

## AVALIAÇÃO DE SAIS DE ISOTIOURÔNIO E 2-IMINOTIAZOLIDINA *IN VITRO*: UMA INVESTIGAÇÃO DE MECANISMOS ANTIOXIDANTES

PÂMELLA DA COSTA<sup>1</sup>; MARIANA PARRON PAIM<sup>2</sup>; GIOVANA DA SILVA RAMOS<sup>3</sup>; MARCUS MANDOLESÍ SÁ<sup>4</sup>; CRISTIANI FOLHARINI BORTOLATTO<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas - Laboratório de Bioquímica e Neurofarmacologia Molecular (LABIONEM) – pamelladacosta2002@gmail.com;

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas - Laboratório de Bioquímica e Neurofarmacologia Molecular (LABIONEM) – maa\_paim@hotmail.com;

<sup>3</sup>Universidade Federal de Santa Catarina –

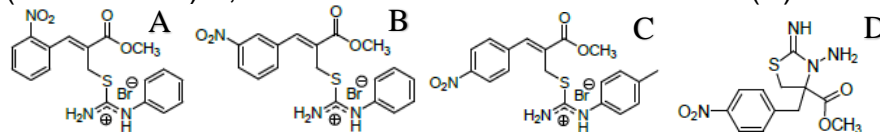
<sup>4</sup>Universidade Federal de Santa Catarina –marcus.sa@ufsc.br

<sup>5</sup>Universidade Federal de Pelotas - Laboratório de Bioquímica e Neurofarmacologia Molecular (LABIONEM) – cbortolatto@gmail.com.

### 1. INTRODUÇÃO

O estresse oxidativo (EO) ocorre quando há produção excessiva de espécies reativas (ER) ou falha na neutralização dessas espécies pelo sistema antioxidante, levando a um desequilíbrio redox e à formação de mediadores pró-inflamatórios. Esse descompasso pode causar danos celulares e teciduais, especialmente no cérebro (AZEVEDO *et al.*, 2023). Assim, a busca por compostos antioxidantes é uma estratégia promissora para prevenir e tratar distúrbios relacionados ao EO. Os sais de isotiourônio são conhecidos por suas atividades antibacterianas, antifúngicas e anti-inflamatórias (SRIHARI *et al.*, 2009), enquanto as 2-iminotiazolidinas oferecem propriedades antioxidantes além das suas atividades antibacterianas e anti-inflamatórias (CONGIU *et al.*, 2008), o que as torna candidatas promissoras no combate ao EO e no desenvolvimento de novos agentes terapêuticos.

Visando isso, este trabalho avaliou a capacidade antioxidante *in vitro* dos compostos bromidrato de (Z)-2-[N-(fenilisotioureido)metil]-3-(2-nitrofenil)-2-propenoato de metila (A), bromidrato de (Z)-2-[N-(fenilisotioureido)metil]-3-(3-nitrofenil)-2-propenoato de metila (B), bromidrato de (Z)-2-[[N-(4-metilfenil)isotioureido]metil]-3-(4-nitrofenil)-2-propenoato de metila (C) e 3-amino-2-imino-4-(4-nitrobenzil)-1,3-tiazolidino-4-carboxilato de metila (D).



**Figura 1.** Estrutura química dos compostos A, B, C e D, respectivamente.

### 2. METODOLOGIA

**2.1. Compostos e animais** Os compostos A, B, C (FERREIRA *et al.*, 2017) e D (FERREIRA *et al.*, 2022) foram sintetizados pelo Laboratório de Metodologia e Síntese Orgânica (MESOLab) da UFSC e dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO). Os compostos foram testados em concentrações que variaram entre 1 µM até 100, 200 ou 500 µM (limite de solubilidade dentro da faixa programada). O tecido biológico utilizado foi o cérebro total de ratos Wistar do Biotério Central da Universidade Federal de Pelotas. Todos os procedimentos foram realizados conforme as diretrizes da Comissão de Ética no Uso de Animais (nº 23110.042314/2023-32, CEUA/UFPEL), com eutanásia por overdose de isoflurano para a remoção do cérebro.

**2.2. Ensaio de lipoperoxidação por níveis de TBARS:** Este ensaio é usado para analisar e quantificar a lipoperoxidação originada pelo excesso de ER nos tecidos. O malondialdeído (MDA), um subproduto da lipoperoxidação, é um indicador chave que reage com o ácido tiobarbitúrico (TBA), resultando numa coloração detectável por espectrofotometria (OHKAWA; OHISHI; YAGI, 1979).

**2.3. Ensaio de captura do radical ABTS:** O procedimento experimental usa uma abordagem colorimétrica para medir a capacidade de um composto em neutralizar o radical livre sintético ABTS, observando a mudança na cor da solução de verde escuro para verde claro e a diminuição da absorbância a 734 nm (RE, R. *et al.*, 1999).

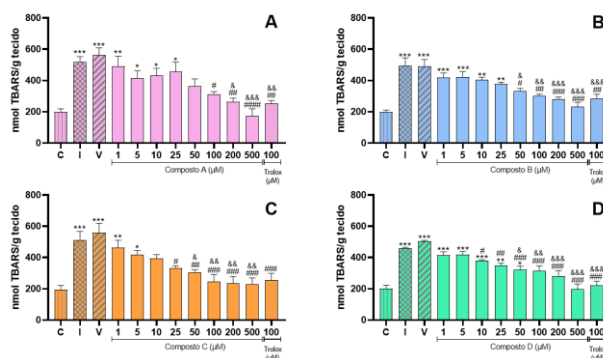
**2.4. Ensaio de poder antioxidante redutor férrico (FRAP):** É um método colorimétrico simples e econômico que avalia o potencial redutor de antioxidantes por transferência de elétron (SET). Ele quantifica a redução do complexo férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ -TPTZ) para ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ), produzindo uma coloração azul intensa com absorção máxima a 593 nm, em que o aumento da absorbância reflete o poder redutor do composto testado (YOSHINO; MURAKAMI, 1998).

**Análise Estatística:** Os dados foram estatisticamente avaliados por meio do programa GraphPad Prism, versão 8.0.2, utilizando a técnica de ANOVA de uma via em seguida foi realizado o teste *post hoc* de Tukey para comparação entre os grupos. Os resultados estão expressos em média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M) e valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significantes.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados do teste TBARS, mostrados na Figura 2, revelaram um impacto significativo dos compostos A, B, C e D ( $F_{(11,24)} = 9,394$ ;  $F_{(11,24)} = 11,89$ ;  $F_{(11,24)} = 9,396$ ;  $F_{(11,24)} = 18,63$ ;  $p < 0,001$ ). O ferro causou peroxidação lipídica, sem influência significativa do veículo DMSO. O composto A reduziu a peroxidação de 100 a 500  $\mu\text{M}$ , o B de 50 a 500  $\mu\text{M}$ , o C de 25 a 500  $\mu\text{M}$  e o D de 10 a 500  $\mu\text{M}$ . O Trolox, controle positivo, mostrou atividade antioxidante em todos os ensaios.

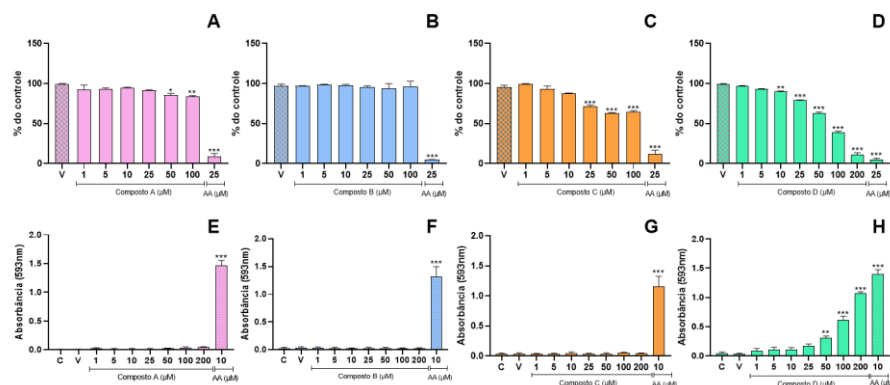
Os sais de isotiourônio, sintetizados a partir da tioureia ou seus derivados que apresentam conhecida atividade antioxidante, foram capazes de reduzir os níveis cerebrais de peroxidação lipídica (YANG *et al.*, 2022). Além disso, a 2-imidazolidina, com estrutura similar à tiazolidina, mostrou resultados promissores na neutralização de radicais livres (MANHIANI *et al.*, 2023), confirmando a eficácia do composto D em nossos experimentos.



**Figura 2.** Perfil de proteção contra peroxidação lipídica dos compostos A, B, C e D. Os resultados, representados como média  $\pm$  EPM ( $n = 3$ ). ANOVA de uma via seguida de teste *post hoc* de Tukey. \*\* $p \leq 0,05$ , \*\*\* $p \leq 0,001$  vs. Controle (C); # $p \leq 0,05$ , ## $p \leq 0,01$  e ### $p \leq 0,001$  vs. Veículo (V); & $p \leq 0,05$ , && $p \leq 0,01$  e &&& $p \leq 0,001$  vs. Induzido (I).

O teste de variância ANOVA revelou que os compostos A, B, C e D tiveram impactos significativos na captura do radical ABTS ( $p < 0,001$ ), conforme mostrado na Figura 3A-D ( $F_{(7, 16)} = 126,4$ ;  $F_{(7, 16)} = 89,91$ ;  $F_{(7, 16)} = 133,5$ ;  $F_{(8, 18)} = 776,6$ ). O composto A teve uma discreta atividade nas concentrações de 50 e 100  $\mu\text{M}$ , o B não mostrou atividade significativa, o C foi ativo a partir da concentração de 25  $\mu\text{M}$ , e o D se destacou, apresentando efeitos significativos a partir da concentração de 10  $\mu\text{M}$ . O ácido ascórbico (25  $\mu\text{M}$ , um controle positivo) confirmou a atividade esperada de sequestro de radicais ABTS.

Embora os compostos testados sejam estruturalmente relacionados, cabe mencionar que, dentre os que apresentaram uma modesta (A e C) ou nenhuma (B) atividade antioxidante neste teste, estão as moléculas contendo grupos nitro ( $\text{NO}_2$ ) e éster ( $\text{COOCH}_3$ ), com baixo potencial de doação de elétrons e hidrogênios, sendo que o composto C, o melhor dentre estes três citados, possui um grupo metila adicional ligado a um dos anéis aromáticos. O melhor perfil antioxidante foi atribuído ao composto D e pode estar relacionado à sua estrutura de imidazol condensado com amina primária, o que poderia facilitar a interação com alvos biológicos (SHEHAB *et al.*, 2022).



**Figura 3.** Efeitos dos compostos A, B, C e D no ensaio de ABTS (Fig. 3A-D) e FRAP (Fig. 3E-H) *in vitro*. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  EPM (n = 3). ANOVA de uma via/ Teste *post hoc* de Tukey. \* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,01$  e \*\*\* $p \leq 0,001$  comparado ao veículo (V). AA refere-se a ácido ascórbico (controle positivo).

A Figura 3E-H mostra os resultados do ensaio FRAP. A ANOVA indicou efeitos significativos no teste ( $F_{(9, 20)} = 229,3$ ;  $F_{(9, 20)} = 46,99$ ;  $F_{(9, 20)} = 39,33$ ;  $F_{(9, 20)} = 139,9$ ;  $p < 0,001$ ), e o teste de Tukey revelou que, com exceção do composto D, os demais compostos não apresentaram resultados positivos. O composto D demonstrou atividade a partir da concentração de 50  $\mu\text{M}$ , enquanto o ácido ascórbico, utilizado como controle positivo, reduziu os íons  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$ , conforme esperado.

Portanto, nossos resultados destacam o potencial antioxidante por transferência de elétrons do composto D, o que corrobora com estudos que mostram que tanto os derivados de tiazolidina e 2-imidazolidina (PÂNZARIU *et al.*, 2016) quanto os derivados de imidazol apresentam bom desempenho antioxidante. Apesar do grupo isotiocianato ( $\text{NHCS}$ ) ser crucial para as propriedades antioxidantes de compostos isotiourônicos, substituir um hidrogênio por um grupo arila pode reduzir essa eficácia (SAOUD *et al.*, 2017), o que ocorreu com os compostos isotiourônicos A, B e C.

#### 4. CONCLUSÕES

Esse estudo demonstrou a eficácia antioxidante dos compostos testados, com destaque para o composto D, o qual demonstrou expressivo potencial de

redução, atuando na neutralização de radicais livres e na proteção contra a peroxidação lipídica em cérebro de roedores. Estes achados revelam a sua potencialidade voltada a tratamentos para condições relacionadas ao estresse oxidativo, tais como as doenças psiquiátricas e neurodegenerativas.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AZEVEDO, A. *et al.* Green Approach for the Synthesis of Chalcogenyl- 2,3-dihydrobenzofuran Derivatives Through Allyl-phenols/ Naphthols and Their Potential as MAO-B Inhibitors. **Chemistry – An Asian Journal**, v. 18, n. 24, p. 1-10, 2023. Wiley.
- CONGIU, C. *et al.* Design, synthesis, and in vitro antitumor activity of new 1,4-diarylimidazole-2-ones and their 2-thione analogues. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, [S.L.], v. 18, n. 3, p. 989-993, fev. 2008. Elsevier BV.
- FERREIRA, M. *et al.* Allylic isothiuronium salts: the discovery of a novel class of thiourea analogues with antitumor activity. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 129, p. 151-158, mar. 2017. Elsevier BV.
- FERREIRA, M. *et al.* Diversity-Oriented Synthesis of 2-Iminothiazolidines: pushing the boundaries of the domino nucleophilic displacement/intramolecular anti :michael addition process. **European Journal Of Organic Chemistry**, [S.L.], v. 2022, n. 15, p. 1-10, 20 abr. 2022.
- MANHIANI, P. *et al.* Comparative Study of Antioxidant Activity between Carnosine and Its Amino Acid Constituents. **Journal Of Food Research**, [S.L.], v. 12, n. 3, p. 69, 14 jul. 2023. Canadian Center of Science and Education.
- OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K.. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, [S.L.], v. 95, n. 2, p. 351-358, jun. 1979. Elsevier BV.
- PÂNZARIU, A. *et al.* Synthesis and biological evaluation of new 1,3-thiazolidine-4-one derivatives of nitro-L-arginine methyl ester. **Chemistry Central Journal**, [S.L.], v. 10, n. 1, p. 1-14, 4 fev. 2016. Springer Science and Business Media LLC.
- RE, R. *et al.* Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology And Medicine**, [S.L.], v. 26, n. 9-10, p. 1231-1237, maio 1999. Elsevier BV.
- SAOUD, S. *et al.* Relationship Between the structure of Newly Synthesized derivatives of 1,3,4-oxadiazole Containing 2-Methylphenol and their Antioxidant and Antibacterial Activities. **Oriental Journal Of Chemistry**, [S.L.], v. 33, n. 04, p. 1781-1798, 25 ago. 2017. Oriental Scientific Publishing Company.
- SHEHAB, W. *et al.* Design, Synthesis, Molecular Docking, and Evaluation Antioxidant and Antimicrobial Activities for Novel 3-Phenylimidazolidin-4-One and 2-Aminothiazol-4-One Derivatives. **Molecules**, [S.L.], v. 27, n. 3, p. 767, 25 jan. 2022. MDPI AG.
- SRIHARI, P. *et al.* Solvent free synthesis of 1,5-disubstituted tetrazoles derived from Baylis Hillman acetates as potential TNF- $\alpha$  inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, [S.L.], v. 19, n. 19, p. 5569-5572, out. 2009. Elsevier BV.
- YANG, W. *et al.* An overview on the synthetic urease inhibitors with structure-activity relationship and molecular docking. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 234, p. 114273, abr. 2022. Elsevier BV.
- YOSHINO, M.; MURAKAMI, K.. Interaction of Iron with Polyphenolic Compounds: application to antioxidant characterization. **Analytical Biochemistry**, [S.L.], v. 257, n. 1, p. 40-44, mar. 1998. Elsevier BV.