

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos

Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e

Bioprospecção



Dissertação

Síntese e Avaliação *in vitro* e *in silico* de Derivados da Tiazolidinona e Imidazolidinona como Inibidores da Monoamina Oxidase B

Cintia da Costa Vianna

Pelotas, 2025

Cintia da Costa Vianna

Síntese e Avaliação *in vitro* e *in silico* de Derivados da Tiazolidinona e Imidazolidinona como Inibidores da Monoamina Oxidase B

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, do Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Bioprospecção.

Orientador: Prof. Dr. Wilson João Cunico

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Francieli Moro Stefanello

Pelotas, 2025

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação da Publicação

V617s Vianna, Cintia da Costa

Síntese e avaliação *in vitro* e *in silico* de derivados da tiazolidinona e imidazolidinona como Inibidores da monoamina oxidase B
[recurso eletrônico] / Cintia da Costa Vianna ; Wilson João Cunico Filho, orientador ; Francieli Moro Stefanello, coorientadora. — Pelotas, 2025.
71 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, 2025.

1. MAO. 2. N-alquilação. 3. IMAO. 4. Docking molecular. 5. Knoevenagel. I. Cunico Filho, Wilson João, orient. II. Stefanello, Francieli Moro, coorient. III. Título.

CDD 547.594

Elaborada por Ubirajara Buddin Cruz CRB: 10/901

Cintia da Costa Vianna

Síntese e Avaliação *in vitro* e *in silico* de Derivados da Tiazolidinona e Imidazolidinona como Inibidores da Monoamina Oxidase B

Dissertação apresentada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Bioprospecção, Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas.

Data da defesa: 09/09/2025 às 14 horas.

Banca Examinadora:

Documento assinado digitalmente
 **WILSON JOAO CUNICO FILHO**
Data: 07/10/2025 16:39:45-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Wilson Cunico (Orientador) - Doutor em Química pela Universidade Federal de Santa Maria.

Documento assinado digitalmente
 **JANICE LUEHRING GIONGO**
Data: 07/10/2025 16:55:08-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof.^a Dr.^a Janice Luehring Giongo. Doutora em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Prof. Dr. Lucas Moraes Berneira. Doutor em Ciências pela Universidade Federal de Pelotas

Dedico esta Dissertação aos meus pais, Wilmar e Maria, pelo apoio incondicional, ao meu namorado Guilherme e à memória da professora e amiga, Massako Takahashi Dourado, por sempre incentivar o meu amor pela Bioquímica.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, aos meus guias espirituais, por sempre me mostrarem o melhor caminho a ser trilhado.

Aos meus pais, Wilmar e Maria, por sempre me apoiarem em todas as fases da minha vida e acreditarem que eu seria capaz. Todas as minhas conquistas devo a eles.

À minha irmã Joice, por ser minha segunda mãe e por sempre me apoiar em todos os momentos.

Ao meu irmão Colmar, por demonstrar orgulho de mim e por me ajudar nas horas em que mais precisei.

Agradeço imensamente ao meu companheiro de vida, Guilherme, por ter entrado na minha vida no momento certo e tornado mais leve essa jornada. Obrigada por ser tão presente e por nunca me deixar desistir.

Agradeço aos meus sogros Michel e Suelen, pelo apoio e incentivo, vocês são inspiração!

Agradeço ao meu cunhadinho Gustavo, por alegrar os meus dias. Amor incondicional.

Um agradecimento especial à amiga de infância, Vivian, pelos conselhos e conversas que muito me ajudaram, especialmente no final desta trajetória.

À minha amiga, colega de laboratório e futura Doutora do LaQuiaBio, Fabiane, pela amizade baseada em ajuda incondicional, risadas e muito apoio.

Ao meu orientador, Wilson, pelo exemplo de profissionalismo, paciência e apoio durante este mestrado.

À minha coorientadora e amiga, Francieli, pela amizade, parceria e inspiração profissional.

Aos meus filhos de quatro patas, Sherlock e Baby, por serem essenciais na minha vida e minha fonte de apoio e motivação ao final do dia, sempre me recebendo com muito amor e ronronadas.

Agradeço ao professor César e à sua aluna Evelyn, pela parceria neste trabalho. E, por fim, agradeço à CAPES pela concessão da bolsa de mestrado.

*“Se você vai ter que conviver com você mesmo até o fim,
se você vai ter que se aguentar até o fim, se você vai ser
espectador de você mesmo até o fim, é melhor que se
encante com o que faz.”*

Clóvis de Barros Filho

RESUMO

VIANNA, Cintia da Costa. **Síntese e Avaliação *in vitro* e *in silico* de Derivados da Tiazolidinona e Imidazolidinona como Inibidores da Monoamina Oxidase B.** Orientador: Wilson Cunico. 2025. 71 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Bioprospecção) – Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2025.

Neste trabalho, foram sintetizados quatro derivados de tiazolidinona e hidantoína (**3A, 3B, 3C** e **3D**), por meio da reação de condensação de Knoevenagel entre o 4-(metiltio)benzaldeído e a 2,4-tiazolidinediona **1A**, rodanina **1B**, hidantoína **1C** e tiohidantoína **1D**. Além disso, foi realizada a síntese do composto inédito **5Bb**, através da reação de N-alkilação do composto **3B** com o cloreto de 4-fluorobenzila **4b**.

Os compostos foram identificados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-MS), e ressonância magnética nuclear de hidrogênio (¹H-NMR) e de carbono (¹³C-NMR), com rendimentos variando de 65 a 82%. O composto inédito **5Bb** foi identificado e caracterizado pelas mesmas técnicas de análise. Em seguida, o potencial inibitório sobre a atividade da isoforma MAO-B foi avaliado por ensaios *in vitro*, utilizando tecido cerebral de camundongo, e *in silico*, empregando a técnica computacional de docagem molecular.

Os ensaios *in vitro* demonstraram que os compostos **3A** (5-(4-(metiltio)benzilideno)tiazolidina-2,4-diona) e **3D** (5-(4-(metiltio)benzilideno)-2-tioxoimidazolidina-4-ona) foram os inibidores mais potentes, promovendo quase completa supressão da atividade enzimática. O composto **3A** reduziu a atividade da MAO-B em 95%, enquanto o **3D** atingiu valor ligeiramente superior, com 97% de inibição. Já os compostos **3B** (5-(4-(metiltio)benzilideno)-2-tioxotiazolidina-4-ona) e **3C** (4-(metiltio)benzilideno)imidazolidina-2,4-diona) apresentaram atividade intermediária. O composto **3B** promoveu 89% de inibição, seguido pelo **3C**, com 72%, enquanto o **5Bb** (3-(4-fluorobenzil)-5-(4-(metiltio)benzilideno)-2-tioxotiazolidina-4-ona) exibiu o menor efeito, alcançando 63% de inibição da MAO-B.

Em contrapartida, os resultados *in silico* mostraram que o composto **5Bb** (energia de interação de -9,4 kcal/mol) apresentou boa afinidade pelo sítio da MAO-B, apresentando melhor equilíbrio global, atribuído pelas interações π - π e π -S (Phe168,

Tyr398, Leu171, Cys172), que podem conferir seletividade adicional ao sítio ativo da enzima. A discrepância observada entre os resultados de docking e a eficácia *in vitro* destaca as limitações intrínsecas dessa abordagem computacional.

Palavras-Chave: MAO, IMAOs, Knoevenagel, N-alquilação, Docking molecular.

ABSTRACT

VIANNA, Cintia da Costa. **Synthesis and in vitro and in silico Evaluation of Thiazolidinone and Imidazolidinone Derivatives as Monoamine Oxidase B Inhibitors**. Advisor: Wilson Cunico. 2025. 71 f. Dissertation (Master's in Biochemistry and Bioprospecting) – Center for Chemical, Pharmaceutical and Food Sciences, Federal University of Pelotas, Pelotas, 2025.

In this work, four derivatives of thiazolidinone and hydantoin (**3A**, **3B**, **3C**, and **3D**) were synthesized via a Knoevenagel condensation reaction between 4-(methylthio)benzaldehyde and 2,4-thiazolidinedione **1A**, rhodanine **1B**, hydantoin **1C**, and thiohydantoin **1D**. Furthermore, the novel compound **5Bb** was synthesized through an N-alkylation reaction of compound **3B** with 4-fluorobenzyl chloride **4b**.

The compounds were identified by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS), and hydrogen nuclear magnetic resonance (^1H -NMR) and carbon nuclear magnetic resonance (^{13}C -NMR), with yields ranging from 65% to 82%. The novel compound **5Bb** was identified and characterized by the same analytical techniques. Subsequently, the inhibitory potential on MAO-B isoform activity was evaluated through in vitro assays using mouse brain tissue and in silico using the computational technique of molecular docking.

The in vitro assays demonstrated that compounds **3A** (5-(4-(methylthio)benzylidene)thiazolidine-2,4-dione) and **3D** (5-(4-(methylthio)benzylidene)-2-thioxoimidazolidin-4-one) were the most potent inhibitors, promoting almost complete suppression of enzymatic activity. Compound **3A** reduced MAO-B activity by 95%, while **3D** reached a slightly higher value, with 97% inhibition. Compounds **3B** (5-(4-(methylthio)benzylidene)-2-thioxothiazolidin-4-one) and **3C** (4-(methylthio)benzylidene)imidazolidine-2,4-dione) showed intermediate activity. Compound **3B** promoted 89% inhibition, followed by **3C** with 72%, while **5Bb** (3-(4-fluorobenzyl)-5-(4-(methylthio)benzylidene)-2-thioxothiazolidin-4-one) exhibited the lowest effect, achieving 63% inhibition of MAO-B.

In contrast, the in silico results showed that compound **5Bb** (interaction energy of -9.4 kcal/mol) had good affinity for the MAO-B site, presenting a better overall balance, attributed by π - π and π -S interactions (Phe168, Tyr398, Leu171, Cys172), which may

confer additional selectivity to the enzyme's active site. The observed discrepancy between the docking results and the in vitro efficacy highlights the intrinsic limitations of this computational approach.

Keywords: MAO, MAOIs, Knoevenagel, N-alkylation, Molecular docking.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Principais reações de um heterocíclico tiazolidinona e imidazolidinona.	16
Figura 2	Estrutura química da 2,4-tiazolidinediona, rodanina, hidantoína e tio-hidantoína.	17
Figura 3	Estruturas químicas dos neurotransmissores.	19
Figura 4	Estruturas químicas dos inibidores irreversíveis da MAO.	21
Figura 5	Estrutura química dos fármacos IMAOs aprovados, isocarboxazida, fenelzina, tranilcipromina e selegilina.	21
Figura 6	Série de derivados fenetilamina com diferentes substituintes (GALLARDO, <i>et al.</i> , 2020).	22
Figura 7	Efeito dos compostos 3A , 3B , 3C , 3D e 5Bb em uma concentração fixa (200µM) sobre a atividade da MAO-B cerebral.	50

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1	Reação proposta neste trabalho	18
Esquema 2	Duas rotas para a síntese de derivados do núcleo tiazolidinico e imidazolidinico (Condensação de Kenoevenagel e N- alquilação) (DE VASCONCELOS <i>et al.</i> , 2021)	23
Esquema 3	Síntese <i>one-pot</i> das 2,4-tiazolidinedionas desejadas (DE VASCONCELOS <i>et al.</i> , 2021)	24
Esquema 4	Três etapas reacionais dos derivados TZDs (CHINTHALA, <i>et al.</i> , 2013)	25
Esquema 5	Rota sintética para os compostos titulados (5a–e) (NAJMI <i>et al.</i> , 2023)	25
Esquema 6	Rota sintética proposta no estudo (BRUNO <i>et al.</i> 2002)	26
Esquema 7	Síntese de uma série de TZDs realizada em duas etapas pelo método de aquecimento térmico convencional (PUROHIT <i>et al.</i> 2012)	26
Esquema 8	Reação em duas etapas de derivados da Hidantoína (KUMAR <i>et al.</i> , 2024)	28
Esquema 9	Rota sintética para a obtenção dos derivados da tiazolidinona e hidantoína 3A-3D	48
Esquema 10	Esquema reacional para a síntese do composto 5Bb	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

^{13}C -RMN	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13
^1H -RMN	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio-1
CG-MS	Cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (do inglês: <i>gas chromatography coupled to mass spectrometer</i>)
DMSO	Dimetilsulfóxido
MAO	Monoamina oxidase
IMAO	Inibidor da Monoamina oxidase
PPAR γ	do inglês <i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor</i>
TZD	2,4-tiazolidinediona

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. OBJETIVO	
2.1 Objetivo Geral.....	18
2.2 Objetivo específico.....	18
3. REFERENCIAL TEÓRICO.....	19
3.1 Monoamina oxidase (MAO).....	19
3.2 Mecanismo de ação dos inibidores da monoamina oxidase (IMAOs).....	20
3.3 Heterocíclicos tiazólicos.....	22
3.4 Síntese de derivados das Tiazolidinonas e da Imidazolidinona.....	22
3.5 Conceitos gerais sobre a técnica de docking molecular.....	28
4. MANUSCRITO CIENTÍFICO.....	30
5. DISCUSSÃO.....	48
6. CONCLUSÃO.....	54
7. REFERÊNCIAS.....	55
Anexo 1	60
Anexo 2	68
Anexo 3	71

1. INTRODUÇÃO

A monoamina oxidase (MAO) é uma enzima localizada na face externa da membrana mitocondrial, responsável por catalisar a desaminação oxidativa de amins presentes na dieta, bem como de neurotransmissores monoaminérgicos, como serotonina, noradrenalina e dopamina. A rápida degradação destes neurotransmissores é essencial para a manutenção de uma neurotransmissão sináptica adequada (HITGE; PETZER; PETZER, 2022). Entretanto, a desregulação da atividade da MAO tem sido associada à patogênese de diversos transtornos neurológicos, como o transtorno depressivo maior (TDM) e doenças neurodegenerativas, incluindo a doença de Alzheimer.

Como forma de tratamento para essas condições, os inibidores da monoamina oxidase (IMAOs), fármacos amplamente utilizados no manejo de transtornos do humor e doenças neurodegenerativas, têm sido foco de diversos estudos, por atuarem diretamente na modulação da atividade dessa enzima. Ao inibir a MAO, estes compostos aumentam a disponibilidade de neurotransmissores nas sinapses, contribuindo para o alívio dos sintomas associados aos transtornos neurológicos (TAN; JENNER; CHEN, 2022).

A busca por IMAOs mais eficazes e seguros tem impulsionado pesquisas nas áreas de química orgânica e medicinal, com o objetivo de desenvolver novas moléculas com melhor desempenho terapêutico (GALLARDO-GODOY *et al.*, 2020), especialmente inibidores seletivos da MAO-B. Essa isoenzima é responsável pela degradação da dopamina no sistema nervoso central e, durante esse processo, gera subprodutos que aumentam o estresse oxidativo, contribuindo para a morte neuronal (MARIKA ALBORGHETTI *et al.*, 2024). Por essa razão, a inibição da MAO-B tem se mostrado uma estratégia promissora no tratamento da Doença de Parkinson, ao preservar os níveis dopaminérgicos e retardar a progressão dos sintomas motores (BORRONI *et al.*, 2017). Além disso, estudos recentes sugerem que a atividade exacerbada da MAO-B também está associada ao acúmulo de espécies reativas de oxigênio e à formação de depósitos de β -amiloide, fenômenos envolvidos na fisiopatologia da Doença de Alzheimer (MARIKA ALBORGHETTI *et al.*, 2024), o que torna essa enzima um alvo terapêutico de interesse em ambas as doenças neurodegenerativas.

Nesse contexto, compostos heterocíclicos derivados dos núcleos tiazolidinona e imidazolidinona, conhecidos por apresentarem uma ampla gama de atividades biológicas, como ação antibacteriana (BRATTY *et al.*, 2020), antifúngica (MARC *et al.*, 2018), anti-inflamatória (REZAEI *et al.*, 2019), antitumoral (GUPTA; THAKUR; JAIN, 2025) e antidepressiva (KUCWAJ-BRYSZ *et al.*, 2024), têm demonstrado potencial terapêutico como IMAOs (KUMAR *et al.*, 2025). Na síntese orgânica, os derivados tiazolidínicos, como por exemplo a 2,4- tiazolidinediona (TZD) e a rodanina, e imidazolidínicos, como a hidantoína e tio- hidantoína, possuem grande potencial reativo devido à sua estrutura química, que permite a realização de diversas reações de modificação em sua estrutura inicial, tais como reações de N-alquilação na posição 3 do anel (e na posição 1, no caso da imidazolidinona), condensação de Knoevenagel com aldeídos ou cetonas na posição 5 do anel, tionação utilizando o reagente de Lawesson na posição 4 do anel e oxidação na

posição 1 do anel (Figura 1), possibilitando a obtenção de um amplo espectro de atividades biológicas (KUMAR et al., 2022).

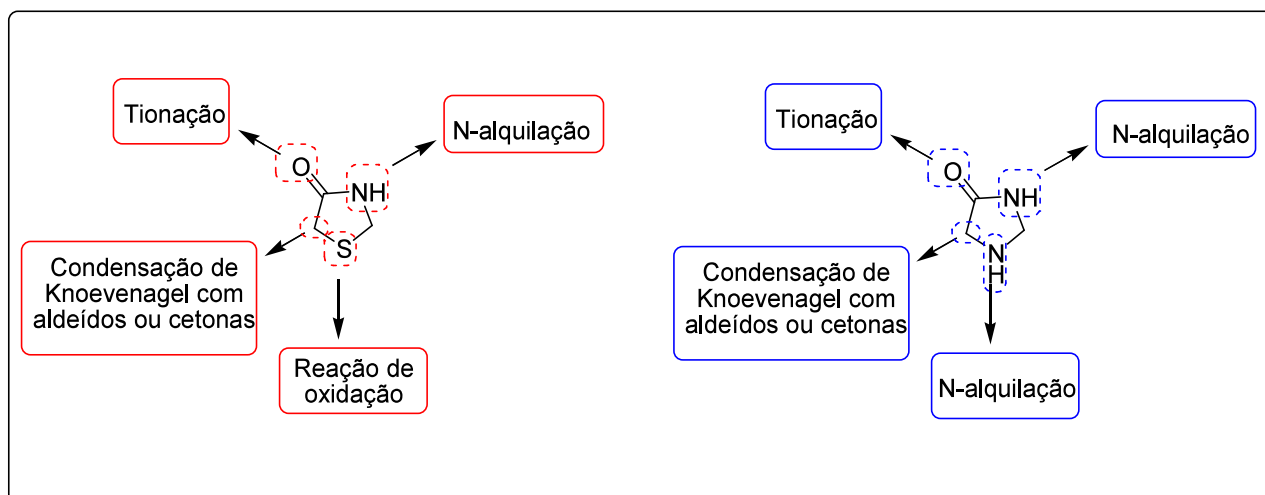


Figura 1- Principais reações de um heterocíclico tiazolidinona (esquerda) e imidazolidinona (direita).

A TZD (Figura 2 -1A), também conhecida como glitazona é um anel heterocíclico de cinco membros com dois grupos carbonila nas posições 2 e 4 do anel, além do seu núcleo tiazolidínico. Foi inicialmente reconhecida por seu papel no tratamento do diabetes mellitus tipo 2, através da ativação seletiva do receptor gama ativado por proliferadores de peroxissomos (PPAR- γ) (GIGLIO *et al.*, 2022). Já a rodanina (Figura 2- 1B), cujo nome na IUPAC é 2-tioxo-4-tiazolidinona, diferencia da TZD por conter um grupo tioxo na posição 2 do anel, sendo esta, bastante estudada em patologias como neoplasias (EL-BAHNSAWYE *et al.*, 2022) e na ação anti- inflamatória (AMEEN *et al.*, 2024).

A hidantoína (Figura 2- 1C), cujo nome na IUPAC é imidazolidina-2,4-diona, é um heterociclo não aromático de cinco membros, reconhecido como um núcleo estrutural valioso e privilegiado na química medicinal. Essa estrutura apresenta cinco possíveis sítios de substituição, incluindo dois grupos doadores e dois aceitadores de ligações de hidrogênio, o que favorece suas interações com alvos biológicos e amplia seu potencial terapêutico. Sua importância na descoberta de fármacos é evidenciada por compostos de uso clínico, como por exemplo, o Hidantal® (fenitoína), um medicamento anticonvulsivante (CHO; KIM; SHIN, 2019). Já a 2-tio-hidantoína (Figura 2- 1D), ou 2-tioxo-imidazolidin-4-ona, um análogo bioisotérico da hidantoína, diferenciando por possuir um grupo tioxo na posição 2 do anel, tem sido muito estudado quanto sua atividade antitumoral (LIU et al., 2020).

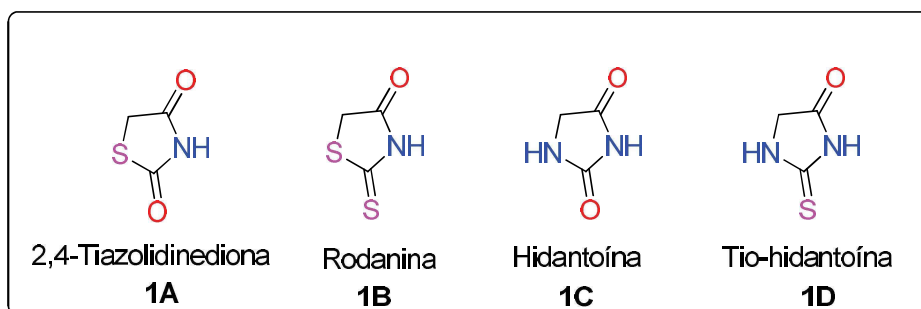


Figura 2. Estrutura química da 2,4-tiazolidinediona, rodanina, hidantoína e tio-hidantoína.

Em vista da ausência de estudos sobre o uso de derivados de tiazolidinediona e imidazolidinediona como inibidores da enzima MAO-B, o presente trabalho teve como objetivo sintetizar esses derivados e avaliar seu potencial inibitório sobre a MAO-B. Para isso, foram realizados ensaios *in vitro* utilizando tecido cerebral de camundongos, além de estudos *in silico* por meio da técnica de *docking* molecular, visando a descoberta de novos candidatos a fármacos.

2. OBJETIVO

2.1 Objetivo Geral

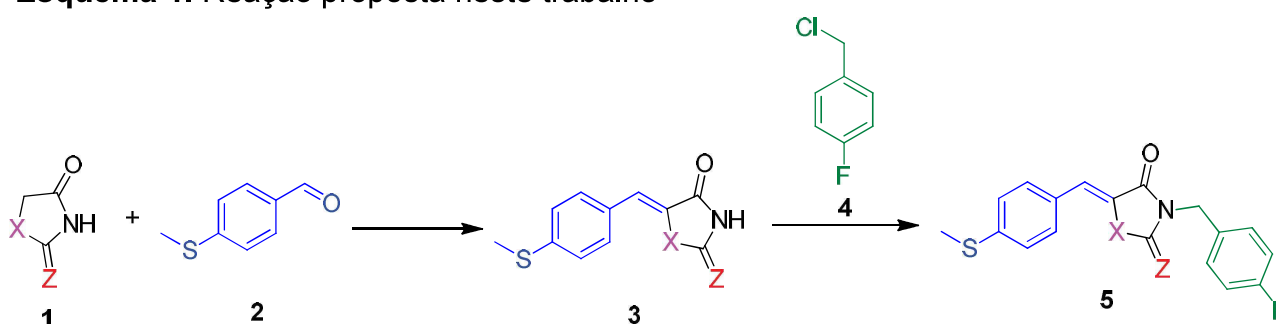
Sintetizar e avaliar por meio de abordagens *in vitro* e *in silico*, o potencial inibitório de derivados contendo os núcleos Tiazolidinona tiazolidinona e Imidazolidinonaimidazolidinona, visando ao desenvolvimento de moléculas que possam representar uma alternativa terapêutica aos fármacos atualmente utilizados como inibidores da enzima monoamina oxidase B.

2.2 Objetivos específicos

Dentre os objetivos específicos, se tem:

- I) Obter derivados das tiazolidinedionas e das imidazolidinedionas **3** através da reação de condensação de Knoevenagel entre o anel tiazolidinico ou imidazolidinico **1** e o 4-(Metiltio)benzaldeído **2** (Esquema 1);
- II) Obter derivados das tiazolidinedionas e das imidazolidinedionas **5** através da reação da reação de N-alquilação entre o composto **3** obtido no objetivo I e o cloreto de 4-fluorobenzila **4** (Esquema 1);
- III) Identificar os compostos sintetizados, através da interpretação dos dados de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C e Espectrometria de massas (CG-MS);
- IV) Avaliar o efeito *in vitro* dos compostos sintetizados na atividade inibitória da enzima monoamina oxidase B, em tecido cerebral de camundongos;
- V) Avaliar o efeito *in silico* dos compostos sintetizados pela técnica computacional de docking molecular.

Esquema 1. Reação proposta neste trabalho



3. REFERENCIAL TEÓRICO

Na literatura científica, observa-se um número crescente de estudos dedicados à síntese de novos derivados de núcleos heterocíclicos, em especial os tiazolidínicos, como a TZD e a rodanina, e os imidazolidínicos, como a hidantoína e a 2-tio-hidantoína, em razão de suas diversas aplicações biológicas. Nesse contexto, a presente revisão tem como objetivo discutir as modificações estruturais potenciais do anel tiazolidínico e imidazolidínico, algumas das metodologias sintéticas utilizadas para a obtenção dos compostos derivados desses núcleos e suas atividades biológicas de interesse. Além disso, apresenta-se uma visão geral da enzima monoamina oxidase (MAO), as principais classes de estruturas orgânicas aprovadas como inibidores da MAO (IMAOs) e seus mecanismos de ação, assim como, uma breve introdução sobre a técnica de docking molecular.

3.1. Monoamina oxidase (MAO)

As monoamina oxidases (MAOs) são enzimas que contêm o cofator flavina Adenina Dinucleotídeo (FAD) firmemente ligado, e estão ancoradas à membrana externa das mitocôndrias de células neuronais, gliais e de outros tecidos de mamíferos por meio de um segmento polipeptídico transmembrana na região C- terminal (HAN *et al.*, 2023). As MAOs são responsáveis pela regulação dos neurotransmissores por meio de sua degradação. A reação enzimática catalisada por essas enzimas envolve a conversão do neurotransmissor no aldeído correspondente, com a regeneração do FAD na forma oxidada, além da liberação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), resultante da redução do oxigênio molecular, e de amônia ou de uma amina substituída, dependendo do substrato. (BHAWNA *et al.*, 2022). Em excesso, esse H_2O_2 gerado como subproduto, pode originar radicais livres altamente reativos, os quais podem exercer efeitos citotóxicos sobre a célula em condições patológicas. (DUARTE; CUADRADO; LEÓN, 2021).

Existem duas isoformas distintas dessa enzima em mamíferos: MAO-A e MAO-B, codificadas por genes diferentes, com diferenças em termos de distribuição tecidual, especificidade de substrato e sensibilidade a inibidores (HAN *et al.*, 2023). A isoforma MAO-A está envolvida principalmente no mecanismo de regulação do humor e do comportamento emocional, por apresentar maior afinidade por neurotransmissores como serotonina (5-HT), norepinefrina (NE) e dopamina (DA) (Figura 3). Sua desregulação está associada a patologias como o Transtorno Depressivo e Ansiedade (WU; SHIH, 2022).

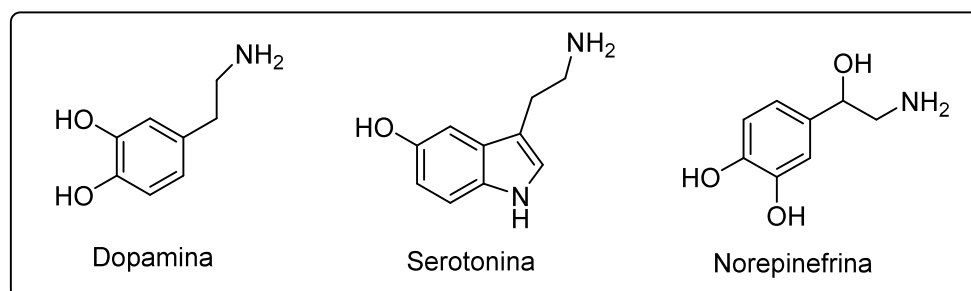


Figura 3. Estruturas químicas dos neurotransmissores.

Já a isoforma MAO-B, apresenta maior afinidade por feniletilamina e benzilamina e metaboliza dopamina, tendo um papel significativo na degradação da dopamina em algumas regiões do cérebro (ALSAAD *et al.*, 2024). Sua atividade está aumentada em doenças neurodegenerativas como o Mal de Parkinson e à doença de Alzheimer, sendo esta última ocorrendo pela produção de espécies reativas de oxigênio, que podem danificar as células, e pelo aumento do acúmulo de placas β -amiloides, características da doença (THENTU *et al.*, 2021).

Nesse contexto, a inibição da MAO tem se mostrado um alvo promissor no tratamento de distúrbios cerebrais. Fármacos com potencial inibitório dessa enzima, classificados como inibidores da monoamina oxidase (IMAOs), são utilizados no manejo de transtornos do humor e doenças neurodegenerativas. Ao inibir a MAO, esses fármacos aumentam a disponibilidade de neurotransmissores nas sinapses, promovendo a melhora dos sintomas associados a essas condições (TAN; JENNER; CHEN, 2022). Neste estudo, será investigado o potencial inibitório *in vitro* das moléculas sintetizadas sobre a MAO-B.

3.2 Mecanismo de ação dos inibidores da monoamina oxidase (IMAOs)

A inibição da MAO possui uma longa trajetória, iniciando-se com a aprovação do primeiro fármaco no final da década de 1950. A iproniazida foi inicialmente testada como um tratamento para tuberculose; embora não tenha demonstrado eficácia contra a doença, observou-se uma melhora significativa no estado emocional dos pacientes. Posteriormente, a iproniazida foi classificada como um inibidor irreversível e não seletivo da MAO, pertencente ao grupo das hidrazinas, sendo aprovada em 1958 para o tratamento da depressão. No entanto, esses fármacos demonstraram elevada toxicidade hepática e foram associados a crises hipertensivas, efeitos adversos que levaram à retirada de alguns deles do mercado (DUARTE; CUADRADO; LEÓN, 2021).

Logo, a identificação de duas isoenzimas distintas da MAO, denominadas MAO-A e MAO-B, com diferentes seletividades por substratos e padrões de expressão em tecidos específicos, impulsionou o surgimento de novas estratégias terapêuticas (BANERJEE *et al.*, 2024). Isso possibilitou o desenvolvimento de novas classes de inibidores como os inibidores seletivos irreversíveis e reversíveis da MAO-B e inibidores reversíveis da MAO A, com menores efeitos adversos com efeitos promissores.

Os inibidores seletivos da MAO atuam especificamente sobre apenas uma das isoformas da enzima (MAO-A ou MAO-B), sem interferir na atividade da outra. Eles se ligam diretamente e de forma estequiométrica ao sítio ativo da isoforma alvo. Em contrapartida, os inibidores não seletivos não distinguem entre as duas isoformas e, por isso, interagem com ambas, inibindo simultaneamente a atividade da MAO-A e da MAO-B (BHAWNA *et al.*, 2022). Em geral, os inibidores irreversíveis podem ser classificados em diferentes classes, de acordo com sua estrutura química: hidrazinas, ciclopropilaminas e propargilaminas (Figura 4).

No caso dos inibidores reversíveis, não há formação de ligações covalentes entre o inibidor e a enzima, o que torna essa interação relativamente fraca e de ação rápida.

Logo, o complexo formado entre o inibidor e a enzima pode se dissociar, especialmente por mecanismos que reduzem a concentração ou a atividade do inibidor. Assim, a duração do efeito dos inibidores reversíveis está diretamente relacionada à sua taxa de metabolismo e/ou eliminação do organismo (BANERJEE et al., 2024).

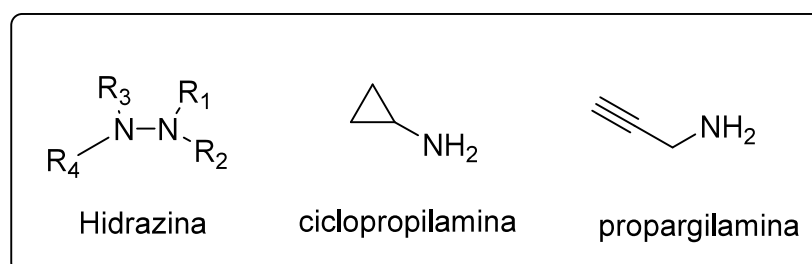


Figura 4. Estruturas químicas dos inibidores irreversíveis da MAO.

De outra forma, os inibidores irreversíveis formam uma ligação covalente estável com o cofator FAD da enzima MAO. Essa ligação é forte, dependente do tempo e não pode ser desfeita, o que torna a inibição permanente enquanto a enzima estiver ativa. Atualmente, os únicos inibidores da MAO aprovados pela agência governamental dos EUA (*Food and Drug Administration* – FDA) são a isocarboxazida (Marplan®), fenelzina (Nardil®), tranilcipromina (Parnate®) e a selegilina (Emsam®) (Figura 5). Esses medicamentos são usados no tratamento de depressão e a selegilina, um inibidor seletivo da MAO-B, também é aprovada para o tratamento da doença de Parkinson, por aumentar os níveis de dopamina, melhorando sintomas motores e na doença de Alzheimer, por seu potencial redutor do estresse oxidativo e proteção neuronal.

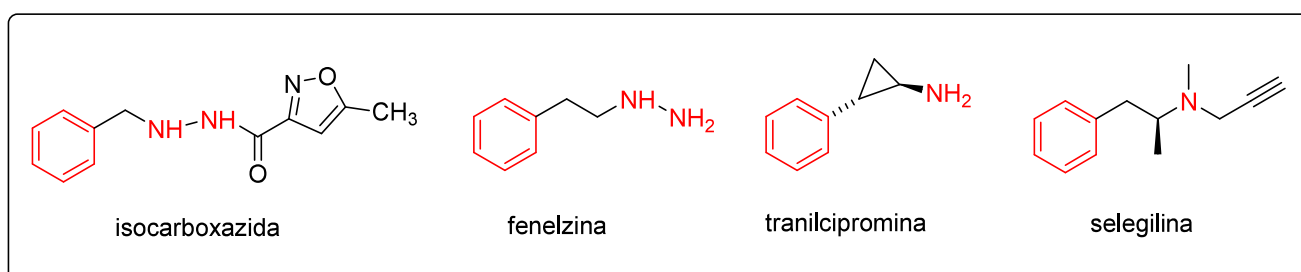


Figura 5. Estrutura química dos fármacos IMAOs aprovados, isocarboxazida, fenelzina, tranilcipromina e selegilina.

Há um interesse crescente no desenvolvimento de novas moléculas que atuem como inibidores da MAO, explorando diferentes tipos de substituintes para otimizar sua seletividade e potência, como no estudo realizado por Gallardo-Godoy e colaboradores (2020), onde uma série de derivados de fenetilamina com vários substituintes de anel, foram sintetizados e testados quanto à sua capacidade de inibir reversivelmente a MAO-A e a MAO-B. Dentre os resultados obtidos desse estudo, destaca-se como os derivados de fenetilamina, alguns com átomos de enxofre incorporados na estrutura, que apresentou forte e seletiva inibição reversível da MAO-B, com IC_{50} na faixa submicromolar (GALLARDO-GODOY et al., 2020).

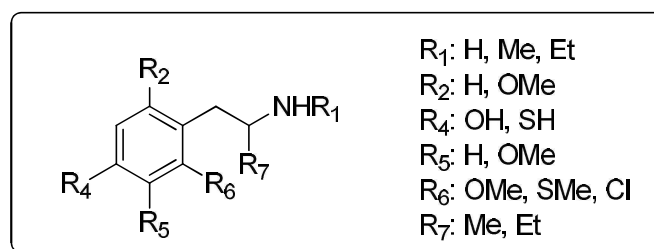


Figura 6. Série de derivados fenetilamina com diferentes substituintes (GALLARDO, et al., 2020)

Dessa forma, a busca por novos fármacos com propriedades cada vez mais eficazes tem impulsionado as pesquisas nas áreas de química orgânica e medicinal, com o objetivo de sintetizar moléculas que apresentem melhor desempenho terapêutico e maior segurança no tratamento. Com isso, a pesquisa de novos inibidores da MAO- B busca desenvolver moléculas eficazes, seguras e com atividade neuroprotetora, podendo servir como alternativas promissoras para o tratamento de doenças neurodegenerativas (GALLARDO-GODOY *et al.*, 2020).

Conforme ilustrado na Figura 5, observa-se que os inibidores de MAO atualmente aceitos e utilizados clinicamente, como isocarboxazida, fenelzina, tranilcipromina e selegilina, compartilham características estruturais comuns, atribuídas principalmente à presença de, pelo menos, um átomo de nitrogênio e de um anel aromático em sua cadeia. Essa similaridade estrutural reforça a relevância do estudo das moléculas sintetizadas neste trabalho, baseadas nos núcleos tiazolidínico e imidazolidínico

3.3. Heterociclos tiazólicos

Os compostos heterocíclicos ocupam posição de destaque na química orgânica e medicinal devido à presença de heteroátomos (nitrogênio, oxigênio ou enxofre) em seus anéis, o que lhes confere propriedades físico-químicas únicas, como maior solubilidade, estabilidade química e capacidade de formar interações específicas com alvos biológicos. Tais características tornam-nos indispensáveis no desenvolvimento de novos fármacos, materiais e agroquímicos (GIOVANNA LI PETRI *et al.*, 2023).

Estima-se que a maior parte dos fármacos aprovados para uso clínico contenha pelo menos um núcleo heterocíclico em sua estrutura, evidenciando sua importância. Exemplos incluem a losartana (anti-hipertensivo), a etravirina (antirretroviral), o fluconazol (antifúngico) e o celecoxibe (anti-inflamatório seletivo para COX-2). Diante desse cenário, observa-se um crescimento expressivo das pesquisas voltadas à síntese de novas moléculas heterocíclicas, especialmente pela sua ampla aplicabilidade terapêutica (TRIPATHI *et al.*, 2024). Entre os heterociclos de maior interesse científico estão as tiazolidinonas e as imidazolidinonas, duas classes de derivados nitrogenados de cinco membros que têm atraído atenção devido ao seu vasto potencial biológico.

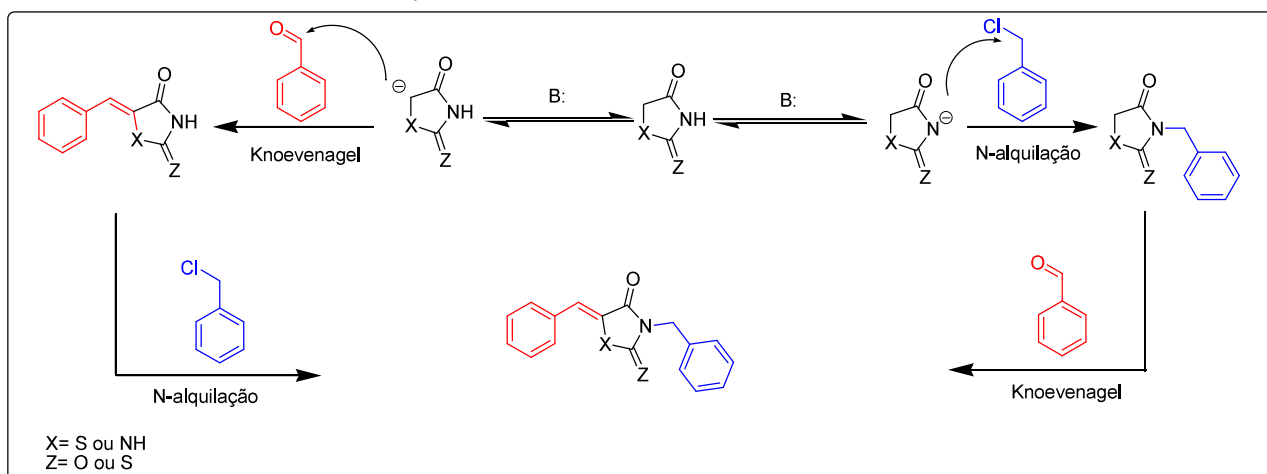
As tiazolidinonas e imidazolidinonas se destacam por apresentarem uma ampla variedade de atividades farmacológicas, incluindo propriedades antibacteriana, antifúngica, anti-inflamatória, antitumoral, antidiabética e anticonvulsivante (JAMPILEK, 2019). Diversos estudos também descrevem seu potencial antioxidante e sua aplicação

como agentes antivirais, tornando-as candidatas promissoras no desenvolvimento de fármacos inovadores (BANSAL et al., 2020).

As imidazolidinonas, embora estruturalmente semelhantes, diferem no arranjo dos átomos e na natureza dos substituintes, o que confere a elas perfis de atividade biológica distintos. Compostos dessa classe já foram associados a atividades antitumorais, antimaláricas, antifúngicas, antimicrobianas e anti-inflamatórias, além de atuarem como potenciais moduladores enzimáticos. Sua versatilidade estrutural permite modificações químicas que ampliam o leque de aplicações terapêuticas, consolidando sua relevância como núcleo bioativo (SINGH et al., 2015).

Nos derivados de tiazolidinediona e imidazolidinediona a modificação estrutural do anel heterocíclico é frequentemente realizada por meio de reações de condensação de Knoevenagel e N-alkilação. Na condensação de Knoevenagel, o hidrogênio metilênico na posição ativa do anel reage com aldeídos ou cetonas substituídas, formando ligações carbono-carbono conjugadas que permitem a introdução de diferentes grupos funcionais, potencializando a atividade biológica dos compostos. A N-alkilação envolve a adição de grupos alquila ao nitrogênio do anel por meio de reações nucleofílicas típicas do tipo SN2, alterando propriedades eletrônicas e estéricas da molécula (TRIPATHI *et al.*, 2024) (Esquema 2). Essas duas estratégias combinadas oferecem uma abordagem eficiente para gerar uma diversidade estrutural significativa em derivados de tiazolidinona e imidazolidinona, permitindo o estudo de suas atividades farmacológicas.

Esquema 2- Duas rotas para a síntese de derivados do núcleo tiazolidínico e imidazolidínico (Condensação de Knoevenagel e reação de N-alkilação) (DE VASCONCELOS *et al.*, 2021)



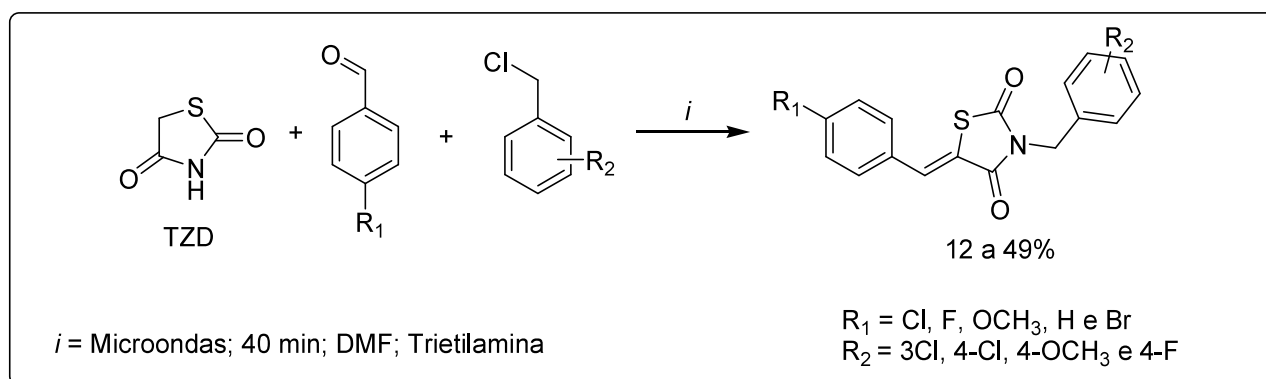
3.4 Síntese de derivados das Tiazolidinonas e da Imidazolidinona

Na química orgânica, o estudo das tiazolidinonas e imidazolidinonas têm sido de crescente interesse, por se tratar de classes importantes de heterocíclicos contendo em sua composição os elementos enxofre (S) e nitrogênio (N), possibilitando uma série de compostos derivados destes núcleos, através das diversas possibilidades de modificações

no anel heterocíclico. Essas modificações podem ser realizadas utilizando inúmeras metodologias para a obtenção do produto desejado, seja por aquecimento convencional ou com o uso de micro-ondas (GENTILI et al., 2021).

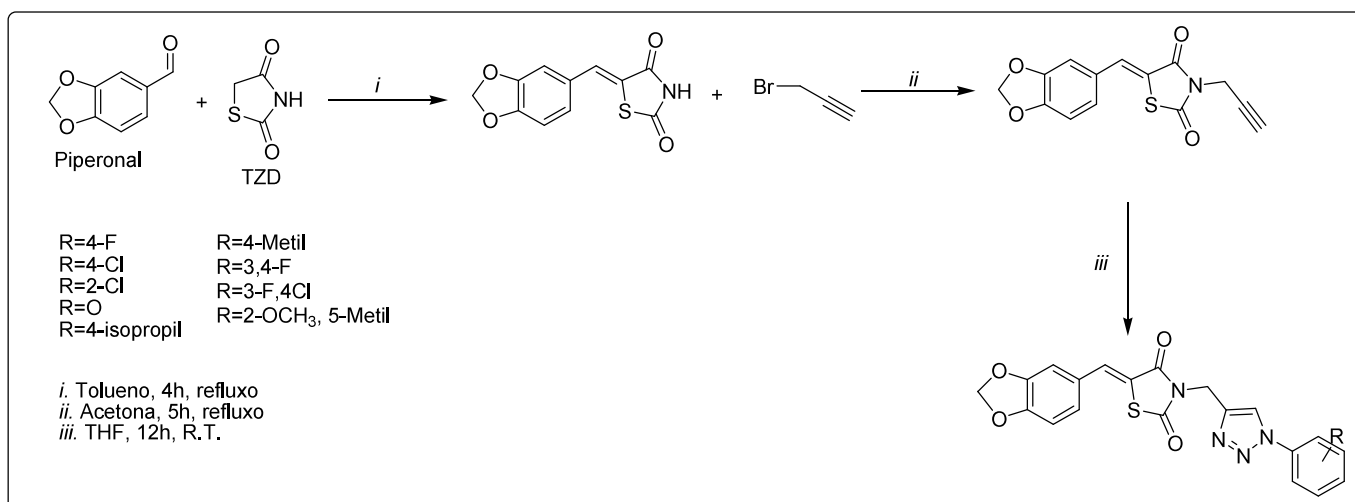
DE VASCONCELOS e colaboradores (2021) sintetizaram 17 compostos derivados da 2,4-Tiazolidinonas pela via multicomponente (*one-pot*) em micro-ondas, utilizando como solvente o Dimetilformamida (DMF) na presença do catalisador Trietilamina. Dessa maneira, a síntese ocorreu através das reações de condensação de Knoevenagel entre a 2,4-Tiazolidinediona **1**, e benzaldeídos substituídos **2A-E**, N-alkilação com cloretos de benzila substituídos **3F-I** (Esquema 3). Esses derivados foram preparados a fim de investigar sua atividade antitumoral em culturas primárias de astrócitos e em células de glioblastoma de ratos e camundongos, o qual foi analisada pelo teste de redução do brometo de 3-(4,5- dimetil)-2,5-difeniltetrazólio (MTT), onde a estrutura **4Cl**, que possui um átomo de flúor na posição 4 do anel B e um metoxi na posição 4 do anel A, obteve o melhor resultado ($IC_{50} = 28,51 \mu M$).

Esquema 3- Síntese *one-pot* das 2,4-tiazolidinedionas desejadas (DE VASCONCELOS et al., 2021)



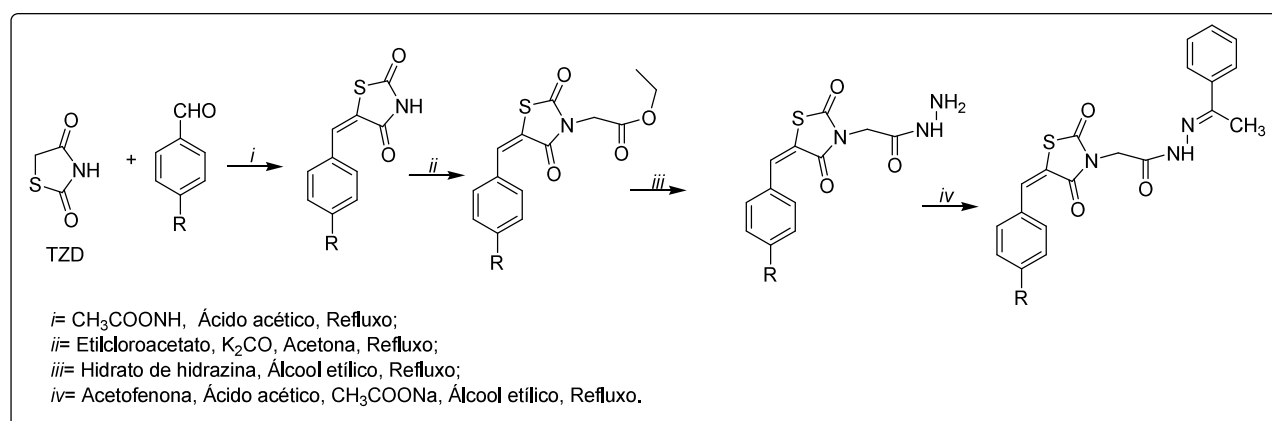
Um estudo utilizando o aquecimento térmico convencional foi descrita por CHINTHALA e colaboradores (2013), em que sintetizaram uma série de derivados de tiazolidina-2,4-diona (TZDs) por meio de três etapas reacionais (Esquema 4). Na primeira etapa, foi obtido o intermediário 1: 5-(benzo[1,3]dioxol-5- ilmetileno)tiazolidina-2,4-diona, por meio de uma reação de condensação de Knoevenagel entre piperonal e tiazolidina-2,4-diona, conduzida sob refluxo em tolueno. Na segunda etapa, a reação ocorreu por meio da N-alkilação do intermediário 1 com brometo de propargila, em refluxo de acetona, resultando no intermediário 2: 5- (benzo[1,3]dioxol-5-ilmetileno)-3-(prop-2-inil)tiazolidina-2,4-diona. Por fim, na terceira etapa, o intermediário 2 foi submetido à reação com azidas aromáticas substituídas, sob refluxo em tetrahidrofurano (THF), resultando nos derivados finais de TZDs, com rendimento médio de aproximadamente 80%.

Esquema 4- Três etapas reacionais dos derivados TZDs (CHINTHALA, *et al*, 2013)



NAJMI e colaboradores 2023, sintetizaram 5 novas benzilideno-tiazolidina-2,4-dionas **5a-e**, mantendo o anel ácido da tiazolidinediona (TZD) no centro da molécula pelo método de aquecimento térmico convencional, em quatro etapas reacionais a partir do material de partida, a 2,4-Tiazolidinediona, onde na 4^o etapa foi utilizado o álcool etílico como solvente com adição do ácido acético a reação, obtendo assim, o produto: Ácido (5-benzilideno-2,4-dioxo-tiazolidin-3-il)-acético (1-fenil-etilideno)-hidrazida **5a-e** (Esquema 5). Esses derivados foram preparados para investigar a eficácia antidiabética in vivo em camundongos diabéticos induzidos por estreptozotocina usando protocolos padrão, onde os compostos **5d** e **5e** mostraram atividade antidiabética promissora comparável à do medicamento padrão rosiglitazona.

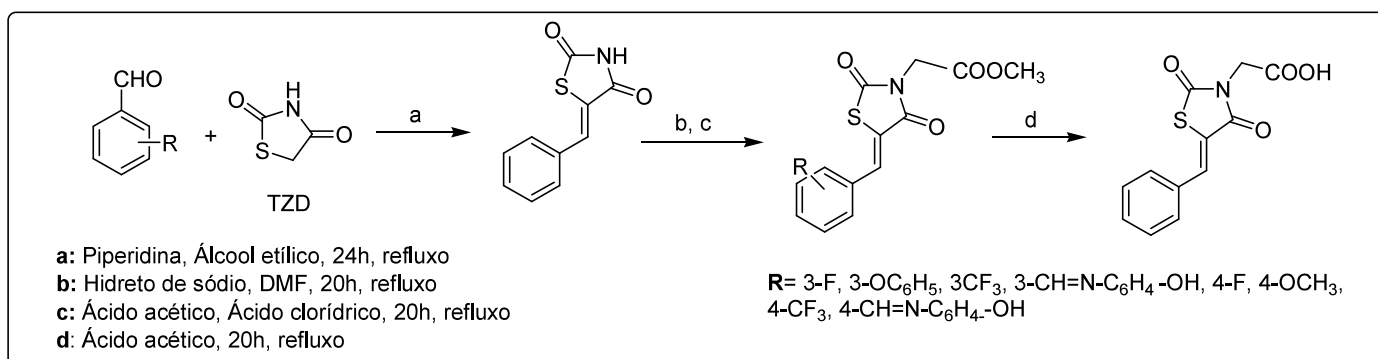
Esquema 5- Rota sintética para os compostos titulados (5a–e) (NAJMI *et al.*, 2023)



Em um outro estudo utilizando a metodologia de aquecimento convencional, foi realizado por BRUNO e colaboradores (2002), onde vários derivados da TZD foram sintetizados em três etapas reacionais (Esquema 6). Na primeira etapa foi obtido o intermediário 1: 5-arilideno-2,4-tiazolidinedionas, através da condensação de Knoevenagel

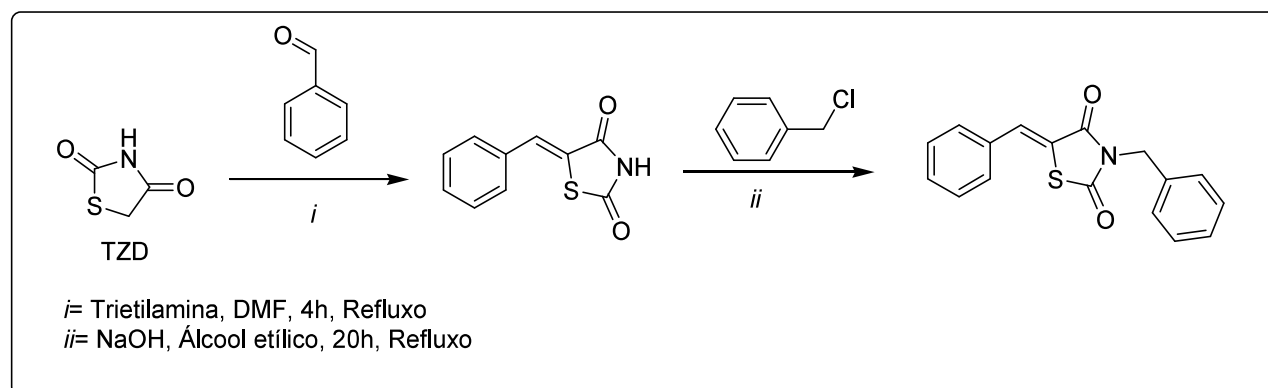
entre aldeídos aromáticos substituídos e TZD, em refluxo de álcool etílico. Na segunda etapa foi obtido o intermediário 2: 5-arilideno-2,4-tiazolidinediona -3- acetato de metila, através da reação entre o 2-bromacetato de metila e com o intermediário 1, em DMF seco agitada por 20 horas a 80°C. Por fim, a obtenção do produto ácido 5-arilideno-2,4-tiazolidinediona-3-acético ocorreu pela mistura do intermediário 2 com ácido acético glacial e ácido clorídrico, em refluxo durante 2 h. Os produtos obtidos foram testados como inibidores da aldose redutase (IRAs).

Esquema 6- Rota sintética proposta no estudo (BRUNO *et al.*, 2002)



Outra metodologia para a obtenção de derivados da TZD foi empregado por PUROHIT e colaboradores (2012), onde os autores sintetizaram uma série de TZDs através de duas etapas reacionais (Esquema 7). Na primeira etapa foram sintetizados os intermediários 5-arilidenotiazolidin-2,4-dionas em uma reação de Knoevenagel de diferentes aldeídos e da TZD em refluxo de etanol. Já na 2ª etapa foram obtidas as TZDs pela N-alquilação dos intermediários com cloretos de benzila substituídos em refluxo de etanol, com rendimentos médios para os produtos de 70%.

Esquema 7. Síntese de uma série de TZDs realizada em duas etapas pelo método de aquecimento térmico convencional (PUROHIT *et al.* 2012)



Um estudo realizado por CHINCHILLI, K.K. *et al.*, 2023, quatro séries de novos derivados de rodanina foram sintetizadas e avaliadas quanto à sua atividade inibitória

contra as isoformas da anidrase carbônica I, II, IX e XII. Os compostos apresentaram boa atividade inibitória contra a isoforma citosólica hCA II e a isoforma associada a tumores hCA IX.

Enquanto os derivados de rodanina-benzilideno e os derivados de rodanina-hidrazina demonstraram seletividade para hCA II, os derivados N-carboxilados apresentaram alta seletividade para hCA IX. Por sua vez, os derivados ligados a isoxazol e 1,2,4-oxadiazol exibiram atividade inibitória contra ambas as isoformas, hCA II e hCA IX. O mecanismo de ação desses derivados foi confirmado por estudos de docking molecular, reforçando a interação com o sítio ativo das enzimas. Além disso, destacou-se que os derivados de rodanina sintetizados pertenciam a uma classe de inibidores de anidrase carbônica não sulfonamídicos, indicando seu potencial como novas ferramentas terapêuticas com seletividade diferenciada entre isoformas.

Em um outro estudo, realizado por KUMAR et al., 2024, dez derivados de hidantoína foram identificados e avaliados quanto à dupla inibição de duas enzimas (ALR2 e PARP-1), além da seletividade frente à aldeído redutase (ALR1), usando ensaios enzimáticos *in vitro*. As moléculas projetadas foram submetidas a análises de modelagem molecular baseadas em estrutura, incluindo docking molecular e simulações de dinâmica molecular. Com base nos resultados *in silico* e *in vitro*, as três melhores moléculas foram testadas *in vivo* quanto ao seu efeito nefroprotetor e potencial antioxidante em modelo de rato diabético induzido por dieta rica em gordura e estreptozotocina.

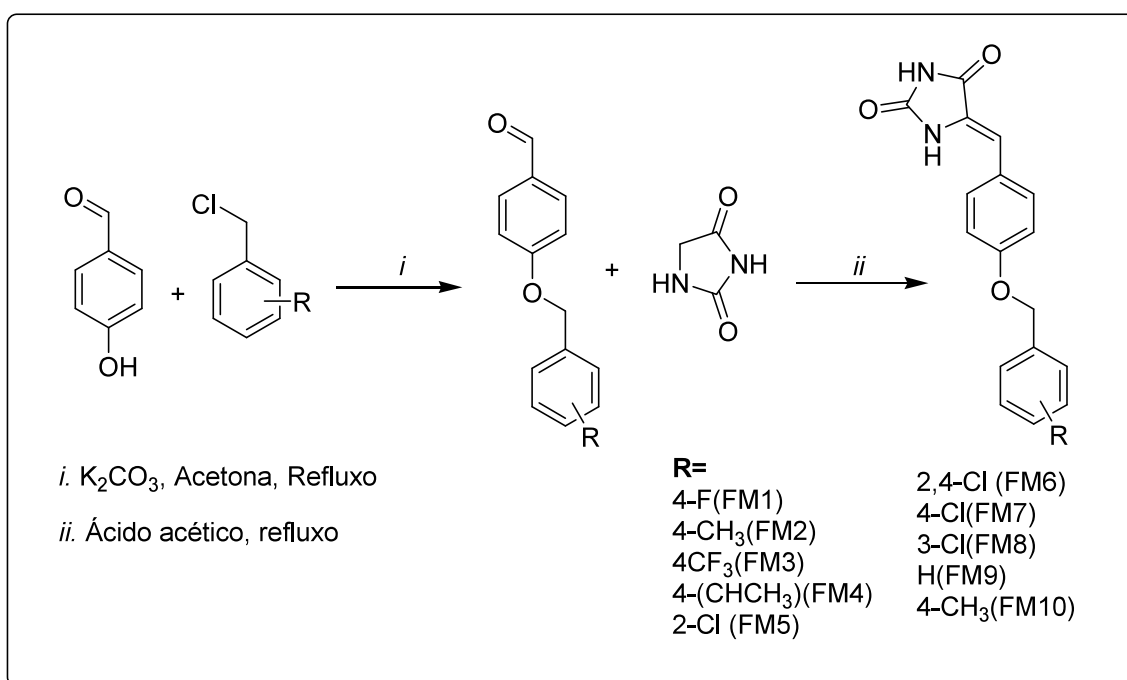
Os resultados mostraram que os compostos FM6, FM7 e FM9 apresentaram baixo potencial inibitório micromolar contra ALR2 (IC₅₀: 1,02; 1,14 e 1,08 µM, respectivamente) e PARP-1 (IC₅₀: 0,95; 0,81 e 1,42 µM, respectivamente), com boa seletividade sobre ALR1 (índice de seletividade: 43,63; 37,03 e 45,14, respectivamente). Este estudo partiu da necessidade de desenvolver novos fármacos para a nefropatia diabética, considerada uma das complicações mais graves do diabetes mellitus e estreitamente relacionada à ativação de duas vias bioquímicas críticas: a via do poliol e o mecanismo unificado. Dentro desse contexto, a inibição das enzimas-chave aldose redutase (ALR2) e poli(ADP-ribose) polimerase-1 (PARP-1) surge como uma estratégia terapêutica promissora.

A síntese desses derivados da hidantoína foi realizada em duas etapas reacionais:

1º) O-alkilação do 4-hidroxibenzaldeído com cloretos de benzila substituídos (na presença de K₂CO₃ em acetona sob refluxo) para formar derivados benzaldeídicos substituídos.

2º) Condensação multicomponente desses aldeídos substituídos com β-alanina e imidazolidina-2,4-diona em ácido acético glacial, sob refluxo, levando à formação dos produtos FM1–FM10 (Esquema 8).

Esquema 8. Reação em duas etapas de derivados da hidantoína KUMAR *et al.*, 2024



Portanto, a literatura evidencia que tanto as tiazolidinonas quanto as imidazolidinonas representam classes promissoras de heterociclos com amplo espectro de potenciais biológicos. As tiazolidinonas destacam-se por suas propriedades anticancerígenas, antimicrobianas, anti-inflamatórias e antioxidantes, tornando-se alvos estratégicos no desenvolvimento de novos fármacos (GIGLIO *et al.*, 2022). Por sua vez, as imidazolidinonas, com ênfase na hidantoína e seus derivados, demonstraram atividades relevantes como anticonvulsivantes, antimaláricas, antimicrobianas e inibidoras de anidrases carbônicas, além de apresentarem perfis de segurança interessantes em diversos estudos (LIU *et al.*, 2020).

Esses achados reforçam que ambas as classes oferecem um rico potencial farmacológico, com diferentes mecanismos de ação que podem ser explorados em áreas críticas da terapêutica, como o tratamento de doenças neurodegenerativas, infecciosas e oncológicas. Nesse sentido, as tiazolidinonas e imidazolidinonas consolidam-se como estruturas-chave para o desenho racional de novos candidatos a fármacos, justificando a continuidade de investigações químicas e biológicas direcionadas a esses núcleos heterocíclicos.

3.5 Conceitos gerais sobre a técnica de docking molecular

O *docking* molecular é uma técnica de modelagem computacional amplamente utilizada para prever a interação entre moléculas, especialmente entre um ligante (como um fármaco ou composto bioativo) e um receptor biológico (geralmente uma proteína). Seu principal objetivo é estimar a melhor orientação e a afinidade de ligação entre essas moléculas, com base em critérios energéticos e estereoquímicos. Por meio dessa

abordagem, é possível simular o acoplamento do ligante ao sítio ativo do receptor, o que permite identificar compostos com potencial atividade biológica antes da realização de testes experimentais (BIGGIN; BOND, 2008).

A interpretação dos resultados de *docking* envolve a análise de diferentes parâmetros. O primeiro é a energia de ligação, geralmente expressa em kcal/mol: quanto mais negativo o valor, maior a afinidade estimada entre o ligante e o receptor. Além disso, o modo de ligação (ou *pose*) é avaliado para verificar se o ligante está corretamente posicionado na cavidade do receptor, formando interações estáveis e específicas com os resíduos do sítio ativo (PANTSAR; POSO, 2018).

Entre as interações mais relevantes, destacam-se ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas, π - π e π -cation. A presença e qualidade dessas interações são fundamentais para inferir a eficácia potencial do ligante. A análise comparativa entre diferentes ligantes permite priorizar aqueles com melhor desempenho para estudos posteriores (BIGGIN; BOND, 2008).

Por fim, sempre que possível, os dados de *docking* devem ser validados por métodos experimentais ou complementares, como simulações de dinâmica molecular, a fim de garantir a confiabilidade dos resultados obtidos *in silico* (TROTT; OLSON, 2009).

4. MANUSCRITO CIENTÍFICO

Os resultados desta dissertação foram organizados na forma de um manuscrito, no qual estão contemplados os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências Bibliográficas. O manuscrito foi estruturado e formatado de acordo com as normas de publicação da revista *Medicinal Chemistry*, da editora *Bentham Science*.

Thiazolidinone and Hydantoin Derivatives as Potential Monoamine Oxidase B Inhibitors

Cintia da Costa Vianna^a; Evelyn Mianes Besckow^b; Fabiane Knepper Zehetmeyer Fernandes^a; Guilherme Porto Vargas de Souza^a; Cristiani Folharini Bortolatto^b; César Augusto Brüning^b; Francieli Moro Stefanello^c; Wilson Cunico^{a*}

^aLaboratório de Química Aplicada a Bioativos (LaQuiABio), Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário s/n, Capão do Leão, RS, CEP: 96010-900, Brasil;

^bLaboratório de Bioquímica e Neurofarmacologia Molecular (LABIONEM), Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário s/n, Capão do Leão, RS, CEP: 96010-900, Brasil;

^cLaboratório de Neuroquímica, inflamação e Câncer (Neurocan) Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário s/n, Capão do Leão, RS, CEP: 96010-900, Brasil.

Context: With the increasing diagnosis of mental and neurodegenerative disorders, the search for new compounds with therapeutic potential has intensified, becoming the focus of numerous studies. In this context, heterocyclic organic compounds e.g. thiazolidinone and imidazolidinone may prove highly promising as inhibitors of monoamine oxidase B (MAO-B), an important target in the treatment of neurodegenerative diseases, such as Alzheimer's and Parkinson's.

Objective: This study aimed the in vitro and the in silico evaluation of some thiazolidinone and hydantoin derivatives regarding their potential MAO-B isoform inhibition.

Method: Four thiazolidinone and hydantoin derivatives were synthesized via the Knoevenagel condensation reaction between 4-(methylthio)benzaldehyde and the corresponding heterocyclic ring and were identified by Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry (GC-MS) and by hydrogen (¹H-NMR) and carbon (¹³C-NMR) Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. Subsequently, the inhibitory potential of the MAO-B isoform activity was evaluated through the in vitro tests in mouse brain tissue and in silico, using the computational technique of molecular docking.

Results: The in vitro results, at a fixed concentration of 200 µM, demonstrated significant inhibition of MAO-B activity, with compounds **3A** (5-(4-(methylthio)benzylidene)thiazolidine-2,4-dione) and **3D** (5-(4-(methylthio)benzylidene)-2-thioxoimidazolidin-4-one) promoting near-complete inhibition of 95% and 97%, respectively ($p \leq 0.001$). Compound **3B** (5-(4-(methylthio)benzylidene)-2-thioxothiazolidin-4-one), on the other hand, exhibited significant inhibition of MAO-B (89%), followed by compound **3C** (5-(4-(methylthio)benzylidene)imidazolidine-2,4-dione), which showed the lowest inhibition (72%), however, both displayed statistically significant results ($p \leq 0.001$). In contrast, in silico studies revealed that compounds **3A** (−7.8 kcal/mol) and **3C** (−7.8 kcal/mol) stood out by forming stable hydrogen bonds with key enzyme residues. Compound **3A** exhibited strong polar anchoring via a carbonyl group (Ser59 and Tyr60). While

compound **3C** stood out due to the bioisosteric substitution of the sulfur (S) atom for a –NH group, broadening the selectivity and forming the so-called "aromatic cage," which guides and stabilizes the molecules through π – π interactions (Tyr398 and Tyr435). The discrepancy between the docking predictions and the in vitro efficacy highlights the intrinsic limitations of this computational approach.

Conclusion: The results demonstrate the high inhibitory potential of the derivatives against the MAO-B isoform, with compounds **3A** and **3D** standing out. Despite the limitations of docking in predicting in vitro efficacy, the findings reinforce the relevance of thiazolidinone and hydantoin cores as promising candidates in the development of new MAO-B inhibitors.

Keywords: TZD, imidazolidinones, Knoevenagel, MAOIs, Molecular docking, MAO.

1. INTRODUCTION

Monoamine oxidase (MAO) is a flavin-containing enzyme located on the outer mitochondrial membrane, whose primary function is the oxidative deamination of endogenous amines, such as the neurotransmitter's serotonin, dopamine, and norepinephrine, as well as dietary amines. This rapid degradation process is essential for the regulation of neurotransmission and the maintenance of central nervous system homeostasis [1]. However, dysregulation of MAO activity has been implicated in the pathophysiology of various neurological disorders, including major depressive disorder (MDD) and neurodegenerative diseases such as Alzheimer's and Parkinson's [2].

As a therapeutic strategy, monoamine oxidase inhibitors (MAOIs) play a central role in the management of neuropsychiatric and neurodegenerative diseases. These compounds increase the availability of monoaminergic neurotransmitters in the synapses, thereby contributing to the improvement of symptoms associated with such disorders [3]. The need for new MAOIs with improved efficacy and safety profiles has stimulated extensive research in medicinal chemistry and pharmacology [4].

Among the monoamine oxidase isoenzymes, MAO-B stands out for its predominant expression in neurons and glial cells in the brain, especially in the striatal and cortical regions [3]. This isoenzyme is primarily responsible for the degradation of dopamine and other biogenic amines, playing a crucial role in the regulation of dopaminergic neurotransmission. MAO-B hyperactivity is associated with oxidative stress and neuronal death, processes linked to neurodegenerative diseases, such as Parkinson's and Alzheimer's [2]. Therefore, selective MAO-B inhibitors are promising for slowing the progression of these diseases and increasing the availability of neurotransmitters in the brain.

In this context, heterocyclic compounds have emerged as promising scaffolds in drug development. Thiazolidinone and imidazolidinone derivatives are particularly noteworthy due to their structural versatility and broad spectrum of reported biological activities, including antibacterial [5], antifungal [6], anti-inflammatory [7], antitumor [8], and antidepressant properties [9].

From a synthetic perspective, these heterocycles exhibit high reactivity, allowing for multiple structural modifications, such as N-alkylation, Knoevenagel condensation, thionation, and oxidation [10]. 2,4-Thiazolidinedione (TZD, **2A**) and rhodanine (**2B**), for instance, are classic structures in medicinal chemistry that have been extensively investigated in metabolic and oncological therapies [11]. Similarly, imidazolidinone derivatives, such as hydantoin and thiohydantoin, represent privileged structural motifs in medicinal chemistry. Hydantoin (imidazolidine-2,4-dione, **2C**) is characterized by multiple substitution sites that facilitate interactions with biological targets, which has led to the development of clinically relevant drugs, such as phenytoin [12]. Thiohydantoin (2-thioxo-imidazolidin-4-one, **2D**), a bioisosteric analogue of hydantoin, has also been widely studied for its antitumor potential [13].

Thus, the chemical and pharmacological relevance of these heterocycles highlights their potential as selective MAO-B inhibitors, reinforcing their value as scaffolds for the development of new therapeutic agents. Therefore, this study aimed at the inhibitory

potential of derivatives containing the thiazolidinone and hydantoin cores in an in vitro and in silico MAO-B isoform assays, with the goal of identifying new inhibitors of the MAO-B isoform, for the purpose of developing new drugs for the treatment of neurodegenerative diseases.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1 Chemistry

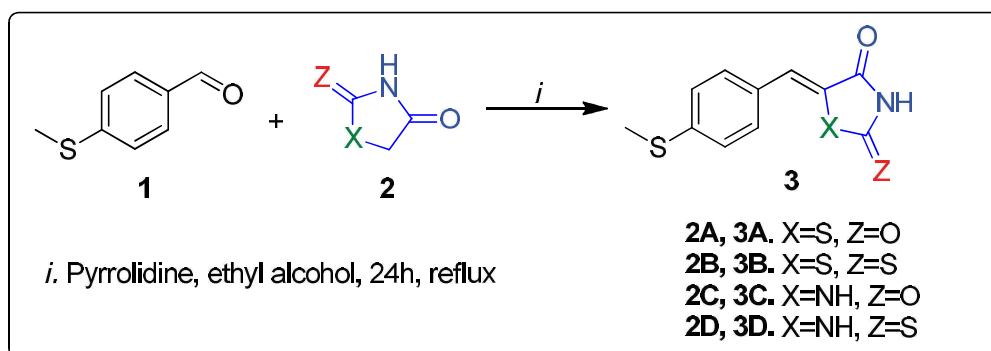
2.1.1 General

The reagents and solvents were acquired from commercial suppliers and used without further purification. The progress of the reactions was monitored by thin-layer chromatography (TLC), using a mixture of hexane:ethyl acetate (3:1) as the eluent. The desired compounds were subsequently identified by Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Spectroscopy, including ^{13}C and ^1H spectra, at a Bruker Ascend 400 spectrometer (^1H at 400 MHz and ^{13}C at 100 MHz) in DMSO-d_6 . The mass spectra were obtained on a Shimadzu GCMS-QP2010-Plus instrument, equipped with a split-splitless injector and coupled to an Rtx-5 capillary column (30 m $\times$ 0.25 mm $\times$ 0.25 μm), using helium as the carrier gas at 0.99 mL/min.

2.1.2 General Procedure for the Synthesis of Thiazolidinone and Imidazolidinone Derivatives 3A-3D

The synthesis of the thiazolidinone and hydantoin derivatives was carried out following the methodology previously described by Bruno et al., 2002 [14] (Scheme 1), and were named 5-(4-(methylthio)benzylidene)thiazolidine-2,4-dione (**3A**) [15], 5-(4-(methylthio)benzylidene)-2-thioxothiazolidin-4-one (**3B**) [16], 5-(4-(methylthio)benzylidene)imidazolidine-2,4-dione (**3C**) [17], and 5-(4-(methylthio)benzylidene)-2-thioxoimidazolidin-4-one (**3D**) [18] (Figure 1).

Scheme 1. Synthetic route for obtaining the thiazolidine and hydantoin derivatives 3A-3D



2.2 Animals

Adult male and female Swiss mice (2 months) weighing between 30–35g were obtained from the Central Biotery of the Federal University of Pelotas (UFPeI). These

animals were maintained under controlled environmental conditions, specifically at a temperature of 22 ± 1 °C, with a 12-hour light/dark cycle. They were provided with ad libitum access to water and standard chow. All animal procedures were performed in accordance with the Guidelines for Care and Use of Laboratory Animals at the Federal University of Pelotas (UFPEl). The experiments were approved by the Ethics Committee on Animal Use (CEUA) at the UFPEl under the number (028361/2022-92), which is associated with the Council for Control of Animal Experiments (CONCEA). Animal care followed the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978). Every effort was made to minimize animal suffering and limit the number of animals used in the experiments. This research was conducted in accordance with internationally recognized standards for animal experimentation, applying the 3Rs principle. Experimental procedures involving live animals were reported in compliance with the ARRIVE guidelines, ensuring adherence to ethical research practices.

2.3 In vitro protocol

The compounds were evaluated against the MAO-B isoform at a fixed concentration of 200 μ M. Brain tissue homogenates were prepared from male and female Swiss mice, with a total of 10 animals employed. Enzymatic measurements were performed in three independent experiments [19].

For this protocol, the mice were euthanized with isoflurane to obtain the cerebral cortex rich in mitochondria, prepared according to a previous study [14]. The brain tissue was used for the in vitro assay of MAO-B activity. In this technique, the compounds **3A-3D** were dissolved in the vehicle DMSO (final concentrations of 200 μ M) and added to the incubation of the mitochondrial fraction, as previously described [15]. Each compound was compared with the vehicle group.

2.3.1 MAO-B activity inhibition assay

For the determination of enzymatic activity, the samples were incubated at 37 °C for 5 min in a buffer solution containing 250 nM clorgyline, a selective MAO-A inhibitor, allowing for the specific quantification of MAO-B activity. Subsequently, 60 μ M kynuramine dihydrobromide was added as the substrate, and the reaction was maintained at 37 °C for 30 min. The reaction was stopped by the addition of 10% trichloroacetic acid (TCA), followed by centrifugation at 16,000 g for 5 min. The supernatant was mixed with 2 mL of 1 M NaOH, and the fluorescence intensity was measured on a spectrofluorometer (excitation: 315 nm; emission: 380 nm). The enzymatic activity was expressed in nmol of 4-hydroxyquinoline/mg of protein.

2.4 In silico test

The two-dimensional (2D) structures of the chemical compounds were sketched in ChemDraw and subsequently converted into three-dimensional (3D) structures using Avogadro 0.9.4. Geometry optimization was performed using the General Amber Force Field (GAFF) method [20]. The 3D structures of the MAO-B (PDB ID: 5MRL) isoform was

obtained from the Protein Data Bank (www.rcsb.org/pdb) in PDB format. The Chimera 1.5.3 software was used to remove water molecules, ions, and co-crystallized ligands. Subsequently, AutoDock Tools 1.5.4 was used to add polar hydrogens, calculate Gasteiger charges, and perform energy minimization with 500 steps. The rotatable bonds of the ligands were set to rotate freely, while the receptors were considered rigid [20]. Molecular docking simulations were performed using AutoDock Vina with a grid box encompassing the entire enzyme structure, allowing for the search of multiple potential interaction sites [21]. Ligand-receptor interactions were analyzed using Discovery Studio Visualizer 2016.

2.5 Statistical analysis

For the statistical analysis, the GraphPad Prism software, version 8.0, was used. Comparisons between experimental groups were performed using one-way ANOVA, followed by Tukey's test (for parametric data). The data are expressed as mean $\pm$ standard error of the mean (S.E.M.). Statistical differences were considered significant when $P \leq 0.05$. Effect size r were calculated using “effect size calculators” available in <https://www.uccs.edu/lbecker>.

3. RESULTS

3.1 Chemistry

The synthesis of compounds **3A–3D** was performed under a single reaction condition, in which 4-(methylthio)benzaldehyde (**1**) reacted with different heterocyclic nuclei (**2A–2D**) via a Knoevenagel reaction, using pyrrolidine as a base and ethanol as a solvent, resulting in thiazolidinone (**3A**, **3B**) and hydantoin (**3C**, **3D**) derivatives after 24 hours (Scheme 1). Compounds **3A–3D** were obtained with yields ranging from 65 to 82% and identified by NMR (^1H and ^{13}C) and GC-MS techniques. Among the tested compounds, **3A** and **3D** stood out as the most potent inhibitors, promoting near-complete suppression of enzymatic activity.

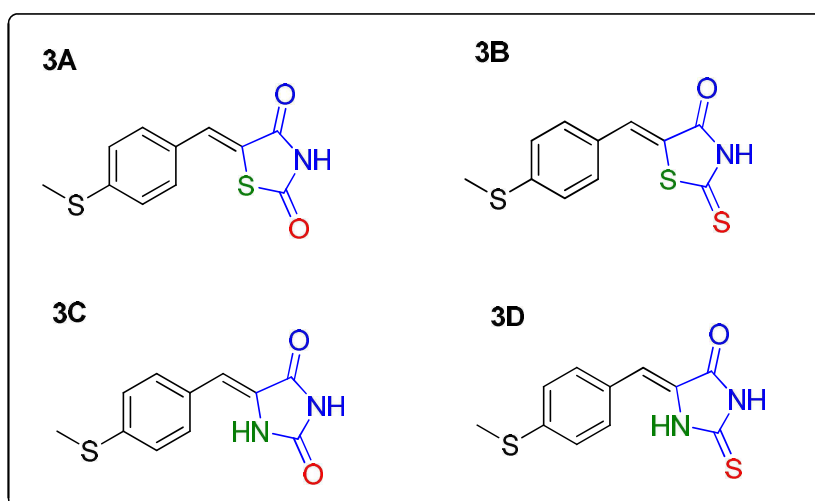


Figure 1. Chemical structure of the thiazolidine and hydantoin derivatives evaluated in this work.

3.2 Effects of compounds **3A**, **3B**, **3C** e **3D** on MAO-B activity

MAO-B activity was evaluated in vitro in the presence of compounds **3A**, **3B**, **3C**, and **3D**, at a fixed concentration of 200 μ M. As shown in Figure 2, all compounds exhibited a significant inhibitory effect compared to the control group (V, DMSO) ($F(4, 10) = 404.8$; $P < 0.0001$), which displayed an average activity close to 8 nmol of 4-OH-quinoline/mg protein/min. Among the tested compounds, **3A** and **3D** stood out as the most potent inhibitors, promoting near-complete suppression of enzymatic activity. Compound **3A** reduced MAO-B activity to minimal levels, with 95% inhibition, suggesting a strong interaction with the catalytic site (effect size $r = 0.997$). Similarly, compound **3D** showed a value slightly higher inhibition, reaching 97% (effect size $r = 0.997$). On the other hand, compound **3B** promoted significant inhibition, of 89% (effect size $r = 0.996$), although less pronounced than that of **3A** and **3D**, while compound **3C** showed the smallest reduction in enzymatic activity, with 72% inhibition (effect size $r = 0.989$).

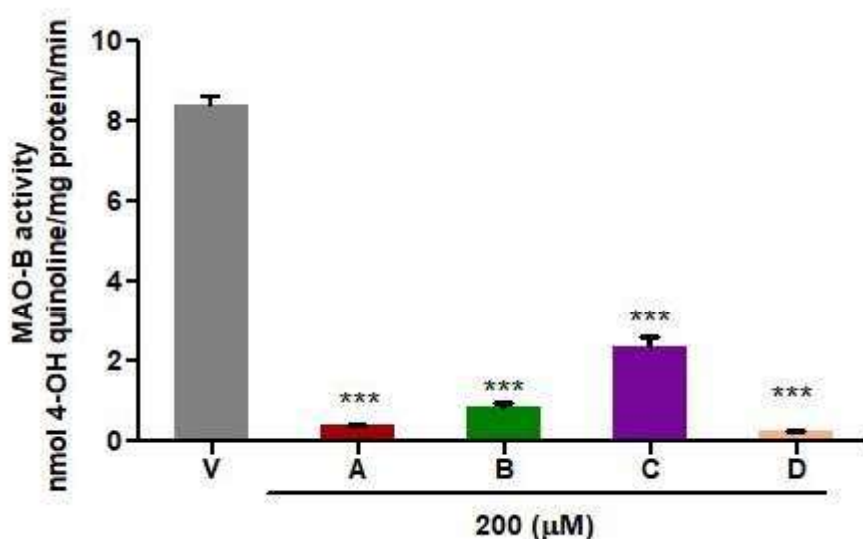


Figure 2. Effect of compounds **3A** to **3D** at a fixed concentration (200 μ M) on cerebral MAO-B activity. The results are expressed as mean $\pm$ standard error of the mean (S.E.M.). Statistical analysis was performed by one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test. (**) $p \leq 0.01$, (***) $p \leq 0.001$ compared to the vehicle group (V, DMSO).

3.3 Molecular docking analysis of the MAO-B isoform for compounds **3A**–**3D**

Molecular docking indicated that compounds **3A** to **3D** exhibit binding energies between -7.6 and -7.8 kcal/mol (Table 1), values that suggest stable interactions with the MAO-B active site, as more negative values reflect higher affinity for the enzymatic target. Compounds **3A** and **3C** showed higher affinity (-7.8 kcal/mol), while **3D** and **3B**

presented close values (−7.7 and −7.6 kcal/mol, respectively). Although the difference is small, the overall results suggest that all derivatives possess good interaction capacity with the enzyme, partially aligning with the experimental findings.

Table 1. Molecular docking analysis between compounds **3A–3D** and the MAO-B isoform

Compound	MAO-B Binding Affinity (Kcal/mol)	MAO-B-Residues
3A	-7,8	SER59, TYR60, LEU171, CYS172, ILE199, TYR326 e TYR398
3B	-7,6	GLU34, ALA35, ARG36, GLY41, ILE264, LYS271, ILE272, TYR393 e HIS273
3C	-7,8	LEU171, TYR398 e TYR435
3D	-7,7	GLY13, ILE14, SER15, GLY16, ARG42, ALA263, TYR435, MET436 e ALA439.

Compound **3A** formed hydrogen bonds with SER59 and TYR60, in addition to π -sulfur and π - π interactions with TYR60 (Figure 3).

The aromatic ring interacted with LEU171 (Pi-Alkyl) and CYS172 (π -Sulfur), while ILE199 and TYR326 recognized the methyl group (π -Alkyl). Furthermore, the aromatic and heterocyclic rings established π - π stacking interactions with TYR398, suggesting stable anchoring within the active site [20].

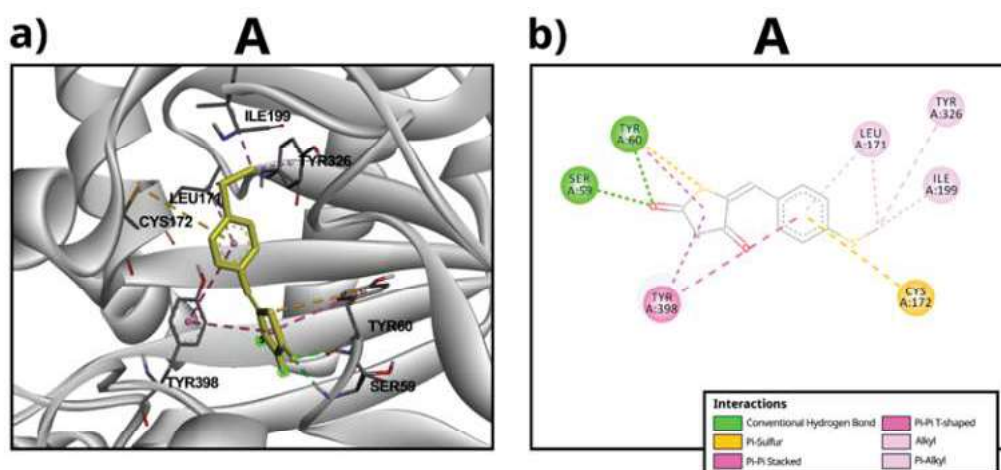


Figure 3. Representation of amino acid residue interactions between compound **3A** and MAO-B (PDB ID: 5MRL) (A) and detailed interactions (B) through molecular docking simulation techniques.

Subsequently, the carbonyl group of compound **3B** formed a conventional hydrogen bond with ARG36 and a C–H-type hydrogen bond with GLY41 (Figure 4). The heterocyclic ring established a π -anion interaction with GLU34, while the aromatic ring participated in π -Sigma interactions with ALA35 and ILE264, as well as a T-shaped π - π interaction with

TYR393. The sulfur-containing side chain contributed additional hydrophobic contacts through Pi-alkyl interactions with LYS271 and HIS273, along with an alkyl interaction with ILE272.

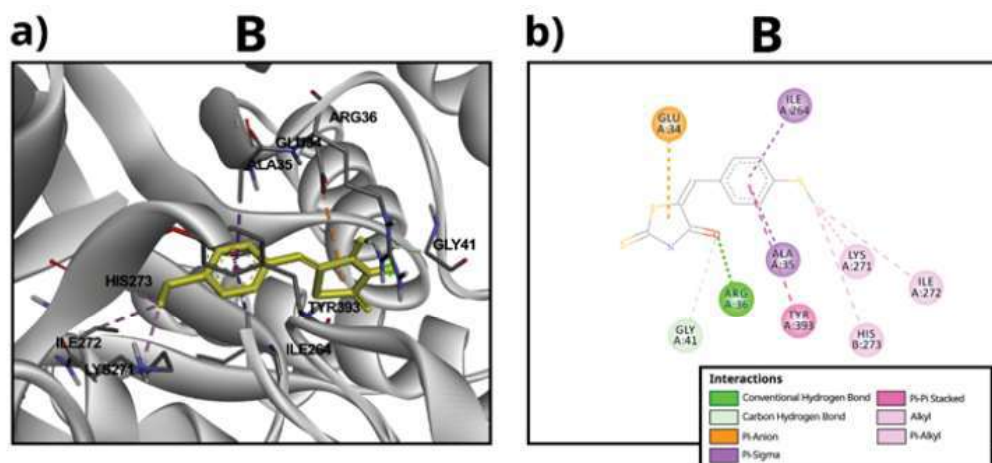


Figure 4. Representation of amino acid residue interactions between compound **3B** and MAO-B (PDB ID: 5MRL) (A) and detailed interactions (B) through molecular docking simulation techniques.

Subsequently, the ligand's carbonyl group in compound **3C** formed conventional hydrogen bonds with TYR398 and TYR435 (Figure 5). The heterocyclic ring participated in a π -alkyl interaction with LEU171, reinforcing the hydrophobic anchoring within the cavity. The aromatic ring promoted T-shaped π - π interactions with TYR398 and TYR435, enhancing its stabilization within the active site [19].

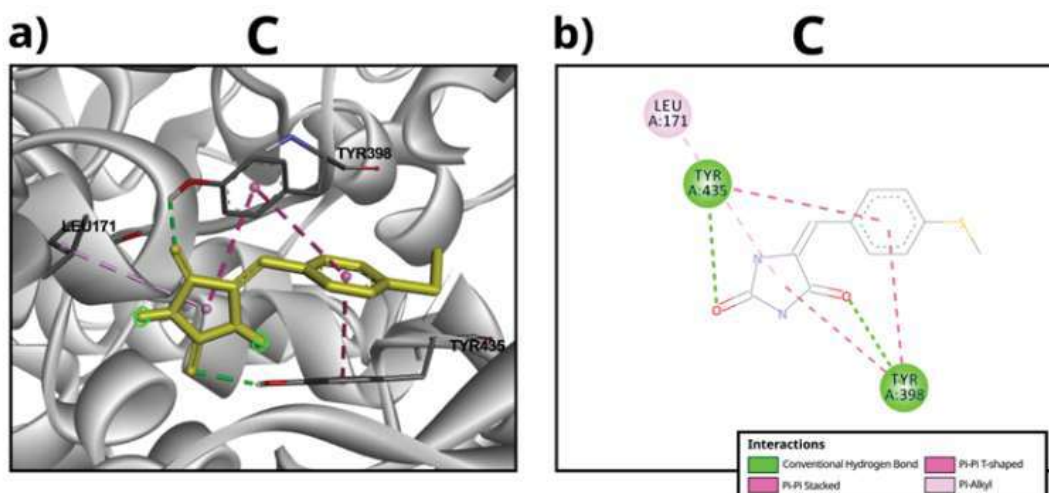


Figure 5. Representation of amino acid residue interactions between compound **3C** and MAO-B (PDB ID: 5MRL) (A) and detailed interactions (B) through molecular docking simulation techniques.

Finally, the ligand's carbonyl group in compound **3D** formed conventional hydrogen bonds with GLY16 and SER15, while the heterocyclic ring participated in a π -Sigma interaction with GLY13, contributing to the stabilization in the active site (Figure 6) [20]. The nitrogen atom in the same ring also formed a hydrogen bond with ALA263. However, an unfavorable donor-donor interaction was observed with ARG42, suggesting possible local electrostatic repulsion. The ligand's aromatic ring contributed hydrophobic π -Alkyl interactions involving ILE14, ARG42, and ALA439, as well as a stacked amide- π interaction with TYR435. Additionally, the methyl group formed a hydrophobic contact through a π -Alkyl interaction with ARG42.

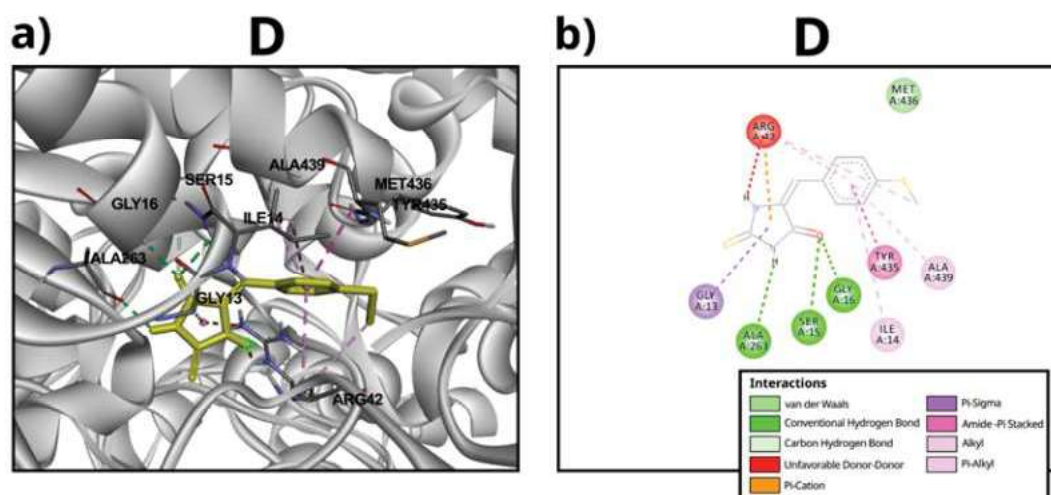


Figure 6. Representation of amino acid residue interactions between compound **3D** and MAO-B (PDB ID: 5MRL) (A) and detailed interactions (B) through molecular docking simulation techniques.

3. DISCUSSION

The brain, essential in regulating the body, is the target tissue for the investigation of compounds with biological potential [22]. Inhibitors of the MAO-B isoform play a crucial role in understanding the biochemical pathways related to neurodegenerative disorders, especially Parkinson's and Alzheimer's disease [23]. Our results showed that all four compounds (**3A-3D**) analyzed exhibited potential for inhibiting this isoform.

Regarding the synthesis of the compounds, although dimethylformamide (DMF) is commonly used as a solvent in the preparation of thiazolidine and hydantoin derivatives [24], ethanol was chosen due to its lower toxicity and greater environmental safety. Despite slightly prolonging the reaction time, the yields obtained were comparable to those reported for DMF (~80%), demonstrating the feasibility of using ethanol without compromising the efficiency of the synthesis. The yield obtained in this study was also comparable to the values previously reported for the methodology used, which ranged from 52 to 80%.

The results of the in vitro screening (Figure 2) showed that the four derivatives (**3A-3D**) significantly reduced MAO-B activity, with statistical significance ($p \leq 0.001$), albeit with distinct intensities, reflecting their structural differences. Compounds **3A**

(thiazolidine-2,4-dione core) and **3D** (thiohydantoin core) were the most effective, exhibiting enzyme inhibition of 95% and 97%, respectively, at a fixed concentration of 200 μ M, suggesting their action as potent enzyme blockers. Compound **3B** (rhodanine core) also showed relevant inhibition (89%), while compound **3C** (hydantoin core) was the least active (72%), indicating moderate inhibitory capacity, possibly of a competitive nature, with lower affinity for the active site compared to the other compounds [25,26,27].

The greater activity of compound **3A** can be attributed to its two activated carbonyl groups, which favor the formation of hydrogen bonds. **3B** exhibited intermediate potency, possibly due to the electrophilic character of the rhodanine ring and the additional polarizability of sulfur, allowing interactions with nucleophilic residues [25]. **3C**, in turn, showed lower activity, suggesting that the excess of polar groups and hydrogen bond donors/acceptors hinders accommodation in a predominantly hydrophobic cavity. Finally, **3D** likely showed higher inhibition due to the bioisosteric substitution $C=O \rightarrow C=S$ in the hydantoin ring, increasing hydrophobicity, allowing additional interactions (π -sulfur and van der Waals), and promoting an adequate balance between hydrogen bonds and hydrophobic forces in the MAO-B cavity [26, 27].

The selective inhibition of the monoamine oxidase B enzyme is a promising strategy for the treatment of neurodegenerative diseases, such as Parkinson's and Alzheimer's, as it helps preserve dopamine levels in the central nervous system [19]. Considering this therapeutic potential and the promising in vitro results of the four compounds, we conducted molecular docking of a new class of compounds to evaluate their affinity and interaction mode with the MAO-B isoform, aiming to identify selective and effective inhibitors.

The results of the in silico test indicated that compound **3A** (Figure 3) anchors stably in the enzyme's bipartite active site, positioning itself between the entrance cavity and the substrate cavity, a region whose access is regulated by the so-called "gating" residues Ile199 and Tyr326 [28]. These residues modulate the volume and connectivity between the cavities and are decisive in the recognition of substrates and inhibitors, contributing to the typical selectivity of the B isoform [29].

Within the catalytic cavity, the ligand establishes π - π interactions with Tyr398, which, together with the FAD cofactor, compose the "aromatic cage," guiding and stabilizing molecules through these interactions [30]. The position and spatial arrangement of the tyrosine residues in the active site of the MAO-B isoform appear consistently in the enzyme's crystallographic structures. This positioning is directly related to how reversible inhibitors manage to bind with greater affinity to this isoform [31].

In addition to aromatic interactions, hydrogen bonds with Ser59 and Tyr60 were observed, an anchoring frequently described for MAO-B inhibitors, which helps fix the orientation of compound **3A** at the entrance of the catalytic tunnel. Such contacts tend to increase the overall affinity and stability of the complex [30]. The model also highlights a π -sulfur interaction with Cys172, a hydrophobic residue that serves as an interaction point with aromatic systems, capable of reinforcing the ligand's fixation near FAD, supporting a competitive inhibition mode [32]. Finally, hydrophobic contacts with Leu171 and Ile199, along with Tyr326, consolidate the docking of compound **3A** within the

predominantly apolar cavity of MAO-B, associated with gains in affinity and selectivity for the B isoform [31].

In contrast to compounds that penetrate deeply into the substrate cavity, compound **3B** (Figure 4) appears to anchor preferentially in the entrance region of the MAO-B cavity, supported by interactions with GLU34 (π -anion), ARG36 (conventional hydrogen bond), and GLY41 (carbon hydrogen bond) [31], as well as hydrophobic and π - π / π -alkyl interactions involving aromatic and aliphatic residues such as Tyr393, Ala35, Ile264, Ile272, and His273. These residues are described as fundamental for ligand anchoring in the enzyme's active site, playing a central role in positioning relative to the FAD cofactor [30]. The observed π - π interaction with Tyr393 plays an important modulatory role, as this residue is located near the catalytic center and is recognized as essential for the stabilization of classic MAO-B inhibitors, such as selegiline [33].

By anchoring at the entrance of the cavity, compound **3B** interacts with polar and charged residues, suggesting an alternative inhibitory mechanism based on the exploitation of specific peripheral regions of MAO-B, rather than occupying the deep catalytic pocket shared by other ligands. The presence of hydrophobic interactions with residues such as Ile264 and Ile272 is also observed, contributing to the compound's accommodation in the enzyme's hydrophobic site, a region determinant for MAO-B selectivity relative to MAO-A [27]. This profile suggests that compound **3B** also exhibits potential selectivity for the B isoform, an important characteristic in candidate drugs for neurodegenerative diseases, such as Parkinson's disease [34].

Compound **3C** (Figure 5) showed interaction with the MAO-B catalytic cavity through a distinct set of interactions, such as conventional hydrogen bonds with Tyr398 and Tyr435, in addition to hydrophobic and π - π interactions with Leu171. These residues are in the region known as the enzyme's entrance cavity, responsible for delineating the passage between the entrance and the catalytic pocket, serving as a relevant hydrophobic anchoring point [35]. The Tyr435 residue is particularly important, as it participates in the so-called "aromatic arc," which contributes to MAO-B selectivity relative to MAO-A and stabilizes ligand binding through π - π or π -cation interactions with aromatic rings present in substrates or inhibitors [30]. From a pharmacological perspective, partial or moderate MAO-B inhibitors may reduce dopamine degradation without causing absolute enzyme blockade, minimizing potential adverse effects associated with complete inhibition [27]. Thus, compound **3C** emerges as a molecule of interest for further investigations and may be considered a prototype for selective MAO-B modulators.

Lastly, the molecular docking analysis showed that compound **3D** (Figure 6) primarily anchors at the entrance of the MAO-B catalytic cavity. This peripheral anchoring mode could confer inhibitory activity by sterically blocking the access pathway and acting as an obstacle to substrate transit toward the catalytic FAD [35]. Among the main interactions observed, conventional hydrogen bonds with GLY16 and SER15 stand out, along with a carbon-H bond with ALA263, which contribute to the stable orientation of the ligand within the catalytic cavity [28]. These initial hydrophilic interactions act as "anchors" that restrict the compound's mobility and favor its retention in the binding site [30].

Furthermore, a significant network of hydrophobic and aromatic interactions involving TYR435, ILE14, ALA439, and MET436 was observed, creating a stabilizing apolar microenvironment for the compound's aromatic core [37].

On the other hand, an unfavorable donor-donor interaction was observed, which may introduce a local energy penalty. This type of interaction occurs when two hydrogen-donating groups are in proximity without an available acceptor group, resulting in repulsion or instability. This observation indicates that these specific positions of the ligand do not favor stable binding to the enzyme [30].

From a pharmacological perspective, the intense interaction of compound **3D** with the MAO-B catalytic site indicates that its action occurs predominantly in a competitive manner, preventing the substrate from approaching the FAD cofactor [28]. This type of mechanism resembles that observed in irreversible inhibitors already used clinically for neurodegenerative diseases, such as Parkinson's disease [22]. Furthermore, the presence of multiple contact points may enhance both the affinity and stability of the ligand, important characteristics for the development of new therapeutic agents [36].

Overall, the results obtained from the in vitro assays demonstrated that all evaluated compounds exhibited a significant inhibitory effect on MAO-B activity, albeit with varying magnitudes. Among them, compounds **3A** (TZD derivative) and **3D** (thiohydantoin derivative) displayed the most pronounced effects, while compound **3B** (rhodanine derivative) and compound **3C** (hydantoin derivative) showed good inhibition at 200 μ M.

The in silico analysis through molecular docking allowed for the understanding of the molecular determinants responsible for these effects. Compound **3D**, for example, established a robust network of interactions in the MAO-B active site, including hydrogen bonds (GLY13, SER15), hydrophobic interactions with critical residues (TYR435, ALA439, ILE14, MET436), and a relevant π -cation interaction with ARG42, which helps explain its high inhibitory potency observed in vitro [37].

The distinct results obtained for the thiazolidine-2,4-dione (**3A**), rhodanine (**3B**), hydantoin (**3C**), and thiohydantoin (**3D**) derivatives suggest that, in addition to the central heterocyclic core, the substituents present on these rings play a determining role in the affinity and interaction pattern with MAO-B. These substituents may influence the compound's lipophilicity, as less polar substituents tend to improve complementarity with hydrophobic regions of the MAO-B active site, favoring interactions with residues such as ILE14, ALA439, and MET436. Given that the bioisosteric exchange C=O (carbonyl) $\rightarrow$ C=S (thiocarbonyl) reduces the compound's polarity and increases its hydrophobicity, it is understandable why compound **3D** exhibited high activity in the in vitro test [39].

Another factor that may influence the compound's interaction with the enzyme is its spatial orientation, where the size and position of substituents can either facilitate or hinder proper docking into the enzyme's catalytic site [40]. These factors help explain why, although all compounds possess related heterocyclic cores and exhibit MAO-B inhibition, only some (compounds **3A** and **3D**) demonstrated higher inhibitory activity in vitro.

Considerations regarding the limitations include the restricted number of molecules studied and the absence of further in vitro tests, such as dose-response assays for the

analyzed compounds. These factors are acknowledged, and future studies will address these aspects with a larger series of thiazolidine and hydantoin derivatives, as well as additional tests for a more comprehensive evaluation of the MAO-B enzyme inhibitory action attributed to these heterocycles.

4. CONCLUSION

The results obtained in this study demonstrate that the four tested compounds possess the ability to inhibit MAO-B activity, with compounds **3A** and **3D** standing out for exhibiting the most pronounced effects in the in vitro test. The integration between in vitro assays and in silico molecular docking simulations was essential to understand the underlying mechanisms of this activity, allowing the correlation of enzymatic efficacy with the pattern of interactions established in the enzyme's active site. Thus, while the in vitro experiments confirmed the effectiveness of the compounds in reducing enzymatic activity, the in silico analyses provided a detailed view of the molecular interactions responsible for this action, strengthening the rationale for selecting the most promising compounds. Therefore, the combined approach used in this study not only validates the inhibitory potency of the compounds but also reinforces the importance of integrated investigative strategies for the development of new selective inhibitors of the MAO-B isoform with potential therapeutic application in neurodegenerative diseases.

5. ETHICAL APPROVAL AND CONSENT FOR PARTICIPATION

This study was approved by the Ethics Committee of the Federal University of Pelotas (UFPel), Brazil, under approval number 028361/2022-92.

6. HUMAN AND ANIMAL RIGHTS

No humans were used. All animal procedures complied with the standards of the "Principles of Laboratory Animal Care" from the National Institutes of Health (NIH).

7. CONFLICT OF INTERESTS

There are no financial or other conflicts of interest.

8. ACKNOWLEDGMENTS

The present work was carried out with the support of the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel – Brazil – (CAPES) – Financing Code 001.

9. REFERENCES

1. RIALETTE HITGE; ANÉL PETZER; PETZER, J. P. Isatoic anhydrides as novel inhibitors of monoamine oxidase. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 73, p. 117030–117030, 23 set. 2022.
2. TRIPATHI, R. K. P.; AYYANNAN, S. R. Monoamine oxidase-B inhibitors as potential neurotherapeutic agents: An overview and update. *Medicinal Research Reviews*, v. 39, n. 5, p. 1603–1706, 2 jan. 2019.
3. TAN, Y.-Y.; JENNER, P.; CHEN, S.-D. Monoamine Oxidase-B Inhibitors for the Treatment of Parkinson's Disease: Past, Present, and Future. **Journal of Parkinson's Disease**, v. 12, n. 2, p. 477–493, 15 fev. 2022.
4. GALLARDO-GODOY, A. et al. Sulfur-Substituted α -Alkyl Phenethylamines as Selective and Reversible MAO-A Inhibitors: Biological Activities, CoMFA Analysis, and Active Site Modeling. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 48, n. 7, p. 2407–2419, 16 fev. 2020.
5. BRATTY, M. A. et al. The Spectrum of Thiazolidinediones against Respiratory Tract Pathogenic Bacteria: An In Vitro and In Silico Approach. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 21, n. 14, p. 1457–1469, 18 jun. 2020.
6. MARC, G. et al. 3,5-Disubstituted Thiazolidine-2,4-Diones: Design, Microwave-Assisted Synthesis, Antifungal Activity, and ADMET Screening. **SLAS DISCOVERY**, v. 23, n. 8, p. 807–814, 13 fev. 2018.
7. REZAEI, A. R. et al. Investigating the effective factors influencing surface runoff generation in urban catchments – A review. **DESALINATION AND WATER TREATMENT**, v. 164, p. 276–292, 2019.
8. THAKUR, G. S. et al. Designing novel cabozantinib analogues as p-glycoprotein inhibitors to target cancer cell resistance using molecular docking study, ADMET screening, bioisosteric approach, and molecular dynamics simulations. **Frontiers in Chemistry**, v. 13, 27 fev. 2025.
9. KATARZYNA KUCWAJ-BRYSZ et al. The Importance of Stereochemistry in 5-HT₇R Modulation-A Case Study of Hydantoin Derivatives. **ACS Chemical Neuroscience**, 21 out. 2024.
10. KUMAR, H. et al. Thiazolidin-2,4-Dione Scaffold: An Insight into Recent Advances as Antimicrobial, Antioxidant, and Hypoglycemic Agents. **Molecules**, v. 27, n. 19, p. 6763, 10 out. 2022.
11. GUO, Y. et al. Discovery of a novel 2,4-thiazolidinedione derivative as dual inhibitor of β -catenin/TCF4 interaction and tubulin polymerization in colon cancer cells. **Archiv der Pharmazie**, v. 358, n. 3, mar. 2025.
12. LIU, X. et al. Comprehensive understanding of magnetic hyperthermia for improving antitumor therapeutic efficacy. **Theranostics**, v. 10, n. 8, p. 3793–3815, 19 fev. 2020.
13. SURESH, J. et al. 3-[2-Cyclopropyl-1-(2-fluorophenyl)-2-oxoethyl]-5-(4-methylsulfanylbenzylidene)-1,3-thiazolidine-2,4-dione. **Acta Crystallographica Section E Structure Reports Online**, v.69, n.2, p.188-198, 4 jan. 2013
14. BRUNO, G. et al. Synthesis and aldose reductase inhibitory activity of 5- arylidene-2,4-thiazolidinediones. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 10, n. 4, p. 1077–1084, abr. 2002.

15. TOMASIC, T.; MASIC, L. Rhodanine as a Privileged Scaffold in Drug Discovery. **Current Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 13, p. 1596–1629, 1 maio 2009.
16. KHANFAR, M. A. et al. The marine natural-derived inhibitors of glycogen synthase kinase-3 β phenylmethylene hydantoins: In vitro and in vivo activities and pharmacophore modeling. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 16, p. 6032–6039, ago. 2009.
17. MOHAMED, B. et al. Synthesis of imidazolidine-2,4-dione and 2-thioxoimidazolidin-4-one derivatives as inhibitors of virulence factors production in *Pseudomonas aeruginosa*. **Archiv der Pharmazie**, v. 353, n. 5, 5 mar. 2020.
18. ÖZDEMİR, Z. et al. Monoamineoxidase-B (MAO-B) Inhibitors in the Treatment of Alzheimer's and Parkinson's Disease. **Current Medicinal Chemistry**, v. 28, 3 fev. 2021.
19. DUARTE, P. et al. Novel Series of Dual NRF2 Inducers and Selective MAO-B Inhibitors for the Treatment of Parkinson's Disease. **Antioxidants**, v. 11, n. 2, p. 247–247, 27 jan. 2022.
20. TROTT, O.; OLSON, A. J. AutoDock Vina: Improving the Speed and Accuracy of Docking with a New Scoring function, Efficient optimization, and Multithreading. **Journal of Computational Chemistry**, v. 31, n. 2, 2020.
20. BRUNO, G. et al. Synthesis and aldose reductase inhibitory activity of 5- arylidene-2,4-thiazolidinediones. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 10, n. 4, p. 1077–1084, abr. 2019.
22. KUMAR, S.; SENTHIL RAJA AYYANNAN. Identification of new small molecule monoamine oxidase-B inhibitors through pharmacophore-based virtual screening, molecular docking and molecular dynamics simulation studies. **Journal of biomolecular structure and dynamics/Journal of biomolecular structure & dynamics**, v. 41, n. 14, p. 6789–6810, 18 ago. 2022.
23. HALL, T. K. et al. Chalcogen dihydrobenzofuran compounds as potential neuroprotective agents: An in vitro and in silico biological investigation. **Biochimie**, 27 jan. 2025.
24. MARC, G. et al. New Phenolic Derivatives of Thiazolidine-2,4-dione with Antioxidant and Antiradical Properties: Synthesis, Characterization, In Vitro Evaluation, and Quantum Studies. **Molecules**, v. 24, n. 11, p. 2060, 30 maio 2019.
25. GAWESKA, H.; FITZPATRICK, P. F. Structures and Mechanism of the Monoamine Oxidase Family. **Biomolecular concepts**, v. 2, n. 5, p. 365–377, 1 out. 2021.
26. KUMAR, S.; SENTHIL RAJA AYYANNAN. Identification of new small molecule monoamine oxidase-B inhibitors through pharmacophore-based virtual screening, molecular docking and molecular dynamics simulation studies. **Journal of biomolecular structure and dynamics/Journal of biomolecular structure & dynamics**, v. 41, n. 14, p. 6789–6810, 18 ago. 2022.
27. HALL, T. K. et al. Chalcogen dihydrobenzofuran compounds as potential neuroprotective agents: An in vitro and in silico biological investigation. **Biochimie**, 27 jan. 2025.

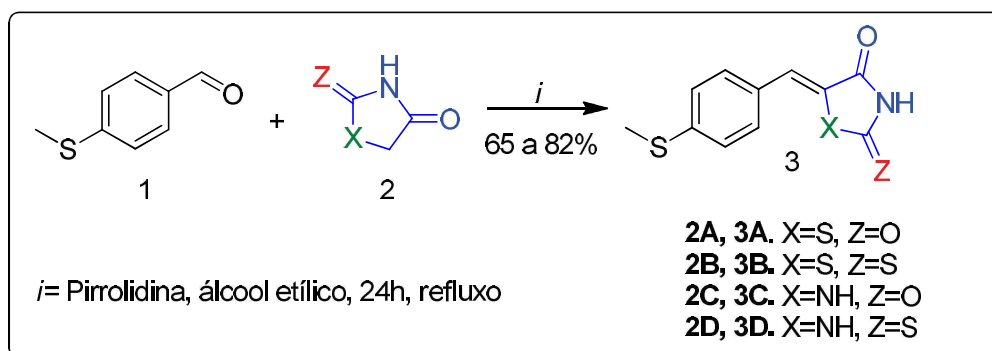
28. FINBERG, J. P. M.; RABEY, J. M. Inhibitors of MAO-A and MAO-B in Psychiatry and Neurology. **Frontiers in Pharmacology**, v. 7, 18 out. 2016.
29. YODIM, M. B. H.; BAKHLE, Y. S. Monoamine oxidase: isoforms and inhibitors in Parkinson's disease and depressive illness. **British Journal of Pharmacology**, v. 147, n. S1, p. S287–S296, 2 fev. 2019.
30. YODIM, M. B. H.; BAKHLE, Y. S. Monoamine oxidase: isoforms and inhibitors in Parkinson's disease and depressive illness. **British Journal of Pharmacology**, v. 147, n. S1, p. S287–S296, 2 fev. 2019.
31. MUSTAFA TOPRAKÇI; KEMAL YELEKÇI. Docking studies on monoamine oxidase-B inhibitors: Estimation of inhibition constants (K_i) of a series of experimentally tested compounds. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 15, n. 20, p. 4438–4446, 31 ago. 2005.
32. GRIGORENKO, B.; DOMRATCHEVA, T.; NEMUKHIN, A. QM/MM Modeling of the Flavin Functionalization in the RutA Monooxygenase. **Molecules**, v. 28, n. 5, p. 2405, 6 mar. 2023.
33. BINDA, C. et al. Insights into the mode of inhibition of human mitochondrial monoamine oxidase B from high-resolution crystal structures. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 17, p. 9750–9755, 11 ago. 2003.
34. HONG, R.; LI, X. Discovery of monoamine oxidase inhibitors by medicinal chemistry approaches. **MedChemComm**, v. 10, n. 1, p. 10–25, 2019.
35. PRINSLOO, I. F. et al. The evaluation of isatin analogues as inhibitors of monoamine oxidase. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 102, n. 5, p. 1067–1074, 27 jul. 2023.
36. HASAN, H. A. et al. Effect of halogens on 3-[4-(dimethylamino) phenyl]-1- phenylprop-2-en-1-ones: development of a new class of monoamine oxidase-B inhibitors. **Applied Biological Chemistry**, v. 67, n. 1, 23 ago. 2024.
37. DA SILVA, P. R. et al. Computational Studies Applied to Linalool and Citronellal Derivatives Against Alzheimer's and Parkinson's Disorders: A Review with Experimental Approach. **Current Neuropharmacology**, v. 21, n. 4, p. 842–866, 2023.
38. YABUKARSKI, F. et al. Assessment of enzyme active site positioning and tests of catalytic mechanisms through X-ray-derived conformational ensembles. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 117, n. 52, p. 33204–33215, 29 dez. 2020.
39. CHEN, J. et al. Effect of Substituents in Different Positions of Aminothiazole Hinge-Binding Scaffolds on Inhibitor–CDK2 Association Probed by Interaction Entropy Method. **ACS Omega**, v. 3, n. 12, p. 18052–18064, 21 dez. 2018.
40. AL-THIABAT, M. G. et al. Potential MAO-B Inhibitors from *Cissampelos capensis* L.f.: ADMET, Molecular Docking, Dynamics, and DFT Insights. **Chemistry & Biodiversity**, 29 out. 2024.

5. DISCUSSÃO

A monoamina oxidase exerce papel central no metabolismo de neurotransmissores, e alterações em sua atividade podem estar relacionadas a processos patológicos (FINBERG *et al.*, 2016). Nesse sentido, a inibição seletiva da isoforma MAO-B representa uma estratégia relevante no estudo de doenças neurodegenerativas, como Parkinson e Alzheimer. Assim, este trabalho buscou avaliar derivados da tiazolidinonas e hidantoínas como potenciais inibidores dessa isoforma.

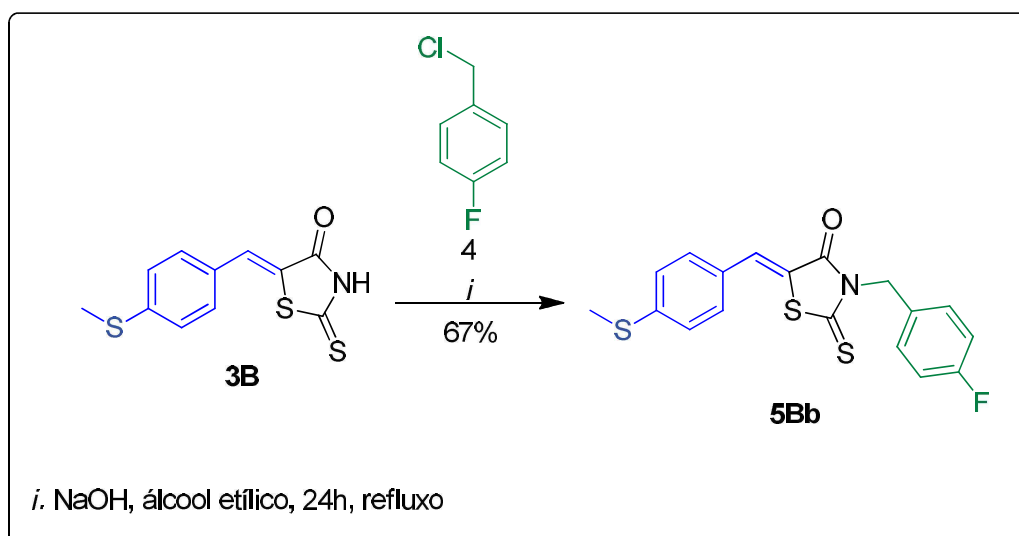
A síntese dos compostos **3A–3D** foi conduzida sob uma única condição reacional, em que o 4-(metiltio)benzaldeído (**1**) reagiu com diferentes núcleos heterocíclicos (**2A–2D**) por meio da reação de Knoevenagel, utilizando pirrolidina como base e etanol como solvente seguindo metodologia previamente descrita na literatura (Bruno *et al.*, 2002) (Esquema 9). Após 24 horas, obtiveram-se derivados de tiazolidinona (**3A**, **3B**) e de hidantoína (**3C**, **3D**) com . Os rendimentos variaram entre 65% e 82%, e os compostos foram identificados por RMN (^1H e ^{13}C) (Figura A1.9 e Figura A1.10) e CG-EM (Figura A1.13).

Esquema 9. Rota sintética para a obtenção dos derivados da tiazolidinona e hidantoína **3A-3D**



Já para a síntese do composto **5Bb**, o composto **3B** previamente sintetizado anteriormente, foi utilizado como material de partida, reagindo com o 4-flúor cloreto de benzila através da reação de N-alquilação, utilizando hidróxido de sódio como base e etanol como solvente, seguindo a metodologia previamente descrita na literatura (Purohit *et al.*, 2012). Após 24 horas, obteve-se o composto inédito derivado da Rodanina **5Bb** (3-(4-fluorobenzil)-5-(4-(metiltio)benzilideno)-2-tioxotiazolidin-4-ona) (Esquema 10), com rendimento de 67%. Logo, o composto foi caracterizado por RMN (^1H e ^{13}C) e CG-EM (Anexo 1).

Esquema 10. Esquema reacional para a síntese do composto **5Bb**



Nos espectros de ^{13}C RMN do composto **5Bb**, o sinal atribuído à carbonila ($\text{C}=\text{O}$) foi observado na faixa de 167,1 ppm e o sinal correspondente à tiocarbonila ($\text{C}=\text{S}$) foi observado na faixa de 193,08 ppm, compatíveis com o heterociclo rodanina. O carbono metilênico (CH_2) ligado ao nitrogênio, foi identificado na faixa de 46,42 ppm, de acordo com o efeito de desblindagem provocado pelo heteroátomo. Além disso, os múltiplos sinais correspondentes aos carbonos aromáticos foram observados em suas regiões típicas (115,0–143,0 ppm), refletindo a presença de dois anéis aromáticos diferenciados pelos substituintes eletrônicos ($-\text{SMe}$ e $-\text{F}$). Nos espectros do ^1H , o hidrogênio vinílico aparece em um simpleto em 6,76 ppm, os hidrogênios metilênicos em 4,17 ppm e os hidrogênios da metila em 3,04 ppm. Além disso, os hidrogênios aromáticos aparecem em suas regiões características. No CG-MS, o íon molecular em m/z 375 apresentou baixa intensidade, enquanto o pico base em m/z 275 indicou o fragmento mais estável. Os sinais em m/z 266–269 e 206 confirmam a fragmentação típica do grupo *p*-fluorobenzil e do núcleo rodanina confirmando a formação do composto esperado.

A atividade da MAO-B foi avaliada *in vitro* na presença dos compostos **3A**, **3B**, **3C**, **3D** e **5Bb**, em uma concentração fixa de 200 μM . Conforme ilustrado na Figura 7, todos os compostos demonstraram efeito inibitório significativo em comparação ao grupo controle (V, DMSO), $p \leq 0.001$. Entre os compostos testados, **3A** e **3D** destacaram-se como os inibidores mais potentes, promovendo supressão quase completa da atividade enzimática. O composto **3A** reduziu a atividade da MAO-B a níveis mínimos, com 95% de inibição, sugerindo forte interação com o sítio catalítico. De forma semelhante, o composto **3D** apresentou valor de inibição ligeiramente superior, atingindo 97%. Por outro lado, os compostos **3B**, **3C** e **5Bb** exibiram efeitos promissores de inibição. O **3B** promoveu inibição significativa, de 89%, embora menos pronunciada que a de **3A** e **3D**. Já o composto **3C**, apresentou uma inibição intermediária na atividade enzimática, com 72% de inibição, seguido pelo composto **5Bb**, que apresentou a menor inibição, reduzindo 63% da atividade de MAO-B, sugerindo que suas características estruturais conferem interações moderadas com o sítio ativo da enzima.

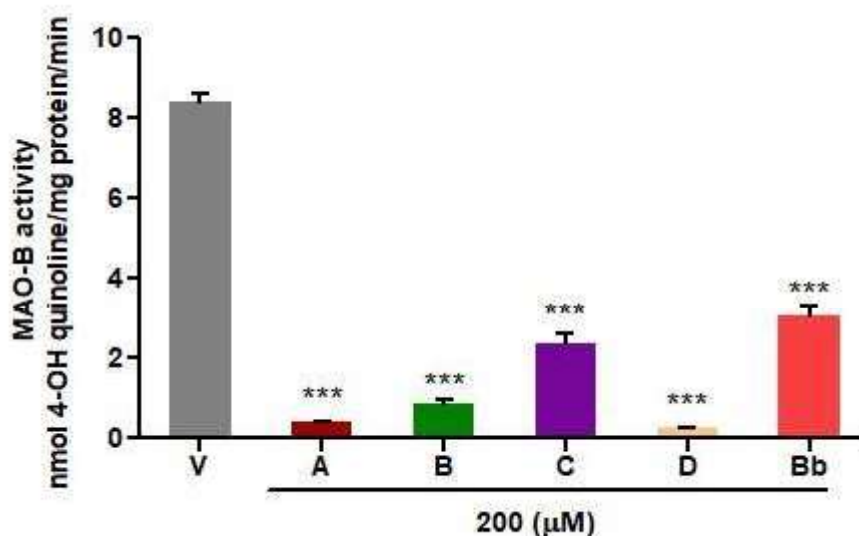


Figura 7 . Efeito dos compostos **3A**, **3B**, **3C**, **3D** e **5Bb** em uma concentração fixa (200μM) sobre a atividade da MAO-B cerebral. Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (E.P.M.). A análise estatística foi realizada por ANOVA one-way seguida do teste post hoc de Tukey. (**) $p \leq 0,01$, (***) $p \leq 0,001$ em comparação com o grupo veículo (V, DMSO).

A maior atividade do composto **3A** pode ser atribuída aos seus dois grupos carbonila ativados, que favorecem a formação de ligações de hidrogênio. O composto **3B** apresentou potência intermediária, possivelmente em razão do caráter eletrofílico do anel rodanina e da polarizabilidade adicional do enxofre, permitindo interações com resíduos nucleofílicos (GAWESKA *et al.*, 2021). Já o composto **3C** apresentou menor atividade, sugerindo que o excesso de grupos polares e doadores/aceptores de ligação de hidrogênio dificulta o encaixe em uma cavidade predominantemente hidrofóbica. Por fim, o composto **3D** provavelmente exibiu maior inibição devido à substituição bioisostérica $C=O \rightarrow C=S$ no anel de hidantoína, o que aumenta a hidrofobicidade, possibilitando interações adicionais (π -enxofre e de van der Waals) e promovendo um equilíbrio adequado entre ligações de hidrogênio e forças hidrofóbicas na cavidade da MAO-B (KUMAR *et al.*, 2022).

Um dos fatores resultantes na menor inibição enzimática observada para o composto **5Bb**, pode se dar pela adição do substituinte benzílico *p*-fluorado, que confere maior volume e flexibilidade conformacional à molécula, podendo dificultar o alinhamento adequado do anel aromático pelas interações π - π com os resíduos Tyr398 e Tyr435 da chamada “gaiola aromática” (BINDA, C. *et al.*, 2013). Além disso, a substituição por flúor exerce um forte efeito indutivo que retira densidade eletrônica do anel, podendo reduzir interações dependentes dessa densidade, como as interações aromáticas de caráter eletrostático (π -cation). Contudo, o flúor também pode influenciar as interações π - π por efeitos de polarização, de modo que o impacto depende do contexto molecular (WANG *et al.*, 2024).

Outro ponto importante para a diminuição da inibição enzimática do **5Bb** pode ser pela perda de pontos de ancoragem (N-H), importante para o reconhecimento molecular no sítio ativo da MAO-B (WHEELER, 2012). Esses resultados reforçam variações estruturais entre os derivados estudados impactam diretamente a potência de inibição, posicionando **5Bb** como um inibidor de atividade intermediária, cujo perfil merece avaliação adicional quanto à seletividade e propriedades farmacológicas.

Com o propósito de compreender melhor as interações deste composto com o sítio ativo da enzima, realizamos o teste *in silico*, baseado na técnica de *docking* molecular. A docagem molecular indicou que os compostos **3A**, **3B**, **3C**, **3D** e **5Bb** apresentam energias de ligação entre -7,6 e -9,4 kcal/mol (Tabela 1), valores que sugerem interações estáveis com o sítio ativo da MAO-B, uma vez que valores mais negativos refletem maior afinidade pelo alvo enzimático. Os compostos **3A** e **3C** exibiram maior afinidade (-7,8 kcal/mol), enquanto **3D** e **3B** apresentaram valores próximos (-7,7 e -7,6 kcal/mol, respectivamente). Já o composto **5Bb** apresentou uma energia de interação de -9,4 kcal/mol, indicando uma maior afinidade pela enzima do que os compostos anteriores. Logo, os resultados gerais sugerem que todos os derivados possuem boa capacidade de interação com a enzima, alinhando-se parcialmente aos achados experimentais.

Tabela 1. Análise de docagem molecular entre os compostos **3A–3D** e **5Bb** frente às isoenzimas MAO-A e MAO-B

Comp	Afinidade de ligação à MAO-A (Kcal/mol)	Afinidade de ligação à MAO-B (kcal/mol)	Resíduos da MAO-B
3A	-7.3	-7,8	SER59, TYR60, LEU171, CYS172, ILE199, TYR326 e TYR398
3B	-6.0	-7,6	GLU34, ALA35, ARG36, GLY41, ILE264, LYS271, ILE272, TYR393 e HIS273
3C	-7.9	-7,8	LEU171, TYR398 e TYR435
3D	-7.2	-7,7	GLY13, ILE14, SER15, GLY16, ARG42, ALA263, TYR435, MET436 e ALA439.
5Bb	-6.8	-9,4	GLY57, GLY58, PHE168, LEU171, CYS172, CYS397, TYR398 e TYR435.

O teste *in silico* indicou que o composto **3A** se ancora de forma estável no sítio ativo bipartido da MAO-B, entre a cavidade de entrada e a cavidade do substrato, cuja abertura é regulada pelos resíduos Ile199 e Tyr326 (FINBERG *et al*, 2016). Na cavidade catalítica, o ligante estabelece interações π - π com Tyr398, compondo a “gaiola

aromática” junto ao cofator FAD, além de ligações de hidrogênio com Ser59 e Tyr60, que auxiliam na fixação do composto na entrada do túnel catalítico (YOUDIM *et al.*, 2019). O composto também interage via π -enxofre com Cys172 e por contatos hidrofóbicos com Leu171, Ile199 e Tyr326, promovendo afinidade e seletividade pela isoforma B (GRIGORENKO *et al.*, 2023) (Figura A2.1).

Já o composto **3B** se ancora preferencialmente na região de entrada da cavidade, interagindo com GLU34 (π -ânion), ARG36 e GLY41 (ligações de hidrogênio), além de contatos hidrofóbicos e π - π / π -alquil com Tyr393, Ala35, Ile264, Ile272 e His273. Tyr393 desempenha papel modulador próximo ao centro catalítico, sendo essencial para a estabilização de inibidores clássicos da MAO-B, como a selegilina (YOUDIM *et al.*, 2019) (HALL *et al.*, 2025) (Figura A2.2).

O composto **3C** interage com a cavidade catalítica da MAO-B por meio de ligações de hidrogênio com Tyr398 e Tyr435, além de interações hidrofóbicas e π - π com Leu171, localizadas na cavidade de entrada da enzima, que atua como ponto de ancoragem e delimita a passagem para a bolsa catalítica (PRINSLOO *et al.*, 2023). Tyr435, integrante do “arco aromático”, contribui para a seletividade da MAO-B em relação à MAO-A e estabiliza a ligação do ligante via interações π - π ou π -cátion (YOUDIM *et al.*, 2019). Do ponto de vista farmacológico, inibidores parciais como **3C** podem reduzir a degradação de dopamina sem bloquear completamente a enzima, minimizando efeitos adversos (HALL *et al.*, 2025), tornando-o um protótipo promissor de moduladores seletivos da MAO-B (Figura A2.3).

O composto **3D** se ancora principalmente na entrada da cavidade catalítica, bloqueando estericamente o acesso do substrato ao FAD (PRINSLOO *et al.*, 2023). Destacam-se ligações de hidrogênio com GLY16 e SER15 e uma ligação carbono-hidrogênio com ALA263, que orientam e estabilizam o ligante (FINBERG *et al.*, 2016). Interações hidrofóbicas e aromáticas envolvendo TYR435, ILE14, ALA439 e MET436 criam um microambiente apolar que reforça a estabilidade do núcleo aromático do composto (SILVA *et al.*, 2023) (Figura A2.4).

Por fim, o composto **5Bb** apresentou interações do anel aromático com GLY57 e TYR398 por meio de interações de empilhamento π - π e estabeleceu contatos π -Enxofre com CYS397 (Figura A2.5), ajudando a ancorar o ligante. O átomo de enxofre do ligante formou uma interação π -Enxofre com TYR435, e o enxofre no anel heterocíclico interagiu com TYR398 (BINDA, C. *et al.*, 2016). O mesmo anel heterocíclico também participou de uma interação em forma de T π - π com TYR398, o que ajuda a manter o posicionamento correto do composto dentro do sítio ativo. O segundo anel aromático formou um contato hidrofóbico π -Alquila com LEU171, juntamente com interações π -Enxofre adicionais com CYS172. O enxofre ligado a este anel aromático envolve-se em uma interação π -Enxofre com PHE168, aumentando potencialmente o número de contatos estabilizadores dentro do sítio ativo (HASAN, H. A. *et al.*, 2024).

Logo, o composto **5Bb** exibiu perfis de interação, envolvendo resíduos-chave como GLY58, TYR398, TYR435, CYS397, GLY57, LEU171, PHE168 e CYS172, mostrando um

padrão de encaixe muito favorável, aproveitando diferentes tipos de contatos (π - π , π -enxofre, hidrofóbicos). Isso explica por que ele apresentou energia de ligação mais baixa e maior afinidade em relação aos outros compostos. Embora esse composto tenha apresentado interações de *docking* altamente favoráveis, particularmente com resíduos críticos como TYR398, PHE168 e LEU171 (CHATZIPIERIS *et al.*, 2025), os ensaios *in vitro* não reproduziram o mesmo grau de eficácia. Essa discrepância pode ser atribuída às limitações intrínsecas do *docking*, que considera apenas a complementaridade geométrica dentro de uma estrutura cristalográfica estática, negligenciando os efeitos de solvatação, entropia e dinâmica conformacional da proteína (FERREIRA *et al.*, 2015). Além disso, fatores como baixa solubilidade, instabilidade química e permeabilidade limitada podem reduzir a fração ativa de ligantes em ensaios experimentais.

De forma geral, os resíduos identificados nas interações com os compostos analisados neste trabalho, fazem parte da cavidade catalítica da MAO-B, abrangendo tanto o “bolso catalítico” quanto a cavidade de entrada da enzima. Entre eles, destacam-se Tyr398 e Tyr435, reconhecidos como resíduos aromáticos essenciais para o posicionamento e a estabilização dos ligantes (BINDA, C. *et al.*, 2016), além de Leu171 e PHE168, que contribuem significativamente para interações hidrofóbicas no interior da cavidade (CHATZIPIERIS *et al.*, 2025). Outros resíduos, como Gly57, Gly58, Ala263 e Cys172, exercem papel estrutural, auxiliando na conformação do sítio ativo e na acomodação dos compostos (FINBERG *et al.*, 2016). Dessa forma, embora nem todos estejam diretamente envolvidos na catálise, todos participam do processo de reconhecimento e estabilização dos ligantes, justificando a relevância das interações observadas no estudo de docagem molecular.

Conforme observado na Tabela 1, o docking molecular dos compostos também foi realizado para a isoforma MAO-A, com a finalidade de investigar a seletividade dos compostos frente à MAO-B, visto que inibidores não-seletivos podem levar a efeitos adversos clínicos, como alterações no metabolismo de neurotransmissores (serotonina, noradrenalina e dopamina). Logo, observou-se que as energias de ligação obtidas para MAO-A foram ligeiramente superiores às registradas para MAO-B, sugerindo que a interação com a MAO-B é mais favorável. Esses resultados indicam uma afinidade preferencial pela MAO-B, reforçando o potencial dos compostos como possíveis inibidores seletivos desta isoforma.

6. CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo mostram que os cinco compostos testados são capazes de inibir a atividade da MAO-B, com destaque para os compostos **3A** e **3D**, que apresentaram os efeitos mais pronunciados *in vitro*. O composto **5Bb**, por sua vez, apresentou as interações mais favoráveis no docking molecular, indicando maior afinidade pelo sítio ativo. A discrepância entre os resultados *in vitro* e *in silico* evidencia as limitações do docking molecular isolado. A combinação de ensaios *in vitro* e simulações de docking molecular foi fundamental para compreender os mecanismos dessa atividade, correlacionando a eficácia enzimática com os padrões de interação no sítio ativo. Assim, enquanto os experimentos confirmaram a capacidade inibitória dos compostos, as análises *in silico* detalharam as interações responsáveis por essa ação, reforçando a racionalidade na escolha dos compostos mais promissores. Essa abordagem integrada valida a potência dos inibidores e evidencia a importância de estratégias combinadas para o desenvolvimento de novos inibidores seletivos da MAO-B com potencial terapêutico em doenças neurodegenerativas.

7. REFERÊNCIAS

- ALSAAD, I. et al. Targeting MAO-B with Small-Molecule Inhibitors: A Decade of Advances in Anticancer Research (2012–2024). **Molecules**, v. 30, n. 1, p. 126, 31 dez. 2024.
- AMEEN, R. Q. et al. Gastroprotective effect of rhodanine and 2,4-thiazolidinediones scaffolds in rat stomachs by contribution of anti-apoptotic (BCL-2) and tumor suppressor (P53) proteins. **Scientific Reports**, v. 14, n. 1, 19 jan. 2024.
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. Diagnostic and statistical manual of mental disorders. 5th-TR ed. [s.l.] **American Psychiatric Association**, 2022.
- AZIZI, S. A. Monoamines: Dopamine, norepinephrine, and serotonin, beyond modulation, “switches” that alter the state of target networks. **The Neuroscientist**, v. 28, n. 2, p. 107385842097433, 9 dez. 2020.
- BIGGIN, P. C.; BOND, P. J. Molecular Dynamics Simulations of Membrane Proteins. **Methods in molecular biology**, p. 147–160, 1 jan. 2008.
- BHAWNA, NULL et al. Monoamine oxidase inhibitors: A concise review with special emphasis on structure activity relationship studies. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 242, p. 114655, 15 nov. 2022.
- BINDA, C. et al. Insights into the mode of inhibition of human mitochondrial monoamine oxidase B from high-resolution crystal structures. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 17, p. 9750–9755, 11 ago. 2003.
- BORRONI, E. et al. Sembragiline: A Novel, Selective Monoamine Oxidase Type B Inhibitor for the Treatment of Alzheimer’s Disease. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 362, n. 3, p. 413–423, 22 jun. 2017.
- BRATTY, M. A. et al. The Spectrum of Thiazolidinediones against Respiratory Tract Pathogenic Bacteria: An In Vitro and In Silico Approach. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 21, n. 14, p. 1457–1469, 18 jun. 2020.

BRUNO, G. et al. Synthesis and aldose reductase inhibitory activity of 5-arylidene-2,4-thiazolidinediones. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 10, n. 4, p. 1077–1084, abr. 2002.

CHIN, E.-Z. et al. Synthesis and biological evaluation of hydantoin derivatives as potent antiplasmodial agents. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, p. 129701– 129701, 1 mar. 2024.

CUI, L. et al. Major Depressive disorder: hypothesis, mechanism, Prevention and Treatment. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 9, n. 1, 2024.

DE VASCONCELOS, A. et al. 2,4-Thiazolidinedione as Precursor to the Synthesis of Compounds with Anti-glioma Activities in C6 and GL261 Cells. **Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 6, p. 601–610, jul. 2021.

DUARTE, P.; CUADRADO, A.; LEÓN, R. Monoamine Oxidase Inhibitors: From Classic to New Clinical Approaches. **Handbook of Experimental Pharmacology**, v. 264, p. 229–259, 2021.

EL-BAHNSAWYE, M. et al. Design, Synthesis, and Antiproliferative Activity of Novel Neocryptolepine–Rhodanine Hybrids. **Molecules**, v. 27, n. 21, p. 7599–7599, 5 nov. 2022.

EL-HALABY, L. O. et al. New phenylpiperazine-thiazolidine-2,4-dione hybrids targeting MAO inhibition: Synthesis, biological evaluation, kinetic study and in silico insights. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 121, p. 118123–118123, 19 fev. 2025.

FINBERG, J. P. M.; RABEY, J. M. Inhibitors of MAO-A and MAO-B in Psychiatry and Neurology. **Frontiers in Pharmacology**, v. 7, 18 out. 2016.

GALLARDO-GODOY, A. et al. Sulfur-Substituted α -Alkyl Phenethylamines as Selective and Reversible MAO-A Inhibitors: Biological Activities, CoMFA Analysis, and Active Site Modeling. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 48, n. 7, p. 2407–2419, 16 fev. 2020.

GIGLIO, R. V. et al. An Update on the Current and Emerging Use of Thiazolidinediones for Type 2 Diabetes. **ProQuest**, p. 1475, 2022.

GIOVANNA LI PETRI et al. Editorial: Emerging heterocycles as bioactive compounds. **Frontiers in Chemistry**, v. 11, 26 abr. 2023.

GUO, Y. et al. Discovery of a novel 2,4-thiazolidinedione derivative as dual inhibitor of β -catenin/TCF4 interaction and tubulin polymerization in colon cancer cells. **Archiv der Pharmazie**, v. 358, n. 3, mar. 2025.

GUPTA, A. K.; THAKUR, G. S.; JAIN, S. K. Recent Development in Hydantoins, Thiohydantoins, and Selenohydantoins as Anticancer Agents: Structure-activity Relationship and Design Strategies. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 25, 10 jan. 2025.

GRIGORENKO, B.; DOMRATCHEVA, T.; NEMUKHIN, A. QM/MM Modeling of the Flavin Functionalization in the RutA Monooxygenase. **Molecules**, v. 28, n. 5, p. 2405, 6 mar. 2023.

HAN, H. et al. Monoamine oxidase A (MAOA): A promising target for prostate cancer therapy. **Cancer Letters**, v. 563, p. 216188, jun. 2023.

HASAN, H. A. et al. Effect of halogens on 3-[4-(dimethylamino) phenyl]-1 phenylprop- 2-en-1-ones: development of a new class of monoamine oxidase-B inhibitors. **Applied Biological Chemistry**, v. 67, n. 1, 23 ago. 2024.

HALL, T. K. et al. Chalcogen dihydrobenzofuran compounds as potential neuroprotective agents: An in vitro and in silico biological investigation. **Biochimie**, 27 jan. 2025.

JAMPILEK, J. Heterocycles in Medicinal Chemistry. **Molecules**, v. 24, n. 21, p. 3839, 25 out. 2019.

KATARZYNA KUCWAJ-BRYSZ et al. The Importance of Stereochemistry in 5-HT7R Modulation—A Case Study of Hydantoin Derivatives. **ACS Chemical Neuroscience**, 21 out. 2024.

KOLAGKIS, P. X. et al. Deciphering the Knoevenagel Condensation: Towards a Catalyst-free and Water-mediated Process. **Organic & Biomolecular Chemistry**, 1 jan. 2024.

KUMAR, H. et al. Thiazolidin-2,4-Dione Scaffold: An Insight into Recent Advances as Antimicrobial, Antioxidant, and Hypoglycemic Agents. **Molecules**, v. 27, n. 19, p. 6763, 10 out. 2022.

KUMAR, S. et al. Inhibition of monoamine oxidases by heterocyclic derived conjugated dienones: synthesis and *in vitro* and *in silico* investigations. **RSC Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 1, p. 221–231, 2025.

KRISHNA KARTHEEK CHINCHILLI et al. Design, synthesis, and structure–activity studies of new rhodanine derivatives as carbonic anhydrase II, IX inhibitors. **Archiv der Pharmazie**, 30 jun. 2023.

LIU, J. et al. Synthesis, Anticancer Evaluation and Docking Study of 3-Benzyloxyhydantoin Derivatives. **Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 1, p. 37–47, 5 jan. 2016.

MARC, G. et al. New N-(oxazolylmethyl)-thiazolidinedione Active against *Candida albicans* Biofilm: Potential Als Proteins Inhibitors. **Molecules**, v. 23, n. 10, p. 2522, 2 out. 2018.

MARIKA ALBORGHETTI et al. Type-B monoamine oxidase inhibitors in neurological diseases. **Neural Regeneration Research**, v. 19, n. 1, p. 16–21, 1 jan. 2024.

PANTSAR, T.; POSO, A. Binding Affinity via Docking: Fact and Fiction. **Molecules**, v. 23, n. 8, p. 1899, 30 jul. 2018.

PHILIPPE DE DEURWAERDÈRE et al. Comparative Analysis of the Neurochemical Profile and MAO Inhibition Properties of N-(Furan-2-ylmethyl)-N methylprop-2-yn-1- amine. **ACS Chemical Neuroscience**, v. 8, n. 5, p. 1026–1035, 30 dez. 2016.

PUROHIT, A.; FOSTER, P. A. Steroid sulfatase inhibitors for estrogen- and androgen-dependent cancers. **Journal of Endocrinology**, v. 212, n. 2, p. 99–110, 22 ago. 2012.

REZAEI, M. et al. Thiazolidinedione Derivative Suppresses LPS-induced COX-2 Expression and NO Production in RAW 264.7 Macrophages. **PubMed**, v. 18, n. 3, p. 1371–1379, 1 jan. 2019.

SABU, S.; SARANYA, P. V.; ANILKUMAR, G. An overview of palladium-catalyzed N-alkylation reactions. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 23, n. 7, p. 1533–1551, 2025.

SILVA, P. R. et al. Computational Studies Applied to Linalool and Citronellal Derivatives Against Alzheimer's and Parkinson's Disorders: A Review with Experimental Approach. **Current Neuropharmacology**, v. 21, n. 4, p. 842–866, 2023.

TAN, Y.-Y.; JENNER, P.; CHEN, S.-D. Monoamine Oxidase-B Inhibitors for the Treatment of Parkinson's Disease: Past, Present, and Future. ***Journal of Parkinson's Disease***, v. 12, n. 2, p. 477–493, 15 fev. 2022.

THENTU, J. B. et al. Evaluation of monoamine oxidase A and B type enzyme occupancy using non-radiolabelled tracers in rat brain. ***Neurochemistry International***, v. 145, p. 105006, maio 2021.

TROTT, O.; OLSON, A. J. AutoDock Vina: Improving the Speed and Accuracy of Docking with a New Scoring function, Efficient optimization, and Multithreading. ***Journal of Computational Chemistry***, v. 31, n. 2, 2009.

WANG, W. et al. Perfluoroaryl-aryl interaction: The most important subset of π -hole- π bonding. ***Chemical Physics Reviews***, v. 5, n. 3, 9 jul. 2024.

WHEELER, S. E. Understanding Substituent Effects in Noncovalent Interactions Involving Aromatic Rings. ***Accounts of Chemical Research***, v. 46, n. 4, p. 1029– 1038, 22 jun. 2012.

WU, B. J.; SHIH, J. C. In Vitro and In Vivo Assays Characterizing MAO A Function in Cancers. ***Methods in Molecular Biology***, p. 171–182, 29 set. 2022

YODIM, M. B. H.; BAKHLE, Y. S. Monoamine oxidase: isoforms and inhibitors in Parkinson's disease and depressive illness. ***British Journal of Pharmacology***, v. 147, n. S1, p. S287–S296, 2 fev. 2019.

Anexo 1

Espectros de RMN (^1H e ^{13}C) e CG-MS dos compostos

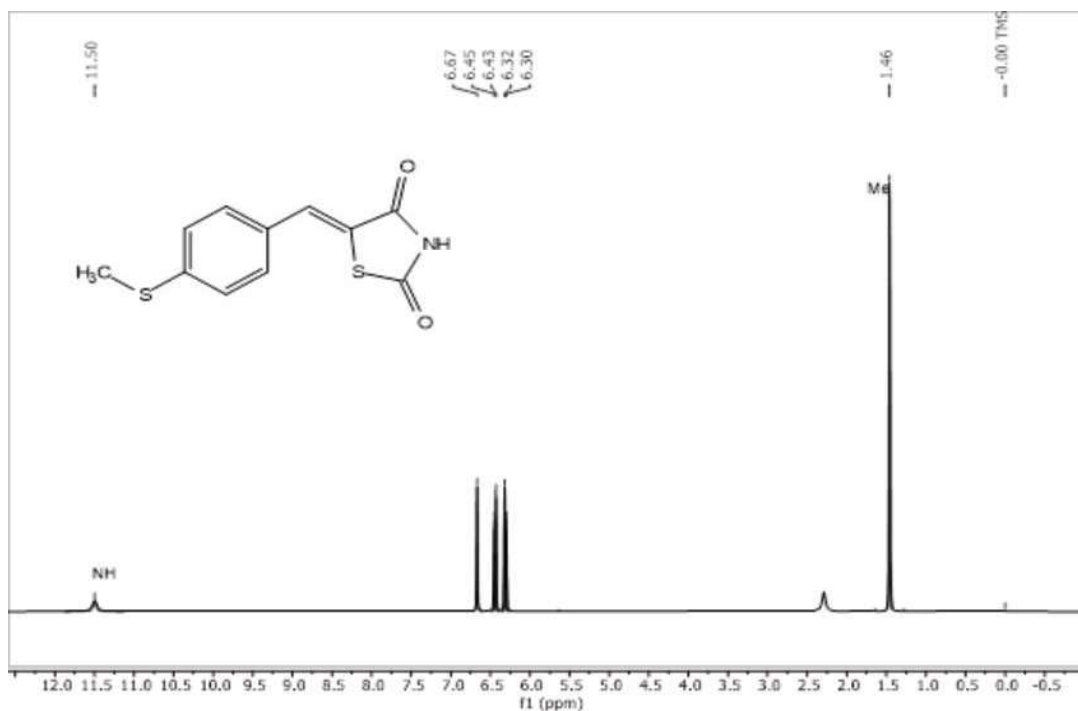


Figura A1.1. Espectro de RMN de ^1H do composto 3A [5-(4-(metiltio)benzilideno)tiazolidina-2,4-diona] (400 MHz, DMSO).

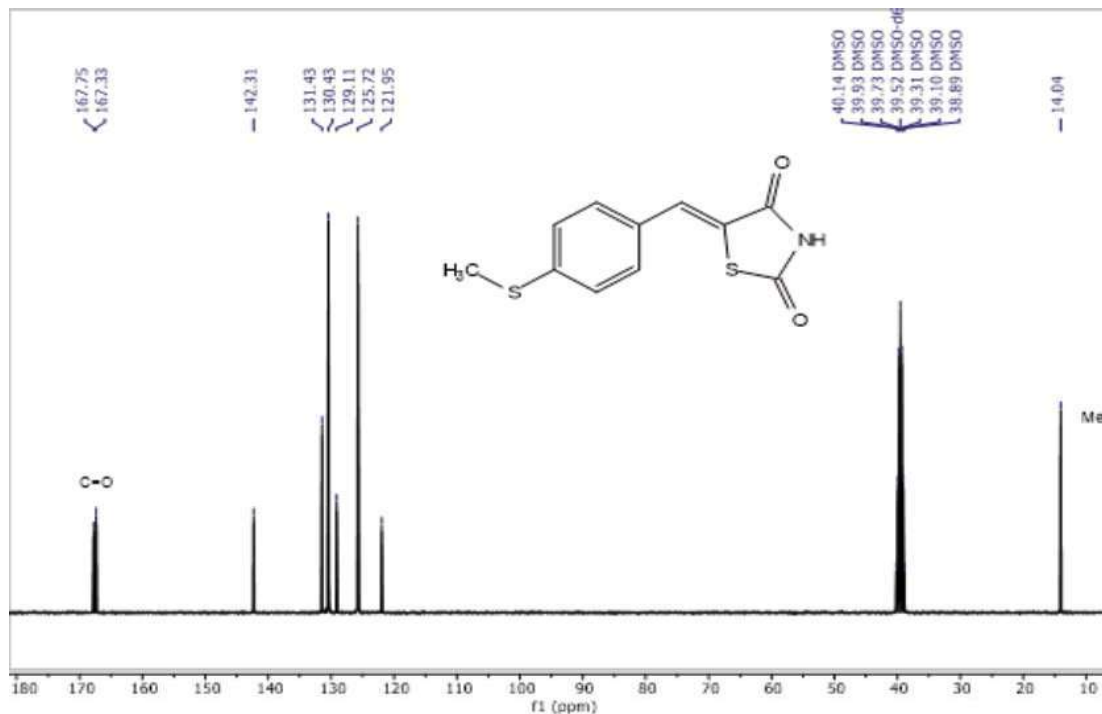


Figura A1.2. Espectro de RMN de ^{13}C do composto 3A [5-(4-(metiltio)benzilideno)tiazolidina-2,4-diona] (100 MHz, DMSO).

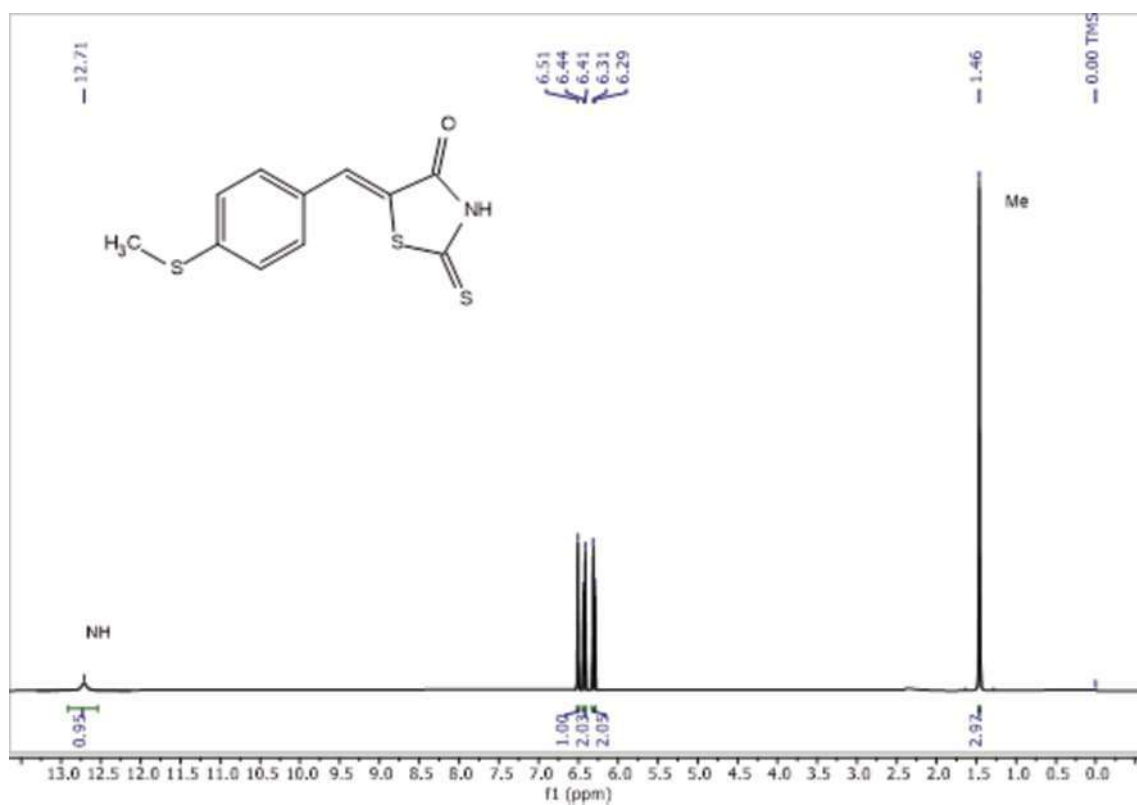


Figura A1.3. Espectro de RMN de ¹H do composto 3B [5-(4-(metiltio)benzilideno)-2-tioxotiazolidin-4-ona] (400 MHz, DMSO).

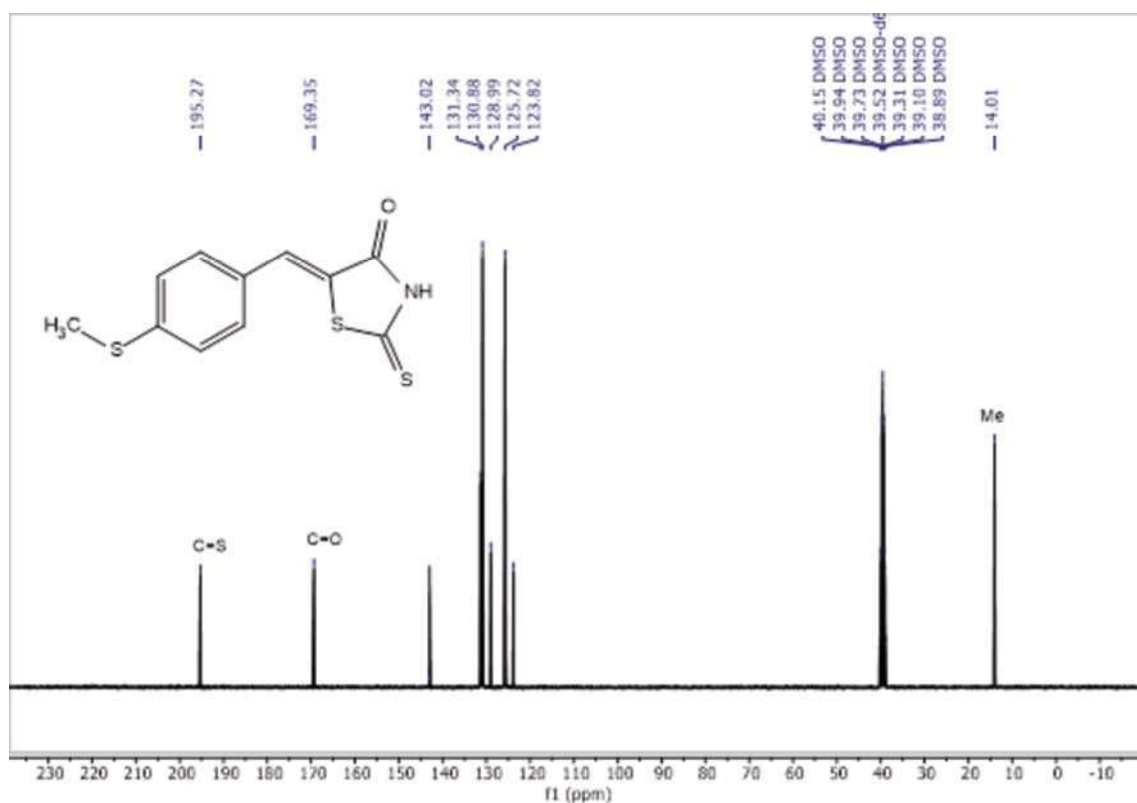


Figura A1.4. Espectro de RMN de ¹³C do composto 3B [5-(4-(metiltio)benzilideno)-2-tioxotiazolidin-4-ona] (100 MHz, DMSO).

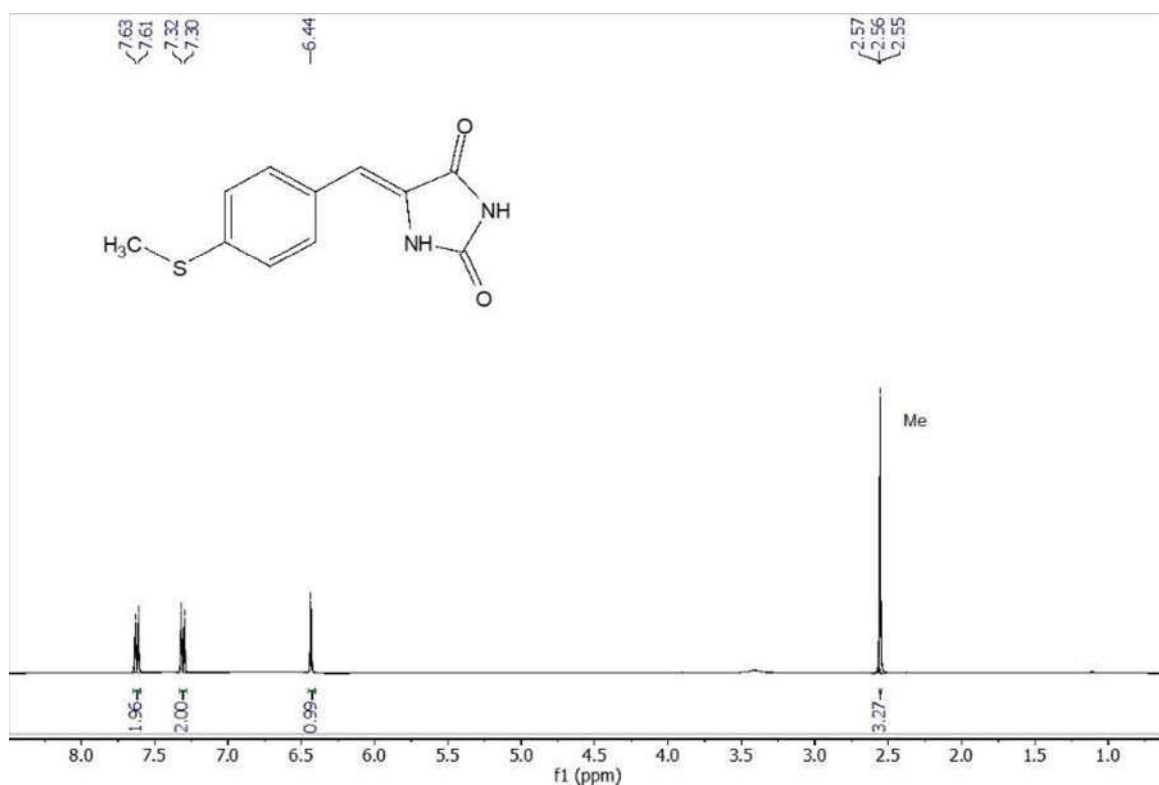


Figura A1.5. Espectro de RMN de ¹H do composto 3C [5-(4-(metiltio)benzilideno)imidazolidina-2,4-diona] (400 MHz, DMSO).

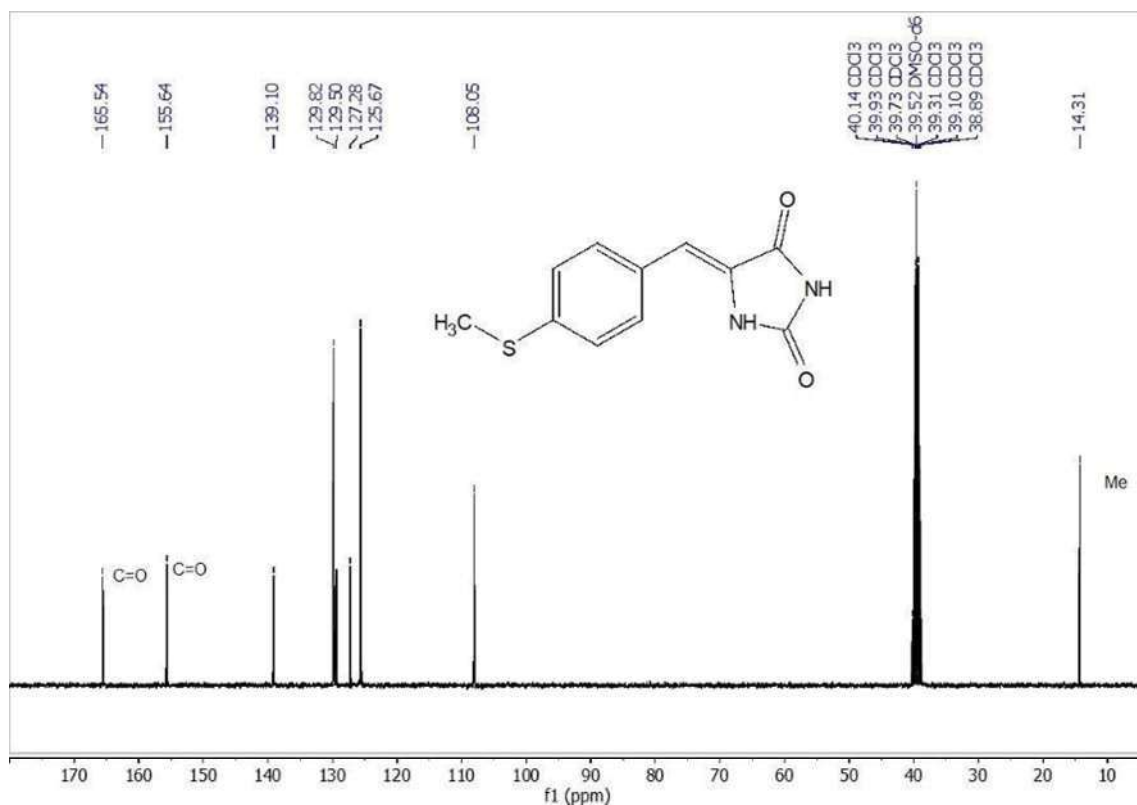


Figura A1.6. Espectro de RMN de ¹³C do composto 3C [5-(4-(metiltio)benzilideno)imidazolidina-2,4-diona] (100 MHz, DMSO).

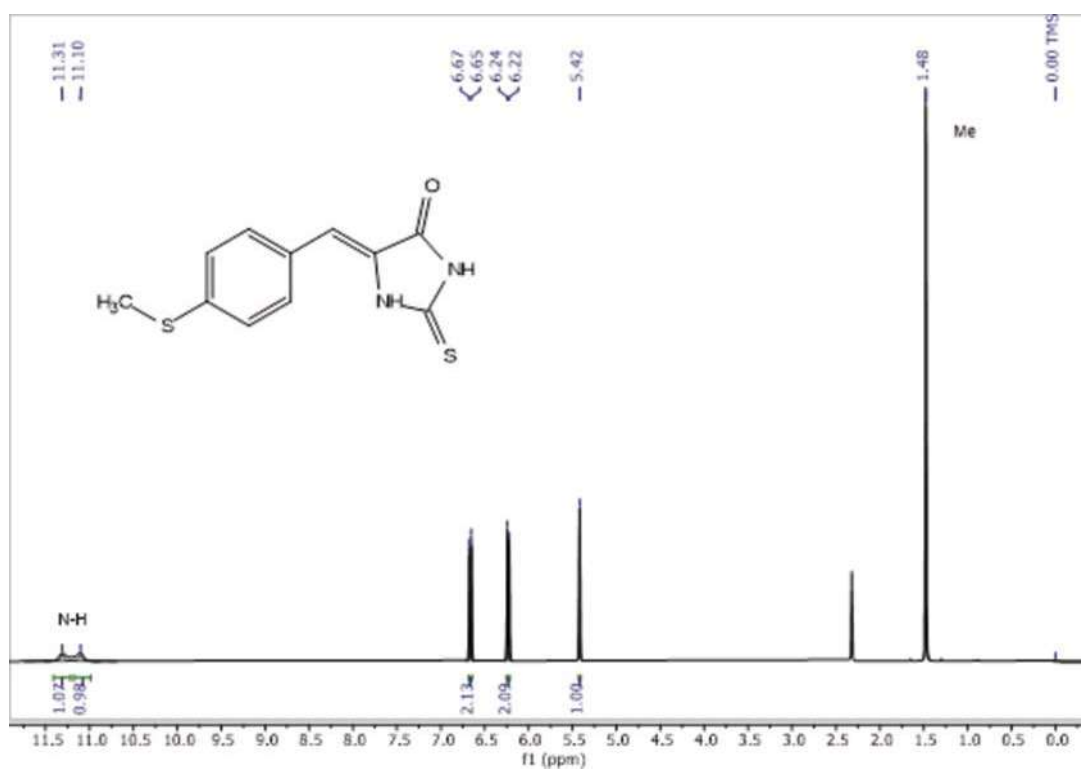


Figura A1.7. Espectro de RMN de ¹H do composto 3D [5-(4-(metiltio)benzilideno)-2-tioxoimidazolidin-4-ona] (400 MHz, DMSO).

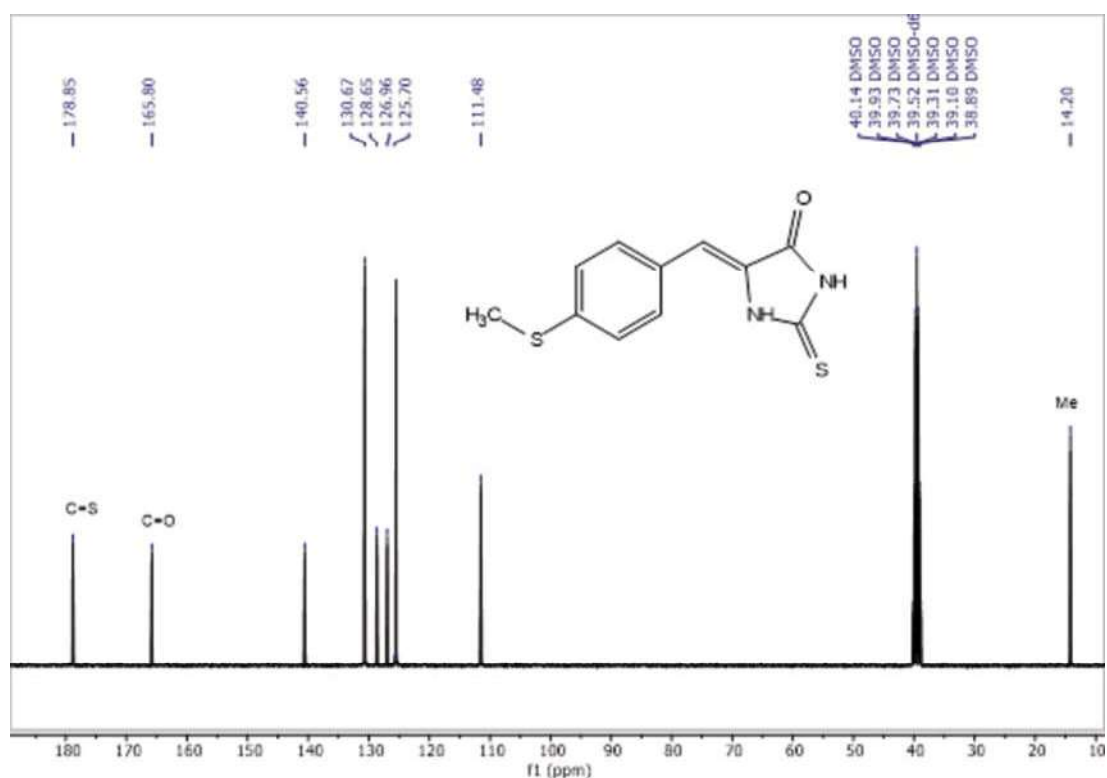


Figura A1.8. Espectro de RMN de ¹³C do composto 3D [5-(4-(metiltio)benzilideno)-2-tioxoimidazolidin-4-ona] (100 MHz, DMSO).

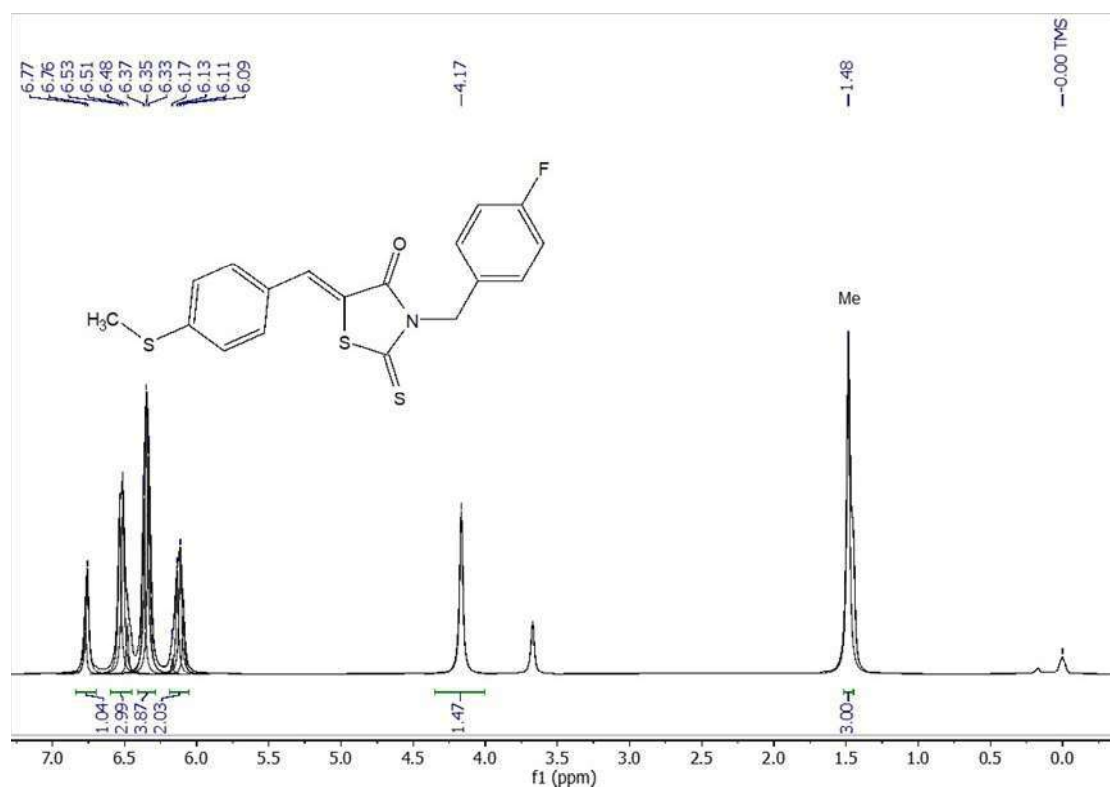


Figura A1.9. Espectro de RMN de ¹H do composto 5Bb [3-(4-fluorobenzil)-5-(4-(metiltio)benzilideno)-2-tioxotiazolidin-4-ona] (400 MHz, DMSO).

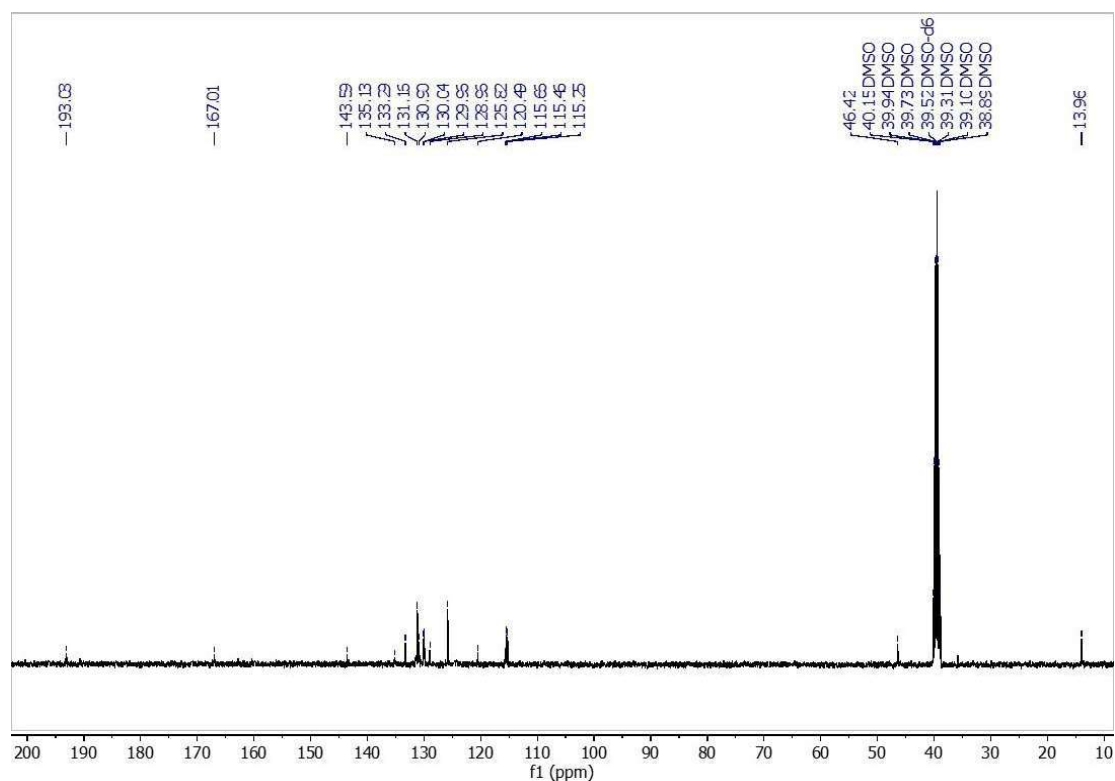


Figura A1.10. Espectro de RMN de ¹³C do composto 5Bb [3-(4-fluorobenzil)-5-(4-(metiltio)benzilideno)-2-tioxotiazolidin-4-ona] (100 MHz, DMSO).

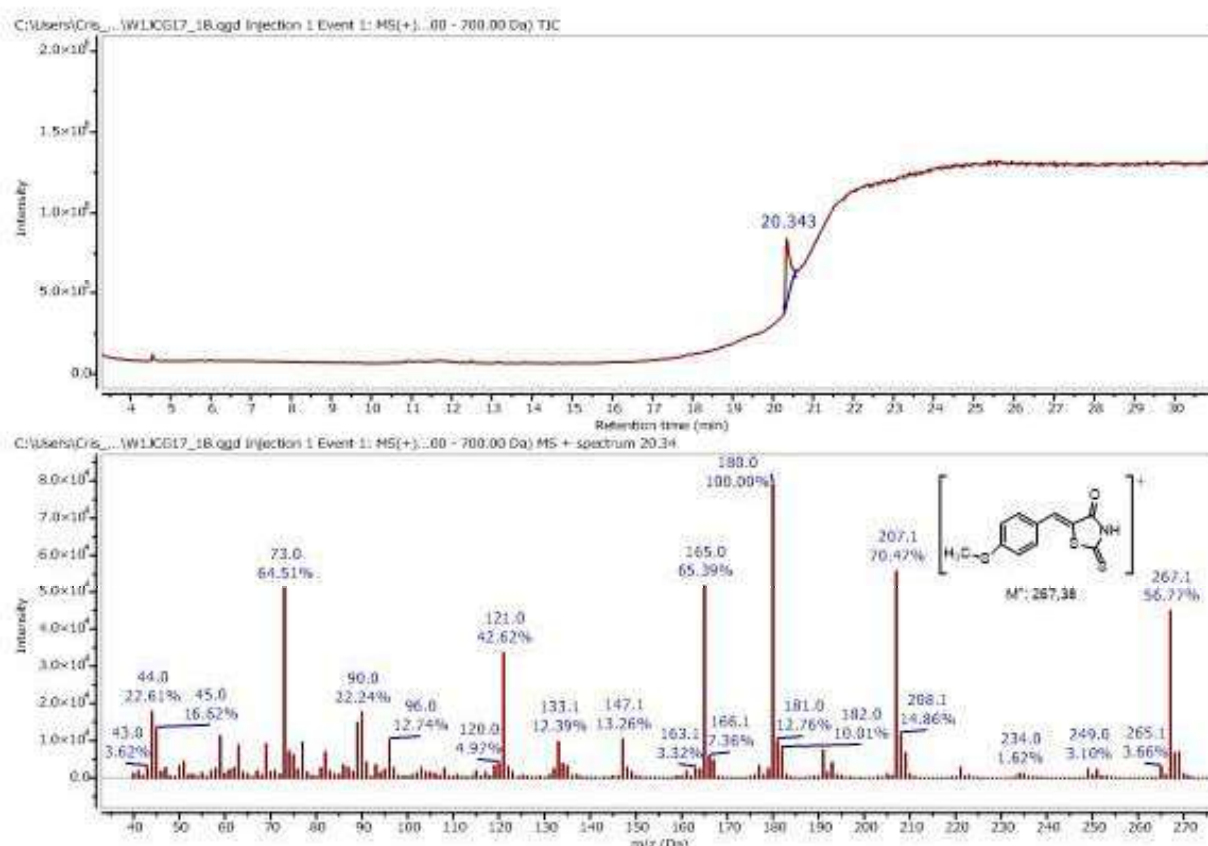


Figura A1.11: Cromatograma e espectro GC/MS do composto 3B.

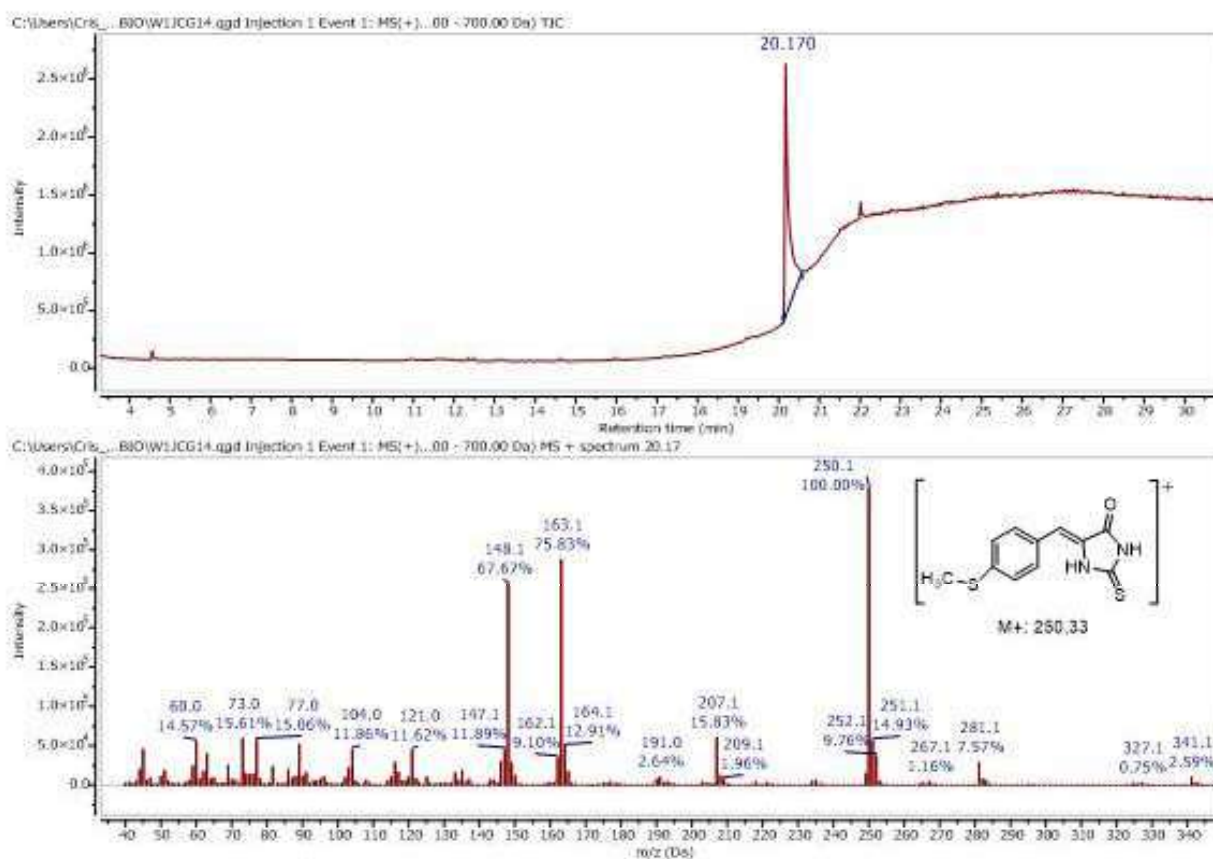


Figura A1.12: Cromatograma e espectro GC/MS do composto 3D.

Interações com resíduos de aminoácidos entre o composto 3A-3D e 5Bb e a MAO-B

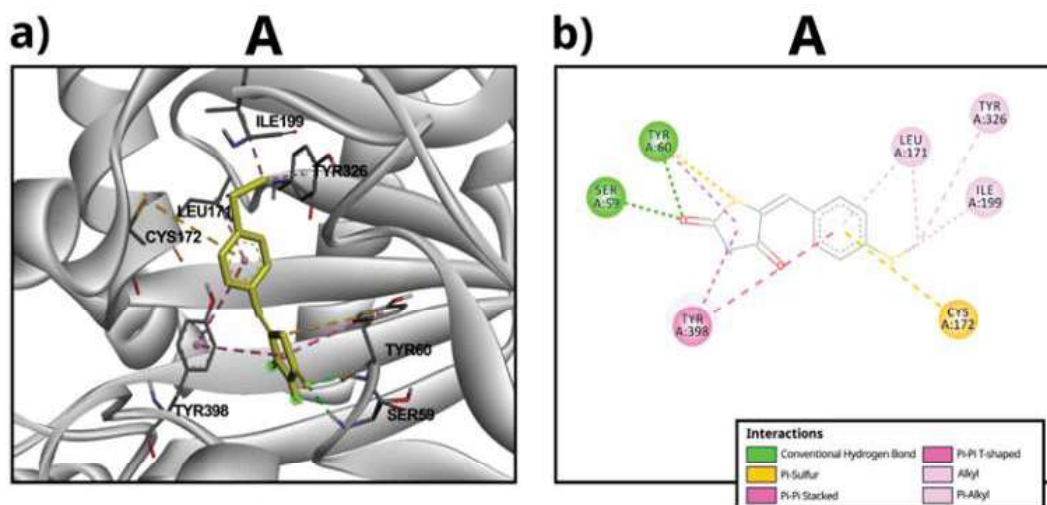


Figura A2.1. Representação das interações com resíduos de aminoácidos entre o composto 3A e a MAO-B (PDB ID: 5MRL) (A) e interações detalhadas (B) por meio de técnicas de simulação de docagem molecular.

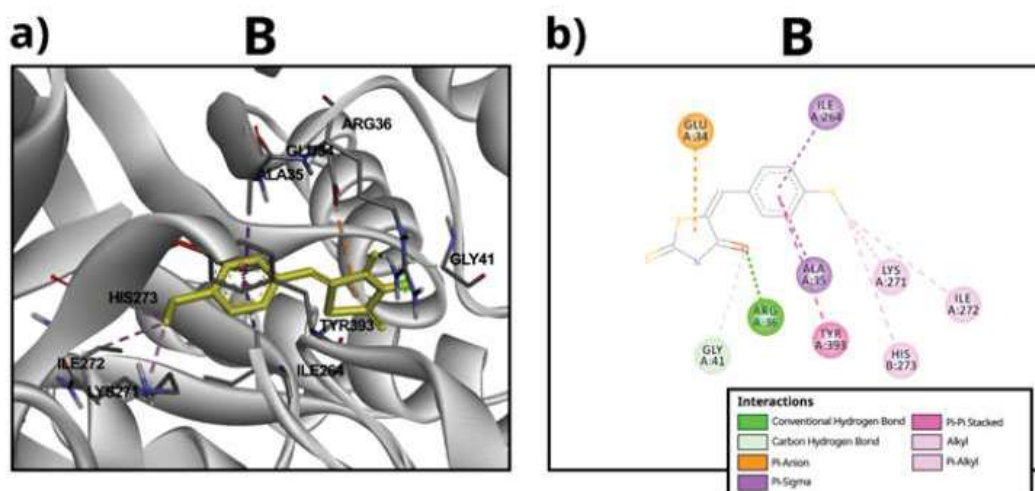


Figura A2.2. Representação das interações com resíduos de aminoácidos entre o composto 3B e a MAO-B (PDB ID: 5MRL) (A) e interações detalhadas (B) por meio de técnicas de simulação de docagem molecular.

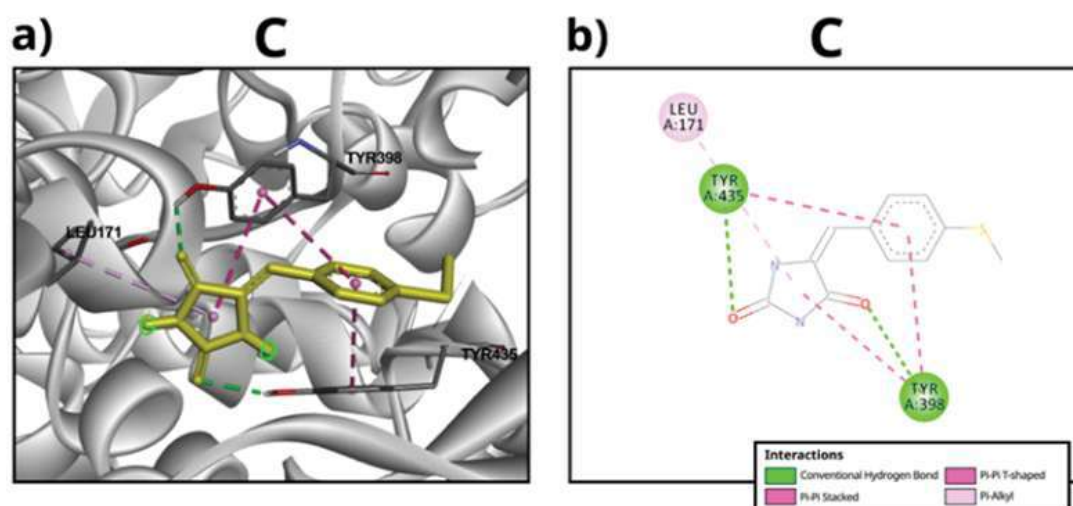


Figura A2.3. Representação das interações com resíduos de aminoácidos entre o composto 3C e a MAO-B (PDB ID: 5MRL) (A) e interações detalhadas (B) por meio de técnicas de simulação de docagem molecular.

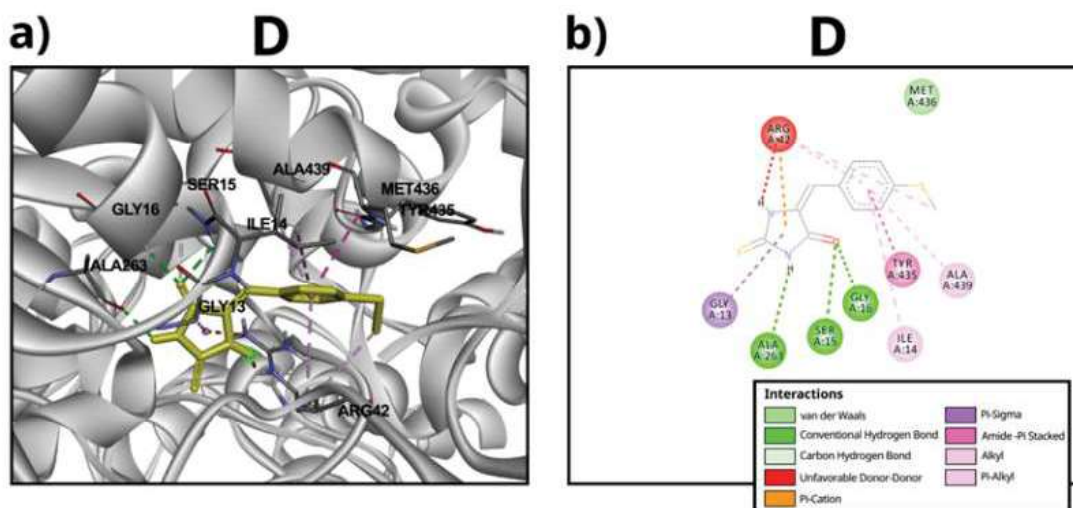


Figura A2.4. Representação das interações com resíduos de aminoácidos entre o composto 3D e a MAO-B (PDB ID: 5MRL) (A) e interações detalhadas (B) por meio de técnicas de simulação de docagem molecular.

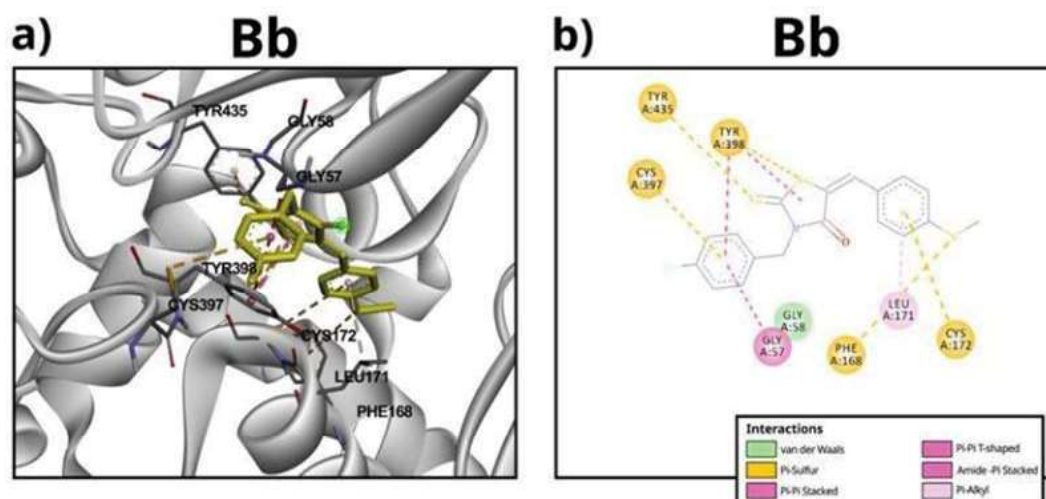


Figura A2.5. Representação das interações entre os resíduos de aminoácidos e o composto **5Bb** com a MAO-B (PDB ID: 5MRL) (a) e interações detalhadas (b) obtidas por técnicas de simulação de *docking* molecular.

Anexo 3

Comprovante da CEUA



PARECER Nº 176/2022/CEUA/REITORIA
PROCESSO Nº 23110.028361/2022-92

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **“Análise do efeito antioxidante e inibitório sobre as enzimas monoamina oxidase e acetilcolinesterase de compostos heterocíclicos sintéticos”**, registrada com o nº **23110.028361/2022-92**, sob a responsabilidade de **César Augusto Brüning** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e recebeu parecer **FAVORÁVEL** a sua execução pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Pelotas, em reunião de 26/10/2022.

Finalidade	(x) Pesquisa () Ensino
Vigência da autorização	Início: 01/11/2022 Término: 20 /12/2024
Espécie/linhagem/raça	<i>Mus musculus</i> / Swiss
Nº de animais	125
Idade	2 meses
Sexo	Fêmeas e Machos
Origem	Biotério Central - UFPel

Código para cadastro nº **CEUA 028361/2022-92**

Parecer 176 (1921242) SEI 23110.028361/2022-92 / pg. 1

Priscila Marques Moura de Leon

Coordenadora da CEUA



Documento assinado eletronicamente por **PRISCILA MARQUES MOURA DE LEON, Professor do Magistério Superior**, em 31/10/2022, às 16:37, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 4º, § 3º, do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufpel.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1921242** e o código CRC **6C2F4A43**.

Referência: Processo nº 23110.028361/2022-92

SEI nº 1921242