

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE *IN VITRO* DE UMA CLASSE DE COMPOSTOS DERIVADOS DE SAIS DE PIRIDÍNIO CONTENDO SELÊNIO

LETÍCIA DEVANTIER KRÜGER¹; MARIANA PARRON PAIM²; LARISSA SANDER MAGALHÃES²; DIANER NORNBERG STRELOW²; EDIANDRA TISSOT CASTRO²; CRISTIANI FOLHARINI BORTOLATTO³

^{1,2,3}Universidade Federal de Pelotas (UFPEL) – Laboratório de Bioquímica e Neurofarmacologia Molecular (LABIONEM) – leticialevantier@hotmail.com; maa_paim@hotmail.com; larissasama@hotmail.com; dianer_strelow@hotmail.com; ediandra.tissot@hotmail.com; cbortolato@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O desequilíbrio entre as espécies reativas de oxigênio e as defesas antioxidantes desencadeiam no organismo o estresse oxidativo, esse acaba gerando danos celulares, contribuindo para o desenvolvimento de diferentes patologias neurodegenerativas, psiquiátricas e metabólicas (ZHANG et al., 2019). Sendo assim, compostos que apresentam efeitos antioxidantes podem ser aliados ao tratamento e prevenção dessas doenças.

Paralelamente a isso, o selênio é um microelemento essencial que já demonstra esse potencial antioxidante. Além disso, derivados de sais de piridina vêm sendo estudados e apresentando resultados promissores como antifúngicos, antibacterianos, anticancerígenos, anticonvulsivantes e antidepressivos (WANG et al., 2019; YAN et al., 2019; NOGUEIRA et al., 2011). Nesse sentido, sabendo que várias doenças possuem o envolvimento do estresse oxidativo em sua fisiopatologia, o estudo de compostos derivados de sais de piridínio e contendo em sua estrutura o elemento selênio pode ser promissor, visto as atividades biológicas que cada um exerce. Ademais, ensaios *in vitro* apresentam uma elevada importância por possibilitarem a triagem rápida de novos compostos que podem ser efetivos em testes *in vivo*, reduzindo o número total de animais empregados na pesquisa.

Dado o exposto, o presente trabalho teve como objetivo investigar o potencial antioxidante dos compostos brometo de 1-(2-oxo-2-feniletil)-2-((fenilselanil)metil)piridín-1-íio (3A), brometo de 1-(2-oxo-2-(p-tolil)etil)-2-((fenilselanil)metil)piridín-1-íio (3B) e (brometo de 1-(2-(4-clorofenil)-2-oxoetil)-2-((fenilselanil)metil)piridín-1-íio (3C) (figura 1) por meio de ensaios *in vitro*.

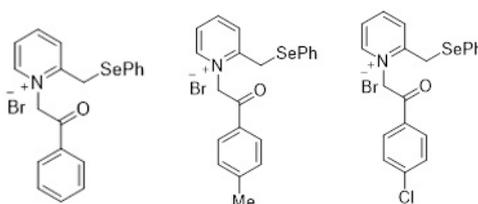


Figura 1. Estrutura química dos sais 3A, 3B e 3C, respectivamente.

2. METODOLOGIA

2.1 Compostos

Os sais 3A, 3B e 3C foram sintetizados pelo Laboratório de Síntese Orgânica Limpa (LASOL) da Universidade Federal de Pelotas. Os mesmos foram

solubilizados em água destilada. Os homogenatos foram preparados com o cérebro total de camundongos Swiss oriundos do projeto de número 027542/2021-11 aprovado pela CEUA.

2.2 Ensaio de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A lipoperoxidação foi determinada pela técnica do TBARS realizada segundo a metodologia de OHKAWA et al. (1979) utilizando o método de indução por nitroprussiato de sódio (NPS), um doador de óxido nítrico. Um homogenato de tecido cerebral de camundongos foi utilizado como fonte lipídica. Para isso os cérebros foram homogeneizados em Tris/HCl 50 mM (pH 7.4) na proporção 1:10 (p/v) e centrifugados. O sobrenadante foi utilizado como tecido na técnica. O grupo controle recebeu o tecido, tris/HCl e água, o induzido recebeu tecido, NPS, tris/HCl e água e os grupos drogas receberam tecido, tris/HCl, NPS, água e os respectivos compostos. Foram utilizadas concentrações de 25, 50, 100, 200 e 500 μ M dos sais A, B e C. Além disso, foi utilizado o trolox como controle positivo (antioxidante padrão). Os tubos foram incubados por 1 hora a 37°C. Em sequência, receberam ácido tiobarbitúrico 10% (TBA), tampão de ácido acético e dodecil sulfato de sódio 0.8% (SDS) e foram incubados por 2 horas a 95°C. Após a incubação foi realizada a leitura espectrofotométrica em 532 nm e os resultados foram expressos em nmol de TBARS/g de tecido.

2.3 Reação de carbonilação de proteínas

Esta técnica determina a carbonilação de proteínas que indica modificações oxidativas nas proteínas (LEVINE et al., 1990). Foi utilizado um homogenato de cérebro de camundongos diluído em Tris/HCl 10 mM (pH 7.4) na proporção 1:10 (v/v). Os grupos utilizados foram controle, que recebeu o homogenato, água e HCl; induzido, recebendo o homogenato e NPS; veículo (água destilada) e dinitrofenilhidrazina (DNPH) e o grupo droga que recebeu o homogenato, NPS, composto A, B ou C e DNPH. O trolox foi utilizado como controle positivo. Foram utilizadas concentrações de 25, 50, 100 e 200 μ M dos sais A, B e C. O DNPH (reativo para coloração) e o HCl foram adicionados após a incubação de 2 horas a 37°C e foram novamente incubados por 1 hora a temperatura ambiente. Foi acrescentado tampão de desnaturação, etanol e hexano. Os tubos passaram por uma centrifugação e foi observado a formação de um *pellet*, que foi lavado com uma solução de acetato de etila:etanol (1:1) e acrescentado tampão de desnaturação. A leitura espectrofotométrica foi realizada em 370 nm e os resultados foram expressos em nmol de carbonila/mg de proteína. A dosagem de proteína do tecido foi realizado pelo método de Bradford (1976).

2.4 Análise estatística

A análise estatística foi realizada pelo software GraphPad Prism 8.0.2 e para a comparação múltipla entre os grupos foi utilizada a análise de variância ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Tukey. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) e um $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados quanto aos níveis de peroxidação lipídica (TBARS) estão expostos na figura 2. A ANOVA de uma via revelou que houve um efeito

significativo dos compostos 3A, 3B e 3C ($F_{(7,16)}=20.00$; $F_{(7,16)}=14.76$ e $F_{(7,16)}=12.71$, respectivamente e $p<0,0001$). O teste *post hoc* de Tukey demonstrou que o NPS foi capaz de aumentar significativamente os níveis de TBARS quando comparado ao grupo controle. Os compostos A e B (figura 2A e 2B respectivamente) nas concentrações de 100, 200 e 500 μM e o composto C (figura 2C) nas concentrações de 50, 100, 200 e 500 μM foram capazes de atenuar esse efeito de lipoperoxidação lipídica *in vitro* quando comparado ao grupo induzido (NPS) demonstrando um efeito antioxidante. Esse efeito também foi observado para o trolox, um análogo da vitamina E, utilizado como antioxidante de referência.

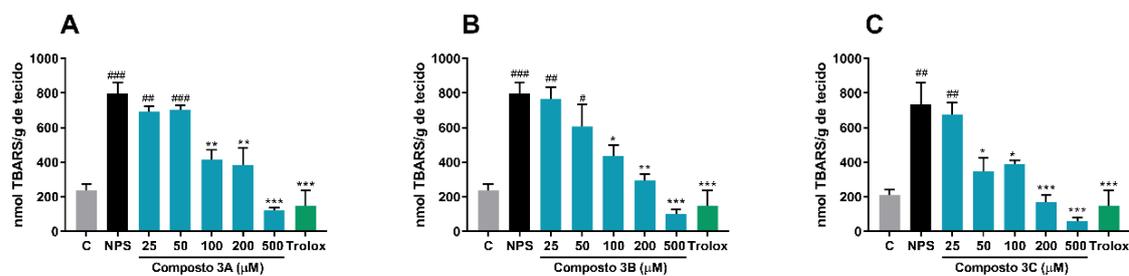


Figura 2. Efeito protetor dos compostos 3A, 3B e 3C contra a lipoperoxidação lipídica induzida por NPS *in vitro* em homogenato de cérebro de camundongos em ensaio de TBARS. Os resultados estão representados em média \pm EPM ($n=3$ experimentos individuais) e são expressos como nmol de TBARS/g de tecido. Foram analisados por ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Tukey. * $p<0,05$, ** $p<0,01$ e *** $p<0,001$ comparado ao NPS. # $p<0,05$, ## $p<0,01$ e ### $p<0,001$ comparado ao controle.

Os resultados quanto ao ensaio de carbonilação de proteínas são mostrados na figura 3. As proteínas sofrem modificações oxidativas pelas espécies reativas de oxigênio e dentre essas modificações está a inserção de grupos carbonila na cadeia lateral dos aminoácidos das proteínas, sendo considerada um marcador de dano oxidativo. Assim, a quantificação de carbonilas de proteínas é utilizada para determinar o nível dano oxidativo celular (AKAGAWA, 2021). A análise dos dados mostrou uma diferença estatística entre os grupos para os compostos 3A, 3B e 3C ($F_{(6,14)}=47.06$, $p<0,0001$; $F_{(6,14)}=9.85$, $p=0,0002$; $F_{(6,14)}=20.11$, $p<0,0001$, respectivamente). O teste *post hoc* de Tukey demonstrou que o NPS, quando comparado ao grupo controle, foi capaz de induzir dano oxidativo em proteínas, evidenciado pela maior formação de proteína carbonila. Esse efeito foi atenuado pelos compostos 3A e 3C nas concentrações de 25, 50, 100 e 200 μM (figura 3A e 3C) e pelo 3B na dose de 200 μM (figura 3B), indicando um efeito protetor contra a carbonilação de proteínas. Ademais, o trolox também demonstrou essa redução, como era o esperado para um controle positivo.

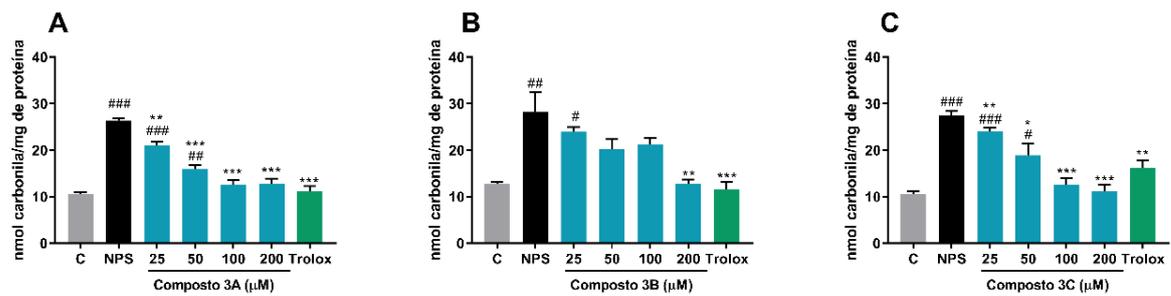


Figura 3. Efeito protetor dos compostos 3A, 3B e 3C frente à carbonilação de proteínas induzida pelo NPS em homogenato de cérebro de camundongos *in vitro*. Os resultados estão representados em média \pm EPM (n= 3 experimentos individuais) e são expressos como nmol de carbonila/mg de proteína. Foram analisados por ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* Tukey. *p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001 comparado ao NPS. #p<0,05, ##p<0,01 e ###p<0,001 comparado ao controle.

4. CONCLUSÕES

Dado o exposto, pode-se inferir que os compostos 3A, 3B e 3C foram capazes de diminuir o dano oxidativo em lipídios e proteínas induzido por NPS, conforme revelado pelos ensaios de TBARS e carbonilação proteica, demonstrando assim seus efeitos antioxidantes. Além disso, os experimentos foram validados com a utilização do trolox como controle positivo antioxidante. Como perspectivas futuras têm-se os ensaios *in vivo* com o emprego destes sais, a fim de analisar se esses efeitos observados *in vitro* são reprodutíveis em espécies animais.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKAGAWA, M. Protein carbonylation: molecular mechanisms, biological implications, and analytical approaches. *Free Radical Research*, v.55, n.4, p.307-320, 2021.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. ***Analytical Biochemistry***. v.72, p. 248-254, 1976.
- LEVINE et al. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. ***Methods Enzymology***, v.186, p. 464-478, 1990.
- NOGUEIRA et al. Toxicology and pharmacology of selenium: emphasis on synthetic organoselenium compounds. ***Archives Toxicology***, v.85, n.11, p.1313-1359, 2011.
- OHKAWA et al. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. ***Analytical Biochemistry***, v. 95, n.1, p. 351-358, 1979.
- WANG et al. Synthesis and Evaluation of Antidepressant Activities of 5-Aryl-4,5-dihydro-1H-tetrazolo [1,5-a]thieno[2,3-e]pyridine Derivatives. ***Molecules***, v.24, n.10, p. 1857,2019.
- YAN et al. Design, synthesis and biological evaluation of tetrazole-containing RXR α ligands as anticancer agents. ***European Journal of Medicinal Chemistry***, v.164, p.562-575, 2019.
- ZHANG et al. Biochemical basis and metabolic interplay of redox regulation. ***Redox Biology***, v. 26, p. 101284, 2019.