



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**CARLA STHEFANE PÊPE MATOS**

**USO DE COMPLEXOS METÁLICOS DE MAGNÉSIO COM**  
**FENÓLICOS COORDENADOS PARA INIBIÇÃO DO ESTRESSE**  
**OXIDATIVO E ESTUDO ANTIOXIDANTE**

**JEQUIÉ – BA**  
**DEZEMBRO/2021**

**CARLA STHEFANE PÊPE MATOS**

**USO DE COMPLEXOS METÁLICOS DE MAGNÉSIO COM  
FENÓLICOS COORDENADOS PARA INIBIÇÃO DO ESTRESSE  
OXIDATIVO E ESTUDO ANTIOXIDANTE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestra em Química.

Área de concentração: Química Analítica.

Orientador: Prof. Dr. Eldevan dos Santos Silva  
Co-orientador: Prof. Dr. Cleber Galvão Novaes

**JEQUIÉ – BA  
DEZEMBRO/2021**

## TERMO DE APROVAÇÃO

### CARLA STHEFANE PÊPE MATOS

**“Uso de complexos metálicos de magnésio com fenólicos coordenados para inibição do estresse oxidativo e estudo antioxidante”**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Química.

#### COMISSÃO EXAMINADORA



Prof. Dr. Eldevan dos Santos Silva  
(UFSCar, São Carlos – SP, 2017)  
(Orientador)



Prof. Dr. Cleber Galvão Novaes  
(UFBA, Salvador – BA, 2011)  
(Coorientador)



Prof. Dra. Wanessa de Cássia Martins Antunes de Melo  
(USP, São Paulo – SP, 2014)



Profa. Dra. Márcia Valéria Silva Lima  
(UFSCar, São Carlos – SP, 2014)

Dissertação aprovada pelo Colegiado do Curso de Pós-graduação em Química em 27 / 12 / 2021

*À Deus, que quando eu nem imaginava  
me disse que tudo seria possível.*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por tornar tudo isso possível e me sustentar em todas as áreas da minha vida. Aos meus pais por toda paciência e suporte durante todos esses anos. Aos meus amigos que torceram muito pelo meu sucesso e sempre dar palavras de incentivo. Ao Prof. Dr. Eldevan dos Santos Silva por, antes de um orientador, ter sido um amigo que contendeu comigo durante esses anos de estudo. Ao Prof. Dr. Cléber Galvão Novaes pelos ensinamentos prestados e o apoio durante a realização deste trabalho. À UESB, CAPES e CNPq pelo fornecimento do ensino e por financiar essa e outras pesquisas.

Agradeço a todos que contribuíram com este trabalho de alguma maneira.

*"E o enchi do espírito de Deus,  
de sabedoria, de entendimento  
e de ciência, em todo o artifício".*

**Bíblia, Êxodo 31:3**

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                        |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1. Produção de ROS na cadeia respiratória .....                                                                                                                                 | 17 |
| Figura 2. Orbital Molecular do Oxigênio .....                                                                                                                                          | 18 |
| Figura 3. Oxidação da L-arginina em L-citrulina.....                                                                                                                                   | 19 |
| Figura 4. Mecanismo catalítico da glutathione peroxidase .....                                                                                                                         | 23 |
| Figura 5. Mecanismo antioxidante do $\alpha$ -tocoferol.....                                                                                                                           | 24 |
| Figura 6. Mecanismo antioxidante do ácido ascórbico .....                                                                                                                              | 24 |
| Figura 7. Estrutura comum dos flavonoides .....                                                                                                                                        | 25 |
| Figura 8. Imagens do peixe <i>Danio rerio</i> .....                                                                                                                                    | 28 |
| Figura 9. Anatomia do <i>Danio rerio</i> . Olho (A), barbatana dorsal (B), barbatana caudal (C), barbatana anal (D), barbatana pélvica (E), opérculo (F), barbilho (G), boca (H) ..... | 31 |
| Figura 10. Acetato de magnésio tetra hidratado .....                                                                                                                                   | 33 |
| Figura 11. Porcentagem de inibição do radical superóxido utilizando o Mg-isovanílico (linha preta) e o ácido isovanílico livre (linha vermelha) .....                                  | 38 |
| Figura 12. Proposta de Mecanismo 1 - Mecanismo de formação do radical superóxido adaptado de (Cardoso, D. R. et al) e desativação utilizando o NBT e o Mg-isovanílico .....            | 39 |
| Figura 13. Inibição do radical estável DPPH• com Mg-isovanílico utilizando ESR (A), regressão linear para cálculo do IC50 (B) .....                                                    | 40 |
| Figura 14. Espectro de absorção do radical estável ABTS•+ na presença de diferentes concentrações do Mg-isovanílico .....                                                              | 40 |
| Figura 15. Proposta de Mecanismo 2 - Proposta de mecanismo de inibição do radical estável DPPH• via transferência de próton.....                                                       | 41 |
| Figura 16. Proposta de Mecanismo 3 - Mecanismo de inibição do radical estável ABTS•+ via processo de transferência de próton.....                                                      | 42 |
| Figura 17. Proposta de Mecanismo 4 - Proposta de mecanismo para a inibição do oxigênio singlete e do radical TEMPOL usando o Mg-isovanílico .....                                      | 42 |
| Figura 18. Atividades das enzimas acetilcolinesterase no cérebro (...) A atividade é expressa em $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína. ....                                | 43 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|                   |                                                                                                 |
|-------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ABCA1             | <i>ATP Binding Cassette Subfamily A Member 1</i> – Capsula de Ligação ATP Subfamília A Membro 1 |
| ABCA7             | <i>ATP Binding Cassette Subfamily A Member 7</i> – Capsula de Ligação ATP Subfamília A Membro 7 |
| ABCG1             | <i>ATP Binding Cassette Subfamily G Member 1</i> – Capsula de Ligação ATP Subfamília G Membro 1 |
| ABTS              | 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)                                          |
| ADP               | Adenosina difosfato                                                                             |
| AGEs              | Produtos finais de glicação avançada                                                            |
| ApoE              | Apolipoproteína E                                                                               |
| APP               | Proteína Precursora Amiloide                                                                    |
| ATP               | Adenosina Trifosfato                                                                            |
| BHT               | 3,5-di-terc-4-butilhidroxitolueno                                                               |
| CAT               | Catalase                                                                                        |
| ChAT              | Acetiltransferase                                                                               |
| CNDB              | 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno                                                                      |
| COX               | Cicloxigenase                                                                                   |
| DA                | Doença De Alzheimer                                                                             |
| DAG               | Diacilglicerol                                                                                  |
| Da                | Dalton                                                                                          |
| DNA               | Ácido Desoxirribonucleico                                                                       |
| DNAmt             | Ácido Desoxirribonucleico Mitocondrial                                                          |
| DP                | Doença De Parkinson                                                                             |
| DPPH <sup>•</sup> | 2,2-difenil-1-picril-hidrazil                                                                   |
| DTNB              | 5–ditio-bis-2-nitrobenzoato                                                                     |
| e <sup>-</sup>    | Elétron                                                                                         |
| eNOS              | Óxido Nítrico Sintetase Endotelial                                                              |
| EPR               | Ressonância paramagnética de elétrons                                                           |
| ER                | Receptor de estrogênio                                                                          |
| ER <sup>+</sup>   | Receptor de estrogênio positivo                                                                 |
| ERA               | Elemento de resposta antioxidante                                                               |
| ESR               | Espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica                                          |



|                        |                                                                                          |
|------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|
| FOX                    | Método de oxidação ferrosa laranja de xilenol                                            |
| GAPDH                  | Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase                                                    |
| GLOBOCAN               | Global Cancer Observatory – Observatório Global do Câncer                                |
| GPx4                   | Glutathione Peroxidase 4                                                                 |
| GR                     | Glutathione Redutase                                                                     |
| GS <sup>-</sup>        | Tiol                                                                                     |
| GSH                    | Glutathione                                                                              |
| GSSG                   | Dissulfureto De Glutathione                                                              |
| GST                    | Glutathione S-Transferase                                                                |
| H NMR                  | Ressonância magnética de próton nuclear                                                  |
| HER2                   | Receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano                                     |
| HPLC                   | <i>High performance liquid chromatography</i> - Cromatografia líquida de alta eficiência |
| IC50                   | Concentração inibitória média                                                            |
| iNOS                   | Óxido Nítrico Sintetase Induzível                                                        |
| LOO <sup>-</sup>       | Peroxil                                                                                  |
| LOX                    | Lipoxigenase                                                                             |
| LPO                    | lipoperoxidação                                                                          |
| MAO-B                  | Monoamina Oxidase-B                                                                      |
| MDHA                   | Monodehidroascorbato                                                                     |
| MES                    | Ácido 2-[N-morfolino] etanosulfônico                                                     |
| Met                    | Metionina                                                                                |
| MPTP                   | 1-Metil-4-Fenil-1,2,3,6-Tetrahidropiridina                                               |
| NAD <sup>+</sup> /NADH | Nicotinamida Adenina Dinucleótido                                                        |
| NADPH                  | Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato                                                |
| NBT                    | Nitro-azul tetrazólio                                                                    |
| NF-κB                  | Fator nuclear kappa 3 B                                                                  |
| NMDAR                  | N-Metil-D-Aspartato                                                                      |
| nNOS                   | Óxido Nítrico Sintetase Neuronal                                                         |
| NOS                    | Óxido Nítrico Sintetase                                                                  |
| NRF2                   | Fator nuclear eritróide 2                                                                |
| OXPHOS                 | Fosforilação Oxidativa                                                                   |
| PARK7                  | <i>Parkinsonism Associated Deglycase</i> - Deglicase Associada ao Parkinsonismo          |
| PARP                   | Poli (ADP-ribose) polimerase                                                             |

|                  |                                                                                             |
|------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|
| pH               | Potencial hidrogeniônico                                                                    |
| PINK1            | <i>PTEN-Induced Kinase 1</i> - Quinase 1 induzida por PTEN                                  |
| PKC              | Proteína C quinase                                                                          |
| POBN             | $\alpha$ -(4-piridil-1-óxido)-N-terc-butilnitrona                                           |
| PR               | Receptor de progesterona                                                                    |
| PRKN             | <i>Parkin RBR E3 Ubiquitin Protein Ligase</i> - Parkin RBR E3<br>Ubiquitina Proteína Ligase |
| PTPs             | Proteínas tirosina fosfatases                                                               |
| RAGE             | Receptor para produtos finais de glicação avançada                                          |
| RNS              | Espécies Reativas de Nitrogênio                                                             |
| RO <sup>-</sup>  | Alcoxila                                                                                    |
| ROO <sup>-</sup> | Alquilperoxila                                                                              |
| ROS              | <i>Reactive Oxygen Species</i> - Espécies Reativas De Oxigênio                              |
| Se-SG            | Selenenilsulfureto Diglutationa                                                             |
| SNC              | Sistema Nervoso Central                                                                     |
| SNCA             | Sinucleína Alfa                                                                             |
| SNP              | Sistema Nervoso Periférico                                                                  |
| SNpc             | <i>Substantia Nigra Pars Compacta</i>                                                       |
| SOD              | Superóxido Dismutase                                                                        |
| SOD2             | Superóxido Dismutase 2                                                                      |
| TEMP             | 2,2,6,6-tetrametil-4-iperidinol                                                             |
| TO <sup>-</sup>  | Tocoferoxil                                                                                 |
| TR1              | Troponina redutase 1                                                                        |
| UV-Vis           | Ultravioleta visível                                                                        |
| VMAT2            | Transportador Vesicular de Monoamina 2                                                      |
| XO               | Xantina Oxidase                                                                             |

## LISTA DE SÍMBOLOS

|                               |                       |
|-------------------------------|-----------------------|
| Ca                            | Cálcio                |
| Ca <sup>2+</sup>              | Íon Cálcio (II)       |
| CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> | Íon Carbonato         |
| Cu                            | Cobre                 |
| Fe                            | Ferro                 |
| H                             | Hidrogênio            |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | Peróxido de oxigênio  |
| Mg                            | Magnésio              |
| Mn                            | Manganês              |
| NH                            | Radical amino         |
| NO                            | Óxido Nítrico         |
| NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>  | Dióxido de Nitrogênio |
| O                             | Oxigênio Atômico      |
| <sup>1</sup> O <sub>2</sub>   | Oxigênio Singlete     |
| O <sub>2</sub>                | Oxigênio Molecular    |
| °C                            | Graus Celsius         |
| OH <sup>-</sup>               | Radical hidroxí       |
| ONOO <sup>-</sup>             | Peroxinitrito         |
| Zn                            | Zinco                 |

## RESUMO

### Uso de complexos metálicos de magnésio com fenólicos coordenados para inibição do estresse oxidativo e estudo antioxidante

Autor: Carla Sthefane Pêpe Matos

Orientador: Prof. Dr. Eldevan dos Santos Silva

Co-orientador: Prof. Dr. Cleber Galvão Novaes

**RESUMO:** O estresse oxidativo é o desequilíbrio entre espécies reativas de oxigênio/nitrogênio e a capacidade do organismo de neutralizar sua ação pelo efeito antioxidante. Esse desequilíbrio pode resultar no agravamento de doenças degenerativas como Alzheimer, Parkinson, Câncer e Diabetes. Este trabalho visou estudar a inibição do estresse oxidativo utilizando complexo metálico antioxidante de magnésio com fenólicos coordenados, bem com sua toxicidade frente ao zebrafish. O estudo de inibição do radical superóxido foi realizado utilizando o ensaio com VitB2/MET/NBT, obtendo uma inibição de 85% para o complexo Mg-isovanílico, contra 58% para o ácido isovanílico livre. A inibição dos radicais ABTS<sup>•+</sup> e DPPH<sup>•</sup> foram estudadas através dos espectros do UV-Vis e EPR, respectivamente. O Mg-isovanílico apresentou IC<sub>50</sub> de 37,15 µmolL<sup>-1</sup> e o isovanilato de 81,78 µmolL<sup>-1</sup>, demonstrando excelente capacidade de inibição do radical ABTS<sup>•+</sup>. A desativação do <sup>1</sup>O<sub>2</sub> utilizando o sequestrador TEMP, tanto para o ácido isovanílico quanto para o complexo não inibiu o radical TEMPO (IC<sub>50</sub> 1391±9 e 1200±12 µmolL<sup>-1</sup>, respectivamente), pois possui alta estabilidade. O efeito do Mg-isovanílico foi estudado no peixe-zebra através da atividade da acetilcolinesterase no cérebro, CAT e GST no trato digestivo, não demonstrando nenhuma alteração no efeito dessas enzimas, além de reduzir a atividade da enzima LPO em meio aquático em todas as concentrações estudadas. Esta pesquisa mostrou que o Mg-isovanílico é capaz de atuar contra o estresse oxidativo, não possuindo nenhum efeito tóxico ao peixe. Contudo, novos estudos precisam ser realizados a fim de esclarecer sua possível atividade frente às doenças neurodegenerativas ocasionadas pelo estresse oxidativo e seu possível uso em humanos.

**Palavras-chave:** Estresse oxidativo, composto metálico, isovanilato, zebrafish.

## ABSTRACT

### Use of magnesium metal complexes with coordinated phenolics to inhibit oxidative stress and antioxidant study

Author: Carla Sthefane Pêpe Matos

Advisor: Prof. Dr. Eldevan dos Santos Silva

Co-advisor: Prof. Dr. Cleber Galvão Novaes

**ABSTRACT:** Oxidative stress is the imbalance between reactive oxygen/nitrogen species and the body's ability to neutralize its action through the antioxidant effect. This imbalance can result in the aggravation of degenerative diseases, such as Alzheimer's, Parkinson, Cancer, and Diabetes. This work aimed to study the effects of the inhibition of oxidative stress using magnesium antioxidant metal complex with coordinated phenolics, as well as its toxicity against zebrafish. The superoxide radical inhibition study was carried out using the VitB2/MET/NBT assay, obtaining an inhibition of 85% for the Mg-isovanillic complex, against 58% for the free isovanillic acid. The inhibition of ABTS<sup>•+</sup> and DPPH<sup>•</sup> radicals was studied through the UV-Vis and EPR spectra, respectively. The Mg-isovanillic presented IC<sub>50</sub> of 37.15 µmolL<sup>-1</sup> and the isovanilate of 81.78 µmolL<sup>-1</sup>, demonstrating an excellent capacity to inhibit the ABTS<sup>•+</sup> radical. The deactivation of <sup>1</sup>O<sub>2</sub> using the TEMP scavenger, both for isovanillic acid and for the complex did not inhibit the TEMPO radical (IC<sub>50</sub> 1391±9 and 1200±12 µmolL<sup>-1</sup>, respectively), as it has high stability. The effect of Mg-isovanillic was studied in zebrafish through the activity of acetylcholinesterase in the brain, CAT and GST in the digestive tract, showing no change in the effect of these enzymes, in addition to reducing the activity of the LPO enzyme in the aquatic environment in all of the concentrations studied. This research showed that Mg-isovanillic is able to act against oxidative stress, not having any toxic effect on fish. However, further studies need to be carried out in order to clarify its possible activity against neurodegenerative diseases caused by oxidative stress and its possible use in humans.

**Keywords:** Oxidative stress, metallic compound, isovanilate, zebrafish.

## SUMÁRIO

|                                                                                                                                              |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. INTRODUÇÃO .....                                                                                                                          | 15 |
| 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....                                                                                                               | 17 |
| 2.1 Estresse oxidativo .....                                                                                                                 | 17 |
| 2.2. Doenças relacionadas ao estresse oxidativo .....                                                                                        | 19 |
| 2.2.1 Doença de Alzheimer.....                                                                                                               | 20 |
| 2.2.2 Doença de Parkinson.....                                                                                                               | 21 |
| 2.3. Antioxidantes.....                                                                                                                      | 22 |
| 2.4. Complexos antioxidantes .....                                                                                                           | 24 |
| 2.5. Zebrafish .....                                                                                                                         | 28 |
| 3. OBJETIVOS .....                                                                                                                           | 31 |
| 3.1 Objetivo geral .....                                                                                                                     | 31 |
| 3.2 Objetivos específicos .....                                                                                                              | 31 |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS .....                                                                                                                  | 32 |
| 4.1 Reagentes.....                                                                                                                           | 32 |
| 4.2 Ressonância paramagnética de elétrons (ESR) .....                                                                                        | 33 |
| 4.3 Determinação da atividade sequestradora do radical ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ )<br>utilizando o nitro-azul tetrazólio (NBT) ..... | 34 |
| 4.4 Determinação da atividade antioxidante do radical estável 2,2-difenil-1-picril<br>hidrazil (DPPH) utilizando o EPR .....                 | 34 |
| 4.5 Radical ABTS <sup>•+</sup> .....                                                                                                         | 35 |
| 4.6 Ensaios de marcadores bioquímicos no peixe zebra .....                                                                                   | 35 |
| 4.7 Desativação do estado triplete da riboflavina e inibição do oxigênio singlete ..                                                         | 37 |
| 4.8 Análise estatística .....                                                                                                                | 37 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....                                                                                                              | 37 |
| 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....                                                                                                                | 45 |
| REFERÊNCIAS.....                                                                                                                             | 46 |

## 1. INTRODUÇÃO

Desde que foi introduzido por Helmus Sies em 1979, o estresse oxidativo tem sido estudado dentro do campo da biologia redox, tendo ocorrido uma evolução nos conceitos de patologias relacionadas ao mesmo<sup>1</sup>. Sabe-se que o dano oxidativo contribui para diversas patologias, envolvendo múltiplos mecanismos pelos quais os oxidantes podem atuar. No entanto, seu grau de participação na patologia das doenças são bastantes variáveis<sup>2</sup>.

O estresse oxidativo ocorre nas células devido às espécies reativas do oxigênio e nitrogênio, denominadas radicais livres. Os radicais livres são átomos ou moléculas que podem apresentar um, dois ou nenhum elétron livre. Sua produção é contínua, pois cumpre funções biológicas relevantes durante os processos metabólicos, como a mediação da transferência de elétrons em reações bioquímicas<sup>1</sup>. Entretanto, os radicais livres são muito reativos e atacam qualquer célula para se estabilizar, trazendo prejuízos ao meio biológico<sup>3</sup>.

Algumas doenças degenerativas como Doença de Alzheimer (DA) e Doença de Parkinson (DP) estão diretamente relacionadas ao estresse oxidativo, sendo que este desempenha um papel importante na patogênese da DA, uma vez que, uma característica importante dessa patologia é a presença de danos oxidativos em lipídeos e proteínas neuronais<sup>4</sup>.

Da mesma maneira, a DP é uma infecção crônica que afeta progressivamente o sistema nervoso. Genes com sensor redox para estresse oxidativo foram identificados na DP e linhas de evidência sugerem que o metabolismo da dopamina, altos níveis de ferro e cálcio no sistema nervoso, disfunção mitocondrial e neuroinflamação contribuem para o aumento do estresse oxidativo e perda neuronal dopaminérgica no cérebro de pacientes com essa doença<sup>5</sup>.

Um dos alvos celulares passíveis de ser atingido pelos radicais livres é o Ácido Desoxirribonucleico (DNA), o que pode levar ao desenvolvimento de câncer. Células tronco cancerosas retém certa quantidade de radicais livres, logo a geração destes durante a quimioterapia pode fazer tais células adquirir resistência, aumentando, assim, a quantidade de células cancerosas resistentes<sup>6</sup>.

A hiperglicemia é um dos fatores na geração de radicais livres, aumentando o estresse oxidativo no diabetes pela ativação de diversas enzimas. Além disso, a hiperglicemia ainda causa a redução da atividade das enzimas glutatona (GSH),

superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT), que são catalisadores enzimáticos de radicais livres, aumentando assim o estresse oxidativo<sup>7</sup>.

Com o objetivo de minimizar esse dano oxidativo, o sistema biológico produz substâncias antioxidantes enzimáticas que são capazes de catalisar os radicais livres em espécies neutras. Entretanto, é necessário uma alimentação balanceada a base de antioxidantes não enzimáticos como Vitamina C e E, polifenóis, dentre outros. Porém, o estresse oxidativo decorre da insuficiência dessas substâncias antioxidantes<sup>8</sup>.

O magnésio associado a antioxidantes fenólicos tem surgido como um agente quelante importante na formação de complexos. Suas inúmeras funções celulares, baixa toxicidade e enzimáticas, bem como a capacidade de estabilizar radicais livres, o torna atraente para esse papel. Os complexos de magnésio são muito versáteis e ganharam papel essencial nas indústrias farmacêuticas, químicas e agrícolas<sup>9</sup>.

A maioria das pesquisas médicas necessitam de modelos animais para ampliar o conhecimento sobre as causas e consequências das doenças humanas. O peixe *Danio rerio* tornou-se um organismo modelo cada vez mais popular na pesquisa biológica básica, pois dentre outros fatores, é pequeno, de baixo custo, fácil manutenção, de fácil acesso e possui seu genoma totalmente sequenciado<sup>10</sup>.

Diante do exposto esse trabalho tem como objetivo estudar a inibição do estresse oxidativo utilizando complexo metálico antioxidante de magnésio com fenólicos coordenados, bem como avaliar sua atividade antioxidante.



## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

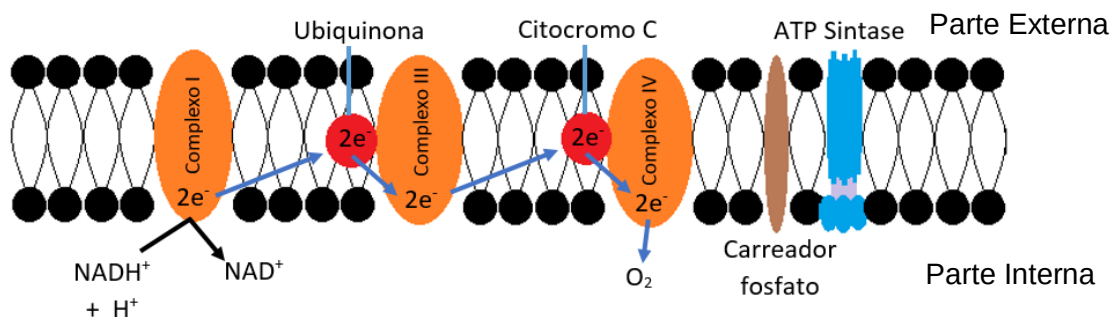
### 2.1 Estresse oxidativo

O estresse oxidativo é o desequilíbrio entre espécies reativas de oxigênio/nitrogênio (ROS/RNS) e a capacidade do organismo de neutralizar sua ação pelo efeito antioxidante, ocorrendo a geração excessiva de radicais livres ou diminuição da velocidade de remoção destes<sup>11</sup>.

Devido às suas necessidades energéticas, os organismos vivos desenvolveram um sistema para produção de energia<sup>11</sup>. Nos organismos aeróbicos, essa produção é feita a partir do oxigênio, sintetizando adenosina trifosfato (ATP). Durante esse processo, diversos radicais livres são produzidos, os quais estão envolvidos na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular, imunidade e defesa celular e síntese de substâncias biológicas<sup>12</sup>.

Os radicais livres são átomos que possuem um par de elétron não pareados, os quais, devido sua alta reatividade, precisam doar ou receber elétrons de outro átomo para se estabilizar. No entanto, alguns deles não apresentam elétrons desemparelhados em sua última camada, embora participem das reações de oxirredução, sendo melhor denominados ROS e RNS<sup>13</sup>.

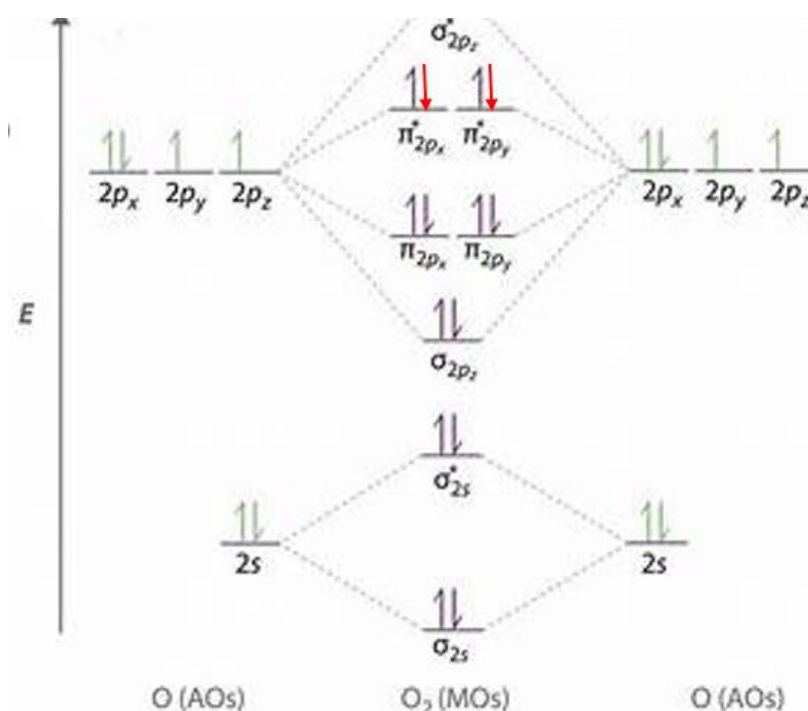
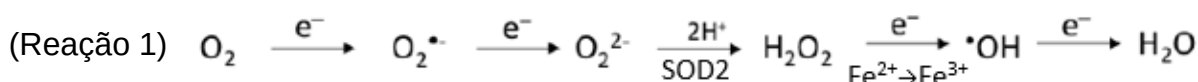
Na cadeia respiratória, última etapa da respiração celular, as moléculas de Nicotinamida Adenina Dinucleótido (NADH) produzidas ao longo dos processos anteriores doam  $2\text{H}^+$  e  $2\text{e}^-$  ao complexo I, presente na membrana interna da mitocôndria (figura 1). Estes elétrons são bombeados através da Ubiquinona até o complexo III, e deste para o citocromo C, da onde vai para o complexo IV, fornecendo energia para bombear moléculas de  $\text{O}_2$  para a região externa<sup>14</sup>.



**Figura 1.** Produção de ROS na cadeia respiratória.

Esses elétrons saem do Complexo IV e reduzem uma molécula de  $\text{O}_2$  a uma molécula de água, através da reação descrita na reação 1. O oxigênio possui dois

elétrons desemparelhados em orbitais antiligantes, conforme seu orbital molecular (figura 2). Ao receber  $1e^-$ , o  $O_2$  se transforma em  $O_2^{\bullet-}$ , que entra no primeiro orbital, considerado o ROS primário. Este, ao receber o segundo elétron, que emparelha com o segundo elétron desemparelhado, se torna o  $O_2^{2-}$ , que através da ação da enzima superóxido dismutase 2 (SOD2) mais  $2H^+$ , forma  $H_2O_2$ , que na presença de  $Fe^{2+}$ , oxida a  $Fe^{3+}$ , gerando o radical  $OH^{\bullet}$ , que finalmente gera uma molécula de  $H_2O$ . No entanto, alguns destes elétrons escapam da mitocôndria e reagem com  $O_2$  não reduzido, formando ROS como  $O_2^{\bullet-}$ ,  $H_2O_2$  e  $OH^{\bullet}$ , que são potencialmente tóxicos<sup>15</sup>.

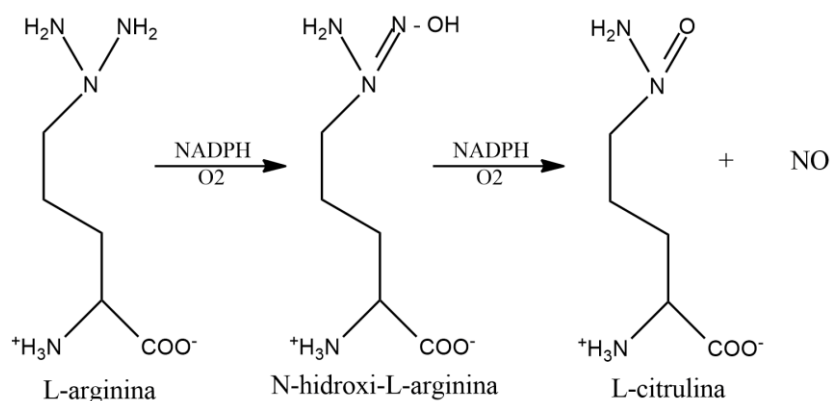


**Figura 2.** Orbital Molecular do Oxigênio.

Os RNS fazem parte de uma família de moléculas microbicidas derivadas do óxido nítrico (NO). O NO é uma molécula sinalizadora que desempenha um papel fundamental na patogênese da inflamação. Ele promove o efeito anti-inflamatório em condições fisiológicas normais. Por outro lado, o NO é considerado um mediador pró-inflamatório que induz a inflamação devido à superprodução em situações anormais<sup>16</sup>.

Acredita-se que o NO induz vasodilatação no sistema cardiovascular, atua nas respostas imunes por citocinas, é um potente neurotransmissor nas sinapses dos neurônios e contribui para a regulação da apoptose. O NO está envolvido na patogênese de distúrbios inflamatórios da articulação, intestino e pulmões<sup>16</sup>.

O radical NO é produzido em tecidos biológicos por sínteses de NO ao oxidar arginina em citrulina (figura 3), com auxílio de NADPH, utilizando  $2O_2$ . São produzidas por 3 enzimas: óxido nítrico sintetase neuronal (nNOS), óxido nítrico sintetase endotelial (eNOS) e óxido nítrico sintetase induzível (iNOS)<sup>17</sup>.



**Figura 3.** Oxidação da L-arginina em L-citrulina através da ação de duas moléculas de oxigênio e dois NADPH.

As enzimas nNOS e eNOS são reguladas por íons de cálcio ligados à proteína calmodulina, e são essenciais para a célula. Produzem NO em baixas concentrações, além de atuar como sinalizador em biomoléculas e vasodilatador. A iNOS é induzida por citocinas liberadas durante um processo inflamatório e produz NO em altas concentrações<sup>17</sup>.

A concentração de NO no plasma, é controlada através de sua ligação com a oxihemoglobina presente em eritrócitos. Contudo, quando em excesso, o NO pode reagir com o  $O_2^{2-}$ , gerando o radical peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>), molécula altamente reativa, que é capaz de induzir peroxidação lipídica e nitrosilação de muitas moléculas de tirosina que normalmente agem como mediadores da função enzimática e sinalizam transdução (DNA)<sup>17,18</sup>.

O ONOO<sup>-</sup> pode se converter ainda mais a intermediários altamente tóxicos, como os radicais  $NO_2^-$  e  $CO_3^{2-}$ . As RNS estão associadas com a inativação enzimática e a ativação excessiva de genes pró-inflamatórios, como também estão envolvidas em várias doenças crônicas não-transmissíveis como doenças cardiovasculares, diabetes, hipertensão, síndrome metabólica, artrite reumatóide e doenças neurodegenerativas (doença de Alzheimer, doença de Parkinson)<sup>16,18,19</sup>.

## 2.2. Doenças relacionadas ao estresse oxidativo

Os radicais livres podem ser gerados no citoplasma, nas mitocôndrias ou na membrana e o seu alvo celular (proteínas, lipídios, carboidratos e DNA) está relacionado com seu sítio de formação<sup>8</sup>. Entretanto, ao agir sobre as células, provocam alterações cumulativas, até o ponto de morte da célula. Com o passar dos anos esse efeito cumulativo pode levar a perda de funções biológicas de proteínas, levando a flacidez da pele, dentre outras alterações que caracterizam o envelhecimento<sup>20</sup>.

Foi estimado que o estresse oxidativo está correlacionado com mais de 100 doenças, seja como fonte ou resultado. Seus danos como contribuintes para a fisiopatologia de muitos problemas crônicos de saúde, como doenças neurodegenerativas (Parkinson, Alzheimer, doença de Huntington e esclerose lateral amiotrófica), doenças cardiovasculares e inflamatórias, diabetes e câncer já foram confirmados<sup>11</sup>.

### 2.2.1 Doença de Alzheimer

Uma das doenças neurodegenerativas mais comuns é a DA. Descrita pela primeira vez por Alois Alzheimer, foi definida como uma patologia progressiva associada à deterioração cognitiva e à demência. É uma doença multifatorial, que se apresenta nas formas esporádica ou genética<sup>4</sup>. A esporádica representa a maior parte dos casos e está relacionada a fatores ambientais, avanço da idade (geralmente após os 65 anos), aumento do estresse oxidativo, falha no metabolismo energético, dentre outros, enquanto a genética é mais rara e começa antes dos 65 anos<sup>4</sup>.

A DA tem origem complexa, resultando na formação de placas de senis extracelulares e emaranhados neurofibrilares intracelulares nas células neuronais. Duas hipóteses explicam o mecanismo molecular da doença: a hipótese colinérgica e a hipótese da cascata amiloide<sup>22,23</sup>.

De acordo com a hipótese da cascata amiloide, as enzimas  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ -secretase realizam a proteólise sequencial da proteína APP, produzindo o peptídeo A $\beta$  solúvel. Quando há um desequilíbrio no metabolismo dos peptídeos A $\beta$ , ocorre o seu acúmulo nas placas senis, dando início a DA. Esse acúmulo resulta numa cascata de processos patogênicos, como a anormalidade da proteína TAU, que culmina na morte do córtex frontal e hipocampo<sup>22,23</sup>.

A hipótese colinérgica baseia-se na observação de que a neurodegeneração afeta principalmente os neurônios colinérgicos, o que contribui para os sintomas da

DA. Esta perda de neurônios colinérgicos é acompanhada pela diminuição de marcadores colinérgicos, como a ChAT, e aumento da atividade da acetilcolinesterase<sup>24</sup>.

### 2.2.2 Doença de Parkinson

A DP é o segundo distúrbio neurodegenerativo mais comum e o distúrbio do movimento mais prevalente em todo o mundo. A maioria dos casos ocorrem de forma idiopática, contudo os fatores genéticos são responsáveis por aproximadamente 10% dos casos. Seus mecanismos patológicos são totalmente compreendidos, mas evidências crescentes implicam o estresse oxidativo e nitrosativo astrocítico na patogênese da DP<sup>27</sup>.

Quanto mais despigmentada a substância negra, maior é a perda de dopamina. Isto junto à depleção nos neurônios dopaminérgicos resultam numa diminuição da atividade das áreas motoras do córtex cerebral, acarretando diminuição dos movimentos voluntários. A medida que a doença progride corpos citoplasmáticos chamados corpos de Lewys (corpos de inclusão citoplasmática dos eosinófilos existentes na substância negra do mesencéfalo) se aglomeram<sup>28</sup>. Além disso, mutações somáticas no DNAm do gene ND5 (que codifica uma subunidade do complexo I) modificam a eficiência da enzima oxphos e do complexo I, contribuindo para a disfunção mitocondrial e o estresse oxidativo encontrados na DP<sup>28,29</sup>.

A dopamina sofre auto-oxidação para formar dopamina quinona e radicais livres. A ciclização da dopamina quinona gera aminocromo, que gera superóxido e desregula o NADPH. Quanto ao metabolismo, a dopamina é metabolizada pela MAO-B gerando 3,4-dihidroxifenil-acetaldeído, amônia e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Entretanto, o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em neurônios dopaminérgicos reage com Fe<sup>2+</sup> formando o radical OH<sup>-</sup>. A indução de MAO-B nos astrócitos leva à perda seletiva de neurônios dopaminérgicos no sistema nervoso<sup>30</sup>.

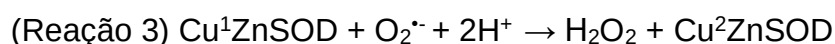
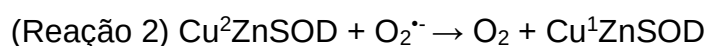
O armazenamento de dopamina requer o transporte através do transportador VMAT2, cuja superexpressão confere proteção contra a toxicidade gerada por MPTP, sendo que neurônios dopaminérgicos com inibições de VMAT2 são mais vulneráveis ao estresse oxidativo. Por outro lado, os transportadores de dopamina são necessários na recaptação de dopamina e sua inibição também aumenta os níveis de dopamina citosólica, que é propensa a ser oxidada<sup>5</sup>.

### 2.3. Antioxidantes

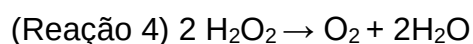
Os antioxidantes são substâncias que combatem o excesso de radicais livres, os quais mesmo em pouca concentração, conseguem inibir as taxas de oxidação através do fornecimento de elétrons. São classificados como enzimáticos e não enzimáticos<sup>13</sup>.

Os antioxidantes enzimáticos desativam as espécies reativas de oxigênio e são encontradas por todo o corpo, tanto dentro como fora da célula, sendo algumas delas a SOD, CAT, GPx4, glutathione redutase (GR) e glutathione S-transferase (GST). Os não enzimáticos reagem com as espécies radicalares e são consumidos durante a reação, destacam-se GSH,  $\alpha$ -tocoferol (vit. E), ácido ascórbico (vit.C), ácido lipóico, carotenóides, flavonoides, dentre outros <sup>8</sup>.

O sistema enzimático da SOD ocorre por dois tipos de enzimas. A primeira tem cobre e zinco como centro redox e ocorre no citosol, sendo que sua atividade não é afetada pelo estresse oxidativo, enquanto a segunda contém  $Mn^{2+}$  como centro redox, ocorre na mitocôndria e tem sua atividade aumentada com o estresse oxidativo. Primeiramente ocorre a redução do  $Cu^{2+}$  a  $Cu^+$  por um superóxido para a produção de  $O_2$  (reação 2) e, posteriormente, (reação 3) outra molécula de superóxido oxida o  $Cu^+$  para produção do peróxido de hidrogênio<sup>40</sup>.



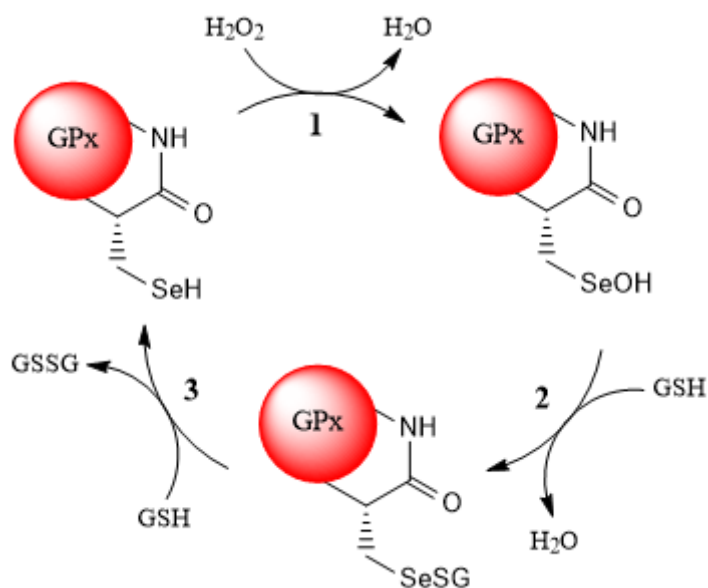
A catalase é uma enzima que existe em quase todos os organismos aeróbicos. Usa ferro ou manganês como cofator e catalisa a degradação ou redução do  $H_2O_2$  em água e oxigênio molecular, consequentemente completando o processo de desintoxicação iniciado pela SOD. Está localizada principalmente nos peroxissomos, mas ausente nas mitocôndrias das células de mamíferos. Seu principal mecanismo de ação é a quebra do  $H_2O_2$ , como mostrado na reação 4<sup>41</sup>.



A GPx4 converte  $H_2O_2$  em água. Vem de um grupo de oito glutathionas e se destaca por ser altamente específica ao atuar sobre a peroxidação lipídica, agindo nas mitocôndrias e no citosol. É uma hidropoxidase fosfolipídica dependente do

selênio, sendo conhecida como uma peroxidase de seleno-cisteína e atua em colaboração com o GSH<sup>41,42</sup>.

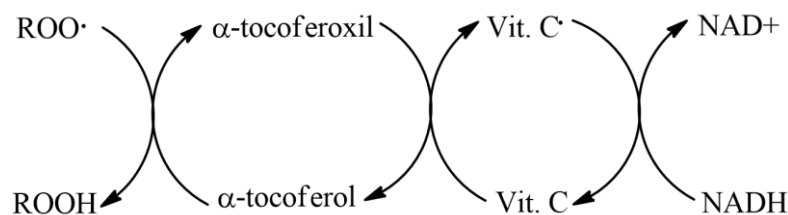
Seu mecanismo catalítico (figura 4) envolve a oxidação do sítio ativo selenolato para ácido selênico (1). Uma molécula de GSH é adicionada, transformando o ácido selênico num aduto de Se-SG (2). Uma segunda molécula de GSH é adicionada (3), regenerando o Se-SG em selenolato activo e GSSG<sup>43</sup>.



**Figura 4.** Mecanismo catalítico da glutathiona peroxidase.

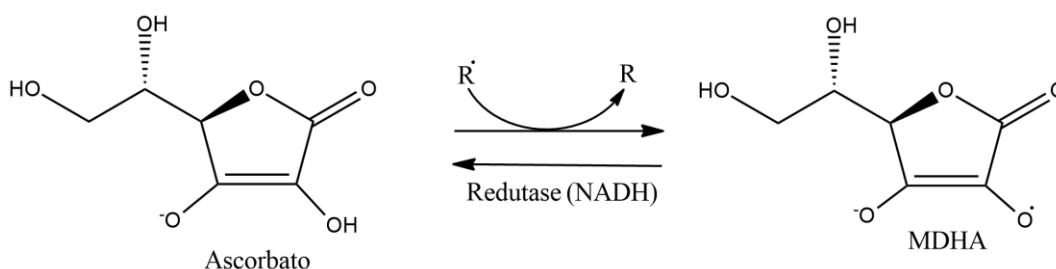
A vitamina E é um antioxidante não-enzimático, cujo termo é utilizado para designar os compostos lipossolúveis denominados tocoferóis. Dentre eles está o  $\alpha$ -tocoferol, principal forma encontrada no sangue e tecidos humanos e que possui 8 isômeros, que podem exercer atividade antioxidante. Desempenha importante função na proteção das membranas das células e das lipoproteínas plasmáticas, agindo sinergicamente com outros compostos, como o selênio<sup>44</sup>.

O  $\alpha$ -tocoferol interrompe a reação em cadeia que ocorre na peroxidação lipídica, doando um átomo de hidrogênio a espécie reagente  $\text{ROO}^\cdot$ , tornando-se o radical  $\alpha$ -tocoferoxil. Posteriormente o ácido ascórbico (Vit. C) doa elétrons a esse radical, reduzindo-o novamente a  $\alpha$ -tocoferol e se tornando um radical, que é novamente reduzido pelo NADH (figura 5)<sup>45</sup>.



**Figura 5.** Mecanismo antioxidante do  $\alpha$ -tocoferol.

O ácido ascórbico é uma vitamina hidrossolúvel essencial ao organismo. Devido sua estrutura, tem propriedades ácida e redutora, podendo doar ou receber elétrons. O ascorbato prontamente doa um elétron a radicais oxidantes potencialmente prejudiciais, como os radicais  $\text{OH}^\cdot$ ,  $\text{RO}^\cdot$ ,  $\text{LOO}^\cdot$ ,  $\text{GS}^\cdot$  e  $\text{TO}^\cdot$ , gerando MDHA, que é relativamente não reativo, e pode ser reduzido de volta ao ascorbato pelas redutases dependentes de NADH e NADPH (Figura 6)<sup>46,47</sup>.



**Figura 6.** Mecanismo antioxidante do ácido ascórbico.

## 2.4. Complexos antioxidantes

Sendo o cofator de várias doenças, o estresse oxidativo é um alvo atraente para a terapia. Ultimamente, vários compostos da medicina popular foram isolados e investigados para observar seus efeitos potenciais, tais como polifenóis, flavonóides, alcalóides e isoflavonas. Os estudos sobre esses compostos têm atraído os pesquisadores, pois o efeito terapêutico do composto é gradualmente revelado a partir dos achados, dentre eles efeitos contra os radicais livres<sup>48</sup>.

Entre os antioxidantes naturais de origem vegetal, um lugar importante é ocupado por óleos essenciais, que são uma mistura de compostos voláteis isolados de plantas aromáticas<sup>49</sup>. Óleos essenciais podem ser uma alternativa plausível a medicamentos, como antibióticos, devido ao seu potencial para difundir a membrana celular do microrganismo, resultando na inibição do crescimento celular, bem como na capacidade de eliminar os radicais livres. Alguns óleos como timol, carvacrol e

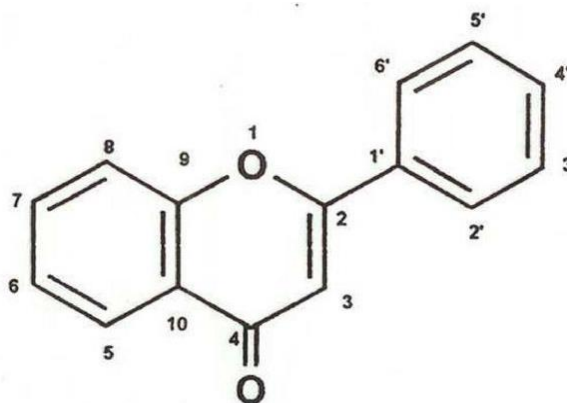


eugenol mostraram ser capazes de reduzir as consequências do estresse oxidativo através da diminuição da atividade mitocondrial das células cancerosas<sup>50</sup>.

Os antioxidantes podem atuar por: captura direta de ROS; inibição de enzimas cujo ciclo catalítico envolve espécies ROS de oxigênio reativo (LOX, COX, XO); modulação de expressão gênica (afetando SOD, CAT, GPx4, TR1); quelação de íons metálicos (particularmente de transição) que estão envolvidos em processos de formação de radicais; e prevenção do processo de peroxidação (reduzindo os radicais alcóxil e peróxil)<sup>51</sup>.

Os complexos antioxidantes são compostos predominantemente por substâncias fenólicas e são reguladores eficazes dos processos de oxidação em sistemas biológicos, bem como de materiais poliméricos, gorduras e óleos alimentares, cosméticos e técnicos. Os compostos fenólicos são caracterizados por conter em sua estrutura química anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais<sup>52</sup>.

Dentre os compostos fenólicos encontram-se os flavonoides que constituem a maior parte dessa classe. A estrutura comum dos flavonoides é baseada em um arranjo de fenilbenzopirona de C6-C3-C6 (figura 7). Eles contêm anéis de fenil A e C ligados por três átomos de carbono que formam uma estrutura fechada do anel de pirano B<sup>53</sup>.



**Figura 7.** Estrutura comum dos flavonoides.

Os flavonoides são conhecidos por serem sintetizados pelas plantas em resposta à infecção microbiana. Sua atividade antioxidante é causada por sua capacidade de inibir enzimas pró-oxidantes, que formam complexos com os cátions de ferro e cobre e capturam radicais de oxigênio e nitrogênio sendo o doador de hidrogênio<sup>52</sup>.

A atividade do flavonoide depende da estrutura. Sua natureza química depende de sua classe estrutural, grau de hidroxilação, outras substituições e conjugações e grau de polimerização. Além disso, a quelação de metais pode ser crucial na prevenção da geração de radicais que danificam as biomoléculas alvo<sup>54</sup>.

Os flavonóides apresentam mais de um sítio quelante possível para íons metálicos. O local de ligação preferido depende do flavonoide, do íon metálico e do valor do pH. Este último é relevante para as propriedades *in vivo* de flavonóides como componentes dietéticos ou farmacêuticos<sup>55</sup>.

Muita atenção também está sendo dada às flavonas. Íons metálicos no complexo de flavona podem atuar como centro de eliminação de radicais ou como um catalisador de Fenton, enquanto a porção ligante é um alvo para o radical hidroxila, fazendo a atividade antioxidante do complexo metálico ser maior do que a flavona. Contudo, o tipo de coordenação metálica é crucial para as propriedades antioxidantes dos complexos metálicos<sup>51</sup>.

#### **2.4.1 Magnésio e complexos antioxidantes**

O magnésio (Mg) é um elemento do Grupo 2 (alcalino-terroso) dentro da tabela periódica e tem uma massa atômica relativa de 24,305 Da, uma gravidade específica a 20°C de 1,738, um ponto de fusão de 648,8°C e um ponto de ebulição de 1090°C. É o sétimo elemento mais comum na crosta terrestre e está principalmente ligado a depósitos minerais, oceanos e rios<sup>56</sup>.

Os sais de magnésio dissolvem-se facilmente em água e são muito mais solúveis do que os respectivos sais de cálcio. No estado dissolvido, o Mg se liga à água de hidratação mais forte do que o cálcio, o potássio e o sódio. Desse modo, o cátion de magnésio hidratado é difícil de desidratar. Seu raio é aproximadamente 400 vezes maior do que seu raio desidratado<sup>58,59</sup>.

O Mg é interessante para uso em aplicações agrícolas por causa de sua abundância, baixo custo e efeitos protetores sobre as plantas. O Mg é o íon central da clorofila, e, portanto, essencial para o crescimento e desenvolvimento das plantas, de modo que o suprimento de Mg em locais com deficiência de Mg aumenta a qualidade das safras agrícolas<sup>57</sup>.

Em vertebrados é o quarto cátion mais abundante e é essencial, especialmente dentro das células, sendo o segundo cátion intracelular mais comum depois do potássio, com ambos os elementos sendo vitais para várias funções fisiológicas<sup>56</sup>. Ele

desempenha um papel importante na saúde humana, auxiliando no envelhecimento e em muitas doenças, como depressão e estresse, que exigem maior absorção de magnésio<sup>57</sup>.

O Mg também é amplamente utilizado para aplicações técnicas e médicas que vão desde a produção de ligas, pirotecnia e fertilizantes para a saúde. Tradicionalmente, os sais de magnésio são usados como antiácidos ou laxantes na forma de hidróxido de magnésio  $[Mg(OH)_2]$ , cloreto de magnésio  $(MgCl_2)$ , citrato de magnésio  $(C_6H_6O_7Mg)$  ou sulfato de magnésio  $(MgSO_4)$ <sup>59</sup>.

O conteúdo total de Mg em um corpo humano adulto (70 kg) é de aproximadamente 1,0 mol. Cerca de 99% está localizado nos ossos, músculos e tecidos moles não musculares. O Mg atua como um cofator em reações enzimáticas estabilizando enzimas e está envolvido na produção de ATP. Seu metabolismo influencia o processo de intervenção da glicose, síntese de gordura, proteínas, ácidos nucleicos, contração muscular e muitos outros<sup>60</sup>.

A maioria dos compostos de Mg contém o íon  $Mg^{2+}$  que forma predominantemente ligações eletrostáticas, interações não direcionais preferencialmente com ligantes fortes que são propensos a dissociações e rearranjos. O  $Mg^{2+}$  é um ácido duro e forma, preferencialmente, complexos hexacoordenados com átomos de oxigênio. É considerado estável a redox e um agente redutor forte<sup>61</sup>.

Como os íons metálicos, dentre eles o Mg, desempenham um papel vital no início dos processos de radicais livres, a quelação metálica é amplamente considerada como outro mecanismo da atividade antioxidante dos flavonoides. A interação de flavonoides com íons metálicos pode alterar as propriedades antioxidantes e alguns efeitos biológicos dos flavonoides<sup>62</sup>.

Muitos carboxilatos de magnésio foram relatados e estruturalmente caracterizados. A maioria deles é moderadamente solúvel em solventes apolares e se dissociam em uma solução polar. Nas ribonucleases, dois dos três carboxilatos estão moderadamente ligados a um íon metálico. As previsões teóricas indicaram que o íon  $Mg^{2+}$  interage com o terceiro carboxilato na camada externa da matriz da proteína, enquanto o íon  $Ca^{2+}$  biologicamente inativo prefere se ligar de forma quelante. Além disso, um íon  $Mg^{2+}$  hidratado pode aceitar termodinamicamente até o terceiro carboxilato em um meio com uma constante dielétrica baixa<sup>63</sup>.

Em um trabalho onde foi desenvolvido um complexo de quercetina com Mg, percebeu-se através de estudos espectrométricos e analíticos que o complexo

apresenta maior atividade antioxidante em comparação com a quercetina pura, o que sugere que o Mg altera significativamente as propriedades químicas da quercetina<sup>62</sup>.

Um grupo de pesquisadores sintetizou um composto de Mg-hesperidina, a fim de obter um composto antioxidante mais solúvel em água, que seja bioativo e tenha baixa toxicidade. Através dos dados coletados percebeu-se que o complexo [Mg(hesp)2(phen)], apresentou características estruturais essenciais para melhorar a atividade físico-química e antioxidante da hesperidina no meio fisiológico<sup>66</sup>.

## 2.5. Zebrafish

O *Danio rerio*, popularmente conhecido como peixe zebra ou *zebrafish*, é uma espécie nativa do sul da Ásia, distribuído pelo Nordeste da Índia, Bangladesh e Nepal, e faz parte da família *Cyprinidae*. Foi utilizado pela primeira vez em pesquisa científica por George Streisinger, quando fez pesquisas genéticas antes usadas apenas em invertebrados, e o lançou como modelo experimental para todo o mundo. Com o tempo, o uso do peixe-zebra foi estendido a outros campos, incluindo saúde, toxicologia, comportamento e evolução<sup>10</sup>.

O *Danio rerio* (figura 8) vive em água doce ligeiramente alcalina de pH 8. São animais extremamente resistente às variações de temperaturas (de 6° a 38°C) e, por isso, conseguem sobreviver em quase todas as localidades geográficas. Entretanto, para fins de pesquisa, é mantido em biotério a temperaturas entre 27-28°<sup>68</sup>.



**Figura 8.** Imagens do peixe *Danio rerio*.

Mamíferos são geralmente empregados em pesquisa, contudo, têm sido gradualmente substituídos pelo peixe zebra. O uso crescente de peixes em pesquisas é frequentemente considerado uma grande conquista, pois mamíferos são de alto custo, necessitam de grandes espaços e consomem muitos produtos químicos, além de preservar os animais dos sofrimentos causados durante o processo do estudo<sup>69</sup>.

Diversas são as vantagens em se utilizar o zebrafish como em estudos laboratoriais. Suas características morfológicas e fisiológicas facilitam os ensaios. Seu tamanho varia entre 2 a 4 cm, tornando menor o espaço necessário para a sua manutenção, permitindo utilizar materiais de pequenas dimensões (caixas petri, lâminas) e baixas quantidades de dosagem dos produtos químicos, resultando em um menor custo para realização da pesquisa<sup>70</sup>.

O *Danio rerio* possui rápida maturação, por volta dos 3 a 6 meses, e alta fecundidade, com capacidade de gerar de 200 a 300 ovos num dia, possibilitando alta replicação e inúmeros alvos de estudo. Após fecundados, os embriões são permeáveis a pequenas moléculas, facilitando a uma administração de agentes tóxicos<sup>67</sup>.

Seus ovos e embriões são transparentes, o que permite monitorar o desenvolvimento dos órgãos, permitindo obter informações morfológicas, bioquímicas, fisiológicas, obter informações acerca dos diversos efeitos provocados pela exposição a um dado composto químico e manipulá-lo in vivo. Ele pode ser exposto a vários fatores ambientais neonatais fora do organismo materno, em ambiente experimentalmente controlável <sup>71</sup>.

O peixe zebra possui seu genoma totalmente sequenciado, além de ter alta homologia com o genoma humano, o que facilita sua manipulação genética e amplia as possibilidades de incorporação em estudos. Seus cérebros são pequenos e podem ser melhor avaliados usando as mais recentes técnicas de imagem<sup>71</sup>.

A escolha do peixe zebra ao invés de mamíferos roedores, em laboratório, facilita a aprovação pelas autoridades competentes e simplifica a adoção de protocolos de experimentação animal, sendo esta uma das principais razões pela escolha dele<sup>72</sup>.

Entretanto, essa espécie não possui tantos vasos sanguíneos quanto os roedores. Medicamentos que não são solúveis em água podem ser problemáticos para administrar por imersão e há considerável diferença na barreira hemato-encefálica em relação aos seres humanos, o que pode afetar a permeabilidade de certos medicamentos. Certas áreas do cérebro não são tão desenvolvidas quanto nos mamíferos, e algumas estruturas do SNC no peixe zebra ainda são difíceis de mapear, o que pode complicar a interpretação da interação circuito-comportamental <sup>71</sup>.

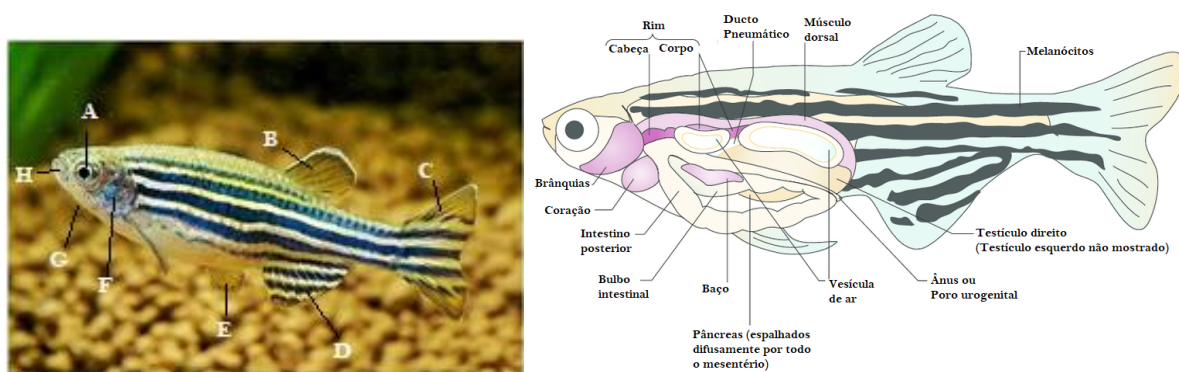
A anatomia do Zebrafish (figura 10) contribui para seu uso considerável como modelo animal para pesquisas e ela pode ser dividida em cabeça, tronco e cauda. O Zebrafish tem formato fusiforme, ou seja, sua cabeça é menor que o tronco, sendo

que o corpo diminui das guelras para o tronco e do tronco para a cauda. Os sistemas orgânicos incluem músculo-esquelético, cardiovascular, digestivo, hematopoiético, endócrino, renal e reprodutivo (ovário ou testículos); localizados dentro da cavidade celômica, envoltos por uma camada peritoneal. O sistema respiratório, contudo, está localizado na cavidade opercular, fora da cavidade celômica<sup>73</sup>.

Assim como nos mamíferos, a pele é o maior órgão do peixe. Ela é uma barreira física que auxilia na osmorregulação e possui células pigmentares que dão a cor característica ao Zebrafish. A superfície da pele é coberta por secreções mucosas contendo substâncias antimicrobianas, que a mantêm livre de patógenos através da descamação constante e renovação<sup>10</sup>.

O intestino possui três divisões funcionais conhecidas como intestino anterior, médio e posterior. A porção anterior é maior e atua como o principal local para a digestão de lipídios e proteínas. Acredita-se que ele desempenha um papel importante na absorção de nutrientes, com base na alta concentração de enzimas digestivas nesta região, bem como na altura das dobras epiteliais<sup>74</sup>.

Durante a ventilação, a água entra primeiro pela boca, passa pelas câmaras operculares nas brânquias e sai por uma abertura formada por cada um dos opérculos. As guelras funcionam como filtros, impedindo ajudando a filtrar as partículas e evitando que se alojem<sup>75</sup>.



**Figura 9.** Anatomia do *Danio rerio*. Olho (A), barbatana dorsal (B), barbatana caudal (C), barbatana anal (D), barbatana pélvica (E), opérculo (F), barbilho (G), boca (H).

O peixe-zebra é um criador assíncrono e, portanto, capaz de reproduzir o ano todo. Os ovários e testículos de adultos contêm células germinativas que estão em todos os estágios de oogênese e espermatogênese, respectivamente. Esse recurso torna o peixe-zebra um modelo ideal para o estudo do desenvolvimento e função das gônadas<sup>76</sup>.

Tal como o ser humano, apresenta também o sistema sensorial, nervoso e cérebro, responsável pelo olfato, memória e comportamentos. No momento da eclosão, a larva do peixe-zebra exibe comportamentos relativamente complexos e é capaz de reagir a diferentes estímulos sensoriais, por exemplo, a resposta de fuga, em que as larvas nadam rapidamente para longe de uma ameaça. No entanto, comportamentos mais complexos, como interações sociais, desenvolvem-se gradualmente ao longo de muitas semanas<sup>77</sup>.

Enquanto os mamíferos possuem neurogênese limitada em adultos, o peixe zebra apresenta neurogênese em adultos ao longo de todo o eixo rostrocaudal do cérebro e da medula espinhal. Isso só é possível devido a presença de células-tronco, localizadas em nichos nas zonas ventriculares do cérebro e da medula espinhal. A capacidade de produzir neurônios tem sido associada à notável capacidade do peixe-zebra de regenerar lesões em seu sistema nervoso<sup>77</sup>.

A anatomia do peixe-zebra e os componentes descritos acima brevemente, são importantes para o uso desse peixe como um modelo animal de pesquisa estabelecido e crescente. A compreensão desses componentes, como eles se desenvolvem, funcionam e podem ser modificados é fundamental para sua incorporação contínua e futura na busca de conhecimento sobre outros modelos de animais aquáticos e organismos terrestres na escala filogenética da complexidade<sup>74</sup>.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Estudar a inibição do estresse oxidativo utilizando complexo metálico antioxidante de magnésio com fenólicos coordenados, bem como sua toxicidade frente ao peixe *Danio rerio*.

#### **3.2 Objetivos específicos:**

- a) Investigar a capacidade antioxidante do complexo Mg-Fenólico frente aos radicais estáveis DPPH<sup>•</sup> e ABTS<sup>•+</sup>;
- b) Investigar a capacidade sequestradora do radical ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) utilizando o nitro-azul tetrazólito (NBT);

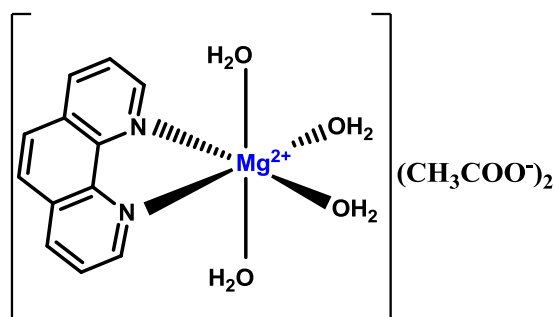
- c) Investigar o processo de desativação do estado triplete da riboflavina e inibição do oxigênio singlete via EPR;
- d) Investigar a toxicidade e o estresse oxidativo frente ao peixe-zebra.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Reagentes

Os acetato de magnésio tetra hidratado ( $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) (figura, sulfato de ferro(II) (Merck) ácido 3-hidroxi-4-metoxibenzóico (ácido isovanílico, Iso). Hidróxido de sódio, sulfato de sódio, ácido clorídrico (HCl) ácido fosfórico ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ), fosfato de potássio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), ácido 2-[N-morfolino] etanosulfônico (MES) e fosfato de potássio dibásico ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) todos de procedência Aldrich, foram usados no preparo de soluções tampão.





**Figura 10.** Acetato de magnésio tetra hidratado.

Riboflavina  $\geq 98\%$  (VitB2), nitro-azul tetrazólio (NBT),  $\alpha$ -(4-piridil-1-óxido)-N-terc-butilnitrona (POBN), 4-hidroxi-2,2,6,6-trimetilpiperidina-1-oxil(4-hidroxi-TEMPO), 2,2,6,6-tetrametil-4-iperidinol 98% (TEMP), 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH), sal de ABTS [2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)], persulfato de potássio, e peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), foram utilizados na avaliação da capacidade antioxidante Cloreto de acetilcolina  $\geq 99\%$ , 5,5-ditio-bis-2-nitrobenzoato  $\geq 98\%$ , pirogalol  $\geq 98\%$  (HPLC), L-glutathione reduzido  $\geq 98,0\%$ , substratos de glutathione S-transferase (GST), albumina de soro bovino (Fração de choque térmico, pH 7,0  $\geq 98\%$ ), (GSH), 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), L-Metionina  $\geq 98\%$ (HPLC), 3,5-di-terc-4-butilhidroxitolueno (BHT), superóxido dismutase (SOD) e ácido sulfúrico, todos de procedência (Sigma-Aldrich), foram utilizados nos estudos enzimáticos. Todos os solventes orgânicos usados foram de grau HPLC e as soluções aquosas foram preparadas com água Milli-Q. Informações a respeito da síntese e caracterização do complexo Mg-Isofenólicos podem ser obtidas nas seguintes fontes: Marchi et al., 2020; Silva et al., 2020, Silva et al., 2018.

## 4.2 Ressonância paramagnética de elétrons (ESR)

Ressonância paramagnética de elétrons I: As medidas de EPR foram realizadas com um espectrômetro Bruker EMX Plus (Rheinstetten, Germany) operando na banda-X, frequência de 9,76 GHz, potência de microondas de 1 mW, e amplitude de modulação de 1 G, cavidade retangular TE 102, capilar de quartzo (d.i.= 0,75 mm) à temperatura de 303 K. Estes experimentos foram realizados no Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo.

Espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (ESR): Os espectros de ESR foram registrados em um espectrômetro Bruker ER-160FC e Magnettech Miniscope MS200 ESR (Berlim, Alemanha) utilizando as seguintes condições: campo

de modulação 100 kHz, amplitude de modulação 0,200 G (POBN) e 0,700 G (TEMP), constante de tempo 327,68 ms, tempo de conversão 1310,72 ms, campo central 3365,98 G (POBN) ou 3364,15 (TEMP), largura de varredura 49,82 G (POBN) ou 97,78G (TEMP), frequência de microondas 9,64 GHz, potência de microondas 20,0 mW e temperatura  $23 \pm 1^\circ \text{C}$ . A varredura do campo magnético foi calibrada usando padrão de 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)<sup>78i</sup>.

#### **4.3 Determinação da atividade sequestradora do radical ânion superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) utilizando o nitro-azul tetrazólio (NBT)**

Para avaliar a capacidade sequestradora do radical ânion superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) utilizou-se riboflavina ( $\text{VitB}_2$ ) como fotossensibilizador, nitro-azul tetrazólio (NBT) como spin trap e o aminoácido metionina (Met) como substrato.<sup>79</sup> O meio de incubação consistiu de 10,0  $\mu\text{L}$  de Riboflavina com uma concentração de  $3,3 \mu\text{molL}^{-1}$ , 100,0  $\mu\text{L}$  de metionina em uma concentração de  $10,0 \text{ mmolL}^{-1}$ , 100,0  $\mu\text{L}$  de nitro-azul tetrazólio em uma concentração de  $46,0 \text{ molL}^{-1}$  e 2790  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato pH=7,4 em uma concentração de  $0,10 \text{ molL}^{-1}$ .<sup>80</sup>

O sistema foi incubado por 5 minutos em um reator utilizando lâmpadas de 450 nm. Em seguida, determinou-se o valor da absorção em 560nm das soluções em estudo contra um branco. Concentrações de 50; 100,0; 150,0; 200,0; 250,0 e 300,0  $\text{molL}^{-1}$  do ácido isovanílico livre e do complexo Mg-isovanílico foram investigadas e logo após calculou-se o  $\text{IC}_{50}$ .

Os resultados foram expressos em média  $\pm$  SD, considerado 100% da redução do NBT como controle. Os valores de  $\text{IC}_{50}$  foram calculados a partir de regressão não linear no software Graphpad Prism, versão 6.0.

#### **4.4 Determinação da atividade antioxidante do radical estável 2,2-difenil-1-picril hidrazil (DPPH) utilizando o EPR**

Foram preparadas soluções do radical estável DPPH $^{\cdot}$  e do Mg-isovanílico nas concentrações de  $1,0 \times 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$  e  $1,0 \times 10^{-3} \text{ molL}^{-1}$  respectivamente, em metanol. Em seguida, a amostra do complexo I foi diluída nas concentrações de 25; 50; 75; 100; 150; 200 e 250M. As mesmas concentrações foram estudadas para o ácido isovanílico livre. Em um tubo de ensaio foram adicionados de 25,0 até 250,0  $\mu\text{L}$  de solução do

ácido isovanílico livre e do complexo Mg-isovanílico à solução do radical estável DPPH<sup>•</sup> e deixados no escuro por 1h.

Os experimentos foram realizados utilizando a espectroscopia de ressonância paramagnética (EPR). Os valores de IC<sub>50</sub> foram calculados a partir de regressão não linear no software Graphpad Prism, versão 6.0 a partir do cálculo das integrais (área relativa) de todos os sinais do radical em função das concentrações estudadas.<sup>81</sup>

#### 4.5 Radical ABTS<sup>•+</sup>

O radical ABTS<sup>•+</sup> foi gerado a partir da reação entre o sal de ABTS e persulfato de potássio. Preparou-se uma solução 0,0070 molL<sup>-1</sup> do sal ABTS e 0,0025 molL<sup>-1</sup> de persulfato de potássio em água destilada, em seguida, essa solução foi mantida em repouso no escuro por 16 horas para formação do radical. Após o período de incubação, a solução do radical ABTS<sup>•+</sup> foi diluída em tampão fosfato (pH 7,4) e teve sua absorbância ajustada para o comprimento de onda de 734 nm assumindo  $\epsilon_{734} = 15000 \text{ mol}^{-1}\text{Lcm}^{-1}$ . As soluções do complexo I e do ácido isovanílico foram preparadas em solução tampão fosfato pH 7,4 utilizando uma concentração de  $1,0 \times 10^{-3} \text{ molL}^{-1}$ .

Em uma cubeta foram adicionados 900,0  $\mu\text{L}$  da solução de radical ABTS<sup>•+</sup> e 100,0  $\mu\text{L}$  da solução do complexo ou do ligante. A mistura foi incubada por 10 minutos à temperatura ambiente, e em seguida, foi realizada a leitura das amostras por espectroscopia de absorção eletrônica na região do UV-Vis.

O valor de IC<sub>50</sub> (concentração de composto necessária para reduzir a concentração inicial do radical ABTS<sup>•+</sup> em 50%) foi determinado variando-se a concentração do inibidor entre 0 e 200,0  $\mu\text{molL}^{-1}$ . Assumindo o controle como 100% da atividade do radical ABTS<sup>•+</sup>, a porcentagem de inibição antioxidante do complexo foi calculada em comparação ao controle.<sup>82</sup> Foram utilizados como padrões o Trolox e a Vitamina C. Os experimentos foram conduzidos em triplicata e os dados tratados no software GraphPad *Prism* 6.0.

#### 4.6 Ensaios de marcadores bioquímicos no peixe zebra

Devido à pequena quantidade de tecido, as análises bioquímicas foram realizadas com 2 peixes por análise. As amostras (fígado + intestino) foram descongeladas, moídas, pesadas e homogeneizadas na proporção de 1:10 (m/V) em

tampão fosfato 0,10 M e pH 7,0. As amostras de cérebro foram homogeneizadas em tampão fosfato 0,10 molL<sup>-1</sup> e pH 7,5 com auxílio de um micro homogeneizador. Já as amostras das vísceras (fígado + intestino) foram centrifugadas por 30 minutos a 15.000xg a 4°C e as de cérebro, por 20 minutos a 10.000xg a 4°C, obtendo-se assim duas fases. Para as amostras de cérebro determinou-se a atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) e nas vísceras (fígado + intestino) analisou-se a atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione S-transferase (GST), além da lipoperoxidação (LPO).<sup>83,84,85</sup> Em uma microplaca adicionou-se às amostras, o DTNB (5,5–ditio-bis-2-nitrobenzoato) a 0,75 mmolL<sup>-1</sup> e o substrato acetiltiocolina a 10,0 mmolL<sup>-1</sup>.<sup>86</sup> As leituras foram realizadas em 405 nm.

As análises da enzima SOD foram determinadas utilizando-se o método proposto por Gao (1998), o qual baseia-se na capacidade da SOD em inibir a auto-oxidação do pirogalol. Em um microtubo adicionou-se amostra, tampão (Tris-base 1,0 molL<sup>-1</sup> /EDTA 5,0 mmolL<sup>-1</sup> pH 8,0) e pirogalol (15,0 mmolL<sup>-1</sup>) e incubados por 30 min. A reação foi interrompida com HCl 1,0 molL<sup>-1</sup>.<sup>87</sup> A leitura foi realizada em 440 nm.

A atividade da enzima CAT foi avaliada segundo o método proposto por Aebi (1984). Em microplaca adicionou-se as amostras e a solução tampão (Tris–base 1,0 molL<sup>-1</sup> /EDTA 5,0 mmolL<sup>-1</sup> pH 8,0, peróxido de hidrogênio 20,0 mmolL<sup>-1</sup> e água MilliQ).<sup>88</sup> A leitura foi realizada em espectrofotômetro comprimento de onda a 240 nm.

A atividade da enzima GST foi determinada segundo o método proposto por Keen (1976). Em microplaca adicionou-se as amostras e acrescentou-se soluções de [GSH a 3,0 mmolL<sup>-1</sup> e CDNB (1-cloro-2,4-dinitrobenzeno) a 3,0 mmolL<sup>-1</sup>].<sup>89</sup> As leituras foram realizadas em 340 nm.

As análises da LPO foram realizadas através da avaliação da concentração de hidroperóxidos pelo ensaio FOX (Ferrous Oxidation/Xylenol Orange Method), proposto por Jiang (1992). O sobrenadante das amostras foi tratado em metanol na proporção 1:2 (v/v) e centrifugado 10 minutos a 10.000 xg a 4°C. Em seguida, o sobrenadante foi transferido para microtubos e incubado com a solução reação (laranja de xilenol 100,0 µmolL<sup>-1</sup>, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 25,0 mmolL<sup>-1</sup>, BHT 4,0 µmolL<sup>-1</sup>, sulfato ferroso amoniacal 250 µmolL<sup>-1</sup> e metanol 90%) por 30 min. As leituras foram realizadas em 570 nm<sup>90</sup>. A concentração de proteína foi determinada através do método de Bradford (1976) com albumina bovina como padrão<sup>91</sup>. As leituras de AChE, SOD, GST LPO e concentração de proteína foram realizadas em espectrofotômetro de microplaca TECAN A 5082.

#### 4.7 Desativação do estado triplete da riboflavina e inibição do oxigênio singlete

O oxigênio singlete  $^1\text{O}_2$  foi gerado com a exposição da riboflavina em luz monocromática em 436nm<sup>92</sup>. A formação de oxigênio singlete foi monitorada com o 2,2,6,6-tetrametil-4-piperidinol (TEMP) como spin trap e a espectroscopia ressonância paramagnética eletrônica (ESR) para a detecção do radical estável formado pela reação do TEMP com oxigênio singlete, gerando o radical 4-hidroxi-TEMPO.<sup>93,94</sup> Foram preparadas soluções de riboflavina, ácido isovanílico e do Mg-isovanílico em água Milli-Q. O oxigênio singlete foi gerado em 2,0 mL de água destilada contendo TEMP (100 mmolL<sup>-1</sup>) e riboflavina ( $2,0 \times 10^{-5}$  molL<sup>-1</sup>). Foram preparadas amostras de ácido isovanílico e complexo I em diferentes concentrações (20-600 µmolL<sup>-1</sup>).

As amostras foram irradiadas à temperatura ambiente em uma cubeta de quartzo durante 20 min. Os valores de IC<sub>50</sub> foram calculados por regressão não-linear a partir da integração (área relativa) de todos os sinais de EPR do radical em função da concentração estudada.

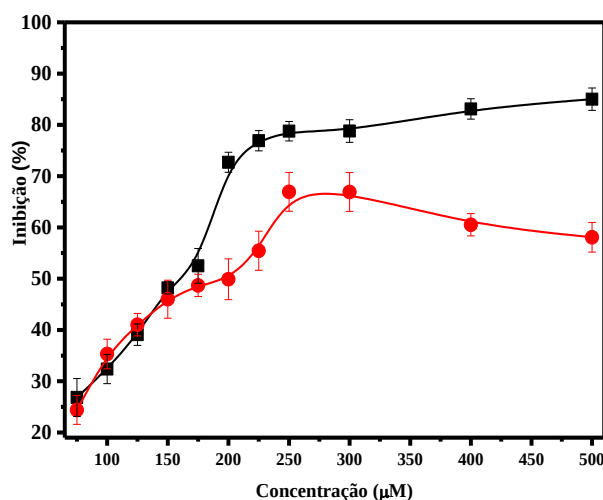
#### 4.8 Análise estatística

Todas as análises foram realizadas em duplicatas ou quintuplicata e foram expressas como média ± DP. As análises foram executadas com o uso dos programas OriginPro2015 e GraphPad Prism 6.01. Todos os testes foram considerados como estatisticamente significantes, quando  $p < 0,05$ .

### 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

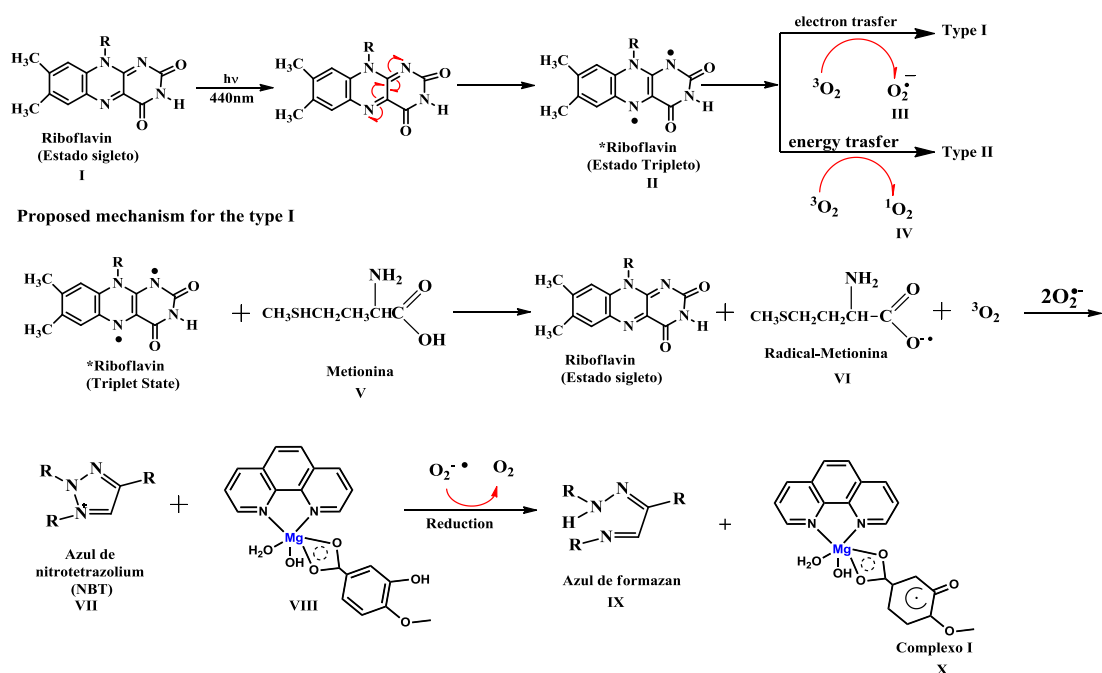
O processo de inibição radicalar via SOD possui o papel importante de atuar na defesa contra as espécies reativas do oxigênio (ROS), sendo o radical superóxido catalisado para evitar a formação de espécies mais reativas, como o radical hidroxil (OH<sup>•</sup>), uma vez que este não possui mecanismo de desativação no meio biológico, por conta de sua alta velocidade e tamanho reduzido.<sup>95</sup>

Para o estudo de inibição do radical superóxido o Mg-isovanílico apresentou uma inibição de 85% (IC<sub>50</sub> de  $64,65 \pm 4,67$  µmolL<sup>-1</sup>), contra uma inibição de 58% (IC<sub>50</sub> de  $105,77 \pm 4,50$  µmolL<sup>-1</sup>) obtido para o ácido isovanílico livre (Figura 10).



**Figura 11.** Porcentagem de inibição do radical superóxido utilizando o **Mg-isovanílico** (linha preta) e o ácido isovanílico livre (linha vermelha).

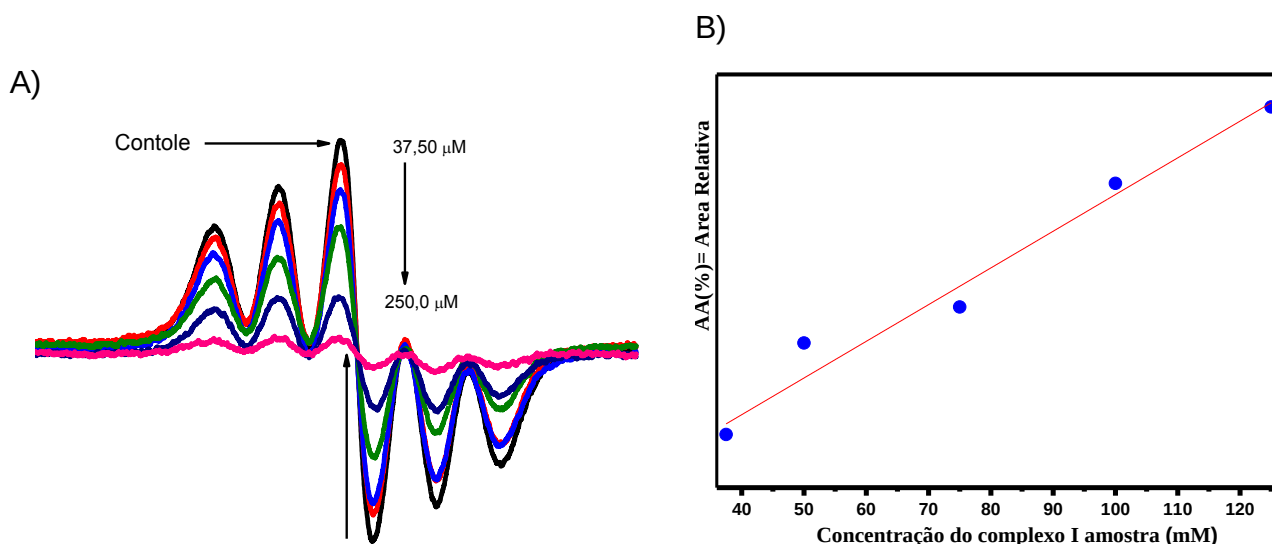
Essa diferença pode estar relacionada a dois fatores: 1) A leve melhora na solubilidade do complexo Mg-isovanílico (314 µg/mL), em relação ao ácido isovanílico livre (240 µg/mL) devido a coordenação do íon isovanilato ao  $Mg^{2+}$ ; 2) A presença do íon  $Mg(II)$  na esfera de coordenação pode estar contribuindo para maior capacidade antioxidante do isovanilato coordenado, uma vez que o magnésio atua na estabilização de ROS em processos de transferência de elétrons e prótons.<sup>96,97,98</sup> É possível observar também uma competição entre o Mg-isovanílico (espécie VIII) e o azul de nitrotetrazolium (espécie VII), (Figura 11), onde o produto proposto em (X), é favorecido em relação ao produto reduzido azul de formazam (espécie IX), o que reforça a hipótese com a presença do íon  $Mg(II)$  na esfera de coordenação.<sup>98</sup>



**Figura 12.** Proposta de Mecanismo 1 - Mecanismo de formação do radical superóxido adaptado de (MORRIS, MAYER; 2017)<sup>101</sup> e desativação utilizando o NBT e o **Mg-isovanílico**.

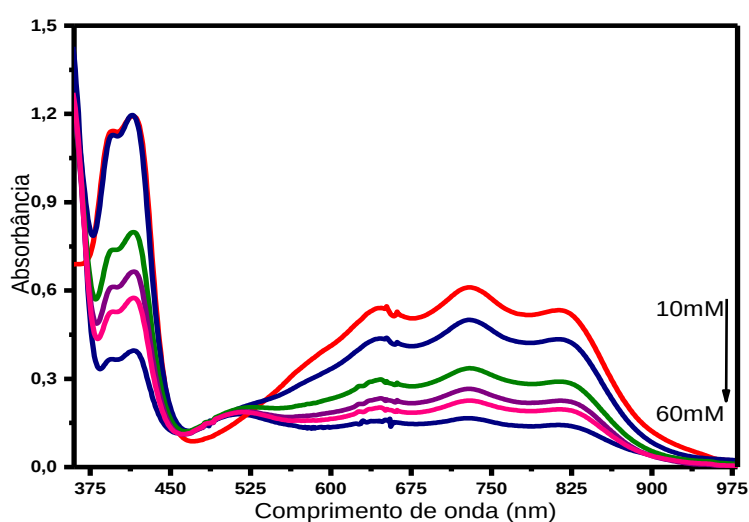
Nos processos de inibição radicalar não enzimático vários polifenóis, tais como a vitamina E (Alfa Tocoferol), Vitamina C (ácido ascórbico) e carotenóides, são fortes inibidores da peroxidação lipídica.<sup>96</sup> Portanto, os resultados antioxidantes obtidos para a inibição das espécies reativas do oxigênio, mostraram um composto estável e com excelente valor de IC<sub>50</sub> para desativação do radical superóxido. Neste contexto, foram realizadas atividades antioxidantes do Mg-isovanílico e do ácido isovanílico livre utilizando o ensaio com a VitB2/MET/NBT para geração do radical O<sub>2</sub><sup>•-</sup>.<sup>96,97</sup>

O radical estável 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH<sup>•</sup>) possui um espectro de EPR característico contendo cinco linhas com constante de acoplamento hiperfino (a<sub>N</sub>) de 9G<sup>96</sup> (Figura 12). Os experimentos da capacidade antioxidante foram realizados em diferentes concentrações do ácido isovanílico livre e do Mg-isovanílico (37.50 a 250 µM). Sendo o IC<sub>50</sub> calculado a partir da regressão linear da dupla integração das intensidades dos sinais (EPR) do radical estável DPPH<sup>•</sup>, utilizando o programa prisma 6.0, obtendo assim, os valores de 94,70 ± 4,12 e 405,0 ± 8,6 µmolL<sup>-1</sup> respectivamente, ou seja, 4 vezes superior ao valor de inibição do ácido isovanílico. Essa diferença pode estar relacionado com a presença do íon Mg(II) na esfera de coordenação, uma vez que este pode estar contribuindo na estabilização do radical nas estruturas de ressonância,<sup>98,99</sup> conforme a figura 11.



**Figura 13.** Inibição do radical estável DPPH<sub>3</sub> com **Mg-isovanílico** utilizando ESR (A), regressão linear para cálculo do IC<sub>50</sub> (B).

O radical estável ABTS<sup>•+</sup> [2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolína-6-sulfonato)] apresenta o espectro de absorção no UV-Vis com máximo de absorção em 734 nm, (Figura 13).<sup>100</sup> O estudo com radical ABTS<sup>•+</sup> foi conduzido por espectroscopia de absorção eletrônica no UV-Vis, a partir da redução do máximo de absorção em 734nm, o qual foi possível calcular os valores de IC<sub>50</sub> para o ácido isovanílico livre e Mg-isovanílico. Foram utilizados como padrões (controle positivo) o trolox e ácido ascórbico.<sup>96</sup>



**Figura 14.** Espectro de absorção do radical estável ABTS<sup>•+</sup> na presença de diferentes concentrações do **Mg-isovanílico**.

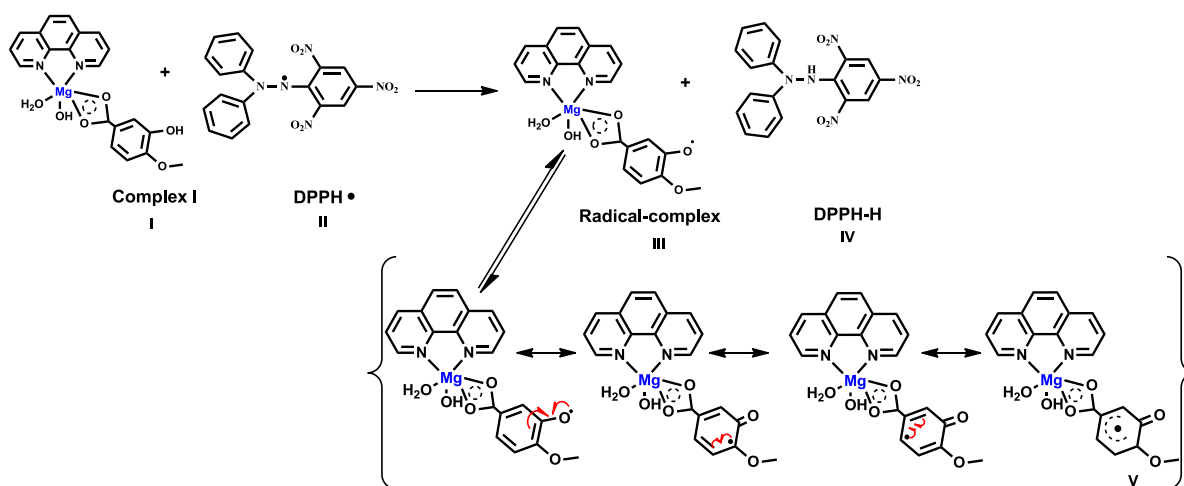
O Mg-isovanílico apresentou um IC<sub>50</sub> de 37,15 μmolL<sup>-1</sup> contra 81,78 μmolL<sup>-1</sup> do ácido isovanílico livre, uma excelente capacidade antioxidante de inibição do radical ABTS<sup>•+</sup> em comparação aos padrões Trolox e Ácido ascórbico (Tabela 1).

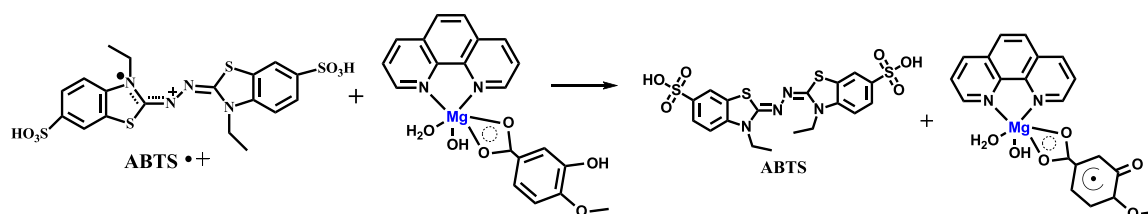


**Tabela 1.** Valores de IC<sub>50</sub> para inibição do radical estável ABTS<sup>•+</sup>

| Compostos               | IC <sub>50</sub> (μmolL <sup>-1</sup> ) |
|-------------------------|-----------------------------------------|
| Mg-isovanílico          | 37,15                                   |
| Ácido isovanílico livre | 81,78                                   |
| Trolox                  | 17,92                                   |
| Ácido ascórbico         | 18,24                                   |

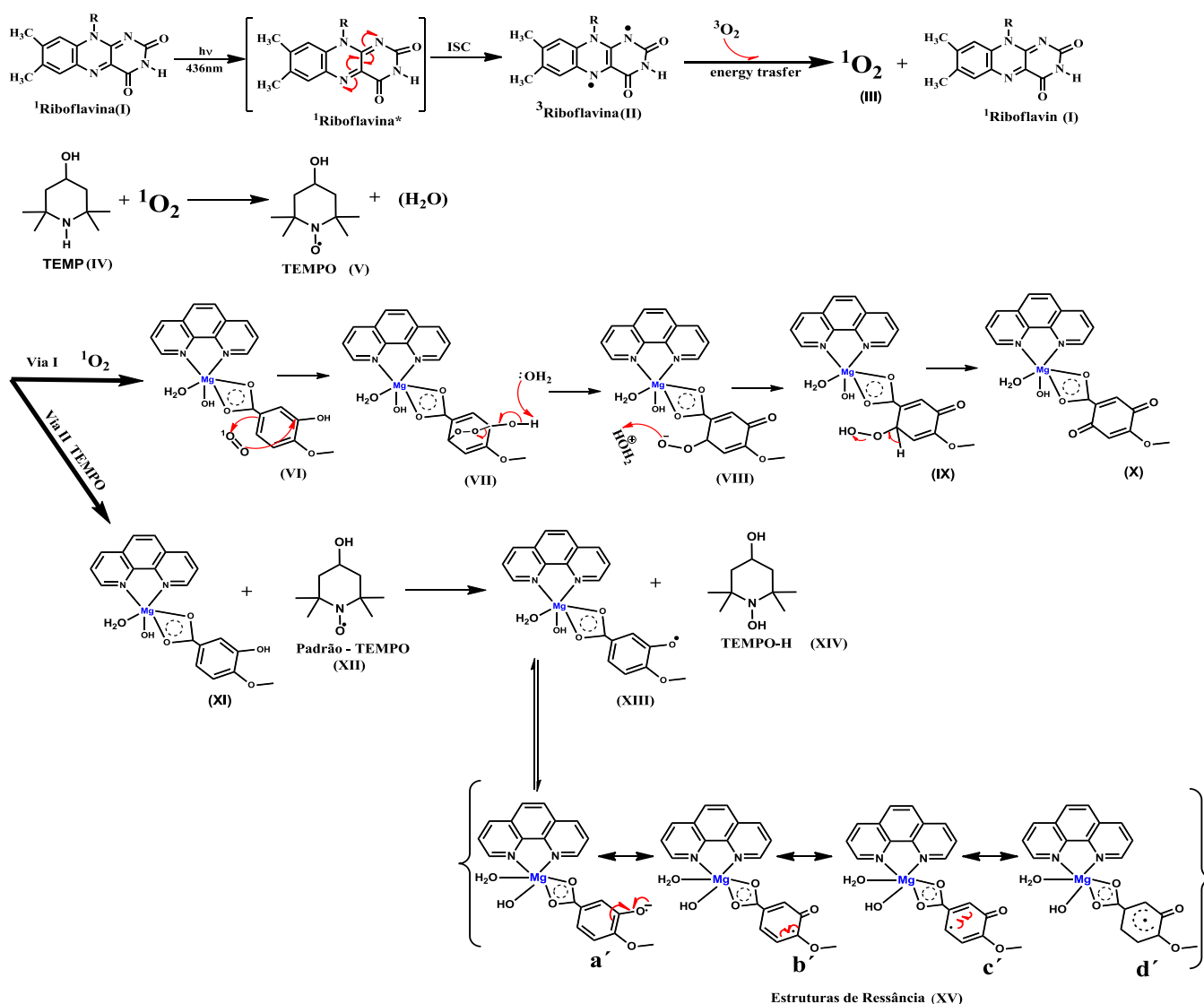
É possível verificar uma diferença na inibição dos radicais DPPH<sup>•</sup> e ABTS<sup>•+</sup>, embora ambos são inibidos por processos de transferência de prótons, conforme as figuras 14 e 15, respectivamente.<sup>96,97</sup> Esta diferença pode estar relacionada ao impedimento estérico destes radicais (DPPH<sup>•</sup> e ABTS<sup>•+</sup>), uma que estudos recentes demonstram as limitações do estudo da capacidade antioxidante do radical estável DPPH<sup>•</sup> quando utilizado na avaliação da capacidade antioxidante de moléculas grandes,<sup>96,97</sup> deixando o experimento limitado, fazendo-se necessário o uso concomitante do radical estável ABTS<sup>•+</sup>.

**Figura 15.** Proposta de Mecanismo 2 - Proposta de mecanismo de inibição do radical estável DPPH<sup>•</sup> via transferência de próton.



**Figura 16.** Proposta de Mecanismo 3 - Mecanismo de inibição do radical estável  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  via processo de transferência de próton.

A desativação do  $^1\text{O}_2$  pelo complexo e pelo ácido isovanílico livre foi avaliada por EPR usando o sequestrador de oxigênio singleto 2,2,6,6-tetrametil-4-iperidinol (TEMP) para identificação do radical TEMPO formado, (*espécie V*), (Figura 16). Neste experimento obteve-se os valores de  $\text{IC}_{50}$  de  $129 \pm 3$  para o complexo e  $360 \pm 9 \mu\text{molL}^{-1}$  para o ácido isovanílico livre.

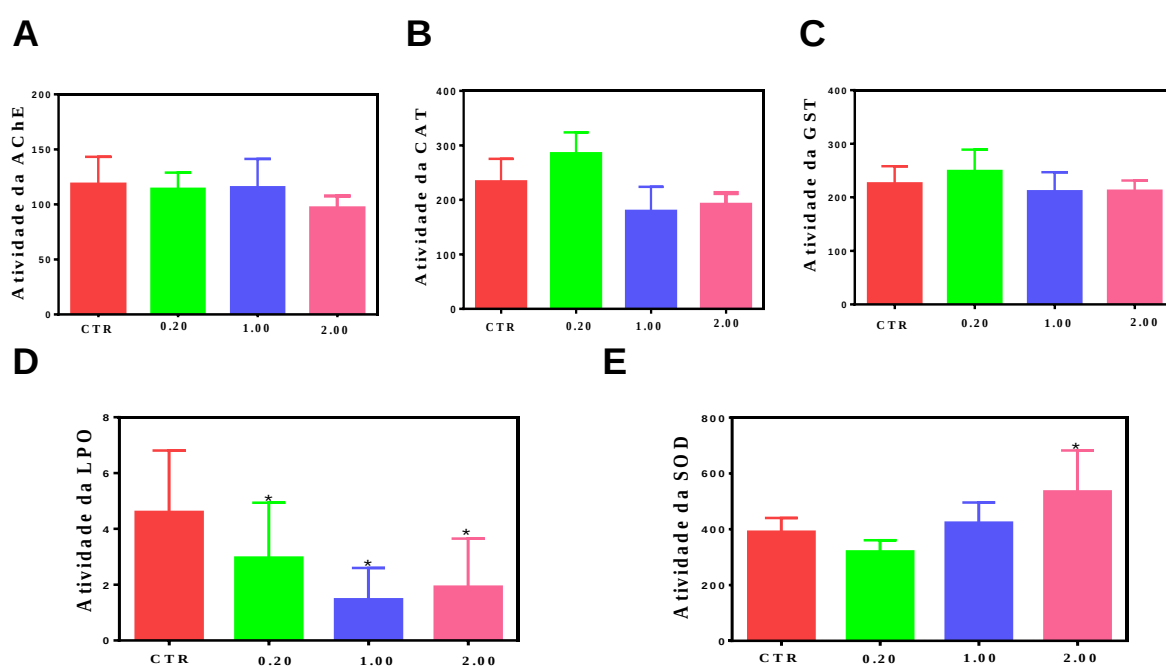


**Figura 17.** Proposta de Mecanismo 4 - Proposta de mecanismo para a inibição do oxigênio singleto e do radical TEMPOL usando o Mg-isovanílico.

Os valores de IC<sub>50</sub> obtidos para inibição do radical TEMPO pelo ligante ácido isovanílico livre e complexo foram de  $1391 \pm 9$  e  $1200 \pm 12 \mu\text{molL}^{-1}$  respectivamente, mostrando que o ácido isovanílico e o complexo não conseguem inibir o radical estável TEMPO, uma vez que este possui alta estabilidade.<sup>96</sup> Esses resultados mostram que a desativação do  $^1\text{O}_2$  ocorre via processo de oxidação conforme o mecanismo proposto na *Via de síntese I* (Figura 16), com formação de endoperóxidos (VII) e produto estável benzoquinona (*espécie X*).<sup>96,97</sup>

Foi analisado também o efeito do Mg-isovanílico sobre a atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) no cérebro e da enzima catalase (CAT) e glutathione-S-transferase (GST) no trato digestivo (intestino e fígado).<sup>96,97</sup> Na figura 16, A, B, C mostra que a exposição do peixe Zebrafish ao Mg-isovanílico não afetou a atividade da enzima AChE no cérebro, um dos biomarcadores utilizados para monitorar alterações de comportamentais quando o peixe é submetido à condição de estresse ou agente toxicológico<sup>96</sup>.

As enzimas CAT e GST não tiveram alterações em suas atividades no aparelho digestivo. Em contraste, a presença do Mg-isovanílico, mostra uma redução significativa na peroxidação lipídica, acompanhada por um aumento na atividade da SOD em comparação com o grupo controle, (Figura 16 D e E). Indicando que o Mg-isovanílico, além de não apresentar toxicidade, pode estar atuando como antioxidante, uma vez que em sua presença ocorre a redução da atividade da enzima LPO em todas as concentrações estudadas.



**Figura 18.** Atividades das enzimas acetilcolinesterase no cérebro (AChE) (A), catalase (CAT) e glutathione-S-transferase (GST), (B, C), peroxidação lipídica (LPO) (D) e superóxido dismutase (SOD) (E) no trato digestivo do peixe Zebrafish após 96 h de exposição a diferentes concentrações do complexo I (0,20, 1,00 e 2,00 mgL<sup>-1</sup>) e controle (CTR). Os dados são média ± SE, n = 6-10. Não houve diferença significativa no valor médio em relação ao controle (p < 0,05). A atividade é expressa em µmol/min/mg de proteína. \* = diferença significativa.

A enzima SOD possui o papel importante de atuar na defesa contra as ROS, sendo o radical superóxido catalisado para evitar a formação de espécies mais reativas, como o radical hidroxil (OH<sup>•</sup>).<sup>96</sup> Assim, o aumento da atividade antioxidante da SOD no estriado, sugere que o complexo I pode estar atuando como um eliminador do radical superóxido O<sub>2</sub><sup>•-</sup>.<sup>97</sup>

Esses resultados mostram que a redução da LPO no peixe zebrafish pode estar relacionada com a atividade antioxidante do Mg-isovanílico, uma vez que este atua diretamente na inibição das espécies reativas de oxigênio.

:

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esta pesquisa trouxe uma contribuição para o conhecimento bioinorgânico ao examinar o efeito inibidor do processo oxidativo de complexo metálico antioxidante de magnésio contendo fenólicos coordenados, tanto *in vitro* como *in vivo*, além de estudar seu efeito toxicológico no peixe zebra.

O complexo apresentou excelente capacidade de inibição do radical ABTS<sup>•+</sup> quando comparado aos padrões e ao isovanilato, mas com diferenças em relação ao radical DPPH<sup>•</sup>. Quanto à inibição do radical superóxido, os resultados obtidos mostraram um composto estável e com excelente valor de IC<sub>50</sub> para desativação do radical. A presença do Mg na esfera de coordenação aumentou a capacidade antioxidante do ácido isovanílico.

Tanto o isovanilato quanto o complexo não foram capazes de inibir o oxigênio singlete devido sua alta estabilidade. Entretanto, a exposição do peixe zebra ao composto mostrou que o complexo não afetou a atividade de enzimas responsáveis por conter o estresse oxidativo, mas reduziu a peroxidação lipídica, demonstrando que não é tóxico e pode atuar como antioxidante no meio aquático.

O estudo demonstrou que o complexo metálico antioxidante de magnésio com fenólicos coordenados (Mg-isovanílico) é capaz de atuar contra o estresse oxidativo tanto *in vivo* como *in vitro*, além de não fornecer nenhum efeito tóxico ao peixe. Contudo, novos estudos ainda precisam ser realizados a fim de esclarecer sua possível atividade frente às doenças neurodegenerativas ocasionadas pelo estresse oxidativo e seu possível uso em humanos.

## REFERÊNCIAS

---

- <sup>1</sup> SIES, H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. **Redox Biology**, n. 4, p. 180–183, 2015.
- <sup>2</sup> FORMAN, H.J.; ZHANG, H. Targeting oxidative stress in disease: promise and limitations of antioxidant therapy. **Nature Reviews Drug Discovery**, n. 20, p. 689 – 709, 2021.
- <sup>3</sup> SIES, H.; BERNDT, C.; JONES, D.P. Oxidative Stress. **Annual Reviews Biochemical**, n. 86, p. 715 – 748, 2017.
- <sup>4</sup> SANTOS, D.B. **Efeitos do probucol sobre a enzima glutathione peroxidase e sua relação com a neuroproteção**. 2012. 96 f. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.
- <sup>5</sup> CHANG, K.H.; CHEN, C.M. The Role of Oxidative Stress in Parkinson's Disease. **Antioxidants**, n. 9, p. 597-628, 2020.
- <sup>6</sup> SAHA, S.K.; et al. Correlation between Oxidative Stress, Nutrition, and Cancer Initiation. **International Journal Molecular Sciences**, n. 18, p. 1544 - 1564, 2017.
- <sup>7</sup> OLA, M.S.; AL-DOSARI, D.; ALHOMIDA, A.S. Role of Oxidative Stress in Diabetic Retinopathy and the Beneficial Effects of Flavonoids. **Current Pharmaceutical Design**, n. 24, p. 2180 - 2187, 2018.
- <sup>8</sup> CONTIGUIBA, G.G.; et al. Método de Avaliação da Defesa Antioxidante: Uma Revisão de Literatura. **UNOPAR Científico de Ciências Biológicas e Saúde**, n. 15, v. 3, p. 231 – 238, 2013.
- <sup>9</sup> YANG, S.J.; et al. Serum magnesium level is associated with type 2 diabetes in women with a history of gestational diabetes mellitus: the Korea National Diabetes Program Study. **Journal of Korean Medical Science**, v. 29, n. 1, p. 84–89, 2014.
- <sup>10</sup> HARPER, C.; LAWRENCE, C. **The laboratory zebrafish**. Boca Raton: CRC Press,

---

2011.

<sup>11</sup> PISOSCHI, A.M.; POP, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, n. 97, p. 55 a 74, 2015.

<sup>12</sup> OLIVEIRA, M.C.; SCHOFFEN, J.P.F. Oxidative stress action in cellular aging. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, n. 6, p. 1333 - 1342, 2010.

<sup>13</sup> VASCONCELOS, T.B.; et al. Radicais Livres e Antioxidantes: Proteção ou Perigo? **UNOPAR Científico de Ciências Biológicas e Saúde**, n. 16, v. 3, p. 213 – 219, 2014.

<sup>14</sup> MARZZOCO, A.; TORRES, B.B. **Bioquímica básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

<sup>15</sup> SANTOS, R. **Desenvolvimento de ferramentas biotecnológicas a partir de recursos naturais para o tratamento da doença de Alzheimer**. 2013. 94 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2013.

<sup>16</sup> AGARWAL, A.; et al. The effects of oxidative stress on female reproduction: a review. **Reproductive Biology and Endocrinology**, n. 10, v. 1, p. 10 – 49, 2012.

<sup>17</sup> GOMES, B.R.B. **Análise da produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio durante a febre e a antipirese em ratos**. 2017. 75 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Molecular) – Universidade de Brasília, Brasília, 2017.

<sup>18</sup> TSANG, A.H.S.; CHUNG, K.K.K. Oxidative and nitrosative stress in Parkinson's disease. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA): Molecular Basis of Disease**, v. 1792, n. 7, p. 643-650, 2009.

<sup>19</sup> ROSALES, M.A.B. **O Estresse Nitrosativo na Patogênese da Retinopatia Diabética. Implicações na Barreira Hemato-Retiniana Externa e Possíveis Alvos Terapêuticos**. 2014. 201 f. Tese (Doutorado em Clínica Médica) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2014.

- 
- <sup>20</sup> TESTON, A.P.; NARDINO, D.; PIVATO, L. Envelhecimento cutâneo: teoria dos radicais livres e tratamentos visando a prevenção e o rejuvenescimento. **UNINGÁ Review**, n. 1, p. 71-84, 2010.
- <sup>21</sup> AMTHOR, F. **Neurociência para leigos**. 2 ed. Rio de Janeiro: Alta Books, 2017. p. 10.
- <sup>22</sup> BORTOLOTTTO, J.W. **Avaliação do sistema purinérgico em modelos de déficit cognitivo e doenças neurodegenerativas em peixe-zebra (*Danio rerio*)**. 2015. 89 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2015.
- <sup>23</sup> TARAWNEH, R.; HOLTMAN, D.M. The Clinical Problem of Symptomatic Alzheimer Disease and Mild Cognitive Impairment. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, n. 2, 2012.
- <sup>24</sup> OZ, M.; PETROIANU, G.; LORKE, D.E.  $\alpha 7$ -Nicotinic Acetylcholine Receptors: New Therapeutic Avenues in Alzheimer's Disease. In: LI, M.D. **Nicotinic Acetylcholine Receptor Technologies**. Springer Science Business Media: New York, 2016.
- <sup>25</sup> RODRIGUEZ, G.A.; et al. Young APOE4 targeted replacement mice exhibit poor spatial learning and memory, with reduced dendritic spine density in the medial entorhinal cortex. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, n. 20, p. 256-266, 2013.
- <sup>26</sup> CHANG, T.Y.; et al. Cellular cholesterol homeostasis and Alzheimer's disease. **Journal of Lipid Research**, v. 58, 2017, p. 2239-2254.
- <sup>27</sup> RIZOR, et al. Astrocytic Oxidative/Nitrosative Stress Contributes to Parkinson's Disease Pathogenesis: The Dual Role of Reactive Astrocytes. **Antioxidants**, n. 8, p. 265-284, 2019.
- <sup>28</sup> DALLEAU; S.; et al. Cell death and diseases related to oxidative stress: 4-hydroxynonenal (HNE) in the balance. *Cell Death and Differentiation*, v. 20, p. 1615–1630, 2013.



- 
- <sup>29</sup> YAN, M.H.; WANG, X.; ZHU, X. Mitochondrial defects and oxidative stress in Alzheimer disease and Parkinson disease. **Free Radical Biology and Medicine**, n. 62, p. 90–101, 2013.
- <sup>30</sup> DIAS, V.; JUNN, E.; MOURADIAN, M.M. The Role of Oxidative Stress in Parkinson's Disease. **Journal of Parkinson's Disease**, n. 3, p. 461–491, 2013.
- <sup>31</sup> SUNG, H.S.; et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **Cancer Journal of Clinicians**, v. 71, n.3, p. 209–249, 2021.
- <sup>32</sup> SAJADIMAJD, S.; KHAZAEI, M. Oxidative Stress and Cancer: The Role of Nrf2. **Current Cancer Drug Targets**, v. 18, p. 538-557, 2018.
- <sup>33</sup> MA, Q. Role of Nrf2 in Oxidative Stress and Toxicity. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, n. 53, p.401–426, 2013.
- <sup>34</sup> MARTINEZ-USEROS, J.; et al. Oxidative Stress: A New Target for Pancreatic Cancer Prognosis and Treatment. **Journal of Clinical Medicine**, v. 6, p. 29-45, 2017.
- <sup>35</sup> LIN, Y.; et al. Cancer and ER stress: Mutual crosstalk between autophagy, oxidative stress and inflammatory response. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 118, 10f., 2019.
- <sup>36</sup> CHATTERJEE, S.; KHUNTI, K.; DAVIES, M.J. Type 2 diabetes. **Lancet**, v. 389, p. 2239–2251, 2017.
- <sup>37</sup> MATOUGH, F.A.; et al. The Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Diabetic Complications. **Sultan Qaboos University Medical Journal**, v. 12, n. 1, p. 5-18, 2012.
- <sup>38</sup> OLA, M.S.; AL-DOSARI, D.; ALHOMIDA, A.S. Role of Oxidative Stress in Diabetic Retinopathy and the Beneficial Effects of Flavonoids. **Current Pharmaceutical Design**, v. 24, p. 2180-2187, 2018.

- 
- <sup>39</sup> SHAKEEL, M. Recent advances in understanding the role of oxidative stress in diabetic neuropathy. **Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews**, v. 9, n. 4, p. 373-378, 2014.
- <sup>40</sup> PEREIRA, M.B. **Síntese, análise estrutural e avaliação da atividade catalítica mimética da superóxido dismutase e peroxidases de complexos derivados do piridoxal e cobre**. 2016. 182f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2016.
- <sup>41</sup> IGHODARO, O.M.; AKINLOYE, O.A. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. **Alexandria Journal of Medicine**, v. 54, n. 4, p. 287-293, 2018.
- <sup>42</sup> CARLSON, B.A.; et al. Glutathione peroxidase 4 and vitamin E cooperatively prevent hepatocellular degeneration. **Redox Biology**, v. 9, p. 22–31, 2016.
- <sup>43</sup> WIRTH, T. Small Organoselenium Compounds: More than just Glutathione Peroxidase Mimics. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 54, p. 10074 – 10076, 2015.
- <sup>44</sup> REBOUÇAS, A.S. **Efeito da suplementação com 800 ui de alfa-tocoferol no soro e leite de mulheres lactantes**. 2019. 88f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN, 2019.
- <sup>45</sup> LANCHÁ JR., A.H.; PEREIRA-LANCHÁ, L.O. **Nutrição e metabolismo aplicados à prática motora**. 2 ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2012. p. 159.
- <sup>46</sup> DU, J.; CULLEN, J.J.; BUETTNER, G.R. Ascorbic acid: Chemistry, biology and the treatment of cancer. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1826, p. 443–457, 2012.
- <sup>47</sup> SMIRNOFF, N. Ascorbic acid metabolism and functions: A comparison of plants and mammals. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 122, p. 116–129, 2018.

- 
- <sup>48</sup> ZAIDUN, N.H.; THENT, Z.C.; LATIFF, A.A. Combating oxidative stress disorders with citrus flavonoid: Naringenin. **Life Sciences**, v. 208, p. 111–122, 2018.
- <sup>49</sup> MISHARINA, T.A.; YEROKHIN, V.N.; FATKULLINA, L.D. Effects of low doses of savory essential oil dietary supplementation on lifetime and the fatty acid composition of the ageing mice tissues. In: KUTCHIN, A.V.; SHISHKINA, L.N.; WEISFELD, L.I. **Chemistry and Technology of Plant Substances: chemical and biochemical aspects**. Apple Academic Press Incorporation: Oakville, 2017.
- <sup>50</sup> OKOH, S.O.; et al. Bactericidal and antioxidant properties of essential oils from the fruits *Dennettia tripetala* G. Baker. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, v. 16, p. 486-498, 2016.
- <sup>51</sup> SAMSONOWICZ, M.; REGULSKA, E.; KALINOWSKA, M. Hydroxyflavone metal complexes - molecular structure, antioxidant activity and biological effects. **Chemico-Biological Interactions**, v. 273, n. 16, p. 245-256.
- <sup>52</sup> SHISHKINA, L.N.; et al. Inhibitory Efficiency of the Plant Cell Components in the Model Oxidative Processes. In: SHISHKINA, L.N.; GOLOSHCHAPOV, A.N.; WEISFELD, L.I. **Antioxidants in systems of varying complexity: chemical, biochemical and biological aspects**. Apple Academic Press Incorporation: Oakville, 2020.
- <sup>53</sup> PANHWAR, Q.K.; MEMON, S. Synthesis, characterisation, and antioxidant study of Cr(III)–rutin complex. **Chemical Papers**, v. 68, n. 5, p. 614–623, 2014.
- <sup>54</sup> KUMAR, S.; PANDEY, A. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. **The Scientific World Journal**, v. 13, 16f., 2013.
- <sup>55</sup> KASPRZAK, M.M.; ERXLEBEN, A.; OCHOCKI, J. Properties and applications of flavonoid metal complexes. **RSC Advances**, v. 5, n. 5, p. 28-51, 2015.
- <sup>56</sup> JOHNNEN-DECHENT, W.; KETTELER, M. Magnesium basics. **Clinical Kidney Journal**, v. 5, n. 1, p. 03-14, 2012.

- 
- <sup>57</sup> SILVA, E.S.; et al. Insecticidal and fungicidal activity of a magnesium compound containing isovanillic acid against leaf-cutting ant and its symbiotic fungus. **Química Nova**, v. 44, n. 3, p. 267-271, 2021.
- <sup>58</sup> CASE, D.R.; ZUBIETA, J.; DOYLE, R.P. The Coordination Chemistry of Bio-Relevant Ligands and Their Magnesium Complexes. **Molecules**, v. 25, p. 3172-3195, 2020.
- <sup>59</sup> MARTINI, N.; et al. Tetraacuo-bis-(N,N-dimethylacetamide-O)magnesium(II) chloride dihydrate. An option to improve magnesium effect on phosphatase stimulation and albumin binding. **Journal of Molecular Structure**, v. 1223, 11f., 2021.
- <sup>60</sup> KAROSANIDZEM, T. Magnesium: so underappreciated. *Practical Gastroenterology*, v. 38, n. 1, p. 28-34, 2014.
- <sup>61</sup> MARCHI, R.C.; et al. Synthesis, Characterization, and Low-Toxicity Study of a Magnesium(II) Complex Containing an Isovanillate Group. **ACS Omega**, v. 5, p. 3504–3512, 2020.
- <sup>62</sup> GHOSH, N.; et al. Synthesis, characterization and study of antioxidant activity of quercetin–magnesium complex. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 151, p. 807–813, 2015.
- <sup>63</sup> OKAMURA, T.; FURUYA, R.; ONITSUKA, K. Synthesis and structures of soluble magnesium and zinc carboxylates containing intramolecular NH...O hydrogen bonds in nonpolar solvents. **Dalton Transactions**, v. 44, n. 16, p. 7512-7523, 2015.
- <sup>64</sup> OKAMURA, T.; et al. Systematic Investigation of Relationship between Strength of NH...S Hydrogen Bond and Reactivity of Molybdoenzyme Models. *Inorganic Chemistry*, v. 52, p. 381–394, 2013.
- <sup>65</sup> OKAMURA, T.; FURUYA, R.; ONITSUKA, K. Regulation of the Hydrolytic Activity of Mg<sup>2+</sup> Dependent Phosphatase Models by Intramolecular NH...O Hydrogen Bonds. *Journal of the American Chemical Society*, v. 136, p. 14639–14641, 2014.

- 
- <sup>66</sup> OLIVEIRA, R. M. M.; et al. Structural effects on the hesperidin properties obtained by chelation to magnesium complexes. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 129, p. 35–42, 2013.
- <sup>67</sup> YAN, Z.; et al. Long-term effects of antibiotics, norfloxacin, and sulfamethoxazole, in a partial life-cycle study with zebrafish (*Danio rerio*): effects on growth, development, and reproduction. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, p. 18222–18228, 2016.
- <sup>68</sup> VALENTIM, A.M.; et al. Euthanizing zebrafish legally in Europe. **EMBO Reports**, v. 17, n. 12, p. 1688-1689, 2016.
- <sup>69</sup> HOLTZMAN, N. G.; et al. Learning to fish with genetics: A primer on the vertebrate model *Danio rerio*. **Genetics**, v. 203, n. 3, p. 1069–1089, 2016.
- <sup>70</sup> PEREIRA, A.C.; et al. The zebrafish embryotoxicity test (ZET) for nanotoxicity assessment: from morphological to molecular approach. **Environmental Pollution**, v. 252, p. 1841-1853, 2019.
- <sup>71</sup> STEWART, A.M.; et al. Zebrafish models for translational neuroscience research: from tank to bedside. **Trends in Neurosciences**, v. 37, n. 5, 2014.
- <sup>72</sup> RIBAS, L.; PIFERRER, F. The zebrafish (*Danio rerio*) as a model organism, with emphasis on applications for finfish aquaculture research. **Reviews in Aquaculture**, v. 6, n.4, p. 209–240, 2014.
- <sup>73</sup> STOSKOPF, M.K. **Fish Medicine**. 2 ed, v. 1, p. 21-64. ART Sciences: Apex, 2010.
- <sup>74</sup> SANDERS, G.E. Zebrafish in Biomedical Research: Head and Body: Anatomy. In: CARTNER, S.C.; et al. **The Zebrafish in Biomedical Research: biology, husbandry, diseases and research applications**. Academic Press: Londres, 2020
- <sup>75</sup> JONZ, M.G. Respiratory System. In: CARTNER, S.C.; et al. **The Zebrafish in Biomedical Research: biology, husbandry, diseases and research applications**. Academic Press: Londres, 2020

---

<sup>76</sup> SIEGFRIED, K.R.; DRAPER, B.W. The Reproductive System. In: CARTNER, S.C.; et al. **The Zebrafish in Biomedical Research: biology, husbandry, diseases and research applications**. Academic Press: Londres, 2020

<sup>77</sup> KASLIN, J.; GANZ, J. Zebrafish Nervous Systems. In: CARTNER, S.C.; et al. **The Zebrafish in Biomedical Research: biology, husbandry, diseases and research applications**. Academic Press: Londres, 2020.

<sup>78</sup> KHACHATRYAN, L.; et al. Environmentally Persistent Free Radicals (EPFRs)-2. Are Free Hydroxyl Radicals Generated in Aqueous Solutions? **Environmental Science Technology**, v. 45, p. 8559–8566, 2011.

<sup>79</sup> CARDOSO, D.R.; et al. Riboflavin as a photosensitizer. Effects on human health and food quality. **Food & Function**, v. 3, n. 5, p. 487, 2012.

<sup>80</sup> LÜ, J.M.; et al. Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. **Journal of cellular and molecular medicine**, v. 14, n. 4, p. 840–860, 2010.

<sup>81</sup> POLOVKA, M. **EPR spectroscopy**: A tool to characterize stability and antioxidant properties of foods. v. 45, n. 1, p. 1–11, 2006.

<sup>82</sup> ROBERTA R.E., et al. "Antioxidant Activity Applying an Improved ABTS Radical Cation Decolorization Assay". **Free Radical Biology and Medicine**, 26, p. 1231-1237, 1999.

<sup>83</sup> ELLMAN, G.L., et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, n. 2, p. 88-95, 1961.

<sup>84</sup> BAKER, T.R.; PETERSON, R. E.; HEIDEMAN, W. Using Zebrafish as a Model System for Studying the Transgenerational Effects of Dioxin. **Toxicology Science**, v. 138, n. 2, p. 403–411, 2014.

- 
- <sup>85</sup> GHISI, C.; OLIVEIRA, E.C.; MENDONÇA, T. F.; et al. Chemosphere Integrated biomarker response in cat fi sh *Hypostomus ancistroides* by River , southern Brazil multivariate analysis in the Pirapo. **Chemosphere**, v. 161, p. 69–79, 2016.
- <sup>86</sup> CRISTINA, I.; et al. drug diclofenac in freshwater fi sh *Rhamdia quelen*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 139, p. 291–300, 2017.
- <sup>87</sup> GAO, R., et al. Mechanism of pyrogallol autoxidation and determination of superoxide dismutase enzyme activity. **Bioelectrochemistry and bioenergetics**. v. 45, n. 1, p. 41-45, 1998.
- <sup>88</sup> AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**. v. 105, p. 121-126, 1984.
- <sup>89</sup> KEEN, J.H., HABIG, W. H., JAKOBY, W. B. Mechanism for the several activities of the glutathione S-transferases. **Journal of Biological Chemistry**. v. 251, n. 20, p. 6183-6188, 1976.
- <sup>90</sup> JIANG, Z.Y.; HUNT, J.V.; WOLFF, S.P. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. **Analytical Biochemistry**, v. 202, n. 2, p. 384–389, 1992.
- <sup>91</sup> BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**. v. 72, n. (1-2), p. 248-254, 1976.
- <sup>92</sup> LÜ, J.; LIN, P.H.; YAO, Q. Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems Chen. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**. v. 14, p. 840–860, 2010.
- <sup>93</sup> CHOE, E.; MIN, D.B. Chemistry and Reactions of Reactive Oxygen Species in Foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 46, p. 1–22, 2006.
- <sup>94</sup> SHAHIDI, F. ZHONG, Y. Lipid oxidation and improving the oxidative stability. **Chemical Society Reviews**, v. 39, p. 4067–4079, 2010.

- 
- <sup>95</sup> TORRES, M.A.; et al. Biochemical biomarkers in algae and marine pollution: a review. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 71, p. 1–15, 2008.
- <sup>96</sup> BIRBEN, E.; et al. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. **World Allergy Organization Journal**, v. 5, n. 1, p. 9-19, 2012.
- <sup>97</sup> NIMSE, S.B.; et al. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. **Royal Society of Chemistry Advances**, v. 5, n. 35, p. 27986-28006, 2015.
- <sup>98</sup> XIE, J.; SCHAICH, K.M. Re-evaluation of the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl free radical (DPPH) assay for antioxidant activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 19, p. 4251–4260, 2014.
- <sup>99</sup> RIOR, R.O.L.P. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 1841–1856, 2005.
- <sup>100</sup> ARTS, M.J.T.J.; et al. Antioxidant capacity of reaction products limits the applicability of the Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) assay, **Food and Chemical Toxicology**, v. 42, n. 1, p. 45–49, 2004.
- <sup>101</sup> MORRIS, W.D.; MAYER, J.M. Separating Proton and Electron Transfer Effects in Three-Component Concerted Proton-Coupled Electron Transfer Reactions. **Journal of the American Chemical Society**, v. 139, p. 10312–10319, 2017.