

AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIOXIDANTE *IN VITRO* DE SELENOINDOLIZINAS

CLEISSON SCHOSSLER GARCIA¹; MARCIA JUCIELE DA ROCHA²; CAMILA SIMÕES PIRES³; MARCELO HEINEMANN PRESA⁴; ÉDER JOÃO LENARDÃO⁵; CÉSAR AUGUSTO BRÜNING⁶

^{1, 2, 3, 4, 6} Laboratório de Bioquímica e Neurofarmacologia Molecular (LABIONEM), Universidade Federal de Pelotas – cleissonschoessler@gmail.com; cabruning@yahoo.com.br

⁵ Laboratório de Síntese Orgânica Limpa (LASOL), Universidade Federal de Pelotas

1. INTRODUÇÃO

“Espécies Reativas de Oxigênio” (ERO) é um termo utilizado para uma grande família de substâncias oxidantes derivadas do oxigênio molecular. Tal família é composta ainda por determinados elementos químicos que podem sofrer um processo de redução-oxidação (redox) e modificar de forma significativa as macromoléculas celulares (SIES et al., 2022). Além disso, as ERO são controladas pelo sistema de defesa antioxidante, que pode ser dividido em enzimático e não enzimático. Em níveis moderados, as ERO são indispensáveis ao organismo, atuando como mediadores para a transferência de elétrons em diversas reações bioquímicas. Porém, quando há um desequilíbrio entre a produção de ERO e a atuação do sistema de defesa antioxidante tem-se um quadro de estresse oxidativo, isto é, uma superprodução de ERO e/ou insuficiência de moléculas antioxidantes (SALIM, 2014).

Ademais, um levantamento demonstra que houve um aumento no uso de antioxidantes para tratar distúrbios causados pelo estresse oxidativo (NOGUEIRA; ROCHA, 2010). Nesse sentido, destaca-se a importância das calcogenoindolizinas, em especial as que contém selênio em sua estrutura química, haja vista que este elemento faz parte das selenoproteínas que são fundamentais para as funções bioquímicas e fisiológicas do organismo. Além disso, compostos orgânicos contendo selênio em sua estrutura têm sido descritos como antidepressivos (GARCIA et al., 2021), antioxidantes (BRUNING et al., 2015a) e neuroprotetores (BRUNING et al., 2015b). Nesta perspectiva, a 1-(fenilselanil)-2-(p-tolil)indolizina (MeSel), um composto orgânico de selênio, demonstrou previamente atividade antioxidante em testes *in vitro* frente à peroxidação lipídica (ZUGE et al., 2020), enquanto a 2-fenil-1-(fenilselanil)indolizina (Sel) demonstrou atividade *scavenger* frente ao radical ABTS^{•+} (PENTEADO et al., 2019). Semelhantemente, o composto 2-(4-clorofenil)-1-(fenilselanil)indolizina (ClSel) têm apresentado atividade *scavenger* frente ao radical DPPH (dados não mostrados). Nesse sentido, experimentos *in vitro* adicionais são necessários para compreender e reforçar a ação antioxidante dos respectivos compostos. Assim, o objetivo do estudo foi avaliar o efeito da Sel, ClSel e MeSel frente aos ensaios antioxidantes FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) e proteína carbonilada.

2. METODOLOGIA

Os compostos (Figura 1) foram sintetizados no Laboratório de Síntese Orgânica Limpa (LASOL) da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL). A atividade antioxidante dos mesmos foi avaliada através dos seguintes

protocolos: Yoshino e Murakami (1998) para o ensaio de FRAP e Levine e colaboradores (1990) para o ensaio da proteína carbonilada. Os animais foram obtidos no Biotério Central da UFPEL e manejados de acordo com as normas do Comitê de Ética e Bem-Estar Animal da mesma universidade (CEEA 12231-2019).

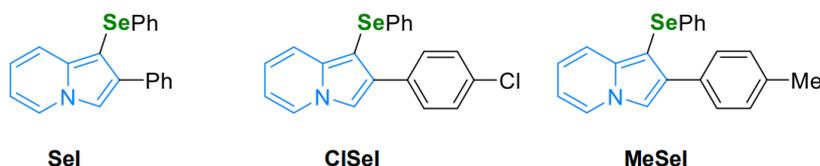


Figura 1. Estruturas químicas da 2-fenil-1-(fenilselanil)indolizina (Sel) e derivados substituídos (ClSel e MeSel).

O ensaio FRAP determina o poder de redução dos compostos tendo como base o complexo oxidado de Fe^{3+} , o 2,4,6-tripiridil-1,3,5- triazina (TPTZ). Assim, há a dissolução dos respectivos compostos em dimetilsulfóxido (DMSO) e a avaliação dos mesmos nas concentrações de 1, 5, 10, 15 e 25 μM . A solução FRAP foi preparada misturando 38 mM de acetato de sódio anidro em água destilada (pH 3.8), 20 mM FeCl_3 em água destilada e 10 mM de TPTZ em 40 mM de HCl em proporções de 10:1:1. Essa solução foi preparada antes de cada experimento. Os compostos Sel, ClSel e MeSel e ácido ascórbico (25 μM , controle positivo) foram incubados com solução FRAP a 37°C no escuro por 40 min. Cada experimento foi repetido três vezes e realizado em duplicata. A absorbância foi lida a 593 nm.

Para o ensaio da proteína carbonilada, os camundongos foram eutanasiados com isoflurano inalado e seus cérebros foram removidos e armazenados em um freezer à -80°C até o momento do preparo do homogenato. Os homogeneizados de cérebro foram preparados com tampão Tris-HCl 50 mM pH 7.4, 1:10 (peso/volume) e, subsequentemente, diluído 1:8. Em diferentes tubos de ensaio, os compostos foram adicionados para serem testados nas concentrações de 1, 10, 25, 50 e 100 μM . Posteriormente, o homogeneizado foi adicionado em todos os tubos e, em seguida, o nitroprussiato de sódio (NPS) 1 mM, usado como um indutor de carbonilação de proteínas. Os tubos foram incubados a 37°C durante 2h. Após este período, o HCl 2M foi adicionado nos tubos controle, e solução de DNPH 10 mM nos tubos das concentrações testadas, deixando repousar por 1h no escuro e agitando a cada 15 min. Um volume de 500 μl de tampão de desnaturação, 1,5 ml de etanol, 1,5 ml de hexano foram adicionados a todos os tubos e, em seguida, foram agitados por 40 s. Em seguida, os tubos foram centrifugados por 15 min e o sobrenadante foi cuidadosamente removido. O pellet formado no tubo foi lavado duas vezes com 1 ml de solução de etanol (1:1). Após 2 minutos do período de secagem, o pellet foi ressuspensão com 1 ml de tampão desnaturante e lido em espectrofotômetro a 370 nm. Cada experimento foi repetido três vezes e realizado em duplicata. Além disso, o Trolox foi utilizado como controle positivo na concentração de 100 μM .

A análise estatística foi realizada por ANOVA unidirecional seguido pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls. Os resultados foram considerados significativos quando $p < 0.05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise realizada demonstrou que houve um aumento significativo da absorbância, em relação ao grupo veículo, no ensaio de FRAP (Figura 2) a partir da concentração de 5 μM . Ademais, nas concentrações posteriores tal aumento foi ainda mais acentuado, demonstrando que os compostos possuem potencial redutor, o qual é um dos mecanismos que podem estar envolvidos na atividade antioxidante de uma molécula. Em relação ao teste da proteína carbonilada (Figura 3), verificou-se que o NPS induziu significativamente a carbonilação proteica e os compostos testados foram capazes de reverter este parâmetro a partir da concentração de 10 μM , onde, inclusive, as concentrações de 50 e 100 μM da MeSel foram capazes de diminuir a carbonilação de proteínas a níveis inferiores ao grupo controle. Os controles positivos de ambos os experimentos foram estatisticamente diferentes quando comparados ao grupo controle. Além disso, as selenindolizinas apresentaram uma maior atividade frente ao FRAP e à carbonilação proteica do que o próprio controle positivo na mesma concentração.

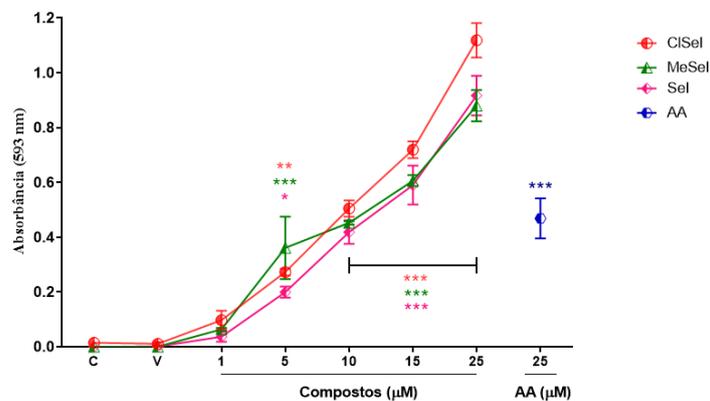


Figura 2. Avaliação do potencial redutor do íon férrico dos compostos Sel, ClSel e MeSel. Os dados representam a média \pm EPM de 3 experimentos independentes, e os resultados estão expressos em absorbância. (*) Quando comparado ao grupo veículo (V). Controle (C); Ácido ascórbico (AA).

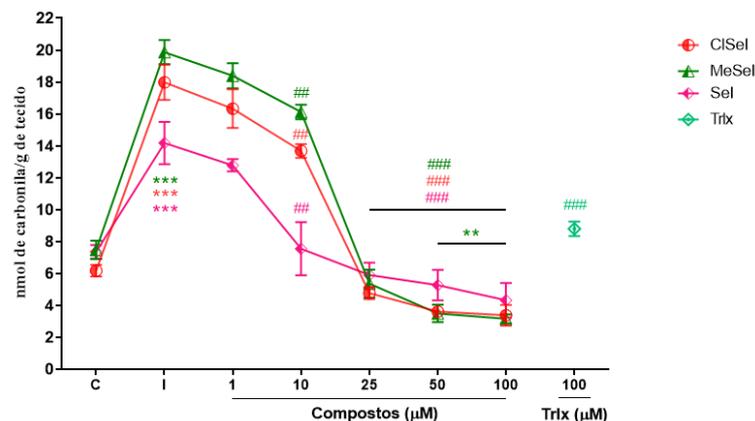


Figura 3. Avaliação dos compostos Sel, ClSel e MeSel frente à carbonilação proteica. Os dados representam a média \pm EPM de 3 experimentos independentes, e os resultados estão expressos em nmol de carbonila/g de tecido. (*) Quando comparado ao grupo controle (C); (#) quando comparado ao grupo induzido (I). Trolox (Trlx).

4. CONCLUSÕES

Mediante os dados apresentados, os três compostos foram capazes de reduzir o íon férrico. Além disso, os dados obtidos no ensaio da carbonilação de proteínas demonstraram a reversão de tal parâmetro pelos três compostos em baixas concentrações, evidenciando que os mesmos apresentam uma significativa atividade antioxidante. Os resultados apresentados neste estudo corroboram com estudos prévios da ação antioxidante destes compostos demonstrada em outros ensaios. Mediante os resultados obtidos neste trabalho, além de uma investigação mais profunda acerca destes compostos, os mesmos poderiam ser utilizados para evitar processos pró-oxidativos associados a diversas patologias.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRUNING, C. A. et al. m-Trifluoromethyl-diphenyl diselenide, a multi-target selenium compound, prevented mechanical allodynia and depressive-like behavior in a mouse comorbid pain and depression model. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, 35-46, 2015a.

BRUNING, C. A. et al. Depressive-like behavior induced by tumor necrosis factor alpha is attenuated by m-trifluoromethyl-diphenyl diselenide in mice. **J Psychiatr Res.**, 75-83, 2015b.

GARCIA, C. et al. Effect of m-Trifluoromethyl-diphenyl diselenide on the Pain/Depression Dyad Induced by Reserpine: Insights on Oxidative Stress, Apoptotic, and Glucocorticoid Receptor Modulation. **Mol Neurobiol.**, 12, 2021.

LEVINE, R. L. et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. In **Methods in enzymology**. Academic Press, 464-478, 1990.

NOGUEIRA, C.W. ROCHA, J.B.T. Diphenyl diselenide a janus-faced molecule. **J. Braz. Chem. Soc.**, 2055–2071, 2010.

PENTEADO, F. et al. Regioselective Synthesis of 1-Sulfanyl- and 1-Selanylindolizines. **The Journal of Organic Chemistry**, 7189-7198, 2019.

SALIM, S. Oxidative stress and psychological disorders. **Current Neuropharmacology**, 140-147, 2014.

SIES, H. et al. Defining roles of specific reactive oxygen species (ROS) in cell biology and physiology. **Nat Rev Mol Cell Biol**, 1-17, 2022.

YOSHINO, M.; MURAKAMI, K. Interaction of iron with polyphenolic compounds: application to antioxidant characterization. **Analytical biochemistry**, 257(1), 40-44, 1998.

ZUGE, N. P. et al. Análise do potencial antioxidante da molécula 2-fenil-1-(fenilselanil)indolizina e derivados substituídos na redução da peroxidação lipídica induzida por nitroprussiato de sódio. In: **6º SEMANA INTEGRADA UFPEL**, Pelotas, 2020.