

AValiação DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE *IN VITRO* DO COMPOSTO 2-(3,5-DI-TERT-BUTIL-4-HIDROXIFENIL)-3-(PROP-2-IN-1-IL)TIAZOLIDIN-4-ONA (4K)

ANDRIÉLI SIEMIONKO LACERDA¹; MARIANA PARRON PAIM²; MELINDA GOMES
VICTOR³; JOSÉ COAN CAMPOS JÚNIOR⁴; WILSON JOÃO CUNICO FILHO⁵;
CRISTIANI FOLHARINI BORTOLATTO⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – andrielislacerda@hotmail.com;

²Universidade Federal de Pelotas - maa_paim@hotmail.com;

³Universidade Federal de Pelotas – melindagv@gmail.com;

⁴Universidade Federal de Pelotas – coanjunior@hotmail.com;

⁵Universidade Federal de Pelotas - wilson.cunico@ufpel.edu.br;

⁶Universidade Federal de Pelotas - cbortolato@gmail.com.

1. INTRODUÇÃO

O desequilíbrio entre espécies reativas (ER) e defesas antioxidantes, a favor das ER, causa estresse oxidativo e, conseqüentemente, danos em componentes celulares, como lípidios e proteínas. Esses danos celulares estão associados a causa de transtornos psiquiátricos, metabólicos e doenças neurodegenerativas. Dessa forma, o estudo de novos compostos que apresentem propriedades antioxidantes tem grande relevância para o tratamento e prevenção dessas condições patológicas (RIBAUDO, *et al.*, 2020).

Nesse sentido, estudos estão sendo realizados com compostos sintéticos derivados de tiazolidin-4-onas (TZD). Os compostos derivados dessa classe são heterocíclicos, sintetizados de maneira simples e de acordo com a literatura são moléculas promissoras, muitas delas possuindo atividade antioxidante, além de anticancerígena, antimicrobiana, antiviral, anti-inflamatória e anticonvulsivante (DINCEL, *et al.*, 2020; MECH; KUROWSKA; TROTSKO, 2021).

Sabendo da relação entre estresse oxidativo e diferentes doenças e do potencial biológico de compostos TZD já descritos na literatura, torna-se interessante e promissora a análise de compostos derivados dessa classe. Além disso, os ensaios *in vitro* são amplamente utilizados, possibilitando resultados rápidos e um direcionamento para compostos que possam ser efetivos em testes *in vivo*, afetando diretamente na menor quantidade de animais empregados na pesquisa. Portanto, o presente trabalho teve como objetivo investigar o potencial antioxidante do composto derivado da classe das TZD, denominado 2-(3,5-di-tert-butil-4-hidroxifenil)-3-(prop-2-in-1-il)tiazolidin-4-ona (4k) (Figura 1A), através de ensaios *in vitro*.

2. METODOLOGIA

2.1. Compostos e material biológico: o composto 4k foi sintetizado no Laboratório de Química Aplicada à Bioativos (LaQuiABio) da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL). O mesmo foi solubilizado em dimetilsulfóxido (DMSO) e as concentrações utilizadas nas análises foram de 1 a 200 µM. O material biológico para as análises foi preparado com cérebro total de camundongos Swiss oriundos do projeto de número 035494/2022-15 aprovado pela CEUA/UFPEL e tampão Tris/HCL 10 mM (pH 7,4). Para ensaio de ER foi utilizado o sobrenadante (S₁). Para o ensaio de carbonilação de proteínas, foi utilizado homogenato, o qual foi diluído em Tris/HCL 10 mM (pH 7,4) na proporção 1:10 (peso/volume).

2.2. Espécies Reativas: determina a capacidade redutiva do composto perante às ER através o método de fluorescência com o reagente diacetato de

diclorodihidrofluoresceína (DCFH-DA) (HEMPEL, *et al.*, 1999). Em tubos contendo Tris/HCL 10 mM, adicionou-se diferentes concentrações do composto 4k (10-200 μ M) e S₁ de cérebro. O 2,6-di-terc-butil-4-metilfenol (BHT) na concentração de 100 μ M foi utilizado como controle positivo. Posteriormente, todos os tubos receberam o reagente DCFH-DA e foram incubados à temperatura ambiente, protegidos contra a luz, por 30 min. A leitura fluorimétrica do produto DCF fluorescente foi realizada com parâmetros ajustados de extinção 488 nm, emissão 520 nm e os resultados foram expressos como unidades arbitrárias de fluorescência.

2.3. Carbonilação de proteínas: determina a adição de grupos carbonila em proteínas, que são biomarcadores indicativos de modificações oxidativas nessas biomoléculas (LEVINE, *et al.*, 1990). Em distintos tubos foram adicionados água, homogenato de cérebro e composto 4k em diferentes concentrações (1-50 μ M) ou seu veículo (DMSO). Com exceção do grupo controle, os tubos então receberam o indutor nitroprussiato de sódio (NPS) e foram incubados por 2 horas a 37 °C. BHT 100 μ M foi utilizado como controle positivo. O reagente para coloração dinitrofenilhidrazina (DNPH) ou HCl (tubos branco) foram adicionados e os tubos foram novamente incubados por 1 hora a temperatura ambiente. Em seguida, foi acrescentado tampão de desnaturação, etanol e hexano e os tubos foram levados para uma centrifugação, sendo observada a formação de um *pellet*, que foi lavado com uma solução de acetato de etila:etanol (1:1) e acrescentado tampão de desnaturação para solubilização. O DNPH em meio ácido reage com carbonilas para formar hidrazonas, lidas espectrofotometricamente em 370 nm. Os resultados foram expressos em nmol de carbonila/mg de proteína. A dosagem de proteína do tecido foi realizada pelo método de BRADFORD (1976).

2.4. Atividade mimética à glutatona S-transferase (GST): avalia a ação mimética de compostos à enzima GST (HABIG, *et al.*, 1974). Os receberam tampão fosfato de sódio (TFNa) 0.1M pH 6,9, água, e o composto 4k (10-200 μ M) ou seu veículo. O disseleneto de difenila (PhSe)₂ 25 μ M foi utilizado como controle positivo. Todos os grupos receberam GSH e foram incubados a 25 °C por 3 min, posteriormente receberam 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB). A leitura cinética foi realizada em espectrofotômetro a 340 nm por 3 min e os resultados foram expressos como Δ absorvância/min.

2.5. Análise Estatística: a análise estatística foi realizada pelo *software* GraphPad Prism 8.0.2 e para a comparação múltipla entre os grupos foi utilizada a análise de variância ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Tukey. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M) e valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados quanto ao ensaio de ER são demonstrados na Figura 1C. A ANOVA demonstrou que houve diferença estatística entre os grupos ($F_{(6, 21)} = 9,353$ e $p < 0,0001$). Além disso, o teste *post hoc* de Tukey revelou que as concentrações de 100 μ M ($p = 0,0020$) e 200 μ M ($p = 0,0003$) foram capazes de reduzir as espécies reativas *in vitro* quando comparamos ao grupo controle, evidenciando um efeito antioxidante. Esse efeito também foi observado para o BHT ($p = 0,0139$), utilizado como controle positivo, por ser um análogo do composto de interesse. O sistema nervoso central (SNC) está altamente exposto ao desequilíbrio das ER, devido a alta atividade metabólica e demanda de oxigênio. Sendo assim, a redução de ER é um importante resultado, indicando a atividade antioxidante do composto de interesse.

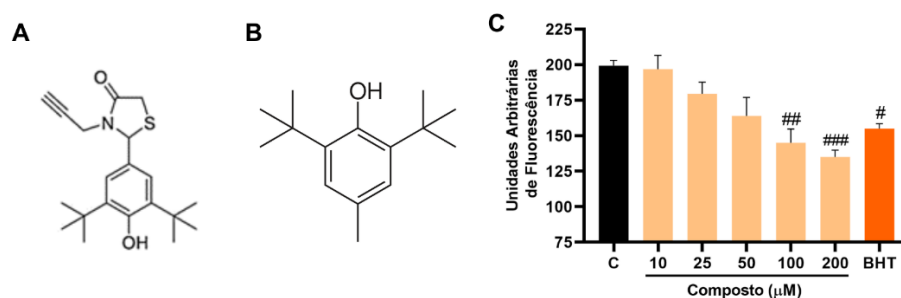


Figura 1. A. Estrutura química do composto 4k. B. Estrutura química do BHT. C. Efeito do composto 4k sobre os níveis de espécies reativas em cérebro de camundongos *in vitro*. Os resultados estão representados em média \pm EPM (n=4) e são expressos em unidades arbitrárias de fluorescência. Foram analisados por ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Tukey. #p<0,05, ##p<0,01 e ###p<0,001 comparado ao controle.

Os resultados do ensaio de carbonilação de proteínas são mostrados na Figura 2. A ANOVA de uma via demonstrou que houve diferença estatística entre os grupos ($F_{(7, 24)} = 14,09$ e $p < 0,0001$). Ademais, o teste *post hoc* de Tukey revelou um efeito significativo do composto 4k, inibindo a formação da carbonila, um biomarcador de dano oxidativo. O grupo NPS, quando comparado ao controle, foi capaz de induzir dano oxidativo em proteínas, evidenciado pela maior formação de proteína carbonila. Esse efeito foi atenuado pelas concentrações de 25 μM ($p = 0,0025$) e 50 μM ($p < 0,0001$), indicando um efeito protetor contra a carbonilação de proteínas. Por fim, o BHT ($p < 0,0001$), também demonstrou atenuação da formação de carbonilas, efeito esperado para o controle positivo, que é um análogo do composto de interesse. O BHT (Figura 1B) é um antioxidante sintético, amplamente utilizado e possui estrutura química semelhante ao 4k, sinalizando uma possível ação do composto de interesse por as mesmas vias antioxidantes.

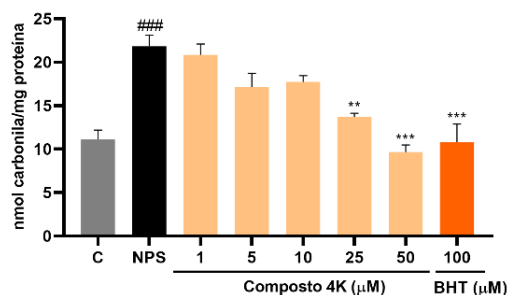


Figura 2. Efeito protetor do composto 4k frente à carbonilação de proteínas induzida pelo NPS em homogenato de cérebro de camundongos *in vitro*. Os resultados estão representados em média \pm EPM (n=4) e são expressos como nmol de carbonila/mg de proteína. Foram analisados por ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* Tukey. ###p<0,001 comparado ao controle. **p<0,01 e ***p<0,001 comparado ao NPS.

Os resultados quanto ao ensaio de atividade mimética à GST estão demonstrados na Figura 3. A GST é um antioxidante natural que promove a conjugação da GSH a metabólitos potencialmente perigosos, formando espécies menos reativas e facilmente excretadas (HABIG, *et al.*, 1974). A ANOVA de uma via revelou que houve um resultado significativo entre os grupos ($F_{(9, 20)} = 107,6$ e $P < 0,0001$). No entanto, o teste *post hoc* de Tukey demonstrou que o composto 4k em todas as concentrações testadas não foi capaz de conjugar GSH ao CDNB significativamente,

sendo, portanto, desprovido de atividade mimética à GST. Por fim, o (PhSe)₂, utilizado como controle positivo apresentou resultado significativo (p<0,0001), validando a análise realizada.

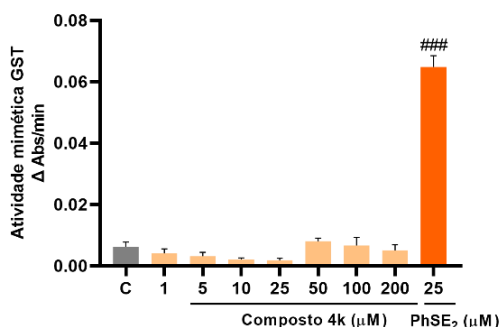


Figura 3. Ensaio de atividade mimética à enzima GST *in vitro*. Os resultados estão representados em média ± EPM (n=3) e são expressos como atividade mimética GST (Δ Abs/min). Foram analisados por ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* Tukey. ###p<0,001 comparado ao controle.

4. CONCLUSÕES

Diante do exposto, pode-se concluir que o composto 4k é capaz de reduzir os níveis de ER e atenuar o dano oxidativo às proteínas em tecido cerebral de camundongos *in vitro*. Além disso, este composto não atua como um mimético da enzima GST. Portanto, podemos afirmar que o composto 4k possui atividade antioxidante, sendo um bom candidato a ensaios futuros.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p. 248-254, 1976.
- DINCEL ED, GÜRISOY E, YILMAZ-OZDEN T, ULUSOY-GÜZELDEMIRCI N. Antioxidant activity of novel imidazo[2,1-b]thiazole derivatives: Design, synthesis, biological evaluation, molecular docking study and in silico ADME prediction. **Bioorganic Chemistry**, v. 103, p. 104220, 2020.
- HABIG, W.H., PABST, M.J., JAKOBY, W.B. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. **Journal of Biological Chemistry**. 249, 7130-9, 1974.
- HEMPEL SL, BUETTNER GR, O'MALLEY YQ, WESSELS DA, FLAHERTY DM. Dihydrofluorescein diacetate is superior for detecting intracellular oxidants: comparison with 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, 5(and 6)-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, and dihydrorhodamine 123. **Free Radical in Biology and Medicine**, v. 27, p. 146-159, 1999.
- LEVINE et al. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Methods Enzymology**, v.186, p. 464-478, 1990.
- MECH, D.; KUROWSKA, A.; TROTSKO, N. The Bioactivity of Thiazolidin-4-Ones: A Short Review of the Most Recent Studies. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 21, p. 11533, 2021.
- RIBAUDO, G.; BORTOLI, M.; PAVAN, C.; ZAGOTTO, G.; ORIAN, L. Antioxidant Potential of Psychotropic Drugs: From Clinical Evidence to In Vitro and In Vivo Assessment and toward a New Challenge for in Silico Molecular Design. **Antioxidantes**, v. 9, n. 714, 2020.