

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE 6-FENILSELENIL PURINA

ANA TERESINHA FERREIRA¹; ALINE LIMA²; VANESSA D. G. DA SILVA³; LUIS F. B. DUARTE⁴; DIEGO ALVES⁵; ETHEL A. WILHEM⁶; CRISTIANE LUCHESE⁷

¹Universidade Federal de Pelotas – tere.df@gmail.com ²Universidade Federal de Pelotas – aline_cresh@hotmail.com ³Universidade Federal de Pelotas – vanessa_dgs@hotmail.com ⁴Universidade Federal de Pelotas – mano_hank@yahoo.com.br ⁵Universidade Federal de Pelotas – diego.alves@ufpel.edu.br ⁶Universidade Federal de Pelotas – ethelwilhelm@yahoo.com.br (co-orientadora) ⁷Universidade Federal de Pelotas – cristiane_luchese@yahoo.com.br (orientadora)

1. INTRODUÇÃO

As espécies reativas de oxigênio (ERO), assim como de nitrogênio (ERN), são produtos normais do metabolismo celular, e estão envolvidas em funções biológicas importantes. No entanto, a produção excessiva de espécies reativas (ERs) pode gerar o estresse oxidativo, causando danos teciduais. Em condições normais, há um equilíbrio entre os agentes pró-oxidantes e antioxidantes. Entretanto no estresse oxidativo ocorre um desequilíbrio entre esses sistemas, em função do aumento da produção de ERs e/ou uma diminuição das defesas antioxidantes. Além disso, as ERs são causadoras de diversas doenças como cardiovasculares, neurodegenerativas, câncer, aterosclerose, artrite reumatoide, hipertensão, isquemia e diabetes mellitus (VALKO et al., 2007).

Nesse sentido, torna-se importante o uso de moléculas antioxidantes, já que estas podem reduzir o estresse oxidativo, diminuindo a incidência de diversas patologias. Um antioxidante refere-se a qualquer molécula que, quando presente em uma concentração mais baixa, comparada com um substrato oxidável, retarda significativamente ou inibe a oxidação do substrato.

Por isso a busca por novas moléculas com propriedades antioxidantes, com síntese simples e baixa toxicidade, vem crescendo muito nos últimos anos. Os compostos derivados de purinas tem demonstrado importantes ações farmacológicas, incluindo as propriedades antioxidantes (STARHA et al., 2009). Paralelamente aos compostos derivados de purina, destacam-se os compostos orgânicos de selênio, os quais possuem atividades farmacológicas relevantes (NOGUEIRA e ROCHA, 2011).

Assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a atividade antioxidante de um composto inédito derivado de purina contendo selênio em sua estrutura.

2. METODOLOGIA

2.1. Composto A

O composto A (6-fenilselenil purina) foi sintetizado no Laboratório de Síntese Orgânica Limpa da UFPel. Em todos os ensaios o composto foi utilizado nas concentrações de 1, 10, 50 e 100 µM.

2.2. Níveis de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Nesse ensaio foi avaliado o potencial de inibição do composto A, contra a peroxidação lipídica induzida por nitroprussiato de sódio (NPS). Para este ensaio, foram utilizados fígados e cérebros de camundongos machos Swiss. Os tecidos foram homogeneizados em Tris-HCl 50 mM, pH 7,4 e centrifugados por 10 min a 900 xg. O sobrenadante foi utilizado para o ensaio de TBARS. A produção de TBARS foi determinada espectrofotometricamente a 532 nm (OHKAWA et al. 1979). Os resultados foram expressos em porcentagem do induzido.

2.3. Atividade *scavenger* do radical 2,2'-azinobis-(ácido 3-etilbenzotiazolina-6sulfônico) (ABTS) e do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)

O ensaio é realizado para verificar a atividade *scavenger* do composto sobre o radical ABTS (RE et al., 1999) ou DPPH (CHOI et al., 2002). Os resultados obtidos foram expressos em porcentagem do branco (controle). O ácido ascórbico foi utilizado como controle positivo (50 µM). As leituras foram determinadas espectrofotometricamente em 734 nm para o ABTS e 517 nm para o DPPH.

2.4. Atividade mimética das enzimas Tiol Oxidase/Peroxidase

A atividade mimética da enzima tiol oxidase determina a capacidade do composto em oxidar os grupos tiois (-SH). A atividade mimética da enzima tiol peroxidase determina a capacidade do composto em oxidar os grupos -SH, reduzindo H₂O₂ a H₂O. O sistema tiol oxidase/peroxidase determina a redução do ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzóico) (DTNB) a tionitrobenzenato (TNB). A concentração de TNB formado foi determinado espectrofotometricamente a 412 nm (ELLMAN, 1959). Os resultados foram expressos em porcentagem de glutatona reduzida (GSH).

2.5. Atividade mimética da enzima glutatona S-transferase (GST)

A GST pode ser mimetizada por compostos sintéticos através da reação de conjugação de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) com GSH levando a produção de uma coloração amarela, que é determinada em uma absorbância de 340 nm, durante três minutos (HABIG et al. 1974). Os resultados foram expressos em Δ absorbância/min.

2.6. Análise estatística

Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão. Foi utilizada ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Newman-Keuls quando apropriado. Os resultados com p<0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com os resultados demonstrados na figura 2 pode-se observar que o composto A não apresentou efeito em reduzir os níveis de TBARS induzido por NPS no fígado (Figura 2A) e no cérebro (Figura 2B) dos camundongos, em nenhuma das concentrações testadas. Dessa forma, o composto não reduziu a peroxidação lipídica induzida por NPS. Entretanto, outros indutores da peroxidação lipídica, assim como outros testes devem ser utilizados para descartar o efeito antioxidante do composto.

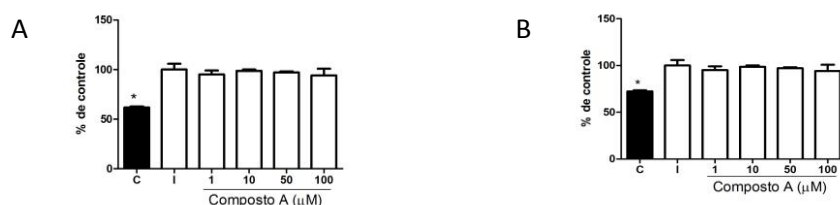


Figura 2: Efeito do composto A na peroxidação lipídica induzida por NPS no fígado (A) e cérebro (B) de camundongos. (*) p< 0,05 quando comparados com o induzido por NPS.

Nas figuras 3A e 3B os resultados demonstraram que o composto A não apresentou atividade *scavenger* dos radicais sintéticos ABTS e DPPH, quando

comparados ao branco. O controle positivo do ensaio, o ácido ascórbico (50 μ M) apresentou efeito *scavenger* tanto de radicais ABTS quanto de radicais DPPH (Figuras 3A e 3B)

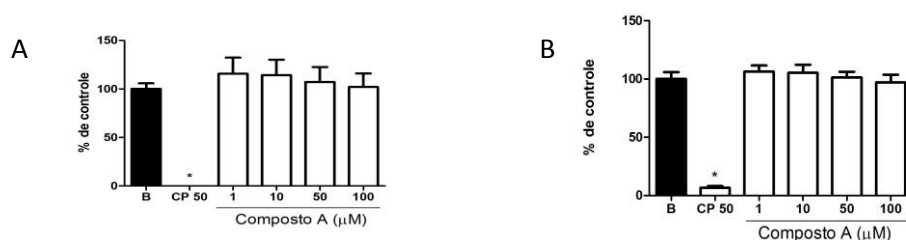


Figura 3: Avaliação da atividade *scavenger* do radical ABTS (A) e DPPH (B) pelo composto A. (*) $p < 0,05$ quando comparado ao branco.

Na figura 4, pode-se verificar que o composto A não apresentou efeito mimético da enzima tiol peroxidase. Baseado nesses resultados do efeito mimético da enzima tiol peroxidase e do efeito *scavenger* de radicais, pode-se descartar que esses mecanismos antioxidantes poderiam estar envolvidos no efeito do composto.

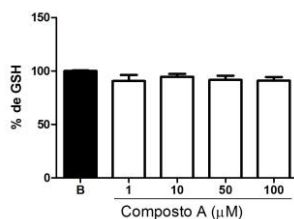


Figura 4: Avaliação da atividade mimética da enzima tiol peroxidase pelo composto A.

Na figura 5 pode-se observar os resultados da atividade mimética da enzima GST pelo composto A. Este estudo demonstrou que o composto A, na concentração de 100 μ M, teve atividade mimética da GST na presença de GSH (Figura 5). A enzima GST, também conhecida como uma enzima de fase II, é amplamente distribuída catalisando e ligando proteínas que promovem a conjugação do GSH com uma variedade de compostos eletrofílicos reativos, resultando na formação de substâncias que são facilmente excretadas pelo corpo (CHASSEAUD, 1979). Além disso, a GST é uma importante defesa antioxidante e serve para proteger os tecidos do estresse oxidativo (FIANDER e SCHNEIDER, 1999). Neste contexto, compostos de baixo peso molecular, operando como mimético de enzimas, tem sido usados como antioxidantes. Portanto, os resultados do presente estudo suportam a ideia que a atividade mimética da GST pelo composto A está envolvida no efeito antioxidante do composto.

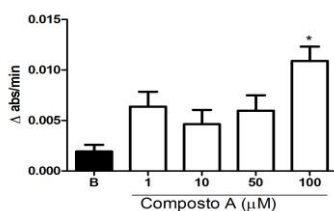


Figura 5: Avaliação da atividade mimética da enzima GST pelo composto A. (*) $p < 0,05$ quando comparado com o branco.

A atividade mimética da enzima tiol oxidase é utilizada para verificar a toxicidade do composto em oxidar grupos -SH. Neste caso, o composto A não apresentou efeito mimético da atividade da enzima tiol oxidase, descartando que a toxicidade do composto envolve a oxidação de grupos -SH (dados não mostrados).

4. CONCLUSÃO

O composto A apresentou atividade antioxidante por mimetizar a enzima GST. Além disso, outros ensaios devem ser realizados objetivando complementar o estudo do efeito antioxidante do composto.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CHASSEAUND, LF. The role of glutathione and glutathione S-transferase in the chemicals carcinogens and other electro-philic agents. **Adv Cancer**, p.175–274, 1979.

CHOI, C. W. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay – guided comparasion. **Plant Science**, Daejeon, p. 1161-1168, 2002.

ELMANN, G. L. Tissue sulfhydryl groups. **Archives of Biochemistry Biofisics**, Seul, v.82, p. 70-77, 1959.

FIANDER H, SCHNEIDER H. Compounds that induce isoforms of glutathione S-transferase with properties of a critical enzyme in defense against oxidative stress. **Biochem Biophys Res Commun**, p. 591–595, 1999.

HABIG, H. PABST, J. JAKOBY, B. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. **Journal of Biological Chemistry**, Rockville, v. 249, p. 7130-7139, 1974.

NOGUEIRA CW, ROCHA JB. Toxicology and pharmacology of selenium: emphasis on synthetic organoselenium compounds. **Arch Toxicol**, 2011.

OHKAWA, H. OHISHI, N. YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, Japão, v.95, n.2, p.351-358, 1979.

RE, R. PELLEGRINI, N. PROTEGGENTE, A. PANNALA, A. YANG, M. RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free radical Biology Medice**, p.1231-1237, 1999.

STARHA P. TRAVNICEK Z. HERCHEL R, POPA I. SUCHY P, VANCO J. Dinuclear copper (II) complexes containing 6-(benzylamino)purines as bridging ligands: Synthesis, characterization, and *in vitro* antioxidant activities. **Jornaul of Inorganic Biochemistry**, p. 434-440, 2009.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M.T.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.39, n.1, p.44-84, 2007.