



UFRJ
UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO DE JANEIRO



instituto de
ciências farmacêuticas
Universidade Federal do Rio de Janeiro - Macaé

BEATRIZ DE FRIAS LEITE

**N-Acilhidrazonas como Inibidoras das Enzimas Mieloperoxidase e
Acetilcolinesterase com Potencial para o Tratamento da Doença de
Alzheimer**

MACAÉ

2022

BEATRIZ DE FRIAS LEITE

N-Acilhidrazonas como Inibidoras das Enzimas Mieloperoxidase e Acetilcolinesterase com Potencial para o Tratamento da Doença de Alzheimer

Trabalho de conclusão de curso (TCC) apresentado ao Curso de Farmácia do Centro Multidisciplinar UFRJ-Macaé, como requisito para obtenção do título de farmacêutico.

Orientador: Prof. Dr. Leandro Louback da Silva

Coorientadora: Profa. Dra. Juliana Montani Raimundo

MACAÉ

2022

CIP - Catalogação na Publicação

L533

Leite, Beatriz de Frias

N-Acilhidrazonas como Inibidoras das Enzimas Mieloperoxidase e Acetilcolinesterase com Potencial para o Tratamento da Doença de Alzheimer / Beatriz de Frias Leite - Macaé, 2022.

51 f.

Orientador(a): Leandro Louback da Silva.

Coorientador(a): Juliana Montani Raimundo.

Trabalho de conclusão de curso (graduação) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Ciências Farmacêuticas, Bacharel em Farmácia, 2022.

1. Ciências farmacêuticas. 2. Farmacologia. 3. Química Medicinal.
4. Doença de Alzheimer. I. Silva, Leandro Louback da, orient.
II. Raimundo, Juliana Montani, coorient. III. Título.

CDD 615

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a)
Biblioteca Central do Centro Multidisciplinar UFRJ-Macaé
Bibliotecário: Anderson dos Santos Guarino CRB7 – 5280

Beatriz de Frias Leite

***N*-Acilhidrazonas como Inibidoras das Enzimas Mieloperoxidase e Acetilcolinesterase com Potencial para o Tratamento da Doença de Alzheimer**

Trabalho de conclusão de curso (TCC) defendido e aprovado como requisito para obtenção do título de farmacêutico.

Macaé, 13 de janeiro de 2023.

Comissão avaliadora:

Prof. Dr. Leandro Louback da Silva (Presidente da Banca)

CM UFRJ-Macaé

<http://lattes.cnpq.br/3640859565231717>

Prof. Dr. Arídio Mattos Junior

CM UFRJ-Macaé

<http://lattes.cnpq.br/8768895227036467>

Prof. Dr. Leonardo Araújo de Abreu

UFRJ/Instituto de Biodiversidade e Sustentabilidade – NUPEM

<http://lattes.cnpq.br/1182000138097293>

RESUMO

As doenças neurodegenerativas ganham relevância com o envelhecimento da população mundial. Acetilcolinesterase (AChE) atua na patogênese da DA, influenciando a resposta inflamatória, apoptose, estresse oxidativo e agregação de proteínas patológicas. Outra enzima com reconhecido papel na patogênese da DA é a mieloperoxidase (MPO). Seus produtos oxidativos reagem com lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, estando associados à neuroinflamação. O tratamento da DA carece de fármacos que possam efetivamente prevenir ou retardar seu curso. Neste contexto, os inibidores duplos de AChE/MPO podem representar um ponto de partida interessante para o desenvolvimento de novos fármacos. Há na literatura diversas atividades farmacológicas descritas para as acilhidrazonas, incluindo a inibição da AChE e da MPO. Sendo assim, este trabalho visa avaliar novos análogos de compostos acilhidrazônicos derivados da isoniazida na busca de inibidores multialvo candidatos a protótipos potencialmente úteis no tratamento da DA. A atividade da AChE foi avaliada pelo método de Ellman. Foram avaliados os derivados LCSO11 e seus análogos, LCSO142, LCSO148 e LCSO160, e o derivado LCSO13 e seu análogo hidrazídico LCSO13Red. Os derivados foram incubados em tampão fosfato com a AChE e o ácido 5,5-ditiobis-2-nitrobenzóico. Após 30 min a reação foi iniciada adicionando iodeto de acetiltiocolina (AChI). A absorbância foi medida a 412 nm. A atividade da MPO foi determinada pela produção de ácido hipocloroso pelo método do TNB. Os derivados foram incubados com a MPO e cloreto em tampão fosfato. Após 20 min sob agitação, a reação foi iniciada adicionando H₂O₂ e a absorbância foi medida em 412 nm. Estudos de cinética foram realizados variando a concentração de cloreto para determinar o tipo de inibição. A eliminação de radicais livres foi medida usando o método DPPH em solução metanólica. Após 30 min de incubação dos derivados com o DPPH, o remanescente foi medido em 517 nm. As CI₅₀ e a análise estatística foram realizadas no programa GraphPad Prism 5.0. Em trabalho anterior do grupo, LCSO11 se mostrou capaz de inibir as enzimas AChE e MPO, além de sequestrar DPPH. Por outro lado, LCSO13 foi o mais potente em inibir apenas a MPO. A avaliação da atividade da MPO empregava a tetrametilbenzidina em uma leitura após 15 minutos. Aqui, o novo método mediu a velocidade da enzima. LCSO11 e LCSO13 mantiveram suas atividades sobre a MPO, e o análogo LCSO13Red também foi ativo, mostrando que as hidrazidas podem também ser investigadas. Quanto ao mecanismo de inibição, LCSO11 parece interagir com um sítio alostérico, enquanto LCSO13 parece interagir com o complexo enzima/substrato. Por outro lado, LCSO13Red parece competir com o cloreto. LCSO13Red não sequestra DPPH e não inibe a AChE. Houve otimização da atividade antioxidante e inibidora da AChE em LCSO160 quando comparado ao protótipo LCSO11, enquanto manutenção e prejuízo dessas atividades em LCSO142 e LCSO148, respectivamente. Os derivados acilhidrazônicos estudados se mostraram capazes de atuar nos alvos pretendidos, podendo ter suas atividades otimizadas. Mostrando que as acilhidrazonas, e também hidrazidas, podem ser fontes de derivados com atividade multialvo inibidores de AChE e MPO, com potencial para o tratamento da DA.

Palavras-chave: Inflamação, Isoniazida, Acilhidrazonas, Mieloperoxidase, Acetilcolinesterase, Doença de Alzheimer.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Reação de Síntese e Hidrólise da ACh	13
Figura 2. Fórmula estrutural dos inibidores de AChE empregados na DA	14
Figura 3. Ciclos Catalíticos da MPO	16
Figura 4. Reação geral de formação de Hidrazona ou Acilhidrazona	20
Figura 5. Estrutura química dos derivados <i>N</i> -acilhidrazônicos	22
Figura 6. Reação de oxidação do TNB a DTNB	26
Figura 7. Reação de redução do radical DPPH• a DPPH-H	27
Figura 8. Formação do ânion 5-tio-2-nitrobenzoato (TNB)	29
Figura 9. Reação geral do mecanismo de ação multi substrato do tipo Ping-pong..	32
Figura 10. Representação do duplo-recíproco de Lineweaver-Burk	32
Figura 11. Representação do duplo-recíproco para diferentes perfis de inibição	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Cl_{50} dos derivados LCSO11, LCSO13 e LCSO13 Red. para MPO	31
Tabela 2. Cl_{50} dos derivados LCSO11, 142, 148 e 160 para DPPH	38
Tabela 3. Percentual de Inibição dos derivados <i>N</i> -acilhidrazônicos sobre AChE	40

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Curvas concentração-resposta dos derivados sobre a MPO	30
Gráfico 2. Diagrama de Lineweaver-Burk: duplo-recíproco – LCSO11	34
Gráfico 3. Diagrama de Lineweaver-Burk: duplo-recíproco – LCSO13	34
Gráfico 4. Diagrama de Lineweaver-Burk: duplo-recíproco – LCSO13 Red.	35
Gráfico 5. Triagem farmacológica dos derivados hidrazônicos sobre o sequestro de DPPH	36
Gráfico 6. Curvas concentração-resposta dos derivados LCSO11, 142, 148 e 160 sobre o sequestro de DPPH	37
Gráfico 7. Triagem farmacológica dos derivados hidrazônicos sobre a AChE	39

LISTA DE SIGLAS e ABREVIações

4-ABAH	Hidrazida do ácido 4-aminobenzóico
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
ACTI	Acetiltiocolina
A β	Beta-amilóide
BHE	Barreira Hematoencefálica
CI ₅₀	Concentração Inibitória Média
DA	Doença de Alzheimer
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
DTNB	Ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzóico)
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELA	Esclerose Lateral Amiotrófica
ERN's	Espécies Reativas de Nitrogênio
ERO's	Espécies Reativas de Oxigênio
ES	Enzima-substrato
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HTAB	Brometo de hexadeciltrimetilamonio
HX	Hexoquinase
IL-1	Interleucina-1
K _m	Constante de Michaelis-Menten
LDH	Lactato desidrogenase
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
MPO	Mieloperoxidase
NAH	Núcleo Acilhidrazônico

NMDA	N-metil D-Aspartato
pH	Potencial hidrogeniônico
PMN's	Polimorfonucleares
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Periférico
TMB	Tetrametilbenzidina
TNB	5-tio-2-nitrobenzoato
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
V _{max}	Velocidade Máxima

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
1.1. Doença de Alzheimer.....	11
1.2. AChE e doença de Alzheimer.....	12
1.2.1. Inibidores de AChE.....	14
1.3. Mieloperoxidase e a doença de Alzheimer.....	15
1.3.1. Inibidores de MPO.....	18
1.4. Hidrazonas e a Doença de Alzheimer.....	20
2. JUSTIFICATIVA.....	22
3. OBJETIVOS.....	24
4. METODOLOGIA.....	25
4.1. Obtenção das <i>N</i>-Acilhidrazonas.....	25
4.2. Obtenção da MPO.....	25
4.3. Avaliação farmacológica dos derivados sobre a MPO.....	26
4.4. Investigação do Mecanismo de Inibição dos derivados sobre a MPO	26
4.5. Avaliação da capacidade sequestrante de DPPH pelos derivados.....	27
4.6. Avaliação farmacológica dos derivados sobre a AChE.....	28
4.7. Análise Estatística.....	28
5. RESULTADOS e DISCUSSÃO.....	29
5.1. Avaliação farmacológica dos derivados sobre a MPO.....	30
5.2. Avaliação do Mecanismo de Inibição dos derivados sobre a MPO.....	31
5.3. Capacidade sequestrante de DPPH pelos derivados.....	35
5.4. Avaliação farmacológica dos derivados sobre a AChE.....	39
6. CONCLUSÃO.....	42
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	43
8. ANEXOS.....	50

1. INTRODUÇÃO

1.1. Doença de Alzheimer

O cérebro humano possui cerca de 100 bilhões de células nervosas, responsáveis pela condução dos impulsos nervosos através das sinapses. Os neurônios constituem a base celular do sistema nervoso, capazes de estabelecer conexões ao receber estímulos do ambiente exógeno ou endógeno. A depender da região cerebral, um conjunto dessas células nervosas pode exercer funções específicas, como desenvolver o pensamento, aprendizagem e memória (KNOPMAN et al., 2021).

A doença de Alzheimer (DA) é uma doença de caráter progressivo e degenerativo prevalente que afeta milhões de pessoas em todo o mundo e tem aumentado nos últimos anos. A prevalência da doença é mais expressiva em indivíduos com mais de 85 anos (40%) e 65 anos (cerca de 10%) (SERENIKI, 2008). O processo de degeneração cerebral com a morte neuronal e atrofia de diversas regiões cujo desenvolvimento leva à perda de memória, de julgamento e da capacidade de aprendizagem, é desencadeado por diversos fatores. A deposição de placas β -amiloides ($A\beta$) nas paredes dos vasos sanguíneos e o acúmulo de emaranhados neurofibrilares no cérebro constituem os principais achados histopatológicos, pois promovem a interrupção da sinalização sináptica, levando à morte celular neuronal. Além desses, a fisiopatologia do prejuízo cognitivo associado a DA tem sido atribuída à perda de neurônios colinérgicos, ativação glial e inflamação (KNOPMAN et al., 2021; ZIA et al., 2022; LAZAREVIC-PASTI et al., 2017; YVES et al., 2000).

Apesar das causas para a DA não serem totalmente descritas e os mecanismos elucidados, existem algumas teorias que fundamentam explicações para a origem e desenvolvimento da doença. A hipótese colinérgica é atualmente a base bioquímica mais aceita para os eventos de diminuição da função cognitiva e mental associada à perda da neurotransmissão na região cortical do cérebro. A acetilcolina (ACh) é um neurotransmissor essencial para o sistema nervoso, estando relacionado a processos normais de aprendizagem e memória. Após produzida, a ACh é armazenada no neurônio colinérgico e liberada mediante estímulo neural. Na DA, a perda de forma seletiva de neurônios colinérgicos decorre da baixa biodisponibilidade de ACh em

regiões do cérebro como hipocampo e córtex cerebral, responsáveis pelas funções de memória e aprendizagem, respectivamente (KNOPMAN et al., 2021; YVES et al., 2000).

Outros processos importantes, como o estresse oxidativo e a produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO's) estão fortemente associados ao estado neuroinflamatório mediante presença de Mieloperoxidase (MPO) e ácido hipocloroso (HOCl), sendo este o principal evento responsável por provocar danos celulares e morte neuronal. De um modo geral, as doenças neurodegenerativas (DND) estão relacionadas a um desequilíbrio da resposta inflamatória, caracterizando um cenário com elevadas concentrações de macrófagos e células da glia ativadas, bem como altos níveis de citocinas pró-inflamatórias como interleucina-1 (IL-1) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) em tecidos cerebrais de pacientes acometidos por essas enfermidades (PERRY, 2004; NAGATSU & SAWADA, 2005).

O papel da MPO em modular DND como Alzheimer, esclerose lateral amiotrófica (ELA), Parkinson e epilepsia, por exemplo, tem sido demonstrado a partir de lesões teciduais provocadas pela ação das espécies radicalares produzidas. O ácido hipocloroso está relacionado com o processo de oxidação de tecidos cerebrais mediante formação de espécies reativas como radicais hidroxila e cloreto de nitrila, capazes de atravessar a membrana plasmática celular e inativar enzimas intracelulares essenciais à manutenção da homeostase, como hexoquinase (HX) e lactato desidrogenase (LDH) (RAY & KATYAL, 2016).

1.2. AChE e doença de Alzheimer

Presente nos sistemas nervoso central (SNC) e periférico (SNP), mas principalmente nas regiões pós-sinápticas das junções neuromusculares (nervos e músculos), a acetilcolinesterase (AChE) é uma enzima responsável por catalisar a hidrólise do neurotransmissor ACh em ácido acético e colina nas sinapses colinérgicas (McHARDY et al., 2017). No SNP, a enzima atua no controle dos batimentos cardíacos, contração da musculatura lisa e condução de impulsos nervosos. Já no SNC, modula a função motora, cognição e memória do indivíduo (PETRONILHO et al., 2011).

A AChE apresenta um sistema catalítico altamente eficiente, capaz de hidrolisar até 6×10^5 moléculas de ACh a partir de uma única molécula da enzima, por minuto (PETRONILHO, 2011). Tal eficiência decorre da composição estrutural específica do seu sítio catalítico, formado por um sítio ativo e dois subsítios, um esterásico e um aniônico (Figura 1). Essas subunidades catalíticas possuem aminoácidos (serina, aspartato, histidina e tirosina, por exemplo) que além de garantir a atividade hidrolítica, promovem a interação do neurotransmissor com a enzima (SHAFFERMAN et al., 2005).

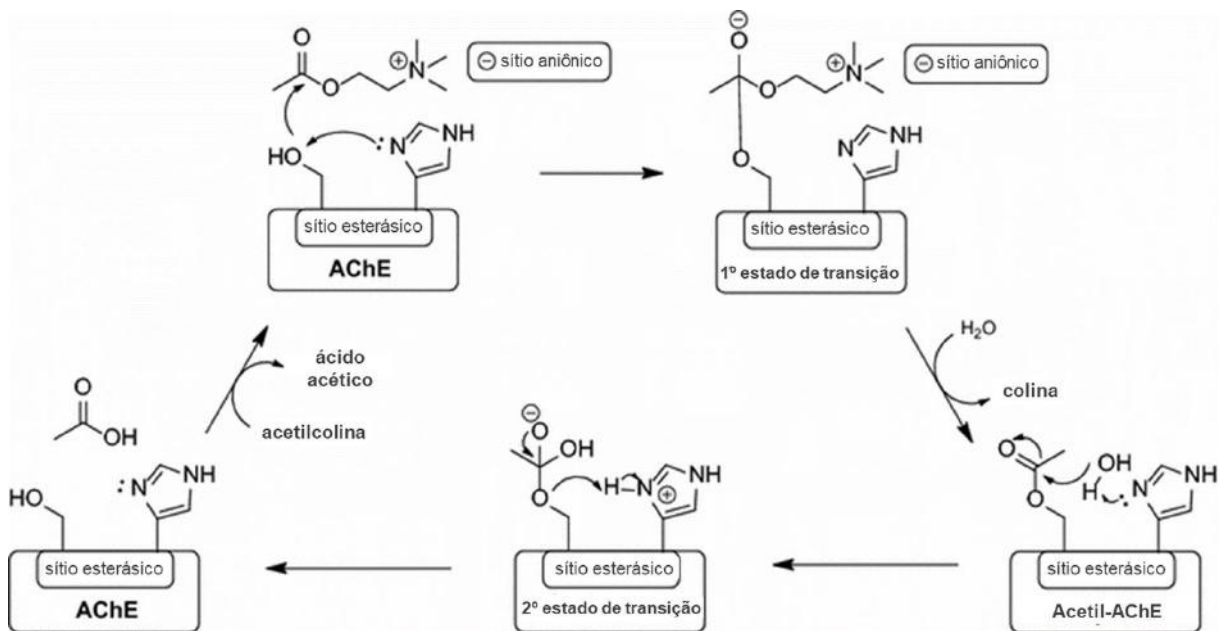


Figura 1: Reação de Síntese e Hidrólise da ACh. Adaptado de GORECKI et al., 2016.

Além dessa sua principal função no encerramento da transmissão neuronal, com a sinalização entre as sinapses, evitando a dispersão da ACh e a ativação de receptores próximos (SHAH et al., 2017), a AChE também desempenha um papel no desenvolvimento neural. De forma intrínseca, a AChE está envolvida na embriologia do sistema nervoso, sendo expressa durante o desenvolvimento de células nervosas (neurônios) e crescimento de axônios. Outros achados acerca da presença de atividade enzimática no sistema nervoso periférico (gânglios da raiz dorsal) de pintos sugerem que a AChE contribui para a morfogênese do desenvolvimento fetal (BIGBEE et al., 1999).

1.2.1. Inibidores de AChE

O sistema de sinapses colinérgicas é amplamente distribuído no SNC e SNP, sendo essencial à manutenção e regulação das funções cognitivas. A fim de compensar a perda de atividade colinérgica na área do hipocampo, inibir a AChE de forma a melhorar a neurotransmissão colinérgica constitui uma abordagem promissora para o tratamento da DA. Alguns fármacos atuam diretamente nas sinapses colinérgicas, de forma a inibir ou reativar a AChE (DI GIOVANNI et al., 2008).

A inibição da AChE promove um acúmulo de acetilcolina que estimula o aumento de receptores muscarínicos e nicotínicos na fenda sináptica, tornando a transmissão colinérgica mais robusta. Isso impacta de forma positiva na terapêutica de minimização dos efeitos de déficits de memória na DA. Apesar de não haver tratamento efetivo, alguns inibidores da AChE são disponibilizados como medicamentos para reduzir os sintomas da DA, capazes de atravessar a barreira hematoencefálica (BHE). São eles: tacrina, donepezila, rivastigmina e galantamina (Figura 2) (LAZAREVIC-PASTI et al., 2017; INOUE, 2004).

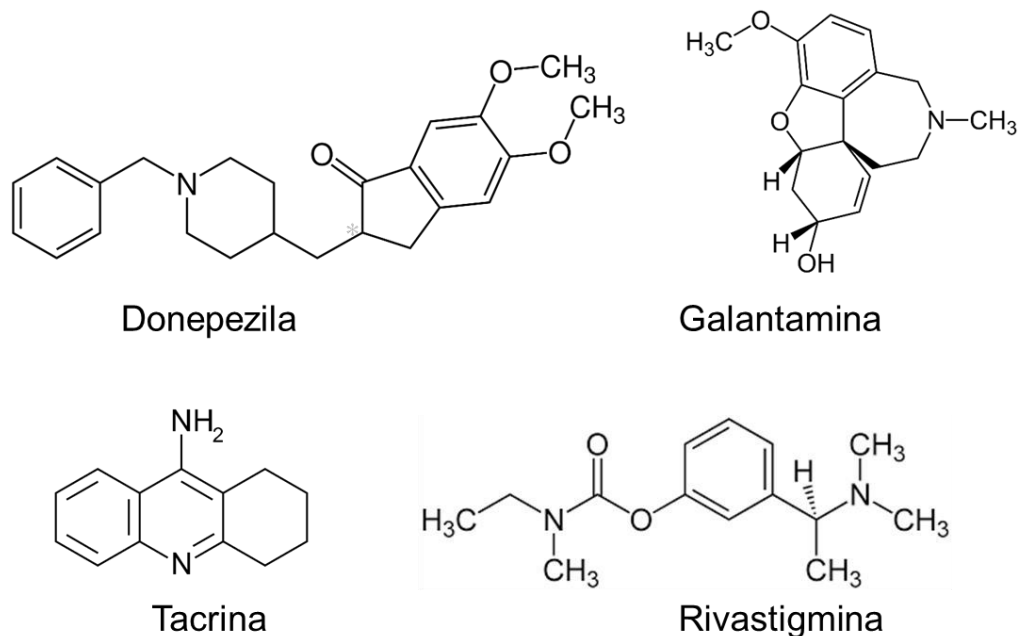


Figura 2: Fórmula estrutural dos inibidores de AChE empregados na DA. Fonte: Wikipedia, 2017.

Apesar dos resultados da modulação da atividade sobre a acetilcolina serem promissores, tais moléculas apresentam potencial efeito de bioacumulação no organismo, o que pode provocar uma interação com placas de β -amiloide, representando perfis mais neurotóxicos quando comparados à β -amiloide sozinha (LAZAREVIC-PASTI et al., 2017; SOREK, 2001; MEHWASH, 2022).

1.3. Mieloperoxidase e a doença de Alzheimer

Uma outra enzima envolvida na fisiopatologia da doença de Alzheimer via estresse oxidativo e recrutamento de células periféricas é a MPO. Classificada como uma hemeperoxidase, a MPO é armazenada no interior de leucócitos como monócitos e neutrófilos sob sua forma nativa. Nos neutrófilos, chega a representar 25% do conteúdo proteico de seus grânulos azurófilos. Mediante presença de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e íons halogênios como cloreto (Cl^-), brometo (Br^-), iodeto (I^-), além do pseudo-halogênio tiocianato (SCN^-), a MPO catalisa a produção de espécies altamente oxidantes como o HOCl, ácido hipobromoso (HOBr) e ácido hipoiódoso (HOI), além do ácido hipotiocianoso (HOSCN). Tais espécies possuem efeito citotóxico, pois são capazes de reagir com moléculas próprias do organismo, provocando danos e contribuindo para o desenvolvimento de algumas doenças. Identificada pela primeira vez em linhagem de células mielóides, a MPO se destaca das demais hemeperoxidases por ser capaz de produzir ácido hipocloroso (HOCl) sob condições fisiológicas (NAUSEEF, 2014; SEGAL, 2005; OKADA et al., 2016; FURTMULLER et al., 2006).

A MPO apresenta atividade catalítica descrita em duas vias, o ciclo halogenação e o ciclo peroxidase (Figura 2). Nas duas vias, a forma nativa da enzima [MPO-Fe(III)] sofre reação de oxidação pelo H_2O_2 para formar o intermediário conhecido como Composto I [MPO-Fe(IV)=O]. Este possui dois elétrons a menos que a MPO na sua forma nativa, havendo duas possibilidades para que a enzima seja convertida de novo em seu estado reduzido. A primeira se dá em uma única etapa, através de uma reação redox com íons halogênios ou pseudohalogênios (ciclo halogenação), e a segunda ocorre através de duas reações consecutivas de um elétron (ciclo peroxidase), oxidando diferentes substratos orgânicos como

aminoácidos (tirosina e triptofano), hormônios esteroidais e derivados fenólicos (Figura 3) (SOUBHYE et al., 2017).

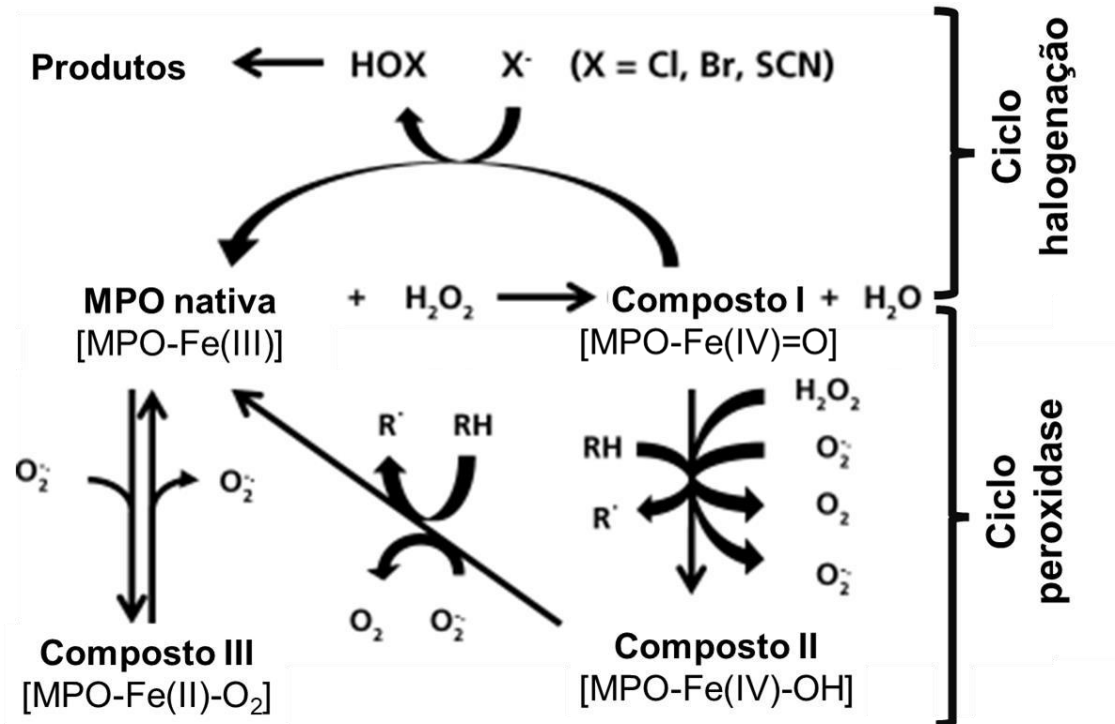


Figura 3: Ciclos catalíticos da MPO. A oxidação inicial da forma restante de ferro (III) da enzima por peróxido de hidrogênio dá origem ao Composto I, que é formalmente uma espécie de ferro (V). Este intermediário pode então sofrer redução de dois elétrons com íons haleto ou pseudohaleto para formar ácidos hipohalosos (o ciclo de halogenação) ou sofrer duas reduções sucessivas de um elétron, via Composto II, com a consequente formação de radicais (o ciclo da peroxidase). A forma de ferro (III) da enzima também pode sofrer redução de um elétron com radicais superóxido para dar o Composto III. Adaptado de DAVIES, 2011.

No ciclo halogenação, após a reação da MPO nativa com o H₂O₂, assumindo a forma de Composto I, este reage com íons halogênicos (X⁻) presentes no meio, como por exemplo o Cl⁻, para formar o respectivo ácido, por exemplo HOCl. Além dele, outros íons como e Br⁻ ou pseudohalogênicos (SCN⁻) podem interagir com o composto I e produzir seus correspondentes ácidos HOX, reduzindo a enzima novamente ao estado nativo (FURTMULLER et al., 2007; GALIJASEVIC et al., 2019; PODREZ et al., 2000).

Em função das suas elevadas concentrações, o íon cloreto é tido como o substrato fisiológico da MPO. Sua concentração citoplasmática varia entre 100 e 140 mM, bem acima dos demais íons: brometo (20-100 μM), iodeto (0,1-0,6 μM) e tiocianato (20-120 μM) (FURTMÜLLER; BURNER e OBINGER, 1998). Dalen e colaboradores (1997) demonstraram que o tiocianato supera em muito o cloreto no

que se refere afinidade pela MPO. Isso fica evidente quando se observa que nas concentrações plasmáticas de cloreto e tiocianato, cerca de metade do H_2O_2 consumido pela MPO é convertido em HOSCN.

No ciclo peroxidase, que acontece em duas etapas, o Composto I é reduzido em Composto II [MPO-Fe(IV)-OH] a partir do ganho de um elétron, seguida de uma nova reação de redução por um elétron, retornando ao estado nativo da enzima. Essa etapa de conversão do Composto II em MPO nativa é uma etapa limitante do ciclo. Enquanto o grupo heme da enzima é reduzido em duas etapas consecutivas de redução de um elétron ao estado nativo, a MPO catalisa reações de oxidação de diferentes substratos orgânicos (UNDURTI et al., 2009). Diversos compostos podem atuar como doadores de elétron para os Compostos I e II, incluindo radicais (óxido nítrico, NO ou NO_2), substâncias orgânicas (tirosina, triptofano, serotonina, triptamina, ascorbato, hormônios esteroides, compostos fenólicos e indólicos, sulfidrilas, urato, fármacos e xenobióticos) ou substâncias inorgânicas (nitrito ou H_2O_2) (ANATOLIOTAKIS, 2013).

Outra via catalítica, um pouco menos relevante para a atividade da enzima, compreende a formação do Composto III [MPO-Fe(II)- O_2], produzido a partir da reação com a MPO nativa e o ânion superóxido. Apesar de sua rápida formação, o Composto III é bastante instável, sendo facilmente convertido à forma nativa da enzima. Além disso, a presença de ânion superóxido nos compartimentos intracelulares dos neutrófilos afeta diretamente o ciclo catalítico, ao ser capaz de reagir com o Composto II, retornando a enzima a sua forma nativa, aumentando assim a atividade clorinante da MPO (FURTMULLER et al., 2007; GALIJASEVIC et al., 2019; PODREZ et al., 2000).

O sistema imunológico humano modula seus mecanismos de ação microbicida por meio de uma série de eventos protetivos os quais ocorrem em detrimento de danos teciduais. Essa resposta imune primária é mediada inicialmente por neutrófilos (MARTINS, 2010). O recrutamento desse tipo celular com o intuito de eliminar patógenos presentes no organismo possibilita que as condições ideais homeostáticas do indivíduo sejam garantidas, o que faz de tal defesa um sistema eficiente (COSTA, 2015). Entretanto, a eliminação desses agentes invasores durante a ativação dos neutrófilos implica diretamente na produção e liberação de espécies reativas de

oxigênio e nitrogênio (ERO's e ERN's), além de enzimas proteolíticas com caráter altamente oxidante e inflamatório ao tecido celular (ARATANY, 2018).

Apesar da elevada toxicidade associada, em condições ideais, o HOCl é produzido apenas mediante presença de microrganismos patogênicos e está contido no fagossoma, sendo direcionado apenas à eliminação de invasores celulares, preservando as demais células. A MPO possui natureza policatiónica, o que permite uma maior afinidade por superfícies negativamente carregadas de patógenos, promovendo assim a destruição das membranas celulares e consequente morte desses (COSTA, 2015; WINTERBOURN et al., 2016).

No entanto, situações como falha dos neutrófilos em fagocitar completamente um agente infeccioso, recrutamento excessivo de neutrófilos via citocinas inflamatórias ou ainda em função de morte celular necrótica, pode ocorrer o extravasamento da MPO para o meio extracelular. Uma vez fora do conteúdo dos grânulos, a MPO adere a moléculas carregadas negativamente presentes nas células endoteliais, por exemplo, e seus produtos reativos provocam danos oxidativos às proteínas nas células hospedeiras (WINTERBOURN et al., 2016).

Neste sentido, a catálise de diversas espécies altamente reativas pela MPO constitui uma barreira à resolução do processo inflamatório. A formação de tais intermediários reativos resulta em destruição tecidual nos locais de inflamação (crônicas ou não) do organismo. Essas substâncias estão vinculadas com reações de oxidação de biomoléculas como peroxidação lipídica, podendo gerar LDL oxidado e HDL disfuncional, uma vez que a enzima também é capaz de interagir com outros tipos celulares (WINTERBOURN et al., 2016; ROMAN, 2015; TENG et al., 2017).

1.3.1. Inibidores de MPO

A inibição da MPO é proposta a partir de dois mecanismos gerais. O primeiro deles envolve a participação do grupo heme da proteína, região responsável pela atividade peroxidase da enzima e formação do ácido hipocloroso. Alguns inibidores já descritos atuam de modo a estabelecer uma forte ligação covalente com o átomo de ferro do grupo heme, bloqueando eficientemente o acesso ao sítio ativo pelo H₂O₂, tornando-a inativa. O outro mecanismo é mediado pelo candidato inibidor e o substrato

ao competirem pelo sítio ativo da enzima. Nesse caso, inibidores reversíveis podem formar um complexo com a MPO, de modo a impedir a continuação do ciclo peroxidase, ou ainda atuar como um substrato da enzima e resultar na acumulação do composto II (SEMIRA, 2019).

Com base nos mecanismos de inibição via substrato ou ciclo catalítico da enzima, uma série de produtos naturais e compostos fisiológicos têm sido alvo de investigação para inibir a MPO, seja de forma reversível ou irreversível. Estudos avaliaram propriedades anti-inflamatórias da melatonina em função de sua capacidade em inibir a peroxidação lipídica e modificação de lipoproteínas induzida por H_2O_2 . De modo semelhante, alguns compostos indólicos relacionados atuaram na inibição da atividade da enzima (SEMIRA, 2008; SOUBHYE, 2013).

Os produtos naturais constituem uma classe de substâncias promissoras em função das mais variadas propriedades bioativas já descritas. Testes *in vivo* e *in vitro* com extratos ou substâncias isoladas avaliaram propriedades anti-inflamatórias de flavonoides como a quercetina, evidenciando forte inibição com valores de concentração inibitória média (CI_{50}) da ordem de $1,27 \mu M$ (LOKE et al., 2008; SHIBA et al., 2008). Além dos flavonoides, compostos como resveratrol, curcumina (-) epicatechin, ácidos cafeico e ferúlico demonstraram capacidade em inibir a formação de espécies radicalares pela MPO, responsáveis por provocar estresse oxidativo ao tecido. Apesar de promissores, alguns dos compostos bioativos apresentaram baixa potência, o que demonstra a necessidade de se realizar estudos mais aprofundados em relação ao mecanismo que desempenham (LAZAREVIC-PASTI, LESKOVAC & VASIC, 2015).

Com mecanismo de inibição sobre a MPO bem elucidado, as tioxantinas constituem uma classe de inibidores irreversíveis, atuando de forma promissora. A tioxantina é oxidada pelo Composto I, formando um radical livre altamente reativo, responsável por transferir um elétron para o grupo heme do Composto II, formando uma ligação covalente através do átomo de enxofre com um dos anéis pirrólicos do grupamento (WARD et al., 2013). Derivados com um grupo 2-tioxantina demonstraram alto potencial inibitório sobre a enzima, apresentando valores de CI_{50} abaixo de μM (440 nM) (HANSON, NODVALL & TIDEN, 2003).

A AstraZeneca vem desenvolvendo um inibidor seletivo e irreversível da MPO, uma tioxantina conhecida como AZD3241. Estudos em modelos animais da doença de Parkinson e atrofia multissistêmica realizados com esse derivado demonstraram supressão da atividade da micróglia e efeito neuroprotetor na sobrevivência das células dopaminérgicas. (AHMAD et al., 2020). O AZD3241 já passou também por estudos clínicos de fase II com pacientes com atrofia multissistêmica (NCT02388295) e doença de Parkinson (NCT01603069; NCT01527695) (*ClinicalTrials.gov*). Apesar do reconhecimento enquanto importante alvo terapêutico no tratamento de doenças inflamatórias, ainda não há disponível um inibidor de MPO aprovado para uso clínico.

1.4. Hidrazonas e a Doença de Alzheimer

As hidrazonas constituem uma classe de compostos químicos em geral sintetizados a partir da reação de condensação entre hidrazinas com substâncias carboniladas, especialmente aldeídos ou cetonas apropriados (substituição da ligação C=O por C=NNH₂). Caso seja empregado uma hidrazida, o composto resultante é chamado de acilhidrazona. O mecanismo reacional via catálise ácida é preferencialmente empregado na síntese desses compostos, o que de modo simples representa uma reação de adição seguida da transferência de prótons (Figura 5). Catalisadores básicos também são utilizados nesse processo, mas com menos frequência. Dessa forma, são estruturalmente caracterizadas pela presença do grupamento R–C=N–NH–R' (GUIMARÃES et al., 2017; IUPAC, 2014; CUNHA et al., 2016).

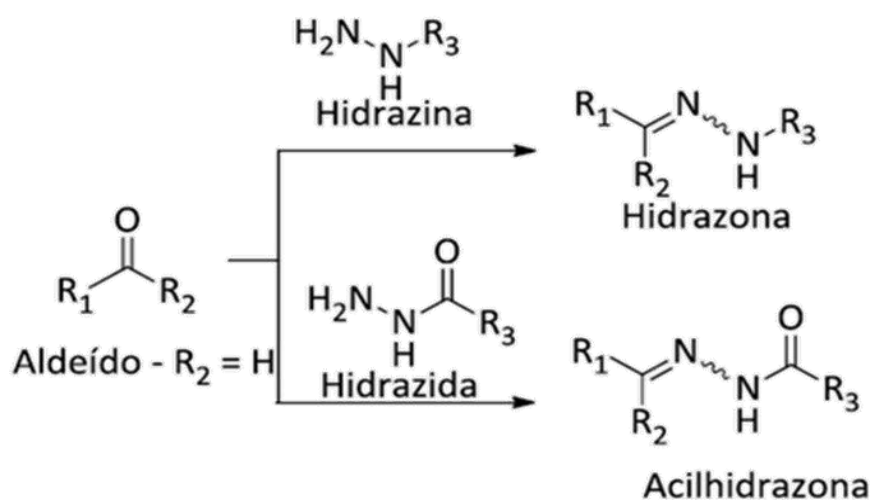


Figura 4. Reação geral de formação de hidrazona ou acilhidrazona, a partir de uma hidrazina ou hidrazida, respectivamente. Adaptado de GUIMARÃES et al., 2017.

O grande interesse em estudar essa classe de compostos deve-se ao amplo espectro de atividades bioativas que possuem. As acilhidrazonas e seus derivados apresentam perfil antioxidante (HADJIPAVLOU-LITINA, 2013), antituberculose (FERRARESI-CUROTTO, 2017), antibacteriano (KHANMOHAMMADI, 2008), anticâncer (CONGIU, 2013; DENG, 2016) e antidepressivo (OLIVEIRA, 2011), por exemplo, muito em função de estarem envolvidos em uma série de mecanismos celulares como quelação de íons (SANTOS et al., 2020), interação com o ácido desoxirribonucleico (DNA) (POPIOLEK, 2021), eliminação de radicais livres (SANTOS et al., 2020), inibição enzimática (YU, 2015). Tal versatilidade atribuída aos derivados hidrazônicos decorre das modificações estruturais que essas moléculas sofrem, pois permitem facilmente que variações em suas estruturas sejam propostas, sendo sintetizadas sem maiores complexidades, além da estabilidade frente a reações de hidrólise (POPIOLEK, 2021; GUIMARÃES et al., 2017).

Soubhye e colaboradores (2017) desenvolveram e avaliaram uma série de derivados hidrazônicos sobre a atividade da MPO. Considerando a atividade inibitória irreversível da MPO pela hidralazina e isoniazida, com valores de CI_{50} de 0,9 μM e 5 μM , respectivamente, foi proposto a exploração da reatividade química desses inibidores na presença de diferentes aldeídos aromáticos e alifáticos para a formação de hidrazonas, possibilitando assim, a identificação de novos inibidores hidrazônicos de MPO com potência otimizada, chegando a compostos com valores de CI_{50} de até 0,08 μM .

Ibrahim e colaboradores (2022) estudaram uma série de 21 derivados sulfonil bis(acilidrazônicos), dos quais se destacaram 2 compostos com significativa atividade inibitória sobre a AChE com valores de CI_{50} próximos a 100 μM . Em outro estudo, Esteban e colaboradores (2013) avaliaram uma série de hidrazinas e hidrazidas indol substituídas como novos compostos multifuncionais com potencial para o tratamento da DA, investigando a atividade inibitória sobre as enzimas como as monoamina oxidases A e B, e as colinesterases, acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BuChE). Os autores identificaram, assim, dois derivados com significativa atividade sobre a AChE, com valores de CI_{50} de $86,4 \pm 15,8 \mu\text{M}$ e $46,3 \pm 2,9 \mu\text{M}$.

2. JUSTIFICATIVA

Estudos na área de química medicinal envolvendo o grupo funcional *N*-acilhidrazona (NAH) têm ganhado destaque, especialmente na síntese de novas moléculas a partir desse núcleo NAH, dada expressiva aplicabilidade em diversos alvos moleculares e sua facilidade de síntese (THOTA et al., 2018). Considerando a significativa contribuição da MPO e AChE na origem, desenvolvimento e manutenção de diversas doenças inflamatórias, sobretudo a doença de Alzheimer, a busca por novos protótipos descritos nesse trabalho que sejam capazes de inibir tais enzimas e assim reduzir esses processos, torna-se relevante.

Um trabalho do nosso grupo de pesquisa envolvendo *N*-acilhidrazonas (NAH) derivados da Isoniazida como potenciais candidatos a protótipos para o tratamento da doença de Alzheimer demonstrou o caráter privilegiado que a estrutura desses compostos bioativos possui. Quinze derivados *N*-acilhidrazônicos (**1a-o**) contendo o arcabouço estrutural da isoniazida, uma hidrazida do ácido isonicotínico utilizada no tratamento da tuberculose, foram sintetizados e resultaram em ligantes interessantes, demonstrando serem inibidores de MPO e AChE. Além disso, exibiram bom perfil antioxidante para a eliminação de radicais livres e capacidade de coordenar metais através de átomos doadores de N/O, demonstrando ser um grupo promissor para o tratamento da DA (SANTOS et al., 2020).

A partir desses resultados, colaboradores do grupo de pesquisa liderado pela Profa. Dra. Andréa F. Luzia de Souza (Instituto de Química / UFRJ) planejaram e sintetizaram novas moléculas da série *N*-acilhidrazonas. Foram sintetizados três análogos da LCSO11 (composto **1m**) e uma forma reduzida da LCSO13 (composto **1o**), modificando os substituintes ligados tanto no núcleo piridínico da isoniazida, quanto na subestrutura aromática da *N*-acilhidrazona, totalizando seis compostos que serão estudados no presente trabalho (Figura 5).

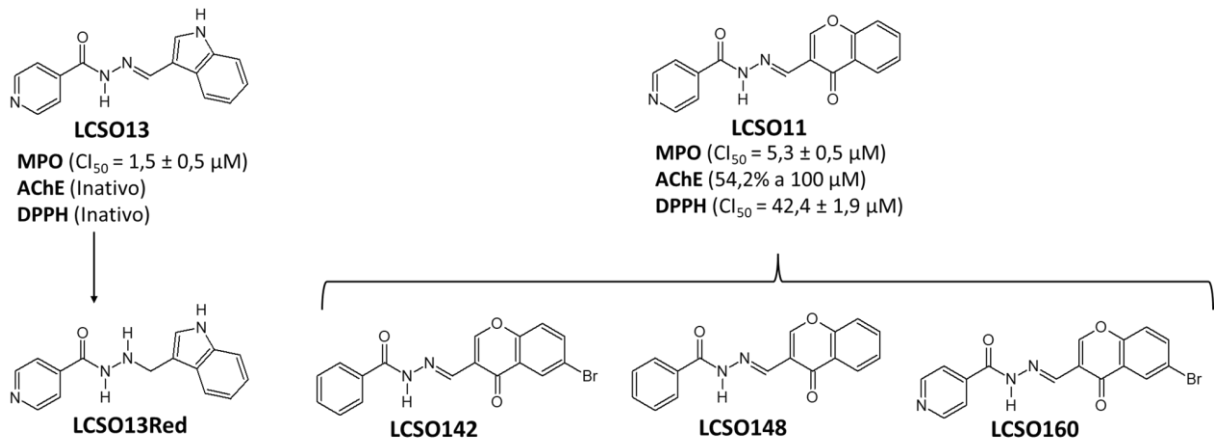


Figura 5: Estrutura química dos derivados *N*-acilhidrazônicos. MPO: mieloperoxidase, AChE: acetilcolinesterase, DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidrazil.

3. OBJETIVOS

Inibidores duplos de AChE/MPO representam um ponto de partida adequado para o desenvolvimento de fármacos anti-Alzheimer, sendo as hidrazonas já descritas como inibidores dessas enzimas. Com isso, o trabalho tem por objetivo a identificação de derivados *N*-acilhidrazônicos com ação multialvo para tratamento da doença de Alzheimer.

Objetivos específicos:

1. Triagem farmacológica dos derivados quanto a sua atividade inibitória sobre a produção de HOCl pela MPO utilizando o método do ácido 2-nitro-5-mercapto-benzóico (TNB);
2. Determinação da potência dos derivados quanto a sua atividade inibitória sobre a produção de HOCl pela MPO no método TNB;
3. Investigação do mecanismo de inibição dos derivados LCSO11, LCSO13 e LCSO13Red sobre a atividade clorinante da MPO;
4. Triagem farmacológica do derivado LCSO11 e seus análogos quanto a sua capacidade em sequestrar radical o DPPH;
5. Determinação da potência do derivado LCSO11 e seus análogos quanto a sua capacidade em sequestrar o radical DPPH;
6. Triagem farmacológica dos derivados quanto a sua atividade inibitória sobre a AChE;
7. Determinação da potência dos derivados quanto a sua atividade inibitória sobre a AChE.

4. METODOLOGIA

4.1. Obtenção das *N*-Acilhidrazonas

As substâncias *N*-acilhidrazônicas derivadas do fármaco isoniazida avaliadas no presente trabalho foram obtidas a partir de parceria com colaboradores do Laboratório de Síntese Orgânica e Química Medicinal localizado na Universidade Federal do Rio de Janeiro, campus Ilha do Fundão. Depois de sintetizadas e enviadas ao Laboratório Integrado de Pesquisa em Farmacologia de Produtos Bioativos, situado no Centro Multidisciplinar – UFRJ Macaé, foram realizados os testes farmacológicos aqui apresentados. Os respectivos códigos atribuídos, estruturas químicas e peso molecular ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$) dos seis derivados *N*-acilhidrazônicos (Figura 5) estudados estão apresentados no Anexo 1.

4.2. Obtenção da MPO

A MPO utilizada nos ensaios tem como fonte a medula óssea de ratos wistar. Inicialmente, o interior dos ossos das patas traseiras (Tíbia e Fêmur) de ratos wistar machos (200-250 g) foram lavados com solução salina isotônica (NaCl 0,9% p/v, EDTA 1 mM) gelada, a fim de retirar a medula óssea. O material obtido foi homogeneizado e centrifugado por 10 minutos (min), a 3000 rpm e 25°C (Daiki, CENTRIBIO/80-2B – 4000 rpm). Na sequência, o *pellet* foi homogeneizado em 5 mL de solução de NaCl hipotônica (0,2% p/v e EDTA 0,5 mM) por 30 segundos, a fim de retirar seletivamente os eritrócitos do conteúdo, e então foram adicionados 5 mL de NaCl hipertônico (1,6% p/v e EDTA 0,5 mM), obtendo novamente uma solução isotônica. Após homogeneização, o material foi novamente centrifugado por 10 min, a 3000 rpm e 25°C. Caso fosse observado a presença de hemácias no conteúdo, o procedimento de ressuspender o *pellet* e lavagem com as soluções salinas deveria ser realizado até a obtenção de uma amostra totalmente branca. Após obtenção, o *pellet* branco foi ressuspensão em 5 mL de tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 7,0, contendo MgCl_2 1mM e NaCl 3mM (Tampão A) e levado ao homogeneizador de tecido do tipo Potter (Novatecnica - NT136), com 10-15 repetições. O pellet obtido foi novamente homogeneizado em Potter, utilizando tampão A, agora contendo 1% de brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB). Por fim, o material foi homogeneizado e levado à microcentrífuga (Cientec CT- 6000R / 20.000 G) refrigerada a 4 °C, por 15

minutos. O sobrenadante então foi coletado e armazenado congelado para futuros ensaios (KARIYA et al., 1987).

4.3. Avaliação farmacológica dos derivados sobre a MPO

A atividade inibitória dos derivados *N*-acilhidrazônicos sobre a MPO foi avaliada a partir da oxidação direta do ácido 5-tio-2-nitrobenzóico (TNB) pelo HOCl, formando o ácido 5-5'-ditio (2-nitrobenzóico) (DTNB) (Figura 6), conforme descrito por Ching e colaboradores (1994).

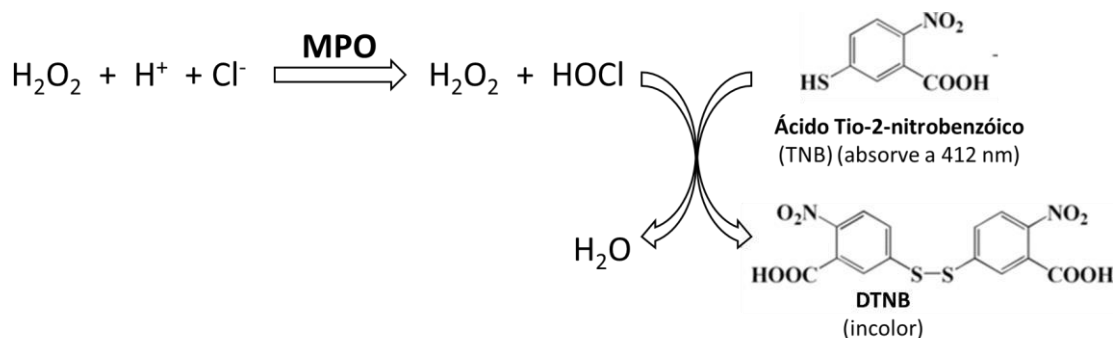


Figura 6: Reação de oxidação do ácido 5-tio-2-nitrobenzóico (TNB) ao dissulfeto correspondente (DTNB). Adaptado de BOTELHO, 2019.

Inicialmente, uma solução de TNB (tampão fosfato 50 mM e NaOH) foi preparada e armazenada ao abrigo da luz, sob refrigeração. Os derivados foram avaliados a 100 μM , utilizando microplacas de 96 poços e atividade da MPO foi determinada pela produção de HOCl em volume final de 125 μL contendo tampão fosfato (0,02 M, pH 7,4), MPO de rato (0,5 U/mL), NaCl (100 mM), TNB (120 μM) e derivados/dimetilsulfóxido (DMSO) a 50mM. Após 20 min sob agitação e ao abrigo da luz, a reação foi iniciada com a adição de H_2O_2 (50 μM). As taxas de reação enzimática das amostras em relação ao grupo controle foram avaliadas em leituras espectrofotométricas em 412 nm, por 10 minutos, a 22°C (CHING; DE JONG; BAST, 1994).

4.4. Investigação do Mecanismo de Inibição dos derivados sobre a MPO

A partir de estudos acerca da cinética enzimática é possível elucidar com detalhes um determinado mecanismo catalítico, além de observar como sua atividade pode ser inibida ou estimulada, a depender das condições reacionais. A fim de

caracterizar o perfil dos inibidores propostos sobre a atividade clorinante da MPO, o mecanismo de inibição dos derivados LCSO11, LCSO13 e LCSO13Red. foi avaliado.

Considerando a existência de novos equilíbrios químicos envolvidos na catálise da enzima, foi necessário investigar variáveis do método adotado a fim de obter as condições ideais de concentração do inibidor e substrato em questão. A oxidação do TNB foi monitorada cineticamente sob o mesmo sistema empregado no ensaio de inibição da atividade da enzima, variando apenas na concentração do substrato (50 a 150 μM) e dos inibidores, escolhidas com base em seus respectivos valores de CI_{50} . A perda de absorvância do TNB em 412 nm foi monitorada a partir de leituras consecutivas em intervalos de 1 minuto, durante 10 min.

4.5. Avaliação da capacidade sequestrante de DPPH pelos derivados

O derivado LCSO11 e seus análogos LCSO142, LCSO148 e LCSO160 foram avaliados quanto à capacidade antioxidante a partir do ensaio de eliminação do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH). O ensaio de DPPH se tornou um método significativo para a triagem de substâncias capazes de sequestrar espécies radicalares, pois em um cenário de busca por candidatos a protótipos de fármacos é imprescindível avaliar compostos com propriedades antioxidantes. A avaliação da capacidade e potência de eliminação radicalar dos compostos testados foram realizadas *in vitro* conforme metodologia proposta por Belkheiri e colaboradores (2010). O método avalia a diminuição da absorvância do radical estável DPPH• (coloração violeta) a 517 nm na presença de substâncias antioxidantes. Essa redução é observada devido a transferência de hidrogênio dos compostos em questão, formando o composto reduzido DPPH-H (coloração amarela) (Figura 7) (BELKHEIRI et al., 2010; SANTOS et al., 2020).

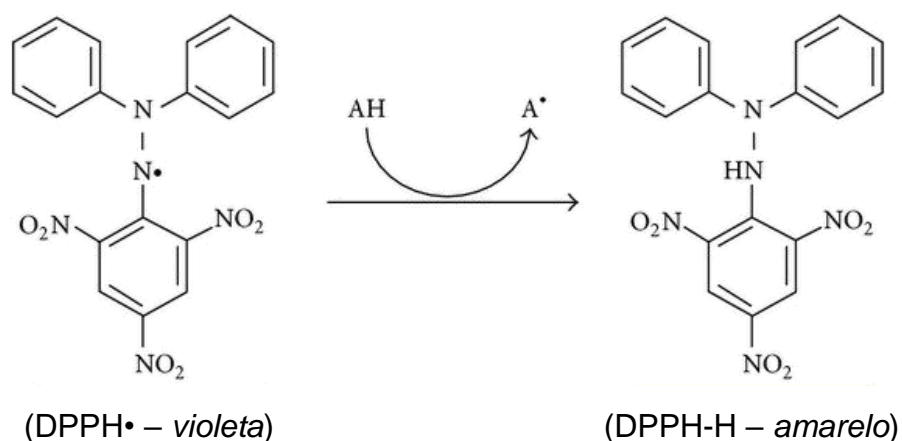


Figura 7: Reação de redução do radical DPPH• a DPPH-H. Adaptado de GASPAR et al., 2013.

O perfil antioxidante dos derivados *N*-acilhidrazônicos foi avaliado a 100 μ M, utilizando microplacas de 96 poços, em um volume final de 200 μ L contendo uma mistura 1:1 de solução metanólica de DPPH e derivados/Metanol, ambos a 0,2 mM. Após 30 min, sob agitação e ao abrigo da luz, a absorbância foi medida em 517 nm, a 22°C. Além da capacidade de eliminação do radical DPPH avaliada, os derivados citados tiveram sua potência determinada. Esta determinação foi feita através da repetição do teste de avaliação da capacidade em diferentes concentrações das substâncias (3,125 a 100 μ M).

4.6. Avaliação farmacológica dos derivados sobre a AChE

A atividade inibitória dos derivados *N*-acilhidrazônicos sobre a AChE foi avaliada pelo método colorimétrico de Ellman, descrito em 1961 por Ellman e colaboradores, sendo atualmente o mais empregado para a determinação da atividade da enzima. Para o presente trabalho, a enzima utilizada foi Acetilcolinesterase de *Electrophorus electricus* (enguia elétrica), Sigma-Aldrich C2888-500UN.

O procedimento emprega o ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzóico) (DTNB), reagente de Ellman, para a determinação da atividade enzimática. O princípio do método de Ellman se baseia na reação de hidrólise da acetiltiocolina (ACTI) catalisada pela AChE, levando à formação de Tiocolina a qual reage com o ânion carboxilato do DTNB, produzindo o 2-nitrobenzoato 5-mercaptopiocolina e um íon de coloração amarela, o 5,5'-ditiobis-2nitrobenzoato (TNB). Este último é quantificado espectrofotometricamente em 412 nm, sendo possível avaliar a atividade remanescente da AChE a partir da produção do intermediário Tiocolina (Figura 8) (ELLMAN et al., 1961).

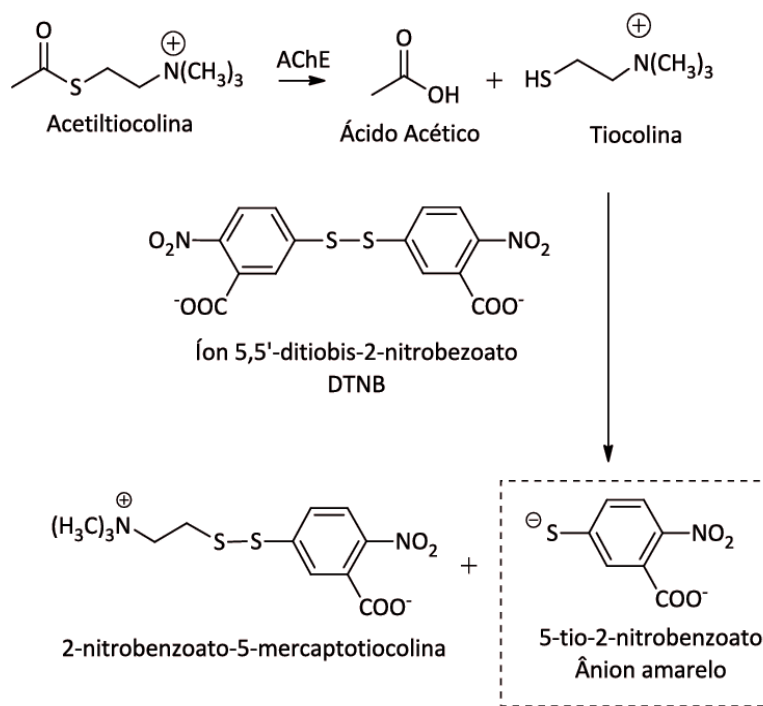


Figura 8: Formação do ânion amarelo do 5-tio-2-nitrobenzoato resultado da reação entre a Tiocolina e o íon 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoato. Adaptado de ARAÚJO et al., 2016.

Os derivados foram avaliados a 50 μM , utilizando microplacas de 96 poços, em um volume final (250 μL) contendo tampão fosfato de sódio (0,05 M, pH 8), 0,25 U/mL de AChE, 60 μM de DTNB e derivados/DMSO. Após 30 min sob agitação e ao abrigo da luz, a reação foi iniciada com a adição de 1,5 mM de ACTI. O ensaio foi avaliado em ao menos três experimentos independentes, realizados em triplicata, e a absorbância foi medida a 412 nm, por 10 min, a 22°C. O percentual de inibição foi determinado comparando-se as taxas de reação enzimática das amostras em relação ao grupo controle (SANTOS et al., 2020).

4.7. Análise Estatística

Os resultados obtidos com os derivados *N*-acilhidrazônicos testados foram comparados com grupo controle positivo, com ao menos três ensaios independentes, realizados em triplicata. A Análise estatística dos dados foi feita utilizando o Software GraphPad Prism versão 5.0, a fim de investigar a presença de diferenças significativas ($p < 0,05$). Para avaliação e determinação da potência foi calculada a CI_{50} através de regressão não linear das curvas concentração-resposta (log da concentração do derivado em relação ao % do controle).

5. RESULTADOS e DISCUSSÃO

5.1. Avaliação farmacológica dos derivados sobre a MPO

Para avaliar a capacidade de inibitória de alguns dos derivados *N*-acilhidrazônicos sobre o ciclo cloração da MPO, foi proposto um ensaio para a determinação da potência (Tabela 1). Em continuação ao trabalho de Santos (2020), curvas concentração-resposta foram determinadas para melhor compreensão das diferenças entre as atividades dos derivados (Gráfico 1). A inibição sobre a atividade catalítica da enzima dos derivados foi comparada ao padrão interno 4-ABAH (hidrazida do ácido 4-aminobenzóico). No trabalho realizado por Santos e colaboradores (2020), os ensaios foram realizados em outro método, utilizando o TMB (3,3', 5,5'-tetrametilbenzina) como indicador de atividade para MPO. Neste método, a oxidação do indicador se dá a partir da reação com a cloro-aurina (Cl-Tau) formada no meio reacional em presença do HOCl produzido pela MPO (KETTLE et al, 2014). A fim de eliminar influências resultantes de um possível sequestro de HOCl pelos derivados *N*-acilhidrazônicos, empregou-se o indicador TNB, capaz de ser oxidado diretamente pelo HOCl a partir da MPO.

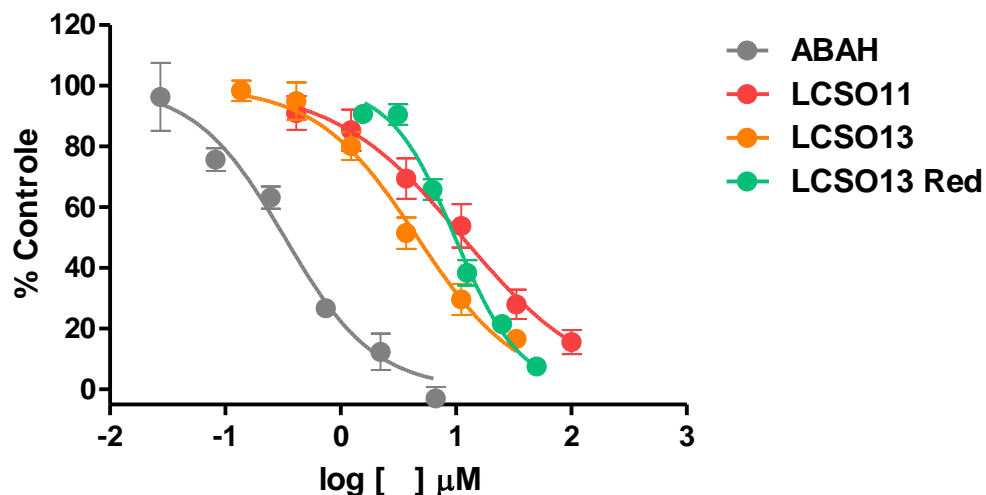


Gráfico 1 – Inibição da atividade de MPO. A atividade de MPO foi avaliada pela produção de HOCl na presença de H_2O_2 e Cl^- . Curvas concentração-resposta dos derivados LCSO11, 13 e 13 Red, e do controle positivo ABAH, sobre a atividade de MPO. Os derivados foram avaliados a concentrações de 3,125 a 100 μM . Dados expressos como % da produção de HOCl em relação ao controle. Pontos representam a média e traços o erro padrão da média de 3 experimentos realizados em triplicata. Linhas mostram a regressão não-linear dos dados.

Tabela 1: Potência dos derivados LCSO11, LCSO13 e LCSO13 Red. sobre a atividade da MPO (μM).

Derivado	N	Cl₅₀ (μM) \pm EPM
ABAH	3	0,34 \pm 0,07 ^a
LCSO11	3	13,7 \pm 3,0 ^b
LCSO13	3	5,1 \pm 0,9 ^{a,c}
LCSO13 Red.	3	10,3 \pm 0,9 ^{b,c}

Cl₅₀ - Média de 3 experimentos realizados em triplicata; EPM – Erro padrão da média. Os valores de Cl₅₀ foram obtidos por regressão não linear usando GraphPad Prism, versão 5.0. Letras diferentes denotam diferença estatisticamente significativa, One-way ANOVA seguido pelo Teste de Comparação Múltipla de Dunnett.

Mediante dados apresentados na Tabela 1, observa-se que os derivados *N*-acilhidrazônicos em questão apresentaram potente ação inibidora sobre a atividade da MPO (produção de HOCl). Destes, LCSO13 foi o mais potente, apresentando valor de Cl₅₀ igual a 5,1 \pm 0,9 μM , sendo estatisticamente diferente do derivado LCSO11 (Cl₅₀ de 13,7 \pm 3,0 μM). Em trabalho anterior do nosso grupo, demonstramos que os derivados LCSO11 e LCSO13 foram capazes de inibir a MPO com valores de Cl₅₀ de 5,3 \pm 0,5 μM e 1,5 \pm 0,5 μM , respectivamente, utilizando outro método de detecção da Cl-Tau em que se emprega o TMB (SANTOS et al., 2020).

O derivado LCSO13Red. apresentou Cl₅₀ igual a 10,3 \pm 0,9 μM , similar a LCSO11. O derivado LCSO13 Red. apresentou-se equipotente quando comparado ao seu análogo. Considerando a presença do anel pirrol na estrutura do núcleo 3-indolil desses derivados, a ausência da ligação dupla na molécula reduzida pareceu não impactar significativamente na capacidade inibitória sobre a atividade da MPO, mas também não otimizou. Sugere-se que a retirada da dupla ligação impactou em aumento da reatividade na molécula, pois sem a alternância das ligações simples e duplas o efeito de ressonância na molécula foi prejudicado.

5.2. Mecanismo de Inibição dos derivados sobre a MPO

Os mecanismos enzimáticos podem ser classificados em mono ou multi substrato. Este último é subdividido em sequencial (a interação dos substratos com a enzima ocorre antes do início da reação) ou Ping-pong (a formação de produtos ocorre antes do consumo total de substrato). Caracterizada como uma enzima que apresenta

mecanismo multi substrato do tipo Ping-pong, a MPO é uma oxirredutase que existe sob duas formas cataliticamente ativas, as quais cada uma reconhece um substrato e o transforma em produto (Figura 9) (BORNSCHEUER, 2006; ILLANES, 2008).

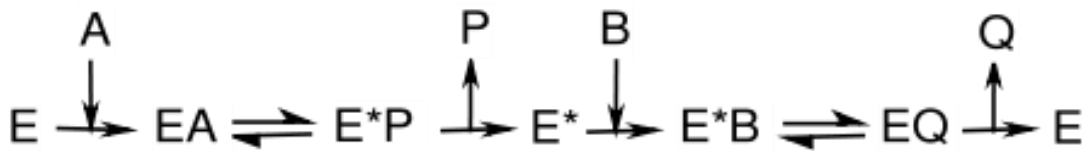


Figura 9: Representação geral do mecanismo de ação multi substrato do tipo Ping-pong. Enzima (E), Primeiro substrato (A); Produtos (P e Q); Enzima em nova conformação (E*); Segundo substrato (B). Fonte: Wikipedia, 2019.

Os inibidores enzimáticos podem atuar de maneira irreversível (inativando permanentemente) ou não (há restauração da atividade com a retirada do inibidor) na redução do potencial biocatalítico da enzima. Os reversíveis são ainda classificados como competitivos, incompetitivos, não-competitivos ou mistos, a depender do efeito que exercem sobre parâmetros cinéticos de K_m e V_{max} , a partir da ligação do inibidor à enzima, ao complexo enzima-substrato (ES) ou aos dois (SHARMA, 2012).

O gráfico do duplo-recíproco, também chamado de gráfico de Lineweaver-Burk, é comumente utilizado para representar os perfis de inibição enzimática a partir da análise dos valores de K_m e V_{max} (Figura 10). Obtidos a partir da linearização da equação de Michaelis-Menten, essas representações auxiliam de forma prática a exibição de dados experimentais ao relacionarem valores do inverso da velocidade em função do inverso da concentração do substrato (Figura 11) (WHITELEY, 2000; NELSON, 2019).

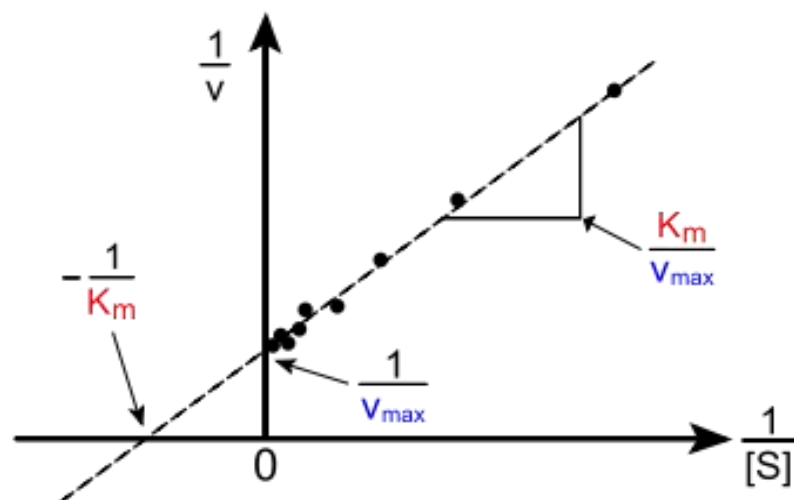


Figura 10: Gráfico duplo-recíproco de Lineweaver-Burk. Fonte: Wikipedia, 2007.

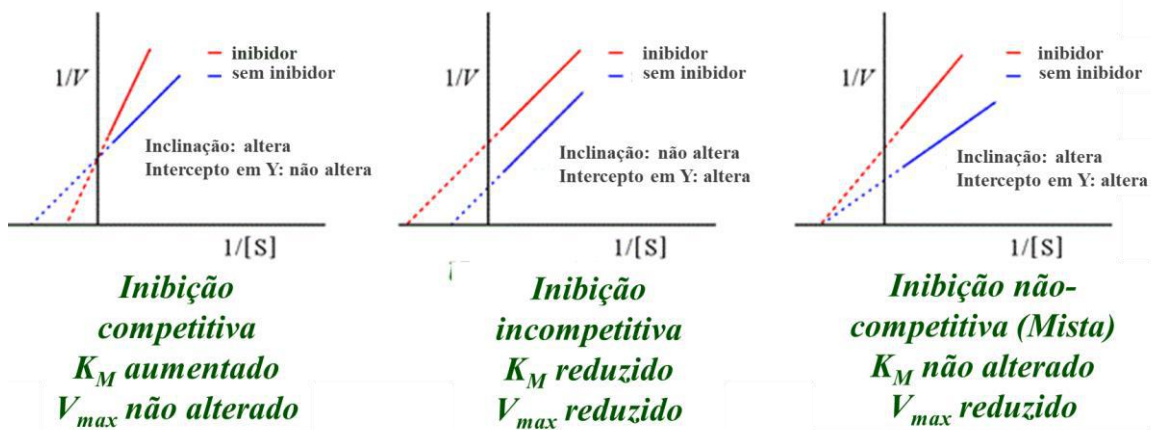


Figura 11: Representação do gráfico duplo-recíproco de Lineweaver-Burk para inibição competitiva, incompetitiva e mista, respectivamente. Adaptado de Wikipedia (2016).

A fim de elucidar as diferentes formas de associação com a enzima a partir de ligações reversíveis ou irreversíveis e caracterizar o modo de ligação dos derivados *N*-acilhidrazônicos com a MPO, um ensaio de avaliação do mecanismo de inibição foi proposto. Com base nas representações gráficas duplo-recíprocas do diagrama de *Lineweaver-Burk* (Gráficos 2, 3 e 4), observa-se que houve uma correlação linear entre a taxa de reação (atividade da enzima) com a concentração da enzima no meio reacional, seguindo a cinética de Michaelis-Menten (CHANG, 2000; LIEBERMAN et al, 2009).

Os perfis de linearização encontrados sugerem existir diferentes ações moleculares para cada inibidor proposto, entretanto todos os derivados exibiram mecanismos de inibição do tipo reversível sobre a atividade da MPO, ou seja, se ligam de forma não covalente à cadeia polipeptídica da enzima. O derivado LCSO11 parece interagir com um sítio que não o ativo (alostérico, por exemplo), ligando-se ao complexo enzima-substrato. Esse efeito é observado quando se tem o aumento da concentração do substrato. A não intercepção nos eixos indica mudanças em $V_{máx.}$ e K_m , característico de inibidores incompetitivos (Gráfico 2) (LEHNINGER, 2019).

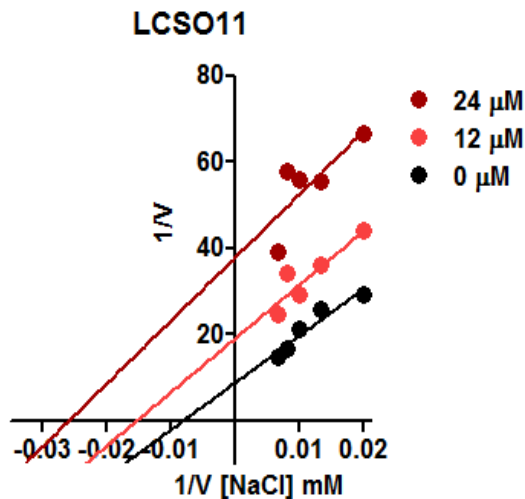


Gráfico 2 – Diagrama de *Lineweaver-Burk* representando o gráfico duplo-recíproco da velocidade inicial da enzima *versus* a concentração de cloreto na ausência e presença de diferentes concentrações do substrato LCSO11 para investigar o mecanismo de reação e o perfil de inibição sobre a atividade da MPO. Cada ponto é a média de três experimentos realizados independentes.

De igual forma, a interação de LCSO13 sugere ser com o complexo enzima-substrato, mas também pode formar ligação diretamente com a enzima. Nesse caso, o aumento da concentração do substrato não é capaz de reverter a inibição, podendo ser observadas interseções acima ou no eixo x, indicando mudanças em $V_{m\acute{a}x}$ e K_m , característico de inibidores não-competitivos ou mistos (Gráfico 3) (LEHNINGER, 2019).

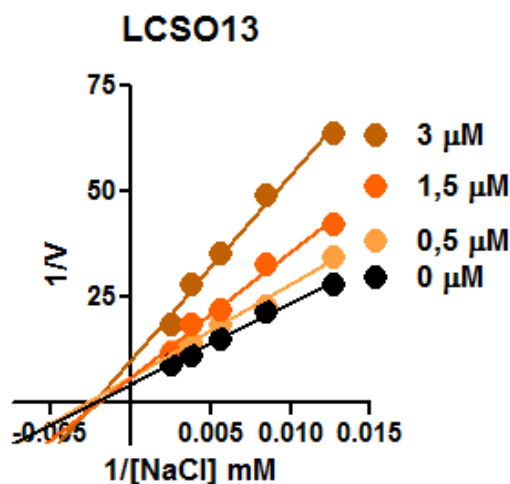


Gráfico 3 – Diagrama de *Lineweaver-Burk* representando o gráfico duplo-recíproco da velocidade inicial da enzima *versus* a concentração de cloreto na ausência e presença de diferentes concentrações do substrato LCSO13 para investigar o mecanismo de reação e o perfil de inibição sobre a atividade da MPO. Cada ponto é a média de três experimentos realizados independentes.

Por outro lado, LCSO13Red. parece ser capaz de interagir com a enzima diretamente, ligando-se ao seu sítio ativo quando a enzima na está ligada a seu substrato, competindo com o cloreto. Uma vez que a interceptação no eixo $1/V$ corresponde a $1/V_{\text{máx}}$, observa-se que $V_{\text{máx}}$ não varia. Esse perfil é característico de inibidores competitivos (Gráfico 4). Isto é, independentemente de qual seja a concentração de um inibidor competitivo, há uma concentração de substrato alta o suficiente que deslocará o inibidor do sítio ativo da enzima (LEHNINGER, 2019).

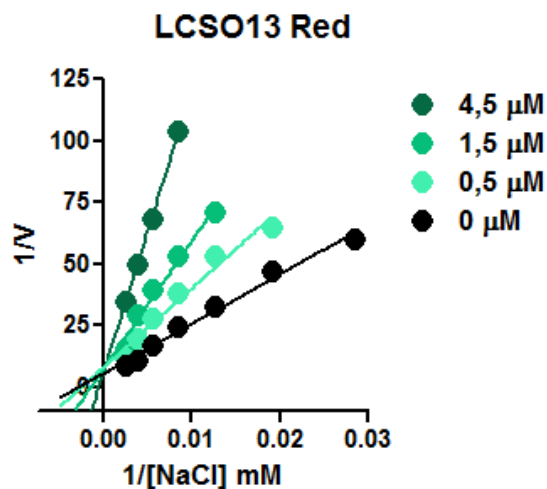


Gráfico 4 – Diagrama de *Lineweaver-Burk* representando o gráfico duplo-recíproco da velocidade inicial da enzima *versus* a concentração de cloreto na ausência e presença de diferentes concentrações do substrato LCSO13 Red. para investigar o mecanismo de reação e o perfil de inibição sobre a atividade da MPO. Cada ponto é a média de três experimentos realizados independentes.

5.3. Capacidade sequestrante de DPPH pelos derivados

Para avaliar a capacidade antioxidante dos derivados *N*-acilhidrazônicos LCSO13, LCSO13 Red., LCSO11 e seus análogos LCSO142, LCSO148 e LCSO160 em relação a eliminação do radical DPPH, foi proposto um ensaio de triagem farmacológica a 100 μM (Gráfico 5). Do grupo de substâncias avaliadas, o derivado LCSO11 e todos os seus análogos apresentaram diferenças estatisticamente significativas quando comparados ao grupo controle, demonstrando que as substâncias possuem boa atividade antioxidante para o sequestro de DPPH bem como apresentam-se promissoras no contexto de síntese de novos derivados hidrazônicos com esse perfil.

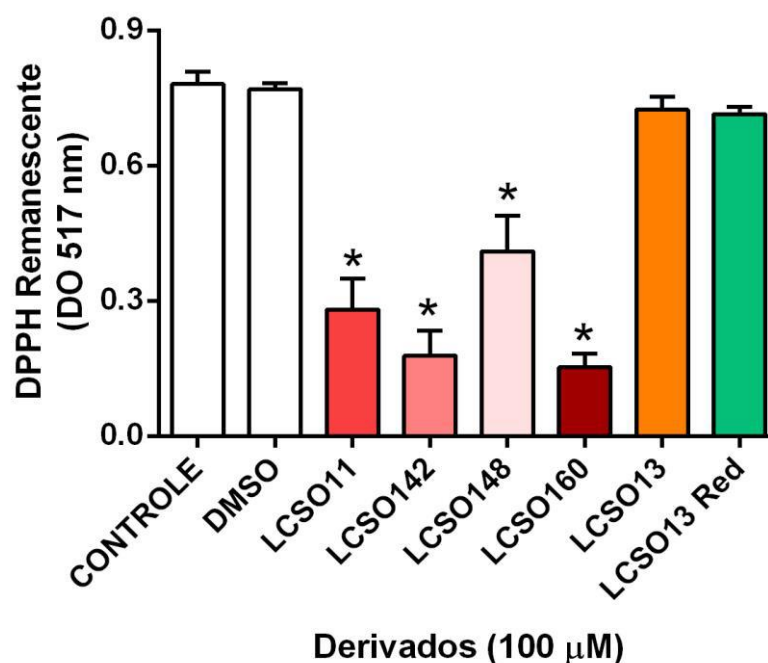


Gráfico 5 – Triagem farmacológica dos derivados *N*-acilhidrazônicos sobre a atividade antioxidante a partir do sequestro do radical DPPH após incubação com as amostras. Os resultados são expressos em relação à atividade do controle. Símbolos e Barras representam a média e traços o erro padrão da média de ao menos três experimentos independentes realizados em triplicata. Símbolos denotam diferença estatisticamente significativa, One-way ANOVA seguido pelo Teste de Comparação Múltipla de Dunnett.

Os análogos LCSO142 e LCSO160 avaliados exibiram bom perfil para a atividade de eliminação do radical DPPH na concentração de triagem. A fim de investigar a influência da retirada da ligação dupla sobre a capacidade antioxidante do LCSO13Red., o derivado LCSO13 foi comparado juntamente. Novamente, a retirada da ligação dupla em LCSO13 Red. demonstrou não interferir positivamente na capacidade antioxidante da molécula para o ensaio *in vitro* realizado.

Elevada reatividade tem sido atribuída ao núcleo indólico devido a capacidade de se estabilizar pelo efeito de ressonância. Moléculas sintetizadas com esse núcleo são capazes de neutralizar espécies radicalares em função de sua estrutura aromática, deslocando os elétrons desemparelhados do anel (LU et al., 2010). Outro trabalho avaliou a relação de estrutura-atividade mediante capacidade de eliminação de radical DPPH a partir de compostos indol-3-acetamida sintetizados. A substituição no núcleo indólico com halogênios como o Flúor na posição *para*, por exemplo, resulta em maior atividade antioxidante para a eliminação de radical DPPH. Isso ocorre em

função da capacidade do Flúor (altamente eletronegativo) em retirar elétrons e estabilizar a carga pelo efeito indutivo negativo (KANWALL et al., 2021). Apesar da presença do núcleo indol nos derivados LCSO13 e LCSO13 Red., não houve otimização para a avaliação da atividade antioxidante proposta.

Diferentes potências para eliminação de DPPH• estão associadas à capacidade intrínseca das *N*-acilhidrazonas sintetizadas em abstrair átomos de hidrogênio da ligação NH. Em avaliação proposta por Santos e colaboradores (2020), foi demonstrado que o derivado LCSO11 é menos potente quando comparado à Isoniazida (Cl_{50} : $42,4 \pm 1,9 \mu\text{M}$ e $22,9 \pm 0,7 \mu\text{M}$, respectivamente). Isso ocorre em função da presença de um átomo de hidrogênio na isoniazida em posição α da porção acilhidrazona, tornando-a reativa.

Para avaliar a capacidade antioxidante do derivado *N*-acilhidrazônico LCSO11 e seus análogos, foi proposto um ensaio de eliminação do radical DPPH para a determinação da potência (Tabela 2). Curvas concentração-resposta foram determinadas para melhor compreensão das diferenças entre as atividades do derivado e seus análogos (Gráfico 6), comparados a LCSO11.

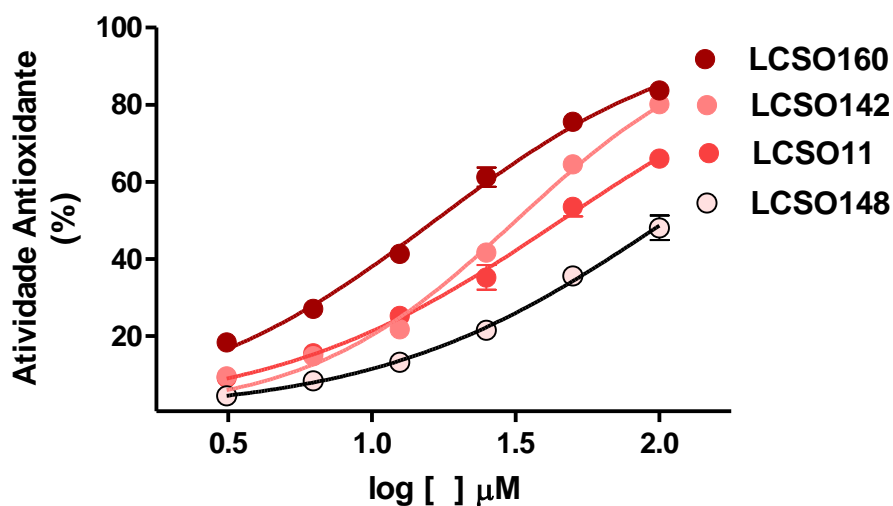


Gráfico 6 – Avaliação da Capacidade Antioxidante. A atividade foi avaliada a partir do sequestro do radical DPPH após incubação com as amostras. Curvas concentração-resposta dos derivados LCSO11, 142, 148 e 160 sobre a atividade de sequestro do radical DPPH. Os derivados foram avaliados a concentrações de 6,250 a 200 μM . Dados expressos como % de sequestro do radical DPPH.

Tabela 2: Potência dos derivados LCSO11, LCSO142, LCSO148 e LCSO160 sobre o sequestro do radical DPPH (μM).

Derivado	N	CI₅₀ (μM) \pm EPM
LCSO11	3	47,5 \pm 4,8 ^a
LCSO142	3	32,0 \pm 1,6 ^{a,b}
LCSO148	3	114,2 \pm 12,5 ^c
LCSO160	3	17,3 \pm 1,7 ^b

Média de 3 experimentos realizados em triplicata; EPM – Erro padrão da média. Os valores de CI₅₀ foram obtidos por regressão não linear usando GraphPad Prism, versão 5.0. Letras diferentes denotam diferença estatisticamente significativa, One-way ANOVA seguido pelo Teste de Comparação Múltipla de Dunnett.

Mediante dados apresentados na Tabela 2, observa-se que os análogos LCSO142 e LCSO160 foram os mais potentes para a capacidade antioxidante sobre a atividade de sequestro do radical DPPH (CI₅₀ de 32,0 \pm 1,6 μM e 17,3 \pm 1,7 μM , respectivamente). O mais potente, LCSO160, mostrou diferença significativa em relação aos análogos LCSO11 e LCSO148. Já LCSO11 e LCSO142, mostraram-se equipotentes, assim como LCSO142 e LCSO160. O precursor LCSO11 demonstrou bom perfil para atividade antioxidante (CI₅₀ de 47,5 \pm 4,8 μM). Esse dado sugere ter ocorrido otimização da atividade antioxidante pelos análogos sintetizados sobre o sequestro de espécies radicalares.

De modo semelhante, a adição de um átomo de bromo (Br) na posição *para* (*p*) do núcleo 3-cromonil dos análogos LCSO142 e LCSO160 impactou de forma positiva a eliminação de espécies radicalares pelo método DPPH, representando otimização nas estruturas das moléculas sintetizadas para a atividade em relação a LCSO11. Conforme demonstrado por LEMES e colaboradores (2018), a substituição *p*-Br no anel de ambas as moléculas diminuiu o efeito de ressonância na estrutura provocado pela disponibilidade de elétrons, o que justifica terem sido mais potentes para a atividade antioxidante. Além disso, a ausência do átomo de nitrogênio na estrutura do análogo LCSO148 impactou em perda da capacidade antioxidante da substância para o método proposto, pois nesse caso, o efeito de ressonância não é estabilizado na molécula pela retirada de elétrons a partir do nitrogênio.

5.4. Avaliação farmacológica dos derivados sobre a AChE

Para avaliar a capacidade de interferência dos seis derivados *N*-acilhidrazônicos sobre a atividade catalítica da AChE, foi proposto um ensaio de triagem farmacológica a 50 μ M (Gráfico 7). Do grupo de substâncias avaliadas, os análogos LCSO142 e LCSO160 apresentaram bons perfis de inibição. A diferença encontrada, estatisticamente significativa quando comparada ao grupo DMSO, demonstrou que os análogos LCSO 142 e LCSO160 exercem forte inibição enzimática sobre a AChE bem como apresentam-se promissores no contexto de síntese de novos derivados hidrazônicos inibidores dessa enzima.

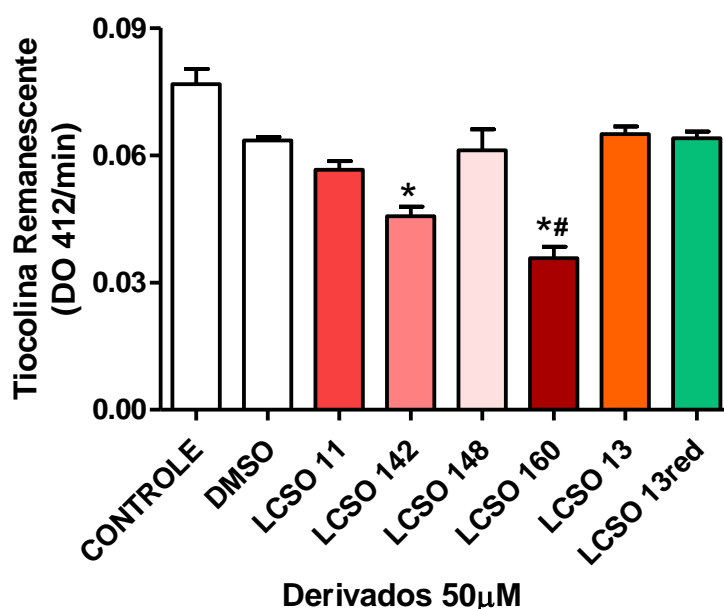


Gráfico 7 – Triagem farmacológica dos derivados *N*-acilhidrazônicos sobre a atividade da AChE a partir do método espectrofotométrico de *Ellman* que detecta tiocolina remanescente após incubação com AChI. Os resultados são expressos em relação ao % do controle. Símbolos e Barras representam a média e traços o erro padrão da média de três experimentos independentes realizados em triplicata. Símbolos diferentes denotam diferenças estatisticamente significativas. ANOVA de uma via seguido de "Dunnett's Multiple Comparison Test".

Dos seis derivados *N*-acilhidrazônicos avaliados, LCSO11, LCSO142, LCSO13 e LCSO13 Red. não foram capazes de inibir a atividade da AChE na concentração de triagem. Para o ensaio proposto, os derivados LCSO11 e LCSO13 não apresentaram perfis de inibição significativa em relação ao grupo DMSO. Esse resultado é especialmente interessante, visto que em trabalho anterior publicado por Santos e colaboradores (2020) avaliando esses mesmos derivados, LCSO11 revelou resultados otimistas para AChE, sendo capaz de inibir a atividade da enzima em 54,2

± 1,7% a 100 µM quando comparado ao padrão de referência Rivastigmina utilizado. A divergência de concentrações sugere ter sido esse o fator limitante para o resultado encontrado, pois o presente estudo realizou o ensaio a 50 µM. Em contrapartida, a tentativa de demonstrar perfis de inibição mais potentes dos derivados *N*-acilhidrazônicos sobre a AChE revelou ter ocorrido otimização promissora para a atividade em relação aos análogos do derivado LCSO11 (LCSO142 e LCSO160). Os análogos em questão demonstraram ter sido capazes de inibir a enzima em 28,1% e 43,7%, respectivamente (Tabela 3).

Tabela 3: Percentual de Inibição dos derivados LCSO11, LCSO142, LCSO148, LCSO160, LCSO13 e LCSO13 Red. sobre a atividade da AChE a 50 µM.

Derivado	N	% Inibição (50 µM)
LCSO11	3	10,8 ^a
LCSO142	3	28,1 ^{a,b}
LCSO148	3	3,6 ^a
LCSO160	3	43,7 ^b
LCSO13	3	-2,4 ^a
LCSO13 Red.	3	-0,9 ^a

Cl₅₀ - Média de 3 experimentos realizados em triplicata. EPM: Erro Padrão da Média. Letras diferentes denotam diferença estatisticamente significativa.

Pequenas alterações como a inserção de halogênios (Bromo, por exemplo) em uma molécula-alvo podem induzir mudanças nas propriedades químicas, atividade biológica e até mesmo a seletividade frente ao alvo (MIETHCHEN, R., 2004). A adição de um átomo de Br no núcleo 3-cromonil dos análogos LCSO142 e LCSO160 promoveu otimização nas estruturas para a atividade em relação a LCSO11, pois a presença do halogênio nas moléculas impactou em aumento da lipofilicidade (LogP). Isto sugere ter sido um dos fatores para a potente atividade anticolinesterásica observada nas substâncias. Fármacos que possuem maior LogP tendem a ser mais permeáveis à bicamada lipídica, o que resulta em melhor perfil de biodisponibilidade (FERREIRA, S. B., 2009).

A presença do átomo de Nitrogênio com par de elétrons livres no anel piridínico possibilita uma contribuição de três híbridos positivamente carregados, estabilizando o efeito de ressonância intrínseco da molécula. A estrutura benzênica por si só não possui essa capacidade de retirar elétrons, o que justifica certo prejuízo em inibir a AChE, apresentado pela retirada do átomo LCSO142 (28,1%) e LCSO148 (3,6%). Ainda, em um estudo sobre a avaliação de β -Cetoindois sobre a atividade da AChE, foi demonstrado que as estruturas que possuem substituintes halogenados (Br ou F) no anel em posição *para* favoreceram a inibição da enzima (LEMES, 2018).

Ademais, essas alterações implicam em diferenças no modo de interação dos derivados *N*-acilhidrazônicos sintetizados com a enzima. A presença de um anel pirrol nos derivados LCSO13 e LCSO13 Red. compondo a estrutura do núcleo 3-indolil indica elevada reatividade das moléculas frente a eletrófilos. Menos eletronegativo que o átomo de Br, por exemplo, a presença do nitrogênio com um par de elétrons livres aumenta o efeito de ressonância na molécula. A reatividade do composto frente a eletrófilos também é aumentada pela presença do anel pirrólico se comparado à estrutura benzênica, pois os elétrons *pi* disponíveis estão deslocalizados em uma estrutura de cinco átomos apenas, o que não ocorre com o anel benzeno. Assim como LCSO13, a forma reduzida do derivado apresentou baixo potencial para inibir a AChE, sugerindo que a presença da ligação dupla na estrutura não influencia significativamente a interação da molécula com a enzima (WARREN et al., 2012).

Os resultados obtidos a partir dos experimentos de triagem dos derivados *N*-acilhidrazônicos a 50 μ M demonstraram o impacto positivo da presença de substituintes contendo halogênios como o Bromo, além do nitrogênio. Entretanto, a fim de melhor compreender as diferenças entre as atividades dos derivados *N*-acilhidrazônicos, serão determinadas as potências inibição sobre a AChE a partir de curvas concentração-resposta dos derivados mais ativos selecionados no ensaio de triagem. Além disso, novos estudos de *docking* molecular serão continuados para investigar o tipo de interação intermolecular (derivado-enzima) bem como avaliar a afinidade por algum resíduo de aminoácido específico em algum sítio catalítico.

6. CONCLUSÃO

A inibição dual das enzimas MPO e AChE parece ter potencial para atenuar diversos efeitos deletérios oriundos do estresse oxidativo descontrolado em diferentes desordens inflamatórias, incluindo doenças neurodegenerativas. O potencial dos diferentes derivados *N*-acilhidrazônicos para o tratamento da DA pode ser atribuído às suas múltiplas propriedades farmacológicas, que constituem estímulo para a síntese de novas substâncias contendo esse núcleo no planejamento de candidatos a fármacos inibidores dos alvos pretendidos.

As potentes atividades aqui demonstradas pelos derivados *N*-acilidrazônicos contendo os núcleos 3-cromonil e 3-indolil reforçam a ideia de esse arcabouço estrutural possa ser empregado na construção de inibidores duais das enzimas MPO e AChE. LCSO160 representa uma otimização de LCSO11 tanto para eliminação do radical DPPH, quanto para inibição da AChE (inibidor mais potente, seguido por LCSO142). Apesar de não inibir a AChE, LCSO13 foi o mais potente em inibir a MPO. Os derivados LCSO11 e LCSO13 mantiveram suas atividades sobre a MPO quando empregado o método do TNB.

A substituição com Bromo na estrutura dos derivados impactou de forma positiva a eliminação de radicais DPPH e a inibição da AChE, indicando que o aumento na densidade eletrônica e na lipofilicidade podem indicar uma estratégia na otimização dessas atividades em futuros análogos. Por outro lado, a redução da hidrazona não interferiu de forma significativa na atividade inibitória sobre a MPO, mas parece interferir no mecanismo de inibição, desse modo, a síntese hidrazidas análogas pode também ser uma estratégia na otimização desses derivados.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANATOLIOTAKIS, N., et al. Myeloperoxidase: expressing inflammation and oxidative stress in cardiovascular disease. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 13, n. 2, p. 115-138, 2013.

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

ARAÚJO, C. R. M.; SANTOS, V. L.; GONÇALVES, A. A. Acetilcolinesterase – AchE: Uma Enzima de Interesse Farmacológico. **Revista. Virtual de Química**. v. 8, n. 6, p. 1818-1834, 2016.

BELKHEIRI, N.; BOUGUERNE, B.; BEDOS-BELVAL, F. **J. Med. Chem.** v. 45, p. 3019, 2010.

BIGBEE, J. W., et al. Morphogenic role for acetylcholinesterase in axonal outgrowth during neural development. **Environ Health Perspect.** v. 1, n. 107, p. 81-87, 1999.

BORNSCHEUER, U. T.; KAZLAUSKAS, R. J. Hydrolases in organic synthesis: regio- and stereoselective biotransformations. **John Wiley & Sons**, 2006.

BOTELHO, M. F. P. **Síntese de organocalcogenetos e estudos preliminares de suas propriedades antioxidantes**. 2019. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

CHANG. Enzyme Kinetics - Physical Chemistry for the Chemical and Biological Sciences, **University Science Books**, 2000.

CHING, T. L.; DE JONG, J. B. A. A method for screening hypochlorous acid scavengers by inhibition of the oxidation of 5-thio-2-nitrobenzoic acid: application to anti-asthmatic drugs. **Anal Biochem.** v. 1, n. 218, p. 377-81, 1994.

CLAYDEN, J.; GREEVES, N.; WARREN, S. **Organic Chemistry**. Oxford University Pres, 2^a ed., 2012.

CONGIU, Cenzo; ONNIS, Valentina. Synthesis and biological evaluation of novel acylhydrazone derivatives as potential antitumor agents. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 21, n. 21, p. 6592-6599, 2013.

COSTA, F. N., et al. Structural feature evolution—from fluids to the solid phase—and crystal morphology study of LASSBio 1601: a cyclohexyl-N-acylhydrazone derivative. **RSC Advances**, v. 5, n. 50, p. 39889-39898, 2015.

COSTA, K. C., et al. Avaliação *in-vitro* e *in-vivo* do potencial fotoprotetor e fotoquimioprotetor da fração purificada de *Ingá edulis* (Ingá). Dissertação (Mestrado) **Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto** – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. p. 2-11, 2015.

CUNHA, M. R., et al. Environmentally safe condition for the synthesis of aryl and alkyl sulfonyl hydrazones via one-pot reaction. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**. v. 4, n. 4, p. 1899-1905, 2016.

DAVIES, M. J. Myeloperoxidase-derived oxidation: mechanisms of biological damage and its prevention. **J Clin Biochem Nutr**. v. 48, n.1, p.8-19, 2011

DE OLIVEIRA, K. N., et al. Synthesis and antidepressant-like activity evaluation of sulphonamides and sulphonyl-hydrazones. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 19, n. 14, p. 4295-4306, 2011.

DENG, J. G., et al. The Cu/ligand stoichiometry effect on the coordination behavior of aroyl hydrazone with copper (II): Structure, anticancer activity and anticancer mechanism. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 24, n. 10, p. 2190-2198, 2016.

DI GIOVANNI, S., et al. In vitro screening assays to identify natural or synthetic acetylcholinesterase inhibitors: Thin layer chromatography versus microplate methods. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 33, p. 109-119, 2008.

ELLMAN, G. L. et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical pharmacology**, v. 7, n. 2, p. 88-95, 1961.

ESTEBAN, G., et al. A therapeutic approach to cerebrovascular diseases based on indole substituted hydrazides and hydrazines able to interact with human vascular adhesion protein-1, monoamine oxidases (A and B), AChE and BuChE. **Journal of Neural Transmission**, v. 120, n. 6, p. 911-918, 2013.

FERRARESI-CUROTTO, V. et al. Synthesis and characterization of a series of isoniazid hydrazones. Spectroscopic and theoretical study. **Journal of Molecular Structure**, v. 1133, p. 436-447, 2017.

FERREIRA, S. B. Importância e métodos de preparação de substâncias contendo o grupo difluorometileno. **Revista Virtual de Química**, v. 1, n. 2, p. 160-169, 2009.

FURTMULLER, P. G., et al. Active site structure and catalytic mechanisms of human peroxidases. **Arch. Biochem. Biophys**, v. 445, n. 2, p. 199-213, 2006.

FURTMÜLLER, P. G.; BURNER, U.; OBINGER, C. Reaction of myeloperoxidase compound I with chloride, bromide, iodide, and thiocyanate. **Biochemistry**. v. 37, n. 51, p.17923-30, 1998.

GALIJASEVIC, S. The development of myeloperoxidase inhibitors. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**. v. 29, n.1, 2019.

GORECKI, L., et al. SAR study to find optimal cholinesterase reactivator against organophosphorous nerve agents and pesticides. **Arch Toxicol**. v. 90, p. 2831–2859, 2016.

GRÁFICO Lineweaver-Burk. In: WIKIPÉDIA: a enciclopédia livre, 2022. Disponível em: https://en.wikipedia.org/wiki/Lineweaver%E2%80%93Burk_plot. Acesso em: 28 dez. 2022.

GREEN, P., et al. Neuronal expression of myeloperoxidase is increased in Alzheimer's disease. **Journal of Neurochemistry**. v. 90, pp. 724-733, 2004.

GUIMARÃES, D. G., et al. Investigação do Potencial Biológico de Hidrazonas Obtidas Sinteticamente na Última Década (2006-2016): Uma Revisão Sistemática. **Rev. Virtual Quim**. v. 9, n. 6, p. 2551-2592, 2017.

HADJIPAVLOU-LITINA, D., et al. Analysis of the antioxidant properties of differently substituted 2-and 3-indolyl carbohydrazides and related derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 63, p. 670-674, 2013.

HANSON, S.; NORDVALL, G.; TIDEN, A. Preparation of xanthinethione derivatives as myeloperoxidase inhibitors. **USA Patent**. v. 30, n. 10, 2003.

HARTMAN, C.; FORD, D. MPO (Myeloperoxidase) Caused Endothelial Dysfunction. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**. v. 38; p. 1676–1677, 2018.

HOLTMANN, D., et al. The taming of oxygen: biocatalytic oxyfunctionalisations. **Chem Commun (Camb)**. v. 50, n. 87, p. 13180-200, 2014.

IBRAHIM, M., et al. Sulfonylbis (acylhydrazones) as anticholinesterase inhibitors: Synthesis, in vitro biological evaluation and computational studies. **Journal of Molecular Structure**, p. 132215, 2021.

ILLANES, A., et al. Enzyme Biocatalysis: Principles and Applications. **Springer-Verlag New York Inc.**, p. 1-56, 2008.

INOUE, K.; OLIVEIRA, G. H. Avaliação crítica do tratamento farmacológico atual para Doença de Alzheimer. **Infarma**. v. 15, n. 80, 2004.

INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY. *Hydrazones*. 2014. Disponível em: <<https://goldbook.iupac.org/terms/view/H02884>>.

JESUS, R. P., et al. Myeloperoxidase Inhibitors as Anti-Inflammatory Drug Candidates. v. 14, n. 4, p.1-14, 2022.

KANWAL, K. K., et al. Indole-3-acetamides: As Potential Antihyperglycemic and Antioxidant Agents; Synthesis, *In Vitro* α -Amylase Inhibitory Activity, Structure-Activity Relationship, and *In Silico* Studies. **ACS Omega**. v.27, n.71. p.1541, 2021.

KARIYA, K., et al. Purification and some properties of peroxidases of rat bone marrow. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology**. v.911, n.1, p. 95-101, 1987.

KETTLE, A. J., et al. Measuring chlorine bleach in biology and medicine. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**. v. 1840, n. 2, p. 781-793, 2014.

KHANMOHAMMADI, H., et al. Synthesis, biological and computational study of new Schiff base hydrazones bearing 3-(4-pyridine)-5-mercapto-1, 2, 4-triazole moiety. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 71, n. 4, p. 1474-1480, 2008.

KNOPMAN, D. S., et al. Alzheimer disease. **Nat Rev Dis Primers**. v. 7, n. 1, p. 33, 2021.

LAZAREVIC-PASTI, T., et al. Modulators of Acetylcholinesterase Activity: From Alzheimer's Disease to Anti-Cancer Drugs. **Curr Med Chem**. v. 24, n. 30, p. 3283-3309, 2017.

LAZAREVIC-PASTI, T.; LESKOVAC, A.; VASIC, V. Myeloperoxidase Inhibitors as Potential Drugs. **Current Drug Metabolism**. v. 16, n. 3, pp. 168-190, 2015.

LEMES, E. O. Síntese de derivados β -cetoindois e avaliação da inibição da acetilcolinesterase. Dissertação de Mestrado no **Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências Aplicadas a Produtos para a Saúde da Universidade Estadual de Goiás**: UEG – Goiás, Brasil. p.41-43, 2018.

LIEBERMAN, M., MARKS, A. D., SMITH, C. M. Marks' basic medical biochemistr: a clinical approach. **Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins**. n. 3, 2009.

LINS, P. G. **Atividade antioxidante in vitro de extrato de folhas de oliveira (Olea europaea L.) e seu efeito protetor sobre danos oxidativos em eritrócitos humanos**. 2015. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

LOKE, W. M., et al. Quercetin and it's in vivo metabolites inhibit neutrophil-mediated low-density lipoprotein oxidation. **Journal of agricultural and food chemistry**. v. 56, n. 10, p. 3609-3615, 2008.

LU, SH., et al. The discovery of potential acetylcholinesterase inhibitors: A combination of pharmacophore modeling, virtual screening, and molecular docking studies. **J Biomed Sci**. v.18, n. 8, 2011.

MALLE, E., et al. Myeloperoxidase: A target for new drug development? **British Journal of Pharmacology**. v.152, n. 838, 2007.

MARTINS, A.B., et al. Concentração e atividade sérica da mieloperoxidase em indivíduos Tabagistas. Dissertação de Mestrado no **Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia aplicada à Farmácia**: Araraquara - São Paulo, Brasil. p. 14-23, 2010.

McHARDY, S. F.; WANG, H. L.; McCOWEN, S. V.; VALDEZ, M. C. Recent advances in acetylcholinesterase Inhibitors and Reactivators: an update on the patent literature (2012-2015). **Expert Opin Ther Pat**. v. 27, n. 4, p. 455-476, 2017.

MIETHCHEN, R. Modified natural substances—fluorinated and fluoroalkylated monosaccharides and inositols. **Journal of fluorine chemistry**, v. 125, n. 6, p. 895-901, 2004.

NAGATSU, T.; SAWADA, M. Inflammatory process in Parkinson's disease: role for cytokines. **Current Pharmaceutical Design**. v. 11, n. 8, p. 999-1016, 2005.

NAUSEEF, W. M. Myeloperoxidase in human neutrophil host defence. **Cellular Microbiology**. v. 16, n. 8, p. 1146–1155, 2014.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Princípios de bioquímica de Lehninger. 7 Porto Alegre: **Artmed**, 7 Ed. p. 1278, 2019.

OKADA, S. S., et al. Myeloperoxidase in human peripheral blood lymphocytes: Production and subcellular localization. **Cellular Immunology**. v. 300, p. 18–25, 2016.

PERRY, V. H. The influence of systemic inflammation on inflammation in the brain: implications for chronic neurodegenerative disease. **Brain Behav. Immun.** v. 18, pp. 407–413, 2004.

PETRONILHO DA C. E.; PINTO, A. C.; VILLAR, J. D. F. Acetilcolinesterase: Alzheimer e GUERRA QUÍMICA. **Ciência e Tecnologia**. v.3, 2011.

PODREZ, E. A.; ABU-SOUD, H. M.; HAZEN, S. L. Myeloperoxidase-generated oxidants and atherosclerosis. **Free Radical Biology and Medicine**. v.15, n. 1717, 2000.

POHANKA, M. Inhibitors of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase meet immunity. **Int J Mol Sci**. v. 15, n. 6, p. 9809-25, 2014.

POPIOŁEK, L. The bioactivity of benzenesulfonyl hydrazones: A short review. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. v. 141, 2021.

RAY, R. S.; KATYAL, Anju. Myeloperoxidase: bridging the gap in neurodegeneration. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**. v. 68, p. 611-620, 2016.

ROMAN, R. M. Valor prognóstico da mieloperoxidase na doença arterial coronariana. Dissertação de Mestrado no **Programa de Pós-Graduação em Cardiologia e Ciências Cardiovasculares**: UFRGS – Rio Grande do Sul, Brasil. p. 8-18, 2006.

SANTOS, D. C. et al. Acylhydrazones as isoniazid derivatives with multi-target profiles for the treatment of Alzheimer's disease: Radical scavenging, myeloperoxidase/acetylcholinesterase inhibition and biometal chelation. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v. 28, n. 10, p. 115470, 2020.

SEGAL, A. W. How Neutrophils Kill Microbes. **Annual Review of Immunology**. v. 23, p. 197–223, 2005.

SEMIRA, G. The development of myeloperoxidase inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. v.29, n. 1, p.1-7, 2019.

SERENIKI, A; VITAL, M. B. F. Alzheimer's disease: pathophysiological and pharmacological features. **Revista de Psiquiatria do Rio Grande do Sul**, v. 30, 2008.

SHAFFERMAN, A. et al. Functional requirements for the optimal catalytic configuration of the AChE active center. **Chemico-Biological Interactions**, Limerick, v. 157/158, p. 123-131, 2005.

SHAH, M. S. et al. Cholinesterases inhibition and molecular modeling studies of piperidyl-thienyl and 2-pyrazoline derivatives of chalcones. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 482, n. 4, p. 615-624, 2017.

SHARMA, R. (Ed.). Enzyme inhibition and bioapplications. **BoD–Books on Demand**, 2012.

SHIBA, Y. et al. Flavonoids as substrates and inhibitors of myeloperoxidase: molecular actions of aglycone and metabolites. **Chemical research in toxicology**. v. 21, n. 8, p. 1600-1609, 2008.

SILMAN, I.; SUSSMAN, J. L. Acetylcholinesterase: “Classical” and “Non-classical” Functions and Pharmacology. **Current Opinion in Pharmacology**. v. 293, n. 5, 2005.

SOREQ, H.; SEIDMAN, S. Acetylcholinesterase-new roles for an old actor. **Nat Rev Neurosci**. v.2, n.9, p.670, 2001.

SOUBHYE, J. et al. 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., et al. From Dynamic Combinatorial Chemistry to in Vivo Evaluation of Reversible and Irreversible Myeloperoxidase Inhibitors. **ACS Medicinal Chemistry Letters**. v. 8, n. 206, 2017.

SREEKANTH, T., et al. N-Acylhydrazones as drugs. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 28, n. 17, p. 2797-2806, 2018.

STAMP, L. et al. Myeloperoxidase and oxidative stress in rheumatoid arthritis. **Rheumatology**. v. 51, n. 10, p. 1796–1803, 2012.

TEIXEIRA, J.; GASPAR, A.; GARRIDO, E.; GARRIDO, J.; BORGES, F. Hydroxycinnamic acid antioxidants: an electrochemical overview (2013). **Biomed Research International**. p.1-11, 2013.

TENG, N. et al. The roles of myeloperoxidase in coronary artery disease and its potential implication in plaque rupture. **Redox Report**. v. 22, n. 2, p. 51-73, 2017.

UNDURTI, A., et al. Modification of high density lipoprotein by myeloperoxidase generates a pro-inflammatory particle. **J Biol Chem**. v. 284, p. 30825–30835, 2009.

VAN DALEN, J. Christine et al. Thiocyanate and chloride as competing substrates for myeloperoxidase. **Biochemical Journal**, v. 327, n. 2, p. 487-492, 1997.

VAN NIEUWENHOVEN, F. A.; TURNER, N. A. The role of cardiac fibroblasts in the transition from inflammation to fibrosis following myocardial infarction. **Vascular Pharmacology**. v. 58, n. 3, p. 182-188, 2013.

WARD, J., et al. Mechanistic characterization of a 2-thioxanthine myeloperoxidase inhibitor and selectivity assessment utilizing click chemistry–activity-based protein profiling. **Biochemistry**. v. 52, n. 51, p. 9187-9201, 2013.

WESTFALL, T. C.; WESTFALL, D. P. GOODMAN & GILMAN. As bases farmacológicas da terapêutica, 10a. Ed.; Brunton, L. L.; Lazo, J. S.; Parker, K. L., eds.; Mc Graw Hill, 2006, cap. 6.

WHITELEY, C. G. Mechanistic and kinetic studies of inhibition of enzymes. **Cell Biochem Biophys**. v. 33, n. 3, p.217-25, 2000.

WINTERBOURN, C. C.; KETTLE, A. J.; HAMPTON, M. B. Reactive oxygen species and neutrophil function. **Annu Rev Biochem**. v. 85, n. 1, p. 765-792, 2016.

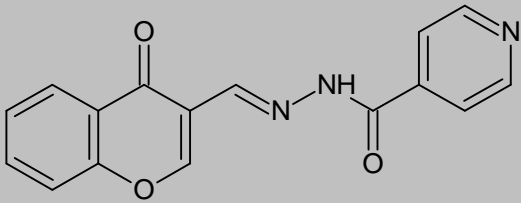
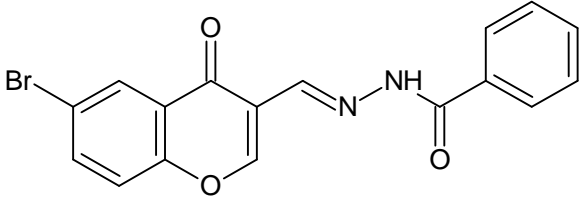
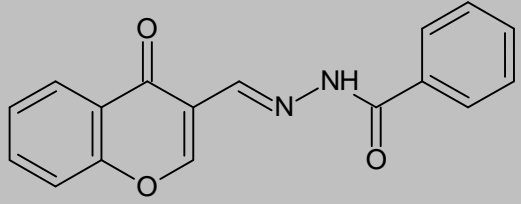
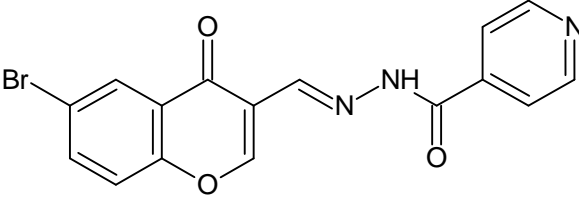
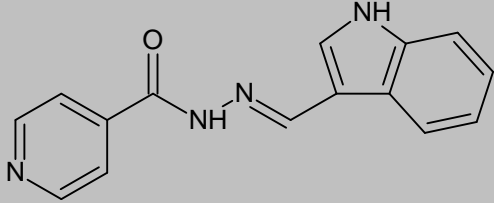
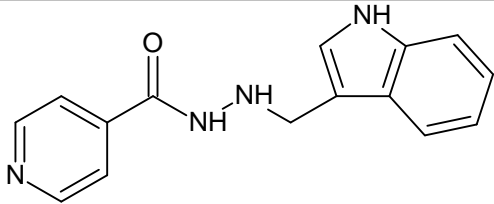
YU, X.; SHI, L.; KE, S. Acylhydrazone derivatives as potential anticancer agents: Synthesis, bio-evaluation and mechanism of action. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 25, n. 24, p. 5772-5776, 2015.

YVES, C. Oxidative stress and Alzheimer disease. **Am. J. Clin. Nutr.** v.71, p. 621–629, 2000.

ZIA, M. et al. Síntese, estrutura e atividade inibidora da acetilcolinesterase de novos diarilpirazóis. **Bioorganic Chemistry**. v. 121, p. 105658, 2022.

8. ANEXOS

Anexo 1. Substâncias contendo os núcleos 3-indolil (LCSO13 e LCSO13 Red.) e 3-cromonil (LCSO11, LCSO142, LCSO148 e LCSO160) avaliadas farmacologicamente.

Nome	Estrutura química	Peso molecular (g.Mol ⁻¹)
LCSO11		293,27
LCSO142		371,18
LCSO148		292,28
LCSO160		371,17
LCSO13		264,28
LCSO13 Red.		266,28