



AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE COMPOSTOS DERIVADOS DE PIRAZOL E ISOXAZOL

EDUARDA BRAGA FERNANDES¹; CAROLINA CRISTÓVÃO MARTINS²;
KARLOS EDUARDO PIANOSKI³; FERNANDA ANDRÉIA ROSA⁴; CRISTIANE
LUCHESE⁵ ETHEL ANTUNES WILHELM⁶

¹Universidade Federal de Pelotas - dudsbrg@outlook.com

²Universidade Federal de Pelotas - carol_cristovao@hotmail.com

³ Universidade Estadual de Maringá -

⁴ Universidade Estadual de Maringá – farosa@uem.br

⁵Universidade Federal de Pelotas - cristiane_luchese@yahoo.com.br (coorientadora)

⁶Universidade Federal de Pelotas - ethelwilhelm@yahoo.com.br (orientadora)

1. INTRODUÇÃO

A síntese de compostos heterocíclicos destaca-se na área da química medicinal, uma vez que estes compostos apresentam um amplo espectro de aplicações farmacológicas (KUMARI, 2016), que além de presentes em muitos medicamentos atualmente disponíveis, são encontrados em abundância na natureza. Particularmente, os heterocíclicos contendo cinco membros têm sido descritos na literatura pela sua ação farmacológica (KUMAWAT, 2018). Em vista disso, os núcleos pirazol e isoxazol vêm sendo amplamente estudados uma vez que as suas propriedades anti-inflamatória e antioxidante já foram elucidadas (ALAM et al, 2015; ZHU et al, 2018).

O pirazol e o isoxazol diferem entre si pela presença de um átomo de oxigênio. Nesse contexto, enquanto o pirazol apresenta dois átomos de nitrogênio nas posições 1 e 2, o isoxazol possui um átomo de oxigênio e de nitrogênio nas posições 1 e 2, respectivamente. Sugere-se que novos compostos derivados destes núcleos possam ser promissores agentes antioxidantes.

As espécies reativas (ER) são conhecidas como moléculas instáveis formadas a partir do metabolismo celular e que em níveis moderados podem exercer importantes funções fisiológicas, como na regulação do fluxo sanguíneo. Contudo, em excesso, as ER podem desregular diversas funções celulares, ocasionar danos a moléculas, como o DNA e proteínas. Assim, o excesso de ER está associado ao desenvolvimento de diversas patologias, incluindo o câncer e a diabetes (HE et al., 2017; CARDOSO, 2014). Diante disso, evidencia-se a necessidade de desenvolver novas moléculas com potencial antioxidante. Desta forma, o presente trabalho tem como objetivo investigar o efeito antioxidante *in vitro* de novos compostos derivados do pirazol e do isoxazol.

2. METODOLOGIA

Síntese dos compostos

Os compostos A, B, C e D (Figura 1) foram sintetizados pelo Departamento de Química da Universidade Estadual de Maringá (UEM). Para a realização dos ensaios *in vitro*, os compostos foram diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO) para a obtenção de uma concentração final correspondente à 1,10,50,100 e 200 µM.

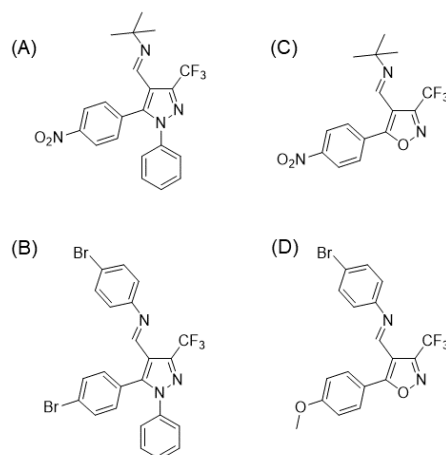


Figura 1. Estrutura química dos compostos (E)-2-metil-N-((5-(4-Nitrofenil)-1-fenil-3-(trifluormetil)-1H-pirazol-4)metileno)propano-2-amina (**A**), (E)-4-bromo-N-((5-(4-bromofenil)-1-fenil-3-(trifluormetil)-1H-pirazol-4)metileno)anilina (**B**), (E)-2-metil-N-((5-(4-nitrofenil)-3-(trifluormetil)isoxazol-4)metilenopropan-2-amina (**C**) e (E)-4-bromo-N-((5-(4-metoxifenil)-3-(trifluormetil)isoxazol-4)metileno)anilina (**D**).

Ensaio do radical 2,2'-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH)

O método descrito por Choi et al. (2002) avalia a atividade *scavenger* de diferentes moléculas sobre o radical livre sintético DPPH, por meio da doação de prótons e elétrons. Nesse ensaio, a atividade antioxidante dos compostos foi determinada por meio de uma mudança na coloração do radical DPPH, de púrpura para amarelo. Assim, o volume equivalente a 1 mL da solução DPPH diluída em etanol foi adicionada em uma alíquota de 10 µL de cada concentração (1-200 µM) dos compostos contidos nos tubos de ensaio, em duplicata. Para o grupo controle, foi utilizado 10 µL de água destilada. A mistura foi incubada durante 30 minutos, no escuro e lida espectrofotometricamente no comprimento de onda de 517 nm.

Ensaio do radical 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6- ácido sulfônico) (ABTS)

O método descrito por Re et al. (1999) avalia a capacidade de diferentes compostos de neutralizar o radical livre sintético ABTS. Nesse experimento, a redução na intensidade da coloração esverdeada do radical ABTS evidencia a atividade *scavenger* destes compostos. Novamente, um volume equivalente a 1 mL da solução ABTS, diluída em tampão fosfato de potássio (TFK), foi adicionada em uma alíquota de 10 µL de cada concentração (1-200 µM) dos compostos presentes nos tubos de ensaio, em duplicata. Para o grupo controle, foi utilizado 10 µL de água destilada. A mistura foi incubada por um período de 30 minutos, no escuro e lido espectrofotometricamente no comprimento de onda de 734 nm.

Análise estatística

Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M.). Os dados foram analisados por ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Newman-Keuls, quando apropriado. Os valores foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os ensaios *in vitro* foram realizados como testes preliminares para avaliar a ação antioxidante de compostos derivados do pirazol e do isoxazol, assim como comparar o potencial biológico de cada núcleo. De acordo com as Figuras 2 e 3, os compostos A-C apresentaram absorbâncias semelhantes ao controle em todas as concentrações testadas, bem como em ambos os ensaios realizados. Por sua vez, o composto D reduziu significativamente a absorbância quando comparado ao grupo controle, a partir de concentrações menores no ensaio do ABTS (50-200 μM) e em maiores concentrações no teste do DPPH (100 e 200 μM). Tais resultados indicam que o composto D apresentou atividade antioxidante frente aos radicais ABTS e DPPH.

A partir dos resultados obtidos, também pode-se inferir que o núcleo isoxazol exibiu potencial biológico mais promissor nos ensaios realizados do que o pirazol. Ainda, o composto D contém um grupamento metoxifenil na sua estrutura, o qual já é descrito na literatura por contribuir para a ação antioxidante em compostos (RACANÉ et al., 2019). Assim, a presença de uma ramificação contendo o grupo metoxifenil no núcleo isoxazol pode ter contribuído para o efeito antioxidante exibido pelo composto D.

Os ensaios *in vitro* realizados nesse estudo são complementares, uma vez que, o teste do DPPH baseia-se na transferência de prótons e elétrons, enquanto o teste do ABTS consiste na transferência de prótons. Portanto, por meio destes testes, pode-se ampliar o conhecimento sobre os mecanismos envolvidos no efeito antioxidante das moléculas avaliadas.

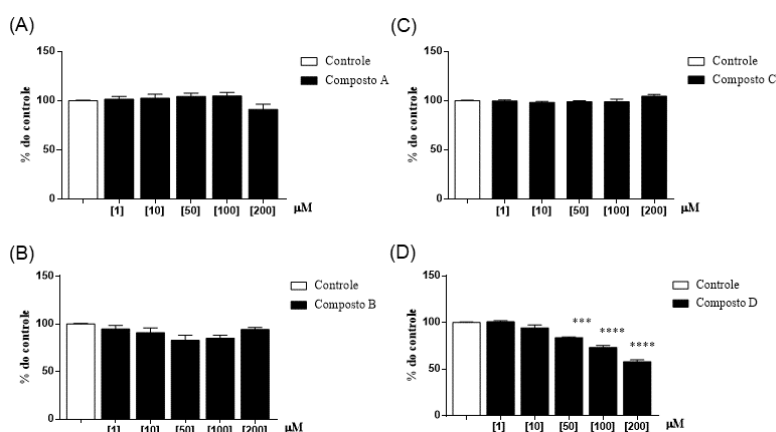


Figura 2. Efeito dos compostos A, B, C e D no ensaio do ABTS. (*) $p < 0,05$ e (***) $p < 0,001$ denota níveis de significância quando comparado ao grupo controle. A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA de única via, seguido pelo teste de Newman-Keuls.

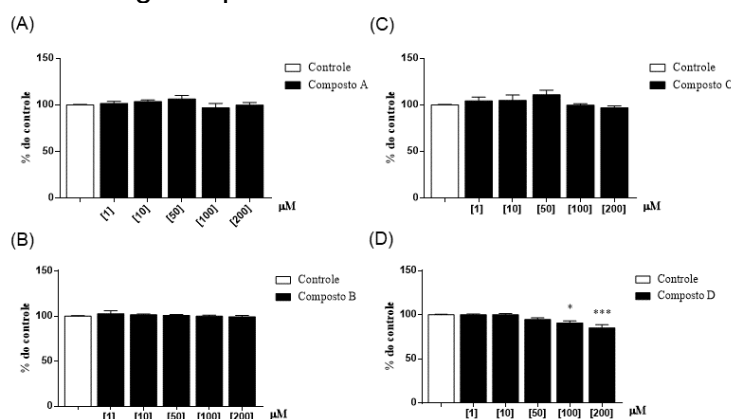


Figura 3. Efeito dos compostos A, B, C e D no ensaio do DPPH. (*) $p < 0,05$ e (***) $p < 0,001$ denota níveis de significância quando comparado ao grupo



controle. A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA de única via, seguido pelo teste de Newman-Keuls.

4. CONCLUSÕES

Em suma, os resultados demonstraram que somente o composto D, nas concentrações de 100 e 200 μM , apresentou efeito antioxidante em ambos os ensaios, enquanto que os demais compostos não exibiram ação antioxidante nestes testes. Ainda, sugere-se que a ação antioxidante exercida por este composto está relacionada à presença do grupo metoxifenil e do núcleo isoxazol. Entretanto, os experimentos desenvolvidos até o momento são considerados preliminares e, portanto, mais estudos são necessários para investigar o potencial farmacológico destes compostos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

- ALAM, M.J.; Alam, O.; Alam, P.; NAIM, M.J. A review on pyrazole chemical entity and biological activity. **International Journal of Pharma Sciences and Research**, v. 6, p. 1433-1442, 2015.
- CARDOSO, A. **Geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) mitocondriais: Papel das Acil-CoA desidrogenases de cadeia muito longa**. 2004. Tese (doutorado em ciências (bioquímicas) - Programa de pós-graduação em ciências biológicas (bioquímica), Universidade de São Paulo.
- CHOI, C.W.; KIM, S.C.; HWANG, S.S.; CHOI, B.K.; AHN, H.J.; LEE, M.Y.; PARK, S.H.; KIM, S.K. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. **Plant science**, v. 163, n. 6, p. 1161-1168, 2002.
- HE, L.; HE, T.; FARRAR, S.; JI, L.; LIU, T.; MA, X. Antioxidants Maintain Cellular Redox Homeostasis by Elimination of Reactive Oxygen Species. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 44, n. 2, p. 532-553, 2017.
- KUMARI, S.; KISHORE, D.; PALIWAL, S.; CHAUHAN, R.; DWIVEDI, J.; MISHARA, A. Transition metal-free one-pot synthesis of nitrogen-containing heterocycles. **Molecular Diversity**, v. 20, n. 1, p. 185-232, 2016.
- KUMAWAT, M.K. Thiazole containing heterocycles with antimalarial activity. **Current drug discovery technologies**, v.15, n. 3, p. 196-200, 2018.
- RACANÉ, L.; PTICEK, L.; FAJDETIC, G.; TRALIC-KULENOVIC, V.; KLOBUCAR, M.; PAVELIC, S.K.; PERIC, M.; PALJETAL, H.C.; VERBANAC, D.; STARCEVIC, K. Green synthesis and biological evaluation of 6-substituted-2-(2-hydroxy/methoxy phenyl) benzothiazole derivatives as potential antioxidant, antibacterial and antitumor agents. **Bioorganic Chemistry**, v. 95, p. 103537, 2020.
- 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 and medicine**, p. 1231-1237. 1999
- SIRIVIBULKOVIT, K.; NOUANTHAVONG, S.; SAMEENOI, Y. Paper-based DPPH assay for antioxidant activity analysis. **Analytical Sciences**, v. 34, n. 7, p. 795-800, 2018.
- ZHU, J.; MO, J.; HONG-ZHI, L.; CHEN, Y.; HAO-PENG, S. The recent progress of isoxazole in medicinal chemistry. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 26, n. 12, p. 3065-3075, 2018.