essa conservação gênica pode refletir o alto grau de similaridade entre muitos processos celulares chave que ocorrem tanto nestas células de *S. cerevisiae* quanto em células humanas, por exemplo, autofagia, translocação e secreção de proteínas, degradação de proteínas associada ao retículo endoplasmático, choque térmico e dobramento de proteínas. Dessa maneira, os resultados obtidos podem ser mais facilmente extrapolados para o homem, em comparação aos obtidos por testes *in vitro*, tendo em vista que os métodos *in vitro* desconsideram as interações metabólicas e condições fisiológicas, que podem influenciar na capacidade antioxidante das substâncias testadas. O sequenciamento genético também permitiu a exploração de cepas mutantes (grupos de células que sofreram modificações genéticas) de modo a

abordar diferentes cenários de suscetibilidade ao estresse oxidativo, assim como melhor compreender a contribuição do papel dos agentes antioxidantes. Ademais, os ensaios com *S. cerevisiae* são realizados de modo mais rápido, econômico e reprodutível comparado a ensaios com animais e culturas celulares animais, tornando-a uma opção bastante vantajosa (SOARES; ANDREAZZA; SALVADOR, 2005; NIELSEN, 2019). Diversos estudos utilizam a levedura como modelo biológico em estudos de avaliação de capacidade antioxidante, seja de produtos naturais (BRACESCO *et al.*, 2003; PIOVEZAN-BORGES *et al.*, 2016; SUBHASWARAJ *et al.*, 2017; ĐORĐEVIĆ *et al.*, 2018) ou sintéticos (KRASOWSKA; SIGLER, 2007; ROSA *et al.*, 2007 PÉREZ DE VEGA, 2020).

A *Saccharomyces cerevisiae* é classificada como uma levedura anaeróbica facultativa, portanto, ela possui a capacidade de realizar o processo fermentativo e o processo respiratório mediante a disponibilidade de hexoses no ambiente extracelular. Num primeiro momento, quando as células são colocadas em contato com um novo ambiente nutritivo, a levedura encontra-se num estado letárgico adaptativo chamado de fase Lag (Figura 14). Na sequência a divisão celular se inicia e o crescimento passa a ser acelerado numa etapa chamada fase exponencial. Nesta etapa, a fonte de energia principal é consumida por meio do processo fermentativo, ou seja, através da conversão da hexose abundante no meio em etanol. Quando a concentração de hexoses atinge valores inferiores a 0,2%, a levedura passa por um processo de estagnação de crescimento (fase diáuxica) e simultaneamente mecanismos metabólicos são ativados para iniciar a via aeróbica. Após a transição, o crescimento volta a ocorrer, porém, em velocidade menor que na fase fermentativa, consumindo lentamente o etanol acumulado no meio (fase pós-diáuxica). Quando o etanol esgota-se, as células param de se dividir e entram em um estado conhecido como fase estacionária (figura 14) (HERMAN, 2002; BUSTI *et al.*, 2010).

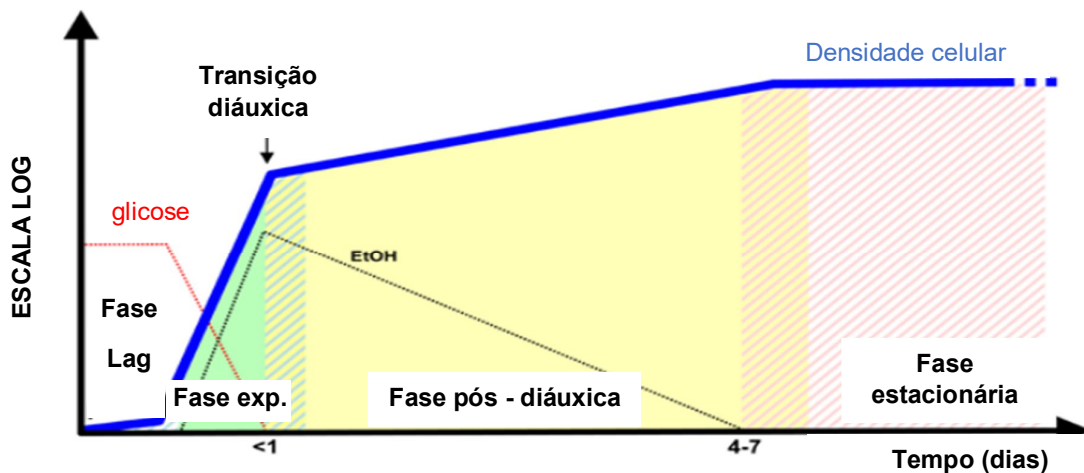


Figura 14. Fases de crescimento da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (BUSTI *et al.*, 2010, adaptado).

É exatamente na fase respiratória que a *Saccharomyces cerevisiae* estará mais exposta à geração de espécies oxidantes, atentando para o fato de a cadeia transportadora de elétrons da mitocôndria ser uma das principais fontes de origem dessas espécies, e conseqüentemente aos danos resultantes da ação dos EROs. Por outro lado, a *S. cerevisiae* possui sistemas de defesa enzimático e não-enzimático,

homólogos ao de células humanas, que exercem o papel de proteger e neutralizar as espécies reativas de oxigênio. As células de levedura na fase respiratória são mais resistentes a H_2O_2 e ânions superóxido do que na fase exponencial fermentativa (JAMIESON, 1998). Embora a explicação para isso não esteja completamente esclarecida, acredita-se que devido ao fato dos genes correspondentes a expressão de catalases, superóxido dismutases, glutathiona peroxidase e citocromo c peroxidase serem reprimidos pela concentração elevada de glicose e sob condições respiratórias, a expressão destes mesmos genes tornam-se elevadas, sugerindo assim uma maior capacidade antioxidante intracelular nessas condições (KREMS; CHARIZANIS; ENTIAN, 1995; MORADAS-FERREIRA *et al.*, 1996; JAMIESON, 1998).

3 OBJETIVO

Avaliar o potencial antioxidante *in vivo* de quatro compostos 3-amino-1,2,4-triazol-*N*-1,5-trissubstituídos inibidores de colinesterases utilizando células de *Saccharomyces cerevisiae*.

Objetivos Específicos

- Verificar e comparar a eficiência antioxidante *in vivo* dos compostos 3-amino-1,2,4-triazol-*N*-1,5-trissubstituído em diferentes fases de crescimento da levedura;
- Verificar a relação entre a ação antioxidante dos compostos 3-amino-1,2,4-triazol-*N*-1,5-trissubstituídos e a influência do sistema de defesa endógeno através da ausência da glutathione em células de *S. cerevisiae*;
- Relacionar a capacidade antioxidante dos compostos 3-amino-1,2,4-triazol-*N*-1,5-trissubstituído com a funcionalidade mitocondrial;
- Comparar a eficiência antioxidante *in vivo* desses compostos com o flavonoide antioxidante quercetina.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

4.1.1 Meios de cultura

Neste trabalho foram utilizadas duas formulações de meios de cultivo: meio YPD 2% líquido, composto de 1% de extrato de levedura (Difco/USA), 2% de peptona (Difco/USA) e 2% de glicose (Sigma); YPD 2% sólido, composto de 1% de extrato de levedura (Difco/USA), 2% de peptona (Difco/USA), 2% de glicose (Sigma) e 2% de ágar (Kasvi) para solidificar o meio.

Os frascos erlenmeyers contendo meio YPD 2% líquido foram preparados obedecendo à proporção de 20% de volume do frasco/volume de meio de cultura líquido. Os meios foram esterilizados em autoclave a 121 °C por 15 minutos. O meio sólido era vertido em placas estéreis em ambiente estéril proporcionado por uma cabine de fluxo laminar (com filtro HEPA, Marca Esco®).

4.1.2 Microrganismos e condições de cultivo

Foram utilizadas duas cepas de *Saccharomyces cerevisiae* (Tabela 1), sendo uma portadora e outra não de deficiência no sistema de defesa antioxidante do tripeptídeo glutationa.

Tabela 1. Cepas de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas no trabalho.

Cepas	Genótipo	Fenótipo
BY4741	<i>MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0</i>	Controle
<i>Δgsh1</i>	Isogênica da BY4741, exceto YJL101c::kanMX4	Cepa deficiente no tripeptídeo glutationa

As cepas foram adquiridas da companhia Euroscarf (<http://www.euroscarf.de/>), localizada em Frankfurt, na Alemanha; e armazenadas em meio sólido YPD 2% a 4 °C. No meio de armazenamento das cepas mutantes houve adição de geneticina (0,02%), uma vez que a deleção confere resistência a este antimicótico.

4.1.3 Preparação de repique e inóculo

Os repiques, uma técnica laboratorial baseada na transferência de um microrganismo de um meio de cultura para outro com a finalidade de manter as células utilizadas nutridas e metabolicamente ativas, foram preparados através da transferência de alçada de cultura para superfície de ágar contendo YPD 2% sólido em um tubo *viale*. Este tubo era incubado a 28 °C por 24 horas em estufa incubadora refrigerada (BOD, Marca SOLAB®).

Para o preparo do inóculo a fim de se trabalhar com as células na fase de crescimento respiratório (segunda fase de crescimento celular, com concentrações da suspensão celular acima de 2,8 mg/mL), uma massa de células do repique fresco foi transferida diretamente para o erlenmeyer contendo meio YPD líquido. O inóculo consiste em uma técnica laboratorial baseada na transferência de um microrganismo para um ambiente rico em nutrientes necessários para promover o crescimento celular, resultando em uma maior disponibilidade de células para a realização dos experimentos.

Visando trabalhar com as células no início do crescimento exponencial (primeira fase de crescimento celular, com concentrações da suspensão celular entre 0,5 e 1,0 mg/mL), para o preparo do inóculo uma alíquota com células do repique fresco foi transferida para um tubo de ensaio contendo 10 mL de água destilada estéril. Um volume dessa suspensão correspondente a 20 µg de células foi transferido para um erlenmeyer contendo 100 mL de meio YPD líquido.

Em ambos os casos, o inóculo foi incubado a 28 °C por 22 horas sob agitação de 160 rpm em incubadora tipo shaker (Incubadora orbital refrigerada, Marca NOVATECNICA®). Após o crescimento das células, a concentração das mesmas foi determinada através da medida da absorvância em espectrofotômetro (UV/Vis, Marca Biospectro®) a 570 nm.

4.1.4 Preparo das substâncias testadas e do padrão

As substâncias analisadas neste trabalho foram escolhidas dentre uma série de compostos inéditos derivados da série contendo o núcleo 3-amino-1,2,4-triazol-N-1,5-trissubstituídos, planejados como inibidores de colinesterases e sintetizados pela doutoranda Daiana de Fatima Portella Franco, orientada pelo Professor Dr. Arthur Eugen Kümmerle no Laboratório de Diversidade Molecular e Química Medicinal – LaDMol-QM da UFRRJ.

Dentre os 29 compostos sintetizados, 4 foram selecionados (90B, 90C, 90N e 90R). Os compostos 90B e 90C foram escolhidos por possuírem um núcleo fenólico, portanto, fortes candidatos a apresentarem atividade antioxidante. O composto 90N destacou-se como um dos mais eficazes inibidores no ensaio da atividade anticolinesterásica e, por último, o composto 90R foi selecionado por apresentar a melhor ação antioxidante em um ensaio *in vitro*.

Os compostos 90B, 90N e 90R foram solubilizados em mistura de DMSO e água destilada na proporção 1:1. O composto 90C foi solubilizado em mistura de DMSO e água destilada na proporção 2:1. Preparou-se uma solução estoque na concentração de 2000 µM. É importante ressaltar que a concentração não-tóxica de DMSO às leveduras é de 3% (SADOWSKA-BARTOSZ *et al.*, 2013), e que nestes ensaios a concentração atingida nas culturas celulares durante os tratamentos foi de no máximo 0,7% de DMSO.

A quercetina foi solubilizada em uma mistura de água destilada e DMSO na proporção 4:1, e preparou-se uma solução estoque na concentração de 5000 µM.

4.2 Métodos

4.2.1 Teste da resazurina

Inicialmente foram distribuídos 50 μL de meio YPD livre de células nos poços da placa de 96 cavidades (estéril), de fundo chato, com tampa. Em seguida adicionou-se 50 μL da solução das substâncias a serem analisadas no primeiro poço de uma mesma linha, com uma concentração inicial das substâncias de 1000 μM . Diluições seriadas foram realizadas a partir da retirada de 50 μL da cavidade mais concentrada para a cavidade sucessora. Após a diluição, adicionou-se em cada poço 10 μL da suspensão celular (inóculo) das cepas da levedura *S. cerevisiae*, para obter uma leitura da absorvância de 0,04 em cada poço.

Como controle negativo, foi adicionado num poço 50 μL do meio de cultura livre de células, e como controle positivo 50 μL de meio com 10 μL da suspensão celular (inóculo). Após 24 horas de contato com as leveduras, a citotoxicidade das diversas concentrações das substâncias foi avaliada por meio do ensaio de capacidade metabólica, baseado no metabolismo celular capaz de reduzir a substância resazurina em resorufina. Adicionou-se 10 μL de solução aquosa de resazurina 0,01% (p/v) em cada um dos poços e após 30 minutos o surgimento de uma coloração rosa é indicativo da presença de atividade metabólica (Figura 15), enquanto a violeta ou azulada indica sua ausência. Todo o procedimento neste ensaio foi realizado na capela de fluxo laminar em ambiente estéril.

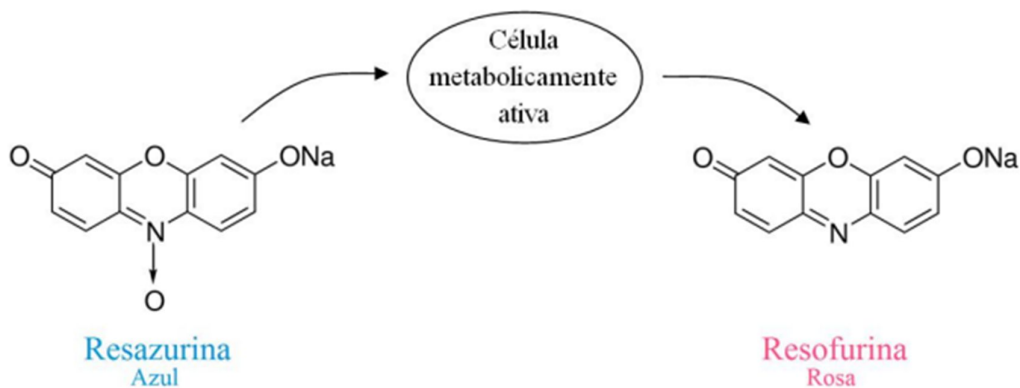


Figura 15. Representação esquemática da conversão por oxirredução do corante resazurina para resorufina por células metabolicamente ativas (CANABARRO, 2017).

4.2.2 Curva de crescimento

Para as curvas de crescimento foram preparados dois meios YPD (100 mL), onde um passou pelo procedimento do inóculo e o outro manteve-se como meio livre (sem células). Após o crescimento celular foi verificada a concentração e retirada uma alíquota de suspensão celular correspondente a 0,1 mg/mL, transferindo-a para erlenmeyers de 100 mL contendo 9,0 mL de meio YPD livre. Em seguida, completava-se este volume com meio livre até o total de 10,0 mL, acrescentando também 0,1 mL das soluções das substâncias, de modo que a concentração final das substâncias em contato com as células fosse de 20 μM .

Imediatamente uma amostra de cada erlenmeyer era coletada e sua concentração conferida, constituindo a absorvância relativa ao tempo zero da curva de crescimento. Os erlenmeyers permaneceram incubados a 28 °C/160 rpm e alíquotas foram recolhidas nos respectivos intervalos de tempo de 3, 5, 7, 22 e 24 horas.

4.2.3 Pré-tratamento com as substâncias e peróxido de hidrogênio

Após 22 horas de incubação do inóculo, determinou-se a concentração da suspensão celular e transferiu-se para tubos tipo falcon estéreis um volume de suspensão celular correspondente a uma quantidade específica demandada para cada ensaio. A suspensão celular foi centrifugada e lavada com água destilada estéril gelada, centrifugando novamente após a lavagem. Adicionou-se, em cada tubo, um volume, também específico para cada ensaio, de solução de tampão fosfato de potássio 0,5 M pH 6,0 e transferiu-se para erlenmeyers de volume que obedecessem à proporção de 20% de volume do frasco/volume de suspensão celular no frasco. Em seguida, adicionou-se alíquotas das soluções das substâncias de modo que a concentração nesses erlenmeyers ficasse em 20 µM, mantendo-os por 2 horas sob agitação a 28 °C/160 rpm.

Em seguida, a suspensão celular foi recolhida mais uma vez nos tubos tipo falcon estéreis e lavada duas vezes com água destilada estéril gelada, centrifugando após cada lavagem. Adicionou-se, novamente, o mesmo volume anterior de solução de tampão fosfato de potássio 0,5 M pH 6,0 e transferiu-se a suspensão para os mesmos erlenmeyers. Acrescentou-se solução de peróxido de hidrogênio (Merck) em todos os erlenmeyers, exceto um (células sem incubação com as substâncias de análise), na concentração de 1,0 mM ou 2,0 mM, dependendo do ensaio, e deixados por 1 hora sob agitação a 28 °C/160 rpm.

4.2.4 Peroxidação lipídica

Após o período de contato com o peróxido de hidrogênio, o volume total da suspensão celular, correspondente a 50 mg de células, foi coletado em tubos tipo falcon (não estéreis) e centrifugado a 4000 rpm/5 min. Centrifugou-se e lavou-se essas células por duas vezes com 10 mL de água destilada estéril gelada, centrifugando novamente após cada lavagem. Após esta etapa, as células foram ressuspensas em 5,0 mL de água destilada, e retirou-se uma alíquota de 0,1 mL, completada com 9,9 mL de água e verificada a concentração celular a 570 nm. O restante da suspensão foi centrifugado, ressuspendido em 0,5 mL de TCA 10% (ácido tricloroacético diluído em solução tampão fosfato de potássio 0,5 M pH 6,0) e transferido para tubos de parede grossa contendo 1,5 g de pérolas de vidro.

Realizou-se um extrato promovendo a lise das células por meio de 6 ciclos de agitação de 20 segundos no vórtex (agitador de tubos, Marca Gehaka®) em velocidade máxima com 20 segundos de repouso no gelo. Em seguida o extrato foi recolhido em tubos tipo eppendorf e centrifugados a 4000 rpm/4 min. Em outro eppendorf foi adicionado 150 µL do sobrenadante do extrato, 150 µL de H₂O, 100 µL de EDTA (Vetec) 0,1 M e 600 µL de ácido tiobarbitúrico (Merck) 1% em NaOH 0,05 M. Também foi preparado um branco reacional, contendo 0,3 mL de H₂O sem o extrato

celular, e uma duplicata reacional contendo o dobro de sobrenadante obtido do extrato. A mistura reacional foi incubada a 100 °C por 15 minutos. Os tubos foram resfriados e a absorvância medida espectrofotometricamente a 532 nm (Figura 16). Os resultados foram expressos em picomoles de malonaldeído (MDA – produto da peroxidação lipídica) por miligrama de células (pmoles MDA/mg cel.) (STEELS; LEARMONTH; WATSON, 1994).

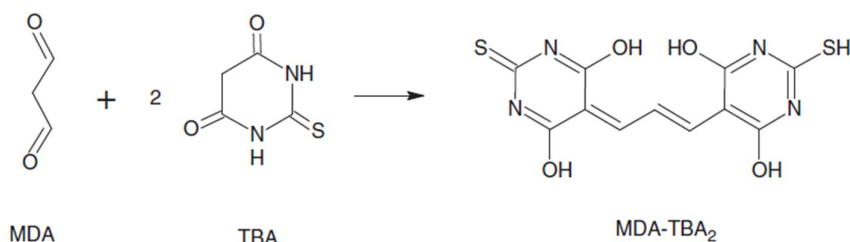


Figura 16. Reação entre malonaldeído (MDA) e o ácido tiobarbitúrico (TBA) formando o complexo MDA-TBA detectável no espectrofotômetro a 532 nm (DESAI FARRIS; RAY, 2014).

4.2.5 Oxidação Intracelular

Um volume correspondente a 3,0 mg da suspensão celular foi tratado com as substâncias analisadas neste estudo em tubos tipo eppendorfs. Após lavagem com água destilada estéril duas vezes, seguidas de centrifugação, as células foram ressuspensas em 1,0 mL de tampão fosfato de potássio 0,5 M pH 7,8. Em seguida, foi adicionado 20 µL de solução de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (H₂DCFDA) (Sigma/EUA), a partir de uma solução estoque em etanol 1,0 mM, mantendo-se uma concentração de 20 µM em contato com as células. Passados 15 minutos foi adicionado 20 µL de solução de peróxido de hidrogênio, mantendo-se a concentração de 2,0 mM desse agente estressante.

Após 1 hora de incubação a 28 °C e 200 rpm, as suspensões celulares foram centrifugadas e transferiu-se alíquotas dos sobrenadantes para uma placa de 96 poços. A fluorescência dos sobrenadantes foi medida (Figura 17) usando um leitor de microplacas (HIDEX, Turku, Finlândia) nos comprimentos de onda de excitação e emissão de 488 e 520 nm, respectivamente (SUBHASWARAJ *et al.*, 2017).

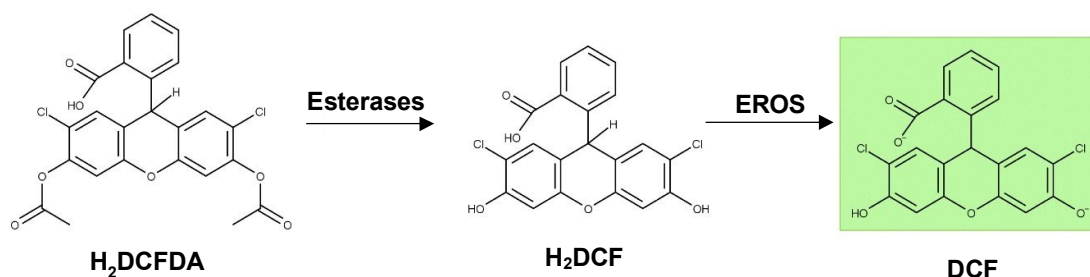


Figura 17. Reação geral da formação da diclorofluoresceína (DCF) detectável através do fluorímetro (NG; OOI, 2021, adaptado).

4.2.7 Consumo de oxigênio

Um volume correspondente a 3,0 mg da suspensão celular foi tratado com as substâncias analisadas neste estudo em tubos tipo eppendorfs. Após o período de contato com o peróxido de hidrogênio (2,0 mM) as células foram lavadas duas vezes com água destilada estéril e ressuspensas em 1,0 mL de tampão fosfato de potássio (0,05 M, pH 6,0). Um volume correspondente a 2,5 mg de células de suspensão celular foi utilizado na câmara do oxígrafo.

O consumo de oxigênio foi medido em um oxígrafo, onde é formado um gráfico que expressa a quantidade de oxigênio residual consumido pela mitocôndria das células em função do tempo (Figura 18), utilizando um eletrodo do tipo Clark (Oxytherm, Hansatech Instrument®) inserido em uma câmara com capacidade de 2,0 mL com um agitador magnético incluso. Após calibrar o eletrodo a 28 °C entre 0 e 100% de saturação com o oxigênio atmosférico, foi transferido para a câmara 2,0 mL do mesmo tampão fosfato em que as células foram ressuspensas. Após aproximadamente 45 segundos, retirou-se da cubeta uma alíquota de tampão de mesmo valor do volume correspondente a 2,5 mg de células de suspensão celular adicionado em seguida.

Com a finalidade de ativar o metabolismo celular adicionou-se 4 µL de uma solução de glicose (0,5 mg/mL). Após a adição da glicose na câmara, a respiração basal foi registrada representando o consumo de oxigênio das células de levedura. Com o interesse em avaliar a capacidade máxima da cadeia transportadora de elétrons e a diferença entre o consumo de oxigênio na respiração basal e o consumo máximo foi adicionado 10 µL (em duas adições de 5 µL) do cianeto de carbonila 4-(trifluorometoxi)fenil-hidrazona (FCCP) (1,0 mM em etanol), chegando a uma concentração de 5 µM do ionóforo. FCCP é uma molécula capaz de captar os prótons do espaço intermembranar à matriz mitocondrial, desacoplando o consumo de oxigênio da síntese de ATP (FONSECA, 2021).

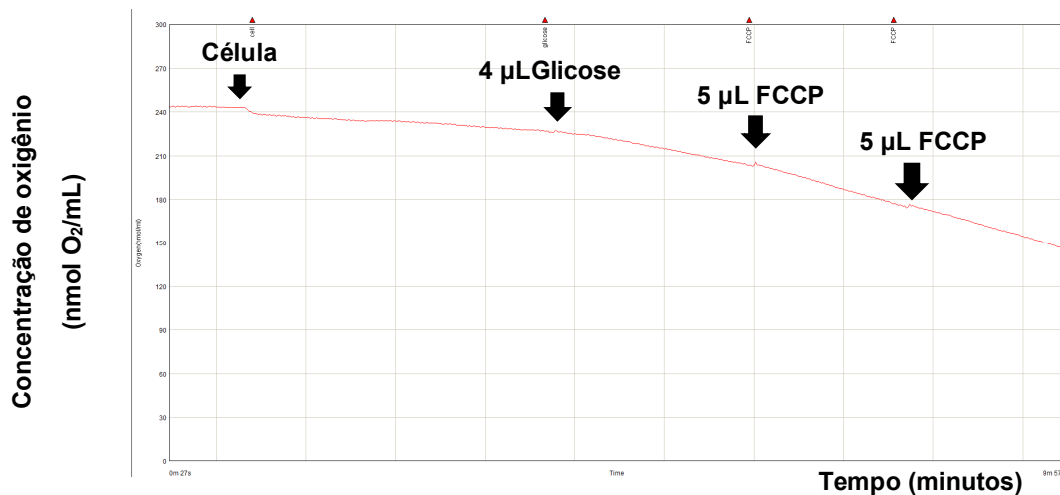


Figura 18. Exemplo de gráfico de consumo de oxigênio obtido neste trabalho. Ensaio com células da cepa BY4741 (Autoria própria).

4.3 Análise estatística

Os resultados foram apresentados na forma de uma média e desvio padrão de três experimentos independentes, no mínimo. Por meio do PRISMA 8 foi aplicado o teste de análise de variância ANOVA seguido do teste de Tuckey para a comparação entre os resultados gerados das diversas médias. A diferença foi considerada estatisticamente significativa quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Teste da Resazurina

Como abordado ao longo deste estudo, compostos triazólicos são conhecidos pela abrangência em atividades biológicas, dentre essas a atividade antifúngica poderia significar uma restrição nas análises de capacidade antioxidante utilizando células de levedura como modelo biológico. Visando verificar quais concentrações dos 4 compostos 3-amino-1,2,4-triazol-*N*-1,5-trissubstituídos selecionados não seriam tóxicas às células de *S. cerevisiae*, determinando assim as concentrações mais adequadas para se trabalhar, evitando possíveis erros de interpretação nas avaliações subsequentes, foi realizado o ensaio com o composto resazurina. O ensaio é baseado na redução intracelular de resazurina (coloração azul) a resorufina (coloração rosa) por células viáveis, metabolicamente ativas, que utilizam NADH e NADPH como fonte de elétrons. A resazurina é muito estável, não tóxica para células e usuários, solúvel em água, fácil de manusear e os resultados são determinados rapidamente (PETTIT *et al.*, 2005); e já foi demonstrado que a sensibilidade de *S. cerevisiae* a uma ampla gama de fungicidas é comparável à de muitas espécies de leveduras recomendando seu uso para testes de toxicidade (FAI; GRANT, 2009).

A partir das colorações obtidas para os tratamentos nos poços da placa de 96 poços pôde-se analisar a toxicidade dos compostos 90B presente na linha A; 90C na linha B; 90N na linha C e o composto 90R na linha D. Comparando com o poço controle pode-se identificar a coloração apresentada para células sob condições normais (F12). Podemos observar a seguir os resultados apresentados frente às cepas BY4741 (Figura 19) e $\Delta gsh1$ (Figura 20). Para melhor visualização dos resultados deste teste, foi construída uma tabela relacionando a concentração dos compostos triazólicos com a toxicidade observada (Tabela 2).

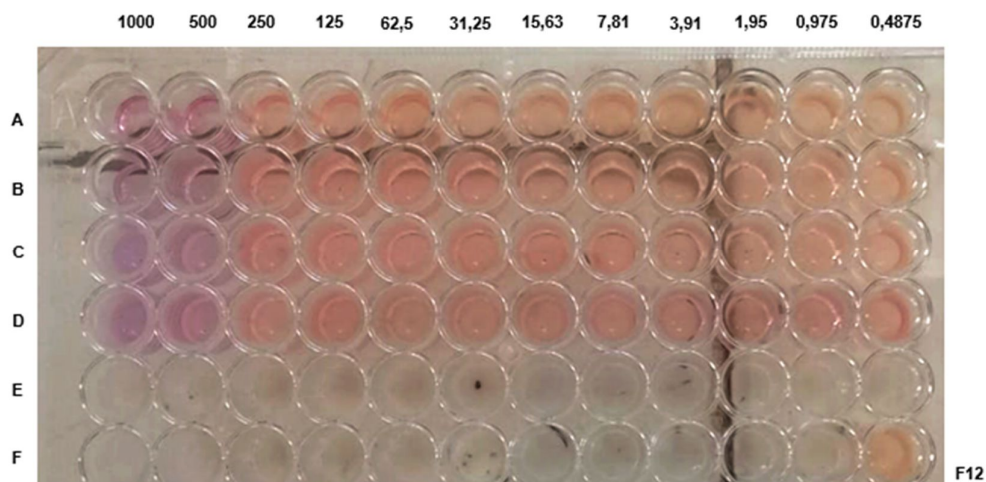


Figura 19. Teste de toxicidade com a resazurina utilizando a cepa BY4741. Diferentes concentrações em micromolar na parte superior da imagem dos compostos 90B (A); 90C (B) 90N (C) e 90R (D). Poço controle com células com metabolismo ativo (F12).

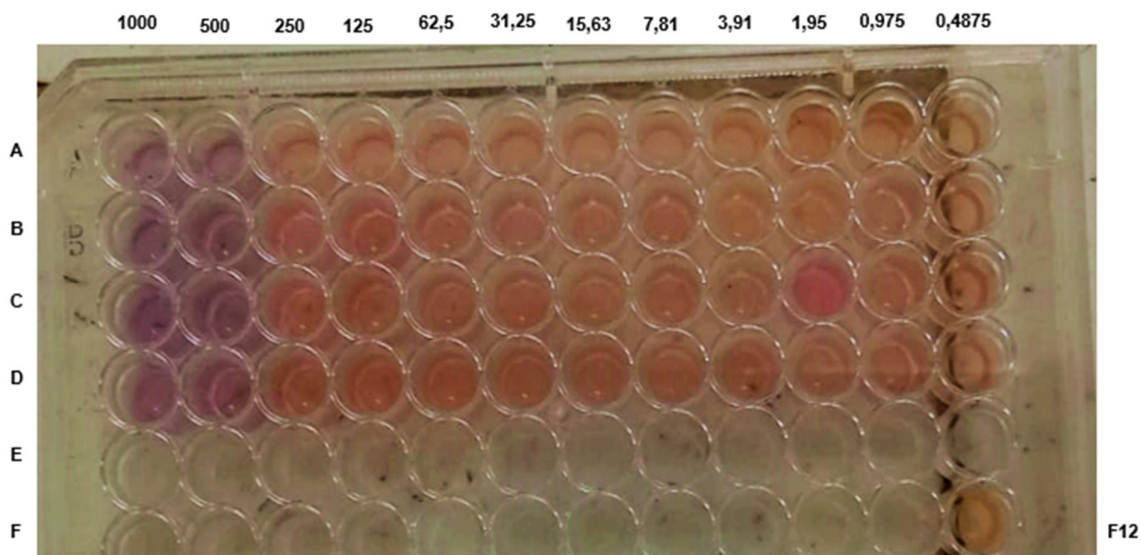


Figura 20. Teste de toxicidade com a resazurina utilizando a cepa $\Delta gsh1$. Diferentes concentrações em micromolar na parte superior da imagem dos compostos 90B (A); 90C (B) 90N (C) e 90R (D). Poço controle com células com metabolismo ativo (F12).

Tabela 2. Resultado do ensaio de toxicidade das amostras no ensaio da resazurina nas cepas BY4741 e $\Delta gsh1$: (+) toxicidade significativa e (-) toxicidade baixa ou inexistente.

Concentração (μM)	Toxicidade 90B	Toxicidade 90C	Toxicidade 90N	Toxicidade 90R
	(Linha A)	(Linha B)	(Linha C)	(Linha D)
	BY/ $\Delta gsh1$	BY/ $\Delta gsh1$	BY/ $\Delta gsh1$	BY/ $\Delta gsh1$
1000	+/+	+/+	+/+	+/+
500	+/+	+/+	+/+	+/+
250	-/-	-/-	-/-	-/-
125	-/-	-/-	-/-	-/-
62,5	-/-	-/-	-/-	-/-
31,25	-/-	-/-	-/-	-/-
15,625	-/-	-/-	-/-	-/-
7,81	-/-	-/-	-/-	-/-
3,91	-/-	-/-	-/-	-/-
1,95	-/-	-/-	-/-	-/-
0,975	-/-	-/-	-/-	-/-
0,4875	-/-	-/-	-/-	-/-

Os ensaios sugerem que abaixo de 250 μM nenhuma das quatro substâncias apresenta toxicidade às células de *S. cerevisiae* em ambas as cepas, sugerindo que a ausência de glutatona não concedeu maior sensibilidade a célula da levedura frente aos compostos triazólicos testados. Na literatura encontramos alguns casos de derivados triazólicos que tiveram sua toxicidade frente a células de diferentes espécies de levedura através do ensaio da resazurina, como no caso dos compostos derivados N1-[1-aryl-2-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)-etilideno]-piridina-2-carboxamidrazona. Os compostos apresentaram MIC_{90} (menor concentração capaz de inibir o crescimento de cerca de 90% da população celular) de 64 mg/L para *Candida albicans* e *Candida glabrata*, independente dos substituintes presentes em cada substância (H, Br, Cl, CH_3 , Ph). Convertendo para a unidade de concentração utilizada neste trabalho de modo a estabelecer uma melhor comparação, obtemos os valores de 209,6 μM (H); 166,5 μM (Br); 188,5 μM (Cl); 200,4 μM (CH_3) e 166,8 μM , valores esses considerados pelos autores como insatisfatórios em atividade antifúngica (BANFI *et al.*, 2006). Em outro estudo, dessa vez utilizando o itraconazol, um derivado triazólico amplamente conhecido como um potente antifúngico, teve sua toxicidade testada por meio do ensaio da resazurina frente aos fungos *Paracoccidioides brasiliensis* e *Paracoccidioides lutzii*. Os resultados mostraram que concentrações de 0,21 e 0,11 μM para o fungo *P. brasiliensis* e concentrações de 0,42 e 0,11 μM para o fungo *P. lutzii* já demonstravam toxicidade significativa (DE PAULA E SILVA *et al.*, 2013).

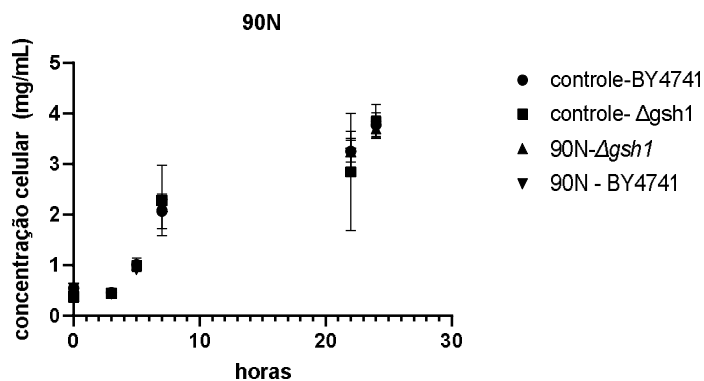
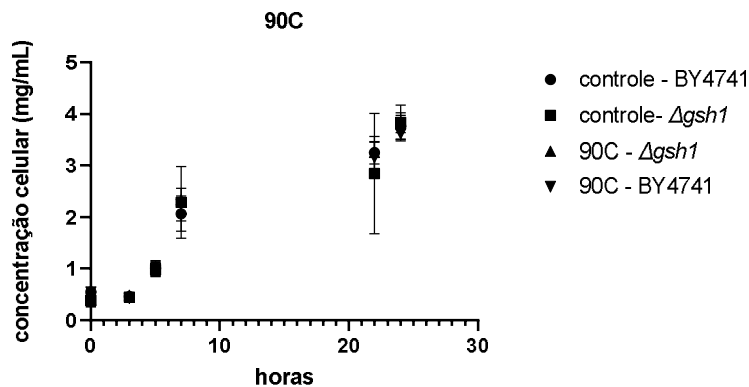
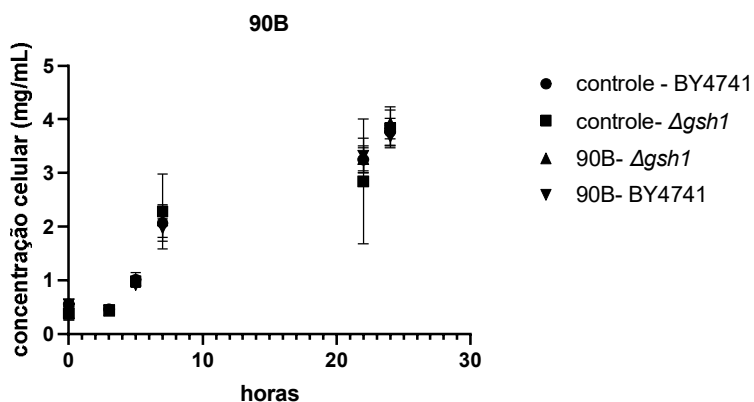
Esses resultados nos permitem concluir que os quatro compostos triazólicos avaliados não possuem uma atividade antifúngica relevante, tendo em vista que as concentrações tóxicas apresentadas por essas substâncias frente a células de levedura (1,0 mM e 500 μM) são muito superiores as apresentadas por compostos classificados como antifúngicos de referência (DE PAULA E SILVA *et al.*, 2013). Essa análise possibilitou maiores opções de concentrações seguras para explorar a possível atividade antioxidante das substâncias.

A partir de estudos publicados buscou-se compostos que apresentassem semelhanças estruturais e com propriedades biológicas avaliadas semelhantes ao nosso estudo para servir de base na escolha das concentrações a serem utilizadas nos ensaios a seguir. Um estudo que avaliou a capacidade antioxidante em ratos de uma série de novos derivados de bifenil-3-oxo-1,2,4-triazina ligados com piperazina foi selecionado como referência (TRIPATHI *et al.*, 2019). A concentração utilizada foi de 10 mg/Kg ou 10 ppm que convertendo para μM encontramos as concentrações de 21,34 μM para os compostos 90B e 90C; 20,11 μM para o 90N e 22,047 μM para o 90R.

De modo que todos tivessem a mesma concentração para melhor comparação de resultados, decidiu-se normalizar em 20 μM , uma concentração não tóxica como demonstrada no ensaio da resazurina localizada entre as colunas 6 e 7 das placas de 96 poços.

5.2 Curvas de Crescimento

A curva de crescimento foi construída de modo a complementar os resultados obtidos no ensaio da resazurina e fornecer de forma quantitativa e detalhada a influência dos compostos triazólicos sobre a proliferação das células de *S. cerevisiae*. Após as suspensões celulares serem submetidas ao contato das substâncias avaliadas, foi efetuada a leitura das absorvâncias transformadas em concentrações celulares com auxílio do espectrofotômetro no comprimento de onda de 570 nm após 0, 3, 5, 7, 22 e 24 horas. Os resultados obtidos para as cepas BY4741 e $\Delta gsh1$ foram descritos e apresentados abaixo (Figura 21).



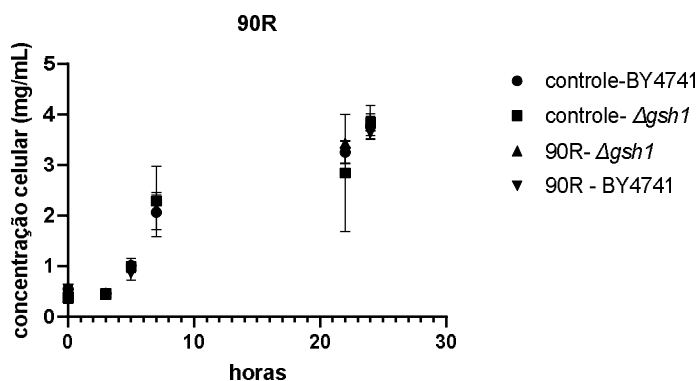


Figura 21. Curvas de crescimento utilizando as cepas BY4741 e $\Delta gsh1$. Concentrações celulares obtidas após a exposição das células aos compostos 90B, 90C, 90N e 90R na concentração de 20 μM durante 24 horas. Os resultados representam a média de pelo menos três experimentos independentes, com $p < 0,05$ na análise de ANOVA *one way* seguida de pós teste de Tukey.

As curvas de crescimento de ambas as cepas confirmaram os resultados vistos no ensaio da resazurina, ou seja, nenhum composto triazólico na concentração de 20 μM apresentou toxicidade às células de levedura, observável pela proximidade nos valores das concentrações celulares ao longo de todo o experimento em comparação com a amostra controle que contém apenas células de *S. cerevisiae*, evidenciando assim que não houve nenhuma interferência para o crescimento das células. Além disso, outra semelhança ao ensaio da resazurina é a similaridade no perfil dos resultados apresentados nas duas cepas, confirmando mais uma vez que a ausência de glutatona não concedeu vulnerabilidade frente aos triazóis.

Na cepa BY4741, após 24 horas, período máximo de duração do ensaio, a amostra controle apresentou uma concentração celular de $3,77 \pm 0,25$ mg/mL; sem diferenças estatísticas significantes com as concentrações $3,67 \pm 0,22$ mg/mL, $3,61 \pm 0,14$ mg/mL, $3,75 \pm 0,20$ mg/mL e $3,63 \pm 0,07$ mg/mL dos compostos 90B, 90C, 90N e 90R, respectivamente. Na cepa $\Delta gsh1$, após as mesmas 24 horas, o mesmo foi observado na comparação com o ensaio controle, onde a concentração celular de $3,84 \pm 0,34$ mg/mL foi estatisticamente semelhante às concentrações $3,93 \pm 0,30$ mg/mL, $3,81 \pm 0,17$ mg/mL, $3,70 \pm 0,19$ mg/mL e $3,77 \pm 0,19$ mg/mL na presença compostos 90B, 90C, 90N e 90R, respectivamente.

O estudo realizado com o composto 3-amino-1,2,4-triazol, parte do esqueleto carbônico presente na estrutura das substâncias usadas neste trabalho, demonstrou que as concentrações de 1,0 mM e 10,0 mM não foram tóxicas em células de *S. cerevisiae* ao não inibirem o seu crescimento ao longo de 80 horas (BAYLIAK *et al.*, 2008). Os compostos avaliados neste trabalho, como mostrado no teste da resazurina, foram tóxicos na concentração de 1,0 mM. Essa diferença observada pode estar atrelada a combinação dos substituintes e da subunidade benzilpirerazina presentes na estrutura das substâncias avaliadas.

Diversos estudos demonstraram a toxicidade de derivados triazólicos frente às células de *S. cerevisiae*, como no caso dos derivados de cumarina triazol. Neste estudo a avaliação antibacteriana e antifúngica mostrou que a introdução do anel triazol, que resultou nos compostos monotriazol cumarínicos, contribuiu para um

aumento da eficiência antimicrobiana quando comparado com os compostos contendo apenas os núcleos cumarínicos. A importância da fração triazólica ficou ainda mais evidente com a introdução de mais um triazol, formando a série bis-triazol cumarínico, que apresentou excelentes atividades antimicrobianas em contraste com seu controle positivo. Levando-se em consideração os ensaios especificamente com *S. cerevisiae*, o bis-triazol contendo um ligante (CH₂)₄ apresentou a inibição mais potente com concentração inibitória mínima (CIM) aproximada de 4,5 µM entre todas as substâncias testadas, incluindo o medicamento padrão fluconazol, indicando que o tipo de ligante e os comprimentos das cadeias alifáticas influenciaram a eficácia antimicrobiana, onde as atividades biológicas inibitórias diminuíram com o aumento do comprimento da cadeia alifática (SHI; ZHOU, 2011).

A presença de dois núcleos triazólicos e a maior toxicidade em células de *S. cerevisiae* também foi observada no trabalho que sintetizou uma nova série de derivados bis-(1,2,3 e 1,2,4)-triazóis. Os resultados sugeriram que entre todos os compostos sintetizados, dois compostos que possuíam os radicais Cl-Ph, mas que se diferenciavam pela presença de radicais PhCOCH₂ e PhCO, e outros dois compostos com radicais *p*-BrPhCOCH₂-S- e *m*-BrPhCOCH₂-S foram os principais compostos que exibiram toxicidade aumentada em *S. cerevisiae* (BITLA *et al.*, 2021).

Esses estudos sugerem que a presença de dois núcleos triazóis, mesmo que de formas isostéricas distintas, estão diretamente relacionados à sua toxicidade em fungos. Essa relação fica ainda mais forte ao observarmos os bis-triazóis antifúngicos padrões como fluconazol, itraconazol e posaconazol. Além disso, como também demonstrado nos derivados bis-(1,2,3 e 1,2,4)-triazol, a presença de halogênios como substituintes vem sendo também relacionada a uma maior toxicidade em células de levedura inclusive em casos de monotriazóis.

Em um estudo com 3-(1,2,4-triazol-1-il)flavanonas utilizando *S. cerevisiae* (NCYC 694), os resultados revelaram que as flavanonas 4'-halogenadas e 3'-halogenadas mostraram-se mais potentes como agentes antifúngicos que o fluconazol, apresentando atividades entre 8 e 16 vezes melhores (EMAMI *et al.*, 2013). Entre os halobenzil sulfonamidas 1,2,4-triazóis com ausência de halogênios, houve baixa atividade na inibição do crescimento de todas as cepas fúngicas testadas. Já os derivados de sulfonamida com átomo de cloro apresentaram atividade antifúngica relativamente melhor do que os fluorados (HE *et al.*, 2018).

Em resumo, compostos derivados 1,2,4-triazol são extensamente retratados na literatura pela propriedade antifúngica, onde fatores como a presença de dois núcleos triazólicos e de substituintes halogênicos na estrutura dessas substâncias têm sido apontados por estudos como relevantes no aumento de suas toxicidades em células de levedura. Observando a estrutura dos quatro compostos 3-amino-1,2,4-triazol-*N*-1,5-trissubstituídos avaliados neste trabalho, constata-se a ausência de tais fatores, o que pode explicar a baixa toxicidade apresentada dessas substâncias frente às células de *S. cerevisiae*.

5.3 Ação dos triazóis sobre os níveis de peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica pode ser definida como uma série de reações em cadeia iniciada pela ação dos radicais livres sobre os lipídios insaturados das membranas celulares, resultando principalmente na formação de radicais lipídicos que possibilitam a propagação dos danos celulares causando rompimento de sua estrutura e, numa condição extrema, morte celular. Muitos aldeídos são produzidos durante a peroxidação lipídica, dentre eles destaca-se o malonaldeído (MDA), determinado com grande eficiência pelo ensaio de “substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico” (TBARS) com medidas feitas por espectrofotometria. Este ensaio, portanto, visa caracterizar o dano oxidativo refletido nos níveis do complexo MDA-TBA formado no teste (REPETTO; SEMPRINE; BOVERIS, 2012).

As leveduras mutantes geneticamente modificadas permitem verificar a importância dos genes deletados em diferentes situações de estresse. A ausência de um componente da defesa antioxidante gera uma cepa teoricamente mais sensível a danos oxidativos comparados a sua cepa controle (BY4741), que apresenta seu genoma completo, com todos os genes relacionados às defesas antioxidantes nestas células. A cepa $\Delta gsh1$ é deficiente na produção do tripeptídeo glutationa, pela ausência de uma das enzimas responsáveis pela sua síntese. Utilizando duas cepas permite desta forma uma melhor observação da capacidade de proteção das substâncias analisadas frente aos danos oxidativos gerados pelo peróxido de hidrogênio.

Após o tratamento com as substâncias, realizada a lise celular e promovida a reação entre o malonaldeído presente no extrato celular com o ácido tiobarbitúrico, obteve-se, após leitura no espectrofotômetro em 532 nm, o perfil de peroxidação nas cepas controle e $\Delta gsh1$ em metabolismo respiratório (Figura 22).

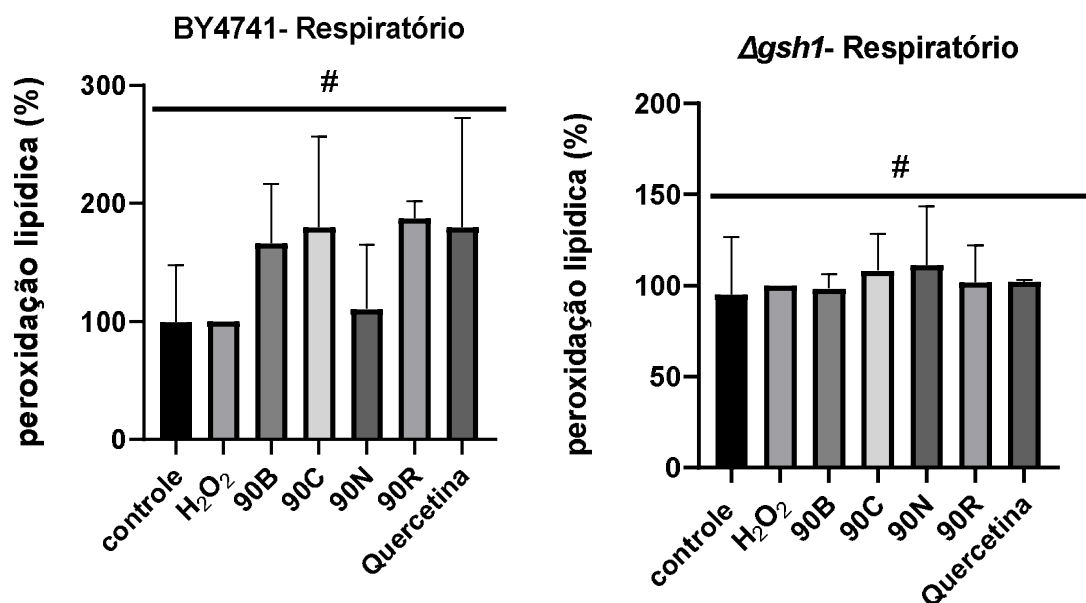


Figura 22. Quantificação da peroxidação lipídica nas cepas BY4741 e $\Delta gsh1$ em metabolismo respiratório. Os compostos 90B, 90C, 90N, 90R e quercetina nas concentrações de 20 μ M permaneceram em contato com as células de *S. cerevisiae* por 2 horas antes de um estresse oxidativo por peróxido de hidrogênio (1,0 mM) por mais 1 hora. Tratamento controle são células não estressadas encubadas em solução tampão fosfato. Os resultados representam a média de pelo menos três experimentos independentes e foram expressos em porcentagem em função do tratamento com H₂O₂ (células estressadas sem tratamento com os compostos). Hashtags iguais mostram resultados estatisticamente semelhantes ($p < 0,05$) na análise de ANOVA *one way* seguida de pós teste de Tukey.

Os resultados em metabolismo respiratório demonstraram que todos os tratamentos em ambas as cepas foram semelhantes estatisticamente entre si, porém inclusive entre os ensaios controle e na presença de peróxido de hidrogênio. Essa semelhança indicou que mesmo com a adição de peróxido de hidrogênio as células não estavam sofrendo o estresse oxidativo esperado, o que impossibilitou a realização de uma análise antioxidante apropriada. Esses resultados indicaram que em metabolismo respiratório as células de *S. cerevisiae* mostraram-se naturalmente resistentes à peroxidação lipídica. Diante disso, para que as células fossem de fato estressadas neste ensaio foi necessário trabalhar em metabolismo fermentativo, tendo em vista que nesta fase as células de *Saccharomyces* encontram-se mais sensíveis ao peróxido de hidrogênio (JAMIESON, 1998).

Após o tratamento com as substâncias na cepa controle obteve-se o perfil de peroxidação em metabolismo fermentativo apresentado abaixo (Figura 23).

BY4741 - Fermentativo

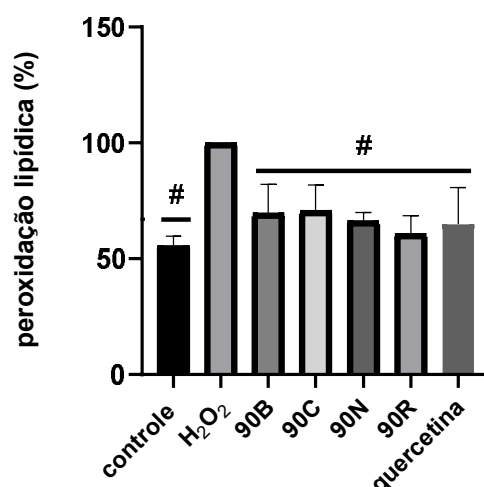


Figura 23. Quantificação da peroxidação lipídica na cepa BY4741 em metabolismo fermentativo. Os compostos 90B, 90C, 90N, 90R e quercetina nas concentrações de 20 μ M permaneceram em contato com as células de *S. cerevisiae* por 2 horas antes de um estresse oxidativo por peróxido de hidrogênio (1,0 mM) por mais 1 hora. Tratamento controle são células não estressadas encubadas em solução tampão fosfato. Os resultados representam a média de pelo menos três experimentos independentes e foram expressos em porcentagem em função do tratamento com H₂O₂ (células estressadas sem tratamento com os compostos). Hashtags iguais mostram resultados estatisticamente semelhantes ($p < 0,05$) na análise de ANOVA *one way* seguida de pós teste de Tukey.

Este ensaio mostrou que as células tratadas com todos os compostos triazólicos avaliados apresentaram redução significativa nos níveis de peroxidação lipídica, com destaque para os compostos 90N e 90R, com reduções em torno de 34% e 40%, respectivamente, em relação às células estressadas (peróxido); inclusive sendo estatisticamente semelhantes às células que não sofreram estresse oxidativo (controle). Os compostos 90B e 90C obtiveram reduções semelhantes, em torno de 30%; porém não foram estatisticamente semelhantes às células do ensaio controle. Estes resultados também mostram que todos os compostos triazólicos testados foram potencialmente antioxidantes, protegendo os lipídios de membrana das células de levedura contra a formação dos produtos da peroxidação lipídica.

Após o tratamento com as substâncias na cepa Δ *gsh1* obteve-se o perfil de peroxidação em metabolismo fermentativo apresentado abaixo (Figura 24).

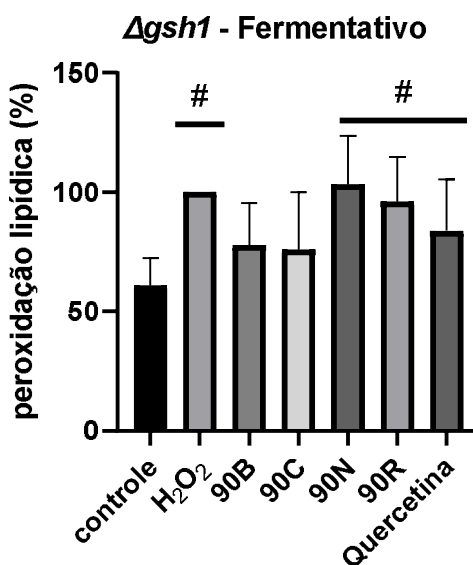


Figura 24. Quantificação da peroxidação lipídica na cepa *Δgsh1* em metabolismo fermentativo. Os compostos 90B, 90C, 90N, 90R e quercetina nas concentrações de 20 μ M permaneceram em contato com as células de *S. cerevisiae* por 2 horas antes de um estresse oxidativo por peróxido de hidrogênio (1,0 mM) por mais 1 hora. Tratamento controle são células não estressadas encubadas em solução tampão fosfato. Os resultados representam a média de pelo menos três experimentos independentes e foram expressos em porcentagem em função do tratamento com H₂O₂ (células estressadas sem tratamento com os compostos). Hashtags iguais mostram resultados estatisticamente semelhantes ($p < 0,05$) na análise de ANOVA *one way* seguida de pós teste de Tukey.

Este ensaio mostrou que na ausência da glutatona os compostos 90N e 90R, que haviam apresentado um alto potencial antioxidante na cepa BY4741, não foram eficientes na redução da peroxidação lipídica, inclusive apresentaram resultados estatisticamente semelhantes às células tratadas apenas com o peróxido de hidrogênio, assim como o padrão antioxidante quercetina. No entanto, os tratamentos realizados com os compostos 90B e 90C (substituintes fenólicos) foram efetivos na redução da peroxidação lipídica, apresentando-se estatisticamente semelhantes ao controle não estressado, com reduções em torno de 22% e 24%, respectivamente.

A quercetina já foi demonstrada na literatura capaz de reduzir a peroxidação lipídica causada por peróxido de hidrogênio em células de *S. cerevisiae* nas cepas BY4741 (BELINHA *et al.*, 2007). O desempenho da quercetina na cepa BY4741 no atual trabalho foi condizente com a literatura, apresentando uma redução de 35% nos níveis de MDA produzido, sendo estatisticamente semelhante ao controle não estressado. Na cepa *Δgsh1*, um estudo utilizando uma concentração de 20 mg/L (aproximadamente 43 μ M) do composto hiperosídeo (quercetina-3-O-galactosídeo) revelou uma redução de peroxidação lipídica de cerca de 50% (GAO *et al.*, 2019), o que não foi condizente com os resultados apresentados neste trabalho, pois a análise estatística demonstrou que o tratamento com a quercetina não foi significativamente diferente do tratamento com peróxido de hidrogênio nesta cepa.

Um estudo avaliando a atividade antioxidante de compostos triazólicos derivados de tiazolidinona através do método TBARS *in vitro* demonstrou que o forte efeito inibitório de lipoperoxidação está diretamente atrelado a capacidade destes compostos em deslocalizar seus elétrons livres produzindo estruturas bastante estáveis, promovida principalmente pela presença de átomos de oxigênio e nitrogênio nos substituintes (DJUKIC *et al.*, 2018). Essa capacidade de deslocalização de elétrons conferida pelos substituintes fenólicos, nitro e pirimidínico presentes na estrutura dos compostos avaliados poderia explicar os resultados apresentados na cepa BY4741.

Observamos, portanto, uma total ineficácia no caso das substâncias 90N e 90R quando comparamos os resultados obtidos na cepa $\Delta gsh1$ com os apresentados na cepa BY4741 (Figura 23). Essas diferenças reforçam a importância da glutatona no combate aos danos oxidativos causados por H_2O_2 , como já demonstrado na literatura, onde a glutatona exerce uma defesa de amplo espectro comparado com as enzimas catalase e superóxido dismutase (BRIGELIUS-FLOHÉ; MAIORINO, 2013); indicando que a presença da glutatona desempenha um papel fundamental na proteção exercida pelos compostos 90N, 90R e pela quercetina observada nos resultados na cepa BY4741. Por outro lado, os compostos 90B e 90C foram efetivos independentemente da cepa e com ação antioxidante maior até do que o padrão também fenólico, indicando um potencial antioxidante promissor protegendo os lipídios de membrana das células de levedura, inclusive para situações de maior vulnerabilidade ao estresse oxidativo.

O núcleo 3-amino-1,2,4-triazol presente na estrutura dos nossos compostos é conhecido na literatura por ser um inibidor da enzima catalase. Vários estudos relataram alterações nos marcadores de estresse oxidativo e defesas antioxidantes após o tratamento com aminotriazóis em vários modelos animais (ALLEN; FARMER; SOHAL, 1983; BAGNYUKOVA *et al.*, 2005) e em culturas de células (DOUIRI *et al.*, 2016; RUIZ-OJEDA *et al.*, 2016). Demonstrou-se que a inibição da catalase pode gerar um mecanismo compensatório e aumentar a atuação das outras defesas endógenas do sistema antioxidante, conferindo proteção celular em queratinócitos displásicos humanos (DOK) (NECHIFOR; DINU, 2017). Isto poderia explicar a diferença dos perfis de resposta entre as cepas BY4741 e a sua mutante. Na cepa BY4741, a inibição parcial da catalase poderia aumentar a quantidade e o espectro de atuação antioxidante da glutatona; enquanto na cepa $\Delta gsh1$ isto não seria possível. Essa possibilidade indicaria que o mecanismo de ação dos compostos 90N e 90R poderiam estar atrelados a esse mecanismo compensatório, por outro lado, indicaria que 90B e 90C utilizariam uma forma de ação mais direta sem tanta dependência da glutatona.

No entanto, outro estudo realizado com células de *Saccharomyces cerevisiae* mostrou que em concentrações inferiores a 1,0 mM como no caso deste trabalho o 3-amino-1,2,4-triazol não consegue inibir significativamente a catalase, portanto, não consegue induzir esse mecanismo compensatório, indicando assim que este núcleo presente na estrutura das substâncias avaliadas não está exercendo o papel inibidor de catalase neste estudo. Em resumo, caso algum mecanismo compensatório esteja atuando na defesa antioxidante retratada neste ensaio, isso não estaria atrelado ao papel de inibidor da catalase comum ao 3-amino-1,2,4-triazol devido à concentração dos compostos avaliados (BAYLIAK *et al.*, 2008).

Outra possibilidade para o desempenho dos triazóis com substituintes fenólicos pode ser explicada pela composição da membrana celular da levedura. A parede celular de *S. cerevisiae* é composta por uma camada interna de polissacarídeos 1,3/1,6- β -glicanos (até 55%) (KLIS *et al.*, 2002); onde grande parte das proteínas associadas às moléculas de β -1,3-glicana apresentam várias ligações fosfodiéster, resultando em excesso de cargas negativas que conferem propriedades hidrofílicas à parede celular. Grupos funcionais como carboxil, hidroxil, sulfidril, fosforil e amino, presentes na membrana, podem estar envolvidos na retenção de grupamentos fenol (VON STASZEWSKI *et al.*, 2012). Esse comportamento foi observado em um estudo com polifenóis extraídos de linhaça, demonstrando que a atividade direta de substâncias fenólicas na membrana está diretamente relacionada a afinidade entre fenóis e os lipídios de membrana, resultando na redução da formação de radicais lipídicos (SOCRIER *et al.*, 2019).

Portanto, os compostos contendo substituintes fenólicos (90B e 90C) poderiam agir diretamente nos lipídios da membrana e não somente por meio de mecanismos de indução dos sistemas de defesa antioxidante, o que explicaria a eficiência na redução da peroxidação lipídica dessas substâncias, inclusive na ausência de glutatona. Ao observarmos o fato da quercetina que, mesmo sendo um polifenol, não apresentou resultados de proteção lipídica na cepa $\Delta gsh1$, há a possibilidade de a retenção desse composto na membrana ser menor que a retenção das substâncias 90B e 90C. Comparando a estrutura dos triazóis, observamos a presença de espaçadores hidrocarbônicos que podem conferir uma afinidade à porção apolar da membrana plasmática, e dessa maneira tornando-os mais propensos a interações polares à bicamada lipídica do que a quercetina.

5.4 Avaliação do ambiente redox intracelular

Este ensaio permite uma melhor avaliação do estado redox intracelular, uma vez que quantifica o ambiente gerado pelo aumento do estresse oxidativo. A oxidação intracelular foi estimada usando-se a substância diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (H_2DCFDA), que penetra facilmente na membrana plasmática e é desacetilada no interior das células por enzimas esterases. No ambiente intracelular a 2',7'-diclorofluoresceína não fluorescente (H_2DCF) é oxidada a 2',7'-diclorofluorescência (DCF) fluorescente, sendo então determinada fluorimetricamente em comprimento de onda específico (JAKUBOWSKI; BARTOSZ, 1997). Estudos já estabeleceram que a quantificação da fluorescência extracelular da DCF é válida para detecção do ambiente oxidante no interior das células, como um índice geral de estresse oxidativo (LEBEL; ISCHIROPOULOS; BONDY, 1992).

Como demonstrado na literatura, as células de levedura em metabolismo respiratório são intrinsecamente mais resistentes a H_2O_2 . Os níveis de superóxido dismutase e catalase encontram-se aumentados nessa fase. No entanto, mutantes deficientes em glutatona na fase respiratória também foram hipersensíveis a H_2O_2 (JAMIESON, 1998). Diante desse cenário buscou-se avaliar a contribuição dos derivados triazólicos na redução da oxidação intracelular em diferentes situações de vulnerabilidade ao estresse oxidativo, portanto, esse ensaio foi realizado nas fases fermentativa e respiratória nas cepas BY4741 e $\Delta gsh1$.

Após o tratamento com as substâncias na cepa controle obteve-se o perfil de oxidação intracelular (Figura 25).

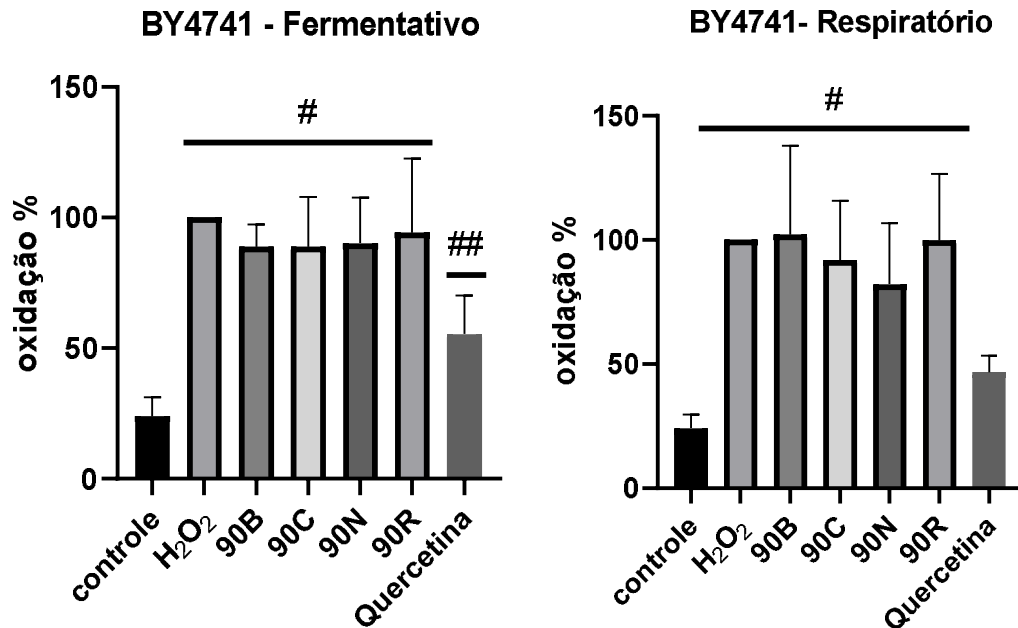


Figura 25. Níveis de oxidação intracelular avaliados na cepa BY4741 em metabolismos fermentativo e respiratório. Os compostos 90B, 90C, 90N, 90R e quercetina nas concentrações de 20 μ M permaneceram em contato com as células de *S. cerevisiae* por 2 horas antes de um estresse oxidativo por peróxido de hidrogênio (2,0 mM) por mais 1 hora. Tratamento controle são células não estressadas encubadas em solução tampão fosfato. Os resultados representam a média de pelo menos três experimentos independentes e foram expressos em porcentagem em função do tratamento com H₂O₂ (células estressadas sem tratamento com os compostos). Hashtags diferentes mostram resultados estatisticamente distintos ($p < 0,05$) na análise de ANOVA *one way* seguida de pós teste de Tukey.

Os resultados mostraram que não houve redução significativa nos níveis de espécies oxidantes no ambiente intracelular em ambas as fases de crescimento para a cepa BY4741. A análise estatística demonstrou que os tratamentos de todos os compostos foram semelhantes ao tratamento com o peróxido de hidrogênio e diferentes ao tratamento das células não estressadas e ao padrão antioxidante quercetina. O tratamento com quercetina conseguiu reduzir o nível de oxidação em ambas as fases, com destaque para a fase respiratória, onde apresentou redução superior a 50%, semelhante estatisticamente ao ensaio controle.

Após o tratamento com as substâncias na cepa $\Delta gsh1$ obteve-se o perfil de oxidação intracelular apresentado abaixo (Figura 26).

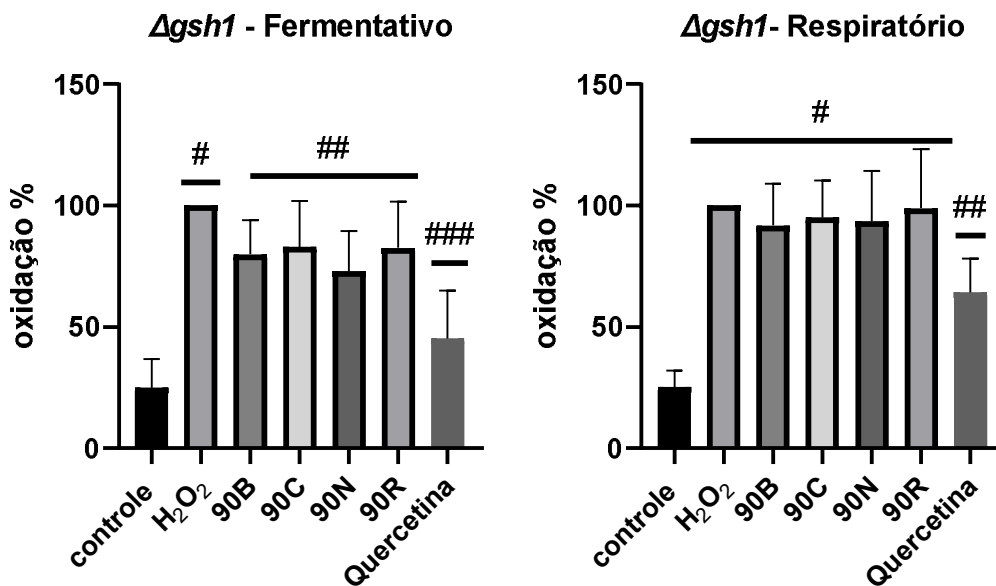


Figura 26. Níveis de oxidação intracelular avaliados na cepa $\Delta gsh1$ em metabolismos fermentativo e respiratório. Os compostos 90B, 90C, 90N, 90R e quercetina nas concentrações de 20 μ M permaneceram em contato com as células de *S. cerevisiae* por 2 horas antes de um estresse oxidativo por peróxido de hidrogênio (2,0 mM) por mais 1 hora. Tratamento controle são células não estressadas encubadas em solução tampão fosfato. Os resultados representam a média de pelo menos três experimentos independentes e foram expressos em porcentagem em função do tratamento com H₂O₂ (células estressadas sem tratamento com os compostos). Hashtags diferentes mostram resultados estatisticamente distintos ($p < 0,05$) na análise de ANOVA *one way* seguida de pós teste de Tukey.

Na fase respiratória, assim como nos resultados obtidos na cepa BY4741, nenhum tratamento conseguiu reduzir significativamente os níveis de oxidação intracelular, sendo todos semelhantes ao tratamento com o peróxido de hidrogênio. No entanto, na fase fermentativa todos os compostos foram eficazes na redução dos níveis de oxidação intracelular, apresentando diferenças estatísticas em relação ao tratamento com peróxido de hidrogênio. Dentre os compostos utilizados, destaque para foi o 90N com uma redução de cerca de 27%, na sequência o 90B com 20% e os compostos 90C e 90R com 18% cada. O padrão quercetina foi novamente capaz de promover redução na oxidação com cerca de 36% na fase respiratória e 55% na fase fermentativa.

Interessante observar que nas duas cepas e nas duas fases de crescimento a proporção do nível de oxidação entre as células do controle e as células estressadas foi a mesma. Em todos os ensaios, as células estressadas apresentaram 4 vezes mais oxidação no ambiente intracelular do que nas células não estressadas com peróxido de hidrogênio, indicando que, em termos proporcionais, a hipersensibilidade ao peróxido de hidrogênio pela cepa $\Delta gsh1$ relatada na literatura (JAMIESON, 1998) não foi observada neste trabalho. Entretanto, estudos sobre estresse oxidativo já relataram níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) menores em cepas mutantes, sem

nenhum tipo de tratamento protetor, em comparação a cepas controle (GAO *et al.*, 2019), indicando haver mecanismos compensatórios na ausência de componentes do sistema antioxidante, o que parece ter sido o caso neste estudo, em especial na fase fermentativa.

Os resultados apresentados pela quercetina foram condizentes com a literatura que já demonstrou capacidade de reduzir os níveis de espécies reativas de oxigênio na cepa BY4741, porém utilizando dihidrorodamina 123 (DHR) como agente oxidante (BELINHA *et al.*, 2007); e na cepa $\Delta gsh1$, onde o composto hiperosídeo (quercetina-3-O-galactosídeo) revelou uma redução na oxidação intracelular em cerca de 75% (GAO *et al.*, 2019). Apesar da redução promovida pela quercetina neste trabalho não ter sido no mesmo nível que o estudo citado, ainda assim foi significativa e exerceu proteção celular com reduções de cerca de 36% na fase respiratória e 55% na fase fermentativa.

Não foram encontrados outros trabalhos na literatura que tenham avaliado a redução da oxidação intracelular por derivados triazólicos em *Saccharomyces cerevisiae*, mas estudos *in vitro* apontam que o potencial antioxidante dos compostos está associado aos substituintes nos anéis 1,2,4-triazóis. A presença de substituintes fenólicos ou nitrogenados, como a pirimidina, nos compostos 1,2,4-triazóis, podem desempenhar um papel importante como doadores de elétrons, o que pode aumentar a capacidade do poder redutor dos compostos ativos (CETIN; GEÇIBESLER, 2015). Como os substituintes citados estão presentes nas substâncias avaliadas, era de se esperar uma redução na oxidação intracelular mais eficiente; diferentemente dos resultados obtidos nas cepas BY4741 e $\Delta gsh1$ no metabolismo respiratório.

É importante ressaltar que os ensaios *in vitro* desconsideram as interações metabólicas que podem influenciar nas capacidades antioxidantes de compostos exógenos; e diferenças nos perfis de resposta podem ser observadas, como demonstrado por Kaproń e colaboradores. Três derivados do composto 1,2,4-triazol-3-tiona foram avaliados *in vitro* quanto à atividade antioxidante de eliminação de EROs pelos métodos baseados em transferência de um único elétron (DPPH e CUPRAC), e *in vivo* por meio da análise de citometria de fluxo da atividade total de EROs em células isoladas de gliomas malignos de um paciente, provavelmente, com glioblastoma. Curiosamente, embora a capacidade antioxidante dos derivados testados tenha sido confirmada *in vitro* e *in vivo*, seu potencial observado pelos métodos DPPH e CUPRAC foi o oposto ao observado nas análises por citometria. O composto derivado arila foi o mais eficiente *in vitro*, à medida que os compostos derivados alquilas foram melhores antioxidantes *in vivo* (KAPROŃ *et al.*, 2020); indicando que diferentes estruturas químicas podem conferir características antioxidantes distintas conforme o método de ensaio utilizado.

Observando os resultados, constatamos que os compostos avaliados neste estudo provavelmente não exerceram nas cepas BY4741 e $\Delta gsh1$ durante o metabolismo respiratório nenhum mecanismo de ação antioxidante diretamente no interior da célula da levedura; bem como nenhum mecanismo de indução do sistema de defesa antioxidante, como possivelmente observado no ensaio para a determinação dos níveis de peroxidação lipídica. No entanto, na cepa $\Delta gsh1$ no metabolismo fermentativo, curiosamente em um quadro de maior vulnerabilidade celular pela ausência de glutatona e de defesas enzimáticas ainda não

completamente desenvolvidas, foi revelado que todos os tratamentos promoveram uma redução significativa na oxidação. Organismos unicelulares quando submetidos a mudanças drásticas no ambiente conseguem desenvolver mecanismos próprios de adaptação. A *Saccharomyces cerevisiae* pode ajustar seu programa de expressão genômica rapidamente frente a presença de substâncias tóxicas, como o peróxido de hidrogênio ou agentes redutores como ditioneitol (DTT), e alguns genes em cepas mutantes são mais induzidos nessas situações do que comparados com cepas selvagens (GASCH *et al.*, 2000).

Portanto, a redução da oxidação intracelular observada na cepa *Δgsh1* no metabolismo fermentativo pode ser mais um reflexo do mecanismo de defesa da célula em uma situação de vulnerabilidade ao estresse oxidativo, estimulada pela presença dos compostos triazólicos, do que a atuação de um mecanismo direto de ação antioxidante por esses compostos.

5.5 Impacto dos compostos sobre a respiração celular

A mitocôndria é uma organela encontrada em células eucarióticas onde ocorre a respiração celular, onde energia é liberada e armazenada na forma de adenosina trifosfato (ATP) por meio da fosforilação oxidativa, sendo esta responsável pela aceitação final de elétrons pelo oxigênio. Este processo é dependente da cadeia de transporte de elétrons, composta pelos complexos I, II, III e IV, e ATP-sintase. Nessa organela são formados os ânions superóxido ($\bullet\text{O}_2^-$) pelo vazamento de elétrons, especificamente nos complexos I e III, para a matriz mitocondrial e para o espaço mitocondrial intermembranar, tornando-se um ponto crítico da formação de espécies reativas de oxigênio (RIGOTTI, 2018).

Além disso, evidências sugerem que um desequilíbrio nas funções mitocondriais pode estar envolvido na fisiopatologia de diversas doenças neurodegenerativas; seja em razão de seu papel na regulação da morte celular, incluindo a liberação de citocromo c; pelo fato de mutações no DNA mitocondrial contribuírem para o envelhecimento, sendo o maior fator de risco para doenças neurodegenerativas (GEMELLI *et al.*, 2013) ou por fatores mais específicos e diretos como alguns estudos sugerem que muitas das proteínas implicadas na patogênese da DA têm envolvimento direto com as mitocôndrias ou proteínas mitocondriais. Neste quesito, destaque para a já citada neste trabalho, a APP (proteína precursora de amiloide) (LIN; BEAL, 2006).

Um estudo descobriu que em camundongos transgênicos que superexpressam APP, a maquinaria de importação de proteínas mitocondriais foi obstruída, causando disfunção mitocondrial e metabolismo energético prejudicado (ANANDATHEERTHAVARADA *et al.*, 2003). A β liga-se a uma proteína de matriz mitocondrial denominada álcool desidrogenase de ligação A β (ABAD) e o bloqueio dessa interação suprime a apoptose induzida por A β e a geração de radicais livres em neurônios (LUSTBADER *et al.*, 2004) Também foi relatado que a interação entre A β e mitocôndria, consegue inibir a atividade da citocromo oxidase e aumenta a geração de radicais livres (CROUCH *et al.*, 2005).

Portanto, é de extrema importância a investigação da disfunção mitocondrial em estudos que avaliam a capacidade antioxidante de compostos que visam a ação

intracelular sobre mecanismos envolvidos no surgimento e na evolução de doenças neurodegenerativas. A fim de averiguar a influência destes compostos sobre uma das principais funções desta organela, avaliou-se o consumo de oxigênio mitocondrial nas células de *Saccharomyces cerevisiae*; com o propósito de analisar variações na respiração celular provocadas nas células previamente tratadas com os compostos e sob estresse oxidativo.

A cadeia respiratória mitocondrial em *S. cerevisiae* possui diferenças em relação a de mamíferos. A mitocôndria de *S. cerevisiae* não possui o complexo I formado por múltiplas subunidades. Em troca, essa região é constituída por três isoformas da NADH desidrogenase. Duas localizadas na membrana mitocondrial interna voltadas para o espaço intermembranar chamadas de NADH desidrogenase externa 1 (Nde1) e 2 (Nde2) responsáveis pela oxidação do NADH gerado no citosol. Por outro lado, a NADH desidrogenase interna 1 (Ndi1) é voltada para a matriz mitocondrial, que oxida o NADH da matriz (Figura 27) (MONTEIRO, 2017). O complexo II (succinato: ubiquinona redutase), promove a oxidação do succinato a fumarato. Os elétrons provenientes das etapas anteriores sendo transferidos à Coenzima Q. Esta transfere os elétrons para o complexo III (ubiquinol-citocromo c redutase), que os transfere para a proteína citocromo c. A partir do citocromo c os elétrons fluem para o complexo IV (citocromo c oxidase), e finalmente para o oxigênio, a etapa final da cadeia de transporte de elétrons. O bombeamento de prótons (H^+) para espaço intermembranar ocorre nos complexos III e IV (BELEVICH; VERKHOSVKY, 2008; MONTEIRO, 2017).

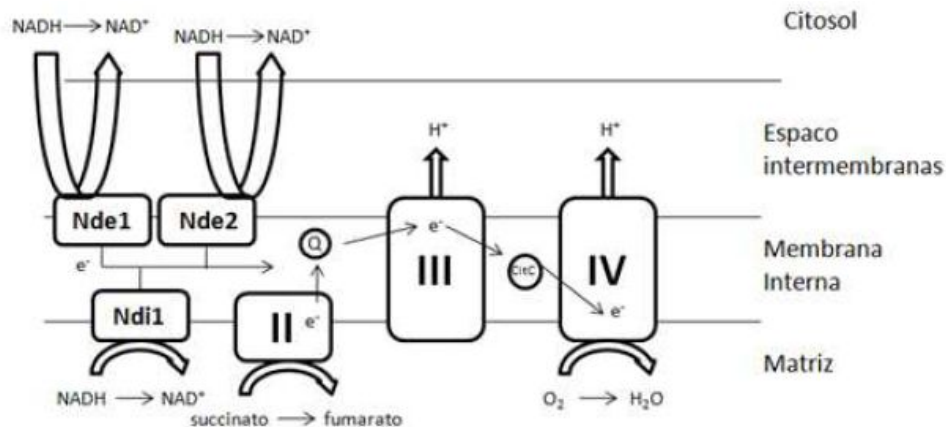


Figura 27. Cadeia transportadora de elétrons da levedura *S. cerevisiae* (MONTEIRO, 2017).

Ao colocar as células na câmara do oxígrafo percebe-se um consumo acentuado de oxigênio, o que é de se esperar visto que as leveduras adicionadas, que estão em metabolismo respiratório, consomem o oxigênio presente. Depois que o consumo de O_2 é normalizado, adiciona-se glicose de modo que dentro do oxígrafo a concentração do glicídio seja inferior a 0,2%. Nesta condição espera-se que o metabolismo das células se encontre mais ativo que em comparação a um meio que contenha apenas solução tampão fosfato, e simultaneamente seja garantido que as mitocôndrias sejam acionadas para a melhor avaliação do seu funcionamento. Portanto, na Figura 28 avaliou-se a consumo de oxigênio após a adição de glicose, função mitocondrial relacionada ao metabolismo celular respiratório.

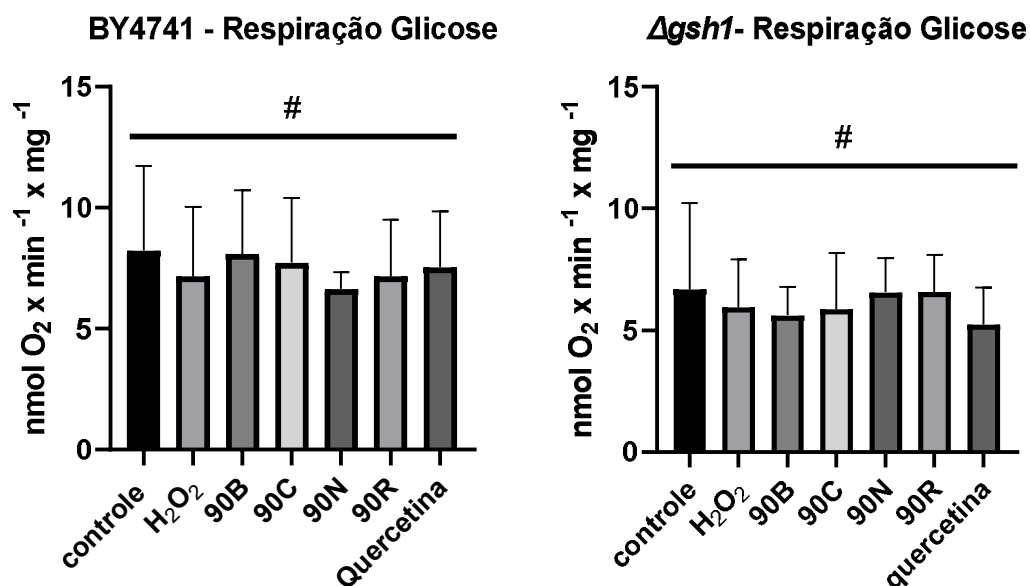


Figura 28. Consumo de oxigênio expresso em nmol O₂ x min⁻¹ x mg⁻¹ nas células das cepas BY4741 e $\Delta gsh1$ após adição de glicose. Os compostos 90B, 90C, 90N, 90R e quercetina nas concentrações de 20 μ M permaneceram em contato com as células de *S. cerevisiae* por 2 horas antes de um estresse oxidativo por peróxido de hidrogênio (2,0 mM) por mais 1 hora. Tratamento controle são células não estressadas encubadas em solução tampão fosfato. Os resultados representam a média de pelo menos três experimentos independentes. Hashtags iguais mostram resultados estatisticamente semelhantes ($p < 0,05$) na análise de ANOVA *one way* seguida de pós teste de Tukey.

Neste ensaio, assim como observado no teste da peroxidação lipídica realizada na fase respiratória (Figura 22), todos os tratamentos, em ambas as cepas, não demonstraram diferença estatística, refletindo assim a mesma resistência das células de *S. cerevisiae* no metabolismo respiratório quando tratadas com peróxido de hidrogênio. Desta maneira não foi possível avaliar a proteção mitocondrial após adição de glicose dos compostos triazólicos.

Este ensaio também procurou avaliar o funcionamento mitocondrial após a adição do FCCP (carbonil cianeto-p-trifluorometoxifenilhidrazona), um desacoplador da fosforilação oxidativa. Os prótons localizados no espaço intermembranar bombeados pela cadeia transportadora de elétrons retornam à matriz mitocondrial, e a utilização do transporte de prótons pela enzima ATP sintase é responsável diretamente pela síntese de ATP. Quando o transporte de prótons é realizado por outras moléculas presentes na membrana interna ao invés da ATP sintase ocorre o que denomina de desacoplamento entre o fluxo de elétrons pela cadeia respiratória e a síntese de ATP. O desacoplamento causado por agentes desacopladores, portanto, resulta no aumento do consumo de oxigênio ao máximo durante o funcionamento da cadeia transportadora de elétrons como um mecanismo compensatório estimulado pela diminuição da produção de ATP (PEREIRA DA SILVA, 2008). No entanto, o perfil de resposta observado após adição de FCCP (Figura 29) foi o mesmo observado após a adição de glicose.

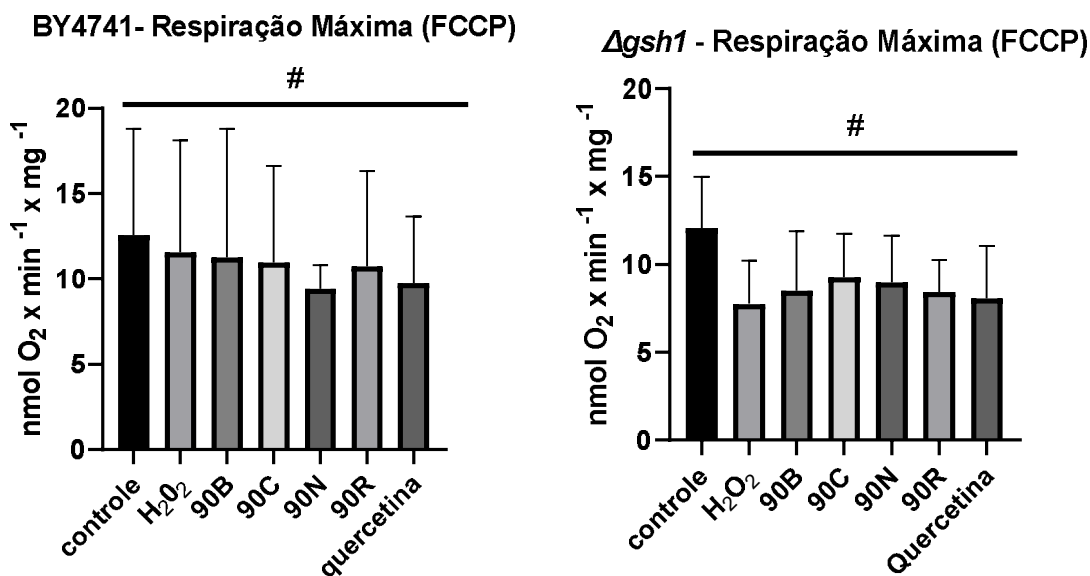


Figura 29. Consumo de oxigênio em $\text{nmol O}_2 \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$ nas células das cepas BY4741 e $\Delta gsh1$ após adição de FCCP. Os compostos 90B, 90C, 90N, 90R e quercetina nas concentrações de $20 \mu\text{M}$ permaneceram em contato com as células de *S. cerevisiae* por 2 horas antes de um estresse oxidativo por peróxido de hidrogênio ($2,0 \text{ mM}$) por mais 1 hora. Tratamento controle são células não estressadas encubadas em solução tampão fosfato. Os resultados representam a média de pelo menos três experimentos independentes. Hashtags iguais mostram resultados estatisticamente semelhantes ($p < 0,05$) na análise de ANOVA *one way* seguida de pós teste de Tukey.

Novamente os ensaios controle e com o peróxido de hidrogênio em ambas as cepas foram estatisticamente semelhantes, portanto, assim como após a adição de glicose, não foi possível avaliar a proteção mitocondrial relativa aos compostos avaliados. No entanto, tendo em vista as respostas observadas nos ensaios anteriores, é possível afirmar que na concentração de $20 \mu\text{M}$ nenhuma substância afetou diretamente o funcionamento mitocondrial. Um resultado coerente com os ensaios da resazurina e a curva de crescimento.

Um estudo demonstrou que utilizando uma massa de $2,62 \text{ mg}$ de células de *S. cerevisiae* da cepa BY4741 em contato com $2,0 \text{ mM}$ de H_2O_2 por duas horas foi suficiente em afetar o consumo de oxigênio em aproximadamente 50%, tanto na respiração basal quanto na respiração máxima (FONSECA, 2021). Outro estudo utilizando mitocôndrias isoladas de *S. cerevisiae* demonstrou que a exposição a $0,5 \text{ mM}$ de H_2O_2 resultou na inibição do consumo de oxigênio no estado desacoplado em 69% (CORTÉS-ROJO *et al.*, 2007). Inclusive, o mesmo estudo aponta uma forma de ação do H_2O_2 na diminuição da frequência respiratória, associando esse efeito com uma inibição das atividades do complexo II da cadeia transportadora de elétrons. Portanto, essa resistência em não reduzir o consumo de oxigênio após o tratamento com H_2O_2 visto neste trabalho não foi condizente com a literatura. Com isso, uma variação das condições e dos parâmetros utilizados neste ensaio como perspectivas futuras é crucial para uma melhor compreensão da atuação dos derivados triazólicos sobre a respiração celular das leveduras sobre estresse oxidativo.

6 CONCLUSÕES

Os quatro compostos 3-amino-1,2,4-triazol-*N*-1,5-trissubstituídos avaliados neste trabalho (90B, 90C, 90N e 90R) mostraram-se não tóxicos às células de *S. cerevisiae*, através dos ensaios da resazurina e curva de crescimento, tanto na cepa controle (BY4741) quanto na cepa deficiente em glutathione ($\Delta gsh1$).

No ensaio de peroxidação lipídica frente a cepa BY4741, todos os compostos revelaram capacidade antioxidante. Por outro lado, no ensaio realizado na cepa $\Delta gsh1$ apenas as substâncias 90B e 90C (substituintes fenólicos) apresentaram proteção antioxidante. No ensaio da oxidação intracelular foi observada capacidade de todos os compostos em reduzir o ambiente oxidante na cepa $\Delta gsh1$ na fase fermentativa.

No entanto, no ensaio de consumo de oxigênio não foi possível avaliar adequadamente a proteção mitocondrial dos compostos estudados, pois todos os tratamentos não apresentaram diferenças estatisticamente significativas.

Com isso conclui-se que os quatro compostos triazólicos apresentaram capacidade antioxidante, inclusive na ausência de glutathione. No entanto, os resultados indicam que essa capacidade está mais atrelada aos substituintes do anel aromático do que ao núcleo triazólico, tendo em vista a diferença de desempenho no ensaio da peroxidação lipídica. Dessa forma percebemos que os compostos fenólicos se mostraram mais eficientes corroborando a ação de substâncias fenólicas da literatura, permitindo levantarmos a hipótese se a adição de mais substituintes fenólicos conseguiriam potencializar essa capacidade observada neste trabalho.

Além disso, esses compostos haviam apresentado eficiente inibição da enzima acetilcolinesterase *in vitro*. Com os resultados apresentados neste estudo podemos classificá-los como promissores multialvos, sendo indicado a continuidade de estudos com essas substâncias em modelos biológicos superiores.

7 PERSPECTIVAS FUTURAS

A partir do atual trabalho e as atividades antioxidantes apresentadas pelos quatro compostos 3-amino-1,2,4-triazol-N-1,5-trissubstituídos seria desejável a continuidade da exploração de suas capacidades protetoras frente as células de *Saccharomyces cerevisiae* e de outros modelos biológicos. A realização do ensaio de consumo de oxigênio que não foi possível ser concluído, provavelmente por questões metodológicas, acompanhado por um ensaio de viabilidade celular em meio YPGly. Um meio contendo glicerol com fonte de carbono não fermentável forçando as mitocôndrias das leveduras a serem ativadas. Por meio desses ensaios avaliar a proteção mitocondrial que faltou ao neste estudo.

Além disso, seria interessante a realização de uma cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) visando responder o questionamento levantado durante os ensaios antioxidantes se os compostos triazólicos penetram ou não a membrana celular e assim, melhor compreender as respostas observadas neste trabalho.

A fim de prosseguir com a avaliação do caráter multialvo dos derivados triazólicos presentes, seria interessante a avaliação de uma possível capacidade de inibição da agregação de β -amiloides através da utilização de cepa transformada que expressam esse peptídeo fundamental na doença de Alzheimer. Por meio do ensaio da Tioflavina T e da utilização de microscopia de fluorescência é possível identificar se os compostos conseguem impedir a forma tóxica do β -amiloide. Juntamente a realização de ensaios antioxidantes com essas cepas é possível correlacionar a capacidade antioxidante vista no atual trabalho com a possível capacidade antiagregante.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEOYE, Oyewopo et al. Review on the role of glutathione on oxidative stress and infertility. **JBRA assisted reproduction**, v. 22, n. 1, p. 61, 2018.

ADLIMOGHADDAM, Aida et al. A review of clinical treatment considerations of donepezil in severe Alzheimer's disease. **CNS neuroscience & therapeutics**, v. 24, n. 10, p. 876-888, 2018.

ALI, Mohamed Ashraf et al. Design, synthesis and evaluation of novel 5, 6-dimethoxy-1-oxo-2, 3-dihydro-1H-2-indenyl-3, 4-substituted phenyl methanone analogues. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 19, n. 17, p. 5075-5077, 2009.

ALLEN, R. G.; FARMER, K. J.; SOHAL, RoS. Effect of catalase inactivation on levels of inorganic peroxides, superoxide dismutase, glutathione, oxygen consumption and life span in adult houseflies (*Musca domestica*). **Biochemical Journal**, v. 216, n. 2, p. 503-506, 1983.

ALZHEIMER NEWS TODAY; Alzheimer's Disease Statistics. Disponível em: <https://alzheimersnewstoday.com/alzheimers-disease-statistics/>. Acesso em: 18 jan. 2022.

ALZHEIMER'S ASSOCIATION et al. 2021 Alzheimer's disease facts and figures. **Alzheimer's & dementia**, v. 17, n. 3, p. 327-406, 2021

ANANDATHEERTHAVARADA, Hindupur K. et al. Mitochondrial targeting and a novel transmembrane arrest of Alzheimer's amyloid precursor protein impairs mitochondrial function in neuronal cells. **The Journal of cell biology**, v. 161, n. 1, p. 41-54, 2003.

ARONSON, Stephen et al. Optimal dosing of galantamine in patients with mild or moderate Alzheimer's disease. **Drugs & aging**, v. 26, n. 3, p. 231-239, 2009.

BABIC, T. The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress. **Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry**, v. 67, n. 4, p. 558-558, 1999.

BAGLIETTO-VARGAS, David et al. Diabetes and Alzheimer's disease crosstalk. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 64, p. 272-287, 2016.

BAGNYUKOVA, Tetyana V. et al. Catalase inhibition by amino triazole induces oxidative stress in goldfish brain. **Brain research**, v. 1052, n. 2, p. 180-186, 2005.

BANFI, Elena et al. Antifungal and antimycobacterial activity of new imidazole and triazole derivatives. A combined experimental and computational approach. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 58, n. 1, p. 76-84, 2006.

BARBOSA, Kiriaque Barra Ferreira et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.

BARONE, Eugenio; CALABRESE, Vittorio; MANCUSO, Cesare. Ferulic acid and its therapeutic potential as a hormetin for age-related diseases. **Biogerontology**, v. 10, n. 2, p. 97-108, 2009.

BARREIRO, Eliezer J.; FRAGA, Carlos Alberto Manssour. Química Medicinal: As bases moleculares da ação dos fármacos. Artmed Editora, 2014.

BAYLIAK, M. et al. Inhibition of catalase by aminotriazole in vivo results in reduction of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in *Saccharomyces cerevisiae* cells. **Biochemistry (Moscow)**, v. 73, n. 4, p. 420-426, 2008.

BELEVICH, Ilya; VERKHOVSKY, Michael I. Molecular mechanism of proton translocation by cytochrome c oxidase. **Antioxidants & redox signaling**, v. 10, n. 1, p. 1-30, 2008.

BELINHA, Iracema et al. Quercetin increases oxidative stress resistance and longevity in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 55, n. 6, p. 2446-2451, 2007

BELLOY, Michaël E.; NAPOLIONI, Valerio; GREICIUS, Michael D. A quarter century of APOE and Alzheimer's disease: progress to date and the path forward. **Neuron**, v. 101, n. 5, p. 820-838, 2019.

BENEK, Ondrej; KORABECNY, Jan; SOUKUP, Ondrej. A perspective on multi-target drugs for Alzheimer's disease. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 41, n. 7, p. 434-445, 2020.

BENTZ, Alexandra B. A Review of quercetin: chemistry, antioxidant properties, and bioavailability. **Journal of young investigators**, 2017.

BERN, Caryn. Antitrypanosomal therapy for chronic Chagas' disease. **New England Journal of Medicine**, v. 364, n. 26, p. 2527-2534, 2011.

BIRKS, Jacqueline S.; EVANS, John Grimley. Rivastigmine for Alzheimer's disease. **Cochrane Database of systematic reviews**, n. 4, 2015.

BITLA, Sampath et al. Design and synthesis, biological evaluation of bis-(1, 2, 3-and 1, 2, 4)-triazole derivatives as potential antimicrobial and antifungal agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 41, p. 128004, 2021.

BOLOGNESI, M. L. Polypharmacology in a single drug: multitarget drugs. **Current medicinal chemistry**, v. 20, n. 13, p. 1639-1645, 2013.

BOLOGNESI, Maria Laura. Harnessing polypharmacology with medicinal chemistry. **ACS Medicinal Chemistry Letters**, v. 10, n. 3, p. 273-275, 2019.

BOUKTAIB, Mohamed; ATMANI, Aziz; ROLANDO, Christian. Regio- and stereoselective synthesis of the major metabolite of quercetin, quercetin-3-O- β -d-glucuronide. **Tetrahedron Letters**, v. 43, n. 35, p. 6263-6266, 2002.

BOZO, E.; SZILÁGYI, Géza; JANÁKY, Judit. 1, 2, 4-triazoles, III: new 1, 5-diaryl-3-(substituted amino)-1H-1, 2, 4-triazoles as anti-inflammatory agents. **Archiv der Pharmazie**, v. 322, n. 10, p. 583-587, 1989.

BRACESCO, Nelson et al. Antioxidant activity of a botanical extract preparation of *Ilex paraguariensis*: prevention of DNA double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae* and human low-density lipoprotein oxidation. **The Journal of Alternative & Complementary Medicine**, v. 9, n. 3, p. 379-387, 2003.

BRIGELIUS-FLOHÉ, R.; MAIORINO, M. Glutathione peroxidases. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1830, n. 5, p. 3289–3303, 2013.

BRIGGS, Robert; KENNELLY, Sean P.; O'NEILL, Desmond. Drug treatments in Alzheimer's disease. **Clinical medicine**, v. 16, n. 3, p. 247, 2016.

BRION, Jean Pierre et al. Neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease: an immunohistochemical study. **Journal of submicroscopic cytology**, v. 17, n. 1, p. 89-96, 1985

BULUT, Nilufer et al. Synthesis of some novel pyridine compounds containing bis-1, 2, 4-triazole/thiosemicarbazide moiety and investigation of their antioxidant properties, carbonic anhydrase, and acetylcholinesterase enzymes inhibition profiles. **Journal of biochemical and molecular toxicology**, v. 32, n. 1, p. e22006, 2018.

BUSTI, Stefano et al. Glucose signaling-mediated coordination of cell growth and cell cycle in *Saccharomyces cerevisiae*. **Sensors**, v. 10, n. 6, p. 6195-6240, 2010

BUTTERFIELD, D. Allan et al. Elevated levels of 3-nitrotyrosine in brain from subjects with amnesic mild cognitive impairment: implications for the role of nitration in the progression of Alzheimer's disease. **Brain research**, v. 1148, p. 243-248, 2007.

CÂMARA, Viktor Saraiva. Síntese de inibidores das enzimas colinesterases contendo os núcleos lofina e benzilamina. 2018.

CAMPS, Pelayo et al. Novel donepezil-based inhibitors of acetyl- and butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase-induced β -amyloid aggregation. **Journal of medicinal chemistry**, v. 51, n. 12, p. 3588-3598, 2008.

CANABARRO, Micaela do Canto. Análise da formação e da susceptibilidade a antimicrobianos de biofilmes de bactérias isoladas de peles humanas para uso em enxertos alógenos. 2017.

CARNEVALE, Daniela et al. Pathophysiological links among hypertension and Alzheimer's disease. **High Blood Pressure & Cardiovascular Prevention**, v. 23, n. 1, p. 3-7, 2016.

- CASTILLO-ORDOÑEZ, Willian Orlando; CAJAS-SALAZAR, Nohelia. Acetylcholinesterase inhibitory agents in plants and their application to dementia: Alzheimer's disease. In: **Diagnosis and Management in Dementia**. Academic Press, 2020. p. 631-645.
- CATTO, Marco et al. Design, synthesis and biological evaluation of coumarin alkylamines as potent and selective dual binding site inhibitors of acetylcholinesterase. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 21, n. 1, p. 146-152, 2013.
- CENINI, Giovanna et al. Effects of oxidative and nitrosative stress in brain on p53 proapoptotic protein in amnesic mild cognitive impairment and Alzheimer disease. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 45, n. 1, p. 81-85, 2008.
- CETIN, Ahmet; GEÇİBESLER, Ibrahim Halil. Evaluation as antioxidant agents of 1, 2, 4-triazole derivatives: effects of essential functional groups. **J. Appl. Pharm. Sci**, v. 5, n. 6, p. 120-126, 2015.
- CHEN, John Xi; YAN, Shirley Shidu. Role of mitochondrial amyloid- β in Alzheimer's disease. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 20, n. s2, p. S569-S578, 2010.
- CHEN, Zhichun; ZHONG, Chunjiu. Oxidative stress in Alzheimer's disease. **Neuroscience bulletin**, v. 30, n. 2, p. 271-281, 2014.
- CHOI, Daein; CHOI, Seulggie; PARK, Sang Min. Effect of smoking cessation on the risk of dementia: a longitudinal study. **Annals of clinical and translational neurology**, v. 5, n. 10, p. 1192-1199, 2018.
- CLEVELAND, Don W.; HWO, Shu-Ying; KIRSCHNER, Marc W. Purification of tau, a microtubule-associated protein that induces assembly of microtubules from purified tubulin. **Journal of molecular biology**, v. 116, n. 2, p. 207-225, 1977.
- COLOVIC, Mirjana B. et al. Acetylcholinesterase inhibitors: pharmacology and toxicology. **Current neuropharmacology**, v. 11, n. 3, p. 315-335, 2013.
- COOKE, Marcus S. et al. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. **The FASEB Journal**, v. 17, n. 10, p. 1195-1214, 2003.
- CORTÉS-ROJO, Christian et al. Electron transport chain of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria is inhibited by H₂O₂ at succinate-cytochrome c oxidoreductase level without lipid peroxidation involvement. **Free radical research**, v. 41, n. 11, p. 1212-1223, 2007.
- CROUCH, Peter J. et al. Copper-dependent inhibition of human cytochrome c oxidase by a dimeric conformer of amyloid- β 1-42. **Journal of Neuroscience**, v. 25, n. 3, p. 672-679, 2005.
- CUMMINGS, Jeffrey et al. Role of donepezil in the management of neuropsychiatric symptoms in Alzheimer's disease and dementia with Lewy bodies. **CNS neuroscience & therapeutics**, v. 22, n. 3, p. 159-166, 2016.

DE PAULA E SILVA, A. C. A. et al. Microplate alamarBlue assay for Paracoccidioides susceptibility testing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, n. 4, p. 1250-1252, 2013.

DEGÁSPARI, Cláudia Helena; WASZCZYNSKYJ, Nina. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. **Visão acadêmica**, v. 5, n. 1, 2004.

DEIBEL, M. A.; EHMANN, W. D.; MARKESBERY, W. R. Copper, iron, and zinc imbalances in severely degenerated brain regions in Alzheimer's disease: possible relation to oxidative stress. **Journal of the neurological sciences**, v. 143, n. 1-2, p. 137-142, 1996.

DEISSEROTH, Albert; DOUNCE, Alexander L. Catalase: Physical and chemical properties, mechanism of catalysis, and physiological role. **Physiological reviews**, v. 50, n. 3, p. 319-375, 1970.

DELANOOGARE, Eslen et al. Hipótese amiloide e o tratamento da doença de Alzheimer: revisão dos estudos clínicos realizados. 2019.

DESAI, S. N.; FARRIS, F. F.; RAY, S. D. Lipid peroxidation. 2014.

DJUKIC, Mirjana et al. In vitro antioxidant activity of thiazolidinone derivatives of 1, 3-thiazole and 1, 3, 4-thiadiazole. **Chemico-Biological Interactions**, v. 286, p. 119-131, 2018.

ĐORĐEVIĆ, Neda O. et al. Antioxidant activity of selected polyphenolics in yeast cells: The case study of Montenegrin Merlot wine. **Molecules**, v. 23, n. 8, p. 1971, 2018.

DOUIRI, Salma et al. Involvement of endogenous antioxidant systems in the protective activity of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide against hydrogen peroxide-induced oxidative damages in cultured rat astrocytes. **Journal of Neurochemistry**, v. 137, n. 6, p. 913-930, 2016.

DRÖGE, Wulf. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological reviews**, 2002.

DUBOIS, Bruno et al. Donepezil decreases annual rate of hippocampal atrophy in suspected prodromal Alzheimer's disease. **Alzheimer's & Dementia**, v. 11, n. 9, p. 1041-1049, 2015.

DUINA, Andrea A.; MILLER, Mary E.; KEENEY, Jill B. Budding yeast for budding geneticists: a primer on the Saccharomyces cerevisiae model system. **Genetics**, v. 197, n. 1, p. 33-48, 2014.

EMAMI, Saeed et al. Synthesis, in vitro antifungal activity and in silico study of 3-(1, 2, 4-triazol-1-yl) flavanones. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 66, p. 480-488, 2013.

ESTRADA-VALENCIA, Martín et al. New flavonoid–N, N-dibenzyl (N-methyl) amine hybrids: Multi-target-directed agents for Alzheimer’s disease endowed with neurogenic properties. **Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry**, v. 34, n. 1, p. 712-727, 2019.

FAI, Patricia Bi; GRANT, Alastair. A rapid resazurin bioassay for assessing the toxicity of fungicides. **Chemosphere**, v. 74, n. 9, p. 1165-1170, 2009.

FARINA, Marcelo; ASCHNER, Michael. Glutathione antioxidant system and methylmercury-induced neurotoxicity: an intriguing interplay. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1863, n. 12, p. 129285, 2019.

FERNÁNDEZ-BACHILLER, María Isabel et al. Novel tacrine– 8-hydroxyquinoline hybrids as multifunctional agents for the treatment of Alzheimer’s disease, with neuroprotective, cholinergic, antioxidant, and copper-complexing properties. **Journal of medicinal chemistry**, v. 53, n. 13, p. 4927-4937, 2010.

FERREIRA, Vitor F. et al. Novel 1 H-1, 2, 3-, 2 H-1, 2, 3-, 1 H-1, 2, 4-and 4 H-1, 2, 4-triazole derivatives: a patent review (2008–2011). **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 23, n. 3, p. 319-331, 2013.

FERREIRA-VIEIRA, Talita H et al. Alzheimer's disease: targeting the cholinergic system. **Current neuropharmacology**, v. 14, n. 1, p. 101-115, 2016.

FETER, Natan et al. Ten-year trends in hospitalizations due to Alzheimer’s disease in Brazil: a national-based study. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 37, p. e00073320, 2021.

FONSECA, Marina Wajsenzon da. **Estudo do potencial antioxidante da própolis verde, do artemelin C e do ácido rosmarínico sobre a funcionalidade mitocondrial em células de *Saccharomyces cerevisiae*: Seropédica, RJ.** 2021.75p Dissertação (Mestrado em Química). Instituto de Química, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

FRANÇA, Mauro B.; LIMA, Karina C.; ELEUTHERIO, Elis CA. Oxidative stress and amyloid toxicity: insights from yeast. **Journal of cellular biochemistry**, v. 118, n. 6, p. 1442-1452, 2017.

FRANCO, Daiana de Fátima Portella. **Síntese e avaliação farmacológica de novos 3-amino-1,2,4-triazóis como inibidores de enzimas envolvidas na doença de Alzheimer.** 2020. 271 f.Tese (Dissertação em Ciências) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2020.

GALANIS, Christos et al. Amyloid-beta mediates homeostatic synaptic plasticity. **Journal of Neuroscience**, v. 41, n. 24, p. 5157-5172, 2021.

GAMBLIN, T. Chris et al. Oxidative regulation of fatty acid-induced tau polymerization. **Biochemistry**, v. 39, n. 46, p. 14203-14210, 2000.

GAO, Yu et al. Tau in Alzheimer's disease: Mechanisms and therapeutic strategies. **Current Alzheimer Research**, v. 15, n. 3, p. 283-300, 2018.

GAO, Yuting et al. Antioxidant activity evaluation of dietary flavonoid hyperoside using *saccharomyces cerevisiae* as a model. **Molecules**, v. 24, n. 4, p. 788, 2019.

GASCH, Audrey P. et al. Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. **Molecular biology of the cell**, v. 11, n. 12, p. 4241-4257, 2000

GEMELLI, Tanise et al. Estresse oxidativo como fator importante na fisiopatologia da Doença de Alzheimer. **Revista Brasileira Multidisciplinar**, v. 16, n. 1, p. 67-78, 2013.

GOEDERT, Michel et al. Phosphorylation of microtubule-associated protein tau by stress-activated protein kinases. **FEBS letters**, v. 409, n. 1, p. 57-62, 1997.

GOFFEAU, André et al. Life with 6000 genes. **Science**, v. 274, n. 5287, p. 546-567, 1996.

GRANT, Chris M.; PERRONE, Gabriel; DAWES, Ian W. Glutathione and catalase provide overlapping defenses for protection against hydrogen peroxide in the yeasts *saccharomyces cerevisiae*. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 253, n. 3, p. 893-898, 1998.

GREENOUGH, Mark A.; CAMAKARIS, James; BUSH, Ashley I. Metal dyshomeostasis and oxidative stress in Alzheimer's disease. **Neurochemistry international**, v. 62, n. 5, p. 540-555, 2013.

GRUNDKE-IQBAL, Inge et al. Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 83, n. 13, p. 4913-4917, 1986.

GUAN, Zhi-Zhong et al. Reduced expression of neuronal nicotinic acetylcholine receptors during the early stages of damage by oxidative stress in PC12 cells. **Journal of Neuroscience Research**, v. 66, n. 4, p. 551-558, 2001.

GULTEKIN, Ergun et al. A Study On Synthesis, Biological Activities and Molecular Modelling of Some Novel Trisubstituted 1, 2, 4-Triazole Derivatives. **ChemistrySelect**, v. 3, n. 31, p. 8813-8818, 2018.

HALLIWELL, Barry. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now?. **Journal of neurochemistry**, v. 97, n. 6, p. 1634-1658, 2006.

HAMPEL, Harald et al. The cholinergic system in the pathophysiology and treatment of Alzheimer's disease. **Brain**, v. 141, n. 7, p. 1917-1933, 2018.

HARDMAN, Roy J. et al. Adherence to a Mediterranean-style diet and effects on cognition in adults: a qualitative evaluation and systematic review of longitudinal and prospective trials. **Frontiers in nutrition**, p. 22, 2016.

HE, Shi-Chao et al. Design and synthesis of novel sulfonamide-derived triazoles and bioactivity exploration. **Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 1, p. 104-118, 2020.

HERMAN, Paul K. Stationary phase in yeast. **Current opinion in microbiology**, v. 5, n. 6, p. 602-607, 2002.

HU, Nan et al. Nutrition and the risk of Alzheimer's disease. **BioMed research international**, v. 2013, 2013.

HUANG, Xudong. Metalloenzyme-like Activity of Alzheimer's Disease beta-Amyloid. Cu-DEPENDENT CATALYTIC CONVERSION OF DOPAMINE,.. 2002.

JAKUBOWSKI, W.; BARTOSZ, G. Estimation of oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae* with fluorescent probes. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 29, n. 11, p. 1297–1301, 1997.

JAMIESON, Derek J. Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 14, n. 16, p. 1511-1527, 1998.

JONES, Michael R. et al. Multi-target-directed phenol–triazole ligands as therapeutic agents for Alzheimer's disease. **Chemical science**, v. 8, n. 8, p. 5636-5643, 2017.

KACHROO, Aashiq H. et al. Systematic humanization of yeast genes reveals conserved functions and genetic modularity. **Science**, v. 348, n. 6237, p. 921-925, 2015.

KAPROŃ, Barbara et al. 1, 2, 4-Triazole-based anticonvulsant agents with additional ROS scavenging activity are effective in a model of pharmacoresistant epilepsy. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 35, n. 1, p. 993-1002, 2020.

KATRITZKY, Alan R.; ROGOVOY, Boris; VVENDESKY, Vladimir; KOVALENKO, Katherine; STEEL, Peter; MARKOV, Victor; FOROOD, Behrouz. Synthesis of N, N-disubstituted 3-amino-1, 2, 4-triazoles. **Synthesis**, v. 2001, n. 06, p. 0897-0903, 2001.

KATZ, David L.; DOUGHTY, Kim; ALI, Ather. Cocoa and chocolate in human health and disease. **Antioxidants & redox signaling**, v. 15, n. 10, p. 2779-2811, 2011.

KATZMAN, Robert. Apolipoprotein E and Alzheimer's disease. **Current opinion in neurobiology**, v. 4, n. 5, p. 703-707, 1994.

KELLER, J. N. et al. Evidence of increased oxidative damage in subjects with mild cognitive impairment. **Neurology**, v. 64, n. 7, p. 1152-1156, 2005.

KHAN, Imtiaz et al. Active compounds from a diverse library of triazolothiadiazole and triazolothiadiazine scaffolds: Synthesis, crystal structure determination, cytotoxicity, cholinesterase inhibitory activity, and binding mode analysis. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 22, n. 21, p. 6163-6173, 2014.

KHARB, Rajeev; SHARMA, Prabodh Chander; YAR, Mohammed Shahar. Pharmacological significance of triazole scaffold. **Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry**, v. 26, n. 1, p. 1-21, 2011.

KHOABI, Mehdi et al. Design, synthesis, docking study and biological evaluation of some novel tetrahydrochromeno [3', 4': 5, 6] pyrano [2, 3-b] quinolin-6 (7H)-one derivatives against acetyl- and butyrylcholinesterase. **European journal of medicinal chemistry**, v. 68, p. 291-300, 2013.

KIM, Tae-Suk et al. Decreased plasma antioxidants in patients with Alzheimer's disease. **International journal of geriatric psychiatry**, v. 21, n. 4, p. 344-348, 2006.

KLIS, F. M. et al. Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 26, n. 3, p. 239–256, 2002

KOHEN, Ron; NYSKA, Abraham. Invited review: Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. **Toxicologic pathology**, v. 30, n. 6, p. 620-650, 2002.

KOŠČAK TIVADAR, Blanka. Physical activity improves cognition: possible explanations. **Biogerontology**, v. 18, n. 4, p. 477-483, 2017.

KRASOWSKA, A.; SIGLER, K. Cell-protective and antioxidant activity of two groups of synthetic amphiphilic compounds—Phenolics and amineN-oxides. **Folia Microbiologica**, v. 52, n. 6, p. 585-592, 2007.

KREMS, B.; CHARIZANIS, C.; ENTIAN, K.-D. Mutants of *Saccharomyces cerevisiae* sensitive to oxidative and osmotic stress. **Current genetics**, v. 27, n. 5, p. 427-434, 1995.

KUMARI, Mukesh et al. Synthesis and biological evaluation of heterocyclic 1, 2, 4-triazole scaffolds as promising pharmacological agents. **BMC chemistry**, v. 15, n. 1, p. 1-16, 2021.

LAMBERTUCCI, Rafael Herling. **Controle da produção muscular de espécies reativas e citocinas por ácido palmítico e eletroestimulação: possíveis implicações no envelhecimento**. 2009. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

LAVERDIERE, Michel et al. Therapeutic drug monitoring for triazoles: a needs assessment review and recommendations from a Canadian perspective. **Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology**, v. 25, n. 6, p. 327-343, 2014.

LEBEL, Carl P.; ISCHIROPOULOS, Harry; BONDY, Stephen C. Evaluation of the probe 2', 7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. **Chemical research in toxicology**, v. 5, n. 2, p. 227-231, 1992.

LENNON, Matthew J.; KONCZ, Rebecca; SACHDEV, Perminder S. Hypertension and Alzheimer's disease: is the picture any clearer?. **Current opinion in psychiatry**, v. 34, n. 2, p. 142-148, 2021.

LIMA, M. L. BARREIRO, E. J. Bioisosterism: A Useful Strategy for molecular Modification and Drug Design. **Current Medicinal Chemistry**, v. 12, p. 23-49, 2005.

LIN, Michael T.; BEAL, M. Flint. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. **Nature**, v. 443, n. 7113, p. 787-795, 2006.

LIN, Yi-Ting et al. Galantamine plasma concentration and cognitive response in Alzheimer's disease. **PeerJ**, v. 7, p. e6887, 2019.

LOERA-VALENCIA, Raúl et al. Alterations in cholesterol metabolism as a risk factor for developing Alzheimer's disease: Potential novel targets for treatment. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 190, p. 104-114, 2019.

LOVELL, Mark A.; MARKESBERY, William R. Oxidative damage in mild cognitive impairment and early Alzheimer's disease. **Journal of neuroscience research**, v. 85, n. 14, p. 3036-3040, 2007.

LOY, Clement; SCHNEIDER, Lon. Galantamine for Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. **Cochrane database of systematic reviews**, n. 1, 2006.

LUBERDA, Zofia. The role of glutathione in mammalian gametes. **Reprod Biol**, v. 5, n. 1, p. 5-17, 2005.

LUSTBADER, J. W. et al. Aβ Directly Links A to Mitochondrial Toxicity in Alzheimer's Disease. **Science**, v. 30, n. 5669, p. 8-52, 2004.

MA, Yunxia et al. Effects of donepezil on cognitive functions and the expression level of β-amyloid in peripheral blood of patients with Alzheimer's disease. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 15, n. 2, p. 1875-1878, 2018.

MACHADO, Hussen et al. Flavonóides e seu potencial terapêutico. **Boletim do Centro de Biologia da Reprodução (Descontinuada)**, v. 27, n. 1/2, 2008.

MACHADO, Jorge; BARROS, José; PALMEIRA, Manuela. Enxaqueca: fisiopatogenia, clínica e tratamento. **Revista Portuguesa de Medicina Geral e Familiar**, v. 22, n. 4, p. 461-70, 2006.

MAKIN, Simon. The amyloid hypothesis on trial. **Nature**, v. 559, n. 7715, p. S4-S4, 2018.

MANSON, Margaret M. Cancer prevention—the potential for diet to modulate molecular signalling. **Trends in molecular medicine**, v. 9, n. 1, p. 11-18, 2003.

MARIANI, Cristina et al. Flavonoid characterization and in vitro antioxidant activity of Aconitum anthora L.(Ranunculaceae). **Phytochemistry**, v. 69, n. 5, p. 1220-1226, 2008.

MARNETT, Lawrence J. Lipid peroxidation—DNA damage by malondialdehyde. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 424, n. 1-2, p. 83-95, 1999.

MASSOULIÉ, Jean et al. Molecular and cellular biology of cholinesterases. **Progress in neurobiology**, v. 41, n. 1, p. 31-91, 1993.

MATOS, Maria João. Multitarget therapeutic approaches for Alzheimer's and Parkinson's diseases: an opportunity or an illusion? **Future Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 15, p. 1301-1309, 2021.

MAURER, Konrad; VOLK, Stephan; GERBALDO, Hector. Auguste D and Alzheimer's disease. **The lancet**, v. 349, n. 9064, p. 1546-1549, 1997.

MCKHANN, G. drachman d, Folstein M, Katzman r, price d, Stadlan eM. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NiNCdS-AdrdA Work Group under the auspices of department of health and human Services Task Force on Alzheimer's disease. **Neurology**, v. 34, n. 7, p. 939-944, 1984.

MECOCCI, Patrizia; MACGARVEY, Usha; BEAL, M. Flint. Oxidative damage to mitochondrial DNA is increased in Alzheimer's disease. **Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society**, v. 36, n. 5, p. 747-751, 1994.

MEDEIROS, Rodrigo; BAGLIETTO-VARGAS, David; LAFERLA, Frank M. The role of tau in Alzheimer's disease and related disorders. **CNS neuroscience & therapeutics**, v. 17, n. 5, p. 514-524, 2011.

MEHTA, Rita S. et al. Combination anastrozole and fulvestrant in metastatic breast cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 367, n. 5, p. 435-444, 2012.

MOHANDAS, E.; RAJMOHAN, V.; RAGHUNATH, B. Neurobiology of Alzheimer's disease. **Indian journal of psychiatry**, v. 51, n. 1, p. 55, 2009.

MONTEIRO, Raquel Fonseca Guedes. Estudo De Proteínas Que Afetam A Tradução Mitocondrial em *Saccharomyces cerevisiae*. Tese (Doutorado), Instituto de Ciências Biomédicas, São Paulo: Universidade de São Paulo, 2017

MORADAS-FERREIRA, P. et al. The molecular defences against reactive oxygen species in yeast. **Molecular microbiology**, v. 19, n. 4, p. 651-658, 1996

MORPHY, Richard; KAY, Corinne; RANKOVIC, Zoran. From magic bullets to designed multiple ligands. **Drug discovery today**, v. 9, n. 15, p. 641-651, 2004.

MORPHY, Richard; RANKOVIC, Zoran. Designing multiple ligands-medicinal chemistry strategies and challenges. **Current pharmaceutical design**, v. 15, n. 6, p. 587-600, 2009.

MORRIS, Martha Clare et al. MIND diet slows cognitive decline with aging. **Alzheimer's & dementia**, v. 11, n. 9, p. 1015-1022, 2015.

MULLAART, Erik et al. Increased levels of DNA breaks in cerebral cortex of Alzheimer's disease patients. **Neurobiology of aging**, v. 11, n. 3, p. 169-173, 1990.

MUSHTAQ, Gohar et al. Status of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in Alzheimer's disease and type 2 diabetes mellitus. **CNS & Neurological Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-CNS & Neurological Disorders)**, v. 13, n. 8, p. 1432-1439, 2014.

NAJAR-AHMADI, Sepideh et al. Interaction of donepezil with tau protein: Insights from surface plasmon resonance and molecular modeling methods. **Journal of Molecular Liquids**, v. 333, p. 115924, 2021.

NANDI, Ankita et al. Role of catalase in oxidative stress-and age-associated degenerative diseases. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2019, 2019.

NECHIFOR, Marina Tamara; DINU, Diana. 3-Amino-1, 2, 4-triazole Limits the Oxidative Damage in UVA-Irradiated Dysplastic Keratinocytes. **BioMed Research International**, v. 2017, 2017

NEJM CATALYST. Value-Based Care Must Strengthen Focus on Chronic Illnesses. Disponível em: <https://catalyst.nejm.org/doi/full/10.1056/CAT.18.0058>. Acesso em: 18 jan. 2022.

NEUGROSCHL, Judith; WANG, Sophia. Alzheimer's disease: diagnosis and treatment across the spectrum of disease severity. **Mount Sinai Journal of Medicine: A Journal of Translational and Personalized Medicine**, v. 78, n. 4, p. 596-612, 2011.

NG, Neville S.; OOI, Lezanne. A simple microplate assay for reactive oxygen species generation and rapid cellular protein normalization. **Bio-protocol**, v. 11, n. 1, p. e3877-e3877, 2021.

NIELSEN, Jens. Yeast systems biology: model organism and cell factory. **Biotechnology journal**, v. 14, n. 9, p. 1800421, 2019

NIKI, Etsuo et al. Lipid peroxidation: mechanisms, inhibition, and biological effects. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 338, n. 1, p. 668-676, 2005.

OBOH, Ganiyu et al. Comparative study on the inhibitory effect of caffeic and chlorogenic acids on key enzymes linked to Alzheimer's disease and some pro-oxidant induced oxidative stress in rats' brain-in vitro. **Neurochemical research**, v. 38, n. 2, p. 413-419, 2013.

OH, Esther S. et al. Amyloid precursor protein increases cortical neuron size in transgenic mice. **Neurobiology of aging**, v. 30, n. 8, p. 1238-1244, 2009.

OHARA, Tomoyuki et al. Midlife and late-life smoking and risk of dementia in the community: The Hisayama Study. **Journal of the American Geriatrics Society**, v. 63, n. 11, p. 2332-2339, 2015

PEDERSEN, Ward A. et al. Protein modification by the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal in the spinal cords of amyotrophic lateral sclerosis patients. **Annals of neurology**, v. 44, n. 5, p. 819-824, 1998.

PEÑA, Cristina et al. Effects of low-fat high-fibre diet and mitratapide on body weight reduction, blood pressure and metabolic parameters in obese dogs. **Journal of Veterinary Medical Science**, p. 13-0475, 2014.

PENG, Zhiyun et al. Synthesis, antioxidant and anti-tyrosinase activity of 1, 2, 4-triazole hydrazones as antibrowning agents. **Food Chemistry**, v. 341, p. 128265, 2021.

PEREIRA DA SILVA, A. P. "Mecanismos De Ação Do 3-Bromopiruvato, Um Agente Anti-Tumoral, Sobre O Metabolismo Energético De Células Derivadas De Hepatocarcinoma Humano." Tese de Doutorado, Instituto De Bioquímica Médica, Universidade Federal Do Rio De Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

PÉREZ DE VEGA, María Jesús et al. Characterization of novel synthetic polyphenols: Validation of antioxidant and vasculoprotective activities. **Antioxidants**, v. 9, n. 9, p. 787, 2020.

PETTIT, Robin K. et al. Microplate Alamar blue assay for Staphylococcus epidermidis biofilm susceptibility testing. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 49, n. 7, p. 2612-2617, 2005.

PI, Rongbiao et al. Tacrine-6-ferulic acid, a novel multifunctional dimer, inhibits amyloid- β -mediated Alzheimer's disease-associated pathogenesis in vitro and in vivo. **PLoS One**, v. 7, n. 2, p. e31921, 2012.

PICONE, Pasquale; DI CARLO, Marta; NUZZO, Domenico. Obesity and Alzheimer's disease: Molecular bases. **European Journal of Neuroscience**, v. 52, n. 8, p. 3944-3950, 2020.

PIOVEZAN-BORGES, A. C. et al. Antioxidant potential of yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) extracts in *Saccharomyces cerevisiae* deficient in oxidant defense genes. **Brazilian journal of biology**, v. 76, p. 539-544, 2016.

PISOSCHI, Aurelia Magdalena et al. Oxidative stress mitigation by antioxidants-an overview on their chemistry and influences on health status. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 209, p. 112891, 2021.

POWERS, Scott K.; JACKSON, Malcolm J. Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. **Physiological reviews**, v. 88, n. 4, p. 1243-1276, 2008.

PRATICÒ, Domenico et al. Increased 8, 12-iso-iPF₂ α -VI in Alzheimer's disease: Correlation of a noninvasive index of lipid peroxidation with disease severity. **Annals of neurology**, v. 48, n. 5, p. 809-812, 2000.

- PROCHÁZKOVÁ, Dagmar; BOUŠOVÁ, I.; WILHELMOVÁ, N. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia*, v. 82, n. 4, p. 513-523, 2011.
- RAJAN, Kumar B. et al. Population estimate of people with clinical Alzheimer's disease and mild cognitive impairment in the United States (2020–2060). ***Alzheimer's & Dementia***, v. 17, n. 12, p. 1966-1975, 2021.
- RAY, Balmiki et al. Rivastigmine modifies the α -secretase pathway and potentially early Alzheimer's disease. ***Translational psychiatry***, v. 10, n. 1, p. 1-17, 2020.
- RAY, Robin; SHAH, Ajay M. NADPH oxidase and endothelial cell function. ***Clinical Science***, v. 109, n. 3, p. 217-226, 2005.
- REIS, Joana et al. Multi-target-directed ligands for Alzheimer's disease: Discovery of chromone-based monoamine oxidase/cholinesterase inhibitors. ***European Journal of Medicinal Chemistry***, v. 158, p. 781-800, 2018.
- REPETTO, Marisa; SEMPRINE, Jimena; BOVERIS, Alberto. Lipid peroxidation: chemical mechanism, biological implications and analytical determination. ***Lipid peroxidation***, v. 1, p. 3-30, 2012.
- RIGOTTI, Marina. Avaliação da função mitocondrial, do estresse oxidativo e da expressão de sirtuínas em células HEK-293 tratadas com proantocianidinas de semente de uva. 2018.
- ROSA, Renato Moreira et al. Pharmacology and toxicology of diphenyl diselenide in several biological models. ***Brazilian Journal of Medical and Biological Research***, v. 40, n. 10, p. 1287-1304, 2007.
- ROSES, MD, Allen D. Apolipoprotein E alleles as risk factors in Alzheimer's disease. ***Annual review of medicine***, v. 47, n. 1, p. 387-400, 1996.
- RUIZ-OJEDA, Francisco Javier et al. Impact of 3-amino-1, 2, 4-triazole (3-AT)-derived increase in hydrogen peroxide levels on inflammation and metabolism in human differentiated adipocytes. ***PLoS One***, v. 11, n. 3, p. e0152550, 2016.
- SADEGHI, Mohsen et al. Preparation and characterization of rivastigmine transdermal patch based on chitosan microparticles. ***Iranian Journal of Pharmaceutical Research: IJPR***, v. 15, n. 3, p. 283, 2016.
- SADOWSKA-BARTOSZ, I. et al. Dimethyl sulfoxide induces oxidative stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. ***FEMS yeast research***, v. 13, n. 8, p. 820–30, 2013.
- SAMIERI, Cécilia et al. Association of cardiovascular health level in older age with cognitive decline and incident dementia. ***Jama***, v. 320, n. 7, p. 657-664, 2018.
- SANTACRUZ, K. et al. Tau suppression in a neurodegenerative mouse model improves memory function. ***Science***, v. 309, n. 5733, p. 476-481, 2005.

SANTOS, Sabrina Neves et al. Regioselective microwave synthesis and derivatization of 1, 5-diaryl-3-amino-1, 2, 4-triazoles and a study of their cholinesterase inhibition properties. **RSC advances**, v. 9, n. 35, p. 20356-20369, 2019.

SAWYER II, R. John. Value-based care must strengthen focus on chronic illnesses. **NEJM Catalyst**, v. 4, n. 6, 2018.

SCHNEIDER, Lon S. et al. Low-dose ladostigil for mild cognitive impairment: A phase 2 placebo-controlled clinical trial. **Neurology**, v. 93, n. 15, p. e1474-e1484, 2019.

SELKOE, Dennis J.; HARDY, John. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. **EMBO molecular medicine**, v. 8, n. 6, p. 595-608, 2016.

ŠERÝ, Omar et al. Molecular mechanisms of neuropathological changes in Alzheimer's disease: a review. **Folia neuropathologica**, v. 51, n. 1, p. 1-9, 2013.

SHARMA, Kamlesh. Cholinesterase inhibitors as Alzheimer's therapeutics. **Molecular medicine reports**, v. 20, n. 2, p. 1479-1487, 2019.

SHEN, Jeff; WONG, B.; ZHANG, H. Negishi Approach to 1, 5-Disubstituted 3-Amino-1 H-1, 2, 4-triazoles. **Organic letters**, v. 17, n. 19, p. 4678-4681, 2015.

SHI, Yuan; ZHOU, Cheng-He. Synthesis and evaluation of a class of new coumarin triazole derivatives as potential antimicrobial agents. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 21, n. 3, p. 956-960, 2011.

SHIEH, Jonathan Chang-Cheng; HUANG, Pai-Tsang; LIN, Yung-Feng. Alzheimer's disease and diabetes: insulin signaling as the bridge linking two pathologies. **Molecular neurobiology**, v. 57, n. 4, p. 1966-1977, 2020.

SILVA, Nathalia Cristina da Silva. Funcionalização do 3, 4, 6-tri-O-acetil-D-glucal com sais de organotrifluoroboratos de potássio e reações de click chemistry para a geração e funcionalização de triazóis. Tese de Mestrado. Universidade de São Paulo. 2013

SIVAPRAKASAM, Kannan. Towards a unifying hypothesis of Alzheimer's disease: cholinergic system linked to plaques, tangles and neuroinflammation. **Current medicinal chemistry**, v. 13, n. 18, p. 2179-2188, 2006.

SKOUMALOVÁ, Alice; HORT, Jakub. Blood markers of oxidative stress in Alzheimer's disease. **Journal of cellular and molecular medicine**, v. 16, n. 10, p. 2291-2300, 2012.

SOARES, Daniele Grazziotin; ANDREAZZA, Ana Cristina; SALVADOR, Mirian. Evaluation of compounds with antioxidant activity in *Saccharomyces cerevisiae* yeast cells. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, p. 95-100, 2005.

SOCRIER, L. et al. Flax phenolic compounds as inhibitors of lipid oxidation: Elucidation of their mechanisms of action. **Food Chemistry**, v. 274, p. 651–658, 2019.

SONG, Yongfeng et al. Cholesterol-induced toxicity: An integrated view of the role of cholesterol in multiple diseases. **Cell metabolism**, v. 33, n. 10, p. 1911-1925, 2021.

STADTMAN, Earl R. Role of oxidant species in aging. **Current medicinal chemistry**, v. 11, n. 9, p. 1105-1112, 2004.

STEELS, E. L.; LEARMONTH, R. P.; WATSON, K. Stress tolerance and membrane lipid unsaturation in *Saccharomyces cerevisiae* grown aerobically or anaerobically. **Microbiology** (Reading, England), v. 140 (Pt 3, n. 1994, p. 569–76, 1994.

STEFANACHI, Angela et al. Coumarin: A natural, privileged and versatile scaffold for bioactive compounds. **Molecules**, v. 23, n. 2, p. 250, 2018.

STEPHEN, Ruth et al. Physical activity and Alzheimer's disease: a systematic review. **The Journals of Gerontology: Series A**, v. 72, n. 6, p. 733-739, 2017.

STRITTMATTER, Warren J. et al. Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, n. 5, p. 1977-1981, 1993.

SUBHASWARAJ, Pattnaik et al. Determination of antioxidant activity of Hibiscus sabdariffa and Croton caudatus in *Saccharomyces cerevisiae* model system. **Journal of food science and technology**, v. 54, n. 9, p. 2728-2736, 2017.

SUBHASWARAJ, Pattnaik et al. Determination of antioxidant potential of Acacia nilotica leaf extract in oxidative stress response system of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 97, n. 15, p. 5247-5253, 2017.

SUN, Yuqian et al. Fluconazole is as effective as other anti-mold agents in preventing early invasive fungal disease after allogeneic stem cell transplantation: assessment of antifungal therapy in haematological disease in China. **Translational Cancer Research**, v. 9, n. 11, p. 6900, 2020.

SWERDLOW, Russell H.; BURNS, Jeffrey M.; KHAN, Shaharyar M. The Alzheimer's disease mitochondrial cascade hypothesis: progress and perspectives. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, v. 1842, n. 8, p. 1219-1231, 2014.

TAN, Seng-Lai et al. Hepatitis C therapeutics: current status and emerging strategies. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 1, n. 11, p. 867-881, 2002.

TANZI, Rudolph E.; BERTRAM, Lars. Twenty years of the Alzheimer's disease amyloid hypothesis: a genetic perspective. **Cell**, v. 120, n. 4, p. 545-555, 2005.

THINAKARAN, Gopal; KOO, Edward H. Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 44, p. 29615-29619, 2008.

TIWARI, Sneham et al. Alzheimer's disease: pathogenesis, diagnostics, and therapeutics. **International journal of nanomedicine**, v. 14, p. 5541, 2019.

TÖNNIES, Eric; TRUSHINA, Eugenia. Oxidative stress, synaptic dysfunction, and Alzheimer's disease. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 57, n. 4, p. 1105-1121, 2017.

TRIPATHI, Prabhash Nath et al. Biphenyl-3-oxo-1, 2, 4-triazine linked piperazine derivatives as potential cholinesterase inhibitors with anti-oxidant property to improve the learning and memory. **Bioorganic Chemistry**, v. 85, p. 82-96, 2019.

TROKE, P. F. et al. Efficacy of UK-49,858 (fluconazole) against *Candida albicans* experimental infections in mice. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 28, n. 6, p. 815-818, 1985.

VALKO, Marian et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007.

VALKO, Marian et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-biological interactions**, v. 160, n. 1, p. 1-40, 2006.

VAN DEN ENDE, Wim; PESHEV, Darin; DE GARA, Laura. Disease prevention by natural antioxidants and prebiotics acting as ROS scavengers in the gastrointestinal tract. **Trends in Food Science & Technology**, v. 22, n. 12, p. 689-697, 2011.

VAN DER JEUGD, Ann et al. Cognitive defects are reversible in inducible mice expressing pro-aggregant full-length human Tau. **Acta neuropathologica**, v. 123, n. 6, p. 787-805, 2012

VAZ, Miguel; SILVESTRE, Samuel. Alzheimer's disease: recent treatment strategies. **European journal of pharmacology**, v. 887, p. 173554, 2020

VICTOR, Victor M.; ROCHA, Milagros; DE LA FUENTE, Monica. Immune cells: free radicals and antioxidants in sepsis. **International immunopharmacology**, v. 4, n. 3, p. 327-347, 2004.

VON OSSOWSKI, Ingemar; HAUSNER, Georg; LOEWEN, Peter C. Molecular evolutionary analysis based on the amino acid sequence of catalase. **Journal of molecular evolution**, v. 37, n. 1, p. 71-76, 1993.

VON STASZEWSKI, M. et al. Nanocomplex formation between β -lactoglobulin or caseinomacropptide and green tea polyphenols: Impact on protein gelation and polyphenols antiproliferative activity. **Journal of Functional Foods**, v. 4, n. 4, p. 800-809, 2012.

WALCZAK-NOWICKA, Łucja Justyna; HERBET, Mariola. Acetylcholinesterase Inhibitors in the Treatment of Neurodegenerative Diseases and the Role of Acetylcholinesterase in their Pathogenesis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 17, p. 9290, 2021.

WATKINS, Paul B. et al. Hepatotoxic effects of tacrine administration in patients with Alzheimer's disease. **Jama**, v. 271, n. 13, p. 992-998, 1994.

XIE, Sai-Sai et al. Design, synthesis and evaluation of novel tacrine–coumarin hybrids as multifunctional cholinesterase inhibitors against Alzheimer's disease. **European journal of medicinal chemistry**, v. 64, p. 540-553, 2013.

YU, Wen-Feng et al. Correlation of oxidative stress and the loss of the nicotinic receptor alpha4 subunit in the temporal cortex of patients with Alzheimer's disease. **Neuroscience letters**, v. 338, n. 1, p. 13-16, 2003.

YU, Yongping; OSTRESH, John M.; HOUGHTEN, Richard A. Solid-phase synthesis of 3-amino-1, 2, 4-triazoles. **Tetrahedron letters**, v. 44, n. 42, p. 7841-7843, 2003.

ZHENG, Yan-Zhen et al. The influence of the H5... OC4 intramolecular hydrogen-bond (IHB) on the antioxidative activity of flavonoid. **Phytochemistry**, v. 160, p. 19-24, 2019.