

SAIS DE PIRIDÍNIO CONTENDO SELÊNIO: DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO* E DE POTENCIAL DE TOXICIDADE *IN VIVO*

TÁCIA KATIANE HALL¹; MARIANA PARRON PAIM²; CAROLINE SIGNORINI GOMES³, EDÉR JOÃO LENARDÃO⁴, CRISTIANI FOLHARINI BORTOLATTO⁵

^{1,2,5} Universidade Federal de Pelotas (UFPel) – Laboratório de Bioquímica e Neurofarmacologia Molecular (LABIONEM) – taciahall26@gmail.com, maa_paim@hotmail.com, cbortolatto@gmail.com

^{3,4} Universidade Federal de Pelotas (UFPel) – Laboratório de Síntese Orgânica (LASOL) – carosigomes@gmail.com, lenardao@ufpel.edu.br

1. INTRODUÇÃO

A geração de espécies reativas (ERs) pode ser considerado um processo fisiológico pois cumpre funções biológicas importantes ao organismo. A produção ininterrupta de ERs leva a geração de mecanismos de defesa antioxidante, isso para que não ocorram danos decorrentes deste processo (PHANIENDRA et al, 2015). Contudo, uma produção elevada de ERs pode levar ao processo chamado de estresse oxidativo, que é decorrente de um desequilíbrio no organismo, no qual as espécies oxidantes estão em maior quantidade comparados aos compostos antioxidantes. A geração permanente do processo em questão está implicada em diversos problemas ao organismo como, por exemplo, lesão tecidual e surgimento de diversas doenças (VALKO et al., 2007).

Desta forma, fica evidente o aumento do interesse nas pesquisas em compostos com propriedades antioxidantes (FORMAN, ZHANG, 2021). Sabe-se que o micronutriente selênio (Se) tem diversas funções no organismo e, dentre elas, pode-se citar a de ser antioxidante (Torres et al., 2021). Os sais de piridínio, uma classe de moléculas heterocíclicas que possuem propriedades de constituição farmacologicamente ativa, vêm sendo amplamente pesquisados (He et al., 2019). Os testes *in vitro* e *ex vivo* são considerados de fácil aplicação, sendo testes normalmente rápidos, simples e ao mesmo tempo considerados seguros para avaliar a ação antioxidante de diferentes compostos (NWACHUKWU et al, 2021).

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi investigar, através de técnicas *in vitro* e *ex vivo*, se os sais de piridínios contendo Se em sua estrutura possuíam atividades antioxidantes.

2. METODOLOGIA

Os compostos utilizados foram sintetizados no Laboratório de Síntese Orgânica Limpa da Universidade Federal de Pelotas (LASOL, UFPel) e foram testados nas concentrações de 5, 10, 25, 50 e 100 µM, sendo dissolvidos em água para a realização dos testes.

Para avaliação da toxicidade *in vivo*, foram utilizados camundongos swiss machos e fêmeas pesando de 25 a 35 gramas, sendo colocados em uma sala com temperatura controlada (22°C ± 1°C), com ciclo claro/escuro de 12 horas. Os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pelotas (UFPel) sob o número 027542/2021-11.

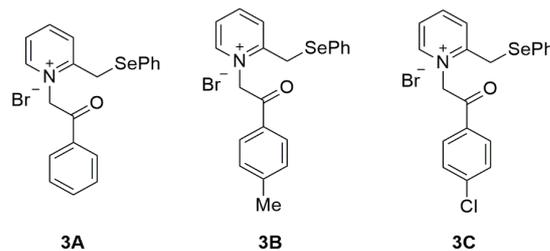


Figura 1- Estrutura química dos compostos

Os três compostos apresentados na Figura 1 acima, são chamados: brometo de 1-(2-oxo-2-feniletíl)-2-((fenilselanil)metil)piridin-1-íó (composto 3A), brometo de 1-(2-oxo-2-(p-tolil)etíl)-2-((fenilselanil)metil)piridin-1-íó (composto 3B), e brometo de 1-(2-(4-clorofenil)-2-oxoetíl)-2-((fenilselanil)metil)piridin-1-íó (composto 3C).

Utilizou-se tecido hepático de camundongos para o teste de carbonilação de proteínas, e plasma para ensaios de toxicidade *ex vivo*.

2.1 Ensaio de carbonilação de proteínas: Modificado de Levine et al. (1990), consiste em avaliar se os compostos testados são capazes de proteger contra os danos oxidativos gerados a proteínas presentes em tecidos. Para a indução do dano, foi utilizado o nitroprussiato de sódio (NPS) e o controle positivo utilizado foi o Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico (Trolox). Após a execução da técnica, foi realizada a leitura no espectrofotômetro a 370 nm.

2.2 Atividade scavenger do radical 2,2'-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH): Esta técnica consiste em avaliar se os compostos testados têm a capacidade de sequestrar o radical livre sintético e reduzir a forma oxidada desse mesmo radical DPPH. O controle positivo utilizado foi o Ácido Ascórbico (AA). Ao final da técnica, foi realizada a leitura no espectrofotômetro a 517 nm (SHARMA E BHAT, 2009).

2.3 Atividade mimética da glutatona S-transferase (GST): Os compostos foram testados para investigar se são mimetizadores da glutatona S-transferase (GST), uma enzima antioxidante que promove a conjugação da GSH (um tripeptídeo presente na maioria dos tecidos) a metabólitos potencialmente perigosos, formando espécies menos reativas e facilmente excretadas (HABIG et al. 1974). A reação foi acompanhada em espectrofotômetro a 340 nm por 3 min, registrando os valores nos tempos de 0 e 180 seg. O controle positivo utilizado foi o disseleneto de difenil (PhSe)₂.

2.4 Análises *ex vivo* (transaminases plasmáticas e ureia): Após a realização do protocolo experimental com camundongos para avaliar a toxicidade oral aguda do composto 3C (selecionado após testes *in vitro*), os camundongos foram eutanasiados e o sangue foi coletado para obtenção do plasma, o qual foi utilizado para análise bioquímica das atividades de alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) e níveis de ureia. Os testes foram realizados utilizando kits comerciais.

2.5 Análise estatística: Os resultados experimentais foram realizados pelo software *GraphPad Prism* (versão 8.0.2). As análises estatísticas foram feitas por meio de variância unidirecional (ANOVA), seguido pela aplicação dos testes de *Tukey* ou *Dunnnett*. Valor de probabilidade de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em relação ao ensaio de carbonilação de proteínas, visto na Figura abaixo, observa-se que o composto 3A na concentração de 50 μM (Figura 2A), e os compostos 3B (Figura 2B) e 3C (Figura 2C) na concentração de 25 μM , foram

eficazes, pois reduziram a quantidade de proteína carbonilada quando comparados com o grupo induzido por NPS (I). O controle positivo (Trolox) também foi capaz de produzir este efeito.

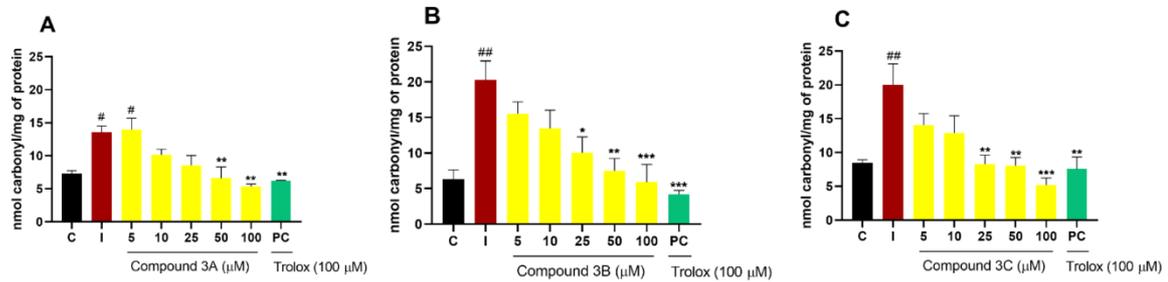


Figura 2– Carbonilação de proteínas para os compostos 3A, 3B e 3C respectivamente. Os valores estão expressos como média \pm E.P.M. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ em comparação ao grupo induzido. # $p < 0,05$ e ## $p < 0,01$ em comparação ao grupo controle. ANOVA de uma via Tukey.

Em relação à atividade *scavenger* do radical DPPH, é possível observar na figura 3, que os compostos foram capazes de capturar radicais DPPH. Os compostos 3A e 3B obtiveram efeitos com a concentração de 10 μ M (Figura 3A e B, respectivamente), enquanto o composto C obteve efeito já com a concentração de 5 μ M (Figura 3C). Ademais, como esperado, o AA também teve um efeito de eliminação significativo.

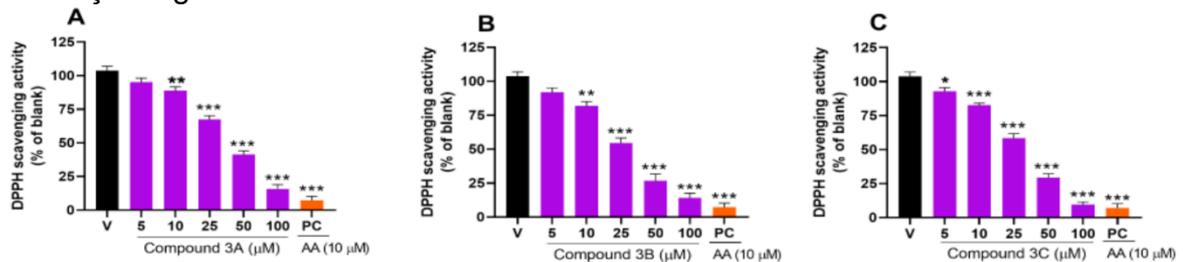


Figura 3- 3A, 3B e 3C respectivamente. Os valores estão expressos como média \pm E.P.M. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ em comparação ao grupo veículo. ANOVA de uma via *Dunnet*.

Sobre a atividade mimética da glutatona S-transferase (GST), observa-se que os 3 compostos apresentaram bons resultados, pois foram capazes de agir mimeticamente à GST nas concentrações de 25, 50 e 100 μ M quando comparados com o branco (B). Como esperado, o controle positivo (PhSe)₂ validou o experimento, pois demonstrou ação semelhante à GST, conforme pode ser visto na Figura 4 abaixo:

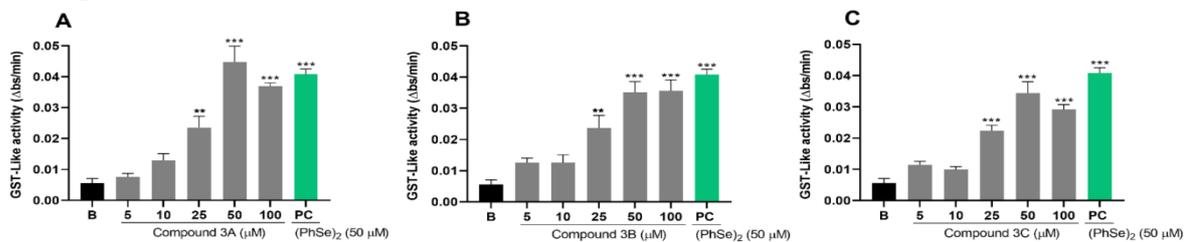


Figura 4- Atividade mimética à GST dos compostos 3A, 3B e 3C. Os valores estão expressos como média \pm E.P.M. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ em comparação ao grupo branco (B). ANOVA de uma via *Tukey*.

Dentre os três compostos testados, o 3C, que é denominado brometo de 1-(2-(4-clorofenil)-2-oxoetil)-2-((fenilselanil)metil)piridin-1-íio, foi o que apresentou os melhores resultados. Desta forma, este composto foi escolhido para realização de

testes *ex vivo* buscando verificar a toxicidade renal e hepática. Não foi observada diferença significativa ao realizar testes nas doses de 50mg/kg e 300 mg/kg nos níveis plasmáticos de uréia, ALT ou AST, o que indica que o composto testado (3C) tem baixo potencial de causar toxicidade oral aguda.

A partir dos resultados acima apresentados, observa-se os efeitos antioxidantes dos três compostos contendo Se, com capacidade redutora de carbonilação de proteínas induzida por NPS, possuindo ações antioxidantes relacionadas a atividades miméticas a enzima GST. Além disso, os compostos, em baixas concentrações, exerceram bons efeitos no teste do radical DPPH, no qual apresentaram boa atividade sequestrante. Ademais, o composto 3C, no teste *ex vivo*, demonstrou que possui baixa possibilidade de causar toxicidade oral.

4. CONCLUSÕES

Após a análise dos resultados, observou-se que todos os sais possuem potencial para proteger contra danos oxidativos em tecido hepático e que sua ação antioxidante pode ser mediada por diferentes mecanismos. Além disso, sugere-se um baixo potencial do composto C (selecionado) em causar toxicidade oral aguda uma vez que os animais expostos a tratamentos com o composto 3C não apresentaram alterações nos marcadores de função hepática e renal. Portanto, conclui-se que o composto em questão é um bom candidato para a continuação de estudos futuros.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- FORMAN, H.J., ZHANG H. Targeting oxidative stress in disease: promise and limitations of antioxidant therapy. **Nat Rev Drug Discov.** V. 20, n. 9, p. 689-709, 2021.
- HABIG, W.H., PABST, M.J., JAKOBY, W.B. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. **J Biol Chem.** 249, 7130-9, 1974.
- He, F. S., Ye, S., Wu, J. Recent Advances in Pyridinium Salts as Radical Reservoirs in Organic Synthesis. **ACS Catalysis.** American Chemical Society. V. 9, n.10, p 8943–8960, 2019.
- LEVINE, R.L., GARLAND, D., OLIVER, C.N., AMICI, A., CLIMENT, I., LENZ, A.G., AHN, B.W., SHALTIEL, S., STADTMAN, E.R., 1990. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. **Methods Enzymol.** 186, 464-78.
- NWACHUKWU, I. D., SARTESHNIZI, R. A., UDENIGWE, C. C., & ALUKO, R. E. (2021). A Concise Review of Current In Vitro Chemical and Cell-Based Antioxidant Assay Methods. **Molecules**, v. 26, n. 16, 4865, 2021.
- PHANIENDRA, A., JESTADI, D. B., PERIYASAMY, L. Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. **Indian J Clin Biochem.** v. 30, n. 1, p. 11-26, 2015.
- TORRES, D.J., ALFULAIJ, N., BERRY, M.J. Stress and the Brain: An Emerging Role for Selenium. **Front Neurosci.** n. 666601, v. 15, p 1-8, 2021.
- SHARMA, O.P., BHAT, T.K.J.F.c. DPPH antioxidant assay revisited. **Food Chem.** 113, 1202-1205, 2009.
- VALKO, M, et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Int. J. Biochem**, v.39, n.1, p.44-84, 2007.