



**RONAN MARTINS CARDOSO**

**EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE DERIVADO DE  
1,4-DIIDROPIRIDINA EM RESPOSTA AO ESTRESSE  
OXIDATIVO INDUZIDO EM *Caenorhabditis elegans***

**LAVRAS/MG  
2020**

**RONAN MARTINS CARDOSO**

**EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE DERIVADO DE 1,4-DIIDROPIRIDINA  
EM RESPOSTA AO ESTRESSE OXIDATIVO INDUZIDO EM  
*Caenorhabditis elegans***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, área de concentração em Alterações metabólicas, inflamação e alimentos funcionais, para a obtenção do título de Mestre.

Prof. Dr. Rodrigo Ferreira de Moura  
Orientador  
Prof. Dr. Rodnei Dennis Rossoni  
Coorientador

**LAVRAS/MG  
2020**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Cardoso, Ronan Martins.

Efeitos da administração de derivado de 1,4-diidropiridina em resposta ao estresse oxidativo induzido em *Caenorhabditis elegans*/ Ronan Martins Cardoso. - 2020.  
62 p.

Orientador(a): Rodrigo Ferreira de Moura.

Coorientador(a): Rodnei Dennis Rossoni.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Lavras, 2020.

Bibliografia.

1. *Caenorhabditis elegans*. 2. Estresse Oxidativo. 3. 1,4-diidropiridina. I. Moura, Rodrigo Ferreira de. II. Rossoni, Rodnei Dennis. III. Título.

O conteúdo desta obra é de responsabilidade do(a) autor(a) e de seu orientador(a).

**RONAN MARTINS CARDOSO**

**EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE DERIVADO DE 1,4-DIIDROPIRIDINA  
EM RESPOSTA AO ESTRESSE OXIDATIVO INDUZIDO EM  
*Caenorhabditis elegans***

**EFFECTS OF THE ADMINISTRATION OF 1,4-DIIDROPYRIDINE DERIVATIVE IN  
RESPONSE TO THE OXIDATIVE STRESS INDUCED IN  
*Caenorhabditis elegans***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, área de concentração em Alterações metabólicas, inflamação e alimentos funcionais, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADO em 27 de novembro de 2020.

Prof. Dr. Rodrigo Ferreira de Moura

Profa. Dra. Laura Cristina Jardim Porto UFLA

Profa. Dra. Camila Aparecida de Machado Oliveira UNIFESP



Prof. Dr. Rodrigo Ferreira de Moura  
Orientador

Prof. Dr. Rodney Dennis Rossoni  
Coorientador

**LAVRAS/MG  
2020**

*Aos meus pais*

*Guilhermino Souza Cardoso e Maria Aparecida Martins Cardoso,  
pelo presente da vida e por ensinarem-me a ser uma pessoa melhor.*

*Aos meus irmãos, cunhados e sobrinhos.*

*Aos meus amigos.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, sempre, por presentear-me com pais excepcionais e por iluminar minhas escolhas.

Agradeço aos meus pais, pela educação, pelo amor e pelo zelo que a mim dedicaram e por mostrar que a vida é perfeita, mesmo que seja simples. A eles, meu amor e gratidão por tudo.

Agradeço a meu cunhado Miguel, pela confiança em ceder seu carro por um bom tempo para que eu pudesse frequentar as aulas, após perder o meu num acidente.

À minha sobrinha Dáphila, por ser também irmã e amiga, três benefícios numa pessoa só. Pessoa extraordinária e que amo muito pelo ser humano que é.

À Gisele, outra pessoa extraordinária que Deus colocou no meu caminho, com tripla função: foi minha professora de graduação, depois chefe e, hoje, uma grande amiga.

Agradeço às colegas do mestrado Daniela, Joana, Dirceia e Eliane pela amizade e conversas proveitosas no café.

Agradeço aos técnicos de laboratório da Universidade Federal de Lavras (UFLA): Aline (Laboratório de Biologia Parasitária), Daniel e Sula (Laboratório de Bacteriologia), Isaac (Laboratório de Citologia e Histologia), Monalisa (Laboratório de Bioquímica) e Vanúzia (Laboratório de Química Orgânica) pela colaboração.

A todos os professores que contribuíram para meu desenvolvimento, crescimento e formação. Em especial, o Prof. Sérgio Scherrer, do Departamento de Química/UFLA.

Agradeço ao meu coorientador Prof. Dr. Rodnei Dennis Rossoni do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista (ICTSJC-UNESP), pela doação das cepas e por colaborar no estudo. E, aqui também, deixo meus agradecimentos à Evelyn Luzia de Souza Santos e ao Felipe de Camargo Ribeiro pela dedicação, orientação e conhecimentos compartilhados durante o estágio.

Uma das pessoas que não posso deixar de agradecer é o meu colega de mestrado e um amigo para a vida, Gustavo. Agradeço pelo companheirismo nos trabalhos e longos dias de laboratório. Sempre disponível e empenhado no que faz. Obrigado!

Ao meu orientador, Prof. Dr. Rodrigo Ferreira de Moura, pelo conhecimento e experiência compartilhados e pela compreensão e paciência neste processo. Meu muito obrigado!

*“A menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo.” (Albert Einstein)*

## RESUMO

O envelhecimento é um processo progressivo na vida de um organismo e pode levar à deterioração de tecidos, da integridade celular e à falência de órgãos. É nessa fase da vida que ocorrem mais evidências de vulnerabilidade, doenças crônicas e morte. A hipótese do estresse oxidativo propõe que envelhecimento é condicionado pelo aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS) no organismo, uma vez que os antioxidantes naturais diminuem sua função à medida que se envelhece. A estimativa para 2050 é que mais de 20% da população tenha 60 anos ou mais. Nesse contexto, a busca por compostos antioxidantes que desempenham papel na prevenção e tratamento de doenças relacionadas à idade faz-se importante. A quinolina é um heterocíclico de nitrogênio, que foi obtido pela primeira vez a partir de alcatrão de carvão, em 1834, e pode desempenhar função antioxidante e na longevidade. Nesse sentido, o objetivo foi avaliar os efeitos do composto sintético 2,7,7-trimetil-5-oxo-4-fenil-1,4,5,6,7,8-hexa-hidroquinolina-3-carboxilato de etila (QUI 1), derivado de 1,4-diidropiridina na sobrevivência e longevidade em cepas N2 e *glp-4;sek-1* de *Caenorhabditis elegans*, além da atividade antioxidante e antibacteriana. Para isso, os nemátodos foram tratados com as concentrações de 100, 250 e 500 µg/ml de QUI 1 e DMSO para controle. No início da vida adulta foram induzidos ao estresse térmico (35° C), osmótico (NaCl a 500 mM) e por peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 0,3%), e para análise de longevidade os nemátodos foram avaliados até que todos estivessem mortos. A análise dos ensaios de longevidade, estresse induzido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e térmico foi feita pela curva de sobrevivência de Kaplan-Meier e as diferenças entre grupos analisada pelo teste *log-rank*, enquanto que a análise comportamental da taxa de bombeamento faríngeo e ensaio de estresse osmótico pelo teste *Anova Two Way* e a comparação entre grupos pelos testes *post hoc* de Sidak e Bonferroni respectivamente. Os testes foram analisados no *software* GraphPad Prism v.8.0.2 com nível de significância pré-estabelecido em  $p < 0,05$ . QUI 1 apresentou atividade antioxidante com IC<sub>50</sub> de  $556,94 \pm 3,40 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$  em sua maior concentração utilizada. Quanto à atividade antibacteriana, bactérias *E. coli* (OP50) mostraram-se resistentes ao composto sem a formação de halo. Nenhum resultado significativo foi encontrado para os ensaios de estresse analisados e longevidade. Em conclusão, não foi encontrada evidência de que o tratamento com QUI 1 tenha influenciado na longevidade e na resistência ao estresse induzido em *C. elegans*.

**Palavras-chave:** *Caenorhabditis elegans*. Espécie Reativa de Oxigênio. Estresse Oxidativo. Longevidade. 1,4-diidropiridina.

## ABSTRACT

Aging is a progressive process in the life of an organism and can lead to the deterioration of tissues, cell integrity and organ failure. It is in this phase of life that there is more evidence of vulnerability, chronic illness and death. The oxidative stress hypothesis proposes that aging is conditioned by the increase in reactive oxygen species (ROS) in the body, since natural antioxidants decrease their function as you get older. The estimate for 2050 is that more than 20% of the population is 60 years old or older. In this context, the search for antioxidant compounds that play a role in the prevention and treatment of age-related diseases is important. Quinoline is a nitrogen heterocyclic, which was first obtained from coal tar in 1834, and can play antioxidant and longevity function. In this sense, the objective was to evaluate the effects of ethyl 2,7,7-trimethyl-5-oxo-4-phenyl-1,4,5,6,7,8-hexahydroquinoline-3-carboxylate (QUI 1), derived from 1,4-dihydropyridine, on survival and longevity in strains N2 and glp-4; sek-1 from *Caenorhabditis elegans*, in addition to antioxidant and antibacterial activity. For that, the nematodes were treated with concentrations of 100, 250 and 500 µg/ml of QUI 1 and DMSO for control. In early adulthood, they were induced to thermal stress (35°C), osmotic stress (500 mM NaCl) and hydrogen peroxide (0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), and for longevity analysis the nematodes were evaluated until all were dead. The analysis of the longevity, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced and thermal stress tests was performed using the Kaplan-Meier survival curve and the differences between groups analyzed by the log-rank test, while the behavioral analysis of the pharyngeal pumping rate and the osmotic stress test by the Anova Two Way test and the comparison between groups by the post hoc tests by Sidak and Bonferroni, respectively. The tests were analyzed using the GraphPad Prism v.8.0.2 software with a pre-established significance level of  $p < 0.05$ . QUI 1 showed antioxidant activity with an IC<sub>50</sub> of  $556.94 \pm 3.40 \mu\text{g} / \text{mL}^{-1}$  at its highest concentration used. As for antibacterial activity, *E. coli* bacteria (OP50) were resistant to the compound without the formation of a halo. No significant results were found for the analyzed stress and longevity tests. In conclusion, no evidence was found that treatment with QUI 1 influenced the longevity and resistance to stress induced in *C. elegans*.

**Keywords:** *Caenorhabditis elegans*. Longevity. Oxidative Stress. Reactive Oxygen Species. 1,4-dihydropyridine

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1-	Processo de defesa antioxidante enzimático.....	16
Figura 2-	Estrutura molecular da quinolina (benzopiridina).....	17
Figura 3-	Anatomia <i>C. elegans</i> , hermafrodita e macho respectivamente.....	19
Figura 4-	Ciclo de vida de <i>C. elegans</i> cultivado a 20° C.....	21
Figura 5-	Síntese de 1,4-diidropiridinas derivadas de benzaldeído, dimedona, acetoacetato de etila e acetato de amônia.....	26
Figura 6-	Atividade antioxidante dos compostos derivados de 1,4-diidropiridina.....	38
Figura 7-	Tempo máximo de vida de <i>C. elegans</i> tratados com diferentes concentrações de QUI 1 submetidos ao estresse térmico.....	41
Figura 8-	Tempo máximo de vida de <i>C. elegans</i> tratados com diferentes concentrações de QUI 1 submetidos ao estresse osmótico.....	42
Figura 9-	Tempo máximo de vida de <i>C. elegans</i> tratados com diferentes concentrações de QUI 1 submetidos ao estresse por H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	43
Figura 10-	Efeito do tratamento com diferentes concentrações de QUI 1 no tempo de vida de <i>C. elegans</i> .....	44
Figura 11-	Efeito do tratamento com diferentes concentrações de QUI 1 na taxa de bombeamento da faringe em <i>C. elegans</i> .....	45
Figura 12-	Proposta de mecanismo de estabilização de radicais DPPH por QUI 1.....	46
Quadro 1-	TSA dos compostos derivados de 1,4-diidropiridina e controle positivo.....	40
Tabela 1-	Estruturas isoméricas das diidropiridinas.....	18
Tabela 2-	Compostos quinolínicos derivados de 1,4-diidropiridina .....	28
Tabela 3-	Atividade antibacteriana do controle positivo.....	39

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>12</b>
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>14</b>
2.1 Envelhecimento.....	14
2.2 Mecanismos enzimáticos e não enzimáticos de combate a ROS.....	15
2.3 Quinolinas.....	16
2.4 <i>Caenorhabditis elegans</i> como modelo experimental .....	19
<b>3 HIPÓTESE.....</b>	<b>23</b>
<b>4 JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>24</b>
<b>5 OBJETIVOS.....</b>	<b>25</b>
5.1 Objetivo geral.....	25
5.2 Objetivos específicos.....	25
<b>6 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>26</b>
6.1 Síntese, análise antioxidante e antibacteriana e ensaio agudo de toxicidade dos derivados de 1,4-diidropiridina.....	26
6.1.1 Síntese de derivados de 1,4-diidropiridina.....	26
6.1.2 Análise da atividade antioxidante dos compostos derivados de 1,4-diidropiridina pela estabilização de radicais DPPH .....	29
6.1.3 Análise antibacteriana dos compostos derivados de 1,4-diidropiridina... ..	29
6.1.4 Ensaio de toxicidade aguda (Exposição Aguda).....	30
6.2 Manutenção das cepas de <i>Caenorhabditis elegans</i> .....	31
6.2.1 Cepa utilizada.....	31
6.2.2 Preparo de meios de crescimento em placas petri.....	31
6.2.3 Preparo de fonte bacteriana de alimento.....	31
6.2.4 Preparo do meio de crescimento de nemátodo (NGM).....	32
6.2.5 Manutenção das cepas.....	32
6.2.6 Preparo de placas para os ensaios.....	33
6.2.7 Sincronização dos nemátodos.....	33
6.4 Ensaios de tolerância ao estresse oxidativo induzido.....	34
6.4.1 Ensaio de resistência ao estresse térmico.....	34
6.4.2 Ensaio de resistência ao estresse osmótico.....	35

6.4.3 Ensaio de resistência ao estresse induzido por H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	35
6.5 Ensaio biológicos.....	35
6.5.1 Ensaio de longevidade.....	35
6.5.2 Quantificação da taxa de bombeamento da faringe.....	36
7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	37
8 RESULTADOS.....	38
8.1 Análise antioxidante por DPPH.....	38
8.2 Análise antibacteriana por TSA.....	39
8.3 Ensaio de toxicidade aguda.....	39
8.4 Ensaio de resistência ao estresse térmico.....	41
8.5 Ensaio de resistência ao estresse osmótico.....	41
8.6 Ensaio de resistência ao estresse induzido por H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	42
8.7 Ensaio de longevidade.....	43
8.8 Quantificação da taxa de bombeamento da faringe.....	44
9 DISCUSSÃO.....	46
9.1 Análise antioxidante e antibacteriana e ensaio agudo de toxicidade dos derivados de 1,4-diidropiridina.....	46
9.2 Ensaio de tolerância ao estresse oxidativo induzido e biológico.....	48
10 CONCLUSÃO.....	51
REFERÊNCIAS.....	52

## 1 INTRODUÇÃO

O envelhecimento é um aspecto característico na vida de um organismo (LIANG *et al.*, 2018) e pode levar à deterioração de tecidos, da integridade celular e à falência de órgãos (PINTO *et al.*, 2018). Stamper *et al.* (2017) definem de forma mais abrangente o envelhecimento como um processo progressivo que gera a diminuição da função fisiológica. É importante mencionar que é nessa fase da vida que ocorrem mais evidências de vulnerabilidade, doenças crônicas e morte (PINTO *et al.*, 2018; STAMPER *et al.* (2017).

Harman (1972) propôs a hipótese do estresse oxidativo do envelhecimento e, desde então, estudos vêm abordando a relação entre espécies reativas de oxigênio (ROS) e longevidade. Em tese, essa hipótese afirma que o envelhecimento é condicionado pelo aumento do dano molecular gerado pelas ROS, em detrimento da diminuição da ação antioxidante de enzimas. As ROS, subprodutos de reações bioquímicas celulares, são moléculas nocivas quando se acumulam no organismo, como ânions de superóxido ( $O_2^-$ ), radicais hidroxila (OH) e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (DETIENNE *et al.*, 2018). Embora o  $H_2O_2$  não tenha um radical livre em sua última camada eletrônica, é uma espécie com alto potencial reativo e capaz de atravessar as membranas celulares, apresentando-se potencialmente tóxico para as células (BARBOSA *et al.*, 2010).

Os antioxidantes enzimáticos como a catalase (CAT), glutathiona peroxidase (GPx) e superóxido dismutase (SOD) diminuem sua função à medida que se envelhece (LEE *et al.*, 2018). Isso cria condições oxidantes dentro das células e gera danos ao ácido desoxirribonucleico (DNA), perfis alterados de expressão gênica, interferência nas cascatas de sinalização, peroxidação e desregulação da homeostase proteica (SHARMA, PANDEY e SALUJA, 2018). Em geral, ocorre a perda da função fisiológica, levando ao encurtamento da vida útil (LEE *et al.*, 2018).

O estresse oxidativo causado pelo acúmulo de ROS está relacionado ao desenvolvimento de doenças neurodegenerativas, cardiovasculares e câncer (LEE *et al.*, 2018). Portanto, inibir as ROS, com estratégias antioxidantes, têm sido significativo em modelos experimentais para o estudo do tratamento de doenças, prolongamento da vida útil e longevidade (LIANG *et al.*, 2018; STAMPER *et al.*, 2017).

Alguns compostos heterocíclicos, denominados assim por apresentarem um elemento químico diferente do carbono no anel aromático, tanto de origem natural ou sintética, apresentam notáveis atividades biológicas e farmacológicas (JAIN *et al.*, 2016; WILHELM *et al.*, 2017). A atividade antioxidante de compostos quinolínicos tem mostrado expressivos resultados na resposta ao estresse oxidativo e refletido diretamente na sobrevida e longevidade de microrganismos em alguns estudos.

Alguns fatores de transcrição modulam a expressão gênica relacionada à resistência ao estresse oxidativo. Isso ocorre pela ativação da expressão de genes que codificam enzimas como SOD e CAT, responsáveis pela eliminação de ROS (BACK, BRAECKMAN e MATTHIJSSENS, 2012). Cepas de *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) com mutações nos genes *cpr-1*, *clec-60* (PARK *et al.*, 2018), *sod-3* (LEE *et al.*, 2018) e *daf-16* (SUGAWARA e SAKAMOTO, 2018) apresentam maior longevidade por terem ativadas a expressão dessas enzimas.

*C. elegans* é um nematoide de vida livre presente no solo e um modelo experimental bem estabelecido para o estudo do envelhecimento e longevidade (CHAUDHARI e KIPREOS, 2018; CHEN *et al.*, 2017; KOTLAR *et al.*, 2018; SHARMA, PANDEY e SALUJA, 2018; SIM *et al.*, 2018). Sua maior utilidade para esse tipo de estudo é explicada pelo fato de ser um organismo de tempo de vida curto, ciclo de vida rápido e facilidade de cultivo em laboratório (CHAUDHARI e KIPREOS, 2018; CHEN *et al.*, 2017). Com cerca de 80% de genes homólogos aos humanos (CHEN *et al.*, 2017), genoma sequenciado, facilidade em gerar linhagens transgênicas e vias moleculares bem conhecidas (CHEN *et al.*, 2017), é possível explorar de modo relativamente simples um sistema complexo no quesito longevidade (PARK *et al.*, 2018).

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Envelhecimento

O envelhecimento é um processo inevitável, progressivo e funcional de modo dependente do tempo de vida da maioria dos seres vivos (SUN, CHEN e WANG, 2017; SON e LEE, 2019) e pode variar muito entre as espécies e entre os próprios indivíduos (TAORMINA *et al.*, 2019).

O processo biológico do envelhecimento não é simples, por tratar-se de uma dinâmica entre as células, tecidos e órgãos. Outro fato é que a longevidade e o envelhecimento saudável são fenótipos complexos que envolvem fatores genéticos e ambientais (TREVISAN *et al.*, 2019). Sun, Chen e Wang (2017) citam a dieta, o exercício físico, fatores psicológicos e interações sociais como interferentes nesse processo.

Aqui, cabe apresentar dois conceitos já descritos por Tissenbaum (2014):

“Expectativa de vida ou longevidade é um parâmetro mensurável que define o tempo em que um organismo pode viver, mas não indica como ele está envelhecendo. O termo sobrevida, por essa razão, define o tempo em que o organismo é ativo, produtivo e livre de doenças associados à idade”.

Algumas hipóteses surgiram para tentar explicar a causa do envelhecimento, mas nenhuma delas prevaleceu até o momento. Esse fato é compreendido, uma vez que elucidar este processo numa única hipótese seria muito complexo, ao passo que todas se complementam (TAORMINA *et al.*, 2019).

Pela hipótese do estresse oxidativo, ROS, em altas concentrações (patológicas), causam danos a múltiplos componentes celulares, como danos ao DNA que se acumulam ao longo do tempo e, por fim, falhas celulares que contribuem para o envelhecimento. Em contrapartida, em níveis basais (fisiológico), atuam como moléculas sinalizadoras em diferentes vias. Esta resposta fisiológica das ROS é apontada como uma resposta adaptativa, mecanismo este denominado mitohormose, para promover a saúde e aumentar a expectativa de vida. Logo, as ROS não são simplesmente um subproduto metabólico tóxico indesejado, mas também uma importante molécula de sinalização, vital para a atividade celular e, por sua vez, há influência no campo do envelhecimento (SON e LEE, 2019).

## 2.2 Mecanismos enzimáticos e não enzimáticos de combate a ROS

O acúmulo de ROS resulta em estresse oxidativo, que pode causar danos a estruturas celulares. O equilíbrio entre as ROS no organismo é promovido por dois sistemas antioxidantes, enzimático e não enzimático, com importância fundamental na saúde do organismo (PUSKULLU *et al.*, 2016).

O excesso de ROS está relacionado a doenças de origem cardiovascular, inflamatória, neurodegenerativa, autoimune, câncer e diabetes mellitus (PUSKULLU *et al.*, 2016; WILHELM *et al.*, 2017; WEN *et al.*, 2018). Como exemplos, Phaniendra, Jestadi e Periyasamy (2014) citam a asma, artrite reumatoide, catarata, Alzheimer, Parkinson e o envelhecimento.

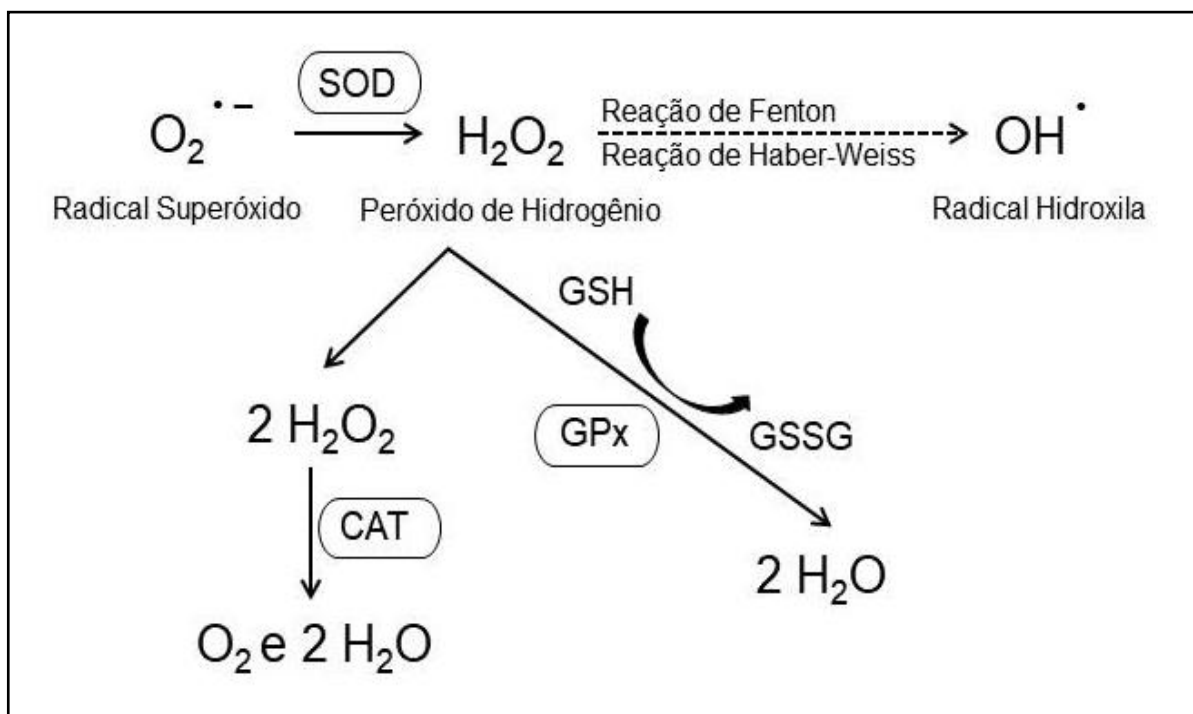
No sistema enzimático, algumas enzimas com a função de manter o equilíbrio oxidativo celular ocorrem naturalmente nos organismos e compõem um sistema de defesa contra ROS, como a CAT, GPx e SOD (Lee *et al.*, 2018).

Esse processo de defesa enzimático ocorre pela ação inicial da SOD que catalisa a dismutação  $\text{H}_2\text{O}_2$  a partir do radical  $\text{O}_2^-$ , enquanto que a CAT e GPx catalisam a conversão de  $\text{H}_2\text{O}_2$  em  $\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{O}_2$  (HE *et al.*, 2017). Em meio a esse mecanismo, excesso de  $\text{H}_2\text{O}_2$  é encontrado e sofre ação das reações de Fenton e Haber-Weiss. Essas reações possibilitam que o acúmulo de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , por meio da participação de metais de transição como o ferro (Fe) e cobre (Cu), tenha como produto final radicais OH, que não apresentam defesa enzimática (GILL e TUTEJA, 2010). Este processo está esquematizado na figura 1.

O sistema de defesa não enzimático consiste em vitaminas, minerais e alguns metabólitos, como descrito por He *et al.* (2017). A vitamina A e E podem ligar-se diretamente aos radicais peroxila (LOO), impedindo a continuação da cadeia oxidativa e a vitamina C atua na eliminação do  $\text{O}_2^-$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  e OH. Os minerais, selênio (Se) e zinco (Zn), são componentes importantes para a manutenção das enzimas antioxidantes e funcionam como substratos para estas. Os metabólitos, como o ácido úrico, bilirrubina e melatonina, também apresentam funções antioxidantes e atuam tanto na formação, quanto na eliminação de ROS.

Nesse sentido, o uso de moléculas antioxidantes que diminuam o estresse oxidativo, a incidência de doenças e aumentem a sobrevida têm sido propostos como alternativa farmacológica (WILHELM *et al.*, 2017).

Figura 1- Processo de defesa antioxidante enzimático.



Fonte: Adaptado de Phaniendra, Jestadi e Periyasamy (2014) e Michalczyk *et al.* (2019).

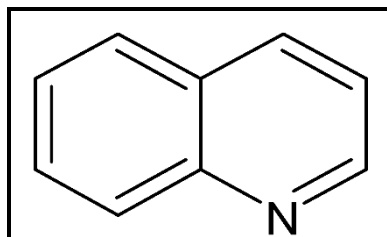
Rathor e Pandey (2018), utilizando uma molécula extraída de *Boerhaavia diffusa L. (Nyctaginaceae)*, Boeravinona B, mostraram em seus experimentos que *C. elegans* tratados com esse composto antioxidante a uma concentração de  $25 \mu M$  tiveram vida útil prolongada através da redução de ROS.

Lee *et al.* (2018) utilizaram *Zingiber officinale Roscoe (Zingiberaceae)* para encontrar possíveis propriedades resistentes ao estresse em *C. elegans* e, para tanto, isolaram o composto 6-gingerol para realizar os experimentos. Dessa forma, concluíram que esse composto elevou a atividade enzimática antioxidante e, por consequência, houve uma redução de ROS intracelulares.

### 2.3 Quinolinas

A quinolina (figura 2) é um composto heterocíclico orgânico aromático de fórmula molecular  $C_9H_7N$  e massa molar  $129.15858 \text{ g/mol}$ , obtido pela primeira vez a partir de alcatrão de carvão, sua principal fonte, em 1834 (PUSKULLU, TEKINER e SUZEN, 2013).

Figura 2- Estrutura molecular da quinolina (benzopiridina).



Fonte: Puskullu, Tekiner e Suzen (2013).

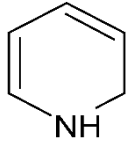
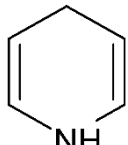
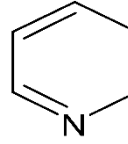
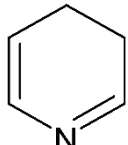
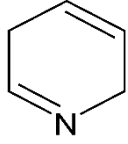
O anel quinolínico tem sido, desde então, utilizado para a síntese de muitos outros compostos (PUSKULLU, TEKINER e SUZEN, 2013).

Uma classe da quinolina, as polihidroquinolinas, hexahidroquinolinas, ou também denominadas diidropiridinas, foram sintetizadas pela primeira vez em 1882 por Hantzsch, químico alemão que, por meio de reação orgânica de três componentes ou Reação de Hantzsch, obteve cinco compostos isoméricos (tabela 1); porém, somente 1,2 e 1,4-diidropiridina conferem moléculas mais estáveis (EDRAKI *et al.*, 2009).

Essa classe de quinolinas apresenta grande atividade biológica, como vasodilatadora, broncodilatadora, antiaterosclerótica, antitumoral, hepatoprotetora, antidiabética (KUMAR *et al.*, 2010) e antioxidante (EDRAKI *et al.*, 2009).

Wilhelm *et al.* (2017) afirmam que os antioxidantes reduzem o estresse oxidativo e, por consequência, a incidência de várias doenças. Isso é evidenciado por Puskullu *et al.* (2016) em seu estudo, ao demonstrarem, experimentalmente, que alguns derivados de quinolinas podem funcionar como estabilizadores de ROS e, assim, reduzi-los no organismo. Salgueiro *et al.* (2014) ressaltam que a ação antioxidante destes compostos contra doenças associadas ao estresse oxidativo ocorre, provavelmente, mediante à eliminação de ROS, por sua alta capacidade nucleofílica. Derivados sintéticos de quinolina, como 2,4-difenilquinolina, 2,4-difenil-3-(fenilsanil)quinolina, 6-cloro-2,4-difenil-3-(fenilsanil)quinolina, 6-nitro-2,4-difenil-3-(fenilselanil)quinolina (WILHELM *et al.*, 2017) e 7-cloro-4-(fenilselanil)quinolina (PINZ *et al.*, 2018) apresentam ação antioxidante.

Tabela 1- Estruturas isoméricas das diidropiridinas.

<b>DIIDROPIRIDINAS</b>	
<b>Estrutura Molecular</b>	<b>Nomenclatura IUPAC</b>
	1,2-diidropiridina
	1,4-diidropiridina
	2,3-diidropiridina
	3,4-diidropiridina
	2,5-diidropiridina
<b>Fórmula Molecular</b>	$C_5H_7N$
<b>Massa molar</b>	81.11578 g/mol

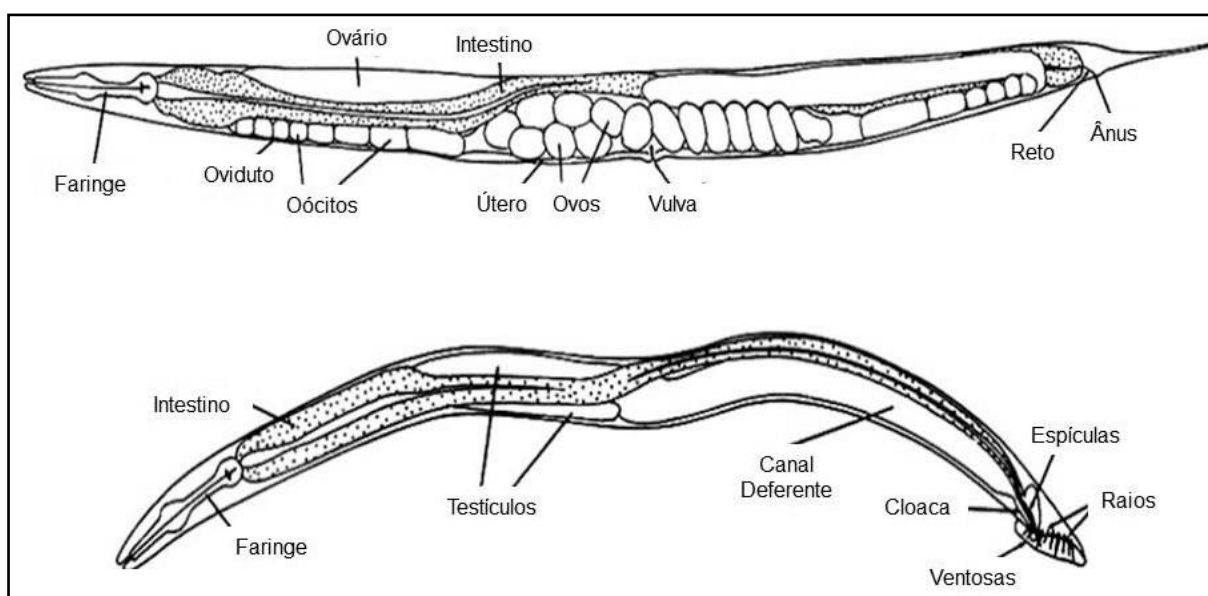
Fonte: Do autor, (2020).

## 2.4 *Caenorhabditis elegans* como modelo experimental

Em 1974, Brenner publicou seus estudos iniciais sobre *C. elegans* (BRENNER, 1974; TISSENBAUM, 2015). Em 1998, este organismo multicelular foi o primeiro a ter o sequenciamento completo do seu genoma, o que levou à identificação molecular de muitos genes-chave no processo biológico de desenvolvimento de células (CORSI, WIGHTAMAN e CHALFIE, 2015).

Presente no solo e com ciclo de vida curto, *C. elegans* apresenta comprimento próximo a 1 mm (TISSENBAUM, 2015; HWANG et al., 2018) e existe, principalmente, como hermafrodita, com machos representando uma frequência <0,2% (CORSI, WIGHTAMAN e CHALFIE, 2015). A figura 3 ilustra a anatomia básica desse organismo.

Figura 3- Anatomia *C. elegans*, hermafrodita e macho respectivamente.



Fonte: Adaptado de Strange (2003).

A principal fonte de alimento de *C. elegans* é bactéria, bacterívora. Em *habitat*, alimentam-se de bactérias presentes no solo e bactérias vegetais em decomposição. *Escherichia coli* (*E. coli*) tornou-se fonte de alimento padrão conveniente para manter os vermes em laboratório (GÓMEZ-ORTE et al. 2018).

De maneira dependente de fatores nutricionais e temperatura ambiental a qual estão submetidos, esses fatores podem afetar o desenvolvimento, crescimento,

fecundidade e sobrevivência dos vermes (PORTA-DE-LA-RIVA *et al.*, 2012 e HWANG *et al.*, 2018). Herndon *et al.* (2018) acrescentam mais um fator, as mutações genéticas. Esse conjunto de fatores tornam o tempo de vida útil desse organismo muito variável (TISSENBAUM, 2015). Em condições controladas em laboratório, esses vermes podem sobreviver muito mais tempo do que livre na natureza, justamente pela oferta de comida e temperatura ideal para seu desenvolvimento (HERNDON *et al.*, 2018).

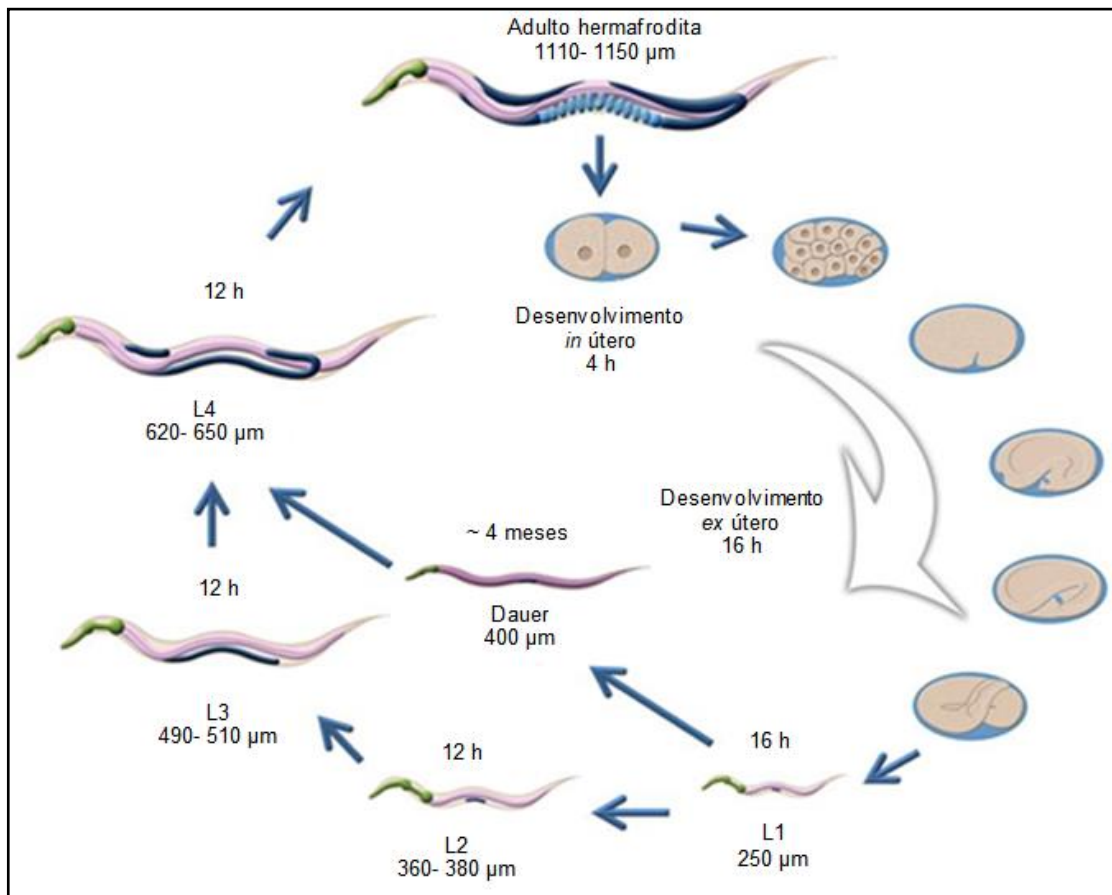
Em condições de ambiente e alimentação desfavoráveis, larvas no estágio L3 entram em um modo alternativo de sobrevivência, denominado de Dauer. Essas larvas prolongam seu tempo de vida até que, em condições propícias, retornem ao seu metabolismo e tão logo progridam para o estágio adulto (TISSENBAUM, 2015).

O ciclo de vida desse organismo é muito rápido. A 20° C a embriogênese de *C. elegans* leva, aproximadamente, 16 horas e, após a fertilização, uma casca de ovo bem resistente é formada. O embrião é mantido dentro da hermafrodita até o estágio de 24 células, momento este em que os ovos são colocados e desenvolvem-se de forma independente. Após a eclosão da larva, momento este chamado de estágio L1, os animais começam a alimentar-se e desenvolvem-se através de quatro estágios larvares (L1 a L4). O estágio L1 tem, aproximadamente, 16 horas de duração enquanto que os outros estágios apresentam 12 horas em média cada um. A troca de estágios ocorre com a troca da cutícula existente por uma nova, uma camada externa de colágeno que recobre o nemátodo e o bombeamento da faringe cessa. Aproximadamente 12 horas após a mudança para o estágio L4, os hermafroditas, já em estágio adulto, começam a se reproduzir (CORSI, WIGHTAMAN e CHALFIE, 2015).

Em condição padrão de laboratório, *C. elegans* podem ter vida útil de 2 a 3 semanas (HERNDON *et al.*, 2018).

Os hermafroditas, assim que se tornam adultos jovens, logo após passar do estágio L4 para adulto, reproduzem-se por um período de 3 a 4 dias, gerando cerca de 300 descendentes. Após o período de reprodução, os vermes entram em outro período denominado pós-reprodutivo, que dura de 2 a 3 semanas até a morte. Nesse período, as taxas de locomoção, contração faríngea e defecação diminuem e os tecidos deterioram-se (HERNDON *et al.*, 2018).

Figura 4- Ciclo de vida de *C. elegans* cultivado a 20° C.



Legenda: Ciclo de vida de *C. elegans* a 20° C representado desde o desenvolvimento *in* útero até a fase adulta do verme.

Fonte: Adaptado de Strange (2003); Corsi, Wightaman e Chalfie (2015) e Herndon *et al.* (2018).

O ciclo de vida a 25° C acelera o processo de desenvolvimento de embrião a adulto, o que a 20° C levaria um tempo maior. Além disso, o desenvolvimento contínuo de vermes a temperaturas acima de 25° C é possível deixar os nemátodos estéreis (CORSI, WIGHTAMAN e CHALFIE, 2015). Nesse caso, somente vermes com mutações sensíveis à temperatura tornam-se estéreis, já que a elevação da temperatura suprime a produção de espermatozoides. No entanto, pode reproduzir normalmente entre 15° e 20° C (LUCANIC *et al.*, 2018).

Nesse sentido, algumas características observáveis nesses organismos ao envelhecer são importantes para compreender esse processo, como as características de comportamento neuromusculares, de movimento corporal e bombeamento da faringe.

O movimento corporal sinusoidal bem coordenado de *C. elegans* é uma característica de vermes jovens (COLLINS *et al.*, 2007). O prolongamento do tempo de vida está associado à diminuição do movimento do corpo causado pela deterioração das fibras musculares e ocasiona a falta de movimento corporal da cabeça a cauda para locomover-se, o que o torna progressivamente mais lento e menos coordenado até cessar completamente (STAMPER *et al.*, 2017; PINTO *et al.*, 2018).

A faringe é um órgão neuromuscular que sofre contrações rítmicas que facilitam a alimentação e atinge cerca de 200 a 300 contrações ou bombeamentos por minuto em larvas adultas jovens (COLLINS *et al.* 2007) e pode chegar a um nível basal menor que 50 contrações em um adulto idoso (CHOW *et al.* 2006). O bombeamento da faringe declina-se com a idade e, por consequência, a ingestão de alimentos também (PINTO *et al.*, 2018).

Herndon *et al.* (2018) acrescenta que, após o período reprodutivo, as taxas de contração da faringe e locomoção diminuem gradativamente até cessar completamente. Esse importante fato de apresentar o ciclo de vida rápido e tempo de vida curto possibilitou que este organismo tornasse modelo para estudos sobre longevidade.

À medida que o organismo envelhece ocorrem várias mudanças comportamentais, reprodutivas, morfológicas e bioquímicas. Isso está relacionado ao aumento do dano oxidativo em uma variedade de moléculas (DNA, proteínas e lipídios), como afirmado por Back, Braeckman e Matthijssens (2012).

Segundo estes mesmos pesquisadores, uma maneira de investigar o papel das ROS no envelhecimento é avaliar a resistência ao estresse oxidativo. A via de sinalização da insulina IGF-1/ISS é uma via conservada e regula o envelhecimento de nemátodos a mamíferos. Em *C. elegans*, compreende um receptor semelhante à insulina (daf-2), que regula negativamente o fator de transcrição FOXO/DAF-16. Uma redução da função daf-2 duplica seu tempo de vida e esta extensão do tempo de vida de *C. elegans* é dependente de daf-16.

As vias relacionadas ao IIS e DAF-16 são induzidas por diversos fatores ambientais, nutrientes, calor, UV, metais pesados e estresse oxidativo. Essas vias promovem resistência e longevidade ao estresse oxidativo e modulam a expressão de genes relacionados à regulação de ROS (BACK, BRAECKMAN e MATTHIJSSENS, 2012).

### 3 HIPÓTESE

O composto sintético 2,7,7-trimetil-5-oxo-4-fenil-1,4,5,6,7,8-hexahidroquinolina-3-carboxilato de etila (representado por QUI 1), derivado de 1,4-diidropiridina, apresenta efeito positivo na sobrevivência e aumento da longevidade em *C. elegans* pela inibição ou redução de ROS intracelulares.

#### 4 JUSTIFICATIVA

O envelhecimento é caracterizado pela deterioração do tecido e da integridade celular, pode levar à falência de órgãos e está associado à incidência maior de doenças crônicas (PINTO *et al.*, 2018).

Pinto *et al.* (2018) ressaltam que a estimativa para 2050 é que 20% de toda a população tenha 60 anos ou mais. Isso representa um problema econômico em muitos países e, em face dessa questão, pesquisas relacionadas ao envelhecimento visam descobrir estratégias que possibilitem minimizar os efeitos das doenças relacionadas à idade (CHEN *et al.*, 2017; SUN, CHEN e WANG, 2017 e PINTO *et al.*, 2018).

A busca por compostos antioxidantes que atuam na prevenção e tratamento de doenças, aumentando a sobrevivência e longevidade, apresenta-se importante nesse cenário mundial.

Compostos derivados de 1,4-diidropiridinas apresentam grande atividade biológica e a inserção de grupos alcoxi (-OR) e hidroxí (-OH) nas posições 3 e 4 do anel fenil aumenta a atividade antioxidante (RANJBAR *et al.*, 2019). Além disso, a síntese desses compostos necessita de poucos recursos e são de baixo custo.

## 5 OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo geral

O objetivo do estudo é avaliar os efeitos do composto sintético QUI 1, derivado de 1,4-diidropiridina, na sobrevivência e longevidade de *C. elegans*.

### 5.2 Objetivos específicos

- Analisar a atividade antioxidante;
- Analisar a atividade antibacteriana em *E. coli* (OP50);
- Avaliar o nível de toxicidade em *C. elegans*;
- Avaliar o efeito da QUI 1 sobre o estresse térmico em *C. elegans*;
- Avaliar o efeito da QUI 1 sobre o estresse osmótico em *C. elegans*;
- Avaliar o efeito da QUI 1 sobre o estresse induzido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em *C. elegans*;
- Avaliar o efeito da QUI 1 na taxa de bombeamento da faringe de *C. elegans*;
- Avaliar o efeito da QUI 1 na longevidade de *C. elegans*.

## 6 MATERIAIS E MÉTODOS

### 6.1 Síntese, análise antioxidante e antibacteriana e ensaio agudo de toxicidade dos derivados de 1,4-diidropiridina

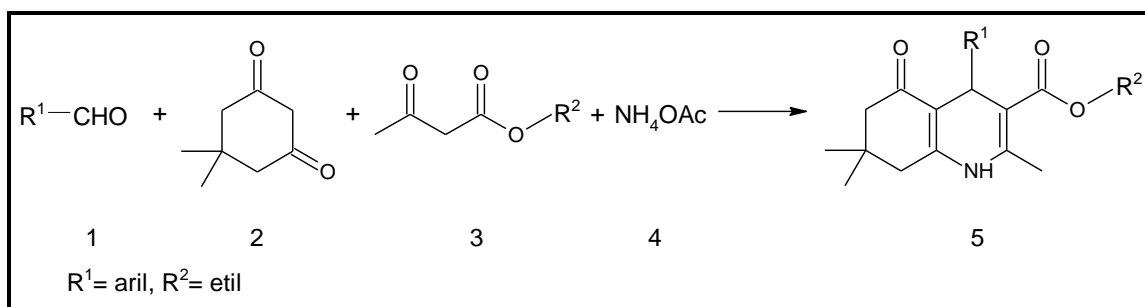
#### 6.1.1 Síntese de derivados de 1,4-diidropiridina

Os compostos derivados de 1,4-diidropiridina foram sintetizados no Laboratório de Bioquímica/ Departamento de Química da Universidade Federal de Lavras (DQI-UFLA) a uma temperatura ambiente e sem a adição de solventes, através de reações de multicomponentes. Reações isentas de solventes são uma alternativa, ambientalmente favorável, por não gerar resíduos tóxicos e por tornar o processo rápido e com rendimentos satisfatórios.

Inicialmente, benzaldeído (2 mmol), dimedona (2 mmol), acetoacetato de etila (2 mmol) e acetato de amônia (3 mmol) foram aquecidos sob refluxo em etanol. Após um período de 4 horas, essa massa foi recristalizada em etanol e, posteriormente, adicionada a um pilão, em seguida, triturada com almofariz até gerar uma massa homogênea em estado parcialmente líquido. Para obter os compostos, essa massa foi recristalizada novamente em etanol e passada para o estado sólido, com uma coloração amarela clara.

Todos os derivados foram sintetizados seguindo a metodologia de Kumar *et al.* (2008). O esquema da reação está representado na figura 5:

Figura 5- Síntese de 1,4-diidropiridinas derivadas de benzaldeído, dimedona, acetoacetato de etila e acetato de amônia.

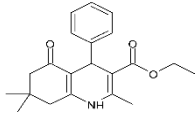

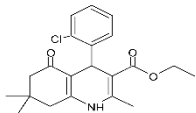

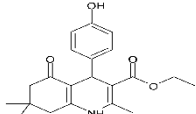

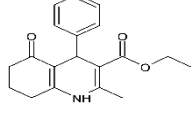

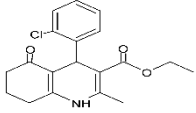
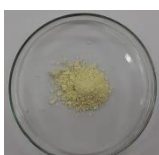
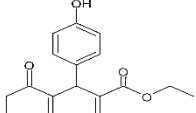



Legenda: 1- Benzaldeído; 2- Dimedona; 3- Acetoacetato de etila; 4- Acetato de amônia; 5- 1,4-diidropiridina.

Fonte: Kumar *et al.* (2008).

Os diferentes compostos de 1,4-diidropirina foram obtidos variando-se o reagente benzaldeído. Todos os compostos obtiveram bons rendimentos. Tais compostos sintetizados estão representados na tabela 2.

Tabela 2- Compostos quinolínicos derivados de 1,4-diidropiridina.

Compostos	Estrutura Molecular	Fórmula Molecular	Massa Molar	Nomenclatura IUPAC	Imagem
QUI 1		$C_{21}H_{25}NO_3$	339.4281 g/mol	2,7,7-trimetil-5-oxo-4-fenil-1,4,5,6,7,8-hexa-hidroquinolina-3-carboxilato de etila	
QUI 2		$C_{21}H_{24}ClNO_3$	373.87316 g/mol	4-(2-clorofenil) - 2,7,7-trimetil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexa-hidroquinolina-3-carboxilato de etila	
QUI 3		$C_{21}H_{25}NO_4$	355.4275 g/mol	4-(4-hidroxifenil) - 2,7,7-trimetil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexa-hidroquinolina-3-carboxilato de etila	
QUI 4		$C_{19}H_{21}NO_3$	311.37499 g/mol	2-metil-5-oxo-4-fenil-1,4,5,6,7,8-hexa-hidroquinolina-3-carboxilato de etila	
QUI 5		$C_{19}H_{20}ClNO_3$	345.82 g/mol	4-(2-clorofenil)-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexa-hidroquinolina-3-carboxilato de etila	
QUI 6		$C_{19}H_{21}NO_4$	327.37434 g/mol	4-(4-hidroxifenil)-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexa-hidroquinolina-3-carboxilato de etila	

Fonte: Do autor (2020).

### 6.1.2 Análise da atividade antioxidante dos compostos derivados de 1,4-diidropiridina pela estabilização de radicais DPPH

A análise da atividade antioxidante foi realizada no Laboratório de Química Orgânica/ Departamento de Química da Universidade Federal de Lavras (DQI-UFLA).

Para determinar a atividade antioxidante dos compostos quinolínicos, foi adotado o método colorimétrico de estabilização de radicais 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH), seguindo metodologia proposta por Ferreira *et al.* (2019). O método baseia-se na transferência de elétrons ou átomos do antioxidante ao radical DPPH. A redução do 2,2-difenil-1-picril-hidrazil é observada pela mudança em sua coloração, de roxo para amarelo e consequente diminuição de absorbância a 515 nm (SIRIVIBULKOVIT, NOUANTHAVONG e SAMEENOI, 2018).

Em tubos de ensaio foram adicionados 0,3 mL das amostras nas concentrações de 25, 50, 100, 150, 200, 250 e 500 µg/mL e 2,7 mL da solução etanólica de DPPH a uma concentração de 40 mg L<sup>-1</sup>). O controle positivo foi realizado a partir de 0,3 mL BHT (Butilato de Hidroxitolueno) e o controle negativo por adição de 0,3 mL de etanol, ambos incubados com 2,7 mL de DPPH. Após esse procedimento, as amostras foram homogeneizadas e incubadas ao abrigo de luz em temperatura ambiente por 60 minutos. Passado esse tempo, a absorbância (A) das amostras foi mensurada por espectrofotômetro a um comprimento de onda de 515 nm e as análises foram realizadas em triplicata.

A porcentagem da atividade antioxidante (%AA) dos compostos quinolínicos foi calculada pela a equação a seguir.

$$\%AA = 1 - [(A_{\text{amostra}} / A_{\text{controle}}) \times 100]$$

### 6.1.3 Análise antibacteriana dos compostos derivados de 1,4-diidropiridina

A análise antibacteriana dos compostos derivados de 1,4-diidropiridina foi realizada no Laboratório de Bacteriologia/ Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Lavras (DMV-UFLA) pelo teste de sensibilidade aos antibióticos (TSA) por meio do método de difusão em disco (HOELZER *et al.* 2011) e

seguindo o protocolo proposto por Photolo *et al.* (2020).

A cultura bacteriana de *E. coli* (OP50) foi preparada no dia anterior à realização do TSA, de acordo como descrito item 6.2.3 e placas petri de 100 mm preparadas com ágar Mueller-Hinton (MH). Discos de papel filtro de 4 mm esterilizados e embebidos com 5 µl dos compostos derivados de 1,4-diidropiridina nas concentrações de 100, 250 e 500 µg foram preparados previamente.

Após estes procedimentos cepa de *E. coli* (OP50) foi espalhada nas placas petri com ágar MH seguido pelo depósito dos discos de papel filtro contendo os compostos. Para controle positivo, discos antibióticos (Sensifar®) com ampicilina (10 µg), norfloxacina (10 µg) e nitrofurantoina (300 µg) foram empregados. Após preparadas, as placas seguiram para incubação por 24 horas a 37°C.

Após o período de incubação, a atividade antimicrobiana foi avaliada observando e medindo os diâmetros da zona de inibição (ou halo) em mm com um paquímetro. Os resultados foram classificados como resistente, intermediário ou suscetível.

#### **6.1.4 Ensaio de toxicidade aguda (Exposição Aguda)**

Para avaliar a toxicidade aguda dos compostos, 25 vermes em estágio L4 sincronizados, como descrito no item 6.2.7, foram transferidos para placas de 24 poços contendo meio de crescimento de nemátodo (NGM), como descrito no item 6.2.6, durante 16 horas a 20° C. Os grupos foram divididos em controle (DMSO nas concentrações de 100, 250 e 500 µl/ml) e tratado (com todos os compostos apresentados na tabela 2 nas concentrações de 100, 250 e 500 µg/ml). Após o período de exposição, a sobrevivência dos vermes foi verificada sob microscópio de dissecação. Dessa maneira, foi constatado morto, caso nenhum movimento corporal fosse detectado após estímulo com fio de platina. O teste foi realizado em triplicata e anotada a porcentagem de vermes mortos. Protocolo de ensaio de toxicidade com adaptações (KRONBERG *et al.*, 2018).

## **6.2 Manutenção das cepas de *Caenorhabditis elegans***

### **6.2.1 Cepa utilizada**

Foram utilizadas no estudo cepas do nemátodo *C. elegans* tipo selvagem (Bistol N2) e duplo mutante *glp-4;sek-1*. A cepa mutante *glp-4* é incapaz de gerar descendentes a 25° C, ideal para controle de ensaios; e a cepa *sek-1* é sensível a patógenos, visto que codificam uma proteína ativada por mitogênio conservada (MAP) cinase, envolvida na resposta imune inata, e os vermes *sek-1* são relativamente imunocomprometidos (ANASTASSOPOULOU, FUCHS e MYLONAKIS, 2011). *E. coli* (OP50) como fonte de alimento. Todas as cepas foram cedidas pelo Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista (ICTSJC-UNESP).

### **6.2.2 Preparo de meios de crescimento em placas petri**

O cultivo de *C. elegans* foi realizado em placas petri contendo NGM, semeado com bactéria, *E. coli* (OP50), fonte de alimento em laboratório estabelecido internacionalmente.

### **6.2.3 Preparo de fonte bacteriana de alimento**

O cultivo inicial de *E. coli* (OP50) foi obtido de estoque de glicerol. Um caldo foi preparado para inocular uma alça dessas bactérias descongeladas em temperatura ambiente.

O caldo LB (Luria Bertani) foi preparado de acordo com o protocolo proposto por Chaudhuri, Parihar e Pires da-Silva (2011). Em um frasco de Erlenmeyer de 1l foi adicionado 10 g de caldo LB (constituído de 5g de bactotripton, 2,5 g de bacto-levadura e 2,5 g de NaCl) e, em seguida, diluído em 500 ml de H<sub>2</sub>O destilada e autoclavado a 121° C por 15 minutos. Após autoclavar em temperatura ambiente e estéril, 400ml do caldo foi armazenado a 4° C e em 100 ml foi inoculado uma alçada de *E. coli* (OP50) e deixado *overnight* em leve agitação a 37° C para crescer.

*E. coli* (OP50) apresenta defeitos na síntese de uracila o que afeta seu desenvolvimento e isso possibilita o crescimento e desenvolvimento dos vermes e maior visibilidade nas placas petri (PORTA-DE-LA-RIVA et al., 2012).

#### **6.2.4 Preparo do meio de crescimento de nemátodo (NGM)**

Placas petri contendo NGM foram preparadas segundo protocolo estabelecido por Stiernagle (2006) com adaptações. Para o preparo das placas de NGM foi realizada uma mistura de 3 g de NaCl, 17 g de ágar e 2,5 g de peptona em 975 ml de H<sub>2</sub>O destilada em um frasco Erlenmeyer de 2 l e autoclavado a 121° C por 15 minutos. Em seguida, a uma temperatura de 55°/ 60° C, foi adicionado 1 ml de 1 M de CaCl<sub>2</sub>, 1 ml de 1 M MgSO<sub>4</sub>, 25ml de 1 M de KPO<sub>4</sub> e 1 ml de 5 mg/ ml de colesterol em etanol, preparados previamente. Após esse processo, 10 ml de meio foram vertidos em placas de 60 mm e 1,5 ml em placas de 24 poços e deixados para secar a 4° C.

Após obter as placas secas, 100 µl de caldo LB contendo *E. coli* (OP50), suspensão previamente preparada, foram semeados nas placas de 60 mm e espalhados com o auxílio de uma alça de Drigalski. Nas placas de 24 poços 15 µl foram adicionados. Tal técnica foi realizada em ambiente estéril. Após preparadas, foram armazenadas a 4° C até o uso por no máximo 2 semanas.

#### **6.2.5 Manutenção das cepas**

Para a manutenção das cepas de *C. elegans*, os vermes foram transferidos para placas petri de 60 mm novas a cada 4 dias e incubados a 20° C (CHEN et al., 2017; DETIENNE et al., 2018; GARCÍA-CASAS et al., 2018; LEE et al., 2018; PARK et al., 2018; SUGAWARA e SAKAMOTO, 2018). A transferência representa a técnica de “*chunking*”, em que uma espátula esterilizada é usada para fazer um recorte de 1x1 cm do meio contendo os vermes de uma placa antiga e movido para a placa nova (STIERNAGLE, 2006).

### 6.2.6 Preparo de placas para os ensaios

As placas relativas aos ensaios para tratamento dos vermes com os compostos foram preparadas seguindo os passos descritos. Inicialmente, em um tubo eppendorf, 0,01 g dos compostos quinolínicos derivados de 1,4-diidropiridinas foram dissolvidos em uma solução contendo um solvente orgânico 50% (v/v), dimetilsulfóxido (DMSO) e submetido ao vórtex por 1 minuto a 2500 rpm para dissolver completamente. Em seguida, foi adicionada água destilada até um volume final de 1 ml e, novamente, levado ao vórtex.

Dessa solução, foi subtraída um volume de 0,1 ml e diluída em 9,9 ml para obter-se a concentração mínima desejada de 100 µg/ml e o mesmo procedimento foi realizado para as concentrações de 250 e 500 µg/ml. As soluções estoque foram armazenadas ao abrigo da luz e a 4°C para uso.

A concentração final de DMSO permaneceu abaixo de 1% como recomendado por Katiki *et al.* (2011) para uma taxa de sobrevivência de 91,89% e inferior a 0,6% para não encurtar a vida útil dos vermes (SOLIS e PETRASCHECK, 2011).

Com as diferentes concentrações preparadas dos compostos, 3 µl foram adicionados em cada poço da placa de 24 poços contendo NGM e *E. coli* (OP50), de acordo com cada protocolo. Placas de NGM contendo DMSO na mesma concentração final que a usada nos ensaios com compostos (0,5% DMSO v/v) também foram preparadas e utilizadas como controle.

Somente para o ensaio de toxicidade aguda, as placas foram preparadas com todas as concentrações de todos os compostos. Para os ensaios de estresse oxidativo e biológicos, as placas foram preparadas apenas com as concentrações da QUI 1.

### 6.2.7 Sincronização dos nemátodos

*C. elegans* é estudado em quatro estágios (L1, L2, L3 e L4). O estágio, logo após a eclosão da larva, é denominado estágio L1; e o estágio, antes de colocar os ovos, é denominado L4 (HWANG *et al.*, 2018). Para a sincronização, apenas nemátodos no estágio L4 foram utilizados.

Tampão M9 e soluções de hipoclorito de sódio (NaClO a ~8%) e hidróxido de sódio (5 M de NaOH) foram preparadas previamente seguindo recomendações do protocolo proposto por Porta-de-la-Riva *et al.* (2012). O tampão M9 foi preparado com 1,5 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 3 g de NaHPO<sub>4</sub>, 2,5 g de NaCl e diluídos em 500 ml de H<sub>2</sub>O destilada em um frasco Erlenmeyer de 1l e autoclavado a 121° C por 15 minutos. Após esfriar, foi adicionado 500 µl de 1 M de MgSO<sub>4</sub> e armazenado a 4° C para uso.

Para coletar os ovos e sincronizar o nível de crescimento dos vermes, 3 placas petri contendo vermes no estágio larval L4 foram lavadas com tampão M9 e vertidos em tubo falcon de 15 ml. O tubo foi levado para centrifugação e submetido a uma rotação de 1500 rpm por 2 minutos, seguido da remoção do sobrenadante. Este processo foi executado 3 vezes para remover resíduos de bactérias.

No passo seguinte, foi adicionado 400 µl de NaClO e 100 µl de 5M de NaOH e agitado por 3 minutos sob observação em microscópio de dissecação. Esse processo permite que vermes sejam mortos e liberem para o meio os ovos mais resistentes à solução pela proteção da casca. A reação foi interrompida com a adição do tampão M9 até completar 15 ml quando observados vermes em forma de “V” ou, completamente, estendidos. Rapidamente, foi centrifugado a uma rotação de 1500 rpm por 1 minuto e descartado o sobrenadante. O *pellet* foi lavado mais 3 vezes com tampão M9.

Ao final, foi adicionado 1 ml do tampão M9 ao *pellet* e deixado em temperatura ambiente em leve agitação *overnight*. Esse processo permite a eclosão das larvas L1 sincronizadas por idade, uma vez que sem a presença de alimento o desenvolvimento dos vermes ficam estacionados (PORTA-DE-LA-RIVA *et al.*, 2012; CHEN *et al.*, 2017; PARK *et al.*, 2018; SUGAWARA e SAKAMOTO, 2018).

## **6.4 Ensaios de tolerância ao estresse oxidativo induzido**

### **6.4.1 Ensaio de resistência ao estresse térmico**

Uma amostra de 25 vermes N2 por grupo, controle (DMSO) e tratado (QUI 1 nas concentrações de 100, 250 e 500 µg/ml), síncronos e no início da fase adulta, tratados com os compostos e livres de progênie, foram transferidos para placas novas de 24 poços com NGM e, em seguida, foram submetidas a 35° C em uma incubadora. A contagem de vermes mortos frente ao estresse térmico ocorreu a

cada hora, após o início do ensaio, com a contagem dos mesmos em resposta ao estímulo do fio de platina até o momento em que todos os vermes estivessem mortos. O teste foi realizado em triplicata e anotado o número de vermes mortos. O ensaio seguiu o protocolo proposto por Ajuda-Duran *et al.*, (2019) com algumas modificações.

#### **6.4.2 Ensaio de resistência ao estresse osmótico**

O estresse osmótico foi realizado no início da vida adulta de vermes N2, após tratamento com as diferentes concentrações de QUI 1 (100, 250 e 500 µg/ml) para o grupo tratado e DMSO para o grupo controle. Para o ensaio, os vermes foram transferidos para placas de 24 poços contendo NGM e 500µl de 500 mM NaCl e mantidos por um período de 12 horas a 20° C. Após esse tempo, foi avaliada a contagem do número de vermes mortos em resposta ao estímulo do fio de platina. No teste, foi avaliada uma amostra de 25 vermes em triplicata (LEE, XING e KIM, 2017; LEE *et al.*, 2018).

#### **6.4.3 Ensaio de resistência ao estresse induzido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

Vermes N2 síncronos e tratados com as diferentes concentrações de QUI 1 (100, 250 e 500 µg/ml) para o grupo tratado e DMSO para o grupo controle, no início da vida adulta, foram transferidos para placa novas de 24 poços com NGM, contendo 500µl de 0,3% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e mantidos a 20° C. Ao total, 25 vermes foram avaliados por grupo. A contagem de vermes mortos ocorreu a cada hora a partir do início do ensaio com o estímulo de um fio de platina e perdurou até que todos os vermes estivessem mortos. O teste foi realizado em triplicata, seguindo o protocolo de Sugawara e Sakamoto (2018), com adaptações.

### **6.5 Ensaio Biológicos**

#### **6.5.1 Ensaio de longevidade**

Vermes duplo mutante *glp-4;sek-1* no estágio L1, síncronos por idade, foram cultivados em placa de 24 poços, de acordo com o item 6.2.6, e mantidos à

temperatura de 25° C para evitar a contaminação por progênie (ANASTASSOPOULOU, FUCHS e MYLONAKIS, 2011; LEE *et al.*, 2018). A transferência para placas novas ocorreu a cada 4 dias.

O ensaio de longevidade foi composto por uma amostra de 100 vermes por grupo experimental. Todos os dias, com auxílio do estereomicroscópio, nemátodos foram estimulados tocando-os com um fio de platina para avaliar se estavam vivos ou mortos. Os vermes que não responderam ao estímulo foram considerados mortos e descartados. Assim, foram desconsiderados da análise vermes que se romperam ou rastejaram para fora das placas (SHARMA, PANDEY e SALUJA, 2018). O ensaio perdurou até que todos os vermes estivessem mortos.

### **6.5.2 Quantificação da taxa de bombeamento da faringe**

A avaliação da taxa de bombeamento da faringe foi realizada em uma amostra de 10 vermes duplo mutante *glp-4;sek-1* por grupo, síncronos e tratados (FERRAZ *et al.*, 2016).

Nos dias 6, 9, 12, e 15 da vida adulta (PINTO *et al.* 2018), os vermes foram transferidos para placas individuais e mantidos a 20° C para ambientação. Com auxílio do microscópio estereoscópico, o número de bombeamento da faringe foi contado num intervalo de 10 segundos. Após, os valores foram multiplicados por 6 para se obter a taxa de bombeamento  $\text{min}^{-1}$ . Esse procedimento foi descrito por Raizen, Song e Trojanowski (2012) e Ferraz *et al.*, (2016) com algumas adaptações. A contagem foi realizada duas vezes e os dados representam a média (PINTO *et al.* 2018).

Após a contagem, os vermes eram devolvidos para placas novas contendo alimento e tratamento com o composto.

## 7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise dos ensaios de longevidade, estresse induzido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e térmico foi calculada pela curva de sobrevivência de Kaplan-Meier e as diferenças entre grupos analisadas pelo teste *log-rank*.

*Anova Two Way* foi utilizada para a análise comportamental da taxa de bombeamento faríngeo e ensaio de estresse osmótico. As comparações entre grupos foram analisadas pelos testes *post hoc* de múltiplas comparações de Sidak e Bonferroni, respectivamente.

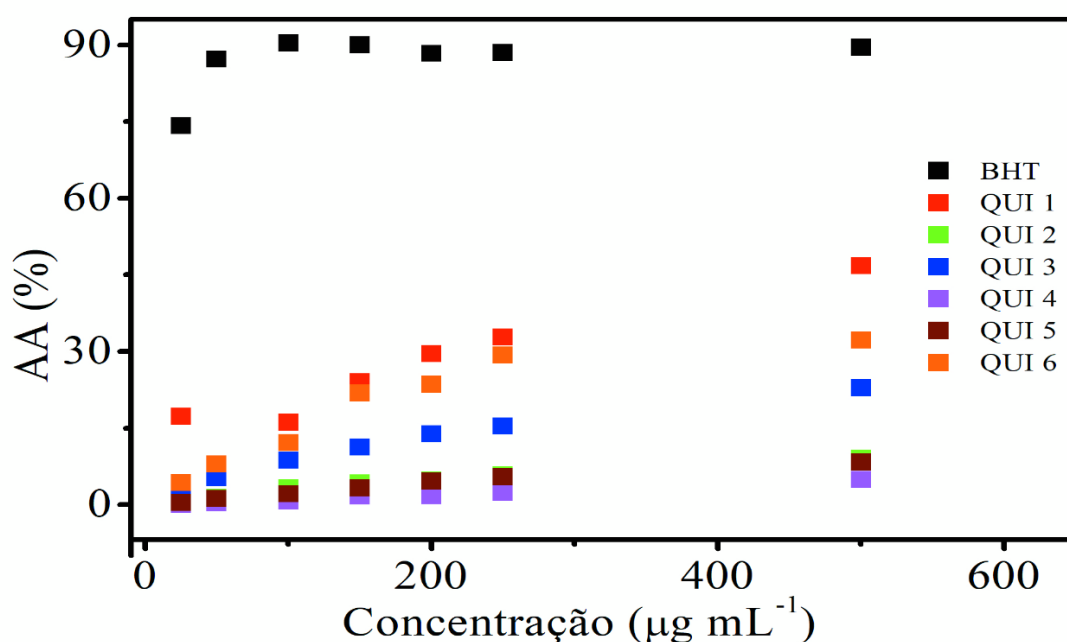
Todos os testes foram analisados no *software* GraphPad Prism v.8.0.2 com nível de significância pré-estabelecido em  $p < 0,05$ .

## 8 RESULTADOS

### 8.1 Análise antioxidante por DPPH

Na Figura 6, estão apresentados os resultados da atividade antioxidante dos compostos quinolínicos, frente ao radical DPPH. Foi possível perceber um comportamento dose-dependente e exponencial para todos os compostos avaliados, inclusive para o controle positivo. O antioxidante sintético BHT exibiu alta atividade com  $IC_{50}$  de  $13,73 \pm 0,09 \mu\text{g/mL}^{-1}$ , ao passo que os compostos quinolínicos exibiram moderada a baixa atividade antioxidante nas concentrações avaliadas. Entre todos os compostos quinolínicos avaliados, QUI 1 foi o que apresentou maior atividade com  $IC_{50}$  de  $556,94 \pm 3,40 \mu\text{g/mL}^{-1}$ . Os demais compostos apresentaram  $IC_{50}$  fora da curva (muito maiores que  $500 \mu\text{g/mL}^{-1}$ ). Entretanto, a despeito disso, observa-se que QUI 6 apresenta um comportamento semelhante a QUI 1 e, dentre os compostos analisados, QUI 4 é o que apresentou menor potencial antioxidante, seguido por QUI 5, QUI 2 e QUI 3.

Figura 6- Atividade antioxidante dos compostos derivados de 1,4-diidropiridina.



Legenda: A atividade antioxidante dos compostos quinolínicos foi realizada pelo método colorimétrico de estabilização de DPPH. A absorbância das amostras foi mensurada por espectrofotômetro a um comprimento de onda de 515 nm e as análises realizadas em triplicata.

## 8.2 Análise antibacteriana por TSA

Os resultados para o controle positivo estão apresentados na tabela 3, a seguir.

Tabela 3- Atividade antibacteriana do controle positivo

<b>ATIVIDADE ANTIBACTERIANA</b>					
	<b>Resistente</b>	<b>Intermediário</b>	<b>Sensível</b>	<b>Resultado</b>	<b>Classificação</b>
Ampicilina (10µg)	≤13	14-16	≥17	26 mm	Sensível
Norfloxacina (10µg)	≤12	13-16	≥17	30 mm	Sensível
Nitrofurantoina (300µg)	≤14	15-16	≥17	38 mm	Sensível

Fonte: Do autor (2020).

Não foi encontrada atividade antibacteriana para os compostos derivados de 1,4-diidropiridina, não havendo a formação de halo (quadro 1) e, portanto, classificados como resistentes à proliferação dessa enterobactéria na presença desses compostos.

## 8.3 Ensaio de toxicidade aguda

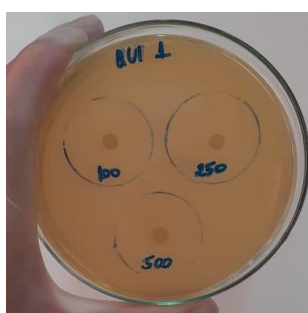
No ensaio de toxicidade aguda, os vermes foram expostos aos compostos derivados de 1,4-diidropiridina nas concentrações de 100, 250 e 500 µg/ml, bem como nas mesmas concentrações para solução veículo de DMSO em µl/ml.

Não foram observados, sob microscópio de dissecação após 16 horas, vermes mortos ou que necessitassem de estímulo com fio de platina para avaliar movimentos corporais. Além disso, foram encontrados ovos e vermes em estágio L1, mostrando que os compostos nas concentrações acima não são tóxicos para este modelo.

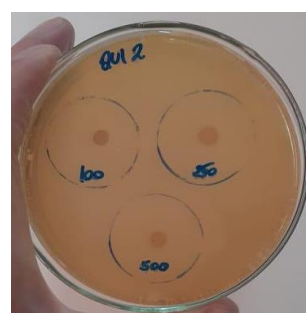
Quadro 1- TSA dos compostos derivados de 1,4-diidropiridina e controle positivo.



Controle Positivo (Ampicilina, Norfloxacin e Nitrofurantoina, respectivamente)



QUI 1



QUI 2



QUI 3



QUI 4



QUI 5



QUI 6

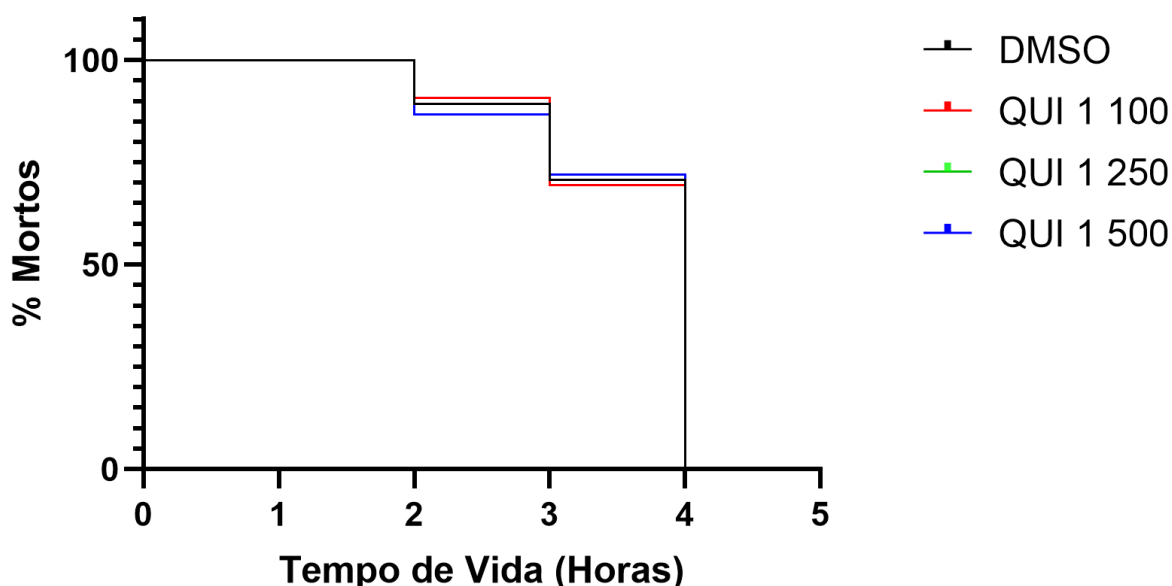
Fonte: Do autor (2020).

#### 8.4 Ensaio de resistência ao estresse térmico

A resistência ao estresse térmico foi avaliada a cada hora, observando a quantidade de vermes vivos tratados com diferentes concentrações de QUI 1, além do grupo controle.

Não foi observada diferença significativa entre o grupo controle e grupos tratados. A figura 7 apresenta o tempo máximo de vida dos vermes.

Figura 7- Tempo máximo de vida de *C. elegans* tratados com diferentes concentrações de QUI 1 submetidos ao estresse térmico



Legenda: Efeitos do tratamento com 100, 250 e 500 µg/ml de QUI 1 no tempo máximo de vida de *C. elegans* (N2) submetidos ao estresse térmico. As curvas de sobrevivência Kaplan-Meier foram criadas usando o software GraphPad Prism v.8.0.2, com nível de significância  $p < 0,05$ .

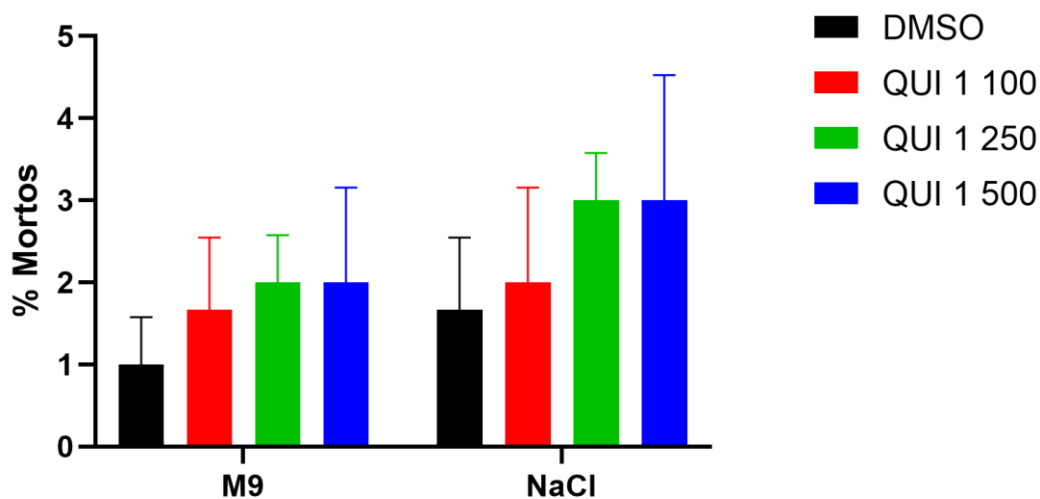
#### 8.5 Ensaio de resistência ao estresse osmótico

Na figura 8, está indicado o tempo máximo de vida dos vermes, quando submetidos ao estresse osmótico.

A resistência ao estresse osmótico foi avaliada após o período de exposição de 12 horas observando a quantidade de vermes vivos tratados com diferentes concentrações de QUI 1, tendo o tampão M9 como controle.

Não foi observada diferença significativa, tanto entre o grupo M9, como no submetido ao NaCl. Também não se observou variações significativas entre as diferentes concentrações nos dois grupos.

Figura 8- Tempo máximo de vida de *C. elegans* tratados com diferentes concentrações de QUI 1 submetidos ao estresse osmótico



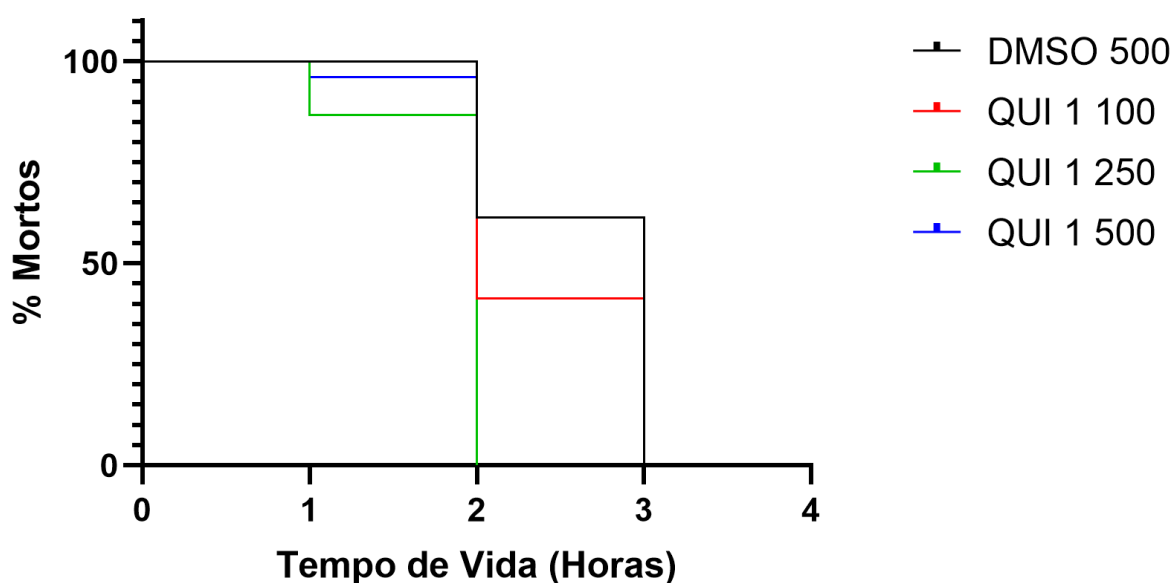
#### Grupo controle vs induzido ao estresse

Legenda: Efeitos do tratamento com 100, 250 e 500  $\mu\text{g/ml}$  de QUI 1 no tempo máximo de vida de *C. elegans* (N2) submetidos ao estresse osmótico. O ensaio foi realizado em triplicata e os dados do gráfico que representam a média foram analisados pela *Anova Two Way*, com nível de significância  $p < 0,05$ .

#### 8.6 Ensaio de resistência ao estresse induzido por $\text{H}_2\text{O}_2$

A figura 9 apresenta o tempo máximo de vida dos vermes quando submetidos ao estresse induzido por  $\text{H}_2\text{O}_2$  e tratados com diferentes concentrações de QUI1. A análise foi realizada a cada hora, até que todos os vermes estivessem mortos.

Figura 9- Tempo máximo de vida de *C. elegans* tratados com diferentes concentrações de QUI 1 submetidos ao estresse por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>



Legenda: Efeitos do tratamento com 100, 250 e 500 µg/ml de QUI 1 no tempo máximo de vida de *C. elegans* (N2) submetidos ao estresse por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. As curvas de sobrevivência Kaplan-Meier foram criadas usando o *software* GraphPad Prism v.8.0.2, com nível de significância  $p < 0,05$ .

Não foi encontrado efeito sobre a resistência ao estresse induzido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pela QUI 1. No entanto, observou-se que a concentração de 250 µg/ml tornou os vermes mais vulneráveis ao estresse.

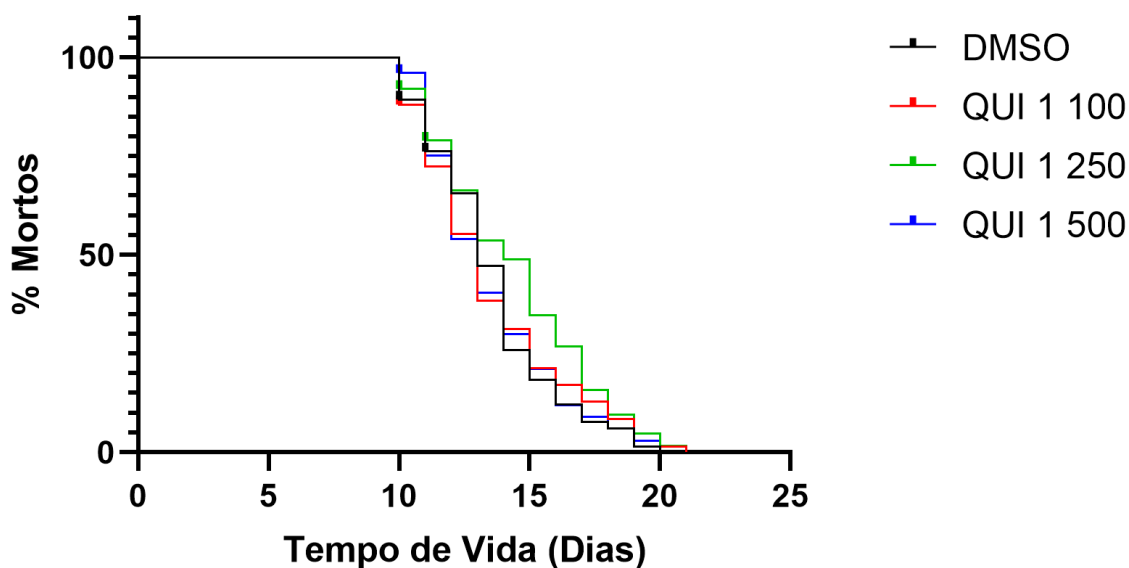
### 8.7 Ensaio de longevidade

O ensaio de longevidade avaliou o tempo máximo de vida de vermes mutantes *glp-4;sek-1* tratados com diferentes concentrações de QUI 1 e controle com DMSO.

O tempo máximo de vida foi de 20 dias para controle e de 21 dias para os tratados.

Não foi encontrado efeito significativo causado pelas concentrações administradas aos vermes em sua longevidade.

Figura 10- Efeito do tratamento com diferentes concentrações de QUI 1 no tempo de vida de *C. elegans*

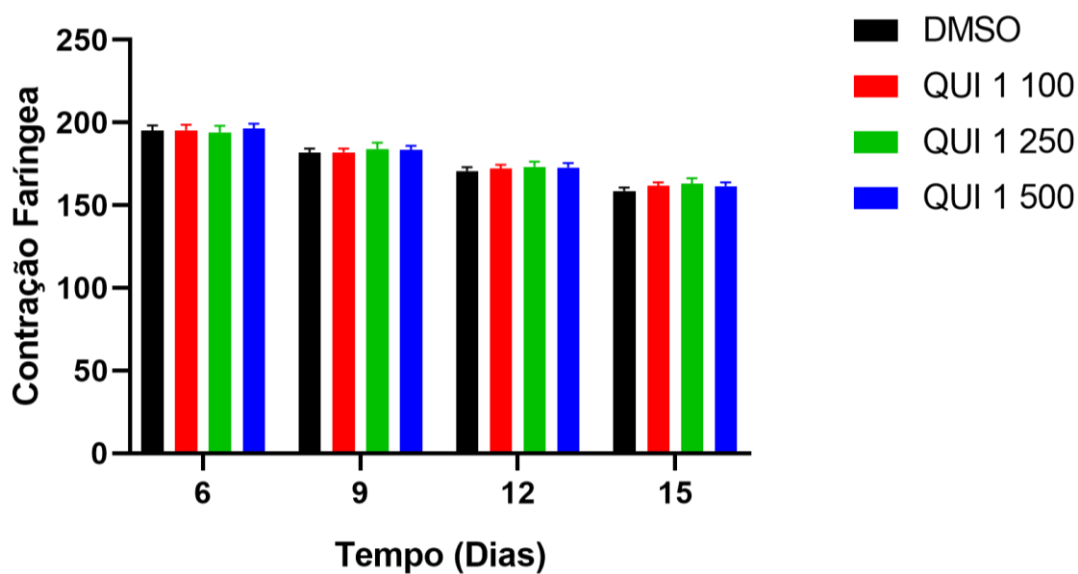


Legenda: Efeitos do tratamento com 100, 250 e 500 µg/ml de QUI 1 no tempo de vida de *C. elegans* (*glp-4;sek-1*). As curvas de sobrevivência Kaplan-Meier foram criadas usando o software GraphPad Prism v.8.0.2, com nível de significância  $p < 0,05$ .

### 8.8 Quantificação da taxa de bombeamento da faringe

Na análise da quantificação da taxa de bombeamento da faringe, a qual avaliou o parâmetro sobrevida, não foi notada qualquer evidência de que a administração das diferentes concentrações de QUI 1 possa postergar a diminuição do número de bombeamento da faringe com o envelhecimento dos vermes.

Figura 11- Efeito do tratamento com diferentes concentrações de QUI 1 na taxa de bombeamento da faringe em *C. elegans*



Legenda: Efeitos do tratamento com 100, 250 e 500  $\mu\text{g/ml}$  de QUI 1 na taxa de bombeamento da faringe de *C. elegans* (*glp-4;sek-1*). O procedimento foi realizado nos dias 6, 9, 12 e 15 do tempo de vida dos vermes e os dados do gráfico representam a média de duas contagens. Os dados foram analisados pela *Anova Two Way*, com nível de significância  $p < 0,05$ .

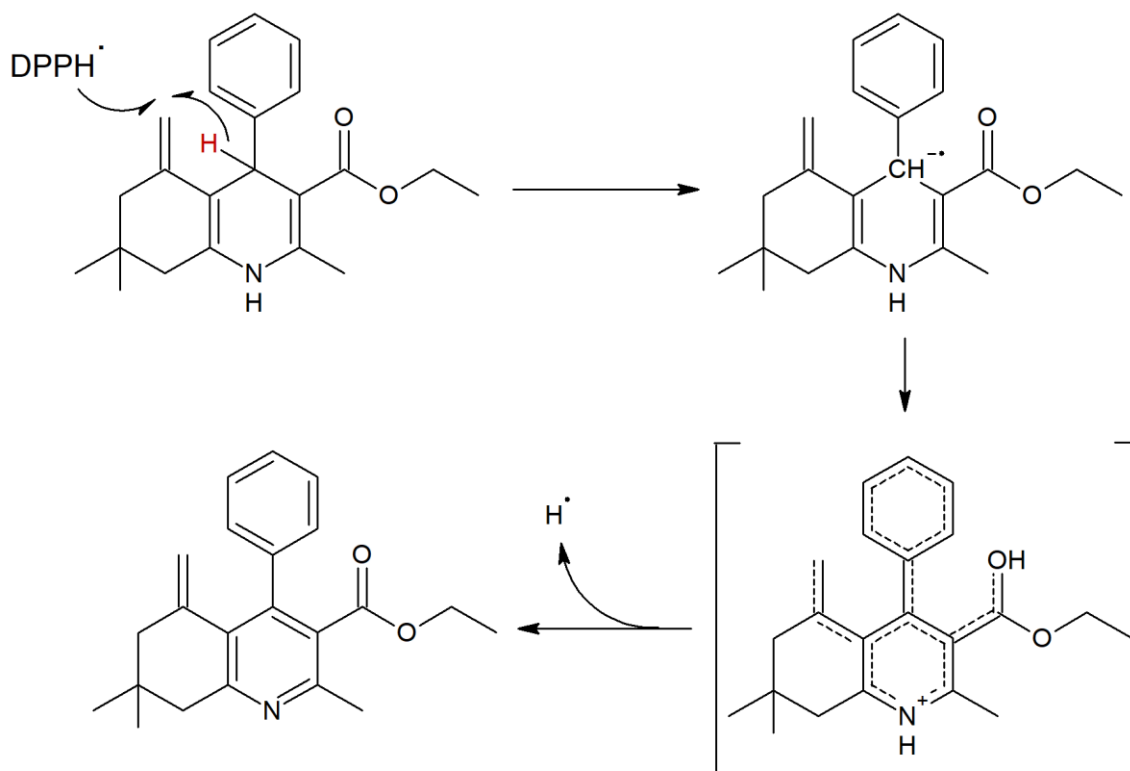
## 9 DISCUSSÃO

### 9.1 Análise antioxidante e antibacteriana e ensaio agudo de toxicidade dos derivados de 1,4-diidropiridina

Após a síntese dos derivados de 1,4-diidropiridina, eles foram analisados quanto a sua atividade antioxidante, antibacteriana e de possível efeito tóxico.

O método de determinação da atividade antioxidante pela estabilização de radicais DPPH baseia-se na transferência de elétrons ou átomos de hidrogênio do antioxidante ao radical DPPH. Compostos fenólicos ou que possuam estruturas facilmente estabilizadas após a doação de átomos de hidrogênio/ elétrons têm maior atividade antioxidante (Ferreira *et al.*, 2019). No caso de QUI 1, a doação de 2 átomos de hidrogênio favoreceria a formação de um sistema aromático, causado pelo deslocamento de elétrons, (Figura 12); o que pode explicar sua maior atividade em relação aos outros compostos. Esperava-se que os compostos QUI 3 e QUI 6 apresentassem uma atividade antioxidante promissora.

Figura 12- Proposta de mecanismo de estabilização de radicais DPPH por QUI 1.



Fonte: Do autor (2020).

Foi demonstrado, entretanto, por Amsterdam *et al.* (1992), que nenhum dos derivados de diidropiridinas apresentaram atividade antioxidante significativa abaixo de 1  $\mu$ M, apesar de serem capazes de interagir com radicais livres em um ritmo lento.

De acordo com Ranjbar *et al.* (2019), diferentes substituições em derivados de 5-oxo-hexahidroquinolina-3-carboxilatos contribuíram para um aumento ou diminuição na atividade antioxidante. De acordo com os autores, a inserção de grupos alcoxi e hidroxí (-OR / -OH) nas posições 3 e 4 do anel fenil aumenta a atividade antioxidante, resultados que corroboram o trabalho e justifica uma maior atividade dos compostos QUI 3 e QUI 6 em relação aos derivados QUI 2, QUI 4 e QUI 5.

A atividade antibacteriana dos compostos também foi avaliada. Como resultado, nenhum dos compostos em suas três concentrações utilizadas conseguiram inibir o crescimento das bactérias, demonstrando que nas concentrações utilizadas bactérias *E. coli* são resistentes aos mesmos. Desse modo eliminaria qualquer suspeita que pudesse ocorrer na longevidade dos vermes, uma vez que os compostos não foram capazes de influenciar na morte ou crescimento das bactérias, fonte de alimento dos vermes.

Esse dado é importante pelo fato de que se as bactérias fossem sensíveis aos compostos, os vermes poderiam apresentar longevidade maior e influenciar assim os resultados. Em estudo realizado por Hwang *et al.* (2018), vermes alimentados com *E. coli* mortas por calor apresentaram um tempo de vida maior em comparação a vermes alimentados com bactérias vivas.

É importante mencionar que era de se esperar que os compostos QUI 2 E QUI 5 apresentassem alguma atividade antibacteriana uma vez que compostos halogenados (hidrocarbonetos com substituição átomos de hidrogênio por átomos de halogênios) apresentam boa atividade biológica.

O ensaio agudo de toxicidade demonstrou que, após 16 horas de exposição aos compostos, vermes mantinham-se vivos e estavam procriando, observado pela presença de ovos e larvas em estágio L1. Esse fato indica que os compostos não são tóxicos aos vermes e não impediram a progênie.

Essas análises serviram de base para ensaios posteriores, uma vez que os compostos não apresentam atividade antibacteriana a *E. coli* (OP50) e não tóxicos a *C. elegans*. Mediante essas análises, o composto com maior atividade antioxidante, a QUI 1 foi selecionada para os ensaios biológicos.

## 9.2 Ensaio de tolerância ao estresse oxidativo induzido e biológico

Estudos anteriores revelaram inúmeras atividades biológicas de quinolina, incluindo as derivadas de 1,4-diidropiridina. Dentre essas atividades, encontramos a sua propriedade antioxidante (EDRAKI *et al.*, 2009). No entanto, não foram encontrados na literatura estudos com 1,4-diidropiridina, especificamente, com 2,7,7-trimetil-5-oxo-4-fenil-1,4,5,6,7,8-hexa-hidroquinolina-3-carboxilato de etila (representado por QUI 1 neste estudo).

O presente estudo não encontrou diferença na resistência ao estresse oxidativo entre QUI 1 e o controle. Em contrapartida, dois estudos que investigaram a resistência ao estresse oxidativo e a modulação da vida útil em *C. elegans* tratados com derivados de quinolina obtiveram resultados positivos.

Wu *et al.* (2016) utilizaram o composto 4-organilsulfenil-7-cloroquinolina para tratar *C. elegans*. Observaram que esse composto pertencente à classe das PQQ apresentou resistência ao estresse oxidativo e modulação na vida útil desses vermes. Foi observado que essa modulação devia-se ao mecanismo de ação envolvendo dois fatores de transcrição, DAF-16/FOXO e SKN-1/Nrf2, responsivos ao estresse oxidativo.

Tratados com compostos de quinolina contendo enxofre, *C. elegans* foram induzidos ao estresse oxidativo por 1,1'-dimetil-4,4'-bipiridina-dicloreto, um herbicida (SALGUEIRO *et al.* 2014). O mecanismo básico de ação deste herbicida ocorre pelo aumento exacerbado de ROS, as quais são instáveis, reagem com o fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADPH) e geram repetidos ciclos de redução e reoxidação, o que favorece um balanço negativo na ação do sistema natural de defesa antioxidante. Essas ROS geradas reagem com facilidade com ácidos graxos e provocam lesões nas membranas, proteínas e DNA, ou simplesmente, danos ao tecido (PETER *et al.*, 1992). Essas tioquinolonas apresentaram uma pequena defesa ao dano oxidativo e foi justificado pela formação de ROS que ativaram fatores de transcrição DAF-16/FOXO, regulando positivamente níveis de superóxido dismutase e catalase e neutralizando, parcialmente, as ROS (SALGUEIRO *et al.* 2014).

Vários genes e vias que prolongam a expectativa de vida em *C. elegans* são conservados em mamíferos e a via de sinalização da insulina é uma das que mais mostrou afetar a expectativa de vida de outros animais (CHAUDARI e KIPREOS, 2018). Essa via promove resistência ao estresse oxidativo e longevidade e regula a

expressão de genes de desintoxicação por ROS (BACK, BRAECKMAN e MATTHIJSSENS, 2012).

Em *C. Elegans* o fator de transcrição DAF-16/FOXO é o principal alvo da sinalização de insulina / fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1). A via de sinalização de insulina em *C. elegans* consiste de um receptor de insulina/IGF-1, PI3-quinase e um fator de transcrição FOXO. A sinalização de insulina resulta na fosforilação de DAF-16 dependente de AKT, impedindo que DAF-16 entre no núcleo para modular seus genes-alvos (BANSAL *et al.*, 2014). Os genes *daf-2* e *daf-16* são os principais (CHEN *et al.*, 2017).

Quando expostos a condições adversas de estresse, a via da insulina é bloqueada e, então, fatores de transcrição DAF-16/FOXO são aumentados, induzindo sua translocação do citoplasma para o núcleo o que, posteriormente, pode promover ou reprimir a expressão de genes-alvo para desencadear a resistência a diferentes tipos de estresse e prolongar a vida útil desses organismos (SUN, CHEN e WANG, 2017).

Neste estudo, a administração de diferentes concentrações de QUI 1 não demonstrou ação sobre a longevidade e nem sobre a resistência à exposição ao estresse térmico e osmótico, quando comparados ao grupo controle. Nesse sentido, algumas observações devem ser feitas.

As justificativas para os resultados encontrados podem ser que defendidas pelo fato de que as concentrações administradas tenham sido baixas e não foram suficientes para aumentar a translocação de fatores de transcrição, como os da via da insulina, para o núcleo e, assim, modular positivamente a longevidade e resistência ao estresse oxidativo. A segunda aponta para a ideia de que o composto não tenha efeito antioxidante *in vivo*, já que em sua análise por DPPH o composto apresentou essa propriedade.

O tratamento com QUI 1 não se mostrou eficiente também quanto à taxa de contração faríngea, uma vez que esta mostrou reduzir linearmente com o envelhecimento dos vermes, o que corrobora a ideia de Pinto *et al.*, (2018) ao afirmar que o bombeamento da faringe declina-se com a idade.

Outro ponto a destacar-se é que não houve diferença na longevidade, já que os vermes obtiveram sua média de vida dentro do esperado. Neste estudo, o tempo máximo de vida dos vermes foram de 21 dias contra a expectativa de vida média de 2 a 3 semanas (CHAUDARI e KIPREOS, 2018).

Partindo do ponto de que a QUI 1 não apresentou efeitos sobre qualquer ensaio realizado, esperava-se que no estresse induzido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> algum resultado fosse encontrado, justificado pela teoria da homeostase redox e expressão de genes-alvo.

Enzimas antioxidantes possuem a capacidade de restringir a quantidade de moléculas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dentro da célula, desempenhando um papel fundamental na manutenção da homeostase redox, como apresentado por Detiene *et al.*, (2018). Nesse caso, enzimas como as peroxidases têm como função modular as ROS intracelulares. Essas enzimas participam na detecção e transdução do sinal de ROS como uma quinase reguladora, transmitindo seus equivalentes oxidantes após ser oxidado por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para outras proteínas.

Em outro estudo realizado por Sugawara e Sakamoto (2018), *C. elegans* foram tratados com bactérias probióticas mortas, *Bifidobacterium longum*, para avaliar a tolerância ao estresse e longevidade. Eles observaram que vermes tratados com a bactéria probiótica obtiveram maior expectativa de vida e resistência ao estresse oxidativo em comparação aos alimentados com *E. coli*. A expectativa de vida foi justificada por duas vias, SKN-1 e DAF-16 como esperado. No entanto, não apresentou correlação com a resistência ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A explicação apresentada foi pela expressão de genes como *ctl-1* e *ctl-2* encontradas. Essas catalases em *C. elegans* são capazes de degradar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e, assim, levar um efeito protetor de resistência ao estresse, embora não tenham esclarecido a via de sinalização envolvida.

Dessa maneira, sabe-se que várias vias de sinalização são importantes tanto na regulação da expectativa de vida, quanto na resposta ao estresse oxidativo e apresentam diferentes rotas. Nesse contexto, a administração de QUI 1 não exerceu ação sobre a exposição ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e não foi capaz de promover efeitos biológicos em condições normais ou proteção contra outros tipos de estresse.

## 10 CONCLUSÃO

Em conclusão, não foi encontrada nenhuma evidência de que o tratamento com QUI 1 tenha influenciado na longevidade e resistência ao estresse induzido em *C. elegans*.

## REFERÊNCIAS

AJUDA-DURAN, Begoña *et al.* Antioxidant Characterization and Biological Effects of Grape Pomace Extracts Supplementation in *Caenorhabditis elegans*. **Foods**, [S. l.], v. 8, ed. 2, p. 1-14, 15 fev. 2019. DOI 10.3390/foods8020075. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6406641/>>. Acesso em: 21 dez. 2019.

AMSTERDAM, Frank Th.M.van *et al.* Lacidipine: A dihydropyridine calcium antagonist with antioxidant activity. **Free Radical Biology and Medicine**, [S. l.], v. 12, n. 3, p. 183-187, 1992. DOI 10.1016/0891-5849(92)90025-C. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/089158499290025C>>. Acesso em: 12 set. 2020.

ANASTASSOPOULOU, Cleo G.; FUCHS, Beth Burgwyn; MYLONAKIS, Eleftherios. *Caenorhabditis elegans*-based Model Systems for Antifungal Drug Discovery. **Current Pharmaceutical Design**, [S. l.], v. 17, n. 13, p. 1225-1233, 2011. DOI 10.2174/138161211795703753. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3719869/>>. Acesso em: 7 jan. 2020.

ATMACA, Mukadder *et al.* The hepatoprotective effect of coumarin and coumarin derivatives on carbon tetrachloride-induced hepatic injury by antioxidative activities in rats. **J Physiol Biochem**, [S.l.], v. 67, n. 4, p. 569-576, jun. 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21656273>>. Acesso em: 07 nov. 2018.

BACK, Patricia; BRAECKMAN, Bart P.; MATTHIJSENS, Filip. ROS in Aging *Caenorhabditis elegans*: Damage or Signaling? **Oxid Med Cell Longev.**, [S.l.], v. 2012, p. 1-14, ago. 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22966416>>. Acesso em: 06 dez. 2018.

BANSAL, Ankita *et al.* Transcriptional regulation of *Caenorhabditis elegans* FOXO/DAF-16 modulates lifespan. **Longevity & Healthspan**, [S.l.], v. 3, n. 5, p. 1-15, abr. 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24834345>>. Acesso em: 05 dez. 2018.

BARBOSA, Kiriague B. F. *et al.* Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, [s. l.], v. 23, ed. 4, p. 629-643, jul./ago. 2010. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1415-52732010000400013](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-52732010000400013)>. Acesso em: 14 out. 2019.

BRENNER, S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. **Genetics**, [S.l.], v. 77, n. 1, p. 71-94, maio. 1974. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4366476>>. Acesso em: 20 out. 2018

BRUNQUELL, Jessica *et al.* CCAR-1 is a negative regulator of the heat-shock response in *Caenorhabditis elegans*. **Aging Cell**, [S.l.], p. 1-11, jul. 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30003683>>. Acesso em: 07 set. 2018.

CHAUDHARI, Snehal N.; KIPREOS, Edward T. The Energy Maintenance Theory of Aging: Maintaining Energy Metabolism to Allow Longevity. **Bioessays**, [S.l.], v. 40, n. 8, p. 1-9, jun. 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29901833>>. Acesso em: 07 set. 2018.

CHEN, Wei *et al.* Echinacoside, a phenylethanoid glycoside from *Cistanche deserticola*, extends lifespan of *Caenorhabditis elegans* and protects from Ab-induced toxicity. **Biogerontology**, [S.l.], v. 19, n. 1, p. 47-65, nov. 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29185166>>. Acesso em: 07 set. 2018.

CHOW, David K. *et al.* Sarcopenia in the *Caenorhabditis elegans* pharynx correlates with muscle contraction rate over lifespan. **Experimental Gerontology**, [S. l.], v. 41, ed. 3, p. 252–260, 30 jan. 2006. DOI 10.1016/j.exger.2005.12.004. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0531556505003141?via%3Dihub>>. Acesso em: 4 jan. 2020.

COLLINS, J.J., *et al.* The measurement and analysis of age-related changes in *Caenorhabditis elegans* (7 de dezembro, 2007), **WormBook**, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.137.1, <http://www.wormbook.org>.

CORSI A.K.; WIGHTMAN B.; CHALFIE M. A Transparent window into biology: A primer on *Caenorhabditis elegans* (18 de junho de 2015), **WormBook**, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.177.1, <http://www.wormbook.org>.

DETIENNE, Giel *et al.* Beyond ROS clearance: peroxiredoxins in stress signaling and aging. **Ageing Research Reviews**, [S.l.], v. 44, p. 33-48, jul. 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29580920>>. Acesso em: 07 set. 2018.

DETSI, Anastasia; KONTOGIORGIS, Christos; HADJIPAVLOU-LITINA, Dimitra. Coumarin derivatives: an updated patent review (2015-2016). **Expert Opin. Ther. Patents**, [S.l.], v. 27, n. 11, p. 1201-1226, ago. 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28756713>>. Acesso em: 06 nov. 2018.

EDRAKI, Najmeh *et al.* Dihydropyridines: evaluation of their current and future pharmacological applications. **Drug Discovery Today**, [S. l.], v. 14, n. 21/22, p. 1058-1066, nov. 2009. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359644609002803?via%3Dihub>>. Acesso em: 2 ago. 2019.

FERRAZ, Rafael C. *et al.* IMPACT is a GCN2 inhibitor that limits lifespan in *Caenorhabditis elegans*. **BMC Biology**, São Paulo, v. 14, n. 1, p. 1-15, 7 out. 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5054600/>>. Acesso em: 25 jul. 2019.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, [s. l.], v. 43, ed. 1, p. 61-68, Jan./Mar. 1997. Disponível em:

<[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0104-42301997000100014](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-42301997000100014)>. Acesso em: 14 out. 2019.

FERREIRA, Vanuzia Rodrigues Fernandes *et al.* Colorimetric, electroanalytical and theoretical evaluation of the antioxidant activity of *Syzygium aromaticum L.*, *Origanum vulgare L.*, *Mentha spicata L.* and *Eremanthus erythropappus M.* essential oils, and their major constituents. **New J. Chem.**, [S. l.], v. 43, p. 7653--7662, 25 abr. 2019. DOI 10.1039/c8nj05893h. Disponível em: <<https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2019/nj/c8nj05893h#!divAbstract>>. Acesso em: 20 dez. 2019.

GARCÍA-CASAS, Paloma *et al.* Inhibition of Sarco-Endoplasmic Reticulum Ca<sup>2+</sup> ATPase Extends the Lifespan in *C. elegans* Worms. **Frontiers in Pharmacology**, [S.l.], v. 9, p. 1-11, jun. 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6026643/>>. Acesso em: 07 set. 2018.

GILL, Sarvajeet Singh; TUTEJA, Narendra. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, [s. l.], v. 48, n. 12, p. 909-930, 15 set. 2010. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20870416>>. Acesso em: 11 dez. 2019.

GÓMEZ-ORTE, Eva *et al.* Effect of the diet type and temperature on the *C. elegans* transcriptome. **Oncotarget**, [S. l.], v. 9, n. 11, p. 9556-9571, 9 fev. 2018. DOI 10.18632/oncotarget.23563. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5839384/>>. Acesso em: 7 jan. 2020.

HARMAN, Denham. The biologic clock: the mitochondria? **J Am Geriatr Soc.**, [S.l.], v. 20, n. 4, p. 145-147, abr. 1972. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5016631>>. Acesso em: 25 nov. 2018.

HART, Anne C., ed. Behavior (3 de julho de 2006), **WormBook**, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.87.1, <http://www.wormbook.org>.

HE, Long *et al.* Antioxidants Maintain Cellular Redox Homeostasis by Elimination of Reactive Oxygen Species. **Cellular Physiology and Biochemistry**, [S. l.], v. 44, ed. 2, p. 532-553, 17 nov. 2017. DOI 10.1159/000485089. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29145191>>. Acesso em: 11 dez. 2019.

HERNDON, L.A. *et al.* 2018. **Introduction to Aging in *C. elegans***. In *WormAtlas*. doi:10.3908/wormatlas.8.4. Disponível em: <<https://www.wormatlas.org/aging/introduction/AIntroframeset.html>>. Acesso em: 08 jan. 2020.

HOELZER, Karin *et al.* Agar Disk Diffusion and Automated Microbroth Dilution Produce Similar Antimicrobial Susceptibility Testing Results for **Salmonella** Serotypes Newport, Typhimurium, and 4,5,12:i-, But Differ in Economic Cost. *Foodborne Pathogens and Disease*, [S. l.], v. 8, ed. 12, p. 1281–1288, 2011. DOI 10.1089/fpd.2011.0933. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3263306/>>. Acesso em: 27 abr. 2020.

HWANG, SilasSu-Bin *et al.* In vivo screening platform for shiga toxinproducing *Escherichia coli* (STEC) using *Caenorhabditis elegans* as a model. **Plos One**, [S.I.], v. 13, n. 2, p. 1-16, fev. 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29489863>>. Acesso em: 07 set. 2018.

JAIN, Shweta *et al.* Comprehensive review on current developments of quinoline-based anticancer agents. **Arabian Journal of Chemistry**, [S. I.], 26 out. 2016. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1878535216301897>>. Acesso em: 2 ago. 2019.

KALITA, Pranjal; KUMARB, Rajiv. Solvent-free coumarin synthesis via Pechmann reaction using solid catalysts. **Microporous and Mesoporous Materials**, [s. I.], v. 149, ed. 1, p. 1-9, 1 fev. 2012. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1387181111003568>>. Acesso em: 15 out. 2019.

KANEKO, Takao; BABA, Naomichi; MATSUO, Mitsuyoshi. Protection of coumarins against linoleic acid hydroperoxide-induced cytotoxicity. **Chemico-Biological Interaction**, [S.I.], v. 142, n. 3, p. 239-254, jan. 2003. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12453663>>. Acesso em: 06 nov. 2018.

KATIK, Luciana M. *et al.* *Caenorhabditis elegans* as a model to screen plant extracts and compounds as natural anthelmintics for veterinary use. **Vet Parasitol.**, [S. I.], v. 182, ed. 2-4, p. 264-268, 15 dez. 2011. DOI 10.1016 / j.vetpar.2011.05.020. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030440171100358X?via%3Dihub>>. Acesso em: 24 dez. 2019.

KATSORI, Anna-Maria; HADJIPAVLOU-LITINA, Dimitra. Coumarin derivatives: an updated patent review (2012-2014). **Expert Opin. Ther. Patents**, [S.I.], v. 24, n. 12, p. 1323-1347, out. 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25327901>>. Acesso em: 06 nov. 2018.

KOTLAR, Ilan *et al.* Comparison of the Toxic Effects of Quinolinic Acid and 3-Nitropropionic Acid in *C. elegans*: Involvement of the SKN-1 Pathway. **Neurotoxicity Research**, [S.I.], v. 33, n. 2, p. 259-267, ago. 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28822104>>. Acesso em: 07 set. 2018.

KRONBERG, María Florencia *et al.* Glyphosate-based herbicides modulate oxidative stress response in the nematode *Caenorhabditis elegans*. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.**, [S. I.], v. 214, p. 1-8, 22 ago. 2018. DOI 10.1016 / j.cbpc.2018.08.002. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30142450>>. Acesso em: 21 dez. 2019.

KUMAR, Atul *et al.* Synthesis and biological evaluation of N-aryl-1,4-dihydropyridines as novel antidyslipidemic and antioxidant agents. **European Journal of Medicinal**

**Chemistry**, [S. l.], v. 45, n. 2, p. 501-509, fev. 2010. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0223523409005388?via%3Dihub>>. Acesso em: 2 ago. 2019.

KUMAR, Satish. An efficient, catalyst- and solvent-free, four-component, and one-pot synthesis of polyhydroquinolines on grinding. **Tetrahedron**, [S. l.], v. 64, ed. 3, p. 536-542, 14 jan. 2008. DOI 10.1016/j.tet.2007.11.008. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S004040200701890X>>. Acesso em: 12 dez. 2019.

KUS, Nihal *et al.* FTIR Spectroscopic and Theoretical Study of the Photochemistry of Matrix-isolated Coumarin. **Photochemistry and Photobiology**, [S.l.], v. 83, n. 5, p. 1237-1253, set. 2007. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17880520>>. Acesso em: 09 nov. 2018.

LEE, Eun Byeol *et al.* Longevity and Stress Resistant Property of 6-Gingerol from *Zingiber officinale* Roscoe in *Caenorhabditis elegans*. **Biomolecules & Therapeutics**, [S.l.], p. 1-8, mar. 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29534560>>. Acesso em: 07 set. 2018.

LEE, Eun Byeol; XING, Ming Ming; KIM, Dae Keun. Lifespan-extending and stress resistance properties of brazilin from *Caesalpinia sappan* in *Caenorhabditis elegans*. **Arch. Pharm. Res.**, [S. l.], v. 40, ed. 7, p. 825-835, 30 jun. 2017. DOI 10.1007/s12272-017-0920-3. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28667441>>. Acesso em: 16 dez. 2019.

LI, Ming *et al.* *Lactobacillus*-derived extracellular vesicles enhance host immune responses against vancomycin-resistant enterococci. **BMC Microbiology**, [S.l.], v. 17, n. 1, p. 1-8, mar. 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28288575>>. Acesso em: 05 dez. 2018.

LIANG, Yaru *et al.* Calorie restriction is the most reasonable anti-ageing intervention: a meta-analysis of survival curves. **Scientific Reports**, [S.l.], v. 8, n. 1, p. 1-9, abr. 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29636552>>. Acesso em: 07 set. 2018.

LIVAK, Kenneth J.; SCHMITTGEN, Thomas D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ . **Methods**, [S.l.], v. 25, n. 4, p. 402-408, dez. 2001. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11846609>>. Acesso em: 05 dez. 2018.

LUCANIC, Mark *et al.* A Simple Method for High Throughput Chemical Screening in *Caenorhabditis Elegans*. **Journal of Visualized Experiments**, [S. l.], ed. 133, p. 1-8, 20 mar. 2018. DOI 10.3791/56892. Disponível em: <<https://www.jove.com/video/56892/um-mtodo-simples-para-high-throughput-screening-qumico-em?language=Portuguese>>. Acesso em: 7 jan. 2020.

MICHALCZYK, Małgorzata Magdalena *et al.* Three weeks of intermittent hypoxic training affect antioxidant enzyme activity and increases lipid peroxidation in cyclists. **Monatsh Chem**, [S. l.], v. 150, ed. 9, p. 1703–1710, 6 ago. 2019. Disponível em:

<<https://link.springer.com/article/10.1007/s00706-019-02451-1#citeas>>. Acesso em: 11 dez. 2019.

MIRANDA-VIZUETE, Antonio; VEAL, Elizabeth A. *Caenorhabditis elegans* as a model for understanding ROS function in physiology and disease. **Redox Biology**, [S. l.], v. 11, p. 708-714, abr. 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5304259/>>. Acesso em: 25 jul. 2019.

MURTHY, Y. L. N. *et al.* Design, solvent free synthesis, and antimicrobial evaluation of 1,4 dihydropyridines. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, [S. l.], v. 22, n. 18, p. 6016–6023, 15 set. 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22901391>>. Acesso em: 2 ago. 2019.

PARK, Mi Ri *et al.* Probiotic *Lactobacillus fermentum* strain JDFM216 stimulates the longevity and immune response of *Caenorhabditis elegans* through a nuclear hormone receptor. **Scientific Reports**, [S.l.], v. 8, n. 1, p. 1-10, maio. 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29748542>>. Acesso em: 07 set. 2018.

PAZOLLI, Ermira; A STEWART, Sheila. Senescence: the good the bad and the dysfunctional. **Current Opinion in Genetics & Development**, [s. l.], ano 2008, v. 18, n. 1, p. 42-47, 8 fev. 2008. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18262406/>>. Acesso em: 12 out. 2019.

PETER, B. *et al.* Role os lipid peroxidation and DNA damage in paraquat toxicity and the interaction of paraquat with ionizing radiation. *Biochemical Pharmacology*, v.43, n.4, p. 705-715, 18 fev. 1992. Disponível em; <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/1540224/>>. Acesso em: 12 out. 2020.

PHANIENDRA, Alugoju; JESTADI, Dinesh Babu; PERIYASAMY, Latha. Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, [S. l.], v. 30, ed. 1, p. 11–26, 15 jul. 2014. DOI 10.1007/s12291-014-0446-0. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s12291-014-0446-0>>. Acesso em: 11 dez. 2019.

PHOTOLO, Mampolelo M. *et al.* Antimicrobial and Antioxidant Properties of a Bacterial Endophyte, *Methylobacterium radiotolerans* MAMP 4754, Isolated from *Combretum erythrophyllum* Seeds. **International Journal of Microbiology**, [S. l.], ano 2020, p. 1-11, 25 fev. 2020. DOI 10.1155 / 2020/9483670. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7060864/#B30>>. Acesso em: 27 abr. 2020.

PINTO, Silas *et al.* Enoxacin extends lifespan of *C. elegans* by inhibiting miR-34-5p and promoting mitohormesis. **Redox Biology**, [S.l.], v. 18, p. 84-92, jun. 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29986212>>. Acesso em: 07 set. 2018.

PINZ, Mikaela P. *et al.* Current advances of pharmacological properties of 7-chloro-4-(phenylselanyl) quinoline: Prevention of cognitive deficit and anxiety in Alzheimer's

disease model. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [S.I.], v. 105, p. 1006-1014, jun. 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30021335>>. Acesso em: 08 nov. 2018.

POLYAK, Erzsebet *et al.* N-acetylcysteine and vitamin E rescue animal longevity and cellular oxidative stress in pre-clinical models of mitochondrial complex I disease. **Molecular Genetics and Metabolism**, [S.I.], v. 123, n. 4, p. 449-462, fev. 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29526616>>. Acesso em: 07 set. 2018.

PORTA-DE-LA-RIVA, Montserrat *et al.* Basic *Caenorhabditis elegans* methods: synchronization and observation. **Journal of Visualized Experiments**, [S.I.], v. 64, p. 1-9, jun. 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22710399>>. Acesso em: 20 out. 2018.

PUJOL, Nathalie *et al.* Anti-Fungal Innate Immunity in *C. elegans* Is Enhanced by Evolutionary Diversification of Antimicrobial Peptides. **PLoS Pathogens**, [S.I.], v. 4, n. 7, p. 1-12, jul. 2008. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18636113>>. Acesso em: 05 dez. 2018.

PUSKULLU, M. Orhan; TEKINER, Betül; SUZEN, Sibel. Recent Studies of Antioxidant Quinoline Derivatives. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, [S.I.], v. 13, n. 3, p. 365-372, mar. 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23190035>>. Acesso em: 08 nov. 2018.

PUSKULLU, M. Orhan *et al.* Synthesis and evaluation of antioxidant activity of new quinoline-2-carbaldehyde hydrazone derivatives: bioisosteric melatonin analogues. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, [S.I.], v. 31, n. 1, p. 121-125, maio. 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25942363>>. Acesso em: 08 nov. 2018.

RAIZEN D., SONG B., TROJANOWSKI N. e You Y. Methods for measuring pharyngeal behaviors (18 de dezembro de 2012), **WormBook**, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.154.1, <http://www.wormbook.org>.

RANJBAR, Sara *et al.* 5-Oxo-hexahydroquinoline: an attractive scaffold with diverse biological activities. **Molecular Diversity**, [S. I.], v. 23, n. 2, p. 471-508, maio 2019. DOI 10.1007/s11030-018-9886-4. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30390186/>>. Acesso em: 29 set. 2020.

RATHOR, Laxmi; PANDEY, Rakesh. Age-induced diminution of free radicals by Boeravinone B in *Caenorhabditis elegans*. **Experimental Gerontology**, [S.I.], v. 111, p. 94-106, jul. 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30004006>>. Acesso em: 28 out. 2018.

RIBEIRO, Vânia Mattoso *et al.* High fat diet and high polyphenols beverages effects in enzymatic and non-enzymatic antioxidant activity. **Nutrición Hospitalaria**, [S. I.], v. 35, n. 1, p. 169-175, 24 nov. 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29565166>>. Acesso em: 2 ago. 2019.

SALGUEIRO, Willian G. *et al.* Direct synthesis of 4-organylsulfenyl-7-chloro quinolines and their toxicological and pharmacological activities in *Caenorhabditis elegans*. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [S.l.], v. 75, p. 448-459, jan. 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24561673>>. Acesso em: 03 nov. 2018.

SARKER, Satyajit D.; NAHAR, Lutfun. Progress in the Chemistry of Naturally Occurring Coumarins. **Prog Chem Org Nat Prod.**, [S.l.], v. 106, p. 241-304, 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28762091>>. Acesso em: 09 nov. 2018.

SASAKURA, Hiroyuki *et al.* Lifespan extension by peroxidase and dual oxidase-mediated ROS signaling through pyrroloquinoline quinone in *C. elegans*. **Journal of Cell Science**, [S.l.], v. 130, n. 15, p. 2631-2643, jul. 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28676501>>. Acesso em: 03 nov. 2018.

SCORZONI, Liliana *et al.* Evaluation of *Caenorhabditis elegans* as a host model for *Paracoccidioides brasiliensis* and *Paracoccidioides lutzii*. **Pathog.**, [S.l.], v. 76, n. 1, p. 1-12, fev. 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29361158>>. Acesso em: 05 de dez. De 2018.

SHARMA, Dinesh; KUMAR, Suresh; MAKRANDI, J.K. Modified Pechmann condensation using grinding technique under solvent-free condition at room temperature. **Green Chemistry Letters and Reviews**, [S.l.], v. 4, n. 2, p. 127-129, jun. 2011. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/17518253.2010.517785>>. Acesso em: 06 dez. 2018.

SHARMA, Meenakshi; PANDEY, Renu; SALUJA, Daman. ROS is the major player in regulating altered autophagy and lifespan in sin-3 mutants of *C. elegans*. **Autophagy**, [S.l.], v. 14, n. 7, p. 1239-1255, jul. 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29912629>>. Acesso em: 07 set. 2018.

SIM, Insuk *et al.* Probiotic Potential of *Enterococcus faecium* Isolated from Chicken Cecum with Immunomodulating Activity and Promoting Longevity in *Caenorhabditis elegans*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, [S.l.], v. 28, n. 6, p. 1-10, abr. 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29642285>>. Acesso em: 07 set. 2018.

SIRIVIBULKOVIT, Kitima; NOUANTHAVONG, Souksanh; SAMEENOI, Yupaporn. Paper-based DPPH Assay for Antioxidant Activity Analysis. **Analytical Sciences**, [S.l.], v. 34, n. 7, p. 795-800, 10 jul. 2018. DOI 10.2116/analsci.18P014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29998961>>. Acesso em: 16 dez. 2019.

SOLIS, Gregory M.; PETRASCHECK, Michael. Measuring *Caenorhabditis elegans* Life Span in 96 Well Microtiter Plates. **Journal of Visualized Experiments**, [s. l.], v. 49, p. 1-6, 18 mar. 2011. DOI 10.3791/2496. Disponível em: <<https://www.jove.com/video/2496/medio-caenorhabditis-elegans-expectativa-de-vida-em-96-placas-de?language=Portuguese>>. Acesso em: 7 jan. 2020.

SON, Jyung Mean; LEE, Changhan. Mitochondria: multifaceted regulators of aging. **BMB Reports**, [S. l.], v. 52, n. 1, p. 13-23, 31 jan. 2019. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30545443>>. Acesso em: 25 jul. 2019.

STAMPER, Breanne L. Newell *et al.* Movement decline across lifespan of *Caenorhabditis elegans* mutants in the insulin/insulin-like signaling pathway. **Aging Cell**, [S.l.], v. 17, n. 1, p. 1-14, dez. 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29214707>>. Acesso em: 07 set. 2018.

STIERNAGLE, T. Maintenance of *C. elegans* (11 de fevereiro, 2006), WormBook, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.101.1, <http://www.wormbook.org>.

STRANGE, KEVIN. From Genes to Integrative Physiology: Ion Channel and Transporter Biology in *Caenorhabditis elegans*. **Physiol Rev.**, [S. l.], v. 83, n. 2, p. 377-415, 11 abr. 2003. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12663863>>. Acesso em: 11 ago. 2019.

SUGAWARA, Takaya; SAKAMOTO, Kazuichi. Killed *Bifidobacterium longum* enhanced stress tolerance and prolonged life span of *Caenorhabditis elegans* via DAF-16. **British Journal of Nutrition**, [S.l.], v. 120, n. 8, p. 872-880, set. 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30178731>>. Acesso em: 07 set. 2018.

SUN, Xiaojuan; CHEN, Wei-Dong; WANG, Yan-Dong. DAF-16/FOXO Transcription Factor in Aging and Longevity. **Frontiers in Pharmacology**, [S. l.], 23 ago. 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28878670>>. Acesso em: 25 jul. 2019.

TAORMINA, Giusi *et al.* Longevity: Lesson from Model Organisms. **Genes (Basel)**, [S. l.], v. 10, n. 7, p. 1-20, 9 jul. 2019. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31324014>>. Acesso em: 25 jul. 2019.

THANGARAJ, Muthu. Synthesis, molecular docking, antimicrobial, antioxidant and toxicity assessment of quinoline peptides. **Journal of Photochemistry & Photobiology**, [S. l.], v. 178, p. 287–295, jan. 2018. DOI 10.1016/j.jphotobiol.2017.11.019. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29175602>>. Acesso em: 16 dez. 2019.

TISSENBAUM, Heidi A. Using *C. elegans* for aging research. **Invertebrate Reproduction & Development**, [S.l.], v. 59, n. 1, p. 59-63, dez. 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26136622>>. Acesso em: 20 out. 2018.

TREVISAN, Kaynara *et al.* Theories of Aging and the Prevalence of Alzheimer's Disease. **BioMed Research International**, [S. l.], v. 2019, p. 1-9, 16 jun. 2019. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31317043>>. Acesso em: 25 jul. 2019.

VASCONCELOS-MORENO, Mirela Paiva *et al.* Telomere Length, Oxidative Stress, Inflammation and BDNF Levels in Siblings of Patients with Bipolar Disorder:

Implications for Accelerated Cellular Aging. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, Porto Alegre, v. 20, n. 6, p. 445-454, 30 jan. 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30545443>>. Acesso em: 25 jul. 2019.

WEN, Linchun *et al.* Pyrroloquinoline quinone induces chondrosarcoma cell apoptosis by increasing intracellular reactive oxygen species. **Molecular Medicine Reports**, [S.l.], v. 17, n. 5, p. 7184-7190, mar. 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29568949>>. Acesso em: 08 nov. 2018.

WILHELM, Ethel A. *et al.* Antioxidant effect of quinoline derivatives containing or not selenium: relationship with antinociceptive action quinolines are antioxidant and antinociceptive. **An Acad Bras Cienc.**, [S.l.], v. 89, n. 1, p. 457-467, maio. 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28538816>>. Acesso em: 08 nov. 2018.

WOLF, Marc *et al.* The MAP kinase JNK-1 of *Caenorhabditis elegans*: location, activation, and influences over temperature-dependent insulin-like signaling, stress responses, and fitness. **J Cell Physiol.**, [S.l.], v. 214, n. 3, p. 721-729, mar. 2008. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17894411>>. Acesso em: 05 dez. 2018.

WU, J.Z *et al.* Pyrroloquinoline quinone enhances the resistance to oxidative stress and extends lifespan upon DAF-16 and SKN-1 activities in *C. elegans*. **Experimental Gerontology**, [S.l.], v. 80, p. 43-50, abr. 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27090484>>. Acesso em: 03 nov. 2018.

YANG, In Jun; LEE, Dong Ung; SHIN, Heung Mook. Anti-inflammatory and antioxidant effects of coumarins isolated from *Foeniculum vulgare* in lipopolysaccharide-stimulated macrophages and 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-stimulated mice. **Immunopharmacol Immunotoxicol**, [S.l.], v. 37, n. 3, p. 308-317, maio. 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25990850>>. Acesso em: 09 nov. 2018.

YU, Jun *et al.* Antioxidant Activity of Citrus Limonoids, Flavonoids, and Coumarins. **J. Agric. Food Chem.**, [S.l.], v. 53, n. 6, p. 2009-2014, mar. 2005. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15769128>>. Acesso em: 09 nov. 2018.

ZHOU, Lin *et al.* Arbutin increases *Caenorhabditis elegans* longevity and stress resistance. **PeerJ.**, [S.l.], v. 5, p. 1-15, dez. 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29340230>>. Acesso em: 28 out. 2018.

ZHOU, Yi *et al.* Bergapten prevents lipopolysaccharide-induced inflammation in RAW264.7 cells through suppressing JAK/STAT activation and ROS production and increases the survival rate of mice after LPS challenge. **International Immunopharmacology**, [S.l.], v. 48, p. 159-168, maio. 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28511114>>. Acesso em: 03 nov. 2018.