

## ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO* DO COMPOSTO (*E*)-1,2-bis(fenilselenoestireno)-1*H*-pirazol

VANESSA KOCH<sup>1</sup>, INGRID RODRIGUES<sup>1</sup>, LOREN GONÇALVES<sup>2</sup>, EDER JOÃO LENARDÃO<sup>2</sup>, FRANCINE NOVACK VICTORIA<sup>3</sup>, LUCIELLI SAVEGNAGO<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Pelotas – Grupo de Pesquisa em Neurobiotecnologia –GPN – vanessaajsk33@gmail.com

<sup>2</sup> Universidade Federal de Pelotas – Laboratório de síntese em orgânica limpa - LASOL

<sup>3</sup> Universidade Federal de Pelotas – CCQFA - Grupo de Pesquisa em Neurobiotecnologia –GPN francinevictoria@yahoo.com.br

<sup>4</sup> Universidade Federal de Pelotas – CDTec- Unidade Biotecnologia- Grupo de Pesquisa em Neurobiotecnologia –GPN lucielisavegnago@yahoo.com.br

### 1. INTRODUÇÃO

As espécies reativas de oxigênio (EROs) são continuamente formadas durante o metabolismo do oxigênio (WEISSMAN et al., 2007). Cerca de 1-5 % do total de oxigênio consumido pela mitocôndria é convertido em ERO, através da redução parcial de oxigênio para o radical ânion superóxido (LEE et al., 2012). Em concentrações mais baixas, as EROs desempenham papéis importantes na transdução de sinal, plasticidade sináptica e a formação da memória (KISHIDA e KLANN, 2007). Entretanto, em níveis mais elevados, as EROs podem danificar macromoléculas celulares incluindo lipídeos, proteínas e DNA, o que pode conduzir à morte celular (BRAWEK et al., 2010; VALKO et al., 2006). Nesse sentido, a procura por novos compostos com potencial antioxidante é de grande relevância, como um meio para minimizar os danos causados pelas EROs no organismo, como por exemplo, os compostos orgânicos de selênio.

O selênio é um elemento necessário para a expressão de cerca de 25 enzimas, dentre estas a glutatona peroxidase, (FLOHE, 1973), a tioredoxina redutase (HOLMGREN, 1989), entre outras selenoproteínas que têm como papel principal modular o status antioxidante e redox da célula (URSINI et al., 1990). Além disso, os compostos orgânicos de selênio possuem atividades biológicas já descritas na literatura, como propriedades neuroprotetoras antidepressivas e antioxidantes (VICTORIA et al., 2013, NOGUEIRA et al., 2010, GERSZON et al., 2012).

Portanto, o objetivo desse trabalho foi de reportar pela primeira vez na literatura a atividade antioxidante *in vitro* do (*E*)-1,2-bis(fenilselenoestireno)-1*H*-pirazol.

### 2. METODOLOGIA

#### 2.1 Composto

O (*E*)-1,2-bis(fenilselenoestireno)-1*H*-pirazol foi sintetizado no laboratório de síntese orgânica limpa (LASOL), localizado na UFPEL. Para a realização dos ensaios *in vitro*, o composto foi diluído em dimetilsulfóxido (DMSO) em diferentes concentrações (10 - 500 µM).

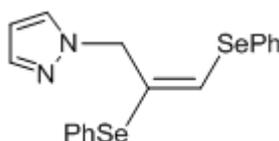


Figura 1: Estrutura química do composto (*E*)-1,2-bis(fenilselenoestireno)-1*H*-pirazol

## 2.2 Determinação da atividade antioxidante *in vitro* do (*E*)-1,2-bis(fenilselenoestireno)-1*H*-pirazol frente a radicais livres sintéticos

A atividade sequestrante de radicais livres sintéticos foi avaliada através dos ensaios DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) e ABTS (2,2-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico).

A atividade sequestrante de radicais DPPH foi determinada de acordo com método proposto por Choi et al (2002). O método DPPH é um método colorimétrico, baseado na neutralização do radical DPPH por ação de um antioxidante. O mecanismo envolve a transferência de elétrons e/ou prótons e a neutralização do radical DPPH produz um decréscimo na absorbância a 517 nm.

A atividade sequestrante do radical ABTS foi determinada de acordo com Re et al. (1999). O método envolve a descoloração da solução contendo o antioxidante e o radical, a qual ocorre pela redução do radical livre através da doação de elétrons e pode ser determinada espectrofotometricamente pelo decréscimo da absorbância da solução a 734 nm.

## 2.3 Efeito do (*E*)-1,2-bis(fenilselenoestireno)-1*H*-pirazol no potencial redutor do íon férrico (FRAP)

A capacidade redutora do (*E*)-1,2-bis(fenilselenoestireno)-1*H*-pirazol foi medida através do método descrito por Stratil (2006). Diferentes concentrações do composto (10–500  $\mu\text{M}$ ) e o reagente FRAP foram misturadas e incubadas a 37 °C por 40 minutos, na ausência de luz. O potencial redutor do composto foi determinado espectrofotometricamente no comprimento de onda 593 nm e o aumento da absorbância, comparado ao aumento ao controle, é diretamente proporcional ao potencial redutor do composto testado.

## 2.4 Efeito do (*E*)-1,2-bis(fenilselenoestireno)-1*H*-pirazol na inibição da oxidação do ácido linoleico induzida por nitroprussiato de sódio (NPS)

A capacidade do (*E*)-1,2-bis(fenilselenoestireno)-1*H*-pirazol inibir a oxidação do ácido linoleico foi determinada através do método descrito por Choi et al (2002). Neste ensaio o ácido linoleico foi utilizado como uma matriz lipídica e a oxidação foi quantificada através da determinação dos níveis de malondialdeído (MDA) formado. O MDA é utilizado como um biomarcador da oxidação de lipídeos por ser um dos produtos finais da peroxidação lipídica.

A oxidação do ácido linoleico foi induzida por NPS (100  $\mu\text{M}$ ), onde o NPS na presença de luz, produz o radical óxido nítrico (NO). A reação ocorre em meio ácido e temperaturas elevadas (95 °C). Após o período de incubação, os níveis de MDA foram determinados espectrofotometricamente (532 nm).

### 2.3. Análise estatística

Os resultados estão apresentados como médias  $\pm$  erro padrão da média. As análises estatísticas foram feitas por meio de análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo teste de comparação múltipla de Tukey, quando necessário. Os ensaios foram feitos em duplicatas e repetidos pelo menos três vezes. A concentração que inibe 50% dos radicais ( $\text{IC}_{50}$ ) foi calculada a partir do gráfico de concentração *versus* % inibição, e o valor de inibição máxima ( $I_{\text{máx}}$ ) foi obtido a partir do maior valor de % inibição observado no ensaio.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1. Efeito do (*E*)-1,2-bis(fenilselenoestireno)-1*H*-pirazol nos ensaios DPPH e ABTS

O (*E*)-1,2-bis(fenilselenoestireno)-1*H*-pirazol apresentou resultado significativo na maior concentração testada (500  $\mu$ M) no ensaio DPPH, como pode ser observado na Figura 2A. No ensaio ABTS o composto não apresentou resultado significativo (dados não demonstrados).

O mecanismo de neutralização do radical DPPH envolve a transferência de prótons e/ou elétrons, enquanto a capacidade sequestrante de radicais ABTS, envolve a transferência de elétrons. Para aprofundar os estudos sobre a capacidade antioxidante e o mecanismo de ação do composto, o efeito deste composto no ensaio FRAP (envolve a transferência de elétrons) foi avaliado.

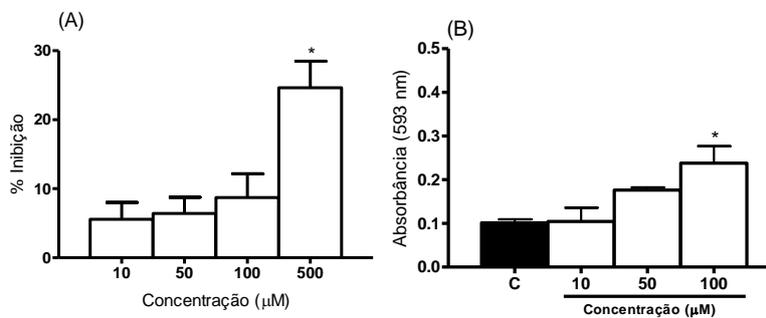


Figura 2: Avaliação da atividade antioxidante do composto (*E*)-1,2-bis(fenilselenoestireno)-1*H*-pirazol, (A) no ensaio DPPH e (B) no ensaio FRAP. Os dados foram apresentados com média  $\pm$  E.P.M das absorbâncias nos valores à 517 nm ( $n = 3$ ). Os dados foram analisados através do teste de uma via ANOVA, seguido pelo teste de comparação múltipla Tukey. \* representa  $p < 0.05$ , comparado com o controle.

### 3.2. Efeito do (*E*)-1,2-bis(fenilselenoestireno)-1*H*-pirazol no ensaio FRAP

O (*E*)-1,2-bis(fenilselenoestireno)-1*H*-pirazol apresentou resultado significativo na maior concentração testada (100  $\mu$ M) (Figura 2B). O poder redutor do íon férrico (FRAP) está relacionado com a capacidade de um composto doar elétrons, portanto a partir destes ensaios é possível inferir que o mecanismo de ação antioxidante do composto pode envolver tanto a transferência de elétrons, como a transferência de prótons, tendo em vista que o composto apresentou efeito nos ensaios DPPH e FRAP.

### 3.3. Efeito do (*E*)-1,2-bis(fenilselenoestireno)-1*H*-pirazol na oxidação do ácido linoleico induzida por NPS

O (*E*)-1,2-bis(fenilselenoestireno)-1*H*-pirazol apresentou resultado significativo em concentrações igual ou maiores do que 50  $\mu$ M, como pode ser visto na Figura 3, quando comparado ao grupo induzido. O composto apresentou uma inibição máxima da oxidação do ácido linoleico ( $I_{max}$ ) de  $84,90 \pm 6,32\%$  e um valor de  $IC_{50}$  (concentração que inibe 50% da oxidação) de  $107,50 \pm 45,70 \mu$ M.

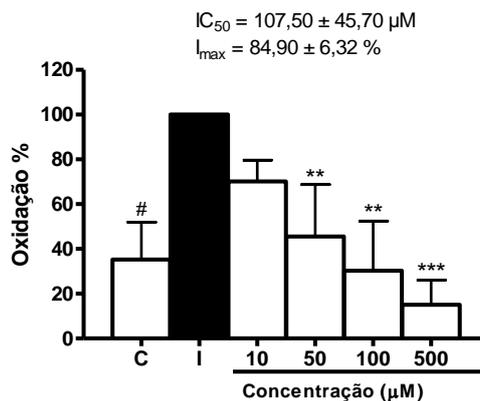


Figura 3: Avaliação da atividade antioxidante do composto (*E*)-1,2-bis(fenilselenoestireno)-1*H*-pirazol no ensaio da oxidação do ácido linoléico. Os dados foram apresentados com média  $\pm$  E.M. das absorvâncias nos valores à 532 nm ( $n = 3$ ). Os dados foram analisados através do teste de uma via ANOVA, seguido pelo teste de comparação múltipla Tukey. \*\* e \*\*\* representam  $p < 0.01$   $p < 0.001$ , comparado com o induzido, e # diferença do controle.

#### 4. CONCLUSÕES

Os resultados da atividade antioxidante do (*E*)-1,2-bis(fenilselenoestireno)-1*H*-pirazol demonstram o potencial deste como um possível agente antioxidante. Mais estudos serão realizados, com o objetivo de explorar o potencial biológico do composto.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. WEISSMAN, I.; SOUZA-PINTO, N.C.; STEVNSNER, T.; BOHR, V.A. DNA repair, mitochondria, and neurodegeneration, **Neuroscience**, v.145, p.1318-1329, 2007.
2. LEE, S.K.; ARUNKUMAR, S.; SIRAJUDEEN, K.N.; SINGH, H.J. Glutathione system in young spontaneously hypertensive rats, **J. Physiol. Biochem**, v.66, p. 321-327.2012.
3. KISHIDA, K.T.; KLANN, E. Sources and targets of reactive oxygen species insynaptic and memory, **Antioxid. Redox. Signal.** v.2, p.233–244, 2007.
4. BRAWEK, B.; LOFFER, M.; WAGNER, K.; WUPPERTZ, H.J.; WENDLING, A.S.; WEYEBROCK, A.; JACKISH, R.; FEUERSTEIN, T.J. Reactive oxygen species (ROS) in the human neocortex:role of aging and cognition, **Brain Res. Bull.** v.81, p. 484–490, 2010.
5. VALKO, M.; RHODES, C.J.; MONCOL, J.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer, **Chem. Biol. Inter.** v.160, p.1-40, 2006.
6. PRIGOL, M; NOGUEIRA, W C.; ZENI, G; BRONZE, M ; CONSTANTINO, L . Physicochemical and Biochemical Profiling of Diphenyl Diselenide. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 169, p. 185-193, 2013.
7. VICTORIA, F. N.; MARTINEZ, D. M.; CASTRO, M.; CASARIL, A. M.; ALVES, D.; LENARDÃO, E. J. ; SALLES, H. D.; SCHNEIDER, P. H.; SAVEGNAGO, L. . Antioxidant properties of (R)-Se-aryl thiazolidine-4-carboselenoate. **Chemico-Biological Interactions**, v. 205, p. 100-107, 2013.
8. GERZSON, M. F. B.; VICTORIA, F. N.; RADATZ, C. S.; GOMES, M. G.; BOEIRA, S. P.; JACOB, R. G.; ALVES, D.; JESSE C. R.; SAVEGNAGO, L. In vitro antioxidant activity and in vivo antidepressant-like effect of  $\alpha$ -(phenylselenanyl) acetophenone in mice. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior** v.102, p.21-29, 2012