

SAIS DE ISOTIOURÔNIO COMO POTENCIAIS SEQUESTRADORES DE RADICAIS LIVRES: MECANISMOS ANTIOXIDANTES IN VITRO

NATALIA GONÇALVES TAVARES¹; TAÍS DA SILVA TEIXEIRA RECH²; BRUNA RAFAELA PIZZI³; CINARA TEIROBA DE ÁVILA⁴; MARCUS MANDOLESI SÁ⁵
CRISTIANI FOLHARINI BORTOLATTO⁶

¹Universidade Federal de Pelotas –natalia10.g.tavares@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas –taisteixeira.r@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas –bruna_pizzi@hotmail.com

⁴Universidade Federal de Santa Catarina –cinara.t.avila@hotmail.com

⁵Universidade Federal de Santa Catarina –marcus.sa@ufsc.br

⁶Universidade Federal de Pelotas –cbortolatto@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O estresse oxidativo é caracterizado pelo aumento de espécies reativas (ER), que podem causar danos significativos aos tecidos. Essas ER são moléculas altamente reativas, incluindo as radicalares como ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), hidroxila (OH^{\cdot}), óxido nítrico (NO^{\cdot}), e as não radicalares, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o peroxinitrito ($ONOO^-$) (SÁNCHEZ, *et al.*, 2020). Nosso organismo conta com sistemas antioxidantes de origem endógena ou exógena para neutralizar as ER e impedir danos oxidativos (SILVA, *et al.*, 2022). Quando as defesas antioxidantes são insuficientes, as ER reagem com as biomoléculas como lipídios, proteínas, e DNA, levando ao desenvolvimento de doenças, como as neurodegenerativas, cardiovasculares, diabetes e câncer (YOSHIKAWA & YOU, 2024).

Diante disso, a pesquisa por novos compostos com atividade antioxidante é um campo de pesquisa promissor, pois pode contribuir para o desenvolvimento de novas terapias e estratégias de prevenção relacionadas ao estresse oxidativo. Neste sentido, os sais de isotiourônio têm atraído atenção por suas propriedades biológicas, destacando-se pela atividade antitumoral (CISILOTTO *et al.*, 2015; FERREIRA *et al.*, 2017; MUNARETTO *et al.*, 2020). Dados ainda não publicados de nosso grupo de pesquisa já demonstraram o potencial de um conjunto de sais de isotiourônio em atenuar a lipoperoxidação lipídica em cérebro de ratos *in vitro*. Desta forma, o presente estudo tem como objetivo estender estes achados, avaliando os mecanismos envolvidos na atividade antioxidante dos sais por meio de técnicas *in vitro*.

2. METODOLOGIA

2.1.Compostos: Cinco sais de isotiourônio foram sintetizados pelo Laboratório de Metodologia e Síntese Orgânica (MESOLab) da Universidade Federal de Santa Catarina (CISILOTTO *et al.*, 2015; FERREIRA *et al.*, 2017; MUNARETTO *et al.*, 2020). Os compostos testados foram nomeados como: bromidrato de (Z)-2-[(N-aminoisotioureido)metil]-3-fenil-2-propenoato de metila (**16**); bromidrato de (4E,8Z)-5-amino-3,4-diaza-9-fenil-2-metil-8-metoxycarbonil-6-tia-2,4,8-trieno (**18**); bromidrato de (4E,8Z)-5-amino-3,4-diaza-2-metil-8-metoxycarbonil-9-(4-metoxifenil)-6-tianona-2,4,8-trieno (**19**); bromidrato de (4E,8Z)-5-amino-3,4-diaza-2-metil-8-metoxycarbonil-9-(4-nitrofenil)-6-tianona-2,4,8-trieno (**20**) e (4E,8Z)-5-amino-3,4-diaza-2-metil-8-metoxycarbonil-9-(4-nitrofenil)-6-tianona-2,4,8-trieno (**21**).

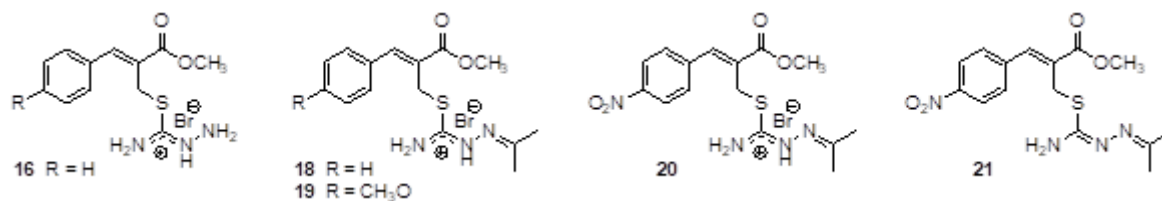


Figura 1. Estruturas químicas dos sais de isotiourônio

2.2. Atividade scavenger de radicais - 2,2'-azinobis 3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico (ABTS) e 2,2'-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH): A atividade antioxidante dos compostos foi testada usando os radicais ABTS e DPPH (RE *et al.*, 1999; SHARMA, 2009). As soluções de ABTS (7 mM) e DPPH (5,05 mM) foram preparadas e diluídas em tampão fosfato de potássio (10 mM, pH 7,0) e etanol, respectivamente. Diferentes concentrações dos compostos (1-100 µM) diluídas em DMSO foram incubadas por 30 minutos. As absorbâncias foram medidas a 734 nm (ABTS) e 517 nm (DPPH). Os resultados foram expressos como porcentagem do branco. Ácido ascórbico (25 µM) foi utilizado como controle positivo.

2.3. Atividade mimética à glutathione S-transferase (GST): Esta dosagem foi avaliada em tampão fosfato de sódio (0,1 M, pH 6,9) com concentrações variáveis dos compostos (1-100 µM). GSH (2 mM) foi adicionada, seguida por CDNB (HABIG, *et al.*, 1974). A leitura foi realizada cineticamente a 340 nm, e os resultados foram expressos como Δ absorbância/min. Difetil disseleneto (25 µM) foi usado como controle positivo.

2.4. Análise estatística: Os dados foram analisados no *software* GraphPad Prism (v. 8.0.2) utilizando ANOVA unidirecional, seguido pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls. Resultados com $p < 0,05$ foram considerados significativos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados referentes ao ensaio de captura do radical ABTS podem ser vistos na Figura 2.

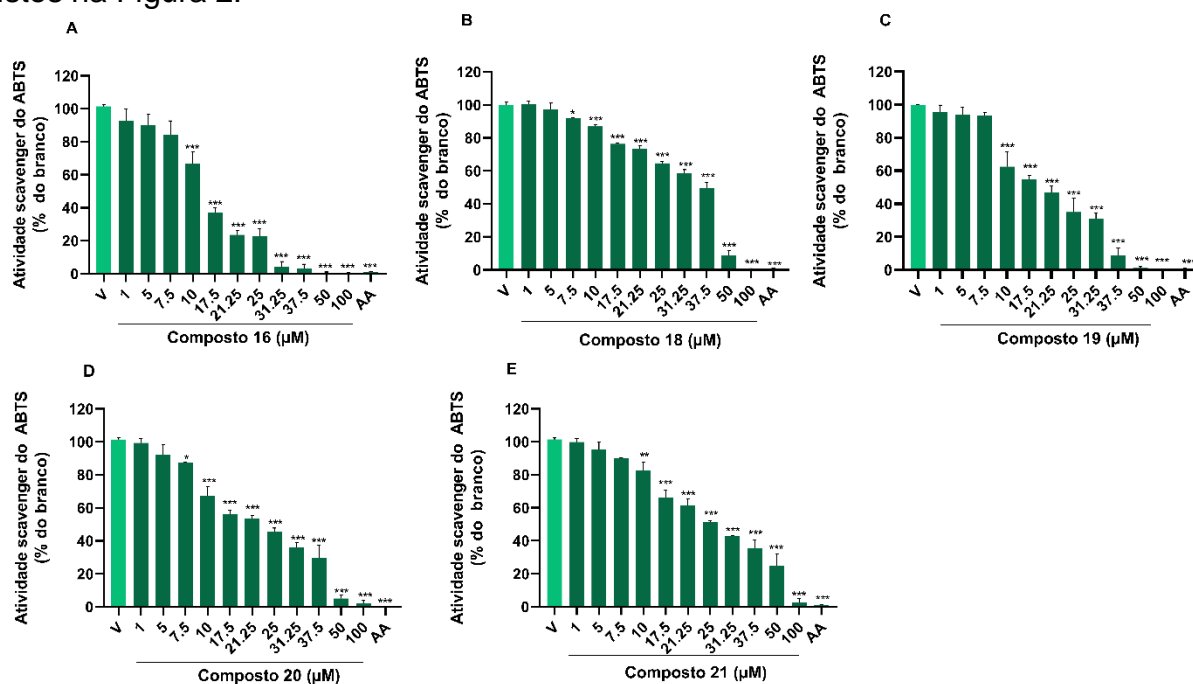


Figura 2. Avaliação da atividade *scavenger* do radical ABTS dos compostos **16,18-21** (A-E, respectivamente). Os valores são expressos como média \pm E.P.M. ANOVA de uma via/Newman-Keuls. Ácido ascórbico (AA) foi utilizado como controle positivo. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$ e *** $p < 0,001$ em comparação ao grupo veículo (V).

A ANOVA de uma via demonstrou que houve diferença entre os grupos experimentais: **16** [$F_{(12,26)}=79,82; p < 0,0001$], **18** [$F_{(12,26)}=322,1; p < 0,0001$], **19** [$F_{(12,26)}=78,91; p < 0,0001$], **20** [$F_{(12,26)}=102,1; p < 0,0001$] e **21** [$F_{(12,26)}=98,25; p < 0,0001$]. A análise *post hoc* de Newman-Keuls revelou que todos os compostos **16-21** (Figura 2A-E) foram capazes de neutralizar o radical ABTS, sendo que os compostos **18** e **20** (Fig. 2B e D) tiveram atividade *scavenger* a partir da concentração 7,5 μ M. Os demais compostos tiveram a mesma atividade a partir da concentração 10 μ M em relação ao grupo veículo. O ácido ascórbico, um controle positivo, teve resultado significativo ($p < 0,0001$) como já era esperado, validando o experimento. O mecanismo antioxidante por trás das técnicas de ABTS e DPPH envolvem a transferência de elétrons (ET) e hidrogênio (HAT) (RUMPF et al., 2023).

Os resultados referentes à atividade *scavenger* do radical DPPH, pode ser visualizado na Figura 3. A ANOVA revelou que houve resultado significativo entre os grupos: **16** [$F_{(7,16)}=144,2; p < 0,0001$], **18** [$F_{(7,16)}=62,37; p < 0,0001$], **19** [$F_{(7,16)}=52,26; p < 0,0001$], **20** [$F_{(7,16)}=83,33; p < 0,0001$] e **21** [$F_{(6,14)}=11,11; p < 0,0001$]. A análise de *post hoc* de Newman-Keuls revelou que os compostos **16-20** (Figura 3A-E) apresentaram atividade *scavenger* significativa em diferentes concentrações. O composto **16** (Figura 3A) mostrou capacidade em capturar o radical DPPH a partir da concentração de 10 μ M, o **18** (Figura 3B) a partir de 50 μ M e os compostos **19** e **20** (Figura 3C-D) a partir da concentração 25 μ M, quando comparados com o veículo. Já o composto **21** (Figura 3E) não exibiu atividade antioxidante via DPPH. Percebe-se que neste teste, a atividade antioxidante dos sais foi menos expressiva, o que poderia estar relacionado à questão de solubilidade, pois o DPPH é mais sensível a antioxidantes que solubilizam em solventes orgânicos, enquanto o ABTS pode ser utilizado em uma gama mais ampla de solventes, incluindo aquosos e orgânicos (RUMPF et al., 2023). O ácido ascórbico, um controle positivo, mostrou resultados significativos ($p < 0,0001$), validando os achados experimentais.

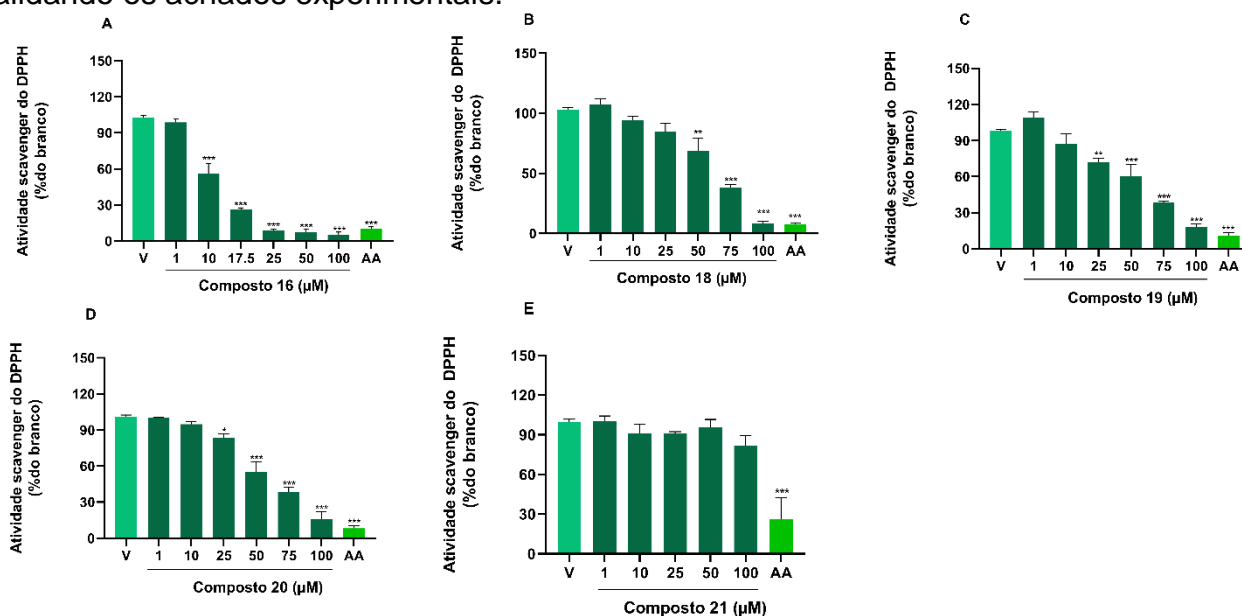


Figura 3. Avaliação da atividade *scavenger* do radical DPPH dos compostos **16,18-21** (Figura 3A-E, respectivamente). Os valores são expressos como média \pm E.P.M. ANOVA de uma via/Newman-Keuls. Ácido ascórbico (AA) foi utilizado como controle positivo. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$ e *** $p < 0,001$ em comparação ao grupo veículo (V).

Em relação ao ensaio de atividade mimética à GST (dados não mostrados). A ANOVA de uma via revelou que houve resultados significativos entre os grupos **16** [$F_{(7,16)}=5,812;p=0,0017$], **18** [$F_{(7,16)}=7,920;p=0,0003$], **19** [$F_{(7,16)}=11,68;p<0,0001$], **20** [$F_{(7,16)}=8,077;p=0,0003$] e **21** [$F_{(7,16)}=9,934;p<0,0001$]. A análise *post hoc* de Newman-Keuls revelou que os compostos **16,18-21** não tiveram atividade mimética ao GST, ou seja, os compostos não possuem a habilidade de conjugar GSH ao CDNB em nenhuma concentração.

4. CONCLUSÕES

Sugere-se que os sais de isotiourônio estudados exercem sua ação antioxidante por sequestro de radicais, envolvendo os mecanismos ET e/ou HAT, porém não através de ação mimética à GST. Além disso, embora todos os compostos apresentem-se como promissores antioxidantes, destaca-se os efeitos do composto **16**. Portanto, tais compostos podem ser úteis para a continuidade de pesquisas futuras relacionadas a doenças associadas ao estresse oxidativo.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CISILOTTO, J. et al. Isothiuronium salts reduce NRAS expression, induce apoptosis and decrease invasion of melanoma cells. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v.15, n.3, p.353-362, 2015.
- FERREIRA, M. et al. Allylic isothiuronium salts: The discovery of a novel class of thiourea analogues with antitumor activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.129, n.31, p.151-158, 2017.
- MUNARETTO, L. S. et al. Synthesis of isothiosemicarbazones of potential antitumoral activity through a multicomponent reaction involving allylic bromides, carbonyl compounds and thiosemicarbazide. **Tetrahedron**, v.76, p.131231, 2020.
- 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.
- RUMPF J, BURGER R, SCHULZE M. Statistical evaluation of DPPH, ABTS, FRAP, and Folin-Ciocalteu assays to assess the antioxidant capacity of lignins. **Int J Biol Macromol**. 2023.
- SÁNCHEZ, A.G. et al. The Role of Oxidative Stress in Physiopathology and Pharmacological Treatment with Pro- and Antioxidant Properties in Chronic Diseases. **Oxidative medicine and Cellular Longevity**, p.1-16, 2020.
- SILVA, L. E. Q. et al. A narrative review: antioxidant use in neurodegenerative diseases. **Brazilian Journal of Development**, v.8, n.2, p.10661-10669, 2022.
- SHARMA O.P., BHAT T. K. DPPH antioxidant assay revisited. **Food Chemistry** v.113 p. 1202-1205, 2009.
- YOSHIKAWA, T; YOU, F. Oxidative Stress and Bio-Regulation. **International journal of molecular sciences**, v.25, n.6, p.3360, 2024.