

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE *IN VITRO* DE UM LÍQUIDO IÔNICO CONTENDO SELÊNIO

JÚLIA DOS SANTOS CARDOSO¹; EVELYN MIANES BESCKOW²; JOÃO MARCOS ANGHINONI³; EDER JOÃO LENARDÃO⁴; CRISTIANI FOLHARINI BORTOLATTO⁵; CÉSAR AUGUSTO BRÜNING⁶

^{1,2,5,6} Laboratório de Bioquímica e Neurofarmacologia Molecular (LABIONEM) - Universidade Federal de Pelotas – juliadscardoso22@gmail.com; cabruning@yahoo.com.br.

^{3,4} Laboratório de Síntese Orgânica Limpa (LASOL) - Universidade Federal de Pelotas

1. INTRODUÇÃO

O estresse oxidativo ocorre devido a um desequilíbrio no sistema de oxirredução, caracterizado pelo aumento na produção de agentes oxidantes e pela redução da eficácia dos mecanismos de defesa antioxidantes do organismo (VELLOSA *et al.*, 2021; AZEVEDO *et al.*, 2024). Esse cenário favorece a formação excessiva de radicais livres (BARBOSA *et al.*, 2010), o que pode levar à perda de funções biológicas e/ou ao comprometimento da homeostase (HALLIWELL *et al.*, 2004).

O conceito de radicais livres faz referência a átomos ou moléculas altamente reativas, que apresentam um número ímpar de elétrons na sua última camada eletrônica (HALLIWELL *et al.*, 1990). Por sua vez, o sistema de defesa antioxidante tem a função de inibir e/ou reduzir os danos causados pela ação deletéria dos radicais livres, ou das espécies reativas não-radiciais (BARBOSA *et al.*, 2010). Os antioxidantes são definidos como qualquer substância que, presente em menores concentrações que as do substrato oxidável, seja capaz de inibir a oxidação deste de maneira eficaz (BARBOSA *et al.*, 2010).

Nesse contexto, o átomo de selênio vem ganhando cada vez mais atenção devido sua presença em moléculas com capacidade antioxidant, tornando-se o ponto de partida para diversas pesquisas em busca de novas moléculas ativas para o tratamento de diferentes doenças, incluindo doenças infecciosas, câncer, Alzheimer e doenças cardiovasculares (ASTRAIN-REDIN *et al.*, 2023; SANTOS, 2024).

Os líquidos iônicos, que são sais capazes de permanecer no estado líquido a temperaturas inferiores a 100 °C, já demonstraram propriedades terapêuticas promissoras, como atividades antimicrobiana, antifúngica e anticancerígena (EGOROVA; GORDEEV; ANANIKOV, 2017). Além disso, apresentam características físico-químicas favoráveis ao desenvolvimento de novos fármacos, como baixa volatilidade, alta estabilidade térmica e grande capacidade de solvatação (ZHUANG *et al.*, 2022).

A inserção do átomo de selênio na estrutura de líquidos iônicos representa uma estratégia promissora para o desenvolvimento de compostos com potencial terapêutico, especialmente devido às conhecidas propriedades antioxidantes desse elemento. Neste contexto, o presente trabalho tem como objetivo avaliar o potencial antioxidante de um líquido iônico denominado tetrafluoroborato de butil(4-metilbenzil)(fenil)selenônio (XX1) (Figura 1), por meio de três ensaios *in vitro*: ABTS (ácido 2,2'-azino-bis(3-etylbenzotiazolino-6-sulfônico), determinação do poder de redução do íon ferro (FRAP) e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).

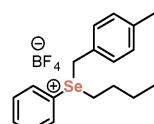


Figura 1. Estrutura química do tetrafluoroborato de butil(4-metilbenzil)(fenil)selenônio.

2. METODOLOGIA

O composto XX1 foi sintetizado no Laboratório de Síntese Orgânica Limpa da Universidade Federal de Pelotas (UFPel) e, em seguida, submetido a três ensaios *in vitro* para avaliação de seu potencial antioxidante: ABTS, FRAP e TBARS. As análises foram realizadas com diferentes concentrações do composto, variando de 10 µM a 500 µM, de acordo com as exigências metodológicas de cada teste, sendo todas as amostras dissolvidas em dimetilsulfóxido (DMSO). Para cada experimento, foram realizadas duplicatas, incluindo: controle negativo (água Milli-Q), controle do veículo (DMSO), diferentes concentrações do composto e, por fim, o controle positivo.

Nos testes de ABTS e FRAP, utilizou-se o ácido ascórbico, um antioxidante amplamente conhecido, como controle positivo na concentração de 25 µM (YOSHINO; MURAKANI, 1998). Já no ensaio de TBARS, o controle positivo foi o Trolox, na concentração de 200 µM (OHKAWA *et al.*, 1979). Nesse último teste, também foi empregado o nitroprussiato de sódio (NPS) como agente indutor de lipoperoxidação em tecido animal.

O ABTS é um ensaio colorimétrico no qual o radical 2,2'-azinobis(3-etylbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS^{•+}) apresenta uma diminuição de cor na presença de antioxidantes (BESSADA *et al.*, 2015). Dessa forma, o grau de descoloração permite avaliar a porcentagem de inibição do radical cátion ABTS, que é determinada em função da concentração do antioxidante e do tempo de reação (KUSKOSKI *et al.*, 2005).

O FRAP é baseado na produção do íon Fe²⁺ (forma ferrosa) a partir da redução do íon Fe³⁺ (forma férrica) (URREA-VICTORIA *et al.*, 2016). Quando a redução ocorre, há uma alteração na tonalidade, passando para um roxo intenso (BENZIE; STRAIN, 1999). Quanto maior a absorbância ou intensidade da coloração, maior será o potencial antioxidante (URREA-VICTORIA *et al.*, 2016).

Por fim, o ensaio de TBARS é amplamente utilizado para avaliar a capacidade de um composto em atenuar a peroxidação lipídica (GHANI *et al.*, 2017). Neste experimento, utilizou-se tecido cerebral de camundongos machos e fêmeas, com peso entre 25 e 30 g, como fonte lipídica. Os animais foram obtidos do Biotério Central da Universidade Federal de Pelotas. Todos os procedimentos experimentais foram conduzidos conforme as diretrizes estabelecidas pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFPel, protocolo nº 028361), sendo realizada eutanásia por overdose de isoflurano para a remoção do cérebro. As amostras foram incubadas por 1 hora a 37 °C e, em seguida, foram adicionados ácido tiobarbitúrico (TBA), tampão de ácido acético e dodecil sulfato de sódio (SDS). Posteriormente, os tubos foram incubados novamente por 1 hora a 95 °C. Após esse processo, a absorbância das amostras foi medida para avaliar a formação de produtos da peroxidação lipídica.

Todos os testes foram realizados em duplicatas e repetidos três vezes de forma independente. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism versão 8.0.2, por meio de ANOVA unidirecional, seguida pelo teste post hoc de Newman-Keuls. Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (E.P.M.) e diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No teste do ABTS (Figura 2A), observa-se que o composto XX1 apresentou atividade antioxidante mínima e somente na concentração de 200 µM, quando

comparado ao veículo. Por outro lado, o ácido ascórbico, um antioxidante conhecido (YOSHINO; MURAKANI, 1998), promoveu uma redução significativa na absorbância das amostras na concentração de 25 µM, confirmando a eficácia e a sensibilidade do ensaio.

Já no ensaio do FRAP (Figura 2B), observou-se um aumento na absorbância a partir da concentração de 200 µM, mostrando que o composto XX1 apresenta atividade antioxidante, quando comparado ao veículo. Esse resultado indica que o composto possui potencial redutor sobre o ferro oxidado presente no sistema. O ácido ascórbico, utilizado como controle positivo, também demonstrou uma redução significativa do ferro oxidado, confirmando a validade do teste.

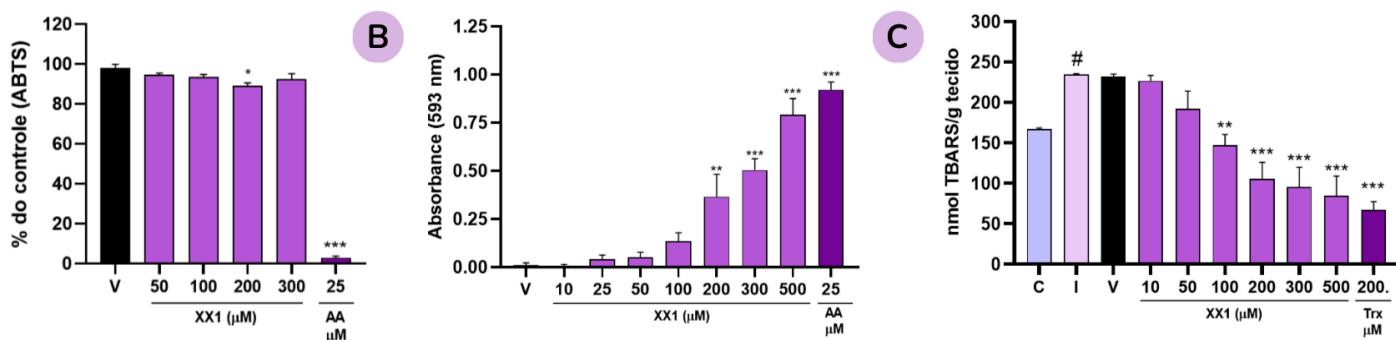


Figura 2. Gráficos referentes aos testes, de ensaio de eliminação de radicais ABTS (ABTS) (A), de poder antioxidante redutor férreo (FRAP) (B) e ao teste de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (C). #p<0,05 vs. controle (C); *p<0,05; **p<0,01 e ***p<0,001 vs. veículo (V). Siglas: AA=ácido ascórbico e Trx=trolox.

No ensaio de TBARS (Figura 2C), o composto XX1 apresentou atividade antioxidante a partir da concentração de 200 µM, com redução significativa da peroxidação lipídica em comparação ao veículo. O Trolox, utilizado como controle positivo, também demonstrou efeito antioxidante significativo na mesma concentração (200 µM), confirmando a confiabilidade do ensaio.

4. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, é possível observar que o composto XX1 não apresentou atividade antioxidante considerável no ensaio ABTS. No entanto, demonstrou efeitos significativos a partir da concentração de 200 µM nos testes FRAP e TBARS, indicando um potencial antioxidante. No teste TBARS, especificamente, foi observado efeito antioxidante no tecido cerebral de camundongos, sugerindo uma possível atuação do composto na prevenção da peroxidação lipídica. Esses achados reforçam a necessidade de realizar estudos adicionais com o composto, a fim de investigar mais profundamente seus mecanismos de ação e potencial terapêutico.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASTRAIN-REDIN, N.; TALAVERA, I.; MORENO, E.; RAMÍREZ, M. J.; MARTÍNEZ-SÁEZ, N.; ENCÍO, I.; SHARMA, A. K.; SANMARTÍN, C.; PLANO, D. Seleno-analogs of scaffolds resembling natural products: a novel warhead toward dual compounds. *Antioxidants*, Basel, v.12, n.1, p.139, 2023.

- AZEVEDO, P. F. L.; BORGES, J. F. T.; LOBATO, M. Y. F.; OLIVEIRA, R. C. S. Relação entre estresse oxidativo e COVID-19: uma breve revisão sistemática. **Revista de Medicina**, São Paulo, v. 103, n. 6, p. 1-12, 2024.
- BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. C. G.; DE PAULA, S. O.; MINIM, V. P. R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 23, n. 4, p. 629–643, ago. 2010.
- BENZIE, I.; STRAIN, J. Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. **Methods in Enzymology**, San Diego, v. 299, n.1, p. 15-27, 1999.
- BESSADA, S. M. F.; BARREIRA, J. C. M.; OLIVEIRA, M. B. P. P. Asteraceae species with most prominent bioactivity and their potential applications: A review. **Industrial Crops and Products**, v. 77, n.1, p. 538-556, 2015.
- EGOROVA, K. S.; GORDEEV, E. G.; ANANIKOV, V. P. Biological Activity of Ionic Liquids and Their Application in Pharmaceutics and Medicine. **Chemical Reviews**, v. 117, n. 10, p. 7132–7189, 26 jan. 2017.
- GHANI, M. A.; BARRIL, C.; BEDGOOD Jr., D. R.; PRENZLER, P. D. Measurement of antioxidant activity with the thiobarbituric acid reactive substances assay. **Food Chemistry**, Londres, v. 230, n. 1, p. 195–207, 2017.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. **Methods in Enzymology**, San Diego, v. 186, n. 1, p. 1–85, 1990.
- HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **British Journal of Pharmacology**, Londres, v. 142, n. 2, p. 231–255, 2004.
- KUSKOSKI, E. M.; ASUERO, A. G.; TRONCOSO, A. M.; MANCINI-FILHO, J.; FETT, R. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. **Food Science and Technology**, Campinas, v. 25, n. 4, p. 726–732, 2005.
- OHKAWA, H.; OHISHI, N.; Yagi, K. J. A. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 95, n. 2, p. 351-358, 1979.
- SANTOS, S. F. **Avaliação da citotoxicidade e potencial antioxidante de compostos orgânicos de selênio em células endoteliais**. 2024. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá.
- URREA-VICTORIA, V.; PIRES, J.; TORRES, P. B.; SANTOS, D. Y. A. C.; CHOW, F. Ensaio antioxidante em microplaca do poder de redução do ferro (FRAP) para extratos de algas. **Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo**, São Paulo, p. 1–6, 2016.
- VELLOSA, J. C. R.; BIAVATTI, M.; FRANÇÓIA, P. C. O.; DE MELLO, B. J.; DE ALMEIDA, A. C.; BUENO, G. E. Estresse oxidativo: uma introdução ao estado da arte Oxidative stress: an introduction to the state of art. **Brazilian Journal of Development**, Paraná, v. 7, n. 1, p. 1-17, 2021.
- 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.
- ZHUANG, L.; LI, Z.; WANG, X.; WANG, Y.; CHEN, G.; ZHANG, X.; LI, X.; WANG, J. Ionic liquids as a tunable solvent and modifier for biocatalysis. **Catalysis Reviews**, Philadelphia, v. 66, n. 2, p. 484-530, 2022.