



Universidade Federal do Rio de Janeiro – Campus Macaé

Curso de Farmácia



**“AVALIAÇÃO DE DERIVADOS HIDRAZÔNICOS DA ISONIAZIDA COMO  
INIBIDORES DE MIELOPEROXIDASE.”**

**João Victor Fernandes Quimas**

Macaé

Março de 2020

João Victor Fernandes Quimas

**“AVALIAÇÃO DE DERIVADOS DA ISONIAZIDA COMO INIBIDORES DE  
MIELOPEROXIDASE.”**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao Curso de Farmácia da  
Universidade Federal do Rio de Janeiro –  
Campus Macaé como requisito para  
obtenção do título de farmacêutico.

Orientador(a): Prof. Dr. Leandro Louback da Silva

Março

2020

Q6a

Quimas, João Victor Fernandes

Avaliação de derivados da isoniazida como inibidores de mieloperoxidase. /  
João Victor Fernandes Quimas. -- Macaé, 2020.  
61 f.

Orientador: Leandro Louback da Silva

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -- Universidade Federal do Rio  
de Janeiro, Campus Macaé Professor Aloísio Teixeira, Bacharel em Farmácia,  
2020.

1. Peroxidase. 2. Hidrazinas. 3. Farmacologia. 4. Bioquímica. I. Silva,  
Leandro Louback da, orient. II. Título.

CDD 572.791

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca com os  
dados fornecidos pelo(a) autor(a)  
Campus UFRJ-Macaé Professor Aloísio Teixeira  
Bibliotecária Rosangela Ribeiro Magnani Diogo CRB7/3719

“As pessoas consideram desafios como problemas, mas pelo contrário, problema é quando não há desafio. Todo desafio tem uma recompensa.”

(Caio Carneiro)

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus, por ter me dado esta oportunidade de realizar o curso de Farmácia, e ter me ajudado e me guiado no meio de tantas dificuldades, angústias e obstáculos. Foram longos anos para chegar até aqui e sem ajuda dele me dando paciência, sabedoria e forças para lidar com todas as adversidades encontradas.

Aos meus Pais Jorge e Marilda, sem os quais eu não teria conseguido alcançar este objetivo, muito obrigado pelo apoio, pelo carinho, pela ajuda e paciência nos momentos nos momentos de estresse. A minha irmã Jennifer da qual me tenho muito carinho e agradecimento por tudo, por todo apoio e por ser assim como meus pais uma inspiração para chegar até aqui.

A Minha avó Dorvalina, por todo carinho todo amor que meu sempre que pode, todo exemplo de mulher guerreira, que mesmo não estando mais presente sempre está comigo me mostrando todo seu legado de educação e princípios éticos e morais.

Aos meus familiares, em especial minhas primas Flávia, Andréia, Carla e Adriana, que sempre me apoiaram e mesmo longe não se esqueceram de mim, sempre se preocupando, me apoiando e me dando forças para continuar. Aos meus tios e Tias, muito obrigado pela força e carinho.

Aos amigos que tive o prazer em encontrar no meio dessa árdua caminhada e os quais batalharam junto comigo para alcançar essa vitória e transformaram momentos difíceis em momentos felizes, de boas histórias, muitas risadas e mais leves. Karoliny Demartini, a quem se transformou numa grande amiga, de muitas risadas, companheira de laboratório, com um grande coração, companheira para todos os momentos, Letícia Lobo, que muito me ensinou, ajudou, companheira de viagem, aquela que com seu jeitinho cativou a todos, Soleane Gonçalves, aquela amiga que soube ser mãe nos momentos certos, que é conselheira, divisora de dores e a quem sou muito grato por ter me ensinado que não importa quão difícil sejam os problemas eles sempre passam e a Raissa Pontes, por toda sabedoria, ajuda e compreensão antes das provas.

Aos professores que conheci, pessoas muito queridas que guardarei para sempre em meu coração.

Ao meu orientador Leandro Louback da Silva pela oportunidade de participar deste projeto, por todo conhecimento transmitido a mim, toda contribuição e dedicação.

A UFRJ que me acolheu, e me concedeu a oportunidade de conceber o título de Farmacêutico.

A Funemac e a FAPERJ pelo apoio financeiro concedido para este projeto

A todos que fizeram parte deste sonho, muito obrigado.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Metabolismo de espécies parcialmente reduzidas a partir de O <sub>2</sub> .....	15
<b>Figura 2-</b> Ciclo catalítico da MPO e seus estados de oxidação .....	15
<b>Figura 3-</b> Produtos primários e secundários da MPO relacionados aos ciclos de cloração e de peroxidação que induzem resposta fisiológica ou patofisiológica	19
<b>Figura 4 –</b> Estrutura do ácido salicilhidroxâmico.....	24
<b>Figura 5 –</b> Estrutura da Isoniazida, do Hidrazida do ácido 4-Aminobenzóico (ABAH), 4-Hidroxibenzóico e do 4-Metoxibenzóico.....	25
<b>Figura 6 –</b> Estrutura dos compostos indólicos 5-fluorotriptamina, 5-clorotriptamina, e os alcaloides indólicos harmol, harmalol, harmina e harmalina .....	27
<b>Figura 7 –</b> Reação direta da oxidação do TMB pela molécula de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	29
<b>Figura 8 –</b> Esquema reacional do ensaio de avaliação do efeito antioxidante pelo método de DPPH.....	31
<b>Figura 9 –</b> Estrutura dos derivados Hidrazônicos.....	34
<b>Figura 10 -</b> Triagem farmacológica dos derivados da ISO sobre a MPO no ciclo da peroxidação .....	35
<b>Figura 11 –</b> Avaliação de porcentagem de inibição da enzima MPO em relação a concentração dos compostos que apresentaram maior perfil de inibição na triagem do ciclo de Peroxidação.....	36
<b>Figura 12 –</b> Estrutura dos compostos que apresentaram melhor perfil de inibição durante a triagem no ciclo da peroxidação.....	38
<b>Figura 13 –</b> Relação entre o tempo em minutos e a concentração de TMB oxidado (Densidade ótica).....	39
<b>Figura 14 -</b> Triagem farmacológica dos derivados da Isoniazida sobre a Mieloperoxidase no ciclo da Cloração.....	40
<b>Figura 15 –</b> Avaliação da Cl <sub>50</sub> dos compostos que apresentaram maior perfil de inibição na triagem do ciclo de Cloração .....	41

<b>Figura 16</b> – Estrutura dos compostos que apresentaram melhor perfil de inibição durante a triagem no ciclo de cloração. ....	42
<b>Figura 17</b> - Avaliação dos compostos com melhor potencial de inibição para verificar sua capacidade de sequestrar Cl-Taurina. Avaliação dos derivados a 100µM.....	44
<b>Figura 18</b> – Avaliação da potência do composto LCSO11 em sequestrar Cl-Taurina a partir da determinação do Cl <sub>50</sub> .....	45
<b>Figura 19</b> - Triagem farmacológica dos derivados da Isoniazida no teste de DPPH.....	46
<b>Figura 20</b> - Avaliação do percentual de atividade antioxidante dos compostos que apresentaram melhor perfil na triagem.....	47
<b>Figura 21</b> – Comparação entre as estruturas do composto LCSO11 e a Flavona, o que possibilita o compreender o perfil antioxidante das moléculas. ....	49
<b>Figura 22</b> - Avaliação dos compostos com melhor potencial de inibição para verificar sua capacidade de sequestrar Cl-Taurina. 50	
<b>Figura 23</b> – Avaliação da potência do composto LCSO11 em sequestrar Cl-Taurina a partir da determinação do Cl <sub>50</sub> .....	51
<b>Figura 24</b> – Radar de biodisponibilidade dos derivados que melhor inibiram o ciclo de cloração da MPO.....	52



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Comparação da potência obtida entre os compostos que apresentaram melhor perfil de inibição durante a triagem no ciclo da peroxidação.....	37
<b>Tabela 2</b> – Comparação da potência obtida entre os compostos que apresentaram melhor perfil de inibição durante a triagem no ciclo de cloração.....	42
<b>Tabela 3</b> - Comparação dos valores de CE <sub>50</sub> , entre os compostos que apresentaram melhor perfil antioxidante durante a triagem no teste de DPPH. ....	48
<b>Tabela 4</b> - Comparação dos resultados teóricos obtidos para os compostos que melhor inibiram o ciclo de cloração da MPO, para a Regra dos 5 de Lipinski. ....	48

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**ABAH** – Hidrazida do ácido 4-aminobenzoico

**APP**- Proteína Precursora Amilóide

**CAT** – Catalase

**ChAT** – Colina Acetil Transferase

**CI-Tau** – Taurinacloramina

**DA**- Doença de Alzheimer

**DMSO** – Dimetilsulfóxido

**DNA** – Ácido Desoxirribonucleico

**DPPH** - 2,2-difenil-1-picrilhidrazil

**CE<sub>50</sub>** – Concentração Eficaz Média

**EPO** – Peroxidase de esinófilos

**ER**- Espécies Reativas

**EROs** – Espécies Reativas de Oxigênio

**HOX** – Ácidos Halogenados

**CI<sub>50</sub>** – Concentração Inibitória Média

**ISO** - Isoniazida

**LDL** – Lipoproteína de Baixa Densidade

**MPO** - Mieloperoxidase

**NADPH** - Fosfato de Dinucleotídeo de Adenina e Nicotinamida

**NAH** - N-Acilhidrazônicos

**PMN** – Polimorfonucleares

**RNA** – Ácido Ribonucleico

**SEM** – Desvio Padrão da Média

**SHA** – Ácido Salicilhidroxâmico

**SNC** – Sistema Nervoso Central

**SOD** - Superóxido Dismutase

**TMB** – 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina

**UV** – Ultravioleta

**VEGF** – Fator de crescimento vascular

**VPO** - Peroxidase Vascular

**X<sup>-</sup>** - Halogênios

## SUMÁRIO

1.0- INTRODUÇÃO.....	14
1.1- MIELOPEROXIDASE: ORIGEM E CICLO CATALÍTICO.....	14
1.3 – MIELOPEROXIDASE PAPEL FISIOLÓGICO E PATOFISIOLÓGICO	17
1.4- INIBIDORES DE MIELOPEROXIDASE .....	23
2. OBJETIVOS.....	28
2.1 OBJETIVOS GERAIS .....	28
2.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	28
3- METODOLOGIA.....	29
3.1- EXTRAÇÃO DE LISADO DE MPO .....	29
3.2- AVALIAÇÃO DO CICLO E PEROXIDAÇÃO DA MIELOPEROXIDASE .....	29
3.3- AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CLORINANTE DA MPO .....	30
3.4 – AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIOXIDANTE DOS DERIVADOS PELO MÉTODO DO DPPH.....	31
3.5 – SEQUESTRO DE TMB OXIDADO .....	32
3.6- SEQUESTRO DE CI-Tau .....	33
3.7 – AVALIAÇÃO DE PROPRIEDADES FARMACOCINÉTICAS <i>in silico</i>	33
3.8 – ESTRUTURA DOS COMPOSTOS AVALIADOS .....	34
3.9 – ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	34
4.0-RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
4.1- INIBIÇÃO DO CICLO DE PEROXIDAÇÃO DA MPO PELOS DERIVADOS NAH .....	35
4.2 – AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE SEQUESTRAR TMB OXIDADO	38
4.3- INIBIÇÃO DO CICLO DE CLORINANTE DA MPO PELOS DERIVADOS NAH .....	39
4.5 – AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE SEQUESTRAR CI-Tau .....	43
4.3 – AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS COMPOSTOS ANÁLOGOS DE ISONIAZIDA.....	45
4.5 – AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE SEQUESTRAR CI-Tau .....	49
4.5 – AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES FARMACOCINÉTICAS <i>in silico</i> .....	51
5 – CONCLUSÃO .....	53
6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54

## RESUMO

QUIMAS, João Victor Fernandes. **Avaliação de derivados de Isoniazida como inibidores de Mieloperoxidase.** Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Bacharelado em Farmácia) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, *campus* Macaé, Professor Aloísio Teixeira, Macaé, RJ 2019.

A enzima Mieloperoxidase (MPO) catalisa reações de oxidação a partir de compostos endógenos, reagindo com  $H_2O_2$ , produzindo ácidos halogenados, como o HOCl, espécie altamente reativa. Fisiologicamente, a MPO, presente em neutrófilos, atua na defesa inata contra infecções, porém os produtos da MPO, e sua presença, em diversos quadros patológicos, tem feito dela um importante alvo farmacológico para o tratamento de condições inflamatórias como: doenças cardiovasculares, doenças neurodegenerativas e doenças imunomediadas. Este trabalho tem como objetivo investigar o perfil antioxidante direto e indireto, através da inibição da MPO, de uma série de derivados *N*-Acilidrazônicos (NAH) derivados da isoniazida (ISO), como candidatos a fármacos com perfil anti-inflamatório. O efeito sobre a atividade da MPO foi verificado em seus dois ciclos, sendo o ciclo peroxidase da MPO observado através da oxidação direta do substrato tetrametilbenzidina (TMB), na presença de  $H_2O_2$ , enquanto o ciclo de cloração foi avaliado através da produção de HOCl, utilizado o método da taurina, na presença de  $H_2O_2$  e íon cloreto, resultando na formação de taurina cloroaminada (Cl-Tau). Homogeneizado de medula óssea de ratos foi empregado como fonte de MPO. A capacidade de sequestrar radicais livres foi verificada pelo método do 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH). Derivados ativos foram avaliados quanto a sua capacidade de sequestrar Cl-Tau e reagir com TMB oxidado para melhor compreensão das suas atividades inibitórias. Parâmetros farmacocinéticos também foram preditos pelo programa SWISSADME. Os derivados LCSO11 e LCSO67 foram os mais ativos sobre o ciclo peroxidase, sendo LCSO67 o mais potente, e sua  $Cl_{50}$  menor que a da ISO ( $3,2 \pm 1,2$  e  $2,4 \pm 0,26$   $\mu M$ , respectivamente). LCSO02, LCSO11, LCSO13 LCSO66 e LCSO67 foram capazes de inibir o ciclo cloração, sendo LCSO02 e LCSO13 mais potentes que a ISO ( $1,6 \pm 0,5$ ,  $1,9 \pm 0,13$  e  $3,8 \pm 0,3$   $\mu M$ ,

respectivamente). Os derivados LCSO11, LCSO12 e LCSO67 foram capazes de sequestrar o radical livre DPPH, sendo LCSO67 o mais potente com  $CI_{50}$  de  $27,3 \pm 1,4 \mu\text{M}$ ). Estudos complementares mostraram que o derivado LCSO67 apresentou perfil de sequestro de TMB oxidado, assim como o derivado LCSO11 foi capaz de sequestrar Cl-Tau, de modo que a atividade inibitória observada para esses derivados está, ao menos em parte, superestimada. Os compostos avaliados para o perfil farmacocinético respeitaram a regra dos 5 de Lipinski. Foram descobertos compostos que são mais potentes que a izonizada em inibir o ciclo cloração, LCSO02 e LCSO13. Além disso alguns derivados se mostraram bons antioxidantes atuando como sequestradores de espécies oxidantes, LCSO11, LCSO12 e LCSO67. Sendo assim, demonstra-se que a atividade da ISO sobre a MPO pode ser otimizada em seus derivados NAH.

## 1.0- INTRODUÇÃO

### 1.1- MIELOPEROXIDASE: ORIGEM E CICLO CATALÍTICO.

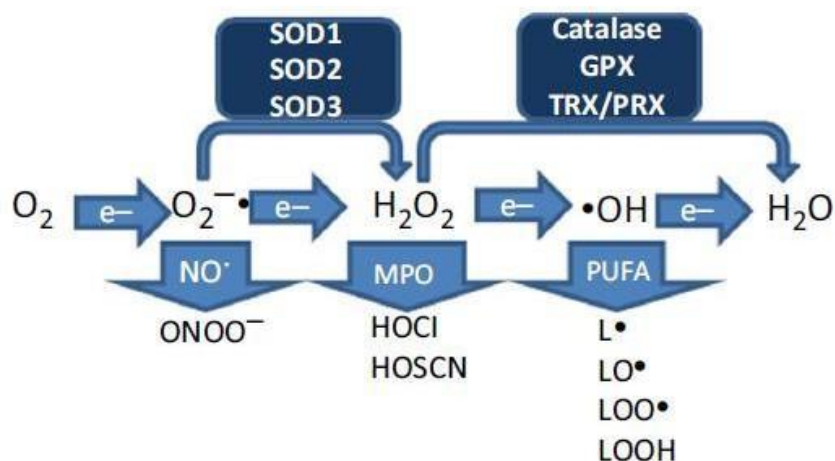
A mieloperoxidase (MPO), uma enzima a qual é sintetizada na medula óssea durante a diferenciação mieloide que completa seu ciclo de maturação dentro dos granulócitos. A MPO é encontrada principalmente em leucócitos polimorfonucleares (PMN) como, monócitos, alguns tipos de macrófagos e neutrófilos (HANSSON, OLSSON e NAUSEEF, 2006) sendo este último a célula onde é encontrada em grandes quantidade e onde ficam armazenadas em grânulos azurófilos (Grânulos primários), constituindo aproximadamente 5% do peso seco destas células (KLEBANOFF, 2005).

Os neutrófilos são as células primordiais que atuam na resposta inflamatória a partir da defesa inata contra infecções. Estas células sofrem migração para a região inflamada onde reconhecem e fazem a fagocitose de bactérias e microrganismos extrínsecos. Tais patógenos são expostos a enzimas como defensinas, catepsinas, elastase neutrofílica, MPO e proteínas com potencial bactericida, as quais ficam armazenados em grânulos e que são capazes de produzir espécies reativas de oxigênio (ROS) como resultado de suas reações (EDWARDS, 1994).

A MPO é uma proteína catiônica altamente glicosilada, com peso molecular de 144 KD sendo constituída por dois dímeros idênticos com um grupamento heme, ligados por uma ponte de dissulfeto e cada monômero é constituído por uma cadeia leve e uma cadeia pesada (ARNHOLD, 2004; FURTMÜLLER *et al.*, 2006).

MPO é uma das principais enzimas responsáveis pela geração de espécies altamente reativas de oxigênio. Esta enzima utiliza o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) proveniente das reações de  $O_2$  com as enzimas NADPH oxidases e suas subunidades (NOX) formando radicais superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) que é consumido pelas enzimas superóxido dismutase (SOD) formando  $H_2O_2$  e é através das enzimas NADPH oxidases, de que são proteínas de membrana que transferem elétrons para o oxigênio formando o  $O_2^{\cdot-}$ , que é convertido a  $H_2O_2$

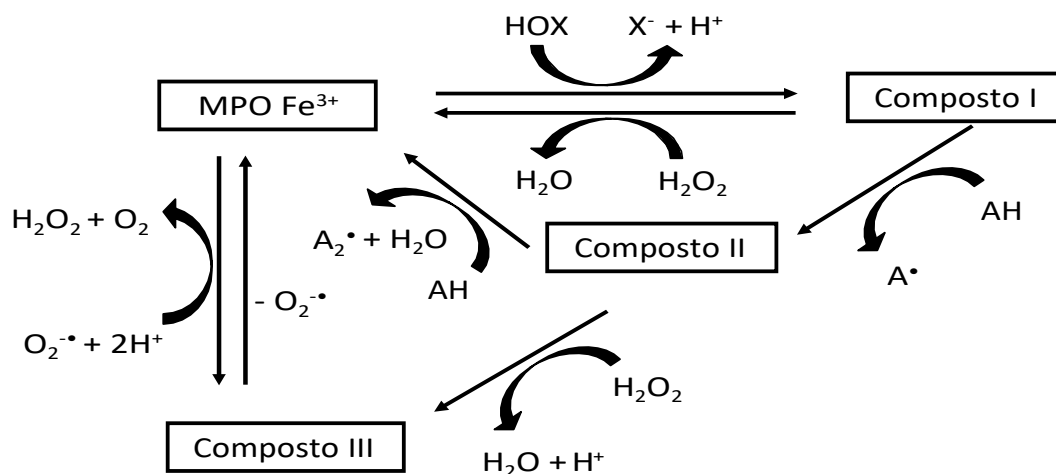
pelas SODs e serve como substrato para a MPO, a qual produz uma espécie altamente reativa, o ácido hipocloroso (HOCl), mas que também podem oxidar outros compostos, como o bromo e o iodo para formarem ácidos halogenados, ou com tiocionato para formar o hipotiocianato, moléculas estas que possuem potencial para causar danos teciduais (Figura 1) (GHOULEH, 2011; PATEL, 2016).



**Figura 1:** Metabolismo de espécies parcialmente reduzidas a partir de  $O_2$  (PATEL, 2016).

A MPO passa por diversas reações químicas para gerar seus produtos, estas se dão a partir dos ciclos de cloração e de peroxidação. Nos quais a enzima passa por diferentes estados de oxidação para gerar seus compostos I e II que os quais apresentam potencial de redução de 1350 mV e 970 mV respectivamente e sofrem oxidações sucessivas para gerarem seus produtos e voltar a enzima em seu estado nativo (Figura 2) (LAZAREVIC, 2015).





**Figura 2-** Ciclo catalítico da MPO e seus estados de oxidação. Adaptado de LAZAREVIC-PASTI, LESKOVAC e VASIC, 2015.

O ciclo de cloração da MPO se dá a partir da formação do composto I, o qual é gerado pela oxidação da enzima em seu estado férrico (MPO<sup>3+</sup>), na presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, gerando o composto reativo, no caso da reação com Cl<sup>-</sup> o HOCl. Essa reação ocorre por meio de um processo de doação de dois elétrons de compostos endógenos ou exógenos (AH) e do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ou pode ocorrer uma redução com transferência de um elétron dos compostos AH para o composto I e ocorrer a formação do composto II, iniciando assim o ciclo de peroxidação (FURTMÜLLER, BURNER e OBINGER, 1998).

O ciclo de peroxidação se dá a partir de reações do composto I com compostos endógenos ou exógenos, que sejam capazes de doar elétrons (AH) formando o composto II. Muitos compostos podem atuar como doadores de elétron para propiciar a formação do composto II, como tióis, tirosina, e alguns medicamentos como ácido mefenâmico e também este ciclo de formação de composto II pode ser aumentado pela presença de compostos capazes de impedir a ligação de Cl<sup>-</sup> com o composto I (SOUBHYE, 2013).

Na presença de altas concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> há o acúmulo de composto II e dessa forma a atividade clorinante pode ser diminuída, pois nesta forma a MPO não pode produzir o HOCl. Por outro lado, o O<sub>2</sub>•<sup>-</sup> pode reagir com o composto II, retornando a enzima na sua forma nativa, a qual poderá reiniciar o

ciclo, resultando assim num favorecimento da atividade clorinante da enzima. Ainda é possível ocorrer a geração do composto III a partir da presença de ânions superóxido que reagem com a MPO nativa (HOOGLAND *et al.*, 1987).

Como característica, o composto III assim como o composto II é inativo para o ciclo de cloração, e ainda o segundo pode ser produto da reação entre o composto III com o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Este terceiro estado da MPO ainda pode ser o responsável pela inativação da mesma, o qual na presença de altas concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pode produzir compostos oxidantes reativos como produto final de reação (HOOGLAND *et al.*, 1987).

O HOCl em geral atua com ácidos graxos insaturados promovendo a oxidação de tióis e gerando cloridrinas que desestabilizam membranas celulares, e com outras moléculas como resíduos de aminoácidos para gerar alterações nas proteínas e fazer com que as mesmas percam sua função (KETTLE *et al.*, 1995).

### **1.3 – MIELOPEROXIDASE PAPEL FISIOLÓGICO E PATOFISIOLÓGICO**

O processo inflamatório é caracterizado como uma resposta do organismo a agentes danosos, como microrganismos, traumas, tumores entre outros, onde os neutrófilos desempenham um papel importante neste processo, com uma resposta ágil e sendo desta maneira a principal célula presente em resposta inflamatória e que quando migrados para a região promovem uma amplificação da resposta inflamatória a partir da produção de mediadores (ABBAS, LICHTMAN e POBER, 2008).

Os neutrófilos recrutados passam por uma sequência de eventos até começarem sua defesa ao organismo, sendo estas, ativação, rolamento, adesão e transmigração, coordenada por moléculas de adesão presentes na superfície de leucócitos e células do endotélio, envolvidas na interação endotélio/neutrófilo (HEIT *et al.*, 2002).

O início do rolamento se dá pela ligação das selectinas, glicoproteínas presentes no neutrófilo e no endotélio, segue com posterior expressão de

integrinas, proteínas as quais fazem o reconhecimento de moléculas de adesão do endotélio, fazendo com que haja uma ligação de alta afinidade com o neutrófilo. Em seguida começa o processo de diapedese, que é feito pelo neutrófilo para chegar ao local do dano tecidual, no qual essa célula segue um gradiente quimiotático (COUSSENS e WERB, 2002).

A migração celular é o principal evento para a resposta inflamatória, onde os neutrófilos migram como resposta a mediadores químicos liberados no local da lesão, sejam eles quimiocinas, componentes do sistema complemento ou componentes de outras vias que em grande parte se ligam aos neutrófilos por receptores de membrana (COUSSENS e WERB, 2002).

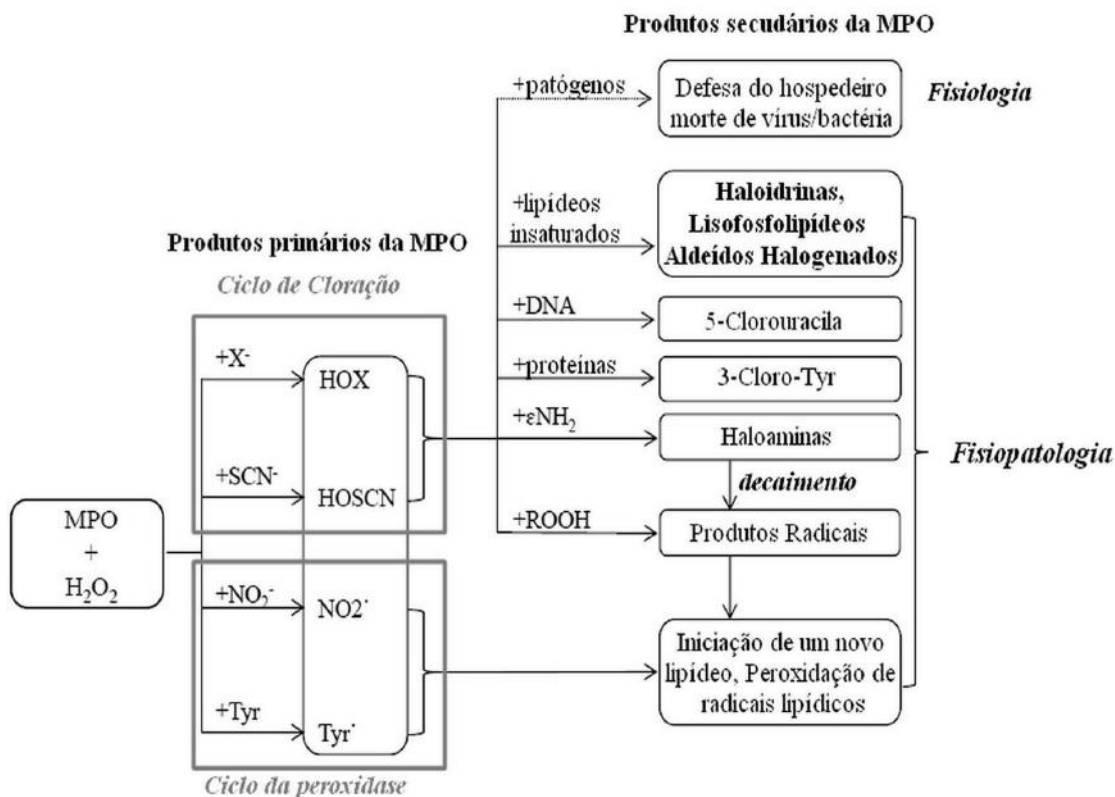
Estes receptores de quimiocinas são acoplados a proteínas G os quais iniciam uma sinalização que faz com que os neutrófilos migrem para o sítio de inflamação, as quimiocinas são capazes de controlar a evolução da resposta inflamatória de acordo com a quantidade de resíduos de cisteína e sua natureza a partir de recrutamento de células efectoras específicas, fazendo com que desta forma uma produção constante de citocinas no local possa desenvolver uma doença crônica ou até mesmo uma neoplasia (WAHL e KLEINMAN, 1998).

A interleucina-8 é considerada uma citocina pró-inflamatória que induz a quimiotaxia, a migração de neutrófilos do compartimento vascular para o local inflamatório e também induz o metabolismo oxidativo dos neutrófilos, conhecido como *burst* oxidativo, além de estimular a produção de ânions superóxido (GAINET *et al.*, 1998).

Assim pode-se compreender que uma cascata de reações metabólicas é gerada quando células fagocíticas como os neutrófilos são ativadas, estas iniciam um processo de respiração não mitocondrial capazes de ativar enzimas para a produção do ânion superóxido, como a SOD. Essa ativação enzimática leva a produção de outras ERO favorecendo o *burst* oxidativo e a produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que serve de substrato para a MPO (PATEL, 2016).

Desta forma, apesar dessas vias favorecerem a proteção ao organismo também vale ressaltar que os ácidos halogenados produzidos pela MPO sob condições fisiológicas a fim de proteger contra patógenos podem reagir com diversas moléculas do organismo gerando diferentes compostos em diferentes

cascatas reacionais que podem servir para a defesa inata ou como promotores de diversas patologias (Figura 3) (LAZAREVIC-PASTI, LESKOVAC e VASIC; 2015).



**Figura 3-** Produtos primários e secundários da MPO relacionados aos ciclos de cloração e de peroxidação que induzem resposta fisiológica ou fisiopatológica. Adaptado de LAZAREVIC-PASTI, LESKOVAC e VASIC (2015).

O HOCl pode reagir com ligações duplas presentes no colesterol ou em ésteres, éteres insaturados e em fosfolípidios para formar cloroidrinas, os produtos destas reações tem efeito negativo nos transportes de membrana podendo ocasionar a ruptura da membrana celular (MALLE *et al.*, 2006). Os produtos reacionais entre HOCl e éteres presentes nos fosfolídeos de membrana podem causar a formação de um ácido graxo clorado 2-clorohexadecanal (2-ClHDA) presente em lesões ateroscleróticas e tecido cardíacos que tiveram infarto do miocárdio. O 2-ClHDA é uma molécula quimioatratante que promove a agregação de neutrófilos da circulação sanguínea para uma região inflamatória e a partir de seus produtos desencadeiam efeitos endoteliais e após a liberação de MPO dos grânulos a enzima muda de

localização e engloba os vasos sanguíneos e promovem a disfunção endotelial (EISERICH *et al.*, 2002).

Outras moléculas também são produzidas e estas servem como produtos das reações da MPO, como 5-clorouracila, que causa danos no DNA, em processos inflamatórios, ou 3-clorotirosina que pode ser encontrada em lipoproteínas de placas de ateroma. Desta forma considerando o papel fisiológico da MPO é visto que a mesma possui diversos produtos e estes podem servir tanto como defesa para o organismo humano, quanto como biomarcadores para condições patológicas podendo ser utilizado para diagnóstico ou para terapêutica (ARMSTRONG, MORROW e SABATINE, 2006).

Os danos oxidativos causados pela MPO estão presentes em locais de inflamação e sua presença, assim como muitos de seus produtos oxidativos estão diretamente ligados a doenças cardiovasculares, sendo a MPO o elo entre inflamação e doenças cardiovasculares devido a esta apresentar papel relevante para o desenvolvimento de aterosclerose, instabilidade de placas de ateroma, resposta no remodelamento ventricular após isquemia e papel na disfunção endotelial (BRENNAN e HAZEN, 2003).

Um fator de risco para a aterosclerose é a presença em altos níveis de lipoproteína de baixa densidade (LDL), o qual é o principal transportador de colesterol no sangue, porém evidências comprovam que para que sejam formadas as placas de ateroma é necessário que o LDL passe por reações oxidativas ou seja modificado quimicamente para que se torne um fator aterogênico (CHISOLM *et al.*, 1999).

Existem evidências de que a MPO atue tanto na iniciação do processo aterosclerótico, quando na propagação de doenças cardíacas associadas ao sistema cardiovascular (RUTH *et al.*, 2006). Como descrito acima, a enzima pode utilizar substratos na presença de  $H_2O_2$  e gerar compostos intermediários reativos, porém como produto final a enzima é capaz de produzir compostos que são instáveis e que são capazes de reagir com proteínas, lipídeos e LDL presentes em lesões ateroscleróticas (HAZEN *et al.*, 1997).

Estudos demonstram que além da MPO ser capaz de formar espécies reativas halogenadas, existem outras enzimas que desempenham o mesmo

papel como a peroxidase vascular (VPO), enzima caracterizada pela presença no coração, músculo liso vascular e em células endoteliais, e a peroxidase de eosinófilos (EPO), que é uma peroxidase presente em granulócitos dos eosinófilos, com reações semelhantes a MPO (YANG *et al.*, 2016; VAN DALEN, e KETTLE, 2001; THUKKANI *et al.*, 2003).

Estudos imuno-histoquímicos e de espectrometria de massas demonstram que lesões causadas por placas de aterosclerose humana são ricas em um composto chamado clorotirosina quando comparados com uma artéria normal, este composto é proveniente de reações oxidativas do HOCl com a apolipoproteína B-100 (apo B-100), a qual é uma proteína essencial para a ligação das moléculas de LDL ao seu respectivo receptor, permitindo a entrada do LDL na célula (ROMAN, WENDLAND e POLANCZYK, 2008). A clorotirosina atua diretamente com fatores de crescimento vascular endotelial (VEGF) que induzem a um efeito organizacional da estrutura vascular (VORCHHEIMER, 2001).

Além disso a MPO também é capaz de consumir óxido nítrico (NO), causando efeitos diretos na função vasomotora e promovendo disfunção endotelial e diminuindo a biodisponibilidade de NO. Estudos demonstram que existe o acúmulo de MPO no endotélio vascular e nitrotirosina nas lesões ateroscleróticas modificando o efeito do NO no endotélio vascular (PODREZ, ABU-SOUD e HAZEN; 2000). Desta maneira o consumo de NO pela MPO está diretamente ligado com a formação de compostos oxidantes nitrados, que podem causar dano oxidativo na parede dos vasos sanguíneos, sendo desta forma um dos compostos, a nitrotirosina, um preditor para o risco de doença arterial coronariana (ABU-SOUD e HAZEN, 2000).

Assim como em doenças cardíacas a MPO também está presente em doenças do Sistema Nervoso central (SNC). Os déficits em funções cerebrais específicas como memória, cognição e movimento são caracterizados como doenças neurodegenerativas as quais atingem o SNC e causam perda progressiva dos neurônios no SNC. Entre as principais estão doença de Alzheimer (DA), doença de Parkinson, esclerose lateral amiotrófica e esclerose múltipla (EM), para as quais existem evidências de que a MPO pode atuar no agravamento do quadro clínico (GAO e HONG, 2008).

Uma das maiores causas de morbidade em idosos com 65 anos ou mais está associada a demência, causada pela DA em 60% dos pacientes. Cerca de 35,6 milhões de pessoas vivem com a DA segundo estimativa de 2015 e esse número pode dobrar em 20 anos chegando a 65,7 milhões de pessoas acometidas em 2030 (TEIXEIRA *et al.*, 2015).

A causa da DA ainda é desconhecida, sabe-se que cerca de 5 a 15% dos casos de DA estejam relacionados a fatores genéticos ligados que afetam a apolipoproteína E (apo E) que participa do transporte de colesterol, em que os subtipos épsilon-4 e épsilon-3 estariam mais propensos a desenvolver a doença em relação ao subtipo épsilon-2, por mecanismos ainda não conhecidos (BIRD, 2018).

Outro fator que deve ser levado em consideração é o aparecimento de alguns sintomas em tecidos cerebrais. Sendo estes depósitos de proteínas beta amiloides, onde tem-se um acúmulo destas dificultando o processo de resposta cerebral. Também são encontradas tranças neurofibrilares as quais são pequenas fibras de proteínas insolúveis envoltos nas células nervosas e emaranhados de tau, uma proteína componente das tranças neurofibrilares e de placas  $\beta$ -amilóides, alguns desses quadros clínicos já são conhecidos e bem característicos (ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2019).

Marcadores neuronais comprovam duas hipóteses principais podem delinear o desenvolvimento da DA, a hipótese da cascata amiloidal, que resulta na deposição de proteínas  $\beta$ -amilóides e emaranhados de tau a partir da clivagem da proteína precursora amiloide (APP) (SERENIKII e VITAL, 2008). A outra hipótese proposta é a colinérgica onde se verificou que a diminuição da concentração de colina acetiltransferase (ChAT) a qual é responsável pela síntese de acetilcolina e baixas concentrações da mesma, o que ocasiona em redução de neurônios colinérgicos, os quais desempenham papel nas atividades de aprendizagem e memória (DE FALCO *et al.*, 2016).

Além de tudo os radicais livres são responsáveis por danos oxidativos causados na DA, visto que muitos estudos elucidam o aumento da peroxidação lipídica, degradação proteína e oxidação de DNA e RNA em diversas regiões do cérebro de pacientes em estágios iniciais da DA (MARKESBERRY e LOVELL, 2007). O tecido cerebral é altamente suscetível a danos oxidativos por requerer

alto consumo de oxigênio, e estes causados por radicais livre que podem ser provenientes da mitocôndria, peptídeos  $\beta$ -amilóides, ferro e da MPO (MAKI *et al.*, 2009).

Além da DA a MPO é amplamente descrita como presente na EM, uma doença autoimune debilitante do SNC. Elevados níveis de MPO foram isolados em tecidos em micróglia ativa de tecido cerebral de pacientes acometidos por esta patologia e estes altos níveis aceleram a progressão da doença (NAGRA *et al.*, 1997).

Além disso, a atividade elevada de MPO está significativamente associada à desmielinização, morte neuronal a qual é um dos fatores que leva a neurodegeneração. Pesquisas documentaram que na encefalomielite autoimune experimental, em um modelo animal com micróglia ativa liberou MPO, que por sua vez gera HOCl, contribuindo para danificar a bainha de mielina que cerca os axônios (NUSSHOLD *et al.*, 2010). Evidências experimentais indicam que a inibição farmacológica da MPO pela hidrazida do ácido 4-aminobenzóico (ABAH) atenuou a gravidade da progressão da EM um modelo animal, comprovando o papel degenerativo crucial da MPO na progressão da doença da EM, assim como estudos para pacientes com doença de Parkinson inibindo a MPO também foram eficazes para comprovar seu papel nesta patologia (FORGHANI R *et al.*, 2012)

#### **1.4- INIBIDORES DE MIELOPEROXIDASE**

Por conta de sua presença em diversas patologias conhecidas, a MPO é amplamente estudada quanto aos compostos que possuem a capacidade de causar sua inibição e diminuir os danos teciduais. Diversos compostos vêm sendo descritos como inibidores de MPO, como ácidos hidroxâmicos, hidrazidas, hidrazinas e compostos indólicos (MALLE *et al.*, 2007).

Os compostos chamados de ácidos hidroxâmicos (RCNOHOH ou RC(O)NHOH), como exemplo o ácido salicilhidroxâmico (SHA) (Figura 4), são conhecidos por seu potencial inibitório frente a MPO. Estudos demonstram sua capacidade de atuarem como agentes redutores dos compostos I e II da MPO



além de sua capacidade de atuarem como substitutos para o  $H_2O_2$  nas reações de cloração (SCHONBAUM e LO, 1972; SCHOBBAUM, 1973).

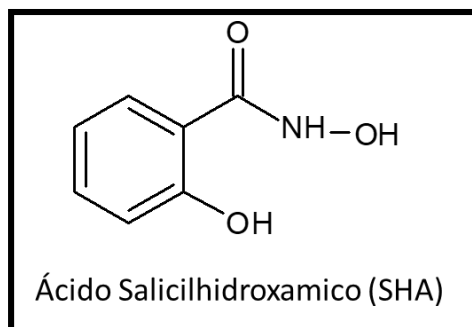


Figura 4 – Estrutura do ácido salicilhidroxâmico.

Apesar do SHA não apresentar efeito sobre a cadeia de geração de ânions superóxido para atuar como  $H_2O_2$ , o mesmo apresenta efeito inibitório sobre a MPO, assim como previne a formação de compostos I e II em baixas concentrações de  $H_2O_2$ , o que é um forte indicativo de que este composto pode atuar como competidor direto do  $H_2O_2$  no sítio de ligação enzimático da MPO (DAVIES e EDWARDS, 1989).

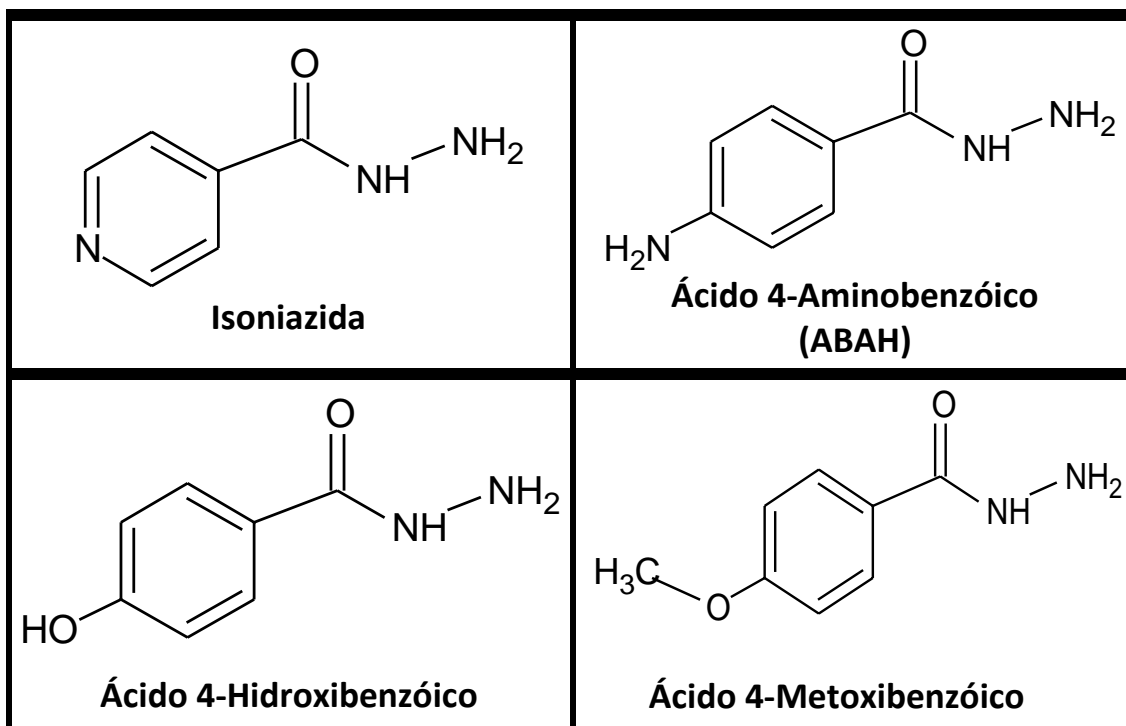
Acredita-se que o mecanismo que envolve a inibição da MPO pelo SHA seja a partir da ligação do com o grupamento heme da enzima. Sua inibição eficaz se dá pela presença de um grupo hidroxila que é capaz de se ligar no sítio de ligação do grupamento heme, formando uma interação entre a molécula e este grupamento. O Valor de  $CI_{50}$  apresentado pelo composto do SHA é de 3 a  $5 \mu M$  (IKEDA-SAITO, SHELLEY e LU, 1991).

Além desses, as peroxidases com grupamentos heme, como é o caso da MPO, estas enzimas apresentam inibição pelos compostos conhecidos como hidrazinas ( $RNHNH_2$ ) e hidrazidas ( $RCONHNH_2$ ). Estes compostos são descritos como inibidores irreversíveis da enzima, impossibilitando sua reconstituição a sua forma nativa (ATOR *et al.*, 1987).

Um dos compostos amplamente conhecidos por inibir a MPO é a isoniazida (ISO), (Figura 5) a qual é um fármaco utilizado para o tratamento da tuberculose, e é uma hidrazida que apresenta perfil inibitório irreversível para os ciclos de cloração e de peroxidação e apresenta valor de  $CI_{50}$  de  $4,7 \mu M$  (SOUBHYE, 2016). A oxidação da ISO é o fator determinante para a

irreversibilidade enzimática causada no grupamento heme, evitando a formação do composto reacional III da MPO (VAN ZYL *et al.*, 1989).

Outro composto conhecido por sua ação inibitória frente a MPO é o ABAH (Figura 5), a principal hidrazida descrita para esta atividade, a qual é um potente doador de elétrons e capaz de inibir de forma pujante a produção de HOCl pela MPO. O ABAH inibe irreversivelmente a atividade da MPO com um  $Cl_{50}$  de 0,3  $\mu$ M. Seu mecanismo de inibição é similar ao da ISO e está associado a oxidação do ABAH no ciclo de peroxidação a composto I e II e a formação de radicais convertem a enzima ao seu estado férrico e a formação de composto III. Na ausência de oxigênio e com o acúmulo de MPO no seu estado férrico ocorre a inibição irreversível, devido a inativação do grupo prostético heme pelos radicais formados pelo ABAH (KETTLE *et al.*, 1997).



**Figura 5** – Estrutura da Isoniazida, do Ácido 4-Aminobenzóico (ABAH), 4-Hidroxibenzóico e do 4-Metoxibenzóico

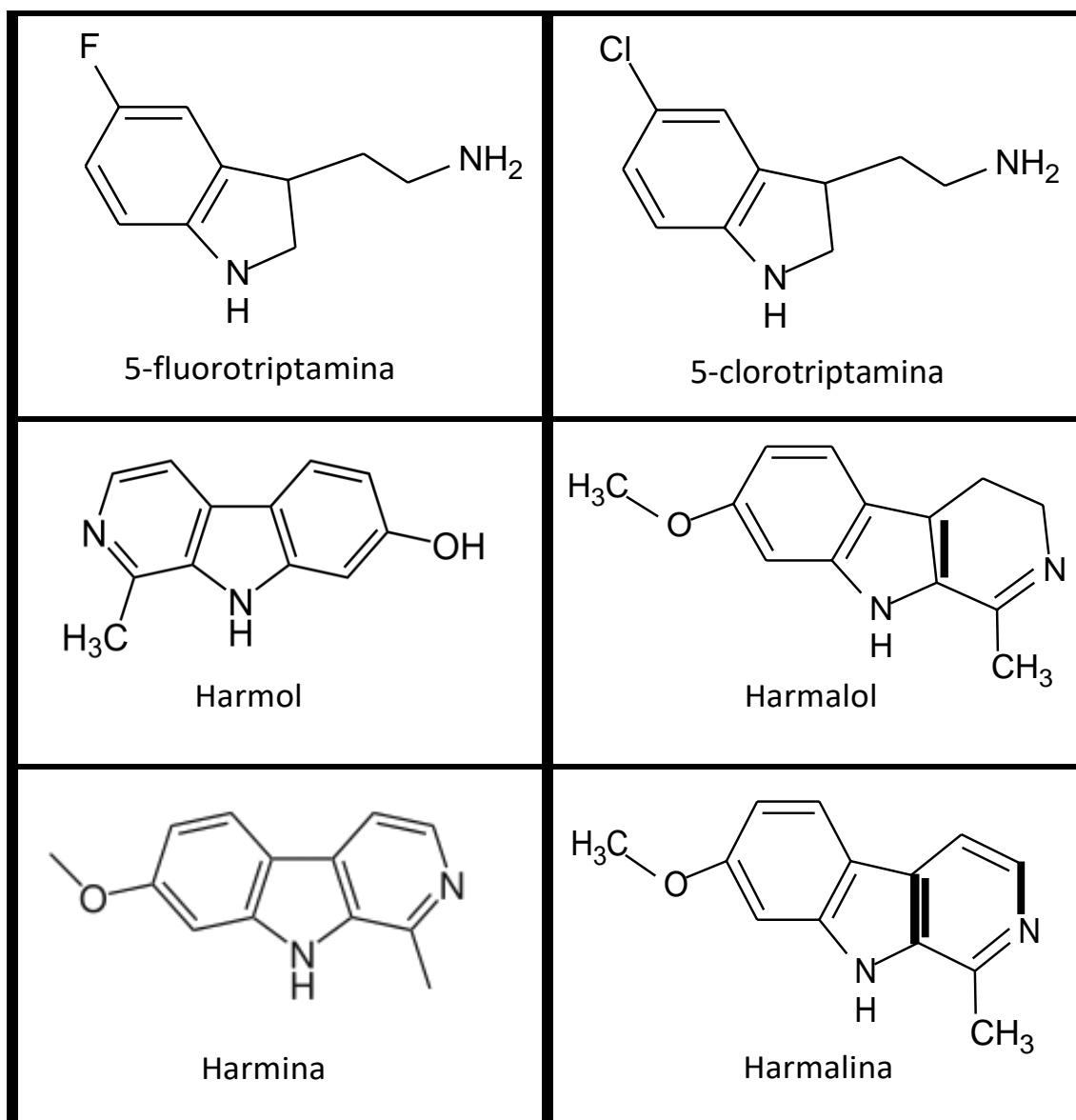
O potencial de inibição do ABAH foi descoberto a partir de um estudo de KETTLE e colaboradores (1995), onde foi testada uma série de hidrazidas do ácido benzoico, como o ABAH, o ácido 4-metoxibenzóico ( $Cl_{50}$  5  $\mu$ M) e o ácido 4-hidroxibenzóico ( $Cl_{50}$  3  $\mu$ M), onde foi descoberto que esses compostos são

inibidores potentes dos ciclos de peroxidação e cloração, sendo o ABAH o mais potente entre eles.

Derivados indólicos também são compostos descritos como inibidores de MPO, estes atuam como doadores de elétron para os compostos I e II das peroxidases. Foi demonstrado que essas moléculas atuam como inibidores reversíveis da MPO quando exibem um potencial de redução de um elétron (JANTSCHKO *et al.*, 2005).

O potencial de inibição dos compostos indólicos se dá a partir do substituinte do anel o qual determina a força de redução dos compostos I e II com os grupos doadores de elétrons, aumentando a reatividade do anel aromático (JANTSCHKO *et al.*, 2005). Substituintes como Cloro ( $CI_{50} = 0,79 \mu\text{M}$ ) e Flúor ( $CI_{50} = 0,73 \mu\text{M}$ ) (XIMENES *et al.*, 2005), que retiram elétrons, podem aumentar o potencial de redução dos derivados indólicos e, como consequência, os desqualificam para atuar como substrato de peroxidase (Figura 6). Devido ao potencial de redução positivo em relação ao composto II, esses substituintes ainda podem servir como doadores de elétrons para composto I, mas não reagirem com o composto II inibindo o ciclo clorinante (ARNHOLD *et al.*, 2006).

Existem ainda estudos que comprovam que os compostos indólicos devem ter um potencial redox baixo, porém não menor que o do composto II, visto que isso facilita com que a enzima volte para seu estado nativo e bloqueie os ciclos de redução, sendo estes compostos inativos frente a inibição da MPO, como é o que acontece com os alcaloides indólicos, harmalol e o harmol, apresentam um potencial de redução abaixo do composto II e acima do composto I, demonstra que os mesmos apresentam uma afinidade ao composto I, promovam a inibição do ciclo clorinante e deixando este disponível para ser reduzido e retornar ao estado nativo. Já com os compostos harmina ( $CI_{50} = 0,12 \pm 0,05 \mu\text{M}$ ) e harmalina ( $CI_{50} = 0,07 \pm 0,02 \mu\text{M}$ ) possuem potencial redox superior ao do composto II e apresentam uma potência alta, sendo capaz de bloquear a formação do composto II por inibirem a MPO no ciclo de cloração evitando a formação do composto II (BENSALEM *et al.*, 2014).



**Figura 6** – Estrutura dos compostos indólicos 5-fluorotriptamina, 5-clorotriptamina, e os alcaloides indólicos harmol, harmalol, harmina e harmalina.

Apesar de um perfil de inibição, os derivados indólicos são substratos potencialmente fracos da MPO e inibidores reversíveis. Sob condições *in vivo*, o composto II pode ser facilmente reduzido por doadores de elétrons alternativos, que seriam radicais livres produtos das reações químicas, diminuindo assim a eficácia desses compostos inibidores reversíveis. Porém esses compostos apesar do baixo potencial podem doar um elétron para o composto I, podem apresentar uma alta afinidade ao composto II quando oxidados, inibindo o sítio ativo da enzima e o composto oxidado apresenta um potencial alto não conseguindo doar outro elétron (KETTLE e CANDAEIS, 2000).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVOS GERAIS

Avaliar uma série de derivados N-acilhidrazônicos (NAH), análogos planejados a partir da ISO, sintetizados e cedidos pelo Laboratório de Catálise Aplicada e Síntese Orgânica (LACASO) da UFRJ-Macaé, quanto ao seu potencial efeito sobre a atividade da MPO, atuando como antioxidantes indiretos, e potencial atividade sequestradora de espécies oxidantes, atuando como antioxidantes diretos.

### 2.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a atividade antioxidante indireta da série de compostos NAH, através da inibição das atividades peroxidase e clorinante da MPO.
- Avaliar o efeito antioxidante direto dos derivados pelo método de 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH).
- Investigar possível sequestro de taurinacloroamina (Cl-Tau) e de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) oxidado por derivados ativos, avaliando possível interferência com atividade inibitória sobre MPO.
- Analisar o perfil farmacocinético *in silico* dos compostos que apresentam melhor perfil de inibição da MPO.

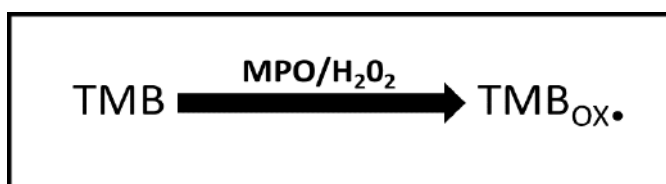
### 3- METODOLOGIA

#### 3.1- OBTENÇÃO DE MPO

A medula óssea de ratos wistar foi empregada como fonte de MPO. Para isso, realizou-se a lavagem do interior dos ossos da pata traseira dos ratos (Fêmur e tíbia) com NaCl 0,9% gelado para retirada da medula óssea. Em seguida o material obtido foi homogeneizado e centrifugado (10 min, 3000 rpm, temperatura ambiente). Para retirada de hemácias das amostras o pellet foi homogeneizado em 5 mL de salina hipotônica (NaCl 0,2% e EDTA 1 mM) por 30 segundos, e então foram adicionados 5 mL de salina hipertônica (NaCl 1,6% e EDTA 1 mM) para obtenção de uma solução novamente isotônica. Após homogeneização, o material foi novamente centrifugado (10 min, 3000 rpm, temperatura ambiente). Caso ainda fosse observada a presença de hemácias o procedimento deveria ser repetido até a obtenção de um pellet totalmente branco. Uma vez obtido, o pellet branco foi homogeneizado em homogeneizador tipo Potter com 3 mL de tampão PBS pH 7 10 mM contendo NaCl 2 mM e MgCl<sub>2</sub> 1 mM (tampão A). O Pellet obtido foi homogeneizado novamente em Potter utilizando tampão A contendo 1% de HTAB. Após homogeneização o material foi centrifugado a 20.000 G, 4 °C por 15 minutos e o sobrenadante foi coletado e armazenado congelado para as futuras análises (SARKARATI, AKYOL e KILINÇ, 2015).

#### 3.2- AVALIAÇÃO DO CICLO E PEROXIDAÇÃO DA MIELOPEROXIDASE

O TMB tem sido amplamente utilizado para testes de quantificação e de avaliação de atividade das peroxidases. Desta forma na presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a peroxidase reage com a molécula de TMB oxidando-a.



**Figura 7** – Reação direta da oxidação do TMB pela molécula de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (ANDREWS e KRINSKY, 1982)

A atividade da MPO foi medida através da sua capacidade de oxidar a 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB) a um produto de cor azul (TMB<sup>•+</sup>), após reagir com o seu substrato H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Em placa de microtitulação de 96 poços contendo taurina (10 mM), derivados a (100 µM), sobrenadante de medula óssea de rato rico em MPO (0,2 %), solução cromogênica TMB (20 %) e tampão citrato fosfato pH 6 (qsp 120 µL), mantida em incubação por 30 min a temperatura ambiente, a reação foi iniciada com a adição de solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (240 µM), produzindo um volume final de 125 µL. Após 5 min a reação foi interrompida pela adição de 100 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 M modificando a cor do meio reacional para amarelo e quantificando em espectrofotômetro a 450 nm. Para avaliar a potência dos compostos derivados da ISO o protocolo acima descrito foi realizado na presença de diferentes concentrações na faixa de 0,1 a 100 µM (ANDREWS e KRINSKY, 1982). A ISO foi utilizada como padrão positivo para comparação no teste nas mesmas concentrações das substâncias de 0,1 a 100 µM.

### **3.3- AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CLORINANTE DA MPO**

Sob condições fisiológicas a principal reação catalisada pela MPO é a de sua atividade clorinante, a qual consiste na oxidação de compostos halogenados (X<sup>-</sup>), principalmente o Cl<sup>-</sup>, mas também pode reagir com Br<sup>-</sup> e SCN<sup>-</sup> tendo como resultado final a produção de ácidos halogenados (HOX) ou ácido hipocianeto (HOSCN) (NAUSEEF, 2014).

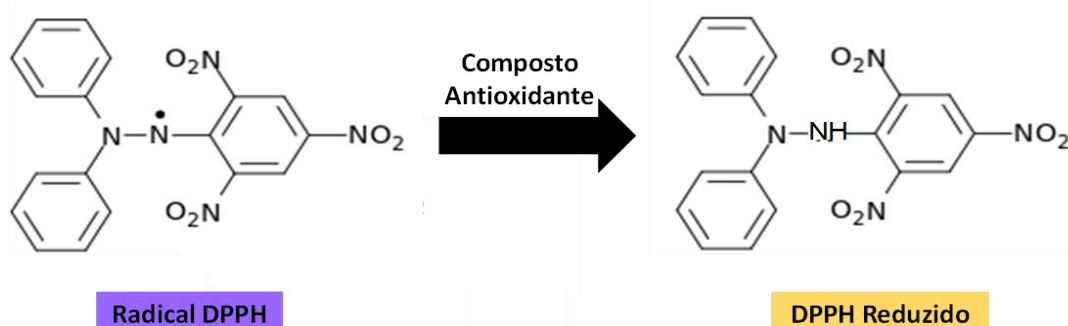
A atividade clorinante da MPO foi medida a partir de sua capacidade de produzir HOCl sob reação com o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. O HOCl possui a capacidade de reagir com aminas primárias, como a taurina, formando Cl-Tau. Esta por sua vez reage, na presença de I<sup>-</sup>, com o TMB promovendo a modificação de coloração, para azul.

Os testes foram realizados em placa de microtitulação de 96 poços contendo solução de taurina (10 mM), NaCl (100 mM) para promover a presença de íons cloreto no meio reacional, compostos inibidores (100 µM), sobrenadante de medula óssea, rico em MPO, e solução tampão pH 7,5 0,05 M (qsp 120 µL), esta mistura foi mantida em temperatura ambiente por 15min. A reação é iniciada

pela adição de  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $240 \mu\text{M}$ ), perfazendo desta forma um volume final de  $125 \mu\text{L}$ . O meio reacional foi deixado em reação por 15 min e em seguida é feita a adição de catalase (CAT) ( $40 \mu\text{g/mL}$ ), a qual é uma enzima que faz a decomposição do  $\text{H}_2\text{O}_2$  excedente no meio reacional (CADENAS e DAVIES, 2000). Após a CAT foi então adicionada a solução de TMB + iodeto de potássio, a placa foi mantida em reação por 5 minutos e em seguida foi adicionado  $\text{H}_2\text{SO}_4$  e a densidade ótica foi medida a  $450 \text{ nm}$  em espectrofotômetro UV. Os testes foram realizados conforme metodologia descrita por DYPBUKT e colaboradores (2005). Para avaliar a potência dos protótipos a inibidores o protocolo acima descrito foi realizado na presença de diferentes concentrações na faixa de  $0,01$  a  $100 \mu\text{M}$ , e foi utilizado a Isoniazida como padrão positivo (VAN ZYN *et al.*, 1989).

### 3.4 – AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIOXIDANTE DOS DERIVADOS PELO MÉTODO DO DPPH

Entre os métodos que podem ser utilizados para avaliação do efeito antioxidante, o método do 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) é um dos mais utilizados, no qual é um radical livre que apresenta certa estabilidade devido a deslocalização de um elétron desemparelhado em sua molécula. Esta molécula apresenta coloração violeta e quando reage com o composto antioxidante passa a apresentar coloração amarelada devido a sua redução á uma hidrazina (ALVES *et al.*, 2010).



**Figura 8** – Esquema reacional do ensaio de avaliação do efeito antioxidante pelo método de DPPH. O Radical DPPH que apresenta coloração violeta, é reduzido pelos compostos antioxidantes formando uma Hidrazina a qual apresenta coloração amarelada.



Desta forma o teste foi delineado em placa de microtitulação de 96 poços contendo 100 µL de DPPH a 600 µM em solução metanólica e 100 µL dos compostos a serem analisados, solubilizados também em solução metanólica a 200 µM. Usou-se como padrão a quercetina, visto que a mesma já é conhecida como apresentando potencial antioxidante frente ao DPPH (BEHLING, 2008) e a ISO (VAN ZYL *et al.*, 1989). O Meio reacional foi mantido por 30 minutos em temperatura ambiente e protegido da luz e em seguida foi feita a leitura em espectrofotômetro UV a 517 nm. Para avaliar a potência dos protótipos a inibidores o protocolo acima descrito foi realizado na presença de diferentes concentrações na faixa de 3 a 300 µM (VIVOT *et al.*, 2001). O Cálculo do percentual antioxidante foi feito a partir da fórmula abaixo, onde DO é a densidade ótica, controle é a Quercetina e DMSO é o Branco.

$$\left( \frac{(DO \text{ controle} - DO \text{ branco}) - (DO \text{ derivado} - DO \text{ branco})}{(DO \text{ controle} - DO \text{ branco})} \right) \times 100$$

### 3.5 – SEQUESTRO DE TMB OXIDADO

A fim de verificar se composto ativo sobre o ciclo peroxidase era capaz de reagir com o TMB oxidado, já que esse era o produto medido como indicador da atividade da MPO, e assim poder descobrir resultados falso positivos foi então estabelecido um protocolo reacional para verificar reações dos presentes compostos com o TMB oxidado.

Avaliou-se a capacidade do inibidor de reagir com o TMB oxidado, deixando o meio de cor azul transparente pela sua complexação com o TMB disponível. O meio reacional foi incubado em uma placa de microtitulação de 96 poços onde foram incubadas a solução de tampão fostato pH 7,4, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100 µM) e solução cromogênica de TMB 20%, a reação foi deixada em incubação por 15 minutos para oxidação completa do TMB e em seguida foi adicionado o composto na concentração final de 100 µM, perfazendo um total de 170 µL de meio reacional em cada poço. O TMB oxidado foi detectado em espectrofotômetro UV a 652 nm por 20 minutos após a adição do inibidor.

### 3.6- SEQUESTRO DE Cl-Tau

A fim de avaliar o real efeito inibitório dos compostos que apresentaram perfil de inibição significativo no ciclo clorinante da MPO, o experimento tem como objetivo avaliar a capacidade dos compostos protótipos a inibidores em sequestrarem, reagirem, com a Cl-Tau presente no meio, impedindo assim que a mesma esteja presente para reagir com o TMB e impossibilitando a formação do TMB oxidado e gerando a coloração azul.

Foram então selecionados os compostos ativos sobre a produção de HOCl e avaliou-se a sua capacidade de reagir com a Cl-Tau. O meio reacional foi incubado em uma placa de microtitulação de 96 poços onde foram adicionados os compostos protótipos a inibidores a 100  $\mu$ M, solução de Cl-Tau a 100  $\mu$ M em tampão fostato pH 7,4, a reação foi deixada em incubação por 15 minutos e em seguida, para detectar a Cl-Tau remanescente foi adicionada a solução cromogênica TMB/KI perfazendo um total de 170  $\mu$ L de meio reacional em cada poço. A quantificação foi realizada em espectrofotômetro UV a 655 nm. Para avaliação da potência dos compostos o protocolo acima foi realizado variando concentrações entre 1  $\mu$ M e 100  $\mu$ M.

### 3.7 – AVALIAÇÃO DE PROPRIEDADES FARMACOCINÉTICAS *in silico*

A fim de avaliar as propriedades farmacocinéticas dos compostos, visando uma administração oral, por meio da análise de sua estrutura química, os compostos foram desenhados no programa SWISSADME (<http://www.swissadme.ch/>) onde foram calculados os parâmetros teóricos e foram extraídos os parâmetros baseados na regra dos 5 de Lipinski, que consiste de que para uma molécula ser candidato a um fármaco com boa disponibilidade oral, precisa apresentar valores favoráveis dentro dos 4 parâmetros, podendo violar apenas uma dessas regras.

São considerados os seguintes fatores: Log P menor ou igual a 5, aceptores de ligação de hidrogênio menor ou igual a 10, doadores de ligação de hidrogênio menor ou igual a 5 e massa molecular menor ou igual a 500. Desta

forma é possível fazer uma avaliação preditiva do perfil de biodisponibilidade oral para moléculas novas (DAINA, MICHIELIN e ZOETE, 2017).

### 3.8 – ESTRUTURA DOS COMPOSTOS AVALIADOS

As substâncias utilizadas foram derivados acilhidrazônicos da isoniazida que apresentavam uma parte da estrutura similar, sofrendo algumas modificações.

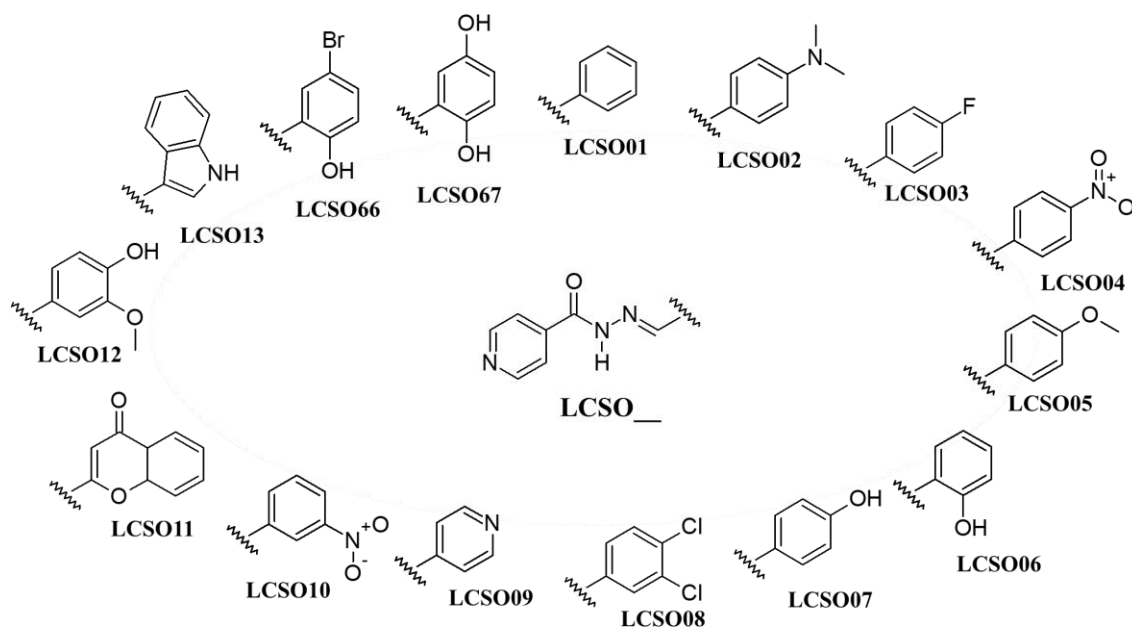


Figura 9 – Estrutura dos derivados Hidrazônicos.

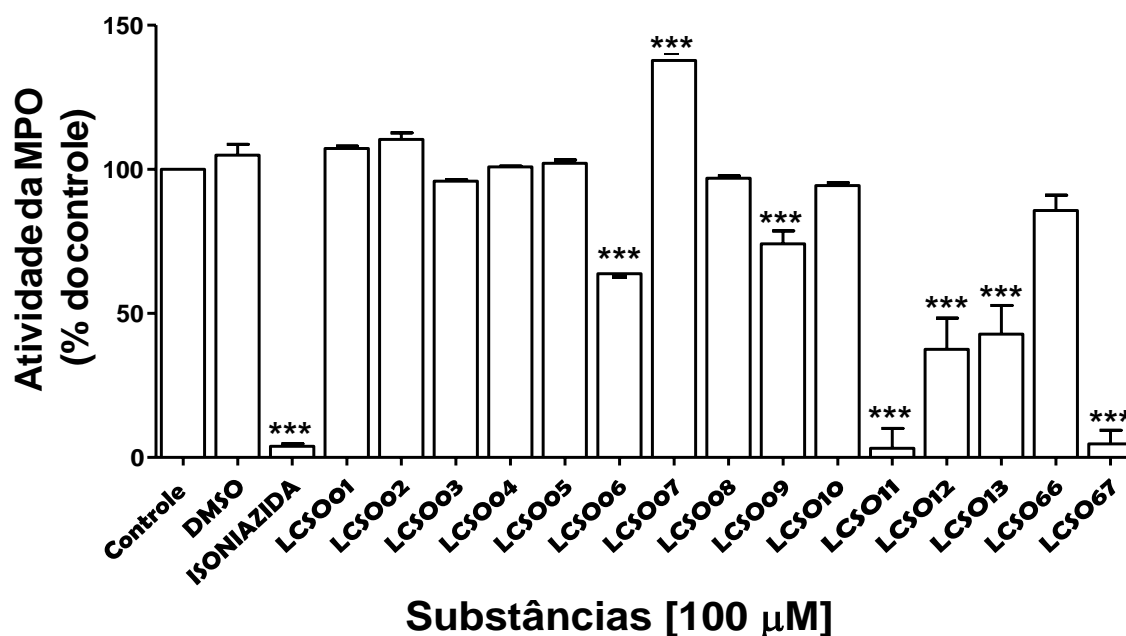
### 3.9 – ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Todos os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa Prism 5.0 (GraphPad Software, USA). Para múltiplas comparações foi utilizado o teste análise de variância (One-way - ANOVA), seguido do teste de *Dunnet* (Prism 5.0). As diferenças entre os grupos experimentais e o grupo controle (DMSO) foram consideradas estatisticamente significativas quando  $*P < 0,001$ .

#### 4.0-RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram testados 15 compostos NAH que apresentam como núcleo comum a ISO, que é um antibiótico utilizado no tratamento de primeira linha para a tuberculose e que é um inibidor conhecido da MPO (FORBES *et al.*, 2012). Os compostos sofreram diferentes substituições e os mesmos foram testados quanto aos seus potenciais efeitos inibitórios sobre a atividade da MPO.

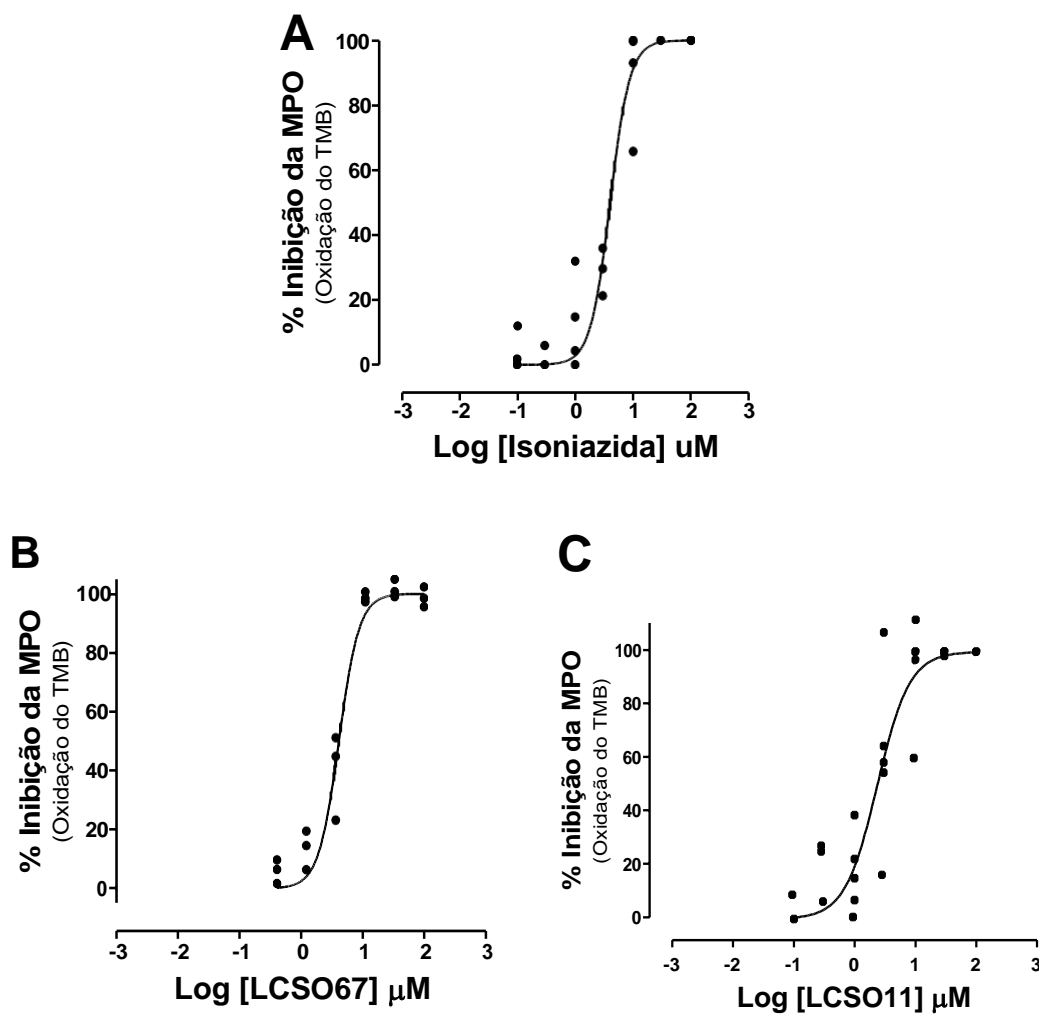
##### 4.1- INIBIÇÃO DO CICLO DE PEROXIDAÇÃO DA MPO PELOS DERIVADOS NAH



**Figura 10** - Triagem farmacológica dos derivados da ISO sobre a MPO no ciclo da peroxidação. Avaliação dos derivados a 100µM. Dados foram apresentados por % do controle. As barras representam as médias e os traços os erros padrões da média de 3 experimentos em triplicata. \*\*\*p<0,001 One-way ANOVA ("Teste de comparação múltipla de Dunnett"), quando comparado ao grupo DMSO (veículo).

Os primeiros testes feitos sobre a atividade de inibição da MPO, serviram para triar entre os 15 compostos quais apresentariam inibição do ciclo de peroxidação da MPO em uma concentração de 100 µM. Com base nas atividades inibitórias *in vitro* apresentadas na figura 10, observou-se que os compostos NAH LCS011 e LCS067 foram consideravelmente mais eficazes, com porcentagens de inibição de 96,8 e 95,3%, respectivamente.

Desta forma considerou-se então dois compostos NAH para verificação de potência comparando-os com a isoniazida. Tal perfil inibitório pode validar desta forma o perfil existente na literatura de que compostos hidrazônicos são inibidores de MPO (KETTLE *et al.*, 1995).



**Figura 11** – Avaliação de porcentagem de inibição da enzima MPO em relação a concentração dos compostos que apresentaram maior perfil de inibição na triagem do ciclo de Peroxidação. A – Isoniazida, utilizada como padrão; B- Composto LCSO67; C- Composto LCSO11. Cada ponto representa um experimento em triplicata. Os parâmetros de  $CI_{50}$  foram obtidos por regressão não linear usando o GraphPad Prism Versão 5.

Sabe-se que no ciclo de cloração a enzima é reduzida a composto I e ocorre a liberação de HOCl. Porém na presença de um doador de elétrons pode ocorrer o ciclo de peroxidação, que consiste na formação da redução do

composto I em composto II e conseqüentemente redução do composto II para o estado férrico novamente (JANTSCHKO, 2005).

Os resultados de potência dos compostos são encontrados na figura 11 e na tabela 1, onde é avaliado a razão entre variação da concentração dos compostos e porcentagem de inibição pelo nível de oxidação do TMB. O TMB é oxidado pelo composto I e pelo composto II, de modo que a inibição da oxidação do TMB pela MPO pode se dar por competição da ligação desse substrato com o sítio ativo da enzima, ou ainda pela inibição da ligação do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> com a MPO, impedindo a formação do composto I.

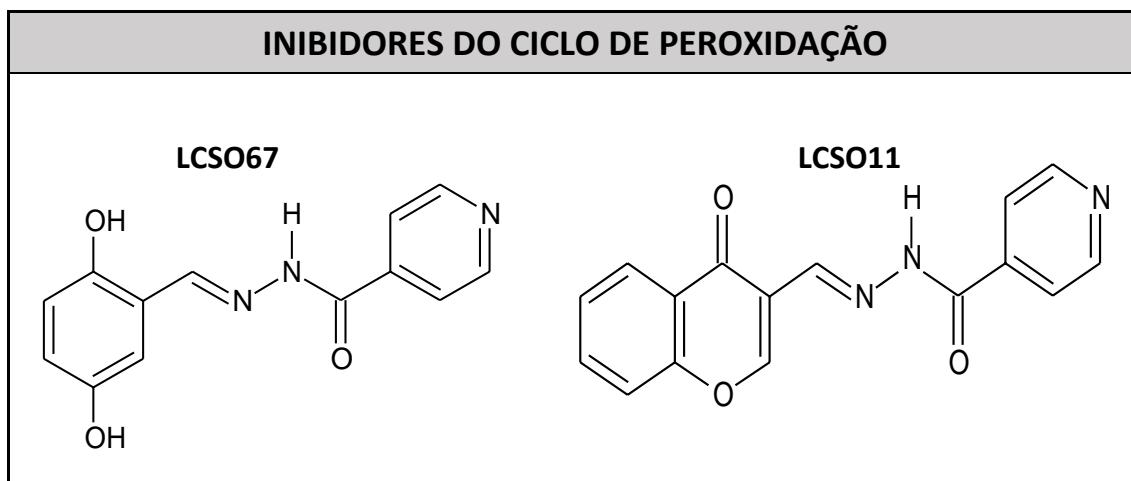
De acordo com os dados é possível concluir que os compostos LCSO11 e LCSO67 foram os compostos mais potentes e que ambos apresentam perfil de inibição no ciclo de peroxidação. Sua potência pode ser comparada com a da ISO, que é o composto com perfil de inibição já conhecido (FORBES *et al.*, 2012), onde observa-se que o composto LCSO67 apresentou um CI<sub>50</sub> 2,4 µM, que comparado a ISO, foi melhor, sendo desta forma uma otimização considerável deste inibidor por apresentar uma CI<sub>50</sub> de aproximadamente 2 µM amenos.

Já o composto LCSO11, teve uma resposta similar à da ISO, apresentando valores próximos e não apresentando perfil de otimização do inibidor já conhecido. Porém este composto não deve ser descartado, considerando-se que um composto promissor seria um protótipo que inibisse os dois ciclos da MPO, com uma otimização da ISO e que apresentasse um efeito antioxidante.

**Tabela 1** – Comparação da potência obtida entre os compostos que apresentaram melhor perfil de inibição durante a triagem no ciclo da peroxidação.

<b>Compostos</b>	<b>CI<sub>50</sub> ± EPM(µM)</b>
<b>Isoniazida</b>	3,8 ± 1,1
<b>LCSO67</b>	2,4 ± 0,26
<b>LCSO11</b>	3,2 ± 1,2

(Legenda: EPM – Erro padrão da média; CI<sub>50</sub> – Concentração inibitória média)

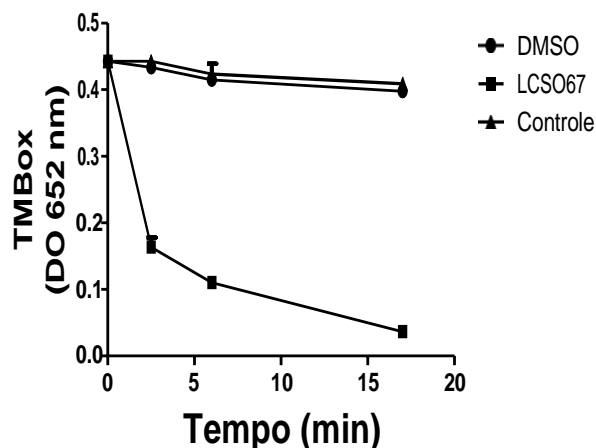


**Figura 12** – Estrutura dos compostos que apresentaram melhor perfil de inibição durante a triagem no ciclo da peroxidação.

#### 4.2 – AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE SEQUESTRAR TMB OXIDADO

Existem ainda fatores que podem contribuir para um efeito que pode ser um falso positivo, ou seja, um perfil de inibição que não é o real. Considerando as atividades sequestrantes apresentadas pelos derivados LCSO11, LCSO12 e LCSO67, e que esses também foram capazes de inibir a atividade da MPO, fez-se necessário avaliar a possibilidade de se ter nos resultados a presença de falso positivo. Isso se dá pelo fato de que os métodos empregados para medição da atividade da MPO, têm como princípio a medida de espécies oxidantes e reativas, tais como Cl-Tau e TMB oxidado.

Por isso foi então pensado num experimento para verificar o potencial do composto mais ativo no ciclo peroxidase. Para isso, a enzima foi incubada com o TMB e o  $H_2O_2$  para oxidação do TMB em meio idêntico àquele em que se realizou os testes de inibição da enzima. Após oxidação total do TMB verificou-se a capacidade do derivado LCSO67 de reagir com o TMB oxidado, reduzindo o novamente (figura 13). O composto LCSO11 não foi considerado para o experimento, visto que o mesmo não significou uma otimização da ISO para a inibição do ciclo de peroxidação.



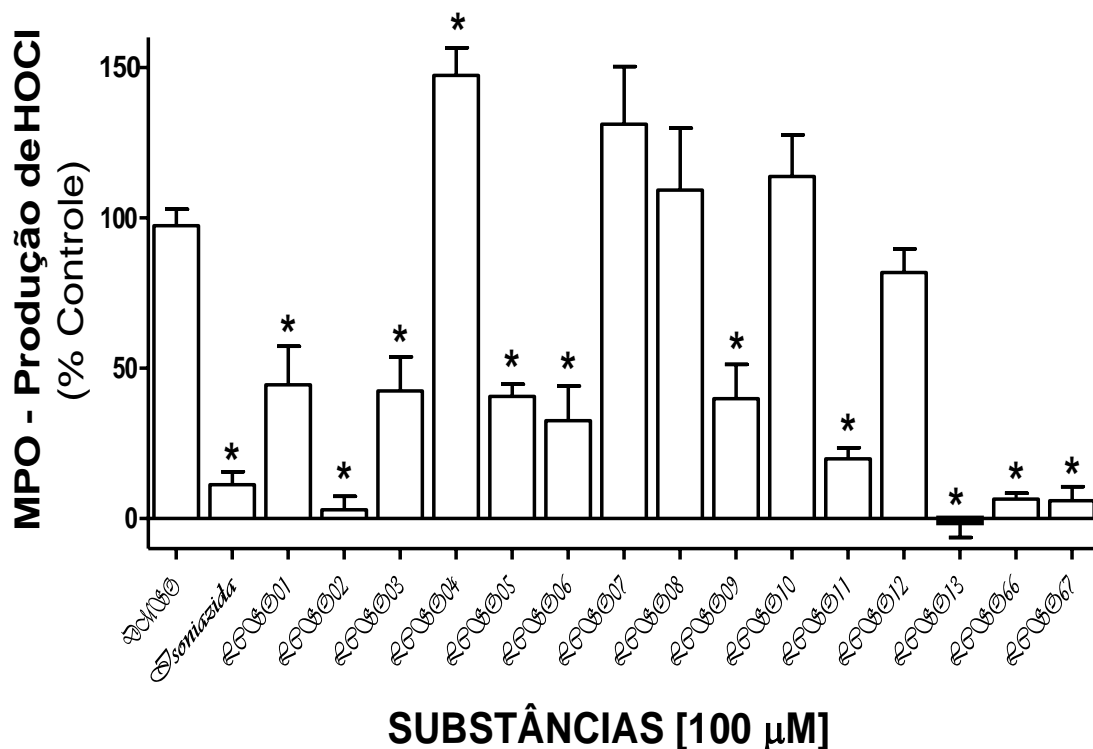
**Figura 13** – Relação entre o tempo em minutos e a concentração de TMB oxidado (Densidade óptica). O LCSO67 foi utilizado na concentração de 100  $\mu$ M, DMSO foi utilizado como 0% do consumo de TMB oxidado e Controle foi utilizado como branco.

Ao analisar o perfil de sequestro de TMB oxidado em função do tempo, é possível observar que a substância LCSO67 foi capaz de reagir com o TMB consumindo-o, tornando-o novamente incolor. Dessa forma, pode-se imaginar que o perfil inibitório desse derivado, ao menos em parte está superestimado, visto que o método usado não discrimina a inibição da oxidação do TMB da redução do TMB que tenha sido oxidado pela enzima.

#### 4.3- INIBIÇÃO DO CICLO DE CLORINANTE DA MPO PELOS DERIVADOS NAH

A inibição do ciclo de peroxidação por um composto não necessariamente indica que este mesmo composto terá atividade inibitória sobre o ciclo de cloração da MPO (KETTLE e WINTERBOURN, 1994). Foi então realizada uma nova triagem para o ciclo de cloração utilizando todos os 15 compostos. A determinação realizada foi da habilidade dos compostos em inibir a produção de HOCl a partir da quantificação de Cl-Tau (Figura 14).



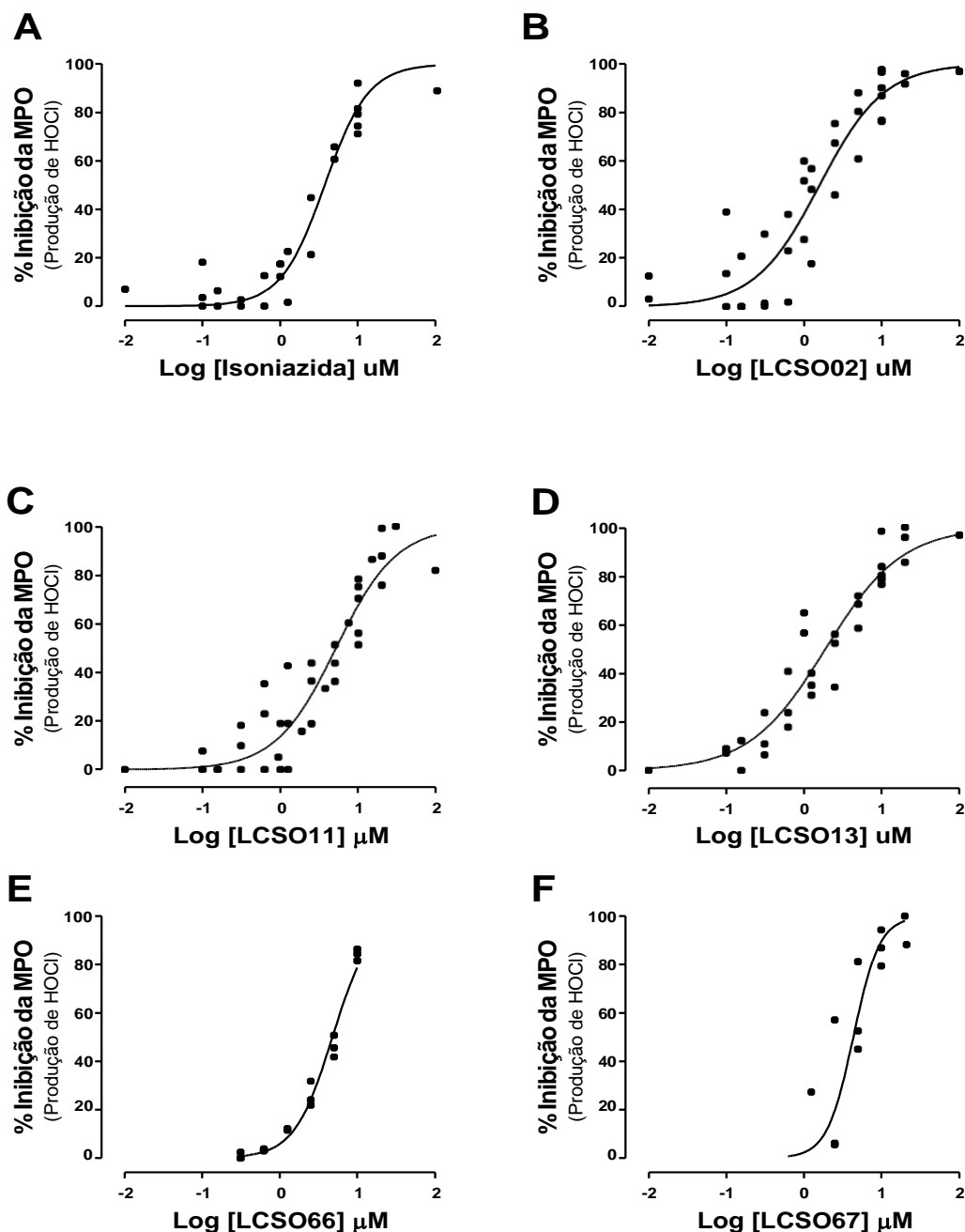


**Figura 14** - Triagem farmacológica dos derivados da Isoniazida sobre a Mieloperoxidase no ciclo da Clorinação. Avaliação dos derivados a 100µM. Dados foram apresentados por % do controle. As barras representam as médias e os traços os erros padrões da média de 3 experimentos em triplicata. \* $p < 0,001$  One-way ANOVA ("Teste de comparação múltipla de Dunnett"), quando comparado ao grupo DMSO (veículo).

Os compostos que apresentaram resultados satisfatórios foram os compostos LCSO02, LCSO11, LCSO13, LCSO66 e LCSO67. Nota-se que os dois dos compostos mais potentes em inibir o ciclo de peroxidação estão apresentando efeito considerável também para a clorinação e foram selecionados para avaliação de suas potências. Também vale considerar que dentre os compostos NAH o derivado LCSO13 pode também ser considerado um composto indólico, que também apresenta histórico de inibição da MPO na literatura (JANTSCHKO *et al.*, 2005).

Além disso vale ressaltar que alguns compostos parecem potencializar a atividade da enzima, ou seja, aumentaram sua capacidade de produção de HOCl, de forma significativa, o derivado LCSO04. Estudos devem ser realizados para melhor compreensão desse efeito. Sabe-se por exemplo que o próprio  $H_2O_2$  pode reagir com o composto I, levando-o a composto II. Nessa situação haveria acúmulo desse composto, prejudicando assim a formação de HOCl (KIRCHNER *et al.*, 2010).

Os resultados dos testes de potência estão apresentados na figura 15 e na tabela 2, onde foi avaliado a razão entre a variação de concentração dos compostos inibidores e a porcentagem de HOCl produzido, medindo a quantidade de Cl-Tau disponível no meio (CADENAS e DAVIES, 2000).



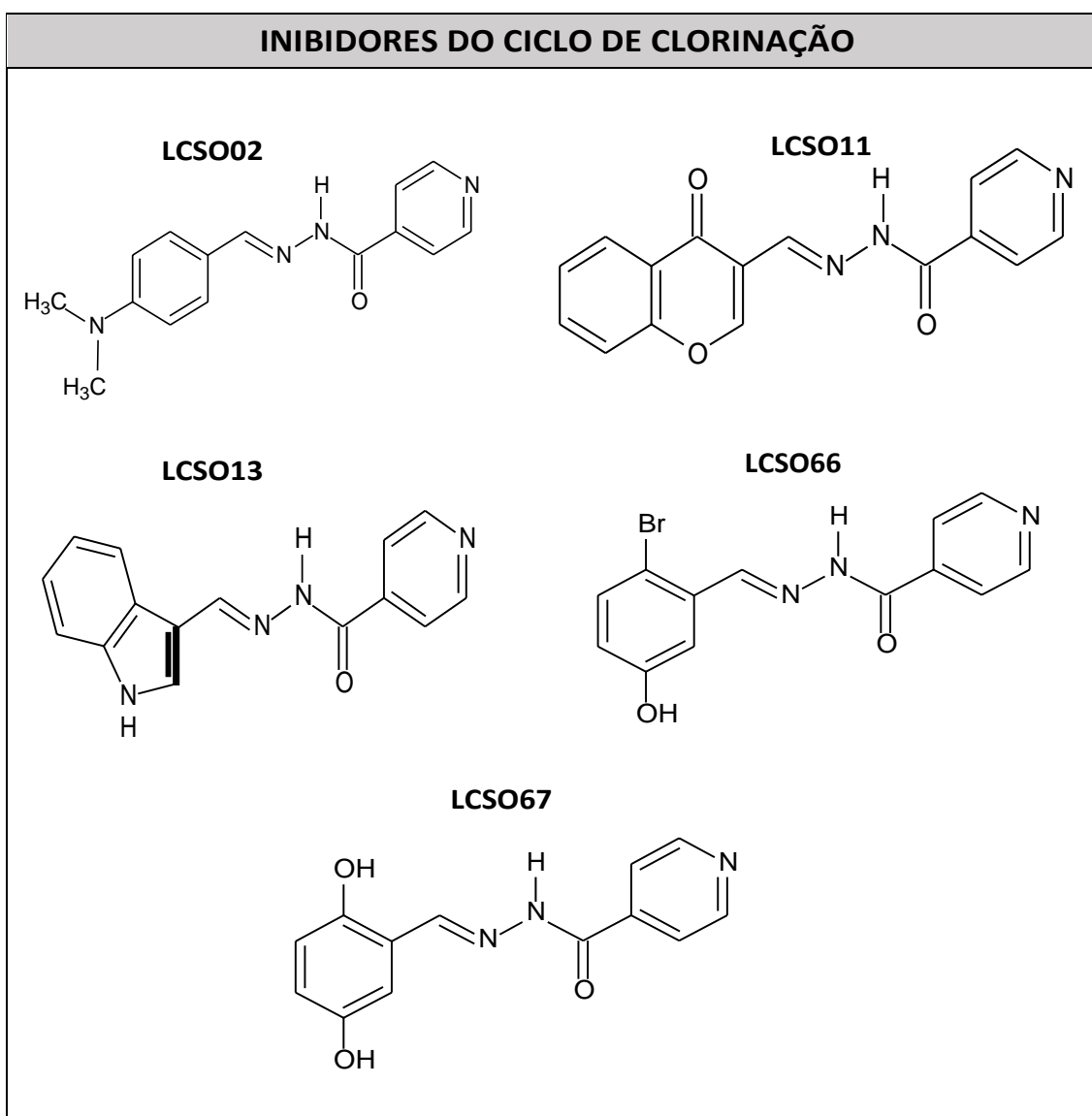
**Figura 15** – Avaliação da  $Cl_{50}$  dos compostos que apresentaram maior perfil de inibição na triagem do ciclo de Clorinação. A – Isoniazida, utilizada como padrão; B- Composto LCSO02; C- Composto LCSO11; D- LCSO13; E- LCSO66, F-LCSO67. Cada ponto representa um experimento. Os parâmetros de  $Cl_{50}$  foram obtidos por regressão não linear usando o GraphPad Prism Versão 5.

**Tabela 2** – Comparação da potência obtida entre os compostos que apresentaram melhor perfil de inibição durante a triagem no ciclo de cloração. (Legenda: EPM – Erro padrão da média;  $Cl_{50}$  – Concentração inibitória média)

Compostos	$Cl_{50} \pm EPM$ ( $\mu M$ )
Isoniazida	$3,8 \pm 0,3$
LCSO02	$1,6 \pm 0,5$
LCSO11	$1,1 \pm 0,4$
LCSO13	$1,9 \pm 0,1$
LCSO66	$4,8 \pm 0,3$
LCSO67	$4,3 \pm 1,0$

(Legenda: EPM – Erro padrão da média;  $Cl_{50}$  – Concentração inibitória média)

**Figura 16** – Estrutura dos compostos que apresentaram melhor perfil de inibição durante a triagem no ciclo de cloração.



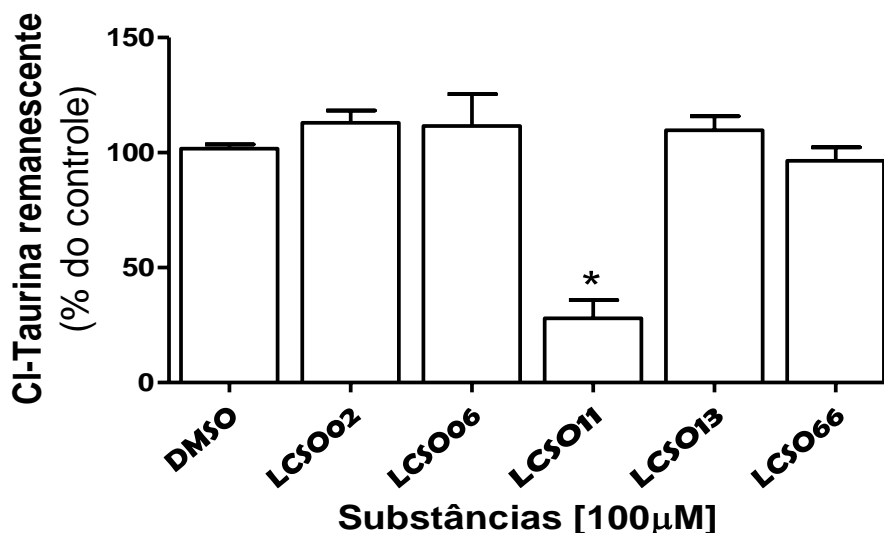
Avaliando os resultados os compostos que se mostram mais promissores foram os compostos LCSO02, LCSO13 e LCSO66, pois apresentaram uma  $CI_{50}$  melhor que a ISO, caracterizando assim uma otimização deste composto. O derivado LCSO02 foi inativo sobre o ciclo peroxidase, no entanto o derivado LCSO13 apresentou certa inibição também sobre o ciclo peroxidase. O composto LCSO02 já foi inclusive descrito como inibidor da MPO por Soubhye e colaboradores (2016), apresentando uma  $CI_{50}$  de 1,6  $\mu$ M e com mecanismo do tipo reversível.

Um mecanismo sugerido para esses derivados poderia ser a inibição do ciclo cloração através do acúmulo do composto II, o que não seria muito eficaz na presença do TMB que pode reduzir o composto II à forma nativa, reiniciando o ciclo catalítico da MPO. Outra explicação, poderia ser a competição com o sítio de ligação do  $Cl^-$  impedindo assim a formação do HOCl (ARNHOLD *et al.*, 2006).

Por outro lado, os derivados LCSO11 e LCSO67 foram capazes de inibir a MPO em seus dois ciclos, pois já haviam demonstrado atividade no ciclo peroxidase e agora se mostram também capazes de inibir o ciclo cloração.

#### **4.5 – AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE SEQUESTRAR Cl-Tau**

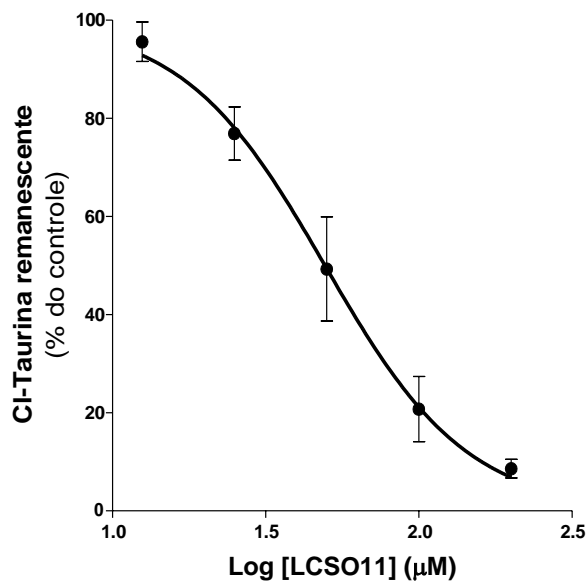
O ciclo de cloração da MPO foi avaliado através da produção de HOCl, que ao reagir com a taurina produz Cl-Tau, a qual possui maior estabilidade e pode se acumular no meio. Sendo assim, substâncias capazes de reagir com HOCl e com a Cl-Tau, podem gerar resultados falso positivos para inibição do ciclo clorinante da MPO. Assim foi delineado um experimento a fim de verificar o potencial dos compostos em se complexar com a Cl-Tau impedindo a mesma de oxidar o TMB e assim ser detectada. Considerou-se apenas a Cl-Tau inicialmente pelo fato de haver taurina em excesso (mM) no meio reacional, de modo que seria pouco provável que o HOCl reagisse preferencialmente com os derivados em detrimento a taurina.



**Figura 17-** Avaliação dos compostos com melhor potencial de inibição para verificar sua capacidade de sequestrar CI-Taurina. Avaliação dos derivados a 100μM. Dados foram apresentados por % do controle. As barras representam as médias e os traços os erros padrões da média de 3 experimentos em triplicata. \* $p < 0,001$  One-way ANOVA ("Teste de comparação múltipla de Dunnett"), quando comparado ao grupo DMSO (veículo).

Os resultados foram avaliados em função da CI-Tau remanescente, considerando o controle como 100%. Os derivados selecionados para esse teste foram aqueles que apresentaram maior atividade inibitória sobre o ciclo cloração, exceto LCSO67, visto que este reagiria com o TMB oxidado, que seria empregado aqui também. Ou seja, os derivados avaliados foram LCSO02, LCSO11, LCSO13 e LCSO66, como observado na figura 17 o único que apresentou perfil para consumo de taurina foi o composto LCSO11. Devido ao consumo da taurina fazendo com que a mesma não esteja disponível para oxidar o TMB. Ou seja, ao menos em parte, os resultados para LCSO11 como inibidor do ciclo de cloração da MPO também estão superestimados.

Para se ter uma ideia dessa interferência, foi determinado sua potência em reagir com a CI-Tau. O valor de  $CI_{50}$  para o derivado foi de 49,33 μM, ou seja, muito maior que aquela observada para a inibição do ciclo clorinante da MPO, que foi de 5,14 μM. Essa diferença sugere ainda que a capacidade sequestrante possa interferir no protocolo empregado, a inibição da MPO não pode ser descartada, de modo que LCSO11 apresenta assim um potencial considerável como candidato a protótipo de fármaco inibidor da MPO, já que inibe os dois ciclos da enzima.



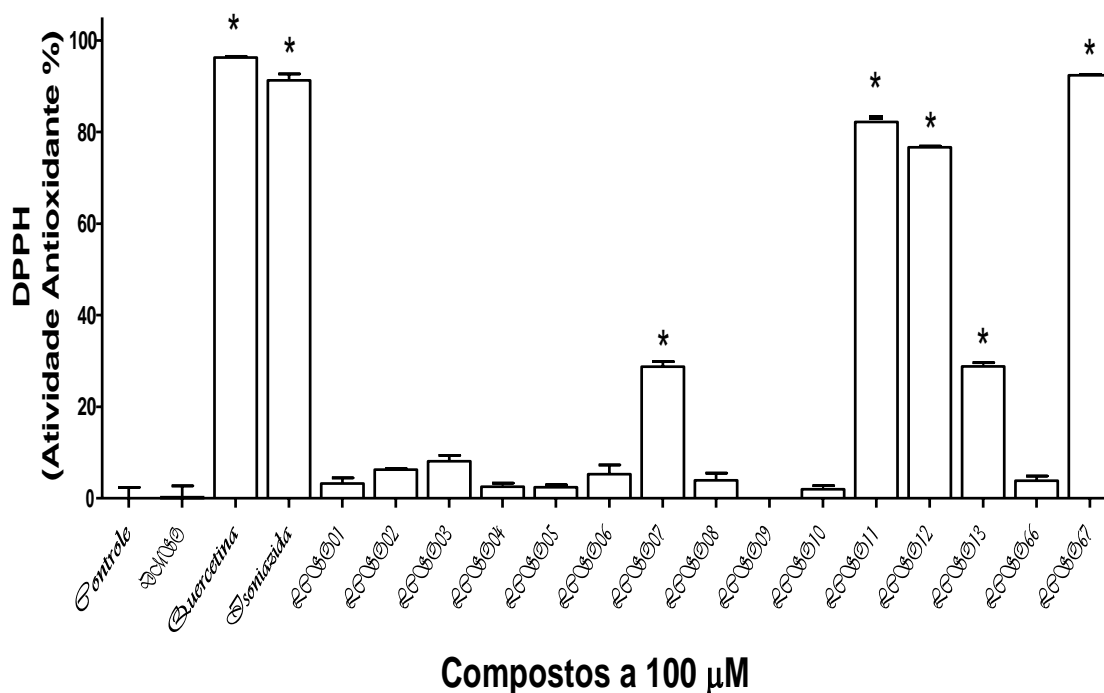
**Figura 18** – Avaliação da potência do composto LCSO11 em sequestrar Cl-Taurina a partir da determinação do  $Cl_{50}$ . Os parâmetros de  $Cl_{50}$  foram obtidos por regressão não linear usando o GraphPad Prism versão 5.

#### 4.3 – AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS COMPOSTOS ANÁLOGOS DE ISONIAZIDA

A avaliação da atividade antioxidante dos compostos é um fator crucial, visto que compostos que apresentam este caráter são importantes em processos patofisiológicos nos quais radicais de oxigênio são produzidos em excesso, sendo os principais causadores destas patologias, como é o caso de patologias com participação da MPO. Os antioxidantes são substâncias que diminuem a velocidade de oxidação através de diversos mecanismos, como inibição de radicais livres e complexação de metais (HUANG, 2005).

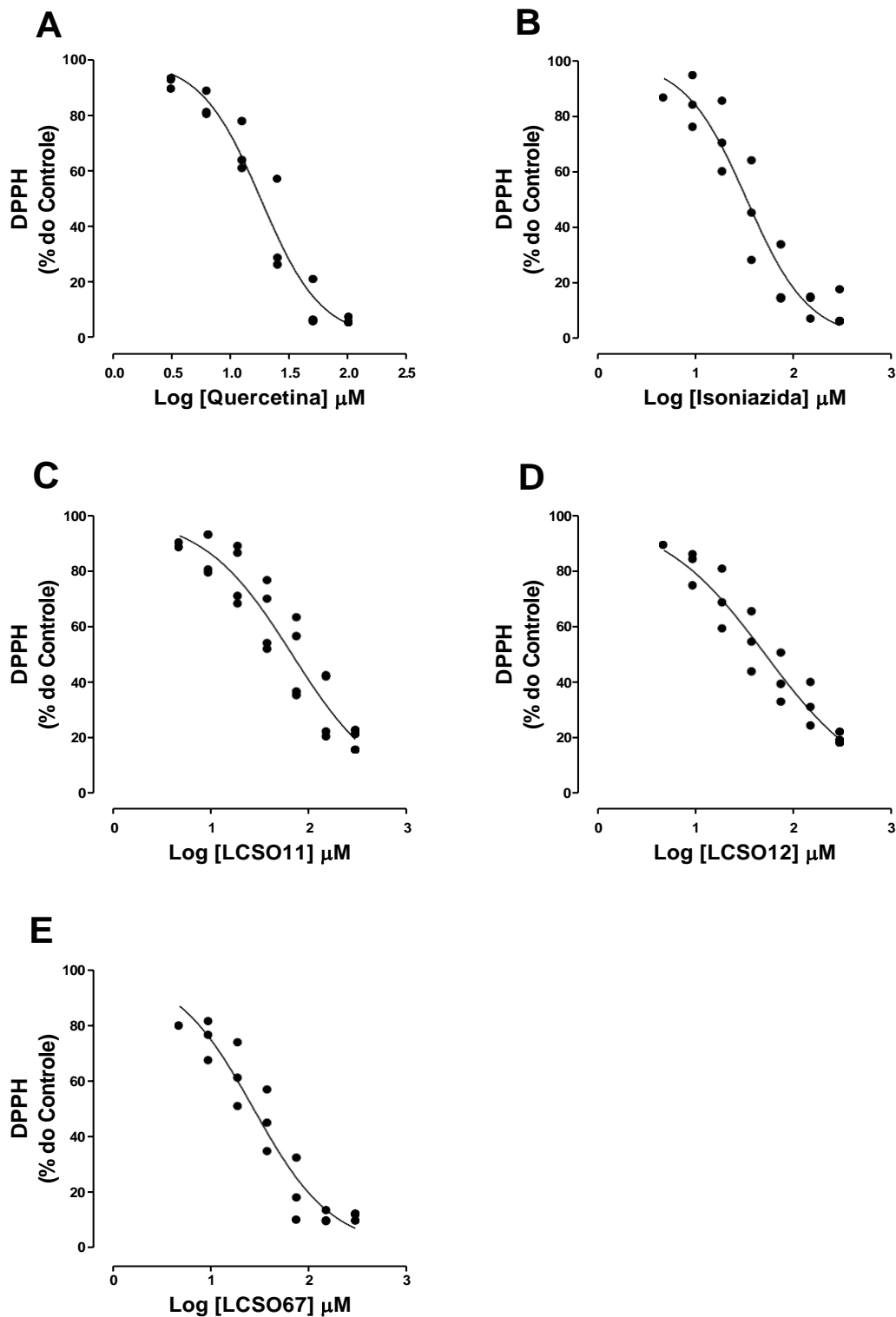
O método de avaliação da atividade antioxidante através do sequestro de radicais livres, como o DPPH, é baseado na transferência de elétrons do composto com atividade antioxidante para o DPPH, o qual é um radical livre que ao sofrer redução modifica sua coloração (BRAND-WILLIAM, CUVELIER e BERSET, 1995).

Desta forma o método foi utilizado para avaliar o poder redutor dos compostos, foi feita uma triagem dos 15 compostos a concentração de 100 $\mu$ M, da ISO e da quercetina (BEHLING, 2008), o qual é um composto já conhecido e utilizado na literatura como padrão para atividade antioxidante no método de DPPH.



**Figura 19-** Triagem farmacológica dos derivados da Isoniazida no teste de DPPH. Triagem dos derivados a 100 $\mu$ M. Os dados representados como % da atividade antioxidante usando branco (MeOH) como 100%, as barras representam a média e os traços o erro padrão da média de três experimentos em triplicata. \*  $p < 0,001$ , One-way ANOVA ("Teste de comparação múltipla de Dunnett"), quando comparado ao grupo DMSO (veículo).

Na figura 19 é possível observar o resultado da triagem dos compostos quanto ao seu perfil antioxidante no método de DPPH. Dos 15 compostos, apenas cinco apresentaram esse perfil, sendo os mais ativos os derivados LCSO11, LCSO12 e LCSO67, sendo esses três selecionados para determinação de suas potências.



**Figura 20** - Avaliação do percentual de atividade antioxidante dos compostos que apresentaram melhor perfil na triagem. Determinação da  $CE_{50}$  dos compostos. A – Quercetina, B- Isoniazida, C- LCSO11, D-LCSO12 e E- LCSO67. Cada ponto representa um experimento em triplicata. Os parâmetros de  $CE_{50}$  foram obtidos por regressão não linear utilizando GraphPad Prism Versão 5.



**Tabela 3** - Comparação dos valores de  $CE_{50}$ , entre os compostos que apresentaram melhor perfil antioxidante durante a triagem no teste de DPPH

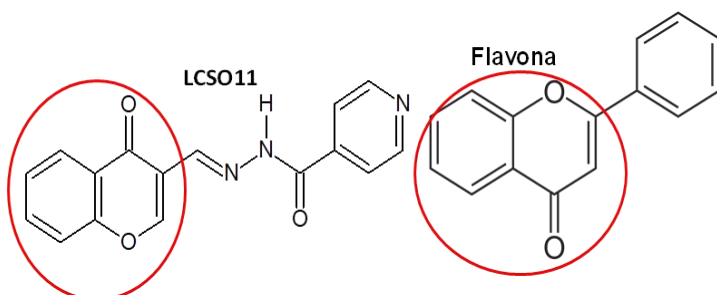
Compostos	$CE_{50} \pm EPM$ ( $\mu M$ )
Quercetina	$18,2 \pm 0,03$
Isoniazida	$33,6 \pm 0,04$
LCSO11	$67,4 \pm 0,04$
LCSO12	$51,7 \pm 0,04$
LCSO67	$27,3 \pm 0,04$

(Legenda: EPM – Erro padrão da média;  $CE_{50}$  – Concentração efetiva média)

Para tal foi então realizado um experimento variando a concentração dos derivados para verificação do  $CE_{50}$ , que consiste na concentração necessária para reduzir 50% do DPPH presente no meio (HILAL-DANDAN, e BRUNTON, 2015), os compostos foram então comparados com a quercetina e com a ISO, quanto a suas potências (Figura 20 e Tabela 3).

Os derivados LCSO11 e LCSO12 apresentaram valores de  $CE_{50}$  de 67,4 e 51,7  $\mu M$ , já o composto LCSO67 apresentou um  $CE_{50}$  de 27,3  $\mu M$ , o qual pode ser considerado melhor que o perfil da ISO, com  $CE_{50}$  de 33,6  $\mu M$ , sendo assim uma otimização desta. Esses resultados indicam que esses derivados apresentam efeito antioxidante direto e indireto, ou seja, são capazes de inibir a produção de espécies oxidantes pela MPO e também são capazes de sequestrar espécies reativas, tais como o DPPH.

Além disso o composto LCSO11 apresenta em sua estrutura uma cromona, a qual já é estudado e conhecido como um potencial antioxidante. Um exemplo similar é o que acontece com a flavona (Figura 21), que apresenta certa similaridade estrutural e efeito antioxidante conhecido (Proença, 2015).

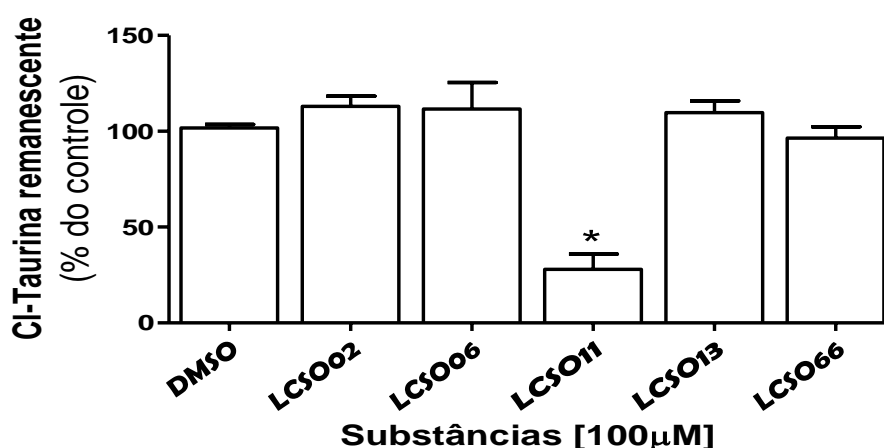


**Figura 21**– Comparação entre as estruturas do composto LCSO11 e a Flavona (Proença,2015), o que possibilita o compreender o perfil antioxidante das moléculas.

Outro fator que pode ser considerado é o tempo de incubação, o protocolo seguido neste trabalho é de 30 minutos de incubação, o que pode ter determinado o potencial baixo dos compostos, visto que estudos apontam que os resultados podem variar de 10 minutos a 6 horas. Assim como a pentoxifilina que não apresenta resultado favorável frente ao teste de sequestro de radicais, porém apresenta efeito antioxidante e apresenta-se favorável em testes *in vivo*, (MISHRA, OJHA e CHAUDHURY, 2012) fatores que poderiam ser considerados para os resultados aqui apresentados.

#### 4.5 – AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE SEQUESTRAR Cl-Tau

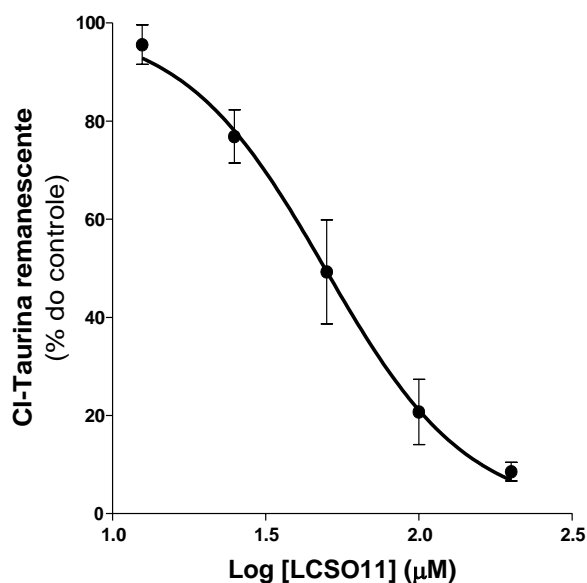
O ciclo de cloração da MPO foi avaliado através da produção de HOCl, que ao reagir com a taurina produz Cl-Tau, a qual possui maior estabilidade e pode se acumular no meio. Sendo assim, substâncias capazes de reagir com HOCl e com a Cl-Tau, podem gerar resultados falso positivos para inibição do ciclo clorinante da MPO. Assim foi delineado um experimento a fim de verificar o potencial dos compostos em se complexar com a Cl-Tau impedindo a mesma de oxidar o TMB e assim ser detectada. Considerou-se apenas a Cl-Tau inicialmente pelo fato de haver taurina em excesso (mM) no meio reacional, de modo que seria pouco provável que o HOCl reagisse preferencialmente com os derivados em detrimento a taurina.



**Figura 22-** Avaliação dos compostos com melhor potencial de inibição para verificar sua capacidade de sequestrar Cl-Taurina. Avaliação dos derivados a 100µM. Dados foram apresentados por % do controle. As barras representam as médias e os traços os erros padrões da média de 3 experimentos em triplicata. \*p<0,001 One-way ANOVA ("Teste de comparação múltipla de Dunnett"), quando comparado ao grupo DMSO (veículo).

Os resultados foram avaliados em função da CI-Tau remanescente, considerando o controle como 100%. Os derivados selecionados para esse teste foram aqueles que apresentaram maior atividade inibitória sobre o ciclo cloração, exceto LCSO67, visto que este reagiria com o TMB oxidado, que seria empregado aqui também. Ou seja, os derivados avaliados foram LCSO02, LCSO11, LCSO13 e LCSO66, como observado na figura 22 o único que apresentou perfil para consumo de taurina foi o composto LCSO11. Devido ao consumo da taurina fazendo com que a mesma não esteja disponível para oxidar o TMB, ou seja, ao menos em parte, os resultados para LCSO11 como inibidor do ciclo de cloração da MPO também estão superestimados.

Para se ter uma ideia dessa interferência, foi determinado sua potência em reagir com a CI-Tau. O valor de  $CI_{50}$  para o derivado foi de  $49,33 \mu\text{M}$ , ou seja, muito maior que aquela observada para a inibição do ciclo clorinante da MPO, que foi de  $5,14 \mu\text{M}$ . Essa diferença sugere ainda que a capacidade sequestrante possa interferir no protocolo empregado, a inibição da MPO não pode ser descartada, de modo que LCSO11 apresenta assim um potencial considerável como candidato a protótipo de fármaco inibidor da MPO, já que inibe os dois ciclos da enzima.



**Figura 23** – Avaliação da potência do composto LCSO11 em sequestrar CI-Taurina a partir da determinação do  $CI_{50}$ . Os parâmetros de  $CI_{50}$  foram obtidos por regressão não linear usando o GraphPad Prism versão 5.

#### 4.5 – AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES FARMACOCINÉTICAS *in silico*

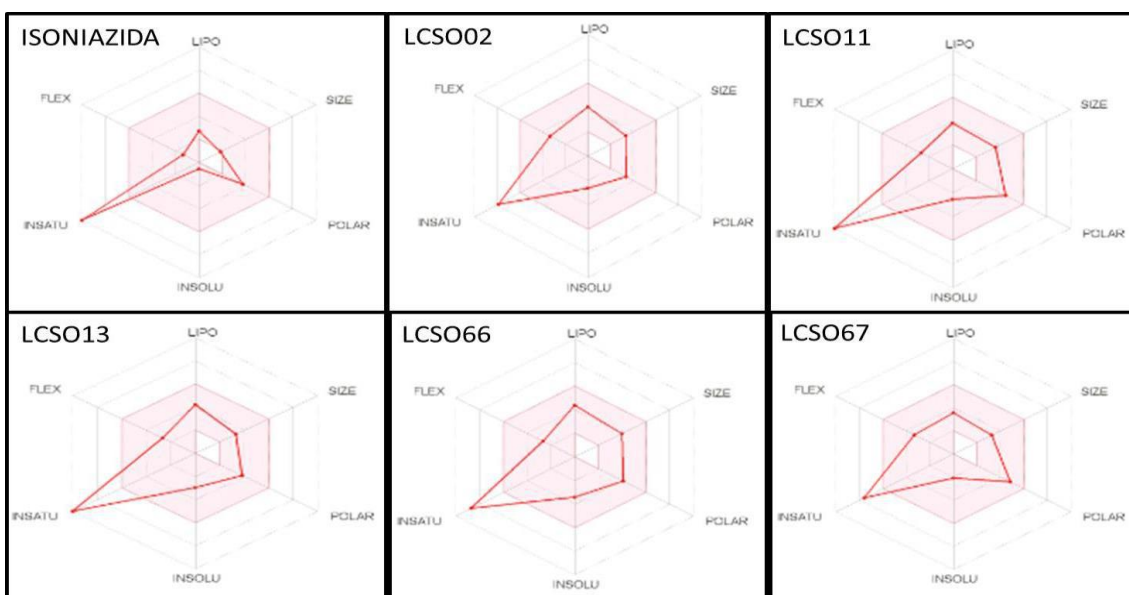
Além dos testes acima, foi avaliado pelo programa SwissADME o perfil farmacocinético dos compostos a protótipo, a fim de fazer uma avaliação *in silico* das propriedades farmacocinéticas para os compostos apresentados como potenciais inibidores dos ciclos de peroxidação e cloração. Os parâmetros avaliados estão apresentados na tabela abaixo.

**Tabela 5** - Comparação dos resultados teóricos obtidos para os compostos que melhor inibiram o ciclo de cloração da MPO, para a Regra dos 5 de Lipinski.

PARÂMETROS	COMPOSTOS					
	Isoniazida	LCSO02	LCSO11	LCSO13	LCSO66	LCSO67
Log P	0,74	1,82	1,30	2,72	2,23	1,96
Massa Molecular (g/mol)	123,11	268,31	293,28	263,29	320,14	256,26
Aceptores de Ligação de H	3	3	5	2	4	4
Doadores de ligação de H	1	1	1	2	2	3

Analisando os resultados obtidos pelos cálculos realizados por meio da ferramenta SWISSADME, pode-se observar que os compostos apresentaram um perfil teórico para boa absorção oral, visto que não apresentaram nenhuma violação de nenhuma das regras, podendo assim ser considerados como bons candidatos a potenciais protótipos para novos fármacos.

Além disso os derivados também foram analisados segundo o gráfico de radar de biodisponibilidade, do programa SWISSADME, correlacionando tamanho da molécula, flexibilidade, solubilidade, lipofilicidade, saturação e polaridade. A área demarcada em rosa delimita as condições ideais para biodisponibilidade oral dos fármacos (DAINA; MICHEILIN; ZOETE, 2017).



**Figura 24** – Radar de biodisponibilidade dos derivados que melhor inibiram o ciclo de cloração da MPO. Legenda: LIPO(Lipossolubilidade), SIZE (Tamanho da molécula), POLAR (Polaridade), INSOLU (Insolubilidade), INSATU (Saturação), FLEX (Flexibilidade).

Como pode ser visto na tabela 5 todos os compostos apresentam perfil semelhante a Isoniazida, não sendo ideal apenas para o perfil de saturação, podem considerando que a Isoniazida é um fármaco já utilizado como inibidor de MPO, os compostos não sofreriam problemas quando considerados esse perfil em um avaliação *in silico*, esse perfil pode estar relacionado a natureza aromática existente nos compostos que pode favorecer a diminuição destes em interagirem com elétrons de ligações duplas (SAKER; NAHAR, 2009). Desta forma podemos considerar o composto LCSO11 seria o melhor protótipo por atuar inibindo os dois ciclos da MPO, pois apesar de não ser o composto mais potente, apresentou resposta significativa em ambos os ciclos, além de capacidade sequestradora de espécies reativas radicalares (DPPH) e não radicalares (Cl-Tau). Por outro lado, os compostos LCSO02 e LCSO13 apresentaram resultados muito bons em inibir o ciclo de cloração, com destaque maior para o derivado LCSO13, já que o derivado LCSO02 foi recentemente descrito como inibidor da MPO.

## 5 – CONCLUSÃO

A avaliação farmacológica dos derivados NAH sintetizados a partir da hidrazida ISO permitiu identificar alguns derivados capazes de inibir a MPO e de sequestrar espécies reativas, se destacaram nesses estudos os compostos LCSO02, LCSO11, LCSO13, LCSO66 e LCSO67. Uma vez que diversos derivados não se mostraram ativos, podemos concluir que a presença de um núcleo proveniente de uma hidrazida ativa sobre a MPO em N-acilhidrazonas análogas não é suficiente para garantir sua interação com o sítio ativo da enzima.

Para a atividade inibitória dos dois ciclos da MPO, peroxidação e cloração, o derivado LCSO11 foi o de maior destaque, sendo o único com o perfil inibitório similar nos dois ciclos, além de ser capaz de sequestrar espécies reativas radicalares e não radicalares, de modo que pode ser caracterizado como um antioxidante direto e indireto.

Considerando apenas o ciclo de cloração os compostos LCSO02, LCSO13 e LCSO66 foram os mais ativos, com destaque para o composto LCSO13 que representou uma otimização do protótipo ISO para essa atividade, não tendo ainda sido descrito para essa atividade.

Além disso foram avaliados os parâmetros farmacocinéticos dos compostos a partir de sua estrutura no software swissADME, o critério avaliado foi a regra dos 5 de Lipinski, de modo que todos os derivados com potencial atividade inibitória sobre a MPO e com perfil sequestrante, também apresentaram promissor perfil para biodisponibilidade por via oral.

## 6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A., LICHTMAN K., ANDREW H., PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. Elsevier Brasil, 2008.

ABU-SOUD, H. M., & HAZEN, S. L. **Nitric oxide is a physiological substrate for mammalian peroxidases**. *Journal of Biological Chemistry*, v. 275, n.48, p. 37524-37532, 2000.

AL GHOULEH, I., KHOO, N.K.H., KNAUS, U.G., GRIENDLING, K.K., TOUYZ, R.M., THANNICKAL, V.J., BARCOWSKY, A., NAUSEEF, W.M., KELLEY, E.E., BAUER, P.M. **Oxidases and peroxidases in cardiovascular and lung disease: New concepts in reactive oxygen species signaling**. *Free Radic. Biol. Med.*v. 51, p. 1271–1288, 2011.

ALVES, C. Q., DAVID, J. M., DAVID, J. P., BAHIA, M. V., & AGUIAR, R. M. **Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos**. *Química Nova*, v. 33, n. 10, p. 2202-2210, 2010.

ALZHEIMER'S ASSOCIATION. **Alzheimer's disease facts and figures**. *Alzheimer's & Dementia*, v. 15, n. 3, p. 321-387, 2019.

ANDREWS, P. C., & KRINSKY, N. I. **Quantitative determination of myeloperoxidase using tetramethylbenzidine as substrate**. *Analytical biochemistry*, v. 127, n. 2, p. 346-350, 1982.

ANDREWS, P. C., PARNES, C., KRINSKY, N. I. **Comparison of myeloperoxidase and hemi-myeloperoxidase with respect to catalysis, regulation, and bactericidal activity**. *Archives of biochemistry and biophysics*, v. 228, n. 2, p. 439-442, 1984.

ARATANI, Y. **Myeloperoxidase: its role for host defense, inflammation, and neutrophil function**. *Archives of biochemistry and biophysics*, v. 640, p. 47-52, 2018.

ARMSTRONG, E. J., MORROW, D. A., SABATINE, M. S. **Inflammatory Biomarkers in Acute Coronary Syndromes: Part III: Biomarkers of Oxidative Stress and Angiogenic Growth Factors.** *Circulation*, v.113, n. 8, p. e289-e292, 2006.

ARNHOLD, J. **Properties, functions, and secretion of human myeloperoxidase.** *Biochemistry (Moscow)*. v.69, n.1, p. 4-9, 2004.

ARNHOLD, J., MONZANI, E., FURTMÜLLER, P. G., ZEDERBAUER, M., CASELLA L., OBINGER, C. **Kinetics and thermodynamics of halide and nitrite oxidation by mammalian peroxidases.** *Eur J Inorg Chem* v.19, p. 3801–3811, 2006.

BARBOSA, K. B. F., COSTA, N. M. B., ALFENAS, R. D. C. G., DE PAULA, S. O., MINIM, V. P. R., & BRESSAN, J. **Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios.** *Revista de nutrição*, v.23, n.4, p.629-643, 2010.

BEHLING, E. V., SENDÃO, M. C., FRANCESCATO, H. D. C., ANTUNES, L. M. G., & BIANCHI, M. D. L. P. **Flavonóide quercetina: aspectos gerais e ações biológicas.** *Alimentos e Nutrição Araraquara*, v.15, n. 3, p. 285-292, 2008.

BENSALEM, S., SOUBHYE, J., ALDIB, I., BOURNINE, L., NGUYEN, A. T., VANHAEVERBEEK, M., & NÈVE, J. **Inhibition of myeloperoxidase activity by the alkaloids of *Peganum harmala* L.(Zygophyllaceae).** *Journal of ethnopharmacology*, v. 154, n. 2, p. 361-369, 2014.

BIRD, Thomas D. **Alzheimer disease overview.** In: GeneReviews. University of Washington, Seattle, 2018.

BOSSHARD, H. R., ANNI, H., YONETANI, T., EVERSE, J., EVERSE, K. E., & GRISHAM, M. B. **Peroxidases in Chemistry and Biology.** CRC Press, Boca Raton, FL, v. 2, p. 51-83, 1991.

BRAND-WILLIAMS, W., CUVELIER, M.E., BERSET, C. **Use of free radical method to evaluate antioxidant activity.** *Lebensm. Wiss. Technol.*, v. 28, p. 25-30, 1995.

BRENNAN, M. L., HAZEN, S. L. **Emerging role of myeloperoxidase and oxidant stress markers in cardiovascular risk assessment.** *Curr. Opin. Lipidol.*, v.14, n.4, p. 353-359, 2003.

BUFFON, A., BIASUCCI, L. M., LIUZZO, G., D'ONOFRIO, G., CREA, F., MASERI, A. **Widespread coronary inflammation in unstable angina.** *N. Engl. J. Med.*, v. 347, n.1, p. 5-12, 2002.

BURNER, U., OBINGER C., PAUMANN M., FURTMÜLLER P. G., KETTLE A. J. **Transient and steady-state kinetics of the oxidation of substituted benzoic acid hydrazides by myeloperoxidase.** *J Biol Chem* v. 274, p. 9494–9502, 1999.

CABUSOGLU, E., RUWENDE, C., ENG, C., CHOPRA, V., YANAMADALA, S., CLARK, L. T., PINSKY, D. J., MARMUR, J. D. **Usefulness of Baseline Plasma**



**Myeloperoxidase Levels as an Independent Predictor of Myocardial Infarction at Two Years in Patients Presenting With Acute Coronary Syndrome.** *Am. J. Cardiol.*, v. 99, n.10, p. 1364-1368, 2007.

CADENAS E., DAVIES K.J. **Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging.** *Free Rad Biol Med*, v.29, p.222-230, 2000.

CHISOLM, G. M. III., HAZEN, S. L., FOX, P. L., CATHCART, M. K. **The oxidation of lipoproteins by monocytes-macrophages.** Biochemical and biological mechanisms. *J. Biol. Chem.* v. 274, p. 25959–25962; 1999.

COUSSENS, L. M. & WERB, Z. **Inflammation and cancer.** *Nature*, v. 420, p. 860-867, 2002.

DAINA, A., MICHIELIN, O., & ZOETE, V. **SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules.** *Scientific reports*, v. 7, p. 42717, 2017.

DAVIES, B., EDWARDS, S. W. **Inhibition of myeloperoxidase by salicylhydroxamic acid.** *Biochem J* v. 258, p. 801–806, 1989.

DE FALCO, A., CUKIERMAN, D. S., HAUSER-DAVIS, R. A., & REY, N. A. **Doença de Alzheimer: hipóteses etiológicas e perspectivas de tratamento.** *Quim. Nova*, v.39, n. 1, p. 63-80, 2016.

DYPBUKT, J.M., BISHOP, C., BROOKS, W.M., THONG, B., ERIKSSON, H., KETTLE, A. J. **A sensitive and selective assay for chloramines production by myeloperoxidase.** *Free Radical Biology & Medicine*, v.39, p. 1468 – 1477, 2005.

EDWARDS, S. W. **The generation and recognition of neutrophil-activating factors: structure and function of neutrophil receptors.** *Biochemistry and Physiology of the Neutrophil*, edited by Edwards SW. New York: Cambridge University Press, 1994.

EISERICH, J. P., BALDUS, S., BRENNAN, M.-L., MA, W., ZHANG, C., TOUSSON, A., CASTRO, L., LUSIS, A. J., NAUSEEF, W. M., WHITE, C. R., FREEMAN, B. A. **Myeloperoxidase, a Leukocyte-Derived Vascular NO Oxidase.** *Science*, v.296, n. 5577, p. 2391-2394, 2002.

FORGHANI, R., WOJTKIEWICZ, G. R., ZHANG, Y., SEEBURG, D., BAUTZ, B. R., PULLI, B., MILEWSKI, A. R., ATKINSON, W. L., IWAMOTO, Y., ZHANG, E. R., ETZRODT, M., RODRIGUEZ, E., ROBBINS, C. S., SWIRSKI, F. K., WEISSLEDER, R., CHEN, J. W. **Demyelinating diseases: myeloperoxidase as an imaging biomarker and therapeutic target.** *Radiology*, v. 263, n. 2, p. 451-460, 2012.

FRATIGLIONI, L., AMADUCI, L. - **An epidemiological survey of Alzheimer disease.** *In: Battistin, L.; Gesterbrand, F. (Eds.). Aging brain and dementia.* New York: Wiley-Liss, p.16-29, 1990.

FURTMÜLLER, P. G., BURNER, U., OBINGER, C. **Reaction of myeloperoxidase compound I with chloride, bromide, iodide, and thiocyanate.** *Biochemistry*, v.37, p. 17923-17930, 1998.

FURTMÜLLER, P. G., ZEDERBAUER, M., JANTSCHKO, W., HELM, J., BOGNER, M., JAKOPITSCH, C., & OBINGER, C. **Active site structure and catalytic mechanisms of human peroxidases.** *Archives of biochemistry and biophysics*, v. 445, n. 2, p. 199-213, 2006.

GAINET, J., CHOLLET-MARTIN, S., BRION, M., HAKIM, J., GOUGEROT-POCIDALO, M. A., & ELBIM, C.. **Interleukin-8 production by polymorphonuclear neutrophils in patients with rapidly progressive periodontitis: an amplifying loop of polymorphonuclear neutrophil activation.** *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, v.78, n. 6, p. 755-762, 1998.

GAO, H., HONG, J. **Why neurodegenerative diseases are progressive: uncontrolled inflammation drives disease progression.** *Trends in immunology*, v. 29, n. 8, p. 357-365, 2008.

GUSTAPANE, M., CARDILLO, M. T., BIASILLO, G., BIASUCCI, L. M. **Myeloperoxidase as possible diagnostic and prognostic marker of acute coronary syndrome.** *Recenti Prog. Med.*, v. 102, n. 11, p. 447- 450, 2011.

HAMPTON, M. B. KETTLE, A. J., WINTERBOURN, C. C. **Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing.** *Blood*, v. 92, p. 3007-3017, 1998.

HANSSON, M., OLSSON, I., & NAUSEEF, W. M. **Biosynthesis, processing, and sorting of human myeloperoxidase.** *Archives of biochemistry and biophysics*, v. 445, n. 2, p. 214-224, 2006.

HAZEN, S. L.; HEINECKE, J. W. **3-chlorotyrosine, a specific marker of myeloperoxidase-catalyzed oxidation, is markedly elevated in low-density lipoprotein isolated from human atherosclerotic intima.** *J. Clin. Invest.* v. 99, p. 2075–2081; 1997.

HEIT, B., TAVENER, S., RAHARJO, E., & KUBES, P. **An intracellular signaling hierarchy determines direction of migration in opposing chemotactic gradients.** *The Journal of cell biology*, v. 159, n. 1, p. 91-102, 2002.

HERRERA, J. E., CARAMELLI, P., SILVEIRA, A. S. B., & NITRINI, R. **Epidemiologic survey of dementia in a community-dwelling Brazilian population.** *Alzheimer Disease & Associated Disorders*, v. 16, n. 2, p. 103-108, 2002.

HILAL-DANDAN, R., BRUNTON, L. **Manual de farmacologia e terapêutica de Goodman & Gilman.** AMGH Editora, 2015.

HOOGLAND, A., VAN KUILENBURG, C., VAN RIEL, A. O., MUIJISERS and . WEVER, R. "**Spectral properties of myeloperoxidase compounds II and III,**" *Biochim.Biophys.Acta.*, vol. 916, p.76-82., 1987.

HUANG, D., OU, B., PRIOR, R. **The chemistry behind antioxidant capacity assays.** *J. Agric. Food Chem.*, v. 53, n. 6, p. 1.841-1.856, 2005.

IKEDA-SAITO, M., SHELLEY, D. A., LU, L., BOOTH, K. S., CAUGHEY, W. S., & KIMURA, S. **Salicylhydroxamic acid inhibits myeloperoxidase activity.** *Journal of Biological Chemistry*, v. 266, n. 6, p. 3611-3616, 1991.

JANTSCHKO, W., FURTMÜLLER, P. G., ZEDERBAUER, M., NEUGSCHWANDTNER, K., LEHNER, I., JAKOPTISCH, C. **Exploitation of the unusual properties of human myeloperoxidase in inhibitor design.** *Biochem Pharmacol* v. 69, p. 1149–1157, 2005.

KARADAG, B., VATAN, B., HACIOGLU, Y., DUMAN, D., BASKURT, M., KELES, I., ONGEN, Z., VURAL, V. A. **Serum myeloperoxidase level predicts reperfusion in patients with myocardial infarction receiving thrombolytic therapy.** *Heart Vessels*, v. 24, n. 4, p. 247-253, 2009.

KETTLE, A. J., CANDAEIS, L. P. **Oxidation of tryptophan by redox intermediates of myeloperoxidase and inhibition of hypochlorous acid production.** *Redox Rep* v. 5, p. 179–184, 2000.

KETTLE, A. J., GEDYE, C. A., HAMPTON, M. B., & WINTERBOURN, C. C. **Inhibition of myeloperoxidase by benzoic acid hydrazides.** *Biochemical Journal*, v. 308, n.2, p. 559-563, 1995.

KETTLE, A. J., GEDYE, C. A., HAMPTON, M. B., WINTERBOURN, C. C. **Inhibition of myeloperoxidase by benzoic acid hydrazides.** *Biochem J* v. 308, p. 559–563, 1995.

KETTLE, A. J., GEDYE, C. A., WINTERBOURN, C. C. **Mechanism of inactivation of myeloperoxidase by 4-aminobenzoic acid hydrazide.** *Biochem J*, v. 321, p. 503–508, 1997.

KETTLE, A. J.; WINTERBOURN, C. C. **Assays for the chlorination activity of myeloperoxidase. In: Methods in enzymology.** Academic Press, p. 502-512, 1994.

KIRCHNER T., FLEMMIG J., FURTMÜLLER P. G., OBINGER C., ARNHOLD J. **Epicatechin enhances the chlorinating activity of human myeloperoxidase.** *Arch Biochem Biophys*. v. 495, n. 1, p. 21-27, 2010.

KLEBANOFF, S. J. **Myeloperoxidase: friend and foe.** *Journal of leukocyte biology*, v. 77, n. 5, p. 598-625, 2005.

LAZAREVIC-PASTI, T., LESKOVAC, A., VASIC, V. **Myeloperoxidase Inhibitors as Potential Drugs.** *Current drug metabolism*, v. 16, n.3, p. 168-190, 2015.

MAKI, R. A., TYURIN, V. A., LYON, R. C., HAMILTON, R. L., DEKOSKY, S. T., KAGAN, V. E., & REYNOLDS, W. F. **Aberrant expression of myeloperoxidase in astrocytes promotes phospholipid oxidation and memory deficits in a mouse model of Alzheimer disease.** *Journal of Biological Chemistry*, v. 284, n.5, p. 3158-3169, 2009.

MALLE, E., FURTMÜLLER, P. G., SATTTLER, W., & OBINGER, C. **Myeloperoxidase: a target for new drug development.** *British journal of pharmacology*, v.152, n. 6, p. 838-854, 2007.

MALLE, E., MARSCHE, G., ARNHOLD, J., DAVIES, M. J. **Modification of low-density lipoprotein by myeloperoxidase-derived oxidants and reagent hypochlorous acid.** *Biochim. Biophys. Acta*, v.1761, n. 4, p. 392-415, 2006.

MARINHO, V., LAKS, J., ENGELHARDT, E. - **Aspectos neuropsiquiátricos das demências degenerativas não-Alzheimer.** *Revista Brasileira de Neuropsicologia*; v. 33, n.1, p. 31-37, 1997.

MEOTTI, F. C. **A produção de oxidantes na inflamação.** LABPRI USP. Disponível em:<<http://www2.iq.usp.br/docente/flaviam/>>; Acesso em: 07 de outubro de 2019.

MISHRA, K., OJHA, H., CHAUDHURY, N. K. **Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results.** *Food chemistry*, v. 130, n. 4, p. 1036-1043, 2012.

NAGRA, R. M., BECHER, B., TOURTELLOTTE, W. W., ANTEL, J. P., GOLD, D., PALADINO, T., SMITH, R. A., NELSON, J. R., REYNOLDS, W. F. **Immunohistochemical and genetic evidence of myeloperoxidase involvement in multiple sclerosis.** *J Neuroimmunol.*, v. 78 n.1-2, p. 97-107, 1997.

NAUSEEF, W. M. **Microreview Myeloperoxidase in human neutrophil host defence.** *Cellular Microbiology*, v. 16, n. 6, p. 1146–1155, 2014.

NAUSEEF, W. M. **Myeloperoxidase deficiency.** *Hematology/oncology clinics of North America*, v. 2, n. 1, p. 135-158, 1988.

NAUSEEF, W. M., BORREGAARD, N. **Neutrophils at work.** *Nature immunology*, v. 15, n. 7, p. 602, 2014

NICHOLLS, S. J., & HAZEN, S. L. **Myeloperoxidase and cardiovascular disease. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 25, n. 6, p. 1102-1111, 2005.

NUSSHOLD, C., KOLLROSER, M., KOFELER, H., RECHBERGER, G., REICHER, H., ULLEN, A., BERNHART, E., WALTL, S., KRATZER I., HERMETTER, A., HACKL, H., TRAJANOSKI, Z., HRZENJAK, A., MALLE, E., SATTTLER, W. **Hypochlorite modification of sphingomyelin generates chlorinated lipid species that induce apoptosis and proteome alterations in dopaminergic PC12 neurons in vitro.** *Free Radic Biol Med.*, v. 48, n. 12, p. 1588-1600, 2010.

PATEL, M. **Targeting Oxidative Stress in Central Nervous System Disorders.** *Trends in Pharmacological Sciences.* v. 37, n.9, p. 768–778, 2016.

PODREZ, E. A., ABU-SOUD, H. M., & HAZEN, S. L. **Myeloperoxidase-generated oxidants and atherosclerosis.** *Free Radical Biology and Medicine,* v. 28, n. 12, p. 1717-1725, 2000.

PROENÇA, C. I. C. **Potencial Antioxidante de Novas Cromonas e Xantonas.** 2015.

ROMAN, R. M., WENDLAND, A. E., POLANCZYK, C. A. **Mieloperoxidase e doença arterial coronariana: da pesquisa à prática clínica.** *Arquivos Brasileiros de Cardiologia,* v. 91, n. 1, p. e12-e19, 2008.

RUTH, A. J., KITCHING, A. R., KWAN, R. Y., ODOBASIC, D., OOI, J. D., TIMOSHANKO, J. R., & HOLDSWORTH, S. R. **Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies and effector CD4+ cells play nonredundant roles in anti-myeloperoxidase crescentic glomerulonephritis.** *Journal of the American Society of Nephrology,* v. 17, n. 7, p. 1940-1949, 2006.

SAKER, S. D.; NAHAR, L. **Compostos heterocíclicos e seus derivados. Química para Estudantes de Farmácia: química geral, orgânica e de produtos naturais.** Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, p. 121-129, 2009.

SARKARATI, B.; AKYOL, T. K.; KILINÇ, K. **An easy two-step purification method for human leucocyte myeloperoxidase.** *Turkish Journal of Biochemistry,* v. 40, n. 5, p. 410-416, 2015.

SCHONBAUM, G. R. **New complexes of peroxidases with hydroxamic acids, hydrazides, and amides.** *J Biol Chem* v.248, p. 502–511, 1973.

SCHONBAUM, G. R., LO S. **Interaction of peroxidases with aromatic peracids and alkyl peroxides.** *J Biol Chem* v.247, p.3353–3360, 1972.

SEGAL, M. J., GRIMM, A.N., KHAN, W., HAN, T.S., BLACKWELL. **Free Radic. Biol phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing.** *Blood,* v. 92, p. 3007- 3017,1998.

SOUBHYE, J. **Design, synthesis and study of myeloperoxidase inhibitors in the series of 3-alkylindole.** 2013.

SOUBHYE, J. **From dynamic combinatorial chemistry to in vivo evaluation of reversible and irreversible myeloperoxidase inhibitors.** *ACS medicinal chemistry letters,* v. 8, n. 2, p. 206-210, 2016.

SOUBHYE, J., ALDIB, I., ELFVING, B., GELBCKE, M., FURTMÜLLER, P. G., PODRECCA, M., & SARAKBI, A. **Design, synthesis, and structure–activity relationship studies of novel 3-alkylindole derivatives as selective and highly potent myeloperoxidase inhibitors.** *Journal of medicinal chemistry,* v. 56, n.10, p. 3943-3958, 2013.

TEIXEIRA, J. B., SOUZA, P. R. B. D., HIGA, J., FILHA, T., & MIRANDA, M. **Doença de Alzheimer: estudo da mortalidade no Brasil, 2000-2009.** *Cadernos de Saúde Pública*, v. 31, p. 850-860, 2015.

THUKKANI, A. K., MCHOWAT, J., HSU, F. F., BRENNAN, M. L., HAZEN, S. L., & FORD, D. A. **Identification of  $\alpha$ -chloro fatty aldehydes and unsaturated lysophosphatidylcholine molecular species in human atherosclerotic lesions.** *Circulation*, v. 108, n.25, p. 3128-3133, 2003.

VAN DALEN, C. J., & KETTLE, A. J. **Substrates and products of eosinophil peroxidase.** *The Biochemical journal*, v.358, p. 233–239, 2001.

VAN ZYL, J. M., BASSON, K., UEBEL R. A., VAN DER WALT, B. J. **Isoniazid mediated irreversible inhibition of the myeloperoxidase antimicrobial system of the human neutrophil and the effect of thyronines.** *Biochem Pharmacol* v.38, p. 2363–2373, 1989.

VIVOT, E., DE DIOS MUÑOZ, J., DEL CARMEN CRUAÑES, M., CRUAÑES, M. J., TAPIA, A., HIRSCHMANN, G. S., & ZACCHINO, S. **Inhibitory activity of xanthine-oxidase and superoxide scavenger properties of *Inga verna* subsp. *affinis*.** Its morphological and micrographic characteristics. *Journal of ethnopharmacology*, v, 76 n.1, p. 65-71, 2001.

VORCHHEIMER, D. A.; FUSTER, V. **Inflammatory markers in coronary artery disease: let prevention douse the flames.** *Jama*, v. 286, n. 17, p. 2154-2156, 2001.

WAHL, L. M.; KLEINMAN, H.K. **Tumor-associated macrophages as targets for cancer therapy.** *Journal of the National Cancer Institute*, v.90, p.1583-1584, 1998.

XIMENES, V., PAINO, I., FARIA-OLIVEIRA O., FONSECA, L., and BRUNETTI I. **"Indole ring oxidation by activated leukocytes prevents the production of hypochlorous acid."** *Brazilian journal of medical and biological research.*, v. 38, n. 11, p. 1575-1583, 2005.

YANG, Y., SHI, R., CAO, Z., ZHANG, G., & CHENG, G., YANG, Y. **VPO1 mediates oxidation of LDL and formation of foam cells.** *Oncotarget*, v.7, n. 24, p. 35500, 2016.