

## ESTUDO DA ATIVIDADE MIMÉTICA DA ENZIMA DEHIDROASCORBATO REDUTASE DE SULFETOS VINÍLICOS

ALINE LIMA<sup>1</sup>; MIKAELA PINZ<sup>2</sup>; PAMELA MACHADO<sup>3</sup>; ETHEL A. WILHELM<sup>4</sup>;  
MARIANA M. BASSACÓ<sup>5</sup>; CLÁUDIO C. SILVEIRA<sup>6</sup>; CRISTIANE LUCHESE<sup>7</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas

*aline\_cresh@hotmail.com*

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – CCQFA- Grupo de Pesquisa em Neurobiotecnologia-

*ethelwilhelm@yahoo.com.br*

<sup>3,4</sup> Universidade Federal de Santa Maria – Departamento de Química

<sup>5</sup>Universidade Federal de Pelotas – CCQFA – Grupo de Pesquisa em Neurobiotecnologia-

*cristiane\_luchese@yahoo.com.br*

### 1. INTRODUÇÃO

O metabolismo celular produz continuamente espécies reativas (ERs) através da respiração e outras atividades metabólicas (HALLIWELL E GUTTERIDGE, 2007). Essas espécies reativas podem ser neutralizadas por defesas antioxidantes enzimáticas e não-enzimáticas (SANTAMARÍA et al., 2003). Entretanto, o desequilíbrio entre os sistemas de defesa antioxidante e uma elevada produção de ERs resulta no estresse oxidativo. Portanto, o estresse oxidativo é caracterizado por um significativo aumento das espécies oxidantes intracelulares, tais como as ERs, o qual é acompanhado por uma diminuição simultânea das defesas antioxidantes (ARTEEL E SIES, 2001). Além disso, muitas doenças e processos degenerativos podem estar associados com a superprodução das ERs, incluindo o envelhecimento, a inflamação, a isquemia cerebral, a arterioesclerose, a mutagênese, o diabetes, o câncer e a demência (ALEXI et al., 2000; JOHNSON, 2004).

Assim, para combater mais eficazmente as ERs, numerosos compostos estão sendo sintetizados com objetivos bem definidos: selecionar substâncias portadoras de ações específicas, de síntese simples, orientadas para o uso em testes biológicos e que associem uma alta eficácia e baixos efeitos colaterais. Neste contexto, tem se intensificado o interesse em sintetizar moléculas orgânicas que contenham átomos de calcogênio (ZENI et al. 2006). De fato, a síntese de organocalcogênios tem revelado moléculas orgânicas com um grande potencial farmacológico, principalmente antioxidante (LUCHESE et al., 2007, 2009, 2010). Por isso, o estudo de compostos orgânicos de enxofre pode ser uma alternativa na busca de novos compostos organocalcogênios com efeito antioxidante para o tratamento de diferentes doenças relacionadas com o estresse oxidativo, já que esse calcogênio é um constituinte essencial de certas proteínas, estando presente nos aminoácidos de cistina, cisteína e metionina. Os compostos orgânicos de enxofre apresentam diversas propriedades farmacológicas descritas na literatura. Dentre elas destaca-se o efeito antioxidante (CHOI, et al., 2008; WANG et al. 2010).

Previamente foi determinado que os sulfetos vinílicos (A-D) apresentaram efeito antioxidante na peroxidação lipídica e na carbonilação de proteínas em cérebros de ratos *in vitro*. Porém o mecanismo pelo qual esses compostos apresentam efeito antioxidante ainda não foi elucidado. Na tentativa de buscar o mecanismo antioxidante dos sulfetos vinílicos, este estudo foi designado para investigar o efeito mimético dos compostos na atividade mimética da enzima dehidroascorbato (DHA)-redutase.

## 2. METODOLOGIA

### 2.1. Compostos orgânicos de enxofre:

Os sulfetos bis vinílicos foram sintetizados no laboratório de química da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) de acordo com metodologia descrita por Silveira et al. (2011).

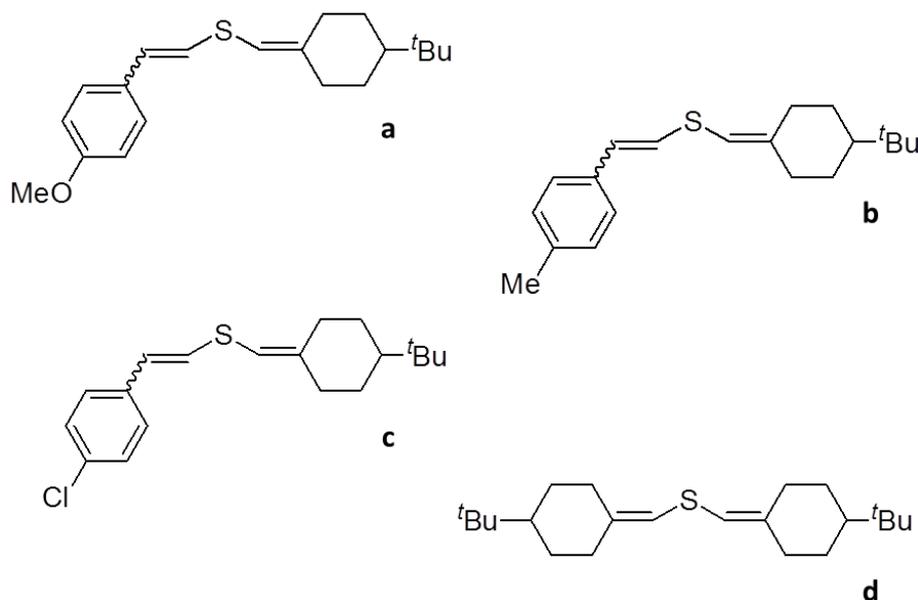


Figura 1 – Estrutura química dos sulfetos vinílicos (a-d)

### 2.2. Atividade Mimética de Enzima DHA-Redutase

A atividade mimética da DHA redutase dos compostos foi realizada conforme descrito previamente por Wells et al. (1995) com algumas modificações. Os compostos (1 $\mu$ M, 10 $\mu$ M, 5 $\mu$ M e 100 $\mu$ M) foram incubados (1-2min) com 100 mM de tampão fosfato de sódio, pH 6.9 a 25 °C na presença de glutathiona reduzida (GSH) (1-4 mM). A atividade da DHA redutase foi iniciada pela adição do DHA (0.5 mM) a um volume final de 1 mL. A regeneração do ácido ascórbico foi determinada espectrofotometricamente a 265 nm. Os resultados foram expressos em nmol/min usando o coeficiente de extinção do ácido ascórbico de 14700/cm/m.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O ácido ascórbico é uma vitamina hidrossolúvel que tem a capacidade de proteção contra a oxidação, devido ao seu alto poder redutor. Quando ingerido, ele é oxidado formando o ácido dehidroascórbico. Participando do sistema de defesa antioxidante, existe a enzima chamada dehidroascorbato redutase, que faz a redução do ácido dehidroascórbico a ácido ascórbico, deixando então, essa vitamina ativa para o seu papel antioxidante (modificado de INZÉ E VAN MONTAGU, 1995).

Por isso, o estudo do efeito mimético da atividade da DHA redutase por compostos, tais como os sulfetos vinílicos do presente estudo, é uma alternativa para buscar o mecanismo pelo qual esses compostos apresentam efeito antioxidante.

Neste sentido, verificou-se que os compostos **b**, **c** e **d** não apresentaram efeito mimético da enzima DHA redutase (dados não mostrados). Entretanto, composto **a** apresentou efeito mimético da enzima DHA redutase na concentração de 100  $\mu\text{M}$  com a concentração de 3 mM de GSH. Com o aumento na concentração de GSH para 4 mM, a atividade mimética do composto inicia na concentração de 1 mM (Tabela 1).

Tabela 1 – Resultados da DHA redutase do composto A.

	GSH 1mM	GSH 2mM	GSH 3mM	GSH 4mM
1 $\mu\text{M}$	1,23 $\pm$ 0,16	7,64 $\pm$ 0,27	8,31 $\pm$ 1,17	13,10 $\pm$ 2,07**
10 $\mu\text{M}$	1,62 $\pm$ 0,62	6,45 $\pm$ 1,6	7,97 $\pm$ 1,05	15,53 $\pm$ 1,31***
50 $\mu\text{M}$	1,77 $\pm$ 0,35	5,22 $\pm$ 0,87	7,22 $\pm$ 0,69	19,93 $\pm$ 5,95***
100 $\mu\text{M}$	1,31 $\pm$ 0,38	6,20 $\pm$ 1,34	9,95 $\pm$ 1,84*	15,25 $\pm$ 3,06***

\*  $P < 0,05$  quando comparado com o branco (zero de atividade); \*\*  $P < 0,01$  quando comparado com o branco (zero de atividade). \*\*\*  $P < 0,001$  quando comparado com o branco (zero de atividade).

Neste estudo, demonstrou-se que o composto A em baixas concentrações (a partir de 1  $\mu\text{M}$ ) teve atividade mimética da enzima DHA-redutase. Dessa forma, este seria um mecanismo pelo qual o composto apresenta efeito antioxidante. Entretanto, outros mecanismos devem ser estudados para elucidar outros mecanismos antioxidantes.

#### 4. CONCLUSÕES

O presente estudo demonstrou que o composto A apresentou efeito mimético da enzima DHA redutase, indicando este como o possível mecanismo do efeito antioxidante do composto.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

MEWIS, I.; ULRICH, C.H. Action of amorphous diatomaceous earth against different stages of the stored product pests *Tribolium confusum* (Coleoptera: Tenebrionidae), *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae), *Sitophilus granarius* (Coleoptera: Curculionidae) and *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Stored Product Research**, Amsterdam, v.37, n.1, p.153-164, 2001.

ALEXI, T.; BORLONGAN, C.; FAULL, C.; WILLIAMS, C.; CLARK, R.; GLUCKMAN, P.; HUGHES, P. Neuroprotective strategies for basal ganglia degeneration: parkinson's and huntington's diseases. **Prog. Neurobiol.** v.60, p.409-470, 2000.

ARTEEL, G.E.; SIES, H. The biochemistry of selenium and the glutathione system. **Environ. Toxicol. Pharmacol.** v.10, p.153–158, 2001.

CHOI, S.I.; HONG, E.Y.; LEE, J.H.; LEE, Y.S.; KIM, G.H. Antioxidant and antimicrobial activities of the ethanol extract of *Allium victorialis* L. var. *platyphyllum*. **Food Sci. Biotechnol.** v.17, p.313-318, 2008.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Free radicals in Biology and medicine, fourth ed. Clarendon Press, **Oxford Science Publications**, Oxford/UK, 2007.

INZÉ, D; Van MONTAGU, M. Oxidative stress in plants. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 6, p. 153-158, 1995.

JOHNSON, I.T. New approaches to the role of diet in the prevention of cancers of the alimentary tract. **Mutat. Res.** v.551, p.9-28, 2004.

LUCHESE, C.; STANGHERLIN, E.C.; ARDAIS, A.P.; NOGUEIRA, C.W.; SANTOS, F.W. Diphenyl diselenide prevents oxidative damage induced by cigarette smoke exposure in lung of rat pups. **Toxicology** v.230, p.189–196, 2007.

LUCHESE, C.; STANGHERLIN, E.C.; GAY, B.M.; NOGUEIRA, C.W. Antioxidant effect of diphenyl diselenide on oxidative damage induced by smoke in rats: Involvement of glutathione. **Ecotox. Environ. Safe.** v.72, p. 248-254, 2009

LUCHESE, C.; NOGUEIRA, C. W. Diphenyl diselenide in its selenol form has dehydroascorbate reductase and glutathione S-transferase-like activity dependent on the glutathione content. **J. Pharm. Pharmacol.** v.62, p.1146 - 1151, 2010.

SANTAMARÍA, A.; SALVATIERRA-SANCHEZ, R.; VAZQUEZ-ROMAN, B.; SANTIAGO-LOPEZ, D.; VILLEDA-HERNANDEZ, J.; GALVAN-ARZATES, S.; JIMENEZ-CAPDEVILLE, M.E.; ALI, S.F. Protective effects of the antioxidant selenium on quinolinic acid-induced neurotoxicity in rats: in vitro and in vivo studies. **J. Neurochem.** v. 86, p. 479-488, 2003.

SILVEIRA, C.C.; RINALDI, F.; BASSACO, M.M.; GUADAGNIN, R.C.; KAUFMAN, T.S. Synthesis of diphenylphosphinoyl methyl vinyl sulfides, symmetric and unsymmetric divinyl sulfides employing bis(diphenylphosphinoyl) methyl sulphide. **Synthesis** v.8, p.1233–1242, 2011.

WELLS, W.W.; XU, D.P.; WASHBURN, M.P. Glutathione – dehydroascorbate oxidoreductases. **Methods Enzymol.** v. 252, p. 30 – 38, 1995.

ZENI, G., LUDTKE, D., PANATIERI, R.B., BRAGA, A.L. Vinylic tellurides: from preparation to their applicability in organic synthesis. *Chem. Rev.* 106, 1032-1076, 2006.