

AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO* DOS COMPOSTOS DERIVADOS DO ALDEÍDO BHT CONTENDO ENXOFRE

GIULIANA P. ZUGNO¹; PALOMA T. BIRMANN²; RENATA A. BALAGUEZ³;
EVELYN TERHAAG³; FÁBIO ZAZYKI GALETTO³; LUCIELLI SAVEGNAGO⁴

¹Universidade Federal de Pelotas, RS, Brasil. giulizugno@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas, RS, Brasil. paloma_birmann@hotmail.com

³Universidade Federal de Santa Catarina, SC, Brasil. renata.balaguez@gmail.com,
evelynterhaag@gmail.com e galettofz@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas, RS, Brasil. luciellisavegnago@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

O enxofre (S) é um elemento importante para o funcionamento de sistemas biológicos relacionados à proteção do organismo frente ao dano oxidativo. Ele apresenta-se integrado a uma gama de moléculas que incluem proteínas, enzimas, aminoácidos e micronutrientes (ATMACA, 2004).

A metionina, por exemplo, é um aminoácido essencial e a principal fonte de S do organismo. Seus resíduos expostos à superfície de proteínas exibem suscetibilidade à oxidação (BATTIN et al., 2008), e, portanto, são capazes de eliminar agentes oxidantes sem alterar a integridade biológica das moléculas em que estão inseridas. Outro aminoácido em que o S apresenta-se incorporado é a cisteína (FOTAKIS et al., 2006), a qual desempenha papel crítico na estrutura de proteínas, sendo necessária para a síntese de glutathiona (GSH), um cofator fundamental para o funcionamento da enzima antioxidante glutathiona peroxidase (GPx) (AGUILAR et al., 2016). Além disso, as tioredoxinas (TRX), proteínas responsáveis por manter o ambiente de redução intracelular, possuem um sítio ativo composto por duas cisteínas vizinhas (NORDBERG et al., 2001). Dessa forma, elas atuam como um antioxidante através da redução das ligações proteicas dissulfeto intracelulares formadas quando os níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) apresentam-se elevadas, contribuindo também para a diminuição desses EROs por meio da enzima tioredoxina peroxidase (TPx).

Em vista destas propriedades, os compostos contendo S despertam interesse quanto a sua participação em sistemas de defesa antioxidantes. Além disso, nas últimas décadas, a comunidade científica vem buscando novos antioxidantes sintéticos com capacidade de neutralização de espécies reativas. Em particular, estratégias de design para antioxidantes com base na estrutura do hidroxitolueno butilado (BHT) têm sido exploradas para a formulação de novos compostos híbridos, capazes de exercerem múltiplas funções farmacológicas (ZHANG, 2005). Nesse sentido, o presente estudo objetivou avaliar a atividade antioxidante *in vitro* de compostos derivados do aldeído BHT contendo enxofre, os quais foram denominados por **5b** e **5d** (Figura 1).

2. METODOLOGIA

Os compostos (Figura 1) avaliados durante o presente estudo foram sintetizados pelo Laboratório de Síntese Multicomponente, da Universidade Federal de Santa Catarina. Posteriormente, foram diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO) para serem testados nas concentrações finais de 0,1 - 100 µM.

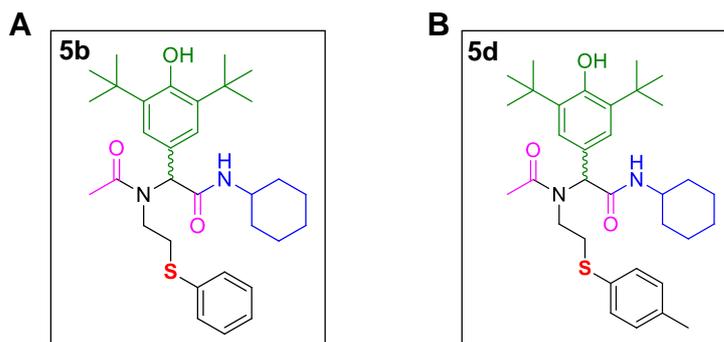


Figura 1. Estrutura dos compostos derivados do BHT contendo enxofre. **(A)** N-ciclohexil-2- (3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) -2- (N- (2- (feniltio) etil) acetamido) acetamida; **(B)** N-ciclohexil-2- (3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) -2- (N- (2- (p-toliltio) etil) acetamido) acetamida.

O método para avaliar a capacidade antioxidante via atividade sequestradora dos radicais livres 2,2-difenil-1-picril-hidrazina (DPPH⁺) pelos compostos (0,1 - 100 μ M) foi adaptada do método de Choi et al. O potencial antioxidante foi determinado por espectrofotometria a um comprimento de onda de 517 nm.

A atividade antioxidante através da captura dos radicais 2,2'-azinobis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS⁺) foi determinado conforme descrito por Re et al., com algumas adaptações. Diferentes concentrações dos compostos (0,1 - 100 μ M) foram adicionadas à solução de ABTS⁺, e a absorvância determinada por espectrofotometria a 734 nm.

Em adição aos protocolos para a avaliação da capacidade antioxidante, o potencial de redução dos compostos foi determinado a partir do teste do poder redutor do íon ferro (FRAP). Diferentes concentrações dos compostos (0,1 - 100 μ M) foram adicionadas à solução de FRAP, e o homogenato foi incubado a 37 ° C por 40 min, de acordo com Stratil et al., com algumas modificações. A absorvância das reações foi medida espectrofotometricamente a 593 nm.

O software *Graphpad Prism* foi utilizado para conduzir as análises estatísticas. Todos os ensaios *in vitro* foram realizados em triplicatas e os resultados avaliados através da análise de variância (ANOVA) unidirecional seguida pelo teste *pos hoc* de Tukey. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão da média (DP), e a diferença foi considerada estatisticamente significativa quando a probabilidade apresentou ser inferior a 5% ($p < 0,05$). Complementando esses resultados, foram calculadas a eficácia dos compostos em neutralizar os radicais livres, sendo ela representada pela porcentagem de inibição máxima ($I_{M\acute{A}X}$) e sua potência caracterizada pela concentração do composto capaz de inibir 50% da formação dos radicais livres (IC_{50}).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados obtidos revelam que ambos os compostos foram capazes de eliminar os radicais DPPH⁺, conforme apresentado na Tabela 1. Mas, nenhuma das concentrações dos compostos testados demonstrou ser potente em eliminar 50% das espécies reativas (IC_{50}). Contudo, o composto **5d** parece ser mais eficiente na eliminação dos radicais DPPH⁺, sendo os valores de inibição máxima ($I_{M\acute{A}X}$) de **5d** > **5b**.

Conforme ilustrado pela Tabela 2, **5b** e **5d** foram capazes de eliminar os radicais ABTS⁺. Considerando a amplitude do desvio padrão da média, ambos os

compostos obtiveram a mesma potência em neutralizar os radicais ABTS⁺ quando comparados ao controle, com IC₅₀ de **5b** = **5d**. Além disso, os valores de I_{MÁX} foram os mesmos para os compostos **5b** = **5d**.

Tabela 1. Efeito dos compostos na atividade *scavenger* do radical DPPH⁺

Compostos	Concentração molar dos compostos (µM)					IC ₅₀	%I _{MÁX}
	0,1	1	10	50	100		
5b	-	0,0±0,0	12,4±5,52	14,2±6,26	17,2±4,0 [*]	-	17,2±4,0
5d	0,0±0,0	19,2±2,5 ^{**}	21,4±2,9 ^{**}	19,2±3,5 ^{**}	28,1±4,0 ^{***}	-	28,1±4,0

Valores apresentados como porcentagem de inibição dos radicais DPPH⁺ em relação ao controle expressos como a média ± desvio padrão da média (DP) (n = 3). O IC₅₀ indica a concentração capaz de inibir 50% da formação dos radicais DPPH⁺. O I_{MÁX} representa a porcentagem de inibição máxima apresentada pelo composto. Os asteriscos atribuem a diferença significativa (* p < 0,05; ** p < 0,01; e *** p < 0,001) quando comparados ao controle pela ANOVA unidirecional seguida pelo teste *pos hoc* de Tukey.

Tabela 2. Efeito dos compostos na neutralização dos radicais ABTS⁺

Compostos	Concentração molar dos compostos (µM)					IC ₅₀	%I _{MÁX}
	0,1	1	10	50	100		
5b	-	10,1±0,2	47,4±11,6 ^{***}	63,5±5,0 ^{***}	76,3±4,1 ^{***}	16,4(9,0 a 28,7)	76,3±4,1
5d	-	12,1±3,1	43,8±2,1 ^{***}	76,1±3,5 ^{***}	82,3±3,9 ^{***}	13,1(10,2 a 16,6)	82,3±3,9

Valores apresentados como porcentagem de inibição dos radicais ABTS⁺ em relação ao controle expressos como a média ± desvio padrão da média (DP) (n = 3). O IC₅₀ indica a concentração capaz de inibir 50% da formação dos radicais ABTS⁺. O I_{MÁX} representa a porcentagem de inibição máxima apresentada pelo composto. Os asteriscos atribuem a diferença significativa (*** p < 0,001) quando comparados ao controle pela ANOVA unidirecional seguida pelo teste *pos hoc* de Tukey.

Em adição aos dados apresentados nas Tabelas 1 e 2, o ensaio FRAP foi realizado para determinar o potencial de redução dos compostos derivados do aldeído BHT contendo enxofre. De acordo com a Figura 2, apenas **5b** demonstrou poder redutor quando na concentração de 100 µM, em comparação ao controle, enquanto **5d** não apresentou capacidade de redução do íon ferro nas concentrações testadas.

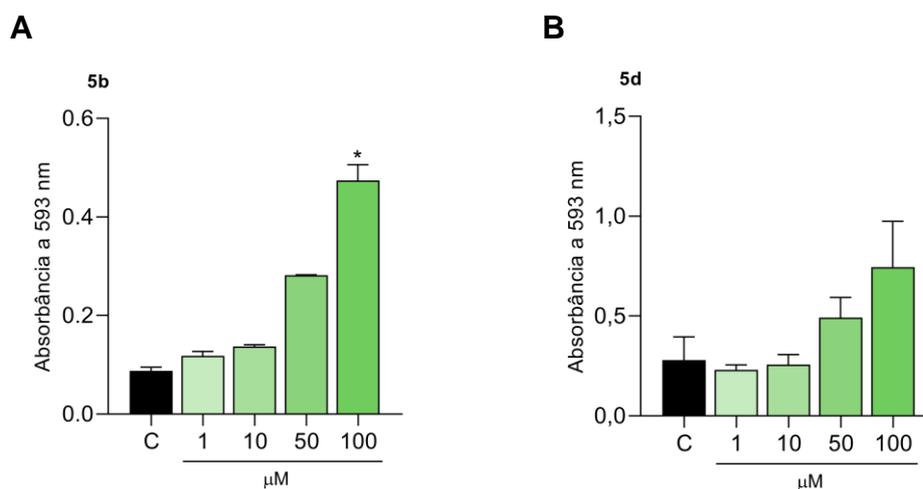


Figura 2. Potencial redutor do íon ferro apresentada pelos compostos (A) N-ciclohexil-2- (3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) -2- (N- (2- (feniltio) etil) acetamido) acetamida; (B) N-ciclohexil-2- (3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) -2- (N- (2- (p-toliltio) etil) acetamido) acetamida. Os dados são apresentados como a média ± desvio padrão da média (DP) dos valores de absorbância a 593 nm (n = 3). * p < 0,05, comparado ao grupo controle.

O estresse oxidativo é um marcador implicado em inúmeras fisiopatologias. Nesse sentido, ressalta-se a importância de estudos que se concentram na busca de novas moléculas antioxidantes capazes de promover o equilíbrio entre os sistemas pró-oxidantes e antioxidantes, evitando que ocorra o dano oxidativo a proteínas, lipídeos, DNA, entre outras biomoléculas estruturais do organismo. Como comentado anteriormente, diversos sistemas antioxidantes contam com a atuação do S na diminuição dos níveis de espécies reativas e redução das ligações dissulfeto de proteínas intracelulares resultantes do aumento dos níveis de EROs (ZHANG, 2005). Assim, essas propriedades chamam atenção para o estudo de compostos contendo S no desenvolvimento de novas estratégias farmacológicas.

4. CONCLUSÕES

Em vista do exposto, os resultados apresentados apontam os compostos **5b** e **5d** como alvos promissores para estudos futuros sobre seu potencial antioxidante no desenvolvimento de estratégias baseadas em terapias capazes de mitigar ou eliminar efetivamente os efeitos deletérios do estresse oxidativo.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUILAR, T.A.F. et al. Endogenous Antioxidants: A Review of their Role in Oxidative Stress. In: GONZALEZ, A.M.; GONZALEZ, J.A.M; SANTILLAN, E.O.M. **A Master Regulator of Oxidative Stress - The Transcription Factor Nrf2**. Croácia: IntechOpen, 2016. Cap. 1, p. 3-19.
- ATMACA, G. Antioxidant Effects of Sulfur-Containing Amino Acids. **Yonsei Medical Journal**, Edirne, v. 45, n. 5, p. 776-788, 2004.
- BATTIN, E.E.; BRUMAGHIM, J.L. Metal specificity in DNA damage prevention by sulfur antioxidants. **Journal of Inorganic Biochemistry**, Clemson, v. 102, n. 12, p. 2036-2042, 2008.
- CHOI, C.W. et al. 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.
- FOTAKIS, G.; TIMBRELL, J. A. Modulation of cadmium chloride toxicity by sulphur amino acids in hepatoma cells. **Toxicology in Vitro**, v. 20, n. 5, p. 641-648, 2006.
- NORDBERG, J. et al. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free radical biology & medicine**, v. 31, n. 11, p. 1287-312, 2001.
- 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.
- STRATIL, P. et al. Determination of total content of phenolic compounds and their antioxidant activity in vegetables--evaluation of spectrophotometric methods. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 54, n. 3, p. 607-616, 2006.
- ZHANG, H.-Y. Structure-Activity Relationships and Rational Design Strategies for Radical- Scavenging Antioxidants. **Current Computer Aided-Drug Design**, Zibo, v.1, n. 3, p. 257-273, 2005.