

ESTUDO *IN VITRO* DO EFEITO ANTIOXIDANTE DO DISSELENETO DE BIS(3-INDOLILA)

KELLEN BÖHLKE THUROW¹; MARCIA JUCIELE DA ROCHA²; KETHELYN MACHADO DA ROSA³; NICOLE MIDORI NISCHIMOTO WASHIO⁴; ÉDER JOÃO LENARDÃO⁵; CÉSAR AUGUSTO BRÜNING⁶

¹*Laboratório de Bioquímica e Neurofarmacologia Molecular (LABIONEM) - Universidade Federal de Pelotas – kellenthurow5@gmail.com;*

²*Universidade Federal de Pelotas – marciajr_15@hotmail.com;*

³*Universidade Federal de Pelotas – kethelynmachado1@gmail.com;*

⁴*Universidade Federal de Pelotas – nicolemnw@gmail.com;*

⁵*Universidade Federal de Pelotas – elenardao@uol.com.br;*

⁶*Universidade Federal de Pelotas – cabruning@yahoo.com.br.*

1. INTRODUÇÃO

Os radicais livres são moléculas que possuem elétrons desemparelhados em sua estrutura, tornando-os altamente instáveis e reativos, sendo assim, eles atuam como oxidantes diretos no corpo humano, desencadeando diversos processos patológicos. Eles têm o potencial de danificar membranas celulares, proteínas, enzimas e até o DNA, aumentando o risco de desenvolvimento de condições como doença de Parkinson, Alzheimer, inflamação crônica, certos tipos de câncer e doenças neurodegenerativas (NANDI et al., 2019; MECH, 2021). Porém, como o organismo sempre busca o equilíbrio ele conta com um sistema de defesas antioxidantes que são divididos em dois grupos: os antioxidantes endógenos, como a glutatona, catalase e a superóxido dismutase que são moléculas capazes de atrasar ou inibir a oxidação, e os antioxidantes exógenos, como a vitamina C, vitamina E, flavonóides e carotenóides que podem ser encontrados em produtos vegetais.

O mecanismo de proteção envolve uma variedade de métodos e atividades, os agentes antioxidantes atuam como doadores de hidrogênio e receptores de radicais livres, criando moléculas mais estáveis que interrompem a cascata de oxidação, assegurando assim a manutenção da saúde (MUNTEANU; APETREI, 2021). No entanto, quando há um aumento das espécies oxidantes em comparação com a capacidade antioxidante do organismo, ocorre o estresse oxidativo (VELLOSA et al., 2021). Ademais, existem agravantes do estresse oxidativo como a poluição do ar, exposição a produtos químicos, radiação ultravioleta, fumo e álcool (LENI; KÜNZI; GEISER, 2020). Portanto, a busca por novas moléculas antioxidantes que possam reduzir ou neutralizar espécies reativas é de grande importância.

O selênio é um micronutriente que possui importantes funções antioxidantes em pequenas concentrações, pois é parte essencial de importantes enzimas antioxidantes (KIEŁCZYKOWSKA et al., 2018). O selênio têm sido alvo de muitas pesquisas e além da atividade antioxidante acredita-se ter um efeito benéfico no tratamento de transtornos como a depressão e ansiedade (BIRMAN et al., 2022). Além disso, o grupo indol é importante para atividade antioxidante por ser uma das mais abundantes estruturas heterocíclicas com ação farmacológica na natureza, é encontrada, por exemplo, na serotonina (ZHANG et. al., 2021). O composto disseleneto de bis(3-indolila) (DBI) (figura 1) possui em sua estrutura

tanto o selênio como o grupo indol, além disso, já demonstrou atividade anteriormente através do teste de scavenger do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH) a partir da concentração de 5 μ M (THUROW et al., CIC 2023).

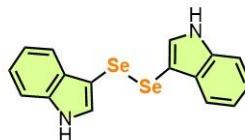


Figura 1. Estrutura química do disseleneto de bis(3-indolila)(DBI).

Portanto, o objetivo do estudo foi ampliar a investigação da atividade antioxidante por diferentes testes *in vitro*. O ensaio do cátion radical estável 2,2'-azinobis(3-etylbenziazolim-6-sulfônico) (ABTS) e o teste do poder antioxidante de redução do ferro (FRAP) avaliam o potencial antioxidante sem o uso de tecido animal. Já no teste de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) se faz o uso de cérebro de camundongos machos (CEUA 017414/2024-10). Há também o teste que avalia a atividade mimética à glutationa S-transferase (GST-like) que é uma enzima antioxidante do organismo.

2. METODOLOGIA

O composto DBI foi sintetizado no Laboratório de Síntese Orgânica Limpa (LASOL) da Universidade Federal de Pelotas (UFPel). O composto foi testado nas concentrações de 0,1 μ M a 100 μ M e dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO).

O teste ABTS avalia a capacidade do composto de neutralizar esse radical (RE et al., 1999). Neste teste foi utilizado o ácido ascórbico na concentração de 100 μ M como controle positivo. O teste FRAP avalia a capacidade do composto em reduzir o ferro oxidado e também foi utilizado ácido ascórbico na concentração de 25 μ M como controle positivo (YOSHINO; MURAKANI., 1998). Já no teste GST-like se avalia a atividade mimética à glutationa S-transferase que é uma enzima antioxidante do organismo e foi utilizado disseleneto difenila (PhSe)₂ na concentração de 25 μ M como controle positivo. Por fim, no teste TBARS, as EROs reagem com os lipídios da membrana, resultando em lipoperoxidação e a formação de malondialdeído (MDA) que é um produto de degradação e este pode ser quantificado para avaliar se o composto conseguiu inibir a cadeia de peroxidação lipídica. Neste teste o nitroprussiato de sódio (NPS) é o indutor de lipoperoxidação no tecido animal e o controle positivo nesse caso foi o trolox, 100 μ M (OHKAWA et al., 1979). Todos os testes foram realizados em duplicatas e repetidos 3 vezes e para análise estatística foi utilizado o GraphPad prism 8.0.2 onde foi realizada ANOVA de uma via seguido pelo teste post hoc de Newman-Keuls de múltiplas comparações. Resultados expressos em média \pm erro padrão da média (E.P.M.) e foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise realizada no teste ABTS demonstrou que, a partir da concentração de 2,5 μ M, houve uma redução significativa da quantidade de radical ABTS em relação ao grupo veículo, como pode ser observado na figura 2a. Ademais, nas concentrações posteriores tal redução foi ainda mais acentuada, demonstrando que o composto possui potencial redutor por conseguir neutralizar o radical ABTS.

A análise realizada no teste FRAP revela que, a partir da concentração 2,5 μM houve um aumento significativo da absorbância como pode ser observado na figura 2 b, indicando uma maior concentração de ferro reduzido. Esse resultado evidencia o potencial redutor do DBI sobre o ferro oxidado.

Já para o TBARS a análise demonstrou sua atividade antioxidante a partir da concentração de 10 μM e nas concentrações seguintes apresentou até menor quantidade de produtos de degradação do que o controle positivo da técnica como observado na figura 2 c.

Quanto à análise da GST-like pode se observar que o DBI apresenta atividade mimética à enzima a partir da concentração de 25 μM e é crescente como observado na figura 2 d.

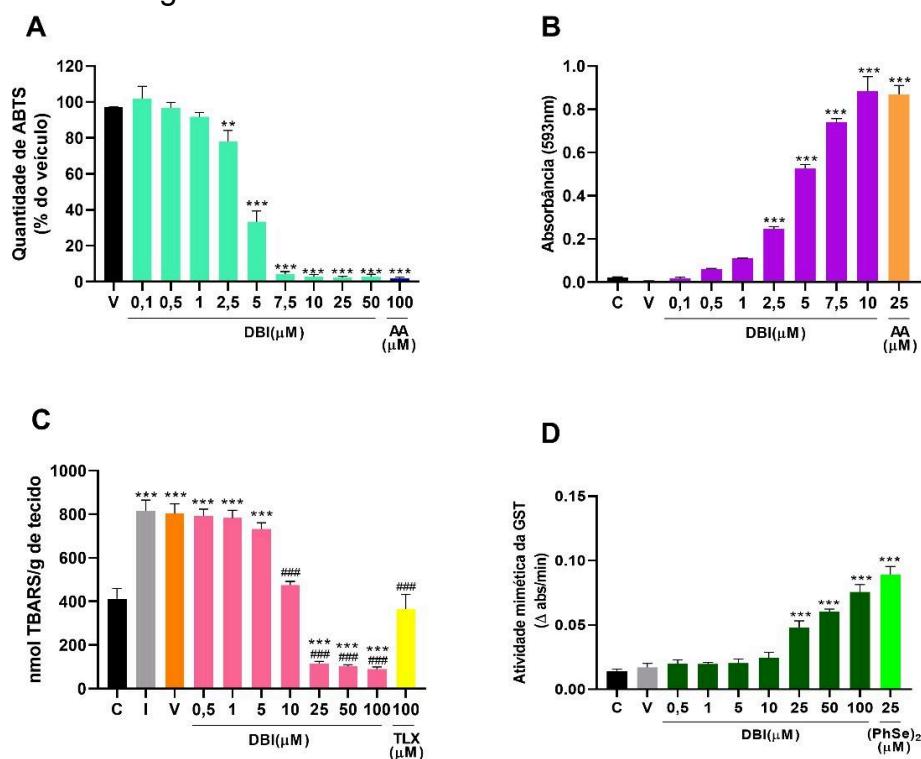


Figura 2. a) Atividade scavenger do DBI sobre o radical ABTS. b) Atividade redutora do DBI sobre o ferro oxidado. c) Atividade antioxidante do DBI frente à peroxidação lipídica. d) Atividade mimética do DBI à glutatona S-transferase.

** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ quando comparado com ao grupo veículo (a) ou ao grupo controle (b,c e d). #### $p < 0,001$ quando comparado ao grupo induzido.

Siglas: AA=ácido ascórbico, TLX=trolox, (PhSe)₂= disseleneto difenila.

4. CONCLUSÕES

Mediante os resultados obtidos neste estudo, pode-se concluir que o composto DBI apresentou ação antioxidante em baixas concentrações e com isso gera-se a possibilidade de testar o efeito antioxidante do DBI em mais ensaios que incluem tecido animal, além de avaliar sua toxicidade em camundongos, tendo a perspectiva de ele ser usado como antioxidante em doenças relacionadas com o estresse oxidativo.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BENZIE, Iris F.; STRAIN, John J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, n. 1, p. 70-76, 1996.
- BIRMAN, P. T. et al. Neuropharmacology of Organoselenium Compounds in Mental Disorders and Degenerative Diseases. **Current Medicinal Chemistry**, v. 29, 15 jun. 2022.
- BOCCHINI, B. et al. Synthesis and Antioxidant Activity of New Selenium-Containing Quinolines. **Medicinal Chemistry**, v. 17, p. 667-676, 2021.
- FORMAN, H. J.; ZHANG, H. Targeting oxidative stress in disease: promise and limitations of antioxidant therapy. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 20, n. 9, p. 689-709, 2021.
- GARCIA et al. Exploring the antioxidant potential of chalcogen-indolizines throughout in vitro assays. **PeerJ**, v. 12, p. e17074, 2024.
- KIEŁCZYKOWSKA, M. et al. Selenium— a fascinating antioxidant of protective properties. **Advances in Clinical and Experimental Medicine**, v. 27, n. 2, p. 245–255, 2018.
- LENI, Z.; KÜNZI, L.; GEISER, M. Air pollution causing oxidative stress. **Current Opinion in Toxicology**, v. 20-21, p. 1–8, abr. 2020.
- MECH, D. Kurowska A, Trotsko N. The Bioactivity of Thiazolidin-4-Ones: A Short Review of the Most Recent Studies. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 21, p. 1-15, 2021.
- MUNTEANU, I. G.; APETREI, C. Métodos Analíticos Utilizados na Determinação da Atividade Antioxidante: Uma Revisão. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, p. 3380, 2021.
- NANDI, A. et al. Role of Catalase in Oxidative Stress- and Age-Associated Degenerative Diseases. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2019, p. 1-20, 2019.
- OHKAWA, H.; OHISHI, N.; Yagi, K. J. A. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. 95(2), 351-358, 1979.
- RE, R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 9-10, p. 1231–1237, maio 1999.
- VELLOSA, J. C. R. et al. Oxidative stress: an introduction to the state of art. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 1, p. 10152-10168, 2021.
- SAMAD, N. et al. Inhibitory Effects of Selenium on Arsenic-Induced Anxiety-/Depression-Like Behavior and Memory Impairment. **Biological Trace Element Research**, v. 200, n. 2, p. 689-698, 2021.
- THUROW, Kellen B, et al. Avaliação do efeito antioxidante *in vitro* do disseleneto de bis(3-indolila). In: **CIC** 2023.
- YADAV, M.; KUMAR, M.; CHAHAL, A.; SODHI, N.; CHHILLAR, B.; ALAJANGI, H.K.; BARNWAL, R.P.; SINGH, V.P. Synthesis, Reactions, and Antioxidant Properties of Bis(3-amino-1-hydroxybenzyl) diselenide. **J Org Chem**, v. 88, n. 6, p. 3509-3522, 2023.
- YOSHINO, M.; MURAKAMI, K. Interaction of Iron with Polyphenolic Compounds: Application to Antioxidant Characterization. **Analytical Biochemistry**, v. 257, n. 1, p. 40–44, mar. 1998.