

AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO* DE (3,5-DIMETIL-1H-PIRAZOL-1-IL)(3-METÓXIFENIL)METANONA E SEU DERIVADO CONTENDO SELÊNIO

LIVIA CONCEIÇÃO LIMA VALENTE¹; JENIFER FETTER²; HECTOR CEZAR RIBEIRO³; LUCIELLI SAVEGNAGO⁴; RAQUEL GUIMARÃES JACOB⁵; DANIELA HARTWIG DE OLIVEIRA⁶;

¹Universidade Federal de Pelotas (UFPEL) – valente.livia@ufpel.edu.br

²Universidade Federal de Pelotas (UFPEL) – jenifer.fetter@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas (UFPEL) – hector.ribeiro@ufpel.edu.br

⁴Universidade Federal de Pelotas (UFPEL) - lucielisavegnago@yahoo.com.br

⁵Universidade Federal de Pelotas (UFPEL) – raquelgjacob@yahoo.com.br

⁶Universidade Federal de Pelotas (UFPEL) – daniela.hartwig@ufpel.edu.br

1. DESCRIÇÃO DA INOVAÇÃO

Os compostos heterocíclicos apresentam grande notoriedade em razão de suas possíveis aplicações, sejam elas na área de farmacologia, agroquímica e de tecnologias, por exemplo. De acordo com a literatura, observa-se que grande parte dos fármacos mundialmente comercializados atualmente contém heterocíclicos nitrogenados em sua composição. Nesse contexto, dentre os compostos heterocíclicos nitrogenados destaca-se a relevância dos pirazóis, os quais apresentam uma ampla variedade de propriedades farmacológicas, tais como atividade antineoplásica, anti-inflamatória, analgésica, anticoagulante, antiobesidade, antibacteriana, dentre outras (BARREIRO, 2001; HAIDER, 2017).

Ainda, dentro deste contexto, os compostos organocalcogênicos são outra classe de compostos orgânicos que apresentam em sua estrutura pelo menos um átomo de calcogênio associado, tais como Oxigênio (O), Enxofre(S), Selênio (Se) e Telúrio (Te). Estas moléculas, conforme a literatura, principalmente os organocalcogênicos contendo selênio, são caracterizadas por apresentar ação antioxidante devido a mimetização da atividade enzimática da glutatona peroxidase (GPx) presente na enzima selenocisteína, que auxilia na proteção da célula contra danos oxidativos (DE SOUZA, 2015; BANDEIRA, 2019).

Pesquisas recentes relatam que os danos às biomoléculas causados pelo estresse oxidativo estão relacionados com os processos de envelhecimento, bem como o desenvolvimento de doenças. O estresse oxidativo caracteriza-se pela presença de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio produzidas em excesso nos diferentes organismos, causando um desequilíbrio homeostático. Estas espécies, podem causar danos às biomoléculas e constituintes das porções celulares, promovendo o surgimento de mutações e o desenvolvimento de patologias. Nesse sentido, a descoberta de novos compostos que apresentam ação antioxidante, ou seja, que possuem a capacidade de neutralizar espécies reativas, é de grande interesse científico (CAVALCANTE, 2022).

2. ANÁLISE DE MERCADO

Em decorrência da criação da lei de medicamentos genéricos no país (Lei nº 9.787/1999) houve um aumento nos investimentos na área de pesquisa e desenvolvimento de produtos farmacêuticos, acarretando o fortalecimento das indústrias nacionais. No entanto, as propriedades intelectuais industriais não fornecem todos os documentos necessários ao desenvolvimento dos produtos, gerando obstáculos na pesquisa e no desenvolvimento de novos produtos relacionados. Nesse sentido, a carência de produção nacional ocasiona na

importação de fármacos, gerando um déficit na balança comercial de bilhões de dólares e o encarecimento dos medicamentos para a população (PONTES, 2017).

Aliado a isso, tem-se a necessidade do desenvolvimento de novos produtos com eficácia farmacêutica que ocasione menos efeitos adversos e respostas mais significativas no tratamento para diferentes doenças (GAD, 2019).

Nesse contexto, considerando as propriedades biológicas reportadas na literatura por diferentes heterocíclicos nitrogenados, principalmente aqueles pertencentes a classe dos pirazóis, além da constante busca por novos compostos que apresentem ação antioxidante, o presente trabalho visa avaliar a capacidade antioxidante dos compostos (3,5-dimetil-1*H*-pirazol-1-il)(3-metóxifenil)metanona e (3,5-dimetil-4-(fenilselanil)-1*H*-pirazol-1-il)(3-metóxifenil) metanona através de técnicas *in vitro*. Dentro deste contexto, é importante destacar que compostos com ação antioxidante apresentam possibilidade de se tornarem um produto terapêutico, beneficiando a indústria farmacêutica nacional.

3. ESTRATÉGIA DE DESENVOLVIMENTO E IMPLEMENTAÇÃO

Considerando os Níveis de Maturidade Tecnológica (Technology Readiness Levels - TRL), o estudo aqui descrito se enquadra no estágio 4, englobando testes a nível laboratorial, fornecendo evidências e resultados precisos, gerando validação no estudo. Entretanto, com base nos resultados obtidos até o presente momento podemos afirmar que o projeto ainda está incipiente para solicitação de propriedade intelectual registrada, sendo necessário novos estudos complementares para avaliar o potencial antioxidante dos compostos testados e seus mecanismos de ação.

Dentre os estágios de desenvolvimento da inovação destacam-se a síntese das moléculas testadas em nosso laboratório de pesquisa (LASOL) e a avaliação da atividade biológica *in vitro* dos compostos (3,5-dimetil-1*H*-pirazol-1-il)(3-metóxifenil)metanona e de (3,5-dimetil-4-(fenilselanil)1*H*-pirazol-1-il)(3-metóxifenil) metanona. Estes compostos foram avaliados frente a sua possível ação antioxidante nos mecanismos de captura dos radicais sintéticos ABTS e DPPH, além de seu potencial em reduzir o íon férrico a íon ferroso.

A fim de avaliar a capacidade antioxidante frente a captura dos radicais ABTS utilizou-se o método descrito por Re et al. (1999) com algumas adaptações. Inicialmente, os compostos sintéticos foram diluídos em dimetilsulfóxido em diferentes concentrações (50 - 500 μ M). Na sequência, foram incubados em duplicata e com a solução ABTS previamente diluída em solução tampão de fosfato de potássio, por um período de 30 minutos, à temperatura ambiente e no escuro. Por fim, a análise foi realizada em um espectrofotômetro medindo-se a absorbância a um comprimento de onda de 734 nm.

Com o intuito de avaliar a atividade sequestrante frente ao radical DPPH, foi utilizado o método adaptado descrito por Sharma et al. (2009). Primeiro, os compostos foram diluídos em dimetilsulfóxido em diferentes concentrações (50 - 500 μ M). Após, foram incubados com a solução DPPH previamente diluída em metanol, em duplicata, por um período de 30 minutos, à uma temperatura de 30 °C e no escuro. Na sequência, a análise é realizada em um espectrofotômetro medindo-se a absorbância a um comprimento de onda de 517 nm.

Com o objetivo de avaliar o potencial de redução do íon férrico, os compostos foram previamente diluídos em dimetilsulfóxido em diferentes concentrações (50 - 500 μ M). Posteriormente as amostras foram incubadas juntamente com a solução, anteriormente preparada, contendo um tampão de acetato de sódio, triazina e cloreto de ferro, por um período de 40 minutos, à uma temperatura de 37 °C e no

escuro. A análise é realizada em um espectrofotômetro medindo-se a absorbância a um comprimento de onda de 593 nm.

4. RESULTADOS ESPERADOS E IMPACTO

A neutralização de espécies reativas é um mecanismo de defesa antioxidante bastante importante nos diferentes organismos, o qual pode atuar prevenindo a degradação de diferentes sistemas biológicos e prevenindo o surgimento de doenças. Nesse sentido, realizou-se os ensaios químicos *in vitro* para avaliar se os compostos apresentavam este efeito antioxidante caracterizado por neutralizar espécies radicalares.

Inicialmente, utilizou-se os radicais catiônicos sintéticos de ABTS para avaliar a capacidade antioxidante dos compostos testados frente a transferência de elétrons do substrato antioxidante para o radical catiônico, com o intuito de estabilizá-lo. Na mesma linha, o ensaio de neutralização dos radicais DPPH também foi realizado, o qual decorre da redução dos radicais presente na solução, a partir da captura de um átomo de hidrogênio do composto que apresenta capacidade antioxidante, formando, então, uma espécie não radicalar estável. Conforme os resultados obtidos, apresentados nas **Tabelas 1 e 2**, foi possível verificar que ambos os compostos testados não apresentaram efeito antioxidante significativo frente a neutralização dos radicais sintéticos de ABTS e DPPH nas concentrações testadas.

Tabela 1: Atividade antioxidante apresentada pelo composto (3,5-dimetil-1H-pirazol-1-il)(3-metóxfenil)metanona

Concentração (µM)	ABTS	DPPH	FRAP
Controle	0,690 ± 0,117	0,319 ± 0,075	0,087 ± 0,050
Veículo	0,695 ± 0,090	0,430 ± 0,016	0,055 ± 0,022
10	0,652 ± 0,066	0,393 ± 0,067	0,105 ± 0,095
50	0,654 ± 0,072	0,390 ± 0,047	0,076 ± 0,045
100	0,637 ± 0,056	0,400 ± 0,073	0,068 ± 0,017
500	0,580 ± 0,0378	0,417 ± 0,001	0,081 ± 0,014

Os valores são expressos em média da absorbância ± desvio padrão (n=3). Os resultados foram comparados com o respectivo controle positivo, sem o composto sintético, (one way ANOVA/Newman-keuls).

Tabela 2: Atividade antioxidante apresentada pelo composto (3,5-dimetil-4-(fenilselanil)-1H-pirazol-1-il)(3-metóxfenil)metanona.

Concentração (µM)	ABTS	DPPH	FRAP
Controle	0,690 ± 0,117	0,319 ± 0,075	0,087 ± 0,050
Veículo	0,695 ± 0,090	0,430 ± 0,016	0,055 ± 0,022
10	0,674 ± 0,098	0,467 ± 0,033	0,070 ± 0,026
50	0,677 ± 0,086	0,538 ± 0,090	0,085 ± 0,045
100	0,668 ± 0,101	0,435 ± 0,009	0,098 ± 0,051
500	0,685 ± 0,043	0,424 ± 0,082	-

Os valores são expressos em média da absorbância ± desvio padrão (n=3). Os resultados foram comparados com o respectivo controle positivo, sem o composto sintético, (one way – ANOVA/Newman-keuls).

Diversos estudos demonstram que a capacidade de doar elétrons de um substrato para outro através de reações de oxirredução podem estar relacionados à capacidade antioxidante em organismos vivos. Nesse sentido, avaliou-se o potencial de oxirredução promovido pelos compostos (3,5-dimetil-1*H*-pirazol-1-il)(3-metóxfenil)metanona e (3,5-dimetil-4-(fenilselanil)-1*H*-pirazol-1-il)(3-metóxfenil)metanona na redução do íon férrico (Fe³⁺) a íon ferroso (Fe²⁺). Entretanto, conforme pode-se evidenciar nas **Tabelas 1 e 2**, ambos os compostos testados não apresentaram efeito antioxidante significativo frente ao potencial redutor do íon férrico.

Diante do exposto, podemos evidenciar que ambos os compostos sintéticos não apresentaram efeito antioxidante *in vitro* nos testes realizados. No entanto, com base nesses dados ainda não é possível descartar totalmente o possível efeito antioxidante destes compostos, uma vez que estes podem apresentar efeitos positivos em outros ensaios os quais avaliam diferentes mecanismos de ação, como a peroxidação lipídica, por exemplo. Nesse sentido, é importante destacar a necessidade do desenvolvimento de ensaios complementares para avaliar o possível efeito antioxidante destas moléculas, objetivando resultados promissores no estudo.

5. CONCLUSÕES

Com base nos resultados apresentados, foi possível concluir que os compostos (3,5-dimetil-1*H*-pirazol-1-il)(3-metóxfenil)metanona e (3,5-dimetil-4-(fenilselanil)-1*H*-pirazol-1-il)(3-metóxfenil)metanona não apresentaram efeito antioxidante significativo nos testes de neutralização das espécies reativas de DDPH e ABTS, assim como no potencial redutor do íon férrico a ferroso (FRAP) frente as análises realizadas. Entretanto, ressalta-se que novos experimentos podem ser realizados para avaliar o possível potencial antioxidante destes compostos, visto que cada ensaio *in vitro* apresenta um mecanismo de atuação distinto.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. F. **Química Medicinal: As Bases Moleculares de ação de Fármacos**. Artemed: Porto Alegre, 2001. 7.
- HAIDER, S. Heterocycles, Back Bone of Drug Design. **Journal Phytochemistry Biochemistry**. v. 1, n. 1, p. e101, 2017.
- DE SOUZA D. et al. New organochalcogen multitarget drug: Synthesis and antioxidant and antitumoral activities of chalcogenozidovudine derivatives. **Journal of Medicinal Chemistry**. v. 58, n.8 p. 3329-3339, 2015.
- BANDEIRA, P. T. et al. Antioxidant Activity and Cytotoxicity of N - Functionalized Organotellurides. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v. 27, n. 2, p. 410-415, 2019.
- CAVALCANTE, K. L.; CALEGARI, G.; ORSATO, A.; PEREZA, C. C. Estresse Oxidativo e Nox: Doenças relacionadas e principais classes de inibidores sintéticos e naturais. **Revista Virtual de Química**. v.15, p. 248-261, 2022.
- Pontes, C. E. C. Pharmaceutical patents and the national pharmaceutical industry: a study of the deposits made in Brazil. **Revista Produção e Desenvolvimento**, v. 3, n. 2, 38-51, 2017.
- GAD, S, C. **Safety Pharmacology in Pharmaceutical Development**. CRC Press, 2019. 2.
- RE, R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**. v. 26, p.1231-1237, 1999. 22.
- SHARMA, O. P.; BHAT T. K. DPPH antioxidant assay revisited. **Food Chemistry**. v. 113, p.1202-1205, 2009.