

## INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO* DO COMPOSTO (Z)-3-(PIRIDIN-2-IL) -2-(PIRIDIN-2-ILIMINO) TIAZOLIDIN-4-ONA (PPIT)

AMÁLIA GONÇALVES ALVES<sup>1</sup>; JOSÉ COAN CAMPOS JUNIOR<sup>2</sup>; LUIZ ROBERTO CARRARO JUNIOR<sup>2</sup>; TAÍS DA SILVA TEIXEIRA RECH<sup>2</sup>; CÉSAR AUGUSTO BRUNING<sup>2</sup>; CRISTIANI FOLHARINI BORTOLATTO<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Pelotas — [amaliaalvs@gmail.com](mailto:amaliaalvs@gmail.com);

<sup>2</sup> Universidade Federal de Pelotas — [coan.junior@ufpel.edu.br](mailto:coan.junior@ufpel.edu.br); [luizrobertocarraro@hotmail.com](mailto:luizrobertocarraro@hotmail.com); [taisteixeira.r@gmail.com](mailto:taisteixeira.r@gmail.com); [cabruning@yahoo.com.br](mailto:cabruning@yahoo.com.br);

<sup>3</sup> Universidade Federal de Pelotas — [cbortolatto@gmail.com](mailto:cbortolatto@gmail.com)

### 1. INTRODUÇÃO

Moléculas orgânicas ou inorgânicas que apresentam um ou mais elétrons não pareados são classificadas como radicais livres (HALLIWELL, 1994), e por essa característica essas moléculas têm como principal aspecto a reatividade. Os radicais livres em sua maioria são derivados do metabolismo, sendo produzidos em maior quantidade em situações onde o organismo se encontra com alguma disfunção ou na defesa contra infecções bacterianas. Segundo BARREIROS *et al.* (2006), podem ser denominadas espécies reativas do metabolismo do oxigênio e nitrogênio (ERON).

As ERON, quando em quantidades exacerbadas, causam diversos danos como modificações nas membranas celulares (peroxidação lipídica), oxidação em bases nucleicas que podem culminar processos mutagênicos e tumorais, oxidação de proteínas e associação a doenças inflamatórias (MARTELLI e NUNES 2014). O sistema nervoso é suscetível a lesões devido a capacidade reduzida de regeneração, alto consumo de oxigênio e grande quantidade de ácidos graxos poli-insaturados (BARBOSA *et al.* 2006).

Os antioxidantes podem ser encontrados naturalmente no organismo, em alimentos ou em medicamentos, tendo como função o retardo ou a inibição da oxidação pelas ERON (FUGESP, 1999). As tiazolidin-4-onas são compostos heterocíclicos que apresentam um destaque científico devido a suas características químicas e biológicas que envolvem potencial antibacteriano, anti-inflamatório, analgésico, dentre outras propriedades (PAGLIARI *et al.* 2015).

O objetivo do presente estudo foi investigar o potencial antioxidante *in vitro* de um novo composto heterocíclico funcionalizado com o intuito de, em um futuro próximo, testá-lo em modelos experimentais de doenças do sistema nervoso envolvendo o estresse oxidativo e, assim, apontar uma nova molécula com possíveis aplicações farmacológicas na saúde humana.

### 2. METODOLOGIA

O composto (Z)-3-(piridin-2-il) -2-(piridin-2-illimino) tiazolidin-4-ona (PPIT) (Figura 1) foi sintetizado pelo Laboratório de Química Aplicada a Bioativos e os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Bioquímica e Neurofarmacologia Molecular (LABIONEM), localizados na UFPEL.

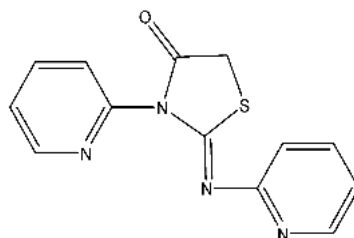


Figura 1. Estrutura química do composto (Z)-3-(piridin-2-il)-2-(piridin-2-illimino)tiazolidin-4-ona (PPIT).

## 2.2 Ensaio de captura dos radicais ABTS•+ e DPPH•

Os testes de captura do ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS•+) e do 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH•) basearam-se nas metodologias de RE *et al.* (1999) e SHARMA *et al.* (2009), respectivamente. Os dois testes avaliam a atividade *scavenger* (captura de radicais livres) do composto PPIT. Em ambos ensaios, o composto foi dissolvido em DMSO e testado nas concentrações de 1-50  $\mu\text{M}$ . O DMSO foi utilizado como veículo do composto e a água foi utilizada para o branco (tubo controle). O ácido ascórbico, um antioxidante com ação *scavenger* de radicais, foi utilizado como controle positivo, e testado nas concentrações de 1-100  $\mu\text{M}$ . Os resultados foram expressos como percentagem (%) do branco.

## 2.3 Ensaio de determinação do poder de redução do íon férrico

O ensaio de determinação do poder de redução do íon férrico (FRAP), uma técnica para análise antioxidante, baseou-se na metodologia de PULIDO *et al.* (2000). Este teste analisa a capacidade dos compostos reduzirem  $\text{Fe}^{3+}$  (forma férrica) a  $\text{Fe}^{2+}$  (forma ferrosa), na presença do complexo 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ). O composto foi dissolvido em DMSO e testado nas concentrações de 10-500  $\mu\text{M}$ . O DMSO foi utilizado como veículo e água milli-Q foi utilizada para o branco (tubo controle). O ácido ascórbico foi utilizado como um controle positivo na concentração de 25  $\mu\text{M}$ .

## 2.4 Análise estatística

A análise estatística foi realizada pelo software GraphPad Prism 7.04. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). As comparações entre os grupos foram realizadas através da análise de variância ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls (dados paramétricos). O teste T não pareado foi usado no ensaio do FRAP para o ácido ascórbico. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos com os ensaios de captura dos radicais ABTS e DPPH, estão demonstrados na figura 2. No ensaio de ABTS, o composto PPIT (5-100  $\mu\text{M}$ ) atuou como *scavenger* deste radical, apresentando uma redução característica da absorbância em relação ao grupo veículo (V) ( $F_{(6, 14)}=250,0$ ;  $p=0,0001$ ) (Fig 2A). O ácido ascórbico, como esperado, reduziu a concentração de radicais ABTS, visto que é um potente agente redutor ( $F_{(5,12)}=73,62$ ;  $p=0,0001$ ) (Fig. 2B).

No ensaio de DPPH, o composto PPIT (25-100  $\mu\text{M}$ ) agiu como *scavenger* deste radical, reduzindo significativamente, porém de maneira discreta, os níveis de radicais DPPH quando comparado ao grupo veículo ( $F_{(6, 14)} = 46,82$ ;  $p=0,0001$ ) (Fig.2C). O ácido ascórbico reduziu a concentração de radicais DPPH, o que comprova seu efeito *scavenger* de radicais ( $F_{(6,14)} = 22,10$ ;  $p=0,0001$ ) (Fig. 2D).

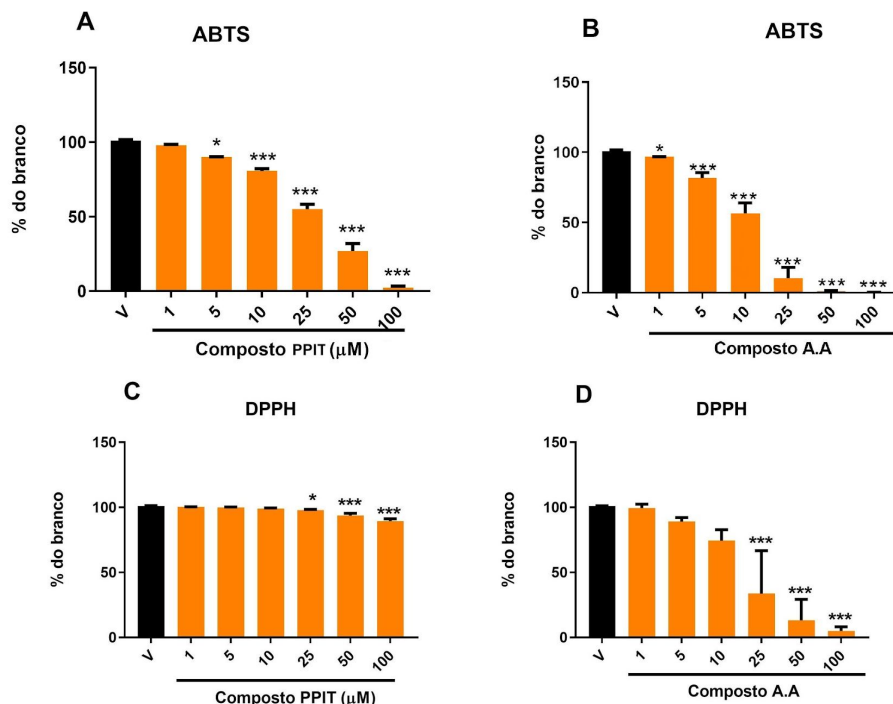


Figura 2. Efeitos do composto PPIT em ensaios de captura dos radicais ABTS (2A) e DPPH (2C). Ácido ascórbico (AA) foi empregado como um controle positivo (2B e D). Os dados representam a média  $\pm$  EPM de 3 experimentos independentes, \* $p<0,05$  \*\* $p<0,01$  \*\*\* $p<0,001$  quando comparado ao veículo (V); ANOVA de uma via/Newman-Keuls.

Conforme demonstrado na Figura 3, o composto PPIT (500  $\mu\text{M}$ ) apresentou ação redutora da forma  $\text{Fe}^{3+}$  para  $\text{Fe}^{2+}$ , detectada pelo característico aumento de absorbância no teste ( $F_{(8, 17)} = 37,75$ ;  $p=0,0001$ ), demonstrando a ação antioxidante deste composto. O ácido ascórbico também reduziu o  $\text{Fe}^{3+}$ , comprovando, portanto, o seu conhecido efeito antioxidante.

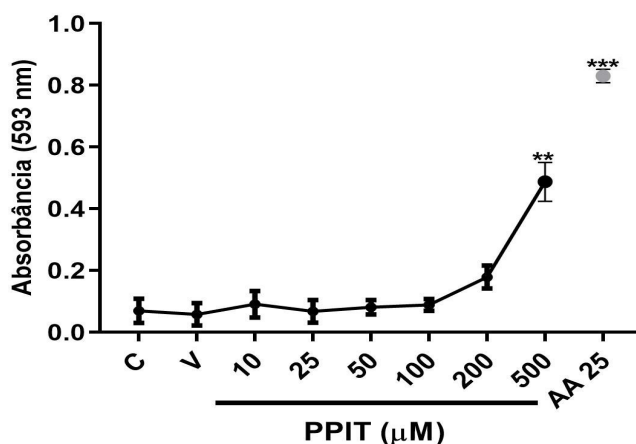


Figura 3. Efeitos do composto PPIT no ensaio FRAP. Ácido ascórbico (AA) foi empregado como um controle positivo. Os dados representam a média  $\pm$  EPM de

3 experimentos independentes \*\* $p < 0,01$  quando comparado ao veículo (V); ANOVA de uma via seguido de um Teste T (não paramétrico) para o A.A.

#### 4. CONCLUSÕES

Diversas evidências correlacionam o estresse oxidativo com o desenvolvimento de injúrias ao organismo. Sendo assim, os antioxidantes têm um papel relevante na contenção de moléculas reativas envolvidas nos processos oxidativos.

Através dos resultados obtidos, observa-se que o composto PPIT apresenta ação antioxidante através do mecanismo de captura de radicais, conforme elucidado pelas técnicas de ABTS e DPPH. Além disso, o PPIT também é efetivo na redução do íon férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ), como demonstrado através do ensaio FRAP. Portanto, sugere-se o PPIT como uma molécula antioxidante em potencial para ser testada em modelos de doenças humanas relacionadas ao estresse oxidativo.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARBOSA, L; MEDEIROS, M; AUGUSTO, O. Danos oxidativos e neurodegeneração: o que aprendemos com animais transgênicos e nocautes? **Química Nova** v. 29, n. 6, p. 1352-1360, 2006.

BARREIROS A; DAVID, J; DAVID, J. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova** v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.

FUGESP. **Radicais livres**. São Paulo, jul. 1999. Acessado em 20 ago. 2019.

Online.[http://www.fugesp.org.br/nutricao\\_e\\_saude\\_conteudo.asp?id\\_publicacao=3&edicao\\_numero=4&menu\\_ordem=3](http://www.fugesp.org.br/nutricao_e_saude_conteudo.asp?id_publicacao=3&edicao_numero=4&menu_ordem=3)

HALLIWELL B. Free radicals and antioxidants: a personal view. **Nutrition Reviews** v.52, p.253–265, 1994.

MARTELLI, F; NUNES, F. Radicais livres: em busca do equilíbrio. **Ciência e Cultura**, v. 66, n. 3, p. 54-57, 2014.

PAGLIARI A; BIANCHI A; ZANATTA J; ORLANDO T; EMMERICH D; CUNICO W. Synthesis of thiazolidin ones and oxathiolones by supercritical fluid. **Perspectiva**, v. 39, p. 43-50, 2015.

PULIDO, R; BRAVO, L; SAURA-CALIXTO, F. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, p. 3396-3402, 2000.

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.

SHARMA OP; BHAT TK. DPPH antioxidant assay revisited. **Food Chemistry**, v.113 p.1202-1205, 2009.