

## SAIS DE ISOTIOURÔNIO: POTENCIAL DE REDUÇÃO DE ÍONS FÉRRICOS E PROTEÇÃO CONTRA A LIPOPEROXIDAÇÃO CEREBRAL IN VITRO

BRUNA RAFAELA PIZZI<sup>1</sup>; TAÍS DA SILVA TEIXEIRA RECH<sup>2</sup>; NATALIA GONÇALVES TAVARES<sup>3</sup>; GABRIELA MACIEL DIOGO<sup>4</sup>; MARCUS MANDOLESI SÁ<sup>5</sup>; CRISTIANI FOLHARINI BORTOLATTO<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – bruna\_pizzi@hotmail.com

<sup>2</sup> Universidade Federal de Pelotas – taisteixeira.r@gmail.com

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – natalia10.g.tavares@gmail.com

<sup>4</sup>Universidade Federal de Santa Catarina – gabriela.diogo1@gmail.com

<sup>5</sup>Universidade Federal de Santa Catarina – marcus.sa@ufsc.br

<sup>6</sup>Universidade Federal de Pelotas – cbortolatto@gmail.com

### 1. INTRODUÇÃO

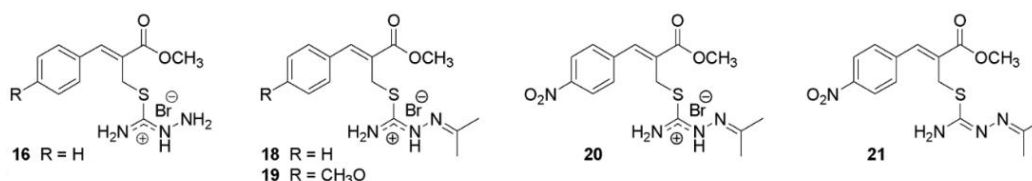
Os radicais livres (RL) são átomos ou moléculas, que por possuírem elétrons desemparelhados, são altamente reativos, e necessitam estabelecer ligações químicas para adquirir estabilidade (BETTERIDGE, 2000). Dentre eles, encontramos as espécies reativas de oxigênio (ERO) ou de nitrogênio (ERN) que são capazes de ocasionar danos aos tecidos caso estejam presentes em altas concentrações em nosso organismo, desencadeando o estresse oxidativo, o qual está atrelado a inúmeras doenças, como é o caso das doenças cardiovasculares, pulmonares e neurodegenerativas (LIGUORI et al, 2018).

Os RL são formados a partir de processos bioquímicos que ocorrem no próprio organismo, como, por exemplo, a respiração celular, ou podem ser gerados em resposta a processos externos, como a radiação eletromagnética e poluentes. Por possuir um sistema antioxidante, o organismo é capaz de equilibrar essas espécies altamente reativas. Entretanto, uma alta exposição aos RL acarreta uma sobrecarga a esse sistema, o que deixa as biomoléculas (lipídios, proteínas e DNA) suscetíveis ao estresse oxidativo (BETTERIDGE, 2000), gerando a sua oxidação e, eventualmente, a perda de sua função.

Sais de isotiourônio têm sido estudados em relação as suas atividades biológicas, incluindo atividade antitumoral (CISILOTTO et al., 2015; FERREIRA et al., 2017; MUNARETTO et al., 2020). Neste trabalho, o objetivo foi ampliar os experimentos que estão sendo realizados em nosso laboratório sobre a antioxidante *in vitro* de uma série de sais de isotiourônio, investigando se estes sais são capazes de proteger contra a lipoperoxidação em tecido cerebral de ratos bem como se possuem a habilidade de reduzir íons férricos.

### 2. METODOLOGIA

Os compostos de sais de isotiourônio (**16**, **18-21**) (Fig. 1) foram sintetizados e disponibilizados pelo Laboratório de Metodologia e Síntese Orgânica (MESOLab) da Universidade Federal de Santa Catarina, os quais foram solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO). Três experimentos independentes (n=3) foram conduzidos em dias diferentes para cada ensaio experimental e realizados em duplicata. Cérebro de ratos Wistar obtidos do Biotério Central da UFPel foram utilizados para um dos experimentos (CEUA 042314/2023-32).



**Figura 1.** Estruturas químicas dos compostos de sais de isotiourônio. Bromoidrato 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**).

O ensaio para investigar a capacidade protetora dos sais contra os danos oxidativos aos lipídios cerebrais foi realizado através da técnica de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), que seguiu a metodologia descrita por Ohkawa (OHKAWA et al, 1979). Os cérebros foram homogeneizados em Tris/HCl 50 mM (pH = 7,4) em uma proporção de 1:10 (p/v), e centrifugados para a obtenção do sobrenadante. A lipoperoxidação foi induzida por sulfato ferroso ( $\text{FeSO}_4$ ) e ácido etilenodiamino tetracético (EDTA), e as concentrações testadas para os compostos de sais de isotiourônio foram de 1-200  $\mu\text{M}$ , além de ser utilizado o Trolox (200  $\mu\text{M}$ ) como controle positivo, para fins comparativos. Após a incubação a 37 °C, foram adicionados ácido tiobarbitúrico (TBA, 0,8%), dodecil sulfato de sódio (SDS, 8,1%), e tampão de ácido acético (pH = 3,4), seguido por uma incubação a 95 °C por uma hora. Após resfriamento, as amostras foram analisadas por espectrofotômetro a 532 nm, com os resultados expressos em TBARS/g de tecido.

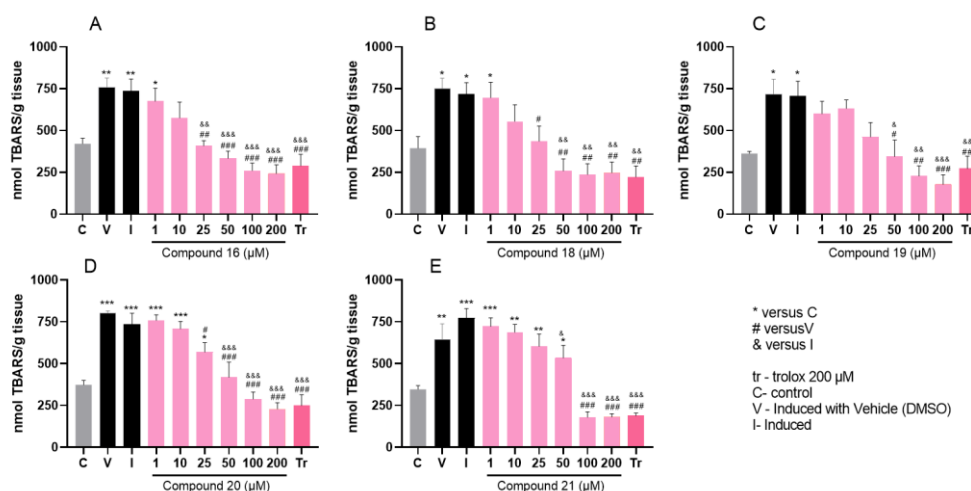
O poder antioxidante de redução do íon férrico (FRAP) consiste em verificar a capacidade dos compostos de reduzir o íon férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ) em íon ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ) na presença de 2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina (TPTZ) (YOSHINO, et al, 1998). Para preparar a solução FRAP foram utilizados 38 mM de acetato de sódio em água destilada, 20 mM de cloreto de ferro ( $\text{FeCl}_3$ ) em água destilada e 10 mM de TPTZ em 40 mM de ácido clorídrico (HCl). Para o FRAP, as concentrações dos compostos testadas foram de 1-50  $\mu\text{M}$ , e como controle positivo utilizou-se o ácido ascórbico na concentração de 25  $\mu\text{M}$ , os quais foram incubados a 37 °C, no escuro, por 40 minutos. As leituras foram realizadas no espectrofotômetro a 593 nm, e os resultados expressos pela absorbância.

As análises estatísticas dos resultados foram obtidas através do *software* GraphPad Prism 8.2.0, em que foram realizadas a análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste post hoc de Newman-Keuls para verificar as diferenças entre os grupos. Os resultados foram expressos em média  $\pm$  erro padrão da média (EPM), considerando um  $p < 0,05$  estatisticamente significativo.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

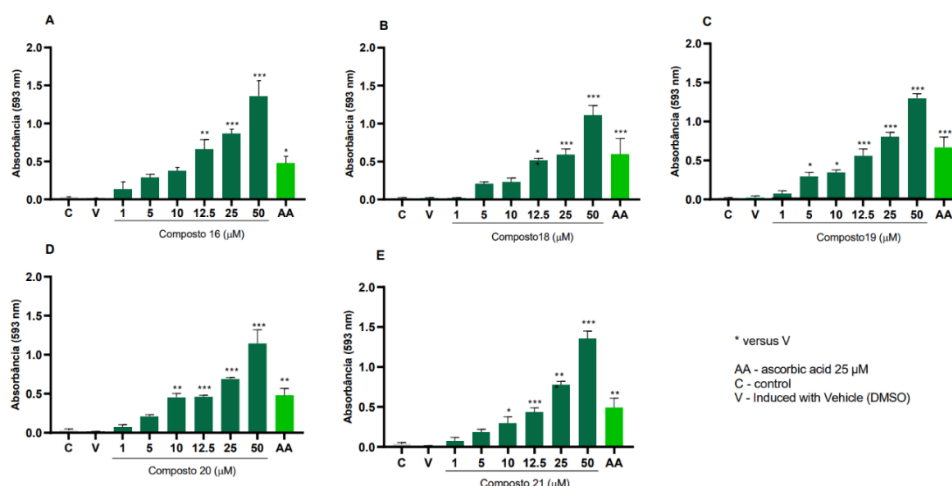
Os resultados das análises para a técnica TBARS estão na Figura 2A-E. Através de dados estatísticos (ANOVA), verificou-se uma variação entre os grupos experimentais **16** [ $F_{(9,30)}=10,96$ ;  $p < 0,0001$ ], **18** [ $F_{(9,30)}=7,891$ ;  $p < 0,0001$ ], **19** [ $F_{(9,30)}=7,648$ ;  $p < 0,0001$ ], **20** [ $F_{(9,30)}=19,04$ ;  $p < 0,0001$ ] e **21** [ $F_{(9,30)}=19,00$ ;  $p < 0,0001$ ]. O teste post hoc de Newman-Keuls revelou aumento da lipoperoxidação no grupo induzido (Fe/EDTA) em relação ao controle, e este aumento não foi influenciado

pelo veículo (DMSO). Já com relação aos grupos que continham os sais, é possível verificar que o composto **16** surtiu efeito antioxidante a partir da concentração de 25  $\mu$ M, e os compostos **18**, **19**, **20** e **21** obtiveram esse efeito inibitório da peroxidação lipídica a partir da concentração de 50  $\mu$ M, todos eles comparados com o induzido. Neste sentido, nossos achados revelam o potencial protetor destes sais contra danos oxidativos aos lipídios cerebrais (COBLEY et al. 2018), assim como o Trolox, um análogo solúvel da vitamina, que também demonstrou atividade antioxidante significativa (Fig. 2).



**Figura 2.** Ação protetora dos compostos **16**, **18-21** contra a lipoperoxidação lipídica induzida por Fe/EDTA in vitro em tecidos cerebrais de ratos. Os dados são expressos como média  $\pm$  EPM. ANOVA de uma via seguida por teste post hoc de Newman-Keuls em que \* indica o  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ , em comparação ao grupo controle. # indica o  $p < 0,05$ ; ##  $p < 0,01$ ; ###  $p < 0,001$ , em comparação ao veículo. & indica o  $p < 0,05$ ; &&  $p < 0,01$ ; &&&  $p < 0,001$ , em comparação ao induzido.

Os resultados das análises para a técnica do FRAP estão na Figura 3A-E. Através da ANOVA, verificou-se uma diferença entre os grupos experimentais **16** [ $F_{(8,15)}=19,33$ ;  $p < 0,0001$ ]; **18** [ $F_{(8,15)}=25,70$ ;  $p < 0,0001$ ]; **19** [ $F_{(8,18)}=44,38$ ;  $p < 0,0001$ ]; **20** [ $F_{(8,16)}=29,92$ ;  $p < 0,0001$ ] e **21** [ $F_{(8,17)}=58,59$ ;  $p < 0,0001$ ]. Todos os compostos foram capazes de reduzir o íon férrico em íon ferroso, indicando que apresentam grande potencial para doar elétrons, se comparados com o grupo veículo, assim como o ácido ascórbico, o qual já apresenta efeitos comprovados. Os compostos **16** e **18** apresentaram efeito redutor a partir da concentração de 12,5  $\mu$ M, enquanto os compostos **20** e **21** a partir da concentração de 10  $\mu$ M, e o composto **19** em uma concentração inferior de 5  $\mu$ M. Portanto, o potencial em doar elétrons é um dos mecanismos que pode explicar a ação antioxidante destes compostos, e embora esta técnica não empregue tecido biológico, um valor de absorbância positivo e alto na técnica sugere que o composto tem uma boa capacidade de atuar como antioxidante.



**Figura 3.** Análise do potencial redutor do íon férrico dos compostos **16, 18-21** *in vitro*. Os dados são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). ANOVA de uma via seguida por teste post hoc de Newman-Keuls em que \* indica o  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  em comparação ao grupo veículo (V).

#### 4. CONCLUSÕES

Os dados expostos no presente trabalho *in vitro* indicam que os compostos **16, 18, 19, 20 e 21** de sais de isotiourônio apresentam um grande potencial para atuarem como agentes antioxidantes, pois são capazes de promoverem a doação de elétrons e reduzirem o dano oxidativo em tecido cerebral. Portanto, são moléculas promissoras para futuros estudos envolvendo o estresse oxidativo, o qual está atrelado ao desenvolvimento de diversas patologias.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BETTERIDGE, J. What is oxidative stress? **Metabolism Clinical and Experimental**, v. 49, n.2, p. 3-8, 2000.
- 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.
- COBLEY JN, FIORELLO ML, BAILEY DM. 13 reasons why the brain is susceptible to oxidative stress. **Redox Biology**, v.15, p. 490-503, 2018.
- 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.
- LIGUORI, I. et al. Oxidative stress, aging, and diseases. **Clinical Interventions in Aging**, v. 13, p. 757-772, 2018.
- 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.
- OHKAWA, H., et al. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 95. ed.2, p. 351-358, 1979.
- YOSHINO, M.; et al. Interaction of iron with polyphenolic compounds: application to antioxidant characterization. **Analytical Biochemistry**, v.257. ed. 1, p. 40-44, 1998.