

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DO COMPOSTO 2-(4-METOXIFENIL)-3-(FENILSELENIL)BENZOFURANO *IN VITRO*

AMÁLIA GONÇALVES ALVES¹; JÉSSICA IARA GALL²; TAÍS DA SILVA TEIXEIRA RECH³; LUIZ ROBERTO CARRARO JUNIOR⁴; CÉSAR AUGUSTO BRUNING⁵; CRISTIANI FOLHARINI BORTOLATTO⁶

^{1,2,3,4,5,6}Universidade Federal de Pelotas – Laboratório de Bioquímica e Neurofarmacologia Molecular (LABIONEM) - amaliaalvs@gmail.com; je.gall@hotmail.com; taisteixeira.r@gmail.com; luizrobertocarraro@hotmail.com; cabrusing@yahoo.com.br; cbortolatto@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Os processos de formação das espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERON), incluindo os radicais livres, estão intimamente relacionados às doenças neurodegenerativas e neuropsiquiátricas, dentre outras disfunções no organismo (PÓRTO, 2001). De acordo com FERREIRA e MATSUBARA (1997), os radicais livres causam diversos danos, acometendo principalmente as membranas celulares em decorrência do processo de lipoperoxidação. Os danos causados nas membranas geram aumento de sua permeabilidade, fazendo com que ocorra o extravasamento do material intracelular, desencadeando diversas situações que podem ser prejudiciais à saúde. O cérebro é particularmente vulnerável à peroxidação lipídica, pois consome uma grande quantidade de oxigênio e é rico em ácidos graxos poli-insaturados altamente peroxidáveis; além disso, sua capacidade antioxidante é limitada (OBOH e HELEN, 1999).

Para a contenção dos radicais livres existem os antioxidantes. Segundo OLIVEIRA (1999), as moléculas antioxidantes são capazes de retardar ou inibir a oxidação, agindo de maneira a bloquear a formação dos radicais livres ou tornando esses radicais inativos. Com base nisto, diversos estudos tem buscado por moléculas capazes de conter o aumento de processos oxidativos associados as mais variadas patologias, contribuindo, desta forma, para a melhora clínica.

A introdução de um átomo de selênio em uma molécula orgânica de benzofurano pode ser algo vantajoso, já que o efeito do selênio tem sido estudado em relação a processos neurodegenerativos. Além disso, de acordo com ALFIERI et al. (1998), o selênio tem a capacidade de proteger contra danos oxidativos. De fato, seu efeito antioxidante parece contribuir em vários de seus efeitos farmacológicos. Somando-se a isso, os benzofuranos têm sido experimentalmente testados como alternativas terapêuticas em modelos de doenças do sistema nervoso central (RIZZO et al. 2008).

Portanto, o objetivo do presente estudo foi testar o potencial antioxidante *in vitro* de uma molécula híbrida com os núcleos benzofurano e organocalcogênio (contendo selênio), para que, futuramente, possa-se aplicar este mesmo na indústria farmacêutica, visando sua ação sobre doenças ou distúrbios do sistema nervoso que envolvam a ação das ERON.

2. METODOLOGIA

O experimento foi conduzido no Laboratório de Bioquímica e Neurofarmacologia Molecular (LABIONEM), localizado na Universidade Federal de Pelotas. O composto 2-(4 metoxifenil)-3-(fenilselenil) benzofurano (BZF5) foi sintetizado pelo Laboratório de Síntese Orgânica Limpa (LASOL) da mesma universidade (Fig. 1). O projeto está cadastrado no COCEPE sob o código 8784 e

aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pelotas (CEEA/UFPel 4897-2017). Todos os experimentos foram realizados em duplicada e cada ensaio contou com um “N” de 3 experimentos independentes.

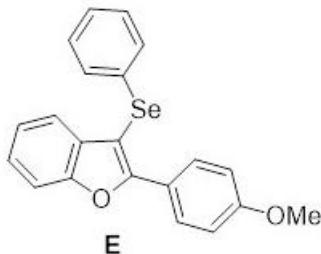


Fig. 1 Estrutura química do composto 2-(4 metoxifenil)-3-(fenilselenil) benzofurano (BZF5).

2.1 Ensaio de peroxidação lipídica induzida por nitroprussiato de sódio (NPS)

O screening da atividade antioxidante *in vitro* do composto BZF5 foi realizado através da dosagem dos níveis de lipoperoxidação induzida por NPS. O ensaio utilizado foi o método espectrofotométrico (532 nm) de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), conforme OHKAWA *et al.* (1978). O homogenato de cérebro de camundongos foi utilizado como fonte de lipídios peroxidáveis. Este tecido foi homogeneizado em tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,4 em uma proporção de 1:10 (peso:volume), submetido à centrifugação e o sobrenadante (S1) foi utilizado para o ensaio. O composto BZF5 foi diluído em dimetilsulfóxido (DMSO) e testado nas concentrações de 1-200 μ M. O grupo veículo recebeu apenas DMSO; o grupo controle, água. NPS foi utilizado como indutor de peroxidação lipídica. Os resultados foram calculados e expressos como nmol TBARS/g de tecido.

2.2 Ensaio de captura do radical ABTS^{•+} e DPPH[•]

Diversos mecanismos podem estar envolvidos no efeito antioxidante de uma molécula, sendo um deles a capacidade de sequestrar radicais livres. Com o objetivo de investigar possíveis mecanismos antioxidantes para o composto BZF5, foram realizadas as técnicas de captura dos radicais sintéticos ácido 2,2'-azino-bis(3-etylbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS^{•+}) e 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH[•]).

O teste do ABTS se baseou na metodologia de RE *et al.* (1999) utilizando o ABTS^{•+} para avaliar a capacidade *scavenger* do BZF5, a qual seria destinada a qualquer substância capaz de doar elétrons para o radical livre inativando-o e tornando-o um composto eletricamente estável de acordo com OLIVEIRA (1999). O teste de DPPH[•] se baseou na metodologia de SHARMA *et al.* (2009), também com o princípio de avaliar a capacidade *scavenger* do composto BZF5. Para ambos os ensaios, o composto BZF5 foi dissolvido em DMSO e testado nas concentrações de 1-50 μ M. DMSO foi utilizado como veículo e água foi utilizada para o branco (tubo controle). O ácido ascórbico foi utilizado como um controle positivo (*scavenger* de radicais) na concentração de 50 μ M. Os resultados foram calculados e expressos como percentagem (%) do branco.

2.3 Análise estatística

A análise estatística foi realizada pelo software GraphPad Prism 7.04 e os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). As comparações entre os grupos foram realizadas através da análise de variância ANOVA de uma via seguido pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls (BZF5) ou ainda,

pelo teste T não pareado (ácido ascórbico). Valores de $p<0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O screening da atividade antioxidante *in vitro* do BZF5 está demonstrado na Fig. 2. Como pode ser observado, o NPS causou um aumento dos níveis de TBARS em homogenato de cérebro de camundongos. O composto BZF5 nas concentrações de 100 e 200 μ M foi efetivo em reduzir parcialmente os níveis de peroxidação lipídica quando comparado aos grupos induzido (I) ou veículo (V) ($p<0,05$). Estes resultados demonstram o potencial antioxidante do BZF5 em cérebro de camundongos *in vitro*.

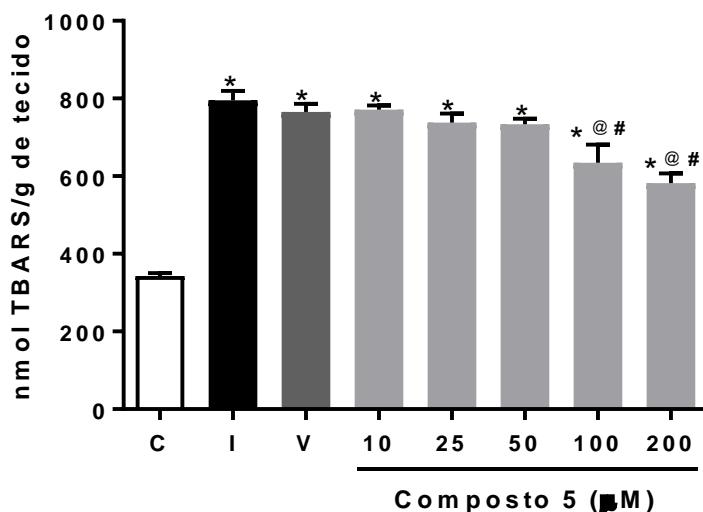


Fig. 2 Efeito do BZF5 sobre os níveis de lipoperoxidação induzida por NPS em homogenato de cérebro de camundongos. Os dados representam a média \pm SEM de 3 experimentos independentes e os resultados estão expressos como nmol de TBARS/g de tecido. * $p<0,05$ comparado ao controle (C); @ $p<0,05$ comparado ao induzido (I); # $p<0,05$ comparado ao veículo (V).

A Fig. 3A apresenta resultados do ensaio de capacidade *scavenger* do radical sintético ABTS $\cdot+$ na presença do composto BZF5. Nota-se que o composto (1-50 μ M) não atuou pelo método *scavenger* deste radical, uma vez que a quantidade de radicais não foi diminuída em relação ao grupo veículo (V) ($p>0,05$). Por outro lado, o ácido ascórbico (controle positivo) reduziu a concentração de radicais ABTS $\cdot+$ ($p<0,05$), o que comprova seu efeito *scavenger* de radicais, visto que é um potente agente redutor.

Na Fig. 3B é possível observar que o composto BZF5 (1-50 μ M) ($p>0,05$), diferentemente do controle positivo (ácido ascórbico, ($p<0,05$)), também não agiu como *scavenger* de radicais, pois não foi eficaz em reduzir os níveis de radicais DPPH \cdot quando comparado ao grupo veículo (V).

Com base nestes resultados, é possível sugerir que a ação antioxidante do BZF5 possa ser mediada por mecanismos distintos da atividade *scavenger* de radicais. Ensaios adicionais para a elucidação de seus mecanismos são necessários para a maior compreensão dos seus efeitos antioxidantes, como, por exemplo, ensaios de atividade mimética a enzimas antioxidantes.

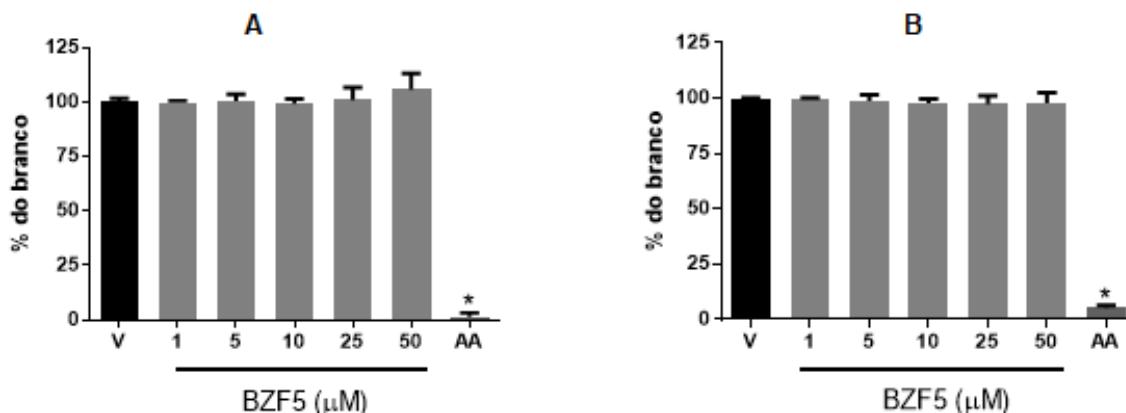


Fig. 3. Ensaio de capacidade *scavenger* do radical ABTS•+ (A) e radical DPPH•. (B)
Os dados representam a média \pm EPM de 3 experimentos independentes e os resultados estão expressos em porcentagem (%) do branco (água). AA significa ácido ascórbico (controle positivo). * $p<0,05$ quando comparado ao veículo (V).

4. CONCLUSÕES

Com base nos experimentos realizados, conclui-se que o composto BZF5 apresenta atividade antioxidante em cérebro de camundongos *in vitro*, porém não atua como uma molécula *scavenger* dos radicais ABTS•+ e DPPH•. Outros ensaios são necessários para elucidar possíveis mecanismos de ação antioxidante. Sugerimos que o BZF5, uma molécula com potencial inovador, deveria ser testado em modelos experimentais de doenças do sistema nervoso associadas ao estresse oxidativo, a fim de que possa contribuir para geração de novos medicamentos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- PÔRTO W.G. Radicais Livres e Neurodegeneração. Entendimento Fisiológico: Base para Nova Terapia?. **Revista Neurociências**. p.70-76, 2001.
- FERREIRA A.L.A; MATSUBARA L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.43 n. 1 p.61-68, 1997
- OBOH. G, et al. Inhibition of fibril formation in beta-amyloid peptide by a novel series of benzofurans **The Biochemical Journal**. P. 283-289, 1999.
- FUGESP. **Radicais livres**. São Paulo, jul. 1999. Acessado em 21 ago. 2018. Online.http://www.fugesp.org.br/nutricao_e_saude_conteudo.asp?id_publicacao=3&edicao_numero=4&menu_ordem=3
- ALFIERI, M.A., LEUNG, F.Y., GRACE, D.M. Selenium and zinc levels in surgical patients receiving total parenteral nutrition. **Biological Trace Element Research**, v.61, n.1, p.33-39, 1998.
- RIZZO, S., et al. Benzofuran-based hybrid compounds for the inhibition of cholinesterase activity, beta amyloid aggregation, and abeta neurotoxicity. **Journal of Medicinal Chemistry** p.2883- 2886, 2008.
- OHKAWA H; OHISHI N; YAGI K. Assay for peroxidation in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Annals of Biochemistry**, v.95 p. 351-358, 1979.
- RE, R., et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**, v.26, n.9-10, p.1231-1237, 1999.
- SHARMA OP; BHAT TK. DPPH antioxidant assay revisited. **Food Chemistry**, v.113 p.1202-1205, 2009.