

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Curso de Biotecnologia

Trabalho de Conclusão de Curso



**Azoninas com Se: Atividade Antioxidante, Docagem Molecular e Atividade da
enzima Acetilcolinesterase na Doença de Alzheimer**

Rodolfo da Silva Mazzarini Baldinotti

Pelotas, Rio Grande do Sul, 2016

Rodolfo da Silva Mazzarini Baldinotti

Azoninas com Se: Atividade Antioxidante, Docagem Molecular e Atividade da enzima Acetilcolinesterase na Doença de Alzheimer

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Programa de Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia

Orientador(a): Lucielli Savegnago

Pelotas, Rio Grande do Sul, 2016

Dados de catalogação na fonte:
Ubirajara Buddin Cruz – CRB-10/901
Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

B177a Baldinotti, Rodolfo da Silva Mazzarini
 Azoninas com SE : atividade antioxidante, docagem molecular e
 atividade da enzima acetilcolinesterase na doença de Alzheimer / Rodolfo
 da Silva Mazzarini Baldinotti. – 44f. : il. – Trabalho de conclusão de curso
 (Graduação em Biotecnologia). Universidade Federal de Pelotas. Centro
 de Desenvolvimento Tecnológico. Pelotas, 2017. – Orientadora Lucielli
 Savegnago.

1.Biotecnologia. 2.Selênio. 3.Doença de Alzheimer. 4.Estresse
oxidativo. 5.Azoninas. I.Savegnago, Lucielli. II.Título.

CDD: 616.8311061

**Trabalho de Conclusão de Curso aprovado, como requisito parcial, para
obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia, Programa de Graduação em
Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas.**

Data da Defesa:

Banca examinadora:

Prof. Dra. Lucielli Savegnago (Orientador)
Doutora em Ciências Biológicas (Bioquímica Toxicológica) pela Universidade Federal de Santa Maria

Dra. Lucimar Marques Pinto Brod
Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Tiago Collares
Doutor em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Mestre Suelly Bampi
Mestre em Nutrição e Alimentos pela Universidade Federal de Pelotas

Rodolfo da Silva Mazzarini Baldinotti



*Dedico este trabalho aos meus pais,
Maria Elaine e Sergio, à minha irmã, Heloísa, e
a todos os familiares que acreditaram
e investiram no meu crescimento.*

Agradecimentos

Gostaria de agradecer primeiramente aos meus familiares, em especial aos meus pais, Sergio e Maria Elaine, e minha irmã, Heloísa. Aos meus pais por toda a dedicação e cuidado, desde as primeiras etapas de estudo até a aprovação para iniciar o curso na universidade. Além disso, foram eles que incentivaram e ajudaram a buscar a faculdade mesmo que longe de casa, em outros estados. Ainda foram eles que ensinaram a ter dedicação a tudo que for realizar na vida: “se for fazer algo, que faça o melhor possível”, assim me incentivando a fazer o melhor durante o período de estudo.

Além deles, tenho muito a agradecer pela minha irmã, por todo carinho, também incentivo e pelas conversas, desde conversas de apoio até aqueles que riamos bastante. Enfim, minha família é a minha base da vida, tanto como um alicerce quanto como base de caráter e princípios.

Além da família é necessário agradecer a todas as amizades feitas ao longo do curso e antigas amizades que sempre ajudaram a superar obstáculos e trazer felicidade em momentos não esperados.

Primeiro gostaria de agradecer aos amigos feitos no pensionato onde morei ao longo do curso, como um segunda grande família, entre eles Amanda, Alexandre, Elton, Heron, Nathaniel, a dona mãezona de todos, Viviane, além alguns outros moradores. Além dos moradores do pensionato, gostaria de agradecer a grande família formada em Bergen, durante o Ciência Sem Fronteiras, que proporcionaram um período incrível da minha vida, sendo alguns deles Camena, Pedro, Rachel, Luciana, Patrícia, Bruna, Carolina, Igor, Débora, Guilherme, Saul, Ivan, Yago, além de outros também. Foram eles que me ajudaram a crescer e moldar quem eu sou hoje, além de toda a convivência com suas complicações, diversão, enfim, um período que foi muito bom e importante.

Além destes, os amigos feitos no curso e na universidade também foram muito importantes. Dentre eles os membros da “Diretoria”, que proporcionaram bastante diversão e boa parte da convivência também. Ainda tenho a agradecer a minha “terceira família”, os integrantes do Grupo de Pesquisa em Neurobiotecnologia (GPN), que me ensinaram muito, ajudaram em várias dificuldades, e me trouxeram grandes oportunidades, além de grande parte da convivência, em especial no último semestre, aonde convivemos grande parte do tempo. Gostaria de agradecer pela oportunidade e aprendizado, além de toda a orientação pelas professoras Ethel e Lucielli. E especial para algumas pessoas do grupo pela ajuda, puxar a orelha e fazer me empenhar bastante, risadas e trabalho também, Mariana F., Angela, Lucimar, Fernanda, Roberta, Débora, Mariana G., Suelly B., porém todas tiveram grande importância neste processo.

Vale agradecer também a todos os professores do curso, os quais me transmitiram muito conhecimento e possibilitaram este momento.

Assim, agradeço por todo este período universitário, aonde pude crescer e conhecer diferentes pessoas, que tiveram grande influência na minha vida, enfim, um período que vai trazer saudades.

Resumo

BALDINOTTI, Rodolfo. Azoninas com Se: Atividade Antioxidante, Docagem Molecular e Atividade da enzima Acetilcolinesterase na Doença de Alzheimer.

2016. 44f. Trabalho de Conclusão de Curso - Curso de Bacharelado em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

A Doença de Alzheimer é a maior causa de demência em idosos, acompanhada de déficit cognitivo e perda da memória, acarretando uma série de prejuízos socioeconômicos. Atualmente, sua fisiopatologia não é completamente elucidada, porém sabe-se que é caracterizada pela neurodegeneração. Além disso, estudos apontam o envolvimento do estresse oxidativo e uma redução da concentração da acetilcolina na fenda sináptica. O atual tratamento para esta patologia é realizado através de inibidores da acetilcolinesterase (anticolinesterásicos) e bloqueadores de receptores glutamatérgicos os quais possuem curta duração e baixa eficiência. Neste cenário, os compostos orgânicos de selênio e as azoninas vêm apresentando diversas propriedades farmacológicas interessantes. Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar o potencial dos compostos 1-Fenil-15H-dibenzo[d,h][1,2,3]triazol[1,5-a][1,3,6]triazonina (FDTT) e 1-((fenilselenil)metil)-15H-dibenzo[d,h][1,2,3]triazol[1,5-a][1,3,6]triazonina (FSeMDTT), frente ao estresse oxidativo (EO) *in vitro* e atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE). A atividade antioxidante foi avaliada através dos ensaios da neutralização dos radicais 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) e 2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS), hidroxil (OH[•]), redução do íon férrico (FRAP), atividade quelante do íon ferroso, atividade mimética da enzima superóxido dismutase (SOD), ensaio das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e das espécies reativas (ER). Além disso, foi realizada a docagem molecular para avaliar a interação dos compostos com a enzima acetilcolinesterase, seguida da avaliação da atividade cinética desta enzima *in vitro*. A partir destes ensaios foi possível observar que, os compostos apresentaram resultados positivos nos ensaios de TBARS e ER. No entanto, não apresentaram resultados estatisticamente significativos nos demais ensaios antioxidantes. O composto FSeMDTT apresentou um efeito significativo estatisticamente em todas as concentrações testadas (10 - 250 µM), em córtex e hipocampo no ensaio TBARS. Isto se repetiu apenas no córtex no ensaio das ER, enquanto que no hipocampo somente na concentração de 250 µM. O composto FDTT se mostrou eficiente no ensaio ER, em todas as concentrações em córtex e hipocampo, entretanto no TBARS mostrou efeito somente em hipocampo nas concentrações de 100 e 250 µM. Quanto a inibição da enzima acetilcolinesterase, o composto FSeMDTT apresentou efeito inibitório na atividade desta enzima no hipocampo. Desse modo, confirmou o resultado prévio obtido pela Docagem Molecular (DM), o que indica afinidade do composto pela enzima AChE. Levando em conta estes resultados, pode-se concluir que, ambos os compostos apresentaram atividade antioxidante *in vitro*, porém mais estudos são necessários para melhor avaliar o potencial dos presentes compostos.

Palavras Chave: selênio; doença de Alzheimer; estresse oxidativo; azoninas.

Abstract

BALDINOTTI, Rodolfo. Azonines with Se: Antioxidant Activity, Molecular Docking and Acetylcholinesterase enzyme activity. 2016. 44f. Trabalho de Conclusão de Curso - Curso de Bacharelado em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Alzheimer's disease is the major cause of dementia in the elderly, followed by cognitive deficit and loss of memory, causing a series of socioeconomic losses. Currently, its pathophysiology is not completely elucidated, but it is known to be characterized by neurodegeneration. In addition, studies indicate the involvement of oxidative stress and a reduction of acetylcholine concentration in the synaptic gap. The current treatment for this pathology is accomplished through acetylcholinesterase inhibitors (anticholinesterases) and glutamatergic receptor blockers which have short duration and low efficiency. In this sense, the organic selenium compounds and the azonines have several interesting pharmacological properties. The aim of the present study was to evaluate the potential of 1-Phenyl-15H-dibenzo [d, h] [1,2,3] triazo [1,5-a] [1,3,6] triazonine compounds (FDTT) and 1 - ((phenylselenyl) methyl) -15H-dibenzo [d, h] [1,2,3] triazo [1,5-a] [1,3,6] triazonine (FSeMDTT), in the Oxidative (EO) *in vitro* and acetylcholinesterase (AChE) activity. The antioxidant activity was evaluated by neutralizing the 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH) and 2,2-azinobis- (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS), hydroxyl (OH[•]) Ferric ion reduction (FRAP), ferrous ion chelating activity, mimetic activity of the enzyme superoxide dismutase (SOD), thiobarbituric acid reactive species (TBARS) and reactive species (ER) assays. In addition, molecular docking was performed to evaluate the interaction of the compounds with the enzyme acetylcholinesterase, followed by the evaluation of the kinetic activity of this enzyme *in vitro*. From these tests it was possible to observe that the compounds showed positive results in the TBARS and ER assays. However, they did not present statistically significant results in the other antioxidant trials. FSeMDTT compound had a statistically significant effect at all concentrations tested (10 - 250 μ M) in cortex and hippocampus in the TBARS assay. This was repeated only in the cortex in the ER assay, whereas in the hippocampus only at the concentration of 250 μ M. The FDTT compound proved to be efficient in the ER assay at all concentrations in the cortex and hippocampus, but in TBARS it showed effect only in the hippocampus at concentrations of 100 and 250 μ M. Regarding the inhibition of the acetylcholinesterase enzyme, the FSeMDTT compound showed an inhibitory effect on the activity of this enzyme in the hippocampus. Thus, it confirmed the previous result obtained by the Molecular Docking (DM), which indicates affinity of the compound for the enzyme AChE. Taking into account these results, it can be concluded that both compounds presented antioxidant activity *in vitro*, however, more studies are needed to better evaluate the potential of the present compounds.

Key words: organic selenium compound; Alzheimer's disease; oxidative stress; azonines;

Lista de Figuras

- Figura 1 Representação do EO.
- Figura 2 Esquema da correlação das diferentes hipóteses da DA
- Figura 3 Hipótese colinérgica na DA.
- Figura 4 Hipótese colinérgica e seu tratamento.
- Figura 5 Estruturas química de compostos orgânicos de selênio.
Estrutura química dos compostos FDDT e FSeMDTT.
- Figura 6
- Figura 7 Ensaio da Atividade neutralizadora do Radical DPPH.
- Figura 8 Ensaio da Atividade neutralizadora do Radical ABTS.
- Figura 9 Ensaio FRAP.
- Figura 10 Ensaio da Capacidade de Neutralização do Radical Hidroxil.
- Figura 11 Ensaio da Capacidade Quelante do Íon Ferroso.
- Figura 12 Auto-oxidação do pirogallol e ensaio da Atividade mimética da enzima SOD
- Figura 13 Representação do ensaio TBARS.
- Figura 14 Ensaio das ER's.
- Figura 15 Esquema da atividade da enzima AChE.
- Figura 16 Melhor conformação do composto FDDT nos sítios CAS e PAS
- Figura 17 Melhor conformação do composto FSeMDTT nos sítios CAS e PAS

Figura 18 Resultados do ensaio TBARS.

Figura 19 Resultados do ensaio ER.

Figura 20 Resultado do ensaio da atividade da enzima AChE.

Lista de Tabelas

Tabela 1 Resultado Docagem Molecular dos compostos FDTT e FSeMDTT nos sítios CAS e PAS da enzima AChE

Lista de Abreviaturas e Siglas

ABTS	2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
A β	Amilóide β
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
ApoE	Apolipoproteína E
ATP	Adenosina trifosfato
BDNF	Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro
CAS	Sítio Ativo Catalítico
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazila
DTNB	5-ditiobis-2-nitrobenzóico
EO	Estresse Oxidativo
ERN	Espécies Reativas de Nitrogênio
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
FRAP	Potencial Redutor do Íon Férrico
GPx	Glutathiona Peroxidase
GSK	Glicogênio Sintase Quinase
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
iAChE	Inibidores da Acetilcolinesterase
NPS	Nitroprussiato de Sódio
O ⁻	Radical Ânion Superóxido
OH [•]	Radical Hidroxil
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAS	Sítio Aniônico Periférico
PPA	Proteína Precursora Amilóide
PS	Presenilina
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Periférico
SOD	Superóxido Dismutase
TBARS	Espécies Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral alfa

Sumário

1. Introdução.....	1
2. Objetivos.....	3
2.1. Objetivo Geral.....	3
2.2. Objetivos Específicos.....	3
3. Revisão Bibliográfica.....	4
3.1. Estresse Oxidativo.....	4
3.2. Doença de Alzheimer.....	5
3.2.1. Teorias envolvidas na Doença de Alzheimer Esporádica.....	6
3.2.1.1. Estresse Oxidativo e a Doença de Alzheimer.....	8
3.2.1.2. Hipótese Colinérgica.....	10
3.2.2. Doença de Alzheimer genética.....	12
3.3. Tratamentos para a Doença de Alzheimer.....	12
3.4. Compostos Orgânicos de Selênio.....	14
3.5 Azoninas.....	15
3.6. Docagem Molecular.....	16
4. Metodologia.....	17
4.1. Compostos.....	17
4.2. Animais.....	17
4.3. Docagem Molecular.....	18
4.4. Ensaio da Atividade Antioxidante.....	18
4.4.1. Atividade neutralizadora do Radical DPPH.....	18
4.4.2. Atividade neutralizadora do Radical ABTS.....	19
4.4.3. Ensaio do Potencial Redutor do Íon Férrico (FRAP)	20
4.4.4. Determinação da Capacidade Sequestrante do Radical	20
Hidroxil (OH [•])	
4.4.5. Capacidade Quelante do Íon Ferroso.....	22
4.4.6. Atividade Mimética da Enzima Superóxido Dismutase.....	22
(SOD) <i>in vitro</i>	
4.4.7. Ensaio das Espécies Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico	23
(TBARS) induzidas por NPS <i>in vitro</i>	
4.4.8. Ensaio das Espécies Reativas (ER)	24
4.4.9. Atividade da enzima Acetilcolinesterase (AChE) Tecidual.....	25

4.4.10. Determinação de Proteínas, método de Bradford.....	26
4.4.11. Análises Estatísticas.....	26
5. Resultados.....	27
5.1. Docagem Molecular.....	27
5.2. Ensaio da Atividade Antioxidante <i>in vitro</i>	30
5.2.7. Ensaio das Espécies Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico.....	30
(TBARS)	
5.2.8. Ensaio das Espécies Reativas (ER)	31
5.2.9. Atividade da enzima Acetilcolinesterase (AChE) Tecidual	32
6. Discussão	34
7. Conclusão e perspectivas	37
8. Referências Bibliográficas	38

1. Introdução

A homeostasia do organismo humano é caracterizada pela presença de um equilíbrio entre moléculas oxidantes e antioxidantes. (EHTERAM et al., 2014). Dentre as pró-oxidantes podem ser citadas as espécies reativas ou radicais livres, sendo estas moléculas instáveis ou que levam a instabilidade de outras biomoléculas no organismo (CUI et al., 2004). Por outro lado, as moléculas antioxidantes são responsáveis pela manutenção deste equilíbrio, sendo responsáveis por neutralizar ou estabilizar as moléculas instáveis (BIRBEN et al., 2012). Assim, essas moléculas possuem o papel de manter um nível fisiológico normal das moléculas pró-oxidantes, estabelecendo um equilíbrio do metabolismo redox celular (LI et al., 2013).

Dessa maneira, diferentes fatores podem levar a um desequilíbrio de moléculas antioxidantes e pró-oxidantes, caracterizando um estado de estresse oxidativo (EO) (VALAVANIDIS et al., 2006). Alguns desses fatores são a exposição a estressores ambientais ou perturbações no equilíbrio fisiológico (doenças, estresse, infecções, entre outros fatores). A partir destes fatores, se estabelece um quadro de EO, o qual vem sendo relacionado a diversas doenças, tanto como marco inicial ou envolvido em sua progressão (VIANELLO et al., 2016). Um exemplo de doenças causadas pelo EO são as neurodegenerativas. Isto pode ser explicado por fatores como o alto consumo de oxigênio (LEBEL et al., 1991) e grande presença de íons metálicos no cérebro (YOU DIM et al., 1988), facilitando o processo de oxidação das biomoléculas. Por esta razão, as doenças que acometem o cérebro estão extremamente ligadas ao EO, como a Doença de Alzheimer (DA).

Além do envolvimento do EO, existem diversas teorias que estão relacionadas a etiologia da DA. Dentre elas, destacam-se a a teoria amiloidogênica, da hiperfosforilação da proteína Tau, cascata mitocondrial, neuroinflamação e astrogliose (KUMAR et al., 2015; CERVELLATI et al., 2016).

De acordo com os fatores apresentados, a DA apresenta-se como uma doença complexa e multifatorial. Além disso, sua fisiopatologia não está completamente elucidada até o presente momento (CERVELLATI et al., 2016). Entretanto, já existem fármacos para o tratamento da DA, como os inibidores da acetilcolinesterase (iAChE) e bloqueadores de receptores glutamatérgicos. Entretanto esses fármacos não são completamente eficazes e possuem curta duração farmacológica (CHIGURUPATI et al., 2016).

Desse modo, a inexistência de fármacos eficazes para o tratamento desta patologia faz com que a busca por novos tratamentos seja de extrema importância. Nesta perspectiva, a atividade inibitória da enzima AChE tem demonstrado ser efetiva no retardo do dano cognitivo (KIM et al., 2014). Associado a esta atividade, antioxidantes também vem se mostrando importantes no retardo da neurodegeneração característica da doença, através do combate ao EO (ALBARRACIN et al., 2013). Acredita-se que essa eficiência está relacionada à modulação desses diferentes parâmetros envolvidos na progressão da doença (ZHELENA-DIMITROVA et al., 2013; ÖZTASKIN et al., 2015).

Neste sentido, os compostos orgânicos de selênio (Se) vêm se mostrando promissores em diversas pesquisas, com diferentes ações farmacológicas interessantes, dentre elas destacam-se: atividade anti-inflamatória, antinociceptiva, antidepressiva, antioxidante e anticancerígena (MEOTTI et al., 2004; SAVEGNAGO et al., 2008; GILL et al., 2010; FREITAS et al., 2011; NOGUEIRA et al., 2011; MISRA et al., 2015; BROD et al., 2016; SOUSA et al., 2016). Além dos compostos orgânicos de selênio, outra classe promissora de compostos são os heterocíclicos, mais especificamente o grupo das azoninas. Essa classe já apresentou efeitos antitumorais e estimulantes do sistema nervoso (THOISON et al., 1994; SUGIMOTO et al., 2013; PACHECO et al., 2014).

Levando em conta as duas classes de compostos promissoras apresentadas, foi utilizado o mecanismo de Docagem Molecular (DM), para avaliar o potencial das moléculas testadas destas classes, previamente ao teste da atividade da enzima AChE. Este método prevê o potencial de interação entre moléculas, neste estudo, dos compostos testados e da enzima AChE.

Assim, devido DA apresentar uma fisiopatologia não completamente elucidada, somada a ineficiência dos tratamentos disponíveis, torna-se evidente a importância de estudar novas moléculas bioativas que possam representar uma alternativa de tratamento para a AD. Dentre essas moléculas, podem ser destacadas as azoninas contendo Se em sua estrutura.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

O objetivo do presente estudo foi avaliar o potencial antioxidante e inibição da enzima acetilcolinesterase, *in vitro* e *in silico* pelos compostos 1-Fenil-15H-dibenzo[d,h][1,2,3]triazol[1,5-a][1,3,6]triazonina (FDTT) e 1-((fenilselenil)metil)-15H-dibenzo[d,h][1,2,3]triazol[1,5-a][1,3,6]triazonina (FSeMDTT), nas estruturas de córtex e hipocampo de camundongos, visando um novo tratamento para a DA.

2.2. Objetivos Específicos

- I. Analisar *in silico* a afinidade dos compostos com os sítios da enzima AChE.
- II. Avaliar o potencial antioxidante dos compostos através de ensaios *in vitro*.
- III. Verificar a capacidade dos compostos em inibir a atividade da enzima AChE.

3. Revisão Bibliográfica

3.1. Estresse Oxidativo

O oxigênio é um elemento essencial para o metabolismo energético, mantendo assim a sobrevivência celular e o funcionamento normal das células em organismos eucarióticos. Além disso, o oxigênio pode apresentar-se em um estado parcialmente reduzido na forma do radical ânion superóxido, uma forma básica de espécie reativa de oxigênio (ERO). Posteriormente, pode vir a gerar outras formas/moléculas que são também consideradas ERO, como o radical hidroxil (OH^\bullet), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), entre outras (CUI et al., 2004). Além das ERO's, o metabolismo celular pode gerar outras espécies reativas, sendo estas formadas a partir do nitrogênio, conhecidas como ERN, também envolvidas em processos fisiológicos quando em concentrações normais (LI et al., 2013).

Além das espécies reativas, se enquadram neste grupo de moléculas reativas e/ou instáveis, os radicais livres. Essas moléculas se caracterizam por apresentar um ou mais elétrons desemparelhados em sua estrutura, o que a torna instável. Porém, em níveis normais, em um organismo eucariótico, apresenta funções fisiológicas importantes para a manutenção e funcionamento do mesmo (WANG et al., 2016).

Sendo assim, essas moléculas instáveis e reativas, necessitam estar em equilíbrio com sistemas de defesa que as estabilize, levando a homeostasia. Como exemplo desses sistemas, podem ser destacadas as defesas antioxidantes, tanto as enzimáticas quanto não enzimáticas (BIRBEN et al., 2012). Fazem parte do sistema de defesa antioxidante enzimático a glutathione peroxidase e redutase, superóxido dismutase e catalase. Quanto ao sistema de defesa não enzimático, alguns exemplos são a glutathione, vitaminas C e E (NIMSE et al., 2015). Além disso, as defesas antioxidantes podem ser classificadas em endógenas e exógenas, produzidas em organismos eucarióticos e adquiridas através da alimentação, respectivamente (JAN et al., 2015).

Embora exista um equilíbrio quando em níveis normais de espécies e/ou moléculas anti e pró-oxidantes, no meio ambiente existem diversas fontes pró-oxidantes, como radiação solar, poluição, dieta, e estilo de vida (LIMÓN-PACHECO et al., 2009). Sendo assim, se faz necessário um nível adequado de antioxidantes para contrapor tal exposição.

Ao longo do envelhecimento e com o desequilíbrio entre moléculas pró e antioxidantes ocorre o processo conhecido como EO (BLAGOSKLONNY et al., 2008). O EO pode levar ao aparecimento de doenças pelo dano causado as biomoléculas do organismo, como proteínas, membranas lipídicas, carboidratos e até mesmo ácidos nucleicos (VALAVANIDIS et al., 2006). O dano a estas biomoléculas pode ocasionar diversas doenças, como o câncer, arteriosclerose, artrite, doenças neurodegenerativas, dentre outras (LI et al., 2013).

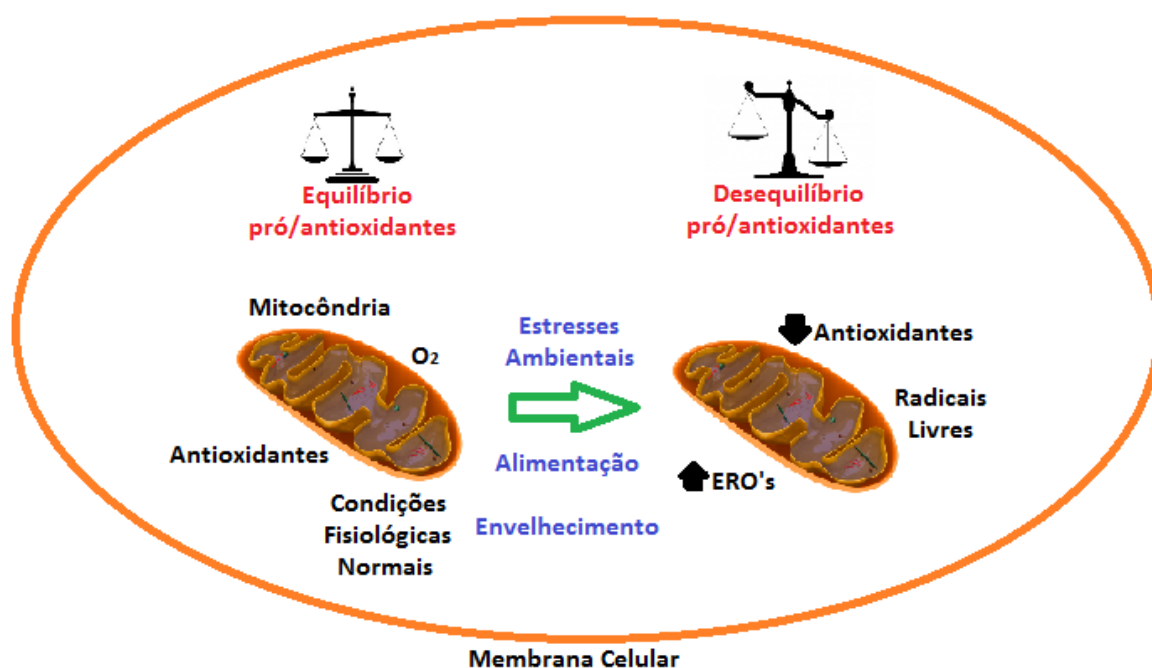


Figura 1. Representação do Estresse Oxidativo. Fonte: Própria.

3.2. Doença de Alzheimer

A DA é a principal causa da demência, e apresenta uma maior prevalência na população de idosos, visto que está associada ao envelhecimento. Isto ocorre, pois, o envelhecimento é caracterizado pela presença do EO, envelhecimento celular e depleção no mecanismo de reparação celular, assim sendo associado a doenças neurodegenerativas, demência e déficit cognitivo (REHMAN et al., 2016). Essa desordem é caracterizada pela degeneração neuronal em determinadas regiões do cérebro, a qual leva a problemas na cognição (como no hipocampo e parte do córtex cerebral), além de alterações no humor (quando afeta a amígdala, córtex pré-frontal e hipotálamo) (TRAMUTOLA et al., 2016).

Por essa razão, a DA representa um impacto socioeconômico negativo tanto a nível mundial quanto nacional. Acredita-se que isso seja o reflexo do envelhecimento populacional, criando uma tendência de crescimento da ocorrência de doenças neurodegenerativas (HUNG et al., 2010). A nível mundial estima-se 35,6 milhões de casos de pacientes com DA, com perspectiva de dobrar em 2030, segundo a OMS, 2013. Enquanto que, a nível nacional, estimam-se 500 mil de pacientes com DA. Desse modo, ocorre um aumento com o gasto nos cuidados e grande impacto social (ILHA et al., 2014). O impacto econômico, segundo a OMS, alcança 604 bilhões de dólares por ano com pessoas que apresentam quadro de demência.

Quanto à fisiopatologia da doença, existem diferentes hipóteses sobre sua possível causa, embora ainda não se saiba como acontece sua progressão. Além disso, é necessária maior compreensão da patologia da DA, visto que seu caráter multifatorial dificulta a busca por uma cura ou mesmo novo tratamento (CERVELLATI et al., 2016).

3.2.1 Teorias envolvidas na Doença de Alzheimer Esporádica

Uma das principais teorias para explicar a DA é a teoria amilóide, onde há a presença de placas senis no cérebro formadas pela clivagem da proteína precursora amilóide (PPA). Esta proteína parece estar associada à neuroproteção, regulação de crescimento celular e interação célula-célula (STOREY et al., 1999). No metabolismo amiloidogênico, é clivada através da enzima γ e β -secretase presentes na membrana celular (GHISO et al., 2002). Inicialmente a PPA é clivada pela enzima β -secretase, seguida da clivagem pela γ -secretase. O principal produto formado é o peptídeo $A\beta$, que possui tamanho de 4.2 kDa, composto de 40-42 resíduos de aminoácidos. Além deste produto, são formados oligômeros solúveis, os quais também estão envolvidos com a neurotoxicidade da via amiloidogênica (KUMAR et al., 2015). Do contrário, em uma via não amiloidogênica, a PPA é clivada pela enzima α -secretase, gerando outro metabólico, não neurotóxico. Estes produtos tornam-se tóxicos a partir do momento que sua produção é exacerbada ou ocorre uma baixa no mecanismo de detoxificação destes (ARMATO et al., 2013). Assim, o produto da clivagem amiloidogênica irá se acumular extracelularmente no sistema nervoso central (SNC), o que leva a consequências danosas, como a geração de neuroinflamação (HENEKA et al., 2015).

Outra teoria bem aceita da DA, é a da hiperfosforilação da proteína Tau. A proteína Tau é uma proteína de 50-75kDa, presente na célula em estado fisiológico normal, responsável pela estabilização dos microtúbulos. Desse modo, mantém estável o transporte de moléculas a nível intracelular e a neurotransmissão (MANDELKOW et al., 2012). No estado patológico da DA a proteína se encontra hiperfosforilada através de um desequilíbrio entre quinases (como a GSK-3 β) e fosfatases. Assim, leva a uma desestabilização da Tau, que se desconecta dos microtúbulos e posteriormente forma um agregado neurofibrilar intracelular (PANZA et al., 2016). Além dos efeitos em resposta a estes agregados, como inflamação e neurodegeneração, existe a possibilidade de que a proteína Tau anormal venha a agir como uma proteína priônica. Isso ocorre quando a proteína anormal induz, em outros neurônios, a formação de novas proteínas anormais, as quais formam agregados intracelulares de proteína TAU hiperfosforilada, como um efeito em cascata (YIN et al., 2014).

A neuroinflamação é um dos fatores envolvidos na DA, sendo um fator que pode ser decisivo para tratamento da doença, visto que envolve as células da glia (maioria das células presentes do SNC) (EIKELEBOOM et al., 2002; ZHANG et al., 2015). De forma geral, são as células gliais que fornecem o suporte físico e bioquímico, além de mediar respostas inflamatórias no SNC (NEWMAN et al., 2003). Dentre as células gliais envolvidas nesta patologia, a microglia é a mais presente, visto que esta célula age como fagócito no SNC, tendo como um de seus alvos, os agregados proteicos amiloides (HENEKA et al., 2015). Porém, quando não degrada estes agregados, devido a defeitos neste mecanismo, ou mesmo quando agregados neurotóxicos estão presentes em excesso, o acúmulo destes leva a um quadro da DA. Além disto, é ela que também promove a manutenção do tecido, age na remodelação e proteção das sinapses no SNC (TISHKINA et al., 2014).

Além da microglia, estudos tem relacionado outras células gliais com a DA, como os astrócitos. Estas são células essenciais no SNC, fornecendo um equilíbrio bioquímico, além do suporte físico, mantendo a homeostase (VERKHRATSKY et al., 2010). Em doenças cerebrais, os astrócitos aparecem alterados, tanto a nível molecular, quanto a nível morfológico, modificando assim sua funcionalidade, caracterizando a astrogliose. As consequências de tal perturbação não estão completamente elucidadas, porém parece estar relacionada a sintomas da demência e alterações na cognição (OSBORN et al., 2015).

Na DA, os astrócitos e a microglia são as principais fontes de citocinas, as quais são mediadores inflamatórios com papel crucial na neuroinflamação. Algumas das funções das citocinas são a quimioatração, processos pró e anti-inflamatórios, envolvidos com o dano neural, além de responder aos acúmulos de A β (CACQUEVEL et al., 2004). Outra importante função é a ativação da microglia. Porém, quando esta ativação é exacerbada, gera um quadro de neuroinflamação, seguido da morte neuronal. Algumas das principais citocinas envolvidas e que se encontram em níveis elevados na DA, são o TNF α , interleucina 6 e 1 α (HENEKA et al., 2015).

Ainda em relação as teorias da DA, a cascata mitocondrial explica a relação da DA com o envelhecimento, que se manifesta na forma de disfunção mitocondrial, degradação de axônios e atrofia neuronal (YE et al., 2012). Sendo a mitocôndria um componente celular essencial, quando há sua disfunção, uma série de cascatas celulares podem ser ativadas, como a da apoptose ou a cascata oxidativa, ambas levando a morte neuronal (MOREIRA et al., 2010). O dano causado à mitocôndria pode ser causado pelo metabolismo anormal da proteína A β , a qual também é processada na membrana mitocondrial, gerando um aumento nas ER e um decréscimo na produção de adenosina trifosfato (ATP) (YE et al., 2012). Outro fator envolvido nesta hipótese é fator genético, ou seja, leva em conta mutações em genes específicos que podem explicar a aparição dos sintomas da fisiopatologia da doença (SWERDLOW et al., 2014).

3.2.1.1. Estresse Oxidativo e a Doença de Alzheimer

Além das hipóteses apresentadas, é necessário mencionar o envolvimento do EO, que está presente nas doenças neurodegenerativas (CHRISTEN et al., 2000; HWANG et al., 2013). O EO é responsável por causar dano a uma diversidade de biomoléculas no organismo humano, como proteínas (como enzimas presentes em rotas metabólicas), lipídeos (como presentes na membrana celular), carboidratos e os ácidos nucleicos (danos ao DNA, o que pode levar a mutação) (VALAVANIDIS et al., 2006). Este dano as biomoléculas por sua vez, pode muitas vezes levar a morte celular, no caso da DA, a morte neuronal no SNC (LI et al., 2013).

Estudos têm associado o EO com a proteômica, onde estão sendo encontradas proteínas oxidadas (se apresentam carboniladas quando oxidadas) as quais podem ser utilizadas como biomarcadores da DA. Algumas destas proteínas encontradas

oxidadas envolvidas na DA, são proteínas reguladoras do metabolismo energético, regulação do pH, sistema antioxidante e detoxificação, atividade proteossomal, estrutura e comunicação celular (SULTANA et al., 2006; TRAMUTOLA et al., 2016).

Tem sido correlacionado o EO com toda a cascata envolvida na DA. Essa correlação trata-se da ligação da presença de A β e seus agregados, do EO e da hiperfosforilação da proteína Tau. No início desta correlação a proteína A β será formada pela clivagem da APP, formando os agregados extracelulares de A β . Este acúmulo irá levar a respostas inflamatórias (ativação da microglia e astrócitos) além de induzir a formação do EO. O EO irá levar a danos as biomoléculas e levar a hiperfosforilação da proteína Tau, consequentemente desestabilizando os microtúbulos e causando dano, devido à presença de agregados neurofibrilares intracelulares (LLORET et al., 2015; LIU et al., 2015) (Figura 2).

Ainda ligado ao EO, foi reportado que os íons metálicos se apresentam desregulados ou em alta quantidade na DA. Estes íons são capazes de mediar a toxicidade do A β (DUCE et al., 2010), o qual é capaz de gerar espécies reativas na presença destes íons (HUANG et al., 2004). Além disso, os íons metálicos facilitam a agregação do peptídeo A β (HUANG et al., 1999) e podem promover a hiperfosforilação da proteína Tau (YAMAMOTO et al., 2002).

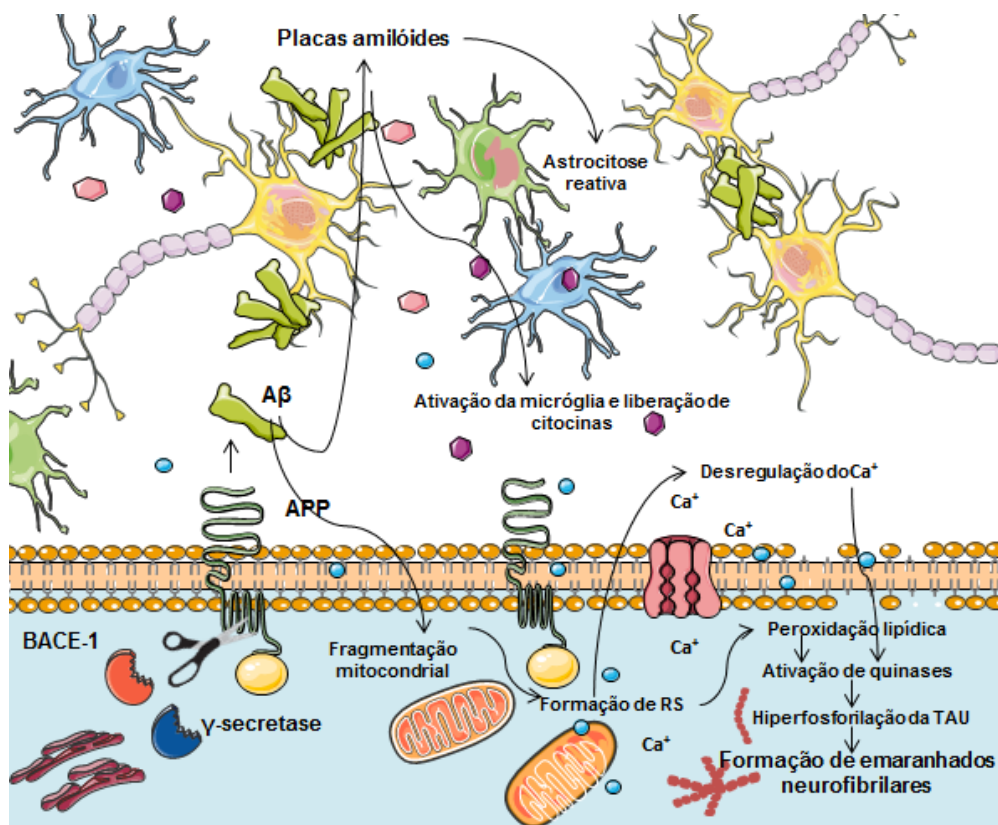


Figura 2. Esquema da correlação das diferentes hipóteses da DA, amiloidogênica, EO e hiperfosforilação da proteína Tau.

Visto que o EO vem sendo extremamente relacionado com o início e progressão da DA, o potencial antioxidante de moléculas é um alvo interessante na busca do tratamento e interrupção da neurodegeneração. Porém, levando em conta o caráter multifatorial da DA se faz necessário uma abordagem de mais de um alvo para o tratamento.

3.2.1.2. Hipótese Colinérgica

A hipótese colinérgica é uma das mais antigas criadas para tentar explicar a DA. Foi descoberto que nesta patologia existe uma disfunção na neurotransmissão da acetilcolina (ACh) (FRANCIS et al., 1999). A acetilcolina é o neurotransmissor responsável pela contração muscular no sistema nervoso periférico (SNP). No SNC age como mediador da transmissão sináptica excitatória, se ligando à receptores nicotínicos e muscarínicos para realizar esta ação. Na DA, a neurodegeneração leva a degradação dos neurônios colinérgicos, assim reduzindo a produção de ACh. Desse modo, a quantidade de ACh na fenda sináptica se encontra reduzida, consequentemente havendo menor estímulo e ligação aos seus respectivos receptores (CHIGURUPATI et al., 2016), como demonstrado na Figura 3.

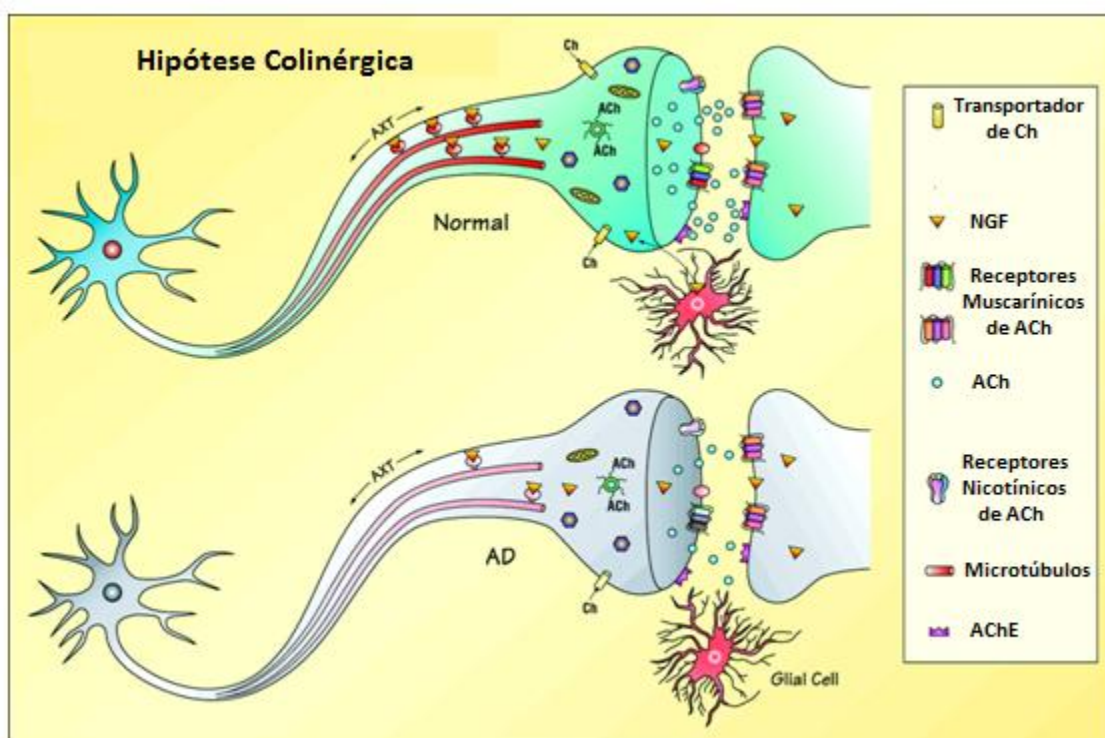


Figura 3. Esquema da hipótese colinérgica na doença de Alzheimer. Fonte: Baseado em TERRY et al. (2003).

Baseado nesses dados, acredita-se que esta disfunção leva a um déficit na memória e na cognição. Neste sentido, a inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE), que é responsável pela degradação e controle dos níveis da ACh na fenda sináptica, é um alvo potencial para o tratamento ou melhora de sintomas da DA (WANG et al., 2016) (Figura 4).

Esta inibição pode ocorrer através da ligação de uma determinada molécula a sítios presentes na enzima, sendo estes o sítio ativo catalítico (CAS) e o sítio aniônico periférico (PAS) (JOHNSON et al., 2006). A inibição do CAS está mais diretamente ligada ao impedimento da ligação entre a enzima e a acetilcolina, impedindo a ligação ao sítio catalítico da enzima. Já o PAS está mais relacionado a funções que extrapolam a neurotransmissão colinérgica, como o possível envolvimento com a cascata amiloide, onde pode estimular a formação dos agregados amiloides (placas senis), ou até um mecanismo de retroalimentação ligado a hiperfosforilação da proteína Tau (CHEN et al., 2014).

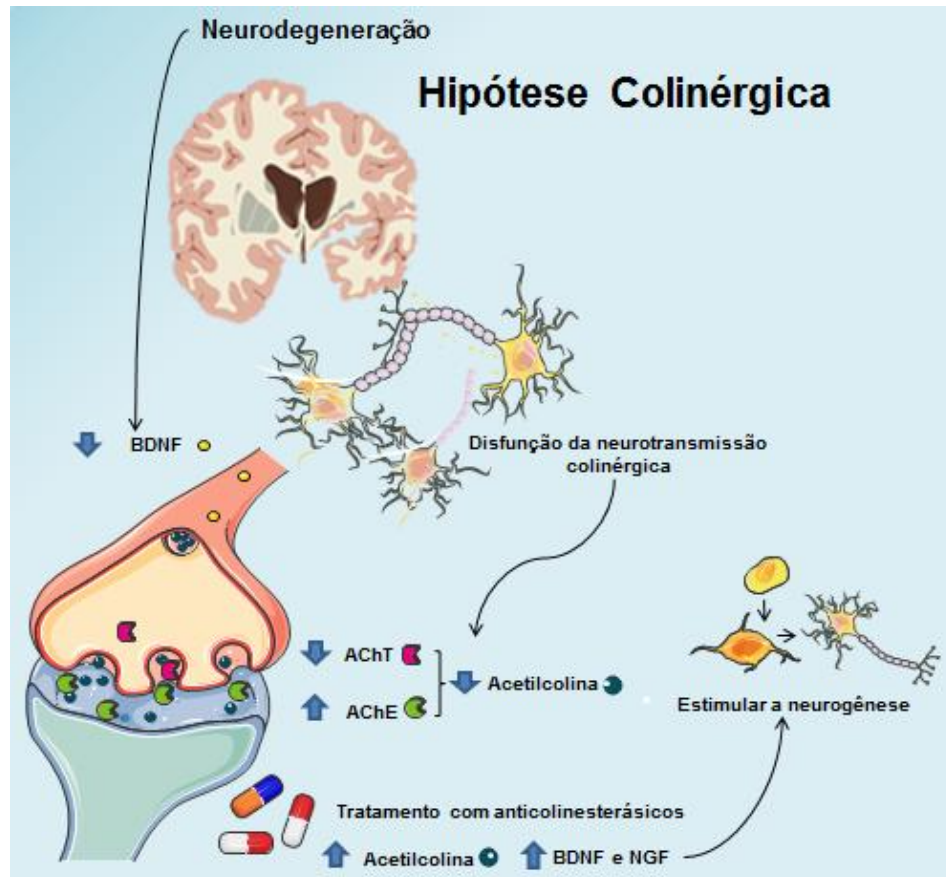


Figura 4. Esquema ilustrando evidências da hipótese colinérgica, onde há a neurodegeneração principalmente colinérgica, em razão da diminuição dos níveis neurotrofinas como o BDNF.

3.2.2. Doença de Alzheimer Genética

A DA está dividida entre esporádica (hipótese apresentadas anteriormente) e a genética. A genética envolve mutação gênica, onde a carga genética e hereditariedade estão envolvidas.

Os casos associados a este tipo da DA ocorrem mais precocemente, em indivíduos adultos jovens, visto que já possuem pré-disposição e defeitos genéticos ligados a doença (BETTENS et al., 2013).

Os genes que parecem estar envolvidos com a DA de modo mais precoce são: PPA, PS 1 e 2, e a apolipoproteína (ApoE). As mutações ligadas aos genes PPA e PS mostram um aumento na produção da A β , a qual é tóxica e como já dita, apresenta um papel importante na doença (YE et al., 2012).

3.3 Tratamentos para Doença de Alzheimer

Dentre os fármacos atualmente utilizados para o tratamento da DA se apresentam os iAChE. A enzima AChE é responsável pela quebra ou degradação da ACh na fenda sináptica. Embora esta classe de medicamentos possua a capacidade de melhorar a neurotransmissão colinérgica, apresentam efeitos adversos importantes e não são totalmente eficientes. Um dos motivos de menor eficiência é a enzima butirilcolinesterase, que também cliva a ACh, assim reduzindo a potência dos fármacos, visto que irá realizar parte da ação de clivagem, mesmo com a inibição da AChE (CHIGURUPATI et al., 2016). Outra classe de medicamentos utilizados são os bloqueadores de receptores glutamatérgicos (NMDA, N-metil D-aspartato). Estas classes melhoram o quadro patológico da doença, porém não interrompem a progressão da doença (DOODY et al., 2003). Os medicamentos utilizados atualmente aprovados pela FDA (Food and Drug Administration), são o Donepezil, Galantamina e Rivastigmina como iAChE e a Memantina como bloqueador de receptores NMDA.

A busca de novos medicamentos engloba o desenvolvimento de novos iAChE, tanto quanto medicamentos que atinjam outros marcadores fisiopatológicos da doença, como as placas senis e agregados intracelulares da proteína Tau. Desse modo, essa busca compreende fármacos que possam atuar em mais de um alvo farmacológico (multi-alvo), como a busca por antioxidantes potentes, que também possuam ação nos diferentes marcadores da DA (UNZETA et al., 2016).

Atualmente, ainda existem anticorpos anti-A β em testes de fase clínica, porém seus predecessores apresentaram graves efeitos adversos nas últimas fases de teste (II e III da fase clínica), quanto à avaliação da segurança do uso em humanos (SEVIGNY et al., 2016).

Além destes, novos medicamentos estudados tem como alvo a proteína Tau e o metabolismo envolvido na hiperfosforilação, presente na patologia da DA. Além disso, buscam prevenir a formação dos agregados intracelulares desta proteína (PANZA et al., 2016).

Ambas as hipóteses amiloidogênica e da hiperfosforilação da proteína Tau, são bem aceitas. Porém, existem controvérsias sobre qual das duas vem a ser o melhor alvo para o tratamento. Desse modo, a busca por novos alvos é interessante.

Além dos fatores danosos ao SNC, existe a possibilidade de explorar a neuroproteção e regeneração. Um possível alvo para regeneração do SNC é o estímulo da produção de Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF). O BDNF é uma neurotrofina que está envolvida na neuroplasticidade e neurogênese, sendo assim, um

fator chave para formação e consolidação da memória (LU et al., 2005). Além disso, alterações nos níveis de BDNF na DA foram reportadas (O'BRYANT et al., 2009; SONG et al., 2014). Sendo assim, é interessante estimular um aumento produção endógena ou presença de BDNF, visando a reversão de quadros negativos relativos à neuroplasticidade e neurogênese, como um elevado nível de neurodegeneração.

Levando em conta a incerteza da sequência de eventos na patologia da Doença de Alzheimer, e o aumento de evidências sobre o envolvimento do estresse oxidativo em doenças neurodegenerativas, o EO se apresenta como um importante alvo para o tratamento desta patologia. Visto que, como já citado neste trabalho, o EO está presente em amostras cerebrais de pacientes com DA, e que o tratamento com antioxidantes mostra melhoras na sintomatologia da doença (TRAMUTOLA et al., 2016).

Visando a busca de novos tratamentos de doenças neurodegenerativas, levando em conta a grande importância do EO, os compostos orgânicos de selênio (Se) vêm sendo destacados.

3.4. Compostos Orgânicos de Selênio

O Se é um micronutriente essencial para a dieta humana. Ele pode ser encontrado em alimentos como o salmão, castanhas, entre outros, sendo recomendado um consumo diário deste micronutriente. A importância do Se está em sua capacidade antioxidante, a qual é essencial para o funcionamento do sistema de diversos organismos (KIELISZEK et al., 2016). À nível biológico, o Se é encontrado na forma de proteínas (selenoproteínas), as quais são um grupo de antioxidantes envolvidos com ativação, proliferação e diferenciação celular, além de o sistema imune inato e adaptativo (BROWN et al., 2001). Alguns exemplos destas proteínas são: a glutathiona peroxidase (GPx), tioredoxina redutase, além das selenoproteínas S, K e P. Dentre essas, a GPx é mais extensamente estudada, a qual é responsável pela detoxificação de ERO's, como o peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos fosfolipídicos (GAUR et al., 2016).

A síntese de compostos orgânicos de Se é interessante para o desenvolvimento de novos fármacos, principalmente com atividade antioxidante. Um exemplo de compostos orgânicos de Se é o Ebselen, o qual apresenta, uma atividade mimética a

enzima GPx, além de reagir com diversos tióis além da glutathiona (substrato para a enzima GPx) e possuir atividade antioxidante (NOGUCHI et al., 2016).

Outros exemplos de atividades farmacológicas interessantes dos compostos orgânicos de Se são: atividade anticancerígena, anti-inflamatória, antinociceptiva, antidepressiva, ansiolítica, atividades gastroprotetoras e neuroprotetora (Figura 5) (MEOTTI et al., 2004; SAVEGNAGO et al., 2008; GILL et al., 2010; FREITAS et al., 2011; NOGUEIRA et al., 2011; MISRA et al., 2015; BROD et al., 2016; SOUSA et al., 2016; REIS et al., 2017).

Sendo assim, devido a uma gama de compostos com efeitos farmacológicos promissores, a busca por um novo potente antioxidante para o tratamento do EO é interessante.

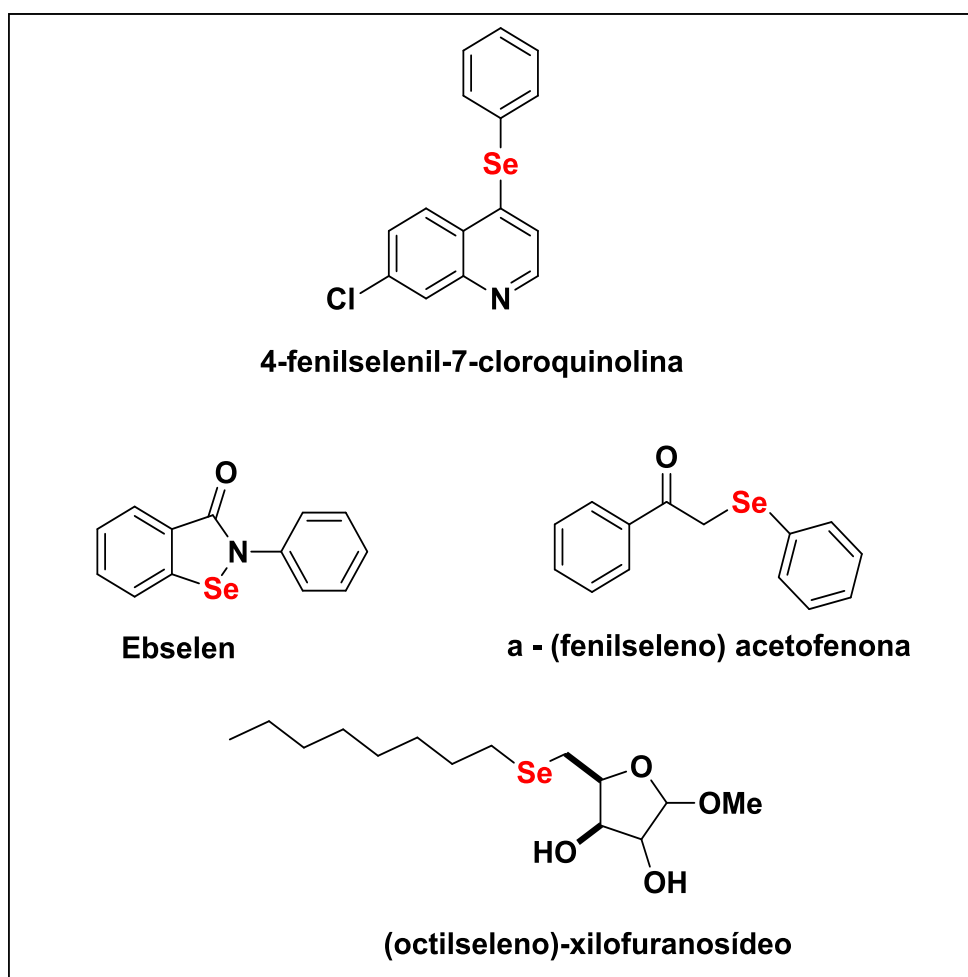


Figura 5. Representação gráfica das estruturas química de compostos orgânicos de selênio.

3.5 Azoninas

O grupo de compostos das azoninas faz parte da classe de compostos conhecidos como heterocíclicos. Tais compostos apresentam um heterociclo em sua estrutura química, ou seja, um ciclo (anel) que possui um elemento químico distinto nesta estrutura, chamado de heteroátomo. Além disso, o que caracteriza as azoninas é a presença de um ciclo com nove lados na sua estrutura, com a presença do heteroátomo de nitrogênio. Em outros estudos com moléculas contendo azonina em sua estrutura, as moléculas testadas apresentam ações farmacológicas interessantes, como por exemplo, a ação antitumoral e estimulante do sistema nervoso (THOISON et al., 1994; SUGIMOTO et al., 2013).

Assim, este grupo de compostos também mostra interessantes ações biológicas. Levando em conta tais características promissoras, além das já apresentadas pelos compostos orgânicos de Se e a necessidade de novos fármacos para o tratamento da DA, a busca por novos compostos se faz necessária.

3.6 Docagem Molecular

Como destacado anteriormente, o número de compostos a serem testados e os que de fato chegam ao mercado são muito diferentes. Assim, a docagem molecular (DM) é utilizada para selecionar os compostos mais promissores, dentre uma gama existente ou a serem sintetizados (GSCHWEND et al., 1996).

Este método já está bem estabelecido, o qual consiste no design de novos compostos, constituindo um método *in silico* de pesquisa, onde se usa a informática (algoritmos e dados de pontuação) junto a dados biológicos (bioinformática) para realizar análises. Através destas análises é possível determinar a força de interação e ligação entre diferentes moléculas, verificando assim o potencial de determinada molécula em interagir com um alvo desejado (BAZGIER et al., 2016). Esse alvo pode ser uma enzima, onde se analisa a força de interação de uma molécula com a enzima testada, assim podendo inibi-la ou ativá-la.

Deste modo, é possível eliminar parte do processo de seleção de novo compostos e acelerá-lo (MENG et al., 2011). Evitando assim desperdício de materiais e reagentes no processo de testes, através da pré-seleção realizada através da DM. Isto possibilita selecionar compostos/moléculas de classes com interessantes ações biológicas dentre uma gama já existente.

4. Metodologia

4.1. Compostos

Os compostos FDDT (figura 6A) e FSeMDTT (figura 6B) foram sintetizados pelo Laboratório de Síntese Orgânica Limpa (LASOL) da Universidade Federal de Pelotas (UFPel). Ambos os compostos foram testados, para comparar os resultados obtidos com as moléculas na presença ou ausência do selênio em sua estrutura. Todos os demais reagentes são de grau analítico.

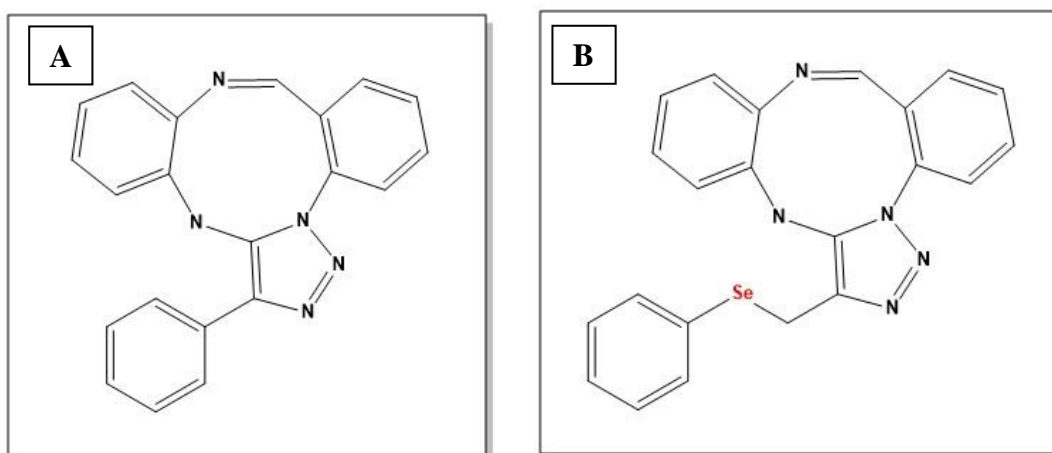


Figura 6. Estrutura química dos compostos FDDT e FSeMDTT, A e B, respectivamente.

4.2. Animais

Os experimentos realizados que utilizaram tecido animal proveniente de camundongos Swiss machos, obtidos do Biotério Central da UFPel. Previamente a eutanásia dos animais e extração do tecido animal, os camundongos foram mantidos em temperatura de 22 ± 1 °C, com ciclo de claro/escuro de 12 horas, com livre acesso a água e comida. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as normas e diretrizes do Comitê de Ética e Experimentação Animal da Universidade Federal de Pelotas (CEEAA/UFPel), sob o número 3301-2015. Os animais foram submetidos à eutanásia para a remoção do cérebro (córtex e hipocampo) e fígado (somente no ensaio TBARS). Após a remoção, os tecidos foram pesados e diluídos em Tampão TRIS HCl 50mM, para o uso no ensaio das Espécies Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) e das Espécies Reativas (ER). No entanto, para o ensaio da Atividade da

Acetilcolinesterase (AChE) tecidual os tecidos foram diluídos em Tampão Medium I. A proporção de diluição dos tecidos foi: córtex e hipocampo 1:4 e fígado 1:10.

4.3. Docagem Molecular

A estratégia de DM foi realizada utilizando o software AutoDock Vina, pois apresenta uma maior velocidade e acurácia entre os já descritos atualmente (TROTT & OLSON, 2010). Nesse sentido, a estrutura da enzima AChE foi obtida através do banco de dados “Protein Data Bank” sob o código PDB:1DX6 e posteriormente excluído seu ligante galantamina utilizando o software Chimera (PETTERSEN et al., 2004). As estratégias para a seleção do seu sítio de inibição aconteceram primeiramente levando em consideração o sítio catalítico aniônico (CAS) (centro_x= 11.033, centro_y= 66,689, centro_z= 61,211 e tamanho_x= 32, tamanho_y= 26 e tamanho_z= 40) essa grid box abrangia os resíduos SER200, HIS440 e GLU327. Em seguida foi levado em conta os resíduos conservados do seu sítio ativo TRP84, PHE330 e TRP279, que compõe o sítio aniônico periférico (PAS), sendo as coordenadas: centro_x= 2.738, centro_y= 63,649, centro_z= 66,58 e tamanho_x= 60, tamanho_y= 56 e tamanho_z= 32. Os compostos foram desenhados no software ChemDraw e as coordenadas 3D foram estabelecidas pelo programa Avogadro (HANWELL et al., 2012).

Essa estratégia foi aplicada uma vez que estudos demonstram que apesar do sítio PAS estar envolvido em funções da AChE que não estão completamente elucidadas, sabe-se que esse sítio pode estimular a deposição de A β , bem como de aumentar a sua toxicidade (CHEN et al., 2014). Dessa maneira, a inibição simultânea desses sítios pode levar a restauração do déficit cognitivo, bem como de auxiliar na interrupção da neurodegeneração (HEBDA et al., 2016).

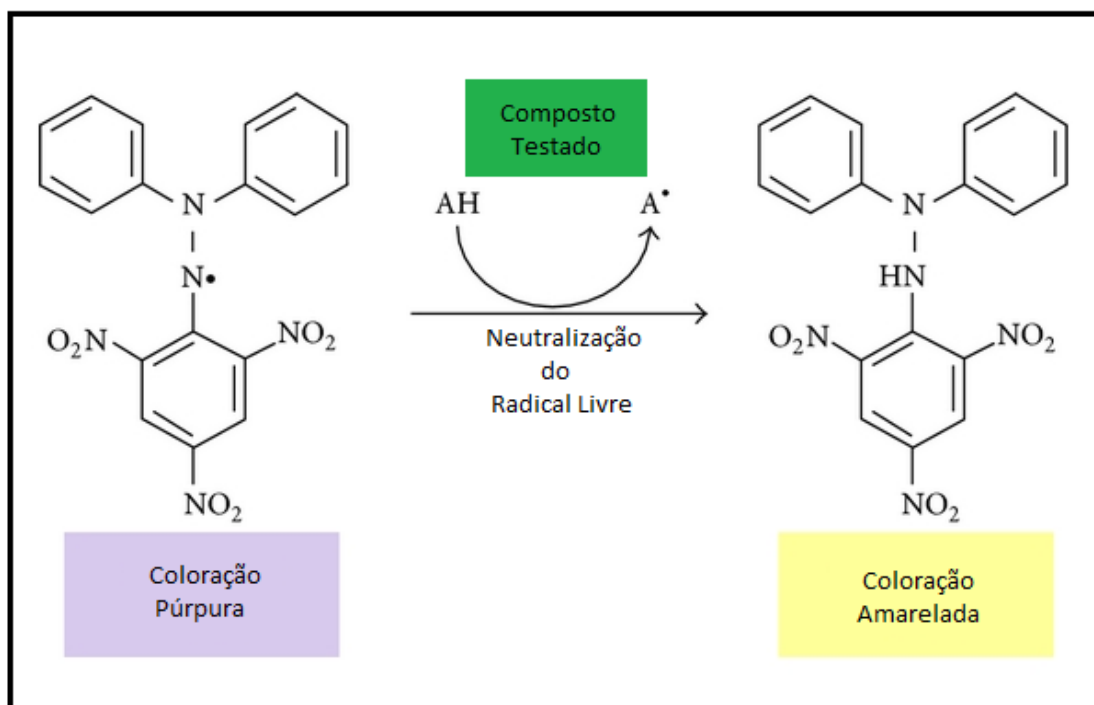
4.4. Ensaio da Atividade Antioxidante

4.4.1. Atividade neutralizadora do Radical DPPH

O método deste ensaio consiste em avaliar a capacidade antioxidante, de um determinado composto, através da atividade sequestradora do radical livre sintético 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) (SHARMA et al., 2009). O radical DPPH possui coloração púrpura, sendo esta absorvida por um comprimento de onda máxima de 517

nm, caracterizando-o como um método colorimétrico. Para atingir a coloração adequada citada anteriormente, a mistura reacional (solução DPPH e composto testado) é deixada a uma temperatura de 30 °C por 30 minutos no escuro para que a reação ocorra. Posteriormente o resultado será analisado em espectrofotômetro. Caso o químico testado possui capacidade em sequestrar tal radical a coloração da solução será reduzida, visto que o DPPH será neutralizado, consequentemente reduzindo a absorvância lida no espectrofotômetro, como demonstrado na figura Figura 7.

Figura 7. Esquema do ensaio da Atividade neutralizadora do Radical DPPH.



4.4.2. Atividade neutralizadora do Radical ABTS

Este ensaio permite analisar a capacidade do composto testado, em neutralizar o radical livre sintético 2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS) (RE et al, 1999). O radical apresenta uma coloração azul após ser diluído em persulfato de potássio, e reagir por 12-16 horas no escuro. Sendo este também um método colorimétrico, será analisado em espectrofotômetro, tendo a coloração absorvida em comprimento de onda máximo de 734 nm. Para atingir o objetivo de analisar o potencial antioxidante de determinada molécula neste ensaio, o composto alvo irá reagir com a solução ABTS, por 30 minutos a temperatura ambiente, no escuro. Após esta etapa

será analisada a absorvância, onde um químico com potencial de neutralizar este radical irá tornar a solução mais, clara, de coloração esverdeada, reduzindo a absorvância da solução (Figura 8). Vale ressaltar que o uso de diferentes radicais livres sintéticos, DPPH e ABTS, se torna interessante, pois nestes ensaios, o modo como os radicais são neutralizados são diferentes. No ensaio do ABTS a estabilização se dá preferencialmente pela transferência de elétrons. Já no ensaio do DPPH, esta estabilização ocorre preferencialmente pela transferência de prótons (RE et al., 1999).

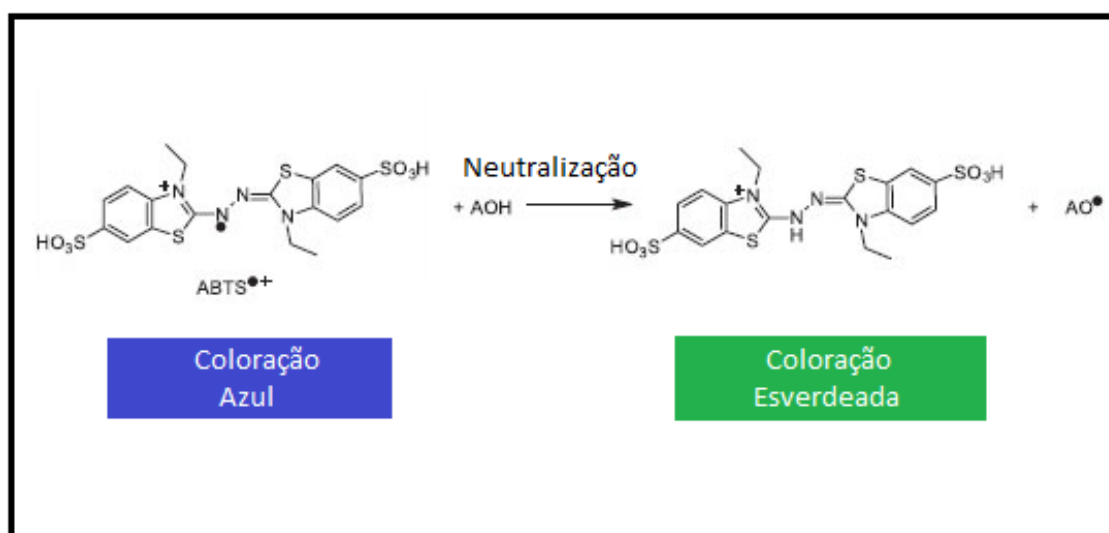


Figura 8. Esquema do ensaio da Atividade neutralizadora do Radical ABTS.

4.4.3. Ensaio do Potencial Redutor do Íon Férrico (FRAP)

Este ensaio irá avaliar o potencial de um composto de converter o íon Férrico (Fe^{+3}) (proveniente do cloreto de ferro) a íon Ferroso (Fe^{+2}), sendo assim, uma reação de redução, outro ensaio para avaliar a capacidade antioxidante de um químico (WONG et al., 2005). Para realizar o ensaio, é preparada uma solução FRAP, a qual possui um tampão acetato de sódio e a triazina, além do próprio do cloreto de ferro. A triazina irá se complexar com o íon férrico (Fe^{+3}), sendo que, se o composto reduzir este íon complexado irá gerar uma solução de coloração azul (40 minutos, 37 °C), onde está presente o íon ferroso (Fe^{+2}) ainda complexado com a triazina, como demonstrado na figura Figura 9. A leitura deste resultado é feita através do uso do espectrofotômetro, com o comprimento de onda de 593 nm. Deste modo, caso reduza este íon, como demonstrado, o composto irá se mostrar capaz de ser um agente

reduzidor, ou seja, capaz de doar elétrons para estabilizar, por exemplo, moléculas instáveis.

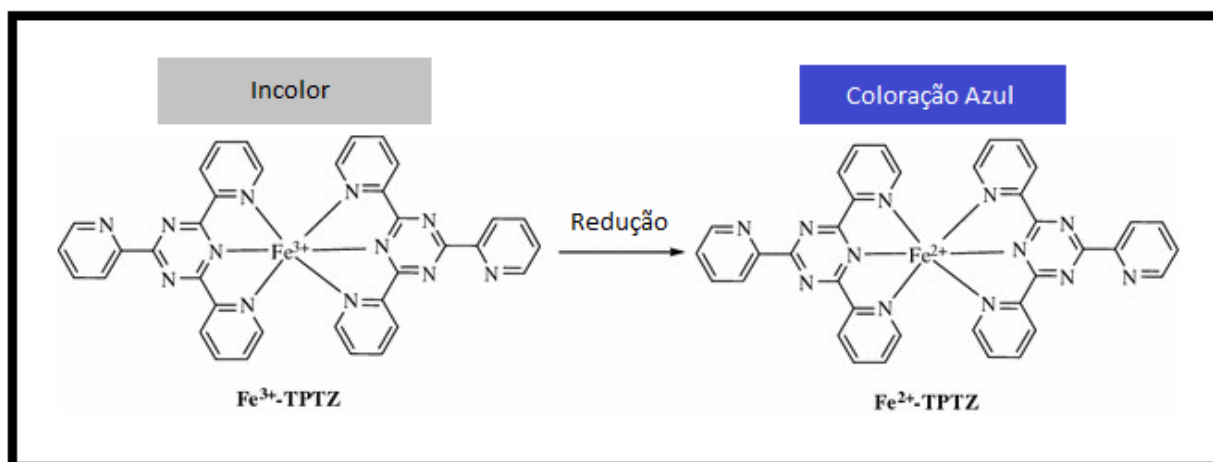


Figura 9. Ensaio do Potencial Redutor do Íon Férrico (FRAP). O ensaio se baseia na capacidade do composto em reduzir o ferro complexado com a triazina (TPTZ), de íon férrico à ferroso.

4.4.4. Determinação da Capacidade Sequestrante do Radical Hidroxil (OH^\cdot)

Este método avalia a capacidade de um composto em neutralizar o radical hidroxil, sendo este formado na reação de Fenton (Figura 10). A reação utiliza ferro (Fe^{2+}) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), mimetizando a reação de Fenton, onde ocorre a formação do radical OH^\cdot . Esta reação ocorre durante 1 hora à 37 °C (GUO et al., 2011). Os resultados serão lidos em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 510 nm.

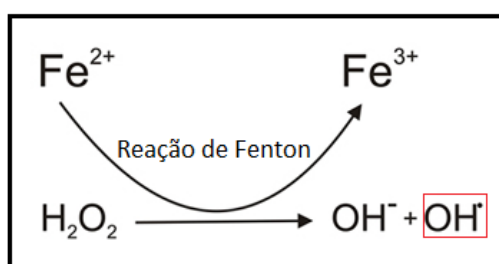


Figura 10. Ensaio da Capacidade de Neutralização do Radical Hidroxil.

4.4.5. Capacidade Quelante do Íon Ferroso

Este ensaio analisa a capacidade de um composto em quelar, ou seja, que possui a capacidade de se complexar e inativar íons metálicos, como por exemplo, cálcio, ferro, cobre e magnésio. Estes íons podem reagir com moléculas e desestabilizá-las, como demonstrado no ensaio anterior, na reação de Fenton, com a presença do ferro. Além disso, há um aumento da presença de alguns íons metálicos ou mesmo um deslocamento destes para locais inadequados, além de se ligarem aos aglomerados de A β (UNZETA et al., 2016). No ensaio é utilizado o ferro complexado com a triazina, que possui uma coloração azul, a qual é convertida a incolor quando o ferro é quelado, sendo o complexo ferro/triazina desfeito (Figura 11), baseado no método de DECKER et al., (1990) com algumas modificações. O ensaio é lido no comprimento de onda 570 nm, em espectrofotômetro.

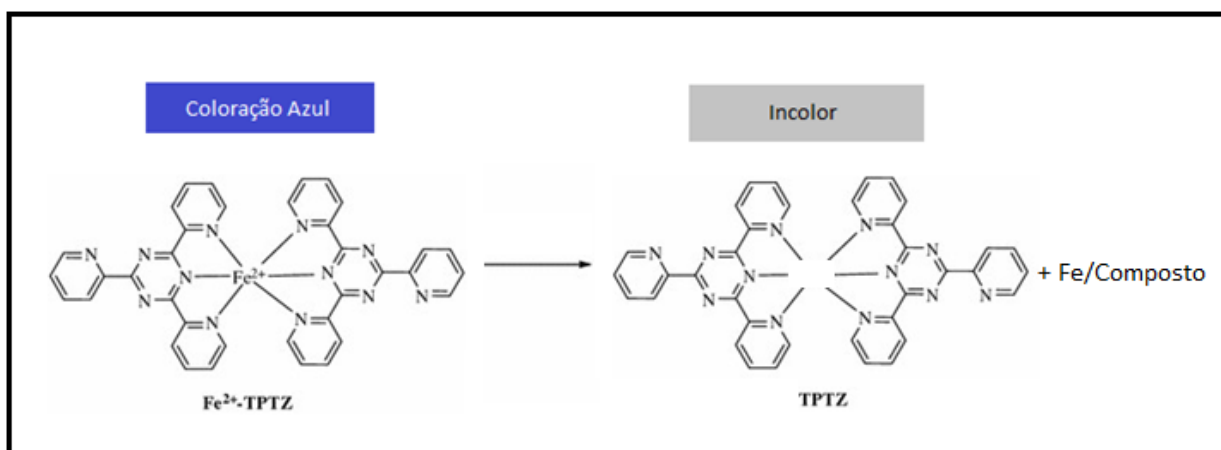


Figura 11. Ensaio da Capacidade Quelante do Íon Ferroso.

4.4.6. Atividade Mimética da Enzima Superóxido Dismutase (SOD) *in vitro*

Este método avalia a capacidade do composto em mimetizar a ação da enzima SOD, a qual é responsável pela conversão do radical ânion superóxido (O^{-•}) à H₂O₂ naturalmente no organismo humano. Neste ensaio avalia-se a atividade mimética à SOD, a qual é a capacidade de um químico em impedir a auto-oxidação do pirogallol, sendo este reagente altamente instável, principalmente em soluções alcalinas (MARKLUND & MARKLUND, 1974). Em uma parte das etapas desta auto-oxidação, ocorre a formação do radical O^{-•}, como demonstrado na figura Figura 12, onde o

composto irá agir mimetizando a enzima. No processo de auto-oxidação do pirogallol, quando finalizada, a solução se torna marrom-amarelada, medida espectrofotometricamente em comprimento de onda de 412 nm.

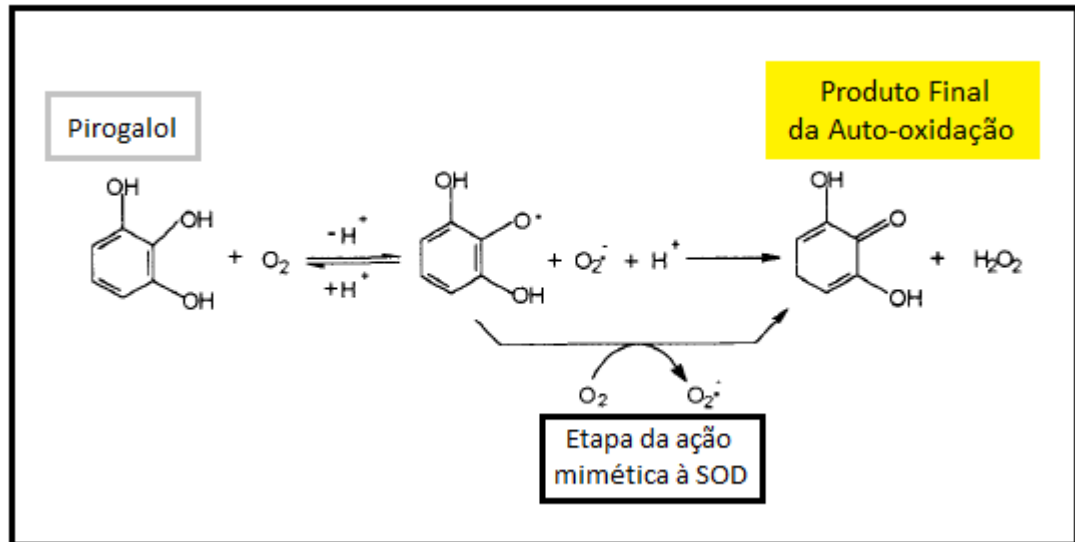


Figura 12. Esquema da auto-oxidação do pirogallol e do ensaio da Atividade mimética da enzima SOD.

Fonte: Baseada em KIM et al. (1995).

4.4.7. Ensaio das Espécies Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) induzidas por NPS *in vitro*

Este método consiste na determinação da peroxidação lipídica, utilizando homogenato tecidual (córtex, hipocampo e fígado), conforme descrito anteriormente. A peroxidação lipídica é consequência do dano causado pelo EO sobre uma matriz lipídica, induzido pela adição de nitroprussiato de sódio (NPS). Este processo ocorre em três etapas, a iniciação, propagação e terminação, onde serão formados radicais livres e ER. Um grupo de moléculas formadas neste processo de oxidação são os malondialdeídos, os quais, em alta temperatura e meio ácido, reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBA), formando uma solução de coloração rósea. O resultado é analisado em espectrofotômetro em comprimento de onda de 532 nm.

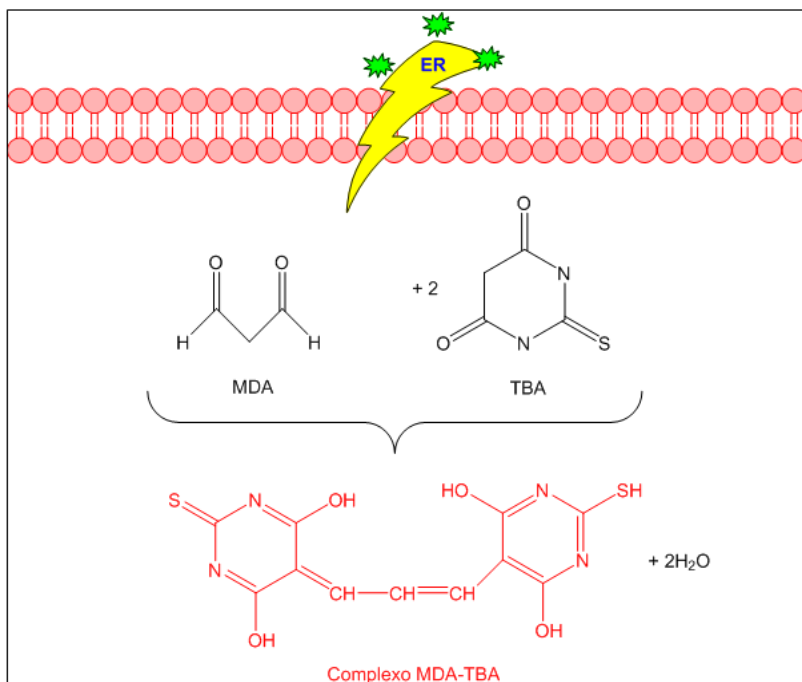


Figura 13. Representação do ensaio TBARS. Fonte: CASARIL, A.M., 2015. Trabalho de Conclusão de Curso UFpel.

4.4.8. Ensaio das Espécies Reativas (ER)

Este ensaio determina a capacidade de um composto em neutralizar as espécies reativas de oxigênio em tecido animal, a nível celular. Neste ensaio a indução da produção de ER se dá através do uso de azida sódica, a qual tem a capacidade de inibir o complexo IV da cadeia transportadora de elétrons, assim induzindo uma maior produção de radical O[•], sendo esta uma ER. Durante um período de 30 minutos a temperatura ambiente, no escuro, ocorre a formação de ER pela ação da azida, oxidando o diacetato de diclorofluoresceína à diclorofluoresceína, tornando-a fluorescente. Caso o composto neutralize as espécies reativas, a fluorescência é reduzida (LOETCHUTINAT et al., 2005). A intensidade da fluorescência será medida com emissão de 520 nm e excitação de 488 nm em espectrofluorímetro.

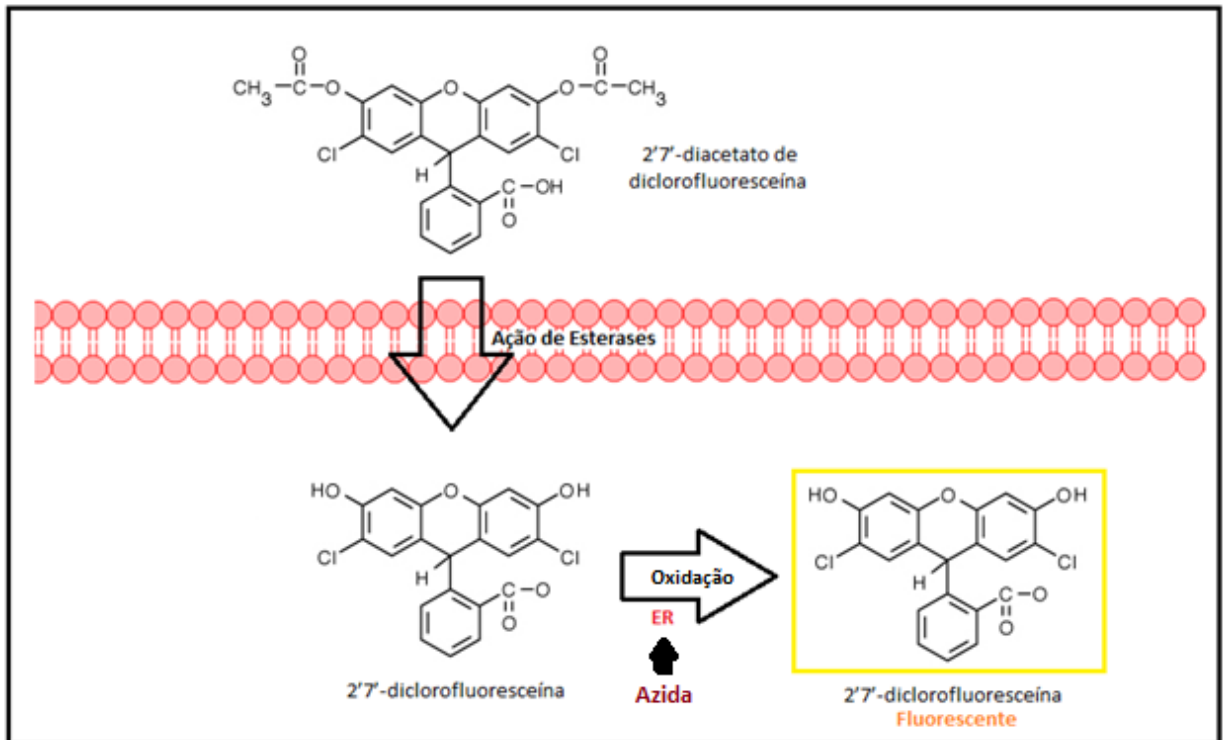


Figura 14. Ensaio das Espécies Reativas.

4.4.9. Atividade da enzima Acetilcolinesterase (AChE) Tecidual

Este método trata da análise da capacidade do composto testado em inibir a enzima AChE, assim, impedindo a degradação de ACh (neste ensaio substituída acetiltiocolina). Neste ensaio a acetiltiocolina é utilizada, pois quando clivada pela AChE (também é um substrato da enzima) será capaz de reduzir a molécula de ácido 5-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB) à ácido 5-tio-2-nitrobenzóico (TNB), presente na solução sistema, deixando a solução com uma coloração amarela. Esta reação de redução se dá através dos grupamentos tióis da tiocolina (produto da clivagem pela AChE) e do DTNB, assim reduzindo-o. Os reagentes são incubados à 25 °C por 2 minutos e então a acetiltiocolina é adicionada a solução, onde é analisada a coloração gerada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 412 nm. São lidas as absorbância nos tempo de 0, 30, 60 e 90 segundos (cinética enzimática). Os resultados foram expressos na atividade da enzima AChE, através do cálculo: $(\Delta \text{min} \times 2/13,6 \times \text{diluição homogenato} \times [] \text{ proteína}) \times 60$ (ELLMAN et al., 1961).

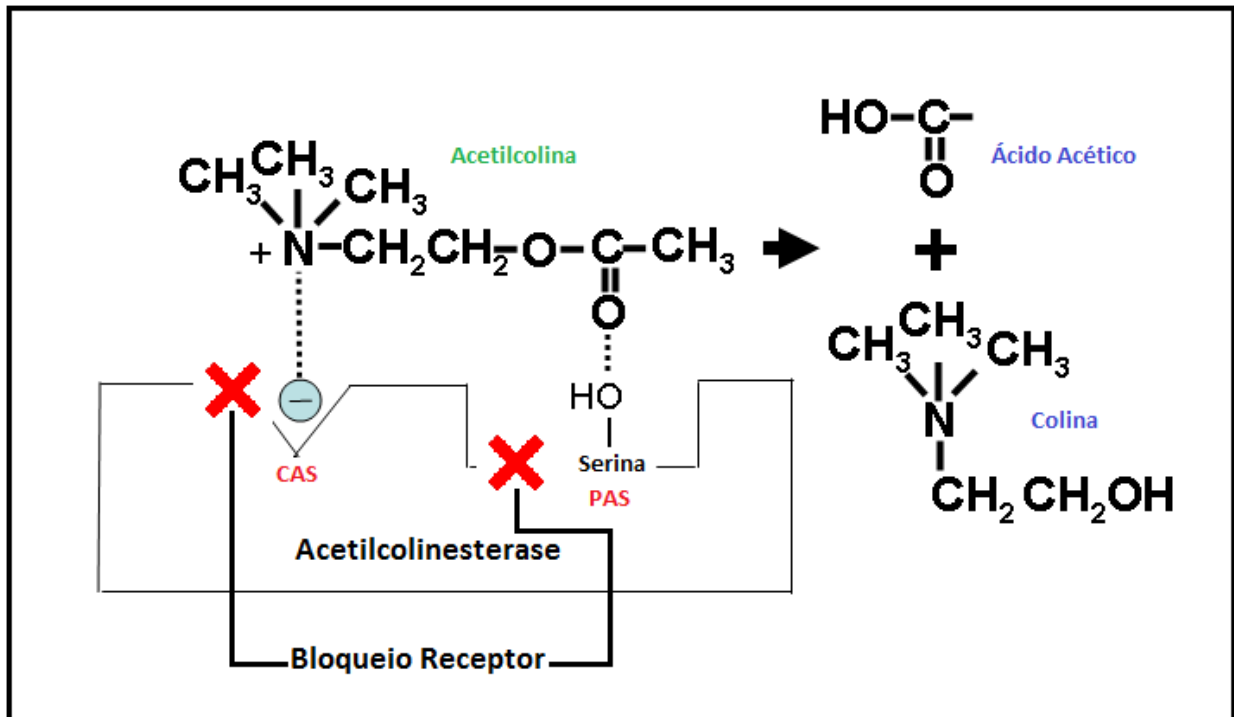


Figura 15. Esquema da atividade da enzima AChE.

4.4.10. Determinação de Proteínas, método de Bradford

Para determinar a concentração proteica nas amostras de tecidos, para o ensaio da atividade da AChE foi o utilizado o método de Bradford. Esse método, utiliza o corante Coomassie brilliant blue, que se liga as proteínas da amostra, formando uma solução colorida, que é lida no comprimento de onda de 596 nm, em espectrofotômetro (BRADFORD et al., 1976).

4.4.11. Análises Estatísticas

Os resultados foram analisados através da Análise de Variância de uma via (ANOVA), seguida pelo teste *post hoc* Newman-Keuls, através do software GraphPad Prism 5.0. Os resultados estão expressos como média \pm desvio padrão e considerados significativos quando $p < 0,05$.

5. Resultados

5.1. Docagem Molecular

Os resultados obtidos a partir da Docagem Molecular (Tabela 1) na enzima AChE nos sítios CAS e PAS demonstraram que o composto FDTT possui interação de -12,1 kcal/mol com o sítio CAS e interação de -11,2 kcal/mol com o sítio PAS. De modo semelhante, o composto FSeMDTT também apresentou interação com os sítios da enzima, sendo -11,1 para o CAS e -10,7 para o PAS. Essa relação pode ser medida, uma vez que quanto menor o escore apresentado em kcal/mol, menor a quantidade de energia gasta para que esta interação ocorra, assim representando uma maior afinidade entre a proteína e o ligante.

Compostos	Docking CAS	Docking PAS
FDTT	-12,1	-11,2
FSeMDTT	-11,1	-10,7

Tabela 1. Docagem Molecular dos compostos FDTT e FSeMDTT nos sítios CAS e PAS da enzima acetilcolinesterase, dado por um escore em kcal/mol.

Conforme a Figura 16 é possível observar que o composto FDTT em sua melhor conformação (-12,1 kcal/mol) fica em contato com os resíduos TRP84, PHE330, PHE331, TYR334, TYR130, GLY117, GLY118, SER122, TYR121 e ASP72 no sítio CAS. No sítio PAS fica em contato com os resíduos TRP84, TYR121, GLN69, TYR334, SER122, ASP72, PHE331, ASN85, PHE330 e TYR70. Enquanto que, o composto FSeMDTT, segundo a Figura 16, fica em contato com os resíduos TRP84, TYR121, GLN69, TYR334, SER122, ASP72, PHE331, ASN85, PHE330, e TYR70 no sítio CAS. No sítio PAS os resíduos são TYR334, TYR121, PHE290, TRP84 e PHE331.

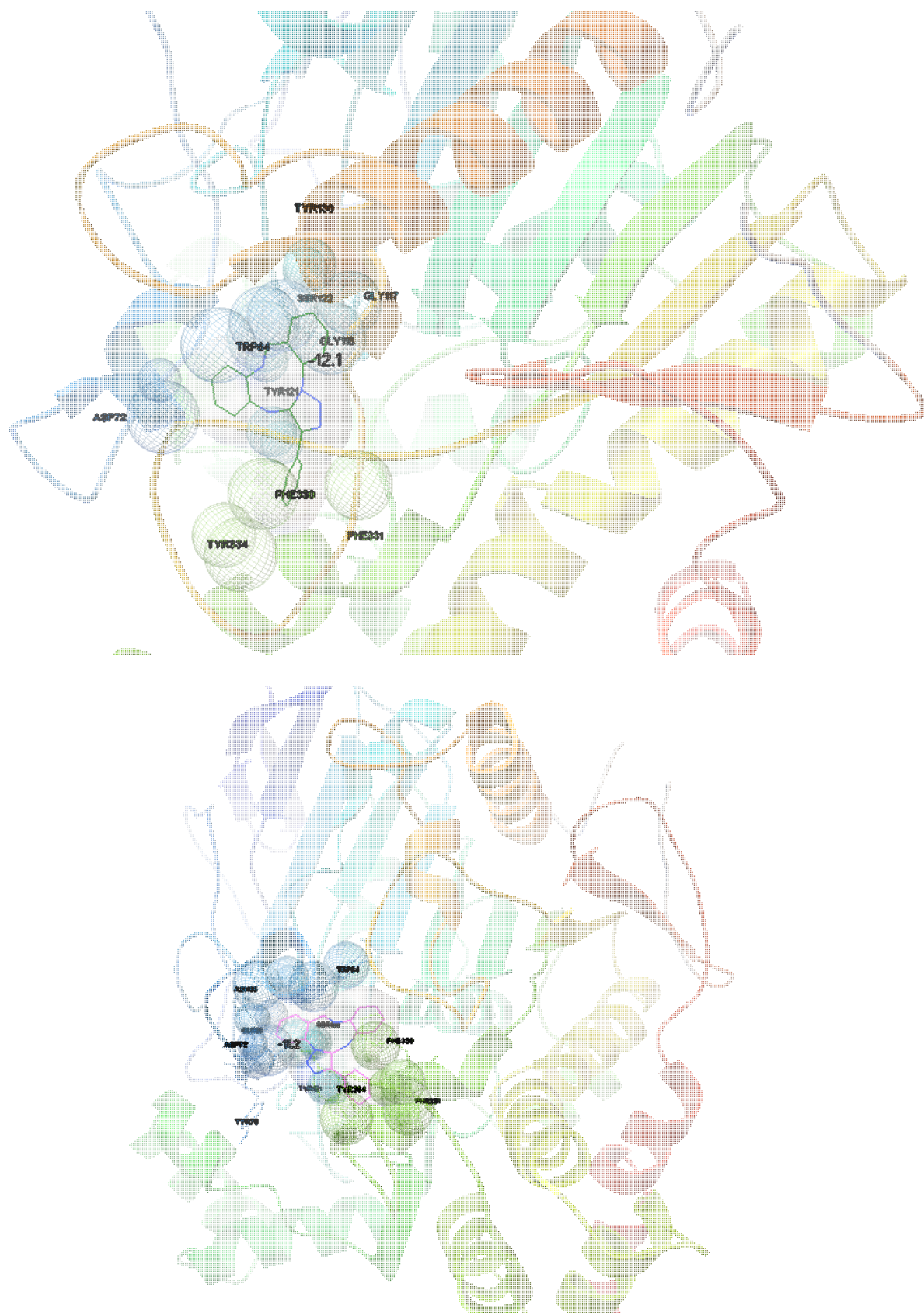


Figura 16. Melhor conformação do composto FDTT nos sítios CAS e PAS com um escore de -12,1 kcal/mol, e -11,2 e os resíduos de contato próximo.

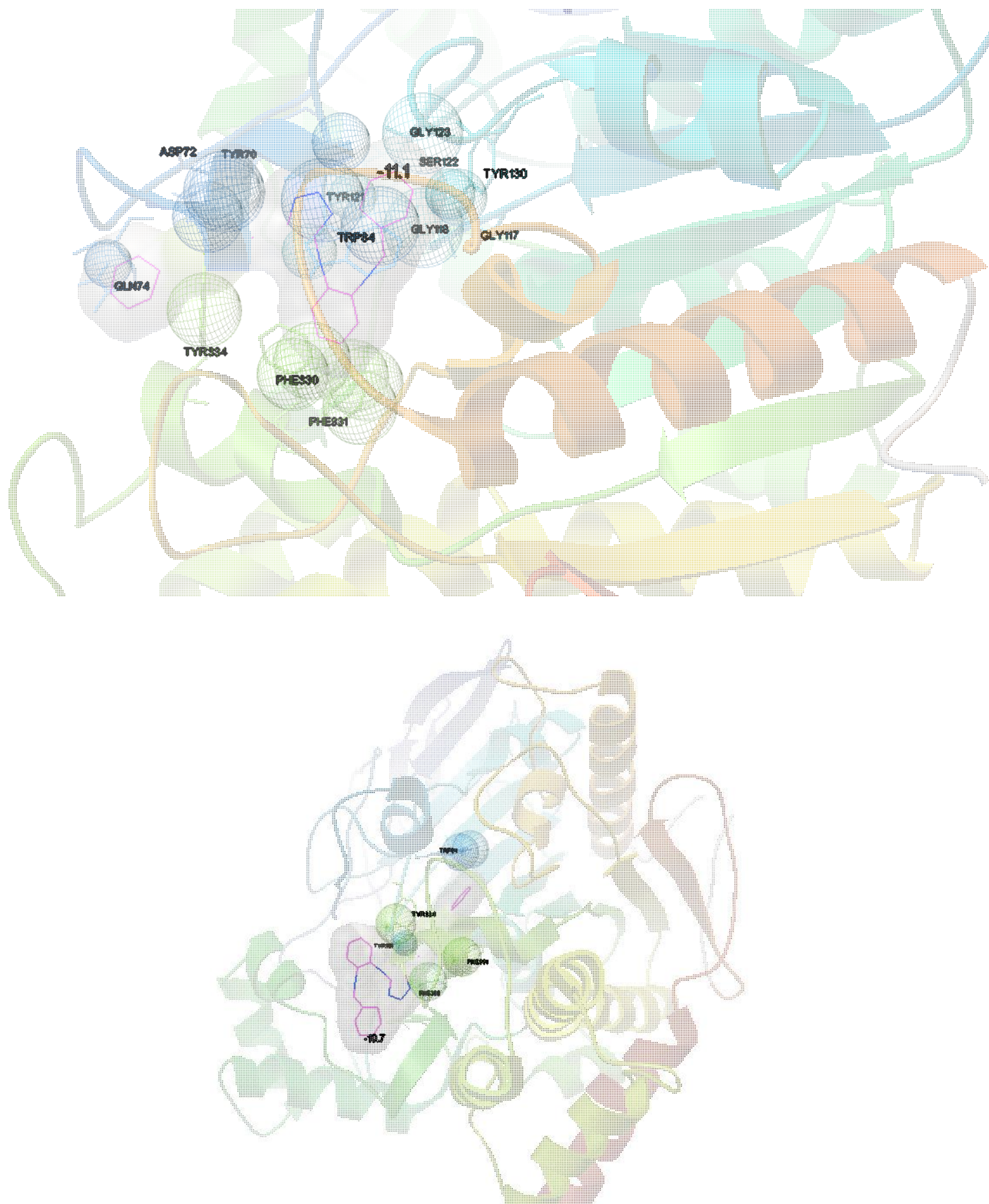


Figura 17. Melhor conformação do composto FSeMDTT nos sítios CAS e PAS com um escore de -11,1 kcal/mol, e -10,7 e os resíduos de contato próximo

5.2. Ensaios da Atividade Antioxidante *in vitro*

Os compostos FDTT e FSeMDTT não apresentaram resultados estatisticamente significativos nos seguintes ensaios: Atividade neutralizadora do radical DPPH, atividade neutralizadora do radical ABTS, ensaio do Potencial Redutor do Íon Férrico (FRAP), Determinação da Capacidade Sequestrante do radical (OH[•]), Capacidade Quelante do Íon Ferroso e Atividade Mimética da Enzima Superóxido Dismutase (SOD) *in vitro*. Deste modo, os resultados não foram expressos em gráficos estatísticos.

5.2.7. Ensaio das Espécies Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)

No experimento TBARS, dentre os compostos testados, o composto FSeMDTT teve a capacidade de proteger contra a peroxidação lipídica induzida por NPS, tanto no córtex quanto no hipocampo, em todas as concentrações testadas (10-250 µM). Entretanto, o composto FDTT, sem o selênio em sua estrutura, apresentou a capacidade de proteger contra esta peroxidação nas concentrações de 100 e 250 µM em hipocampo, com menor significância. No tecido do fígado não houveram alterações na peroxidação lipídica em nenhuma das concentrações testadas, em ambos os compostos. Os resultados foram demonstrados na Figura 18.

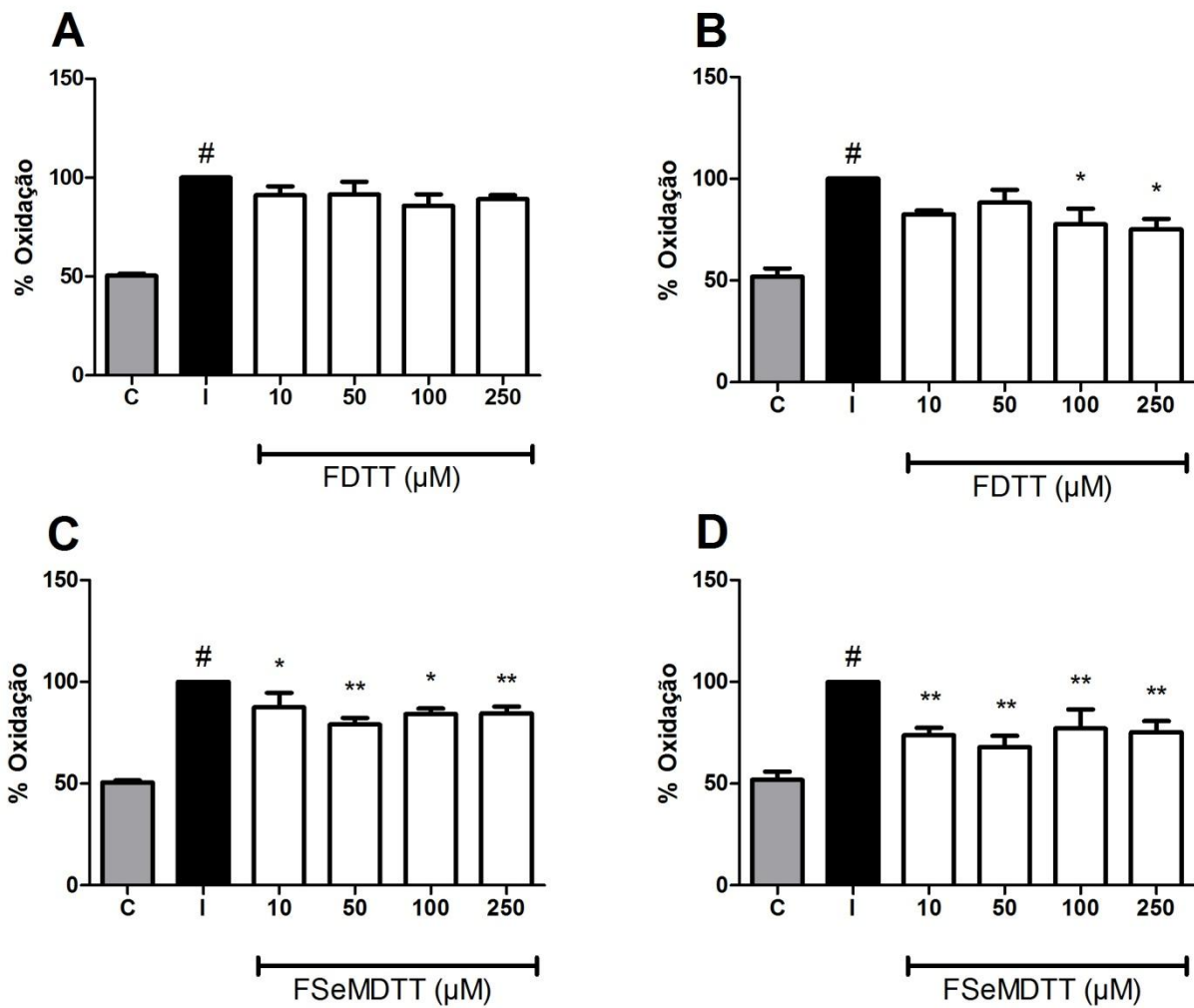


Figura 18. Atividade dos compostos FDTT em córtex (A) e hipocampo (B), e FSeMDTT também em córtex (C) e hipocampo (D), frente a peroxidação lipídica induzida por NPS no ensaio das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico. Resultados estão expressos como média \pm desvio padrão. As análises foram feitas por ANOVA seguido pelo teste *post hoc* de Student-Newman-Keuls. (*) $p < 0,05$ e (**) $p < 0,01$ quando comparado ao grupo induzido; (#) $p < 0,001$ quando comparado ao grupo controle. Abreviações: C: Controle; I: Induzido.

5.2.8. Ensaio das Espécies Reativas (ER)

No ensaio das ER, dentre os compostos testados, o FDTT em todas as concentrações testadas (10-250 μM) se destacou apresentando capacidade de proteger contra a formação de ER em córtex e no hipocampo,. Entretanto, o FSeMDTT foi capaz de proteger contra a formação de ER em todas as concentrações testadas (10-250 μM), em córtex e na concentração de 250 μM no hipocampo, com menor

significância quando comparado ao FDTT. Os resultados foram demonstrados na figura 19.

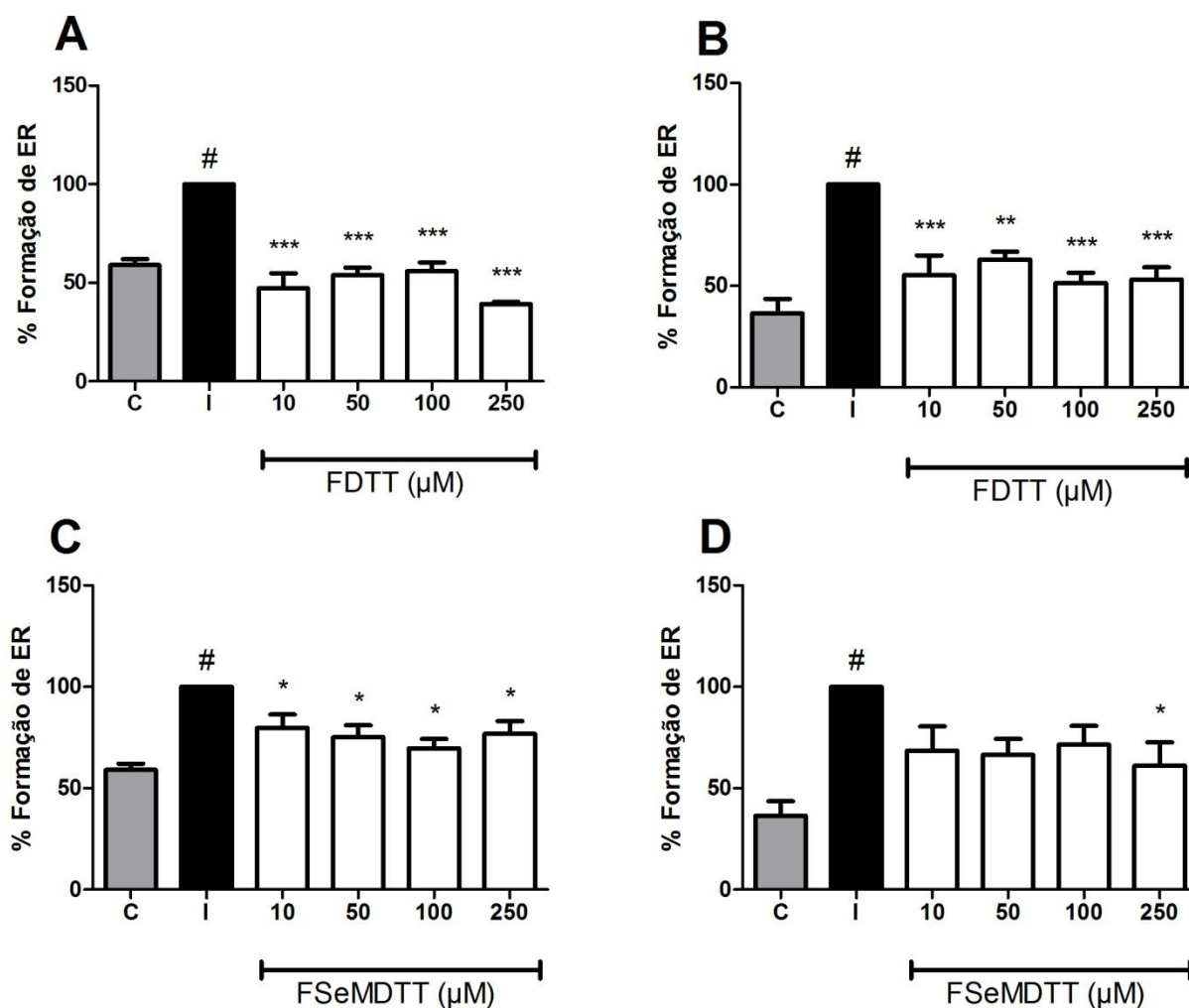


Figura 19. Atividade dos compostos FDTT em córtex (A) e hipocampo (B), e FSeMDTT também em córtex (C) e hipocampo (D), frente a formação de ER. Resultados estão expressos como média \pm desvio padrão. As análises foram feitas por ANOVA seguido pelo teste *post hoc* de Student-Newman-Keuls. (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$ e (***) $p < 0,001$ quando comparado ao grupo induzido; (#) $p < 0,001$ quando comparado ao grupo controle. Abreviações: C: Controle; I: Induzido

5.2.9. Atividade da enzima Acetilcolinesterase (AChE) Tecidual

No ensaio da atividade da enzima AChE tecidual, dentre os compostos testados, o composto FSeMDTT foi capaz de inibir a atividade da enzima AChE no hipocampo, em todas as concentrações testadas (10-250 μM) (Figura 20).

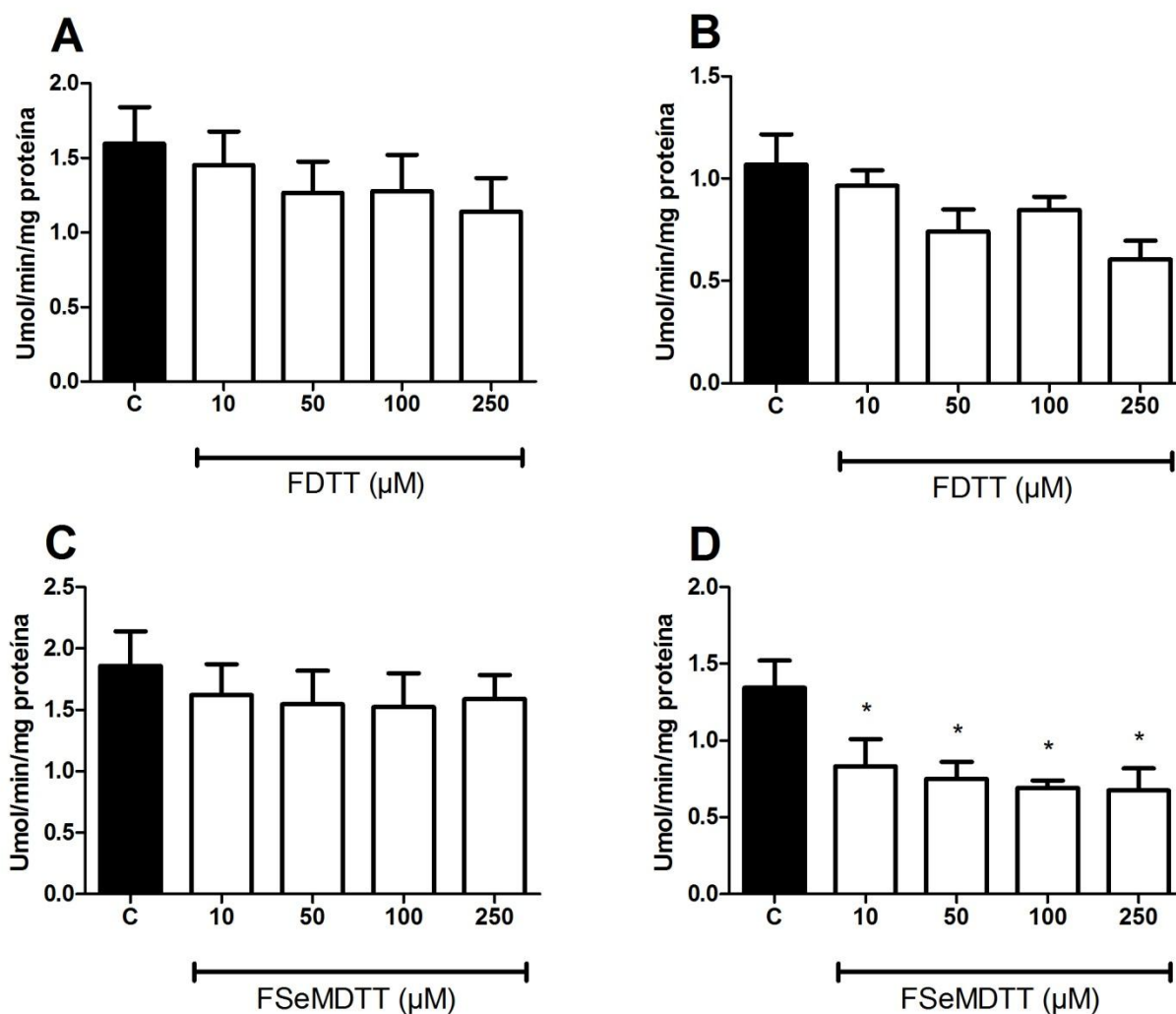


Figura 20. Atividade dos compostos FDTT em córtex (A) e hipocampo (B), e FSeMDTT também em córtex (C) e hipocampo (D), frente a atividade da enzima acetilcolinesterase. Resultados estão expressos como média \pm desvio padrão. As análises foram feitas por ANOVA seguido pelo teste *post hoc* de Student-Newman-Keuls. (*) $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle. Abreviações: C: Controle.

6. Discussão

Tendo em vista que a DA é a maior causa associada à demência, fator que leva a um grande impacto socioeconômico (ILHA et al., 2014), em conjunto com a ineficiência dos fármacos disponíveis para seu tratamento (DOODY et al., 2003), a busca por novas moléculas que sejam capazes de tratar a DA é de extrema importância. No presente estudo, foram avaliados alguns dos fatores relacionados ao a esta doença, sendo eles: atividade da enzima AChE, EO.

Na DA, a neurotransmissão colinérgica encontra-se alterada, visto que esta patologia se caracteriza pela degeneração e morte de neurônios colinérgicos no SNC. (FRANCIS et al., 1999). Deste modo, os compostos testados, FDDT e FSeMDTT, foram avaliados quanto a sua capacidade de inibir a enzima AChE, o que contribui para um aumento de ACh na fenda sináptica. Somente o composto com selênio em sua estrutura, FSeMDTT, foi capaz de reduzir esta atividade enzimática em hipocampo, semelhante ao que foi encontrado por ISOMAE et al. (2002). Essa exclusividade de ação inibitória pode ser positiva, uma vez que em outro estudo (KASA et al., 2000), o hipocampo se mostrou mais resistente, frente a inibição dessa enzima. Além disso, a ação do composto sobre a AChE pode variar de acordo com a região cerebral, e de acordo com a concentração, podendo haver também, maior afinidade pelo hipocampo. O hipocampo é uma estrutura cerebral relacionada a formação de memória, sendo assim amplamente ligada a DA, visto que um dos sintomas é a perda de memória (HYMAN et al., 2016). Além disso, é no hipocampo que ocorre a maior perda de neurônios durante a DA (WEST et al., 1994).

Embora na DM os compostos apresentassem possível interação com a enzima AChE, os resultados na atividade da mesma não foram correspondentes. Uma vez que não é possível, através desta análise, avaliar o tipo de interação envolvida entre os compostos testados e enzima. Para tanto, é necessário o uso de outro programa de DM, onde se avalia a capacidade inibitória, através da flexibilidade conformacional da molécula (AKULA et al, 2006). Desse modo, a interação pode não ser inibitória de acordo com o ensaio da atividade da enzima AChE, embora possuam afinidade pela mesma.

Além disso, outro fator que pode justificar os resultados obtidos frente a atividade da enzima AChE, são os resíduos de aminoácidos dos sítios CAS e PAS, em

contato com os compostos em sua melhor conformação. Diferente de outros iAChE, os compostos FDTT e FSeMDTT, se ligam a resíduos diferentes (ATANASOVA et al., 2015) ou somente com pouca semelhança (SIPPL et al., 2001). Alguns dos resíduos ligados a inibição da enzima nos sítios CAS e PAS, são SER200, HIS440, GLU327; e TRP84, PHE330 e TRP279, respectivamente. Isso pode alterar sua ação, deixando de inibir a enzima AChE.

Outro fator avaliado foi o EO, parâmetro que possui grande importância, visto que está presente em várias doenças neurodegenerativas, devido ao dano que causa as biomoléculas do organismo humano (LI et al, 2013). Além disso, é EO que leva a oxidação de proteínas vitais para as células, envolvidas no metabolismo celular (TRAMUTOLA et al., 2016). Neste sentido existe uma correlação direta entre o EO, onde a formação da A β e formação de seus agregados, levam a respostas inflamatórias e geram EO. O EO por sua vez, contribui com a hiperfosforilação da proteína Tau (LLORET et al, 2015; LIU et al, 2015).

Neste contexto, foi avaliada a capacidade antioxidante dos compostos, ou seja, sua capacidade de restaurar o equilíbrio em um quadro de EO, caracterizado por um desequilíbrio em moléculas pró e antioxidantes. Para tanto foram realizados ensaios *in vitro*, como a neutralização dos radicais sintéticos DPPH e ABTS, ensaio FRAP, capacidade sequestrante do radical hidroxil, e atividade mimética a enzima SOD. Os compostos testados não apresentaram atividade antioxidante nestes ensaios.

Por outro lado, nos ensaios que utilizam tecido animal, TBARS e das ER, os compostos demonstraram resultados significativos, em córtex e hipocampo, demonstrando assim uma atividade antioxidante interessante. No fígado não houve alterações na peroxidação lipídica (TBARS) em ambos os compostos testados, o que mostra um resultado interessante, visto alguns dos iAChE disponíveis no mercado levam a uma hepatotoxicidade (WU et al., 2010). O ensaio TBARS quantifica a produção de molondialdeídos, sendo estes um produto da peroxidação lipídica. Desse modo, os compostos mostram ser capazes de proteger lipídeos da oxidação gerada pela indução com NPS, que gera espécies reativas de nitrogênio (DRAPUR et al, 1990). No ensaio das ER, foi analisada a capacidade dos compostos em neutralizar as espécies reativas ou impedir sua formação. Esta determinação ocorre através da indução da formação de ER's, através de azida sódica. Posteriormente, ocorre formação de fluorescência da presença destas espécies, assim ocorre uma baixa da fluorescência caso o composto seja efetivo em inibi-las (LOETCHUTINAT et al, 2005).

Além das atividades testadas, frente ao EO e a depleção de ACh presentes na DA, foi testada a capacidade quelante dos compostos, visto que os íons metálicos podem contribuir desde a formação do aglomerados de A β , fosforilação da proteína Tau, ou até a própria geração de espécies reativas e EO (UNZETE et al, 2016). Entretanto os compostos testados não foram capazes de quelar o íon ferroso utilizado no ensaio.

Assim, fazendo uma comparação entre os dois compostos testados, FDTT e FSeMDTT, o composto contendo Se, foi o que apresentou os melhores resultados. Entretanto, no ensaio das ER, foi o composto FDTT que apresentou melhor resultado. Este efeito pode ser explicado pela diferença das metodologias do TBARS e das ER. No TBARS o NPS é a substância utilizada para induzir a peroxidação lipídica, a qual gera espécies reativas de nitrogênio (NAZARI et al., 2012). No entanto, no ensaio das ER, a azida bloqueia o complexo IV da cadeia transportadora de elétrons, assim agindo como indutor neste ensaio (LOETCHUTINAT et al., 2005). Com o bloqueio deste complexo há um aumento da produção do radical ânion superóxido e espécies reativas decorrentes do bloqueio da bomba de prótons (complexo IV) e consequente baixa na redução do oxigênio proveniente deste processo celular (KEILIN et al., 1936). Desse modo, esses resultados podem indicar uma diferença no mecanismo de ação antioxidante dos compostos, pela preferência de ação sobre as diferentes ER induzidas nos ensaios realizados.

Além disso, visto que as ER que são produzidas no ensaio do TBARS e no ensaio das ER são muito danosas às biomoléculas do organismo, o potencial antioxidante dos compostos testados representa um importante efeito biológico, com destaque para o composto FSeMDTT. Sendo assim, pode-se atribuir os melhores resultados a presença do selênio na estrutura química do composto, pois é este elemento que difere as duas estruturas dos compostos. Isso pode ser explicado pela atividade antioxidante do Se, que faz parte de selenoproteínas, que possuem importantes funções fisiológicas (BROWN et al., 2001).

7. Conclusão e perspectivas

Podemos afirmar que, a partir do que foi exposto, os compostos FDDT e FSeMDTT apresentaram potencial antioxidante, nas estruturas de córtex e hipocampo, frente a peroxidação lipídica induzida por NPS e na produção de ER. Desse modo, os resultados sugerem que os compostos testados, podem vir a ser possíveis moléculas no tratamento da DA, frente ao EO. A partir desses resultados promissores, mais estudos são necessários para a melhor compreensão da ação dos compostos no início e progressão da DA.

Considerando os resultados obtidos no presente trabalho, os possíveis trabalhos ainda a serem realizados com os compostos FDDT e FSeMDTT, são:

- Avaliar outras atividades biológicas dos compostos.
- Analisar outros mecanismos, pelos quais os compostos possam agir em um dos fatores patológicos da DA, visando tratamento multi-alvo.
- Investigar toxicidade dos compostos, avaliando sua segurança.

8. Referências Bibliográficas

- AKULA, N.; LECANU, L.; GREESON, J.; PAPADOPOULOS, V. 3D QSAR studies of AChE inhibitors based on molecular docking scores and CoMFA. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**: v. 16, p. 6277-6280, 2006.
- ALBARRACIN, S.L.; STAB, B.; CASAS, Z.; SUTACHAN, J.J.; SAMUDIO, I.; GONZALEZ, J.; GONZALO, L.; CAPANI, F.; MORALES, L.; BARRETO, G.E. Effects of natural antioxidants in neurodegenerative disease. **Nutritional Neuroscience**: v. 15, p. 1-9, 2013.
- ARMATO, U.; CHAKRAVARTHY, B.; PACCHIANA, R.; WHITFIELD, J. Alzheimer's disease: An update of the roles of receptors, astrocytes and primary cilia (Review). **International Journal of Molecular Medicine**: v. 31, p. 3-10, 2013.
- ATANASOVA, M.; YORDANOV, N.; DIMITROV, I.; BERKOV, S.; DOYTCHINOVA, I. Molecular Docking Study on Galantamine Derivates as Colinesterase Inhibitors. **Molecular Informatics**: v. 34, p. 394-403, 2015.
- BAZGIER, V.; BERKA, K.; OTYEPKA, M.; BANÁS, P. Exponential Repulsion Improves Structural Predictability of Molecular Docking. **Journal of Computational Chemistry**: No prelo, 2016.
- BETTENS, K.; SLEEGERS, K.; BROEKHOVEN C.V. Genetic insights in Alzheimer's disease. **The Lancet Neurology**: v. 12, p. 92-104, 2013.
- BIRBEN, E.; SAHINER, U.M.; SACKESEN, C.; ERZURUM, S.; KALAYCI, O. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. **World Allergy Organization Journal**: v. 5, p. 9-19, 2012.
- BLAGOSKLONNY, M.V.; Aging: ROS or TOR. **Cell Cicle**: v. 7, p. 3344-3354, 2008.
- 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, p. 248-254, 1976.
- BROD, L. M. P.; FRONZA, M. G.; VARGAS, J. P.; LUDTKE, D. S.; LUCHESE, C.; WILHELM, E. A.; SAVEGNAGO, L. Involvement of monoaminergic system in the antidepressant-like effect of (octylseleno)-xylofuranoside in the mouse tail suspension test. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.*, v, 65, p. 201-207, 2016.
- BROWN, K.M.; ARTHUR, J.R. Selenium, selenoproteins and human health: a review. **Public Health Nutrition**: v. 4, p. 593-599, 2001.
- CACQUEVEL, M.; LEBEURRIER, N.; CHÉENNE, S.; VIVIEN, D. Cytokines in Neuroinflammation and Alzheimer's Disease. **Current Drug Targets**: v.5, p. 529-534, 2004.
- CERVELLATI, C.; WOOD, P.L.; ROMANI, A.; VALACCHI, G.; SQUERZANTI, M.; SANZ, J.M.; ORTOLANI, B.; ZULIANI, G. Oxidative challenge in Alzheimer's disease: state of knowledge and future needs. **Journal of Investigative Medicine**: v. 64, p. 21-32, 2016.
- CHEN, X.; WEHLE, S.; KUZMANOVIC, N.; MERGET, B.; HOLZGRABE, U.; KÖNIG, B.; SOTRIFFER, C.A.; DECKER, M. Acetylcholinesterase Inhibitors with Photowitchable Inhibition of β -Amiloid Aggregation. **ACS Chemical Neuroscience**: v. 5, p. 377-389, 2014.
- CHIGURUPATI, S.; SELVARAJ, M.; MANI, V.; SELVARAJAN, K.K.; MOHAMMAD, J.I.; KAVETI, B.; BERA, H.; PALANIMUTHU, V.R.; TEH, L.K.; SALLEH, M.Z. Identification of novel acetylcholinesterase inhibitors: Indolopyrazoline derivates and molecular docking studies. **Bioorganic Chemistry**: v.67, p. 9-17, 2016.

- CHRISTEN, Y. Oxidative stress and Alzheimer's disease. **The American Journal of Clinical Nutrition**: v. 71, p. 621-629, 2000.
- CUI, K.; LUO, X.; XU, K.; MURTHY, M.R.V. Role of oxidative stress in neurodegeneration: recent developments in assay methods for oxidative stress and nutraceutical antioxidants. **Progress In Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**: v. 28, p. 771-799, 2004.
- DAVID, B.; SÉVENET, T.; MORGAT, M.; GUENÁRD, D.; MOISAND, A.; TOLLON, Y.; THOISON, O.; WRIGHT, M. Rhazinilam mimics the cellular effects of taxol by different mechanisms of action. **Cell Motil Cytoskeleton**: v. 28, p. 317-26, 1994.
- DECKER E.A.; WELCH, B. Role of Ferritin as a Lipid Oxidation Catalyst in Muscle Food. **Journal of Agriculture and Food Quemistry**: v. 38, p. 674-677, 1990.
- DOODY, R.S. Current Treatments for Alzheimer's Disease: Colinesterase Inhibitors. **The Journal of Clinical Psychiatry**: v. 64, p. 11-17, 2003.
- DRAPUR, H.H.; HODLEY, M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**: v. 186, p. 421-431, 1990.
- DUCE, J.A.; TSATSANIS, A.; CATER, M.A.; JAMES, S.A.; ROBB, E.; WIKHE, K. Iron-export ferroxidase activity of beta-amyloid precursor protein is inhibited by zinc in Alzheimer's disease. **Cell**: v. 142, p. 857-867, 2010.
- EHTERAM H.; SHANAKI, M.; MOKHTARI, M.; SAKI, N.; SOLEIMANI, M.; PARIZADEH, S.M.R.; MOBARRA, N. Prooxidant-Antioxidant Balance and hs-CRP in Patients with β -Thalassemia Major. **Clinical Laboratory**: v. 60, p. 201-15, 2014.
- EIKELEBOOM, P.; BATE, C.; VAN GOOL, W.A.; HOOZEMANS, J.J.M.; ROZEMULLER, J.M.; VEERHUIS, R.; WILLIAMS, A. Neuroinflammation in Alzheimer's disease and prion disease. **Microglia in Disease**: v. 40, p. 232-239, 2002.
- ELLMAN, G.L.; COURTNEY, K.D.; ANDRES, V.; FEATHERSTONE, R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**: v. 7, p. 88-95, 1961.
- FRANCIS, P.T.; PALMER, A.M.; SNAPE, M.; WILCOCK, G.K. The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review in progress. **Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry**: v. 66, p. 137-147, 1999.
- FREITAS, A.S.; ROCHA, J.B.T. Diphenyl diselenide and analogs are substrates of cerebral rat thioredoxin reductase: A pathway for their neuroprotective effects. **Neuroscience Letters**: v. 503, p. 1-5, 2011.
- GAUR, S.; AGNIHOTRI, R. Trace Mineral Micronutrients and Cronic Periodontitis-a Review. **Biological Trace Element Research**: No prelo, 2016.
- GHISO, J.; FRANGIONE, B. Amiloidosis and Alzheimer's disease. **Advanced Drug Delivery Reviews**: v. 54, p. 1539-1551, 2002.
- GILL. R.; TSUNG, A.; BILLIAR, T. Linking oxidative stress to inXammation: toll-like receptors. **Free Radical Biology Medicine**: v. 48, p. 1121-1132, 2010.
- GSCHWEND, D.A.; GOOD, A.C.; KUNTZ, I.D. Molecular Docking Towards Drug Discovery. **Journal of Molecular Recognition**: v. 9, p. 175-186, 1996.
- GUO, T.; WEI, L.; SUN, J.; HOU, CL.; FAN, L. Antioxidant activities of extract and fractions from *Tuber indicum* Cooke & Masee. **Food Quemistry**: v. 127, p. 1634-1640, 2011.
- HENEKA, M.T.; CARSON, M.J.; KHOURY, J.E.; LANDRETH, G.E.; BROSSERON, F.; FEINSTEIN, D.L.; JACOBS, A.H; WYSS-CORAY, T.; VITORICA, J.; RANSOHOFF, R.M.; HERRUP, K.; FRAUTSCHY, S.A.; FINSSEN, B.; BROWN, G.C.; VERKHRATSKY, A.; YAMANAKA, K.; KOISTINAHO, J.; LATZ, E.; HALLE, A.; PETZOLD, G.; TOWN, T.; MORGAN, D.; SHINOHARA M.L.; PERRY, V.H.; HOLMES, C.; BAZAN, N.G.; BROCKS, D.J.; HUNOT, S.; JOSEPH, B.; DEIGENDESCH, N.; GARASCHUK, O.;

- BODDEKE, E.; DINARELLO, C.A.; BREITNER, J.C.; COLE, G.M.; GOLENBOCK, D.T.; KUMMER, M.P. Neuroinflammation in Alzheimer's disease. **Lancet Neurol**: v. 14, p. 388-405, 2015.
- HERMENEGILDO, C.; NIES, E.; MONSALVE, E.; PUERTAS, F.J.; HIGUERAS, V.; ROMERO, F.J. Some aspects of cardiac antioxidant defense: enselen treatment increases glutathione peroxidase activity in the rat heart. **Biochemical Society Transactions**: v. 18, p. 1193-1194, 1990.
- HUANG, X.; CUAJUNGCO, M.P., ATWOOD, C.S.; HARTSHORN, M.A.; TYNDALL, G.R.; HANSON, J.D. Cu (II) potentiation of Alzheimer A- β neurotoxicity. Correlation with cell-free hydrogen peroxide production and metal reduction. **J.Biol.Chem**: p. 274, v. 37111-37116, 1999.
- HUANG, X.; MOIR, R.D.; TANZI, R.E.; BUSH, A.I.; ROGERS, J.T. Redox- active metals, oxidative stress and Alzheimer's disease pathology. **Ann.N.Y. Acad.Sci.**: v. 1012, p. 153-163, 2004.
- HUNG, CW.; CHEN, YC.; HSIEH, WL.; CHIOU, SH.; KAO, CL. Aging and neurodegenerative diseases. **Ageing Research Reviews**: v. 9, p. 36-46, 2010.
- HWANG, O. Role of Oxidative Stress in Parkinson's Disease. **Experimental Neurobiology**: v. 22, p. 11-17, 2013.
- HYMAN, B.T.; HOESEN, G.W.V.; DAMASIO, A.R.; BARNES, C.L. Alzheimer's Disease: Cell-Specific Pathology Isolates the Hippocampal Formation. **Science**: v. 225, p. 1168-1170, 2016.
- ILHA, S.; ZAMBERLAN, C.; NICOLA, G.D.O.; ARAÚJO, A.S.; BACKES, D.S. Refletindo acerca da Doença de Alzheimer no Contexto Familiar do Idoso: Implicações para a Enfermagem. **Revista de Enfermagem do Centro Oeste Mineiro**; v. 4, p. 1057-1065, 2014.
- ISOMAE, K.; ISHIKAWA, M.; OHTA, M.; OGAWA, Y.; HASEGAWA, H.; KOHDA, T.; KAMEI, J. Effects of T-82, a New Quinoline Derivative, on Cholinesterase Activity and Extracellular Acetylcholine Concentration in Rat Brain. **The Japanese Journal of Pharmacology**: v. 88, p. 206-212, 2002.
- JAN, A. T.; AZAM, M.; SIDDIQUI, K.; ALI, A.; CHOI, I.; MOHD, Q.; HAQ, R. Heavy Metals and Human Health: Mechanistic Insight into Toxicity and Counter Defense System of Antioxidants. **International Journal of Molecular Sciences**; v. 16, p. 29592-29630, 2015.
- JOHNSON, G.; MOORE, S.W. The Peripheral Anionic Site of Acetylcholinesterase: Structure, Functions and Potential Role in Rational Drug Design. **Current Pharmaceutical Design**: v. 12, p. 217-225, 2006.
- KASA, P.; PAPP, H.; KASA JR, P.; TOROK, I. DONEPEZIL DOSE-DEPENDENTLY INHIBITS ACETYLCHOLINESTERASE ACTIVITY IN VARIOUS AREAS AND IN THE PRESYNAPTIC CHOLINERGIC AND THE POSTSYNAPTIC CHOLINOCEPTIVE ENZYME-POSITIVE STRUCTURES IN THE HUMAN AND RAT BRAIN. **Neuroscience**: v. 101, p. 89-100, 2000.
- KEILIN, D. The Action of Sodium Azide on Cellular Respiration and some Catalytic Oxidation Reactions. **Proceedings of The Royal Society**: v. 121, p. 165-173, 1936.
- KIELISZEK, M.; BLAZEJAK, S. Current Knowledge on the Importance of Selenium in Food for Living Organisms: A review. **Molecules**: v. 21, p. 609, 2016.
- KIM, S.J.; HAN, D.; MOON, K.D.; RHEE J.S. Measurement of Superoxide Dismutase-like activity of Natural Antioxidants. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**: v. 59, p. 822-826, 1995.

- KIM, H.K.; KIM, M.; KIM, S.; KIM, M.; CHUNG, J.H. Effects of Green Tea Polyphenol on Cognitive and Acetylcholinesterase Activities. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**: v. 68, p. 1977-1979, 2014.
- KUMAR, A., SINGH, A.; EKAVALI. A review on Alzheimer's disease pathophysiology and its management: an update. **Pharmacology Reports**: v. 67, p. 195-203, 2015.
- LEBEL, C.P.; BONDY, S.C. Oxygen radicals: common mediators of neurotoxicity. **Neurotoxicology and Teratology**: v. 13, p. 341-346, 1991.
- LI, J.; WULIJI, O.; LI, W.; JIANG, Z.; GHANBARI, H.A. Oxidative Stress and Neurodegenerative Disorders. **International Journal of Molecular Sciences**; v. 14, p. 24438-24475, 2013.
- LIANF, Y.; ZHOU, Y.; DENG, S.; CHEN, T. Microwave-Assisted Syntheses of Benzimidazole-Containing Selenadiazole Derivatives That Induce Cell-Cycle Arrest and Apoptosis in Human Breast Cancer Cells by Activation of the ROS/AKT Pathway. **ChemMedChem**: v. 11, p. 2339-2346, 2016.
- LIMÓN-PACHECO, J.; GONSEBATT, M.E. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. **Mutation Research**: v. 674, p. 137-147, 2009.
- LIU, Z.; LI, T.; LI, P.; WEI, N.; ZHAO, Z.; LIANG, H.; WEI, J. The Ambiguous Relationship of Oxidative Stress, Tau Hyperphosphorylation, and Autophagy Dysfunction in Alzheimer's Disease. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**: No prelo, 2015.
- LLORET, A.; FUCHSBERGER, T.; GIRALDO, E.; VINA, J. Molecular mechanisms linking amyloid beta toxicity and Tau hyperphosphorylation in Alzheimers disease. **Free Radical Biology**: v. 83, p. 186-191, 2015.
- LOETCHUTINAT, C.; KOTHAN, S.; DECHSUPA, S.; MEESUNGNOEN, J.; JAYGERIN, J-P.; MANKHETKORN, S. Spectrofluorometric determination of intracellular levels of reactive oxygen species in drug-sensitive and drug-resistant cancer cells using the 2',7'-dichlorofluorescein diacetate assay. **Radiation Physics and Chemistry**: v. 72, p. 323-331, 2005.
- LU, B.; PANG, P.T.; WOO, N.H. The Yin and the Yang of Neurotrophin Action. **Nature Revs/Neuroscience**: v. 6, p. 603-614, 2005.
- MAO, X.Y.; CAO, D.F.; LI, X.; YIN, J.Y.; WANG, Z.B.; ZHANG, Y.; MAO, C.X.; ZHOU, H.H.; LIU, Z.Q. Huperzine A ameliorates cognitive deficits in streptozotocin-induced diabetic rats. **International Journal of Molecular Sciences**: v. 15, p. 7667-83, 2014.
- MANDELKOW, EM.; MANDELKOW, E. Biochemistry and Cell Biology of Tau Protein in Neurofibrillary Degeneration. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**: v. 2, p. 1-25, 2012.
- MARKLUND, S.; MARKLUND, M. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. **European Journal of Biochemistry**: v. 47, p. 469-74, 1974.
- MENG, XY.; ZHANG, HX.; MEZEI, M.; CUI, M. Molecular Docking: A powerful approach for structure-based drug discovery. **Curr Comput Aided Drug Design**: v. 7, p. 146-157, 2011.
- MEOTTI, F.C.; STANGHERLIN, E.C.; ZENI, G.; NOGUEIRA, C.W.; ROCHA, J.B.T. Protective role of aryl and alkyl diselenides on lipid peroxidation. **Environmental Research**: v. 94, p. 276-282, 2004.
- MISRA, S.; BOYLAN, M.; SELVAM, A.; SPALLHOLZ, J.E.; BJORNSTEDT, M. Redox-Active Selenium Compounds-From Toxicity and Cell Death to Cancer Treatment. **Nutrients**: v. 7, p. 3536-3556, 2015.

- MOREIRA, P.I.; CARVALHO, C.; ZHU, X.; SMITH, M.A.; PERRY, G. Mitochondrial dysfunction is a trigger of Alzheimer's disease pathophysiology. **Biochimica et Biophysica Acta**: v. 1802, p. 2-10, 2010.
- NAZARI, Q.A.; MIZUNO, K.; KUME, T.; TAKATORI, Y.T.; IZUMI, Y.; AKAIKE, A. In Vivo brain oxidative stress model induced by microinjection of sodium nitroprusside in mice. **Journal of Pharmacological Sciences**: v. 120, p. 105-111, 2012.
- NEWMAN, E.A. New roles for astrocytes: Regulation of synaptic transmission. **Trends in Neurosciences**: v. 26, p. 536-542, 2003.
- NIMSE, S.B.; PAL, D. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. **Royal Society of Chemistry**: v. 5, p. 27986-28006, 2015.
- NOGUCHI, N. Ebselen, a useful tool for understanding cellular redox biology and a promising drug candidate for use in human diseases. **Archives of Biochemistry and Biophysics**: v. 595, p. 109-112, 2016.
- NOGUEIRA, C.W.; ROCHA, J.B.T. Toxicology and pharmacology of selenium: emphasis on synthetic organoselenium compounds. **Archives of Toxicology**: v. 85, p. 1313-1359, 2011.
- O'BRYANT, S.E.; HOBSON, V.; HALL, J.R.; WARING, S.C.; CHAN, W.; MASSMAN, P.; LACRITZ, L.; CULLUM, C.M.; DIAZ-ARRASTIA, R. Brain-derived neurotrophic factor levels in Alzheimer's disease. **Journal of Alzheimer's Disease**: v.17, p. 337-341, 2009.
- OSBORN, L.M.; KAMPHUIS, W.; WADMAN, W.J.; HOL, E.M. Astroglialosis: An integral player in the pathogenesis of Alzheimer's disease. **Progress in Neurobiology**: No prelo, 2016.
- ÖZTASKIN, N.; ÇETINKAYA, Y.; TASLIMI, P.; GÖKSU, S.; GÜLÇİN, I. Antioxidant and Acetylcholinesterase Inhibition Properties of Novel Bromophenol Derivatives. **Bio-Organic Chemistry**: v. 60, p. 49-57, 2015.
- PACHECO, J.C.O.; OPATZ, T. Ring Expansion of 1,2,3,4-Tetrahydroisoquinolines to Dibenzo[c,f]azonines. An Unexpected [1,4]-Sigmatropic Rearrangement of Nitrile-Stabilized Ammonium Ylides. **The Journal of Organic Chemistry**: v. 79, p. 5182-92, 2014.
- PANZA, F.; SOLFRIZZI, V.; SERIPA, D.; IMBIMBO, B.P.; LOZUPONE, M.; SANTAMATO, A.; ZECCA, C.; BARULLI M.R.; BELLOMO, A.; PILOTTO, A.; DANIELE, A.; GRECO, A.; LOGROSCINO, G. Tau-Centric Targets and Drugs in Clinical Development for the Treatment of Alzheimer's Disease. **BioMed Research International**: No prelo, 2016.
- RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant Activity Applying an Improved ABTS Radical Cation Decolorization Assay. **Free Radical Biology & Medicine**: v. 26, p. 1231-1237, 1999.
- REHMAN, S.U.; SHAH, S.A.; ALI, T.; CHUNG, J.II; KIM, M.O. Anthocyanins Reversed D-Galactose-Induced Oxidative Stress and Neuroinflammation Mediated Cognitive Impairment in Adult Rats. **Molecular Neurobiology**: No prelo, 2016.
- REIS, S. A.; PINZ, M; DUARTE, L. F.B.; ROEHRS, J. A.; ALVES, D.; LUCHESE, C.; WILHELM, E. A. 4-phenylselenyl-7-chloroquinoline, a novel multitarget compound with anxiolytic activity: Contribution of the glutamatergic system. **Jour. of Psych. Res.**, v.84, p. 191-199, 2017.
- SAVEGNAGO, .L; JESSE, C.R.; PINTO, L.G.; ROCHA, J.B.T.; BARANCELLI, D.A.; NOGUEIRA, C.W.; ZENI, G. Diphenyl diselenide exerts antidepressant-like and anxiolytic-like effects in mice: involvement of L-arginine-nitric oxide-soluble guanylate cyclase pathway in its antidepressant-like action. **Pharmacology, Biochemistry and Behaviour**: v. 88, p. 418-426, 2008.

- SEVIGNY, J.; CHIAO, P.; BUSSIÈRE, T.; WEINREB, P.H.; WILLIAMS, L.; MAIER, M.; DUNSTAN, R.; SALLOWAY, S.; CHEN, T.; LING, Y.; O'GORMAN, J.; QIAN, F.; ARASTU, M.; LI, M.; CHOLLATE, S.; BRENNAN, M.S.; QUINTERO-MONZON, O.; SCANNEVIN, R.H.; ARNOLD, H.M.; ENGBER, T.; RHODES, K.; FERRERO, J.; HANG, Y.; MIKULSKIS, A.; GRIMM, J.; HOCK, C.; NITSCH, R.M.; SANDROCK, A. The antibody aducanumab reduces A β plaques in Alzheimer's disease. **Nature**: v. 537, p. 50-56, 2016.
- SHARMA, O.P.; BHAT, T.K. DPPH antioxidant assay revisited. **Food Chemistry**: v. 113, p. 1202-1205, 2009.
- SIPPL, W.; CONTRERAS, J.M.; PARROLT, I.; RIVAL, Y.M.; WERMUTH, C.G. Structure-based 3D QSAR and design of novel acetylcholinesterase inhibitors. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**: v. 15, p. 395-410, 2001.
- SONG, J.H.; YU, J.T.; TAN, L. Brain-Derived Neurotrophic Factor in Alzheimer's Disease: Risk, Mechanisms, and Therapy. **Molecular Neurobiology**: v. 52, p. 1477-93, 2014.
- SOUSA, F. S. S. Avaliação da atividade antinociceptiva da α -(fenilseleno)acetofenona em camundongos. 2016. 87 f. Dissertação de mestrado (Pós graduação em bioquímica e bioprospecção) – Centro de ciências químicas, farmacêuticas e de alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2016.
- STOREY, E.; CAPPAL, R. The amyloid precursor protein of Alzheimer's disease and the A β peptide. **Neuropathology and Applied Neurobiology**: v. 25, p. 81-97, 1999.
- SUGIMOTO, K.; TOYOSHIMA, K.; NONAKA, S.; KOTAKI, K.; UEDA, H.; TOKUYAMA, H. Protecting-Group-Free Total Synthesis of (-)-Rhazinilam and (-)-Rhazinicine using a Gold-Catalyzed Cascade Cyclization. **Angew. Chem.**: v. 52 p. 7168-7171, 2013.
- SULTANA, R.; BOYD-KIMBALL, D.; POON, H.F.; CAI, J.; PIERCE, W.M.; KLEIN, J.B.; MERCHANT, M.; MARKESBERY, W.R.; BUTTERFIELD, D.A. Redox proteomics identification of oxidized proteins in Alzheimer's disease hippocampus and cerebellum: An approach to understand pathological and biochemical alterations in AD. **Neurobiology of Aging**: v. 27, p. 1564-1576, 2006.
- SWERDLOW, R.H.; BURNS, J.M.; KHAN, S.M. The Alzheimer's Disease Mitochondrial Cascade Hypothesis: Progress and Perspectives. **Biochimica et Biophysica Acta**: v. 1842, p. 1219-1231, 2014.
- TAKASAGO, T., PETERS, E.E., GRAHAM, D.I., MASAYASU, H., MACRAE, I.M. Neuroprotective efficacy of ebselen, an anti-oxidant with anti-inflammatory actions, in a rodent model of permanent middle cerebral artery occlusion. **Brain Journal of Pharmacology**: v. 122, p. 1251–1256, 1997.
- TISHKINA, A.O.; STEPANICHEV, M.; ANIOL, V.A.; GULIAEVA, N.V. Functions of microglia in the healthy brain: focus on neuroplasticity. **Usp Fisiol Nauk**: v. 45, p. 3-18, 2014.
- TRAMUTOLA, A.; LANZILLOTTA, C.; PERLUIGI, M.; BUTTERFIELD, D.A. Oxidative Stress, Protein Modification and Alzheimer Disease. **Brain Research Bulletin**: No prelo, 2016.
- UNZETA, M.; ESTEBAN, G.; BOLEA, I.; FOGEL, W.A.; RAMSAY, R.R.; YODIM, M.B.H.; TIPTON, K.F.; MARCO-CONTELLI, J. Multi-Target Directed Donepezil-Like Ligands for Alzheimer's Disease. **Frontiers in Neuroscience**: No prelo, 2016.
- VALAVANIDIS, A.; VALHOGIANNI, T.; DASSENAKIS, M.; SCOULLOS, M. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. **Ecotoxicology and Environmental Safety**: v. 64, p. 178-189, 2006.
- VERKHRATSKY, A.; OLABARRIA, M.; NORISTANI, H.N.; YEH, C.Y.; RODRIGUEZ, J.J. Astrocytes in Alzheimer's disease. **Neurotherapeutics**: v. 4, p. 399-412, 2010.

- VIANELLO, R.; DOMENE, C.; MAVRI, J. The use of Multiscale Molecular Simulations in Understanding a Relationship between Structure and Function of Biological Systems of the Brain: The Application to Monamine Oxidase Enzymes. **Frontiers in Neuroscience**: v. 10, p. 327, 2016.
- WANG, Q.B.; XU, F.P.; WEI, C.X.; PENG, J.; DONG, X.D. Research progress on free radicals in human body. **Chinese Journal of Epidemiology**; v. 37, p. 1175-1182, 2016.
- WANG, Z.M.; CAI, P.; LIU, Q.H.; XU, D.Q.; YANG, X.L.; WU, J.J.; KONG, L.Y.; WANG, X.B. Rational modification of donepezil as multifunctional acetylcholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease. **European Journal of Medicinal Chemistry**: v. 123, p. 282-297, 2016.
- WEST, M.J.; COLEMAN, P.D.; FLOOD, D.G.; TRONCOSO, J.C. Differences in the pattern of hippocampal neuronal loss in normal ageing and Alzheimer's disease. **The Lancet**: v. 344, p. 769-772, 1994.
- WONG, S.P.; LAI, P.L.; JEN, H.W.K; Antioxidant activities of aqueous extracts of selected plants. **Food Chemistry**: v. 99, p. 775-83, 2005.
- WU, T.Y.; CHEN, C.P.; JINN, T.R. Alzheimer's disease: Aging, insomnia and epigenetics. **Taiwan J. Obstet. Gynecol.**: v. 49, p. 468-472, 2010.
- YAMAMOTO, A.; SHIN, R.W.; HASEGAWA, K.; NAIKI, H.; SATO, H.; KITAMOTO, T. Iron (III) induces aggregation of hyperphosphorylated tau and its reduction to iron (II) reverses the aggregation: Implications in the formation of neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. **J.Neurochem**: v. 82, p. 1137-1147, 2002.
- YE, X.; TAI, W.; ZHANG, D. The early events of Alzheimer's disease pathology: from mitochondrial dysfunction to BDNF axonal transport deficits. **Neurobiology of Aging**: v. 33, p. 1122.e1-10, 2012.
- YOUDIM, M.B.H. Iron in brain: implications for Parkinson's and Alzheimer's diseases. **Mount Sinai Journal of Medicine**: v. 55, p. 97-101, 1988.
- ZHELENA-DIMITROVA, D.ZH. Antioxidant and acetylcholinesterase inhibition properties of *Amorpha fruticosa* L. and *Phytolacca Americana* L. **Pharmacognosy Magazine**: v. 9, p. 109-113, 2013.
- ZHANG, F.; JIANG, L. Neuroinflammation in Alzheimer's disease. **Neuropsychiatric Disease & Treatment**: v. 11, p. 243-256, 2015.