

## TRIAGEM DE ATIVIDADE BIOLÓGICA DE COMPOSTOS CALCOGENO-DIHIDROBENZOFURANOS: TESTES *IN VITRO* E *IN SILICO*

**TÁCIA KATIANE HALL<sup>1</sup>; LARISSA SANDER MAGALHÃES<sup>2</sup>; MARIANA PARRON PAIM<sup>2</sup>; VANESSA NASCIMENTO<sup>3</sup>; CÉSAR AUGUSTO BRÜNING<sup>4</sup>; CRISTIANI FOLHARINI BORTOLATTO<sup>5</sup>**

<sup>1,2,4,5</sup> Universidade Federal de Pelotas (UFPEL) - Laboratório de Bioquímica e Neurofarmacologia molecular (LABIONEM) – taciahall26@gmail.com, larissasama@hotmail.com, cabruning@yahoo.com.br, cborbolatto@gmail.com

<sup>3</sup> Universidade Federal Fluminense (UFF) – nascimentovanessa@id.uff.br

### 1. INTRODUÇÃO

As espécies reativas (ER) surgem de processos fisiológicos no organismo, como produção de energia e defesa imunológica. Entretanto, o excesso de ERs e/ou baixa atividade antioxidante ocasiona o estresse oxidativo (ANDERSON, 1996), que está relacionado a diversas doenças. O cérebro, altamente oxigenado, é vulnerável às ER, fator este que aumenta o risco de doenças psiquiátricas e neurodegenerativas (SINGH; KUKRETI; SASO et al., 2019). Diversas patologias do sistema nervoso central impactam a qualidade de vida. A depressão, vinculada a desequilíbrios neuroquímicos, está relacionada ao aumento da atividade da enzima monoamina oxidase A (MAO-A), que degrada neurotransmissores como serotonina e noradrenalina, fundamentais para funções orgânicas. A MAO também influencia a geração de ER, formando aldeídos e liberando peróxido de hidrogênio durante a quebra de neurotransmissores (EDMONSON, 2014).

Muitas pesquisas se concentram na descoberta de novos compostos com potencial atividade biológica. Os compostos organocalcogênios contendo enxofre e telúrio ganham destaque nesse cenário (LIN; LEE; CHANG et al., 2012). O núcleo 2,3-dihidrobenzofurano, encontrado em produtos naturais, pode ser a base para diversos compostos calcogênios (MALMSTROM; JONSSON; COTGREAVE et al., 2001). Testes *in vitro* e *in silico* podem ser empregados para a triagem de novas substâncias com potencial ação biológica. Essas abordagens são benéficas, uma vez que reduzem a necessidade de testes em animais (ALAM; BRISTI; RAFIQUZZAMAN, 2013). Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi investigar a atividade antioxidante e o potencial de inibição da enzima MAO-A, por meio de testes *in vitro* e *in silico*, de seis compostos 2,3-DHBF contendo os átomos de enxofre (S) (1 a 5) ou Telúrio (Te) (6).

### 2. METODOLOGIA

#### 2.1 Compostos

Os compostos utilizados neste estudo foram sintetizados no Laboratório SupraSelen da Universidade Federal Fluminense (UFF), e são denominados 2-((fenilltio)metil)-2,3-dihidrobenzofurano (1), 2-((p-toliltio)metil)-2,3-dihidrobenzofurano (2), 2-((o-toliltio)metil)-2,3-dihidrobenzofurano (3), 2-(((4-fluorofenil)tio)metil)-2,3-dihidrobenzofurano (4), 2-(((4-clorofenil)tio)metil)-2,3-dihidrobenzofurano (5), 2-((feniltelanil)metil)-2,3-dihidrobenzofurano (6). Os compostos foram solubilizados em dimetilsulfóxido para realização dos testes *in vitro*. Os homogenatos foram preparados com o cérebro total de camundongos Swiss oriundos do projeto de

número 029384/2022-14, aprovado pela Comissão de Ética em Uso de animais da UFPel.

## 2.2 Ensaio de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A lipoperoxidação foi avaliada conforme a técnica de OHKAWA et al. (1979), com indução pelo nitroprussiato de sódio (NPS). O homogenato de tecido cerebral foi preparado, e o sobrenadante usado como amostra. Os grupos tratados com compostos receberam tecido, NPS, tris/HCl, água e os compostos testados. O trolox serviu como controle positivo. Após incubação a 37°C por 1 hora, os tubos foram tratados com ácido tiobarbitúrico 10%, tampão de ácido acético e dodecil sulfato de sódio 0,8%, incubados a 95°C por 1 hora e lidos a 532 nm, expressando os resultados em nmol de TBARS/g de tecido.

## 2.3 Inibição da enzima Monoamina Oxidase A (MAO-A)

O tecido cerebral foi preparado conforme SOTO-OTERO et al., 2001. A concentração de proteínas foi ajustada para 1 mg/ml (BRADFORD, 1976). Em seguida, o tecido foi incubado com pargilina, um inibidor da MAO-B. Após 5 minutos, o composto e o substrato quinuramina foram adicionados e incubados por 10 minutos a 37°C. A reação foi interrompida com ácido tricloroacético e as amostras centrifugadas. Os sobrenadantes foram transferidos para novos tubos de ensaio, adicionando hidróxido de sódio 1M. As amostras foram lidas em fluorímetro, com excitação de 315 nm e emissão de 380 nm.

## 2.4 Análises *in silico*

Os compostos tiveram suas estruturas 2D desenhadas no Chemdraw e convertidas em 3D no Avogadro 0.9.4. As cargas elétricas foram adicionadas com o AutoDockTools. A estrutura 3D da MAO-A foi obtida do Protein Data Bank (PDB) (ID: 2z5x) e preparada no Chimera 1.5.3. A docagem usou o AutoDock Vina 1.1.1 para identificar interações, e para as interações utilizou-se o Discovery Studio.

## 2.5 Análise estatística

A análise estatística foi realizada no software GraphPad Prism 8.0.2. Para as comparações entre grupos, a análise de variância (ANOVA) de um fator foi aplicada, seguida pelo teste *post hoc* de Tukey. Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M), sendo  $p<0,05$  considerado como nível de significância estatística.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Realizou-se uma triagem inicial dos seis compostos em uma concentração fixa de 200  $\mu$ M para identificar moléculas antioxidantes através da proteção contra a peroxidação lipídica (Figura 1A) e identificar potenciais inibidores da enzima MAO-A cerebral (2A). Para a detecção de moléculas antioxidantes, a ANOVA revelou diferença entre os grupos experimentais no ensaio de TBARS [ $F_{(9, 20)}=0,6729$ ;  $p<0,0001$ ]. O teste *post hoc* revelou que o composto 6, com átomo de Te em sua estrutura, demonstrou eficácia na proteção contra o dano oxidativo induzido em lipídios, a uma concentração de 200  $\mu$ M, demonstrando parecer que a presença do átomo de Te é muito importante para este efeito, o que foi visto em trabalhos semelhantes (NOBRE; BORGES; SILVA et al., 2014). O controle positivo trolox (100 e 200  $\mu$ M) reduziu os níveis de lipoperoxidação, validando os resultados. Portanto, o composto 6 foi selecionado para a análise de atividade antioxidante em um experimento de curva concentração-resposta (01-1 $\mu$ M). A Figura 1B revela que o composto 6 exibiu proteção contra a peroxidação lipídica em concentrações iguais ou superiores a 0,5  $\mu$ M [ $F_{(8, 18)}=382,6$ ;  $p<0,0001$ ], com um valor de  $IC_{50}$  de 0,3525  $\mu$ M (0,3134 - 0,3907  $\mu$ M). O controle positivo, trolox,

também protegeu o tecido cerebral contra o dano oxidativo a 100  $\mu$ M e 200  $\mu$ M. Como observado na imagem, os efeitos do composto contendo o átomo de Te, parecem ser superiores ao controle positivo, como visto em outros trabalhos, onde se percebe uma forte atividade antioxidante de compostos contendo o átomo de Te em sua estrutura (GAY; LUCHESE; NOGUEIRA et al., 2010).

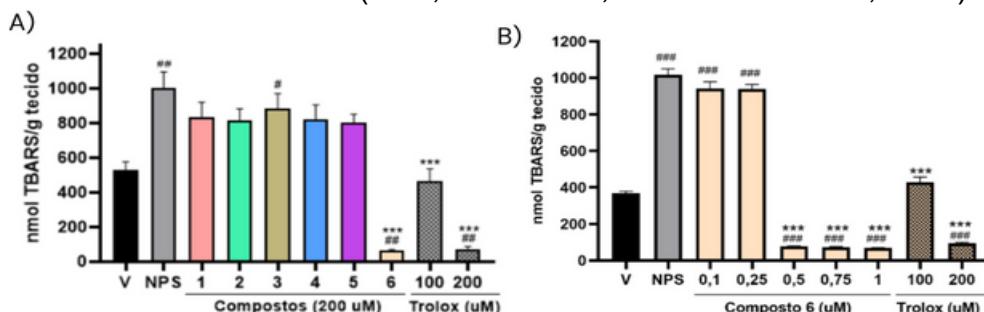


Figura 1 – Efeitos dos compostos 2,3-DHBF nos níveis de lipoperoxidação (TBARS) induzidos por NPS em tecido cerebral de camundongo ( $n = 3$ ). (A) Triagem dos compostos 1 a 6 em concentração fixa (200  $\mu$ M); (B) Curva concentração-resposta do composto 6. Os dados representam a média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M). Trolox foi usado como controle positivo. (\*\*\*  $p < 0,001$  quando comparado ao grupo NPS e (#)  $p < 0,05$  (##)  $p < 0,01$  (###)  $p < 0,001$  quando comparado ao grupo veículo (V). ANOVA de uma via e teste *post hoc* de Tukey.

Em relação ao ensaio de inibição de atividade da enzima MAO-A, a Figura 2A indica que os compostos 2, 4, 5 e 6, na concentração fixa de 200  $\mu$ M, foram capazes de reduzir a atividade desta isoforma enzimática [ $F_{(6, 14)} = 12,79$ ,  $p < 0,0001$ ]. Visando selecionar a molécula com o melhor perfil de inibição, uma triagem virtual foi realizada utilizando a docagem molecular. Os resultados revelaram que todos os compostos contendo enxofre exibiram afinidade de ligação similar com a enzima. Os resultados do encaixe molecular dos compostos contendo S foram -9,4, -9,9, -9,2, -9,5 e -9,6 kcal/mol respectivamente para os compostos 1 à 5. Neste caso, uma menor energia de ligação representa uma melhor afinidade de ligação. Portanto, o composto 2 teve a menor energia de ligação, sendo selecionado entre os compostos de S para um ensaio de concentração-resposta. Para o composto 6, o *docking molecular* não foi possível devido à falta de descriptores para o átomo de Te no software utilizado. Apesar disso, devido a sua singularidade como exemplo de calcogênio, também foi selecionado para uma curva concentração-resposta. Desta forma, os compostos 2 e 6 foram testados em uma faixa de concentração de 5- 500  $\mu$ M.

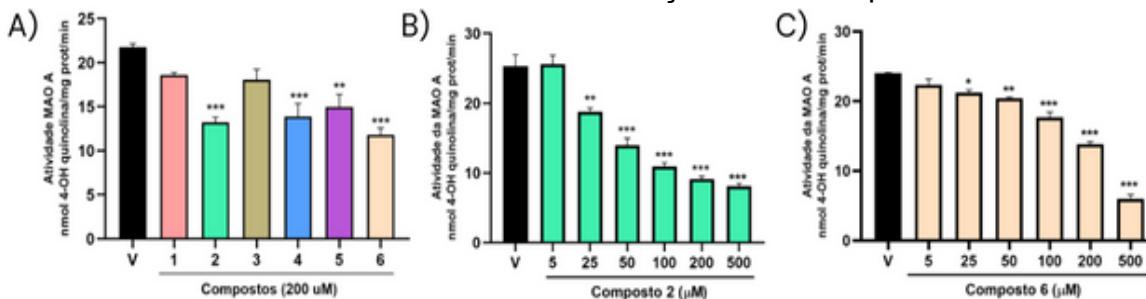


Figura 2 – Efeitos dos compostos 2,3-DHBF na atividade da enzima MAO-A em tecido cerebral de camundongo ( $n = 3-4$ ). (A) Triagem dos compostos 1 a 6 em concentração fixa (200  $\mu$ M); (B) Curva concentração-resposta do composto 2; (C) Curva concentração-resposta do composto 6. Resultados expressos como erro  $\pm$

E.P.M.(\*) p<0.05 (\*\*) p<0,01,(\*\*\*) p<0,001 quando comparado ao grupo veículo. ANOVA de uma via e teste *post hoc* de *Tukey*.

A Figura 2B acima mostra que o composto 2 demonstrou resultados significativos, inibindo a MAO-A em concentrações iguais ou superiores a 25  $\mu$ M [ $F_{(6, 21)}=60,67$ , p<0,0001], com  $IC_{50}$  de 93,68  $\mu$ M (69,88 - 128,3  $\mu$ M). O composto 6 (Figura 2C) exibiu atividade de inibição da MAO-A em uma faixa de concentração semelhante, com diferença significativa em concentrações iguais e superiores a 25  $\mu$ M [ $F_{(6, 14)}=141,2$ , p<0,0001], porém com  $IC_{50}$  de 228,2  $\mu$ M (197,8 - 266,3  $\mu$ M). Considerando o valor de  $IC_{50}$ , o composto 2 demonstrou uma inibição mais eficaz da enzima MAO-A.

#### 4. CONCLUSÕES

Este estudo revelou a eficácia de compostos 2,3-DHBF na inibição da MAO-A cerebral *in vitro*. Além disso, o composto 6 demonstrou atividade antioxidante em cérebro. A combinação da triagem *in vitro* com a análise molecular forneceram informações essenciais, orientando as próximas etapas da investigação pré-clínica, as quais visam especialmente o estudo de condições neurológicas envolvendo estresse oxidativo e desequilíbrio de monoaminas.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALAM, M. N.; BRISTI, N. J.; RAFIQUZZAMAN, M. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharm J*, 21, n.2, p. 143-152, 2013.

ANDERSON, D. Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage. *Mutat Res*, 350, n. 1, p. 103-108, 1996.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72, p. 248-254, 1976.

EDMONDSON, D. E. Hydrogen peroxide produced by mitochondrial monoamine oxidase catalysis: biological implications. *Curr Pharm Des*, 20, n.2, p.155-160, 2014.

GAY, B. M.; LUCHESE, C.; NOGUEIRA, C. W.; WENDLER, P. et al. Antioxidant effect of functionalized alkyl-organotellurides: a study *in vitro*. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 25, n. 4, p. 467-475, 2010.

LIN, Z. H.; LEE, C. H.; CHANG, H. Y.; CHANG, H. T. Antibacterial activities of tellurium nanomaterials. *Chem Asian J*, 7, n. 5, p. 930-934, 2012.

MALMSTROM, J.; JONSSON, M.; COTGREAVE, I. A.; HAMMARSTROM, L. et al. The antioxidant profile of 2,3-dihydrobenzo[b]furan-5-ol and its 1-thio, 1-seleno, and 1-telluro analogues. *J Am Chem Soc*, 123, n. 15, p. 3434-3440, 2001.

NOBRE, P. C.; BORGES, E. L.; SILVA, C. M.; CASARIL, A. M. et al. Organochalcogen compounds from glycerol: synthesis of new antioxidants. *Bioorg Med Chem*, 22, n. 21, p. 6242-6249, 2014.

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

SINGH, A.; KUKRETI, R.; SASO, L.; KUKRETI, S. Oxidative Stress: A Key Modulator in Neurodegenerative Diseases. *Molecules*, 24, n. 8, 2019.

SOTO-OTERO, et al. Inhibition of brain monoamine oxidase activity by the generation of hydroxyl radicals: potential implications in relation to oxidative stress. *Life Sci*, 69, n. 8, p. 879-889, 2001.