



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CAMPUS I
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO FARMÁCIA
CURSO DE FARMÁCIA**

JANIELY BRENDA DE SOUZA ALMEIDA

**ESTUDO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA “IN SILICO” E TOXICIDADE DO
DERIVADO N-ACILHIDRAZÔNICO SUBSTITUIDO: N'-2-CIANO-(4-
(METILSULFONIL- BENZILIDENO) - ACETOHIDRAZIDA (JR04)**

CAMPINA GRANDE

2021

JANIELY BRENDA DE SOUZA ALMEIDA

**ESTUDO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA “IN SILICO” E TOXICIDADE DO
DERIVADO N-ACILHIDRAZÔNICO SUBSTITUIDO: N'-2-CIANO-(4-
(METILSULFONIL- BENZILIDENO) - ACETOHIDRAZIDA (JR04)**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Departamento de
Farmácia da Universidade Estadual da
Paraíba, como requisito para obtenção do
título de Farmacêutico.

Área de concentração: Farmácia.

Orientador: Prof. Dra. Vanda Lucia dos Santos

CAMPINA GRANDE-PB

2021

É expressamente proibido a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano do trabalho.

A447a Almeida, Janiely Brenda de Souza.

Estudo da atividade anti-inflamatória "in silico" e toxicidade do derivado n-acilhidrazônico substituído [manuscrito] : n'-2-ciano-(4-(metilsulfonil-benzilideno)-acetohidrazida (JR04) / Janiely Brenda de Souza Almeida. - 2021.

47 p. : il. colorido.

Digitado.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2021.

"Orientação : Profa. Dra. Vanda Lucia dos Santos , Coordenação do Curso de Farmácia - CCBS."

1. Inflamação. 2. Docking molecular. 3. Hidrazonas. I.

Título

21. ed. CDD 615.1

JANIELY BRENDA DE SOUZA ALMEIDA

**ESTUDO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA “IN SILICO” E TOXICIDADE DO
DERIVADO N-ACILHIDRAZÔNICO SUBSTITUIDO: N'-2-CIANO-(4-
(METILSULFONIL- BENZILIDENO) - ACETOHIDRAZIDA (JR04)**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Departamento de
Farmácia da Universidade Estadual da
Paraíba, como requisito para obtenção do
título de Farmacêutico.

Área de concentração: Farmácia

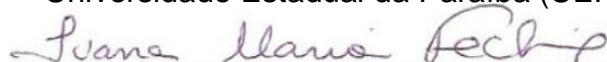
Aprovada em: 23/09/2021

BANCA EXAMINADORA



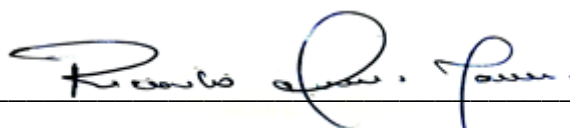
Profa.Dra. Vanda Lucia dos Santos (Orientadora)

Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Profa.Dra. Ivana Maria Fechine

Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Prof.Dr. Ricardo Olimpio de Moura

Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

DEDICATÓRIA

A Nossa Senhora e a Deus que por meio de sua intercessão me concedeu chegar até aqui, a minha mãe e minha família por todos os esforços e incentivos que me foram dados, DEDICO.

AGRADECIMENTOS

A nossa senhora por me ajudar a chegar até aqui e a Deus por me amparar durante esses 9 anos de começos e recomeços, sem eles não sou nada.

Aos meus pais, Janete e José por acreditarem em mim, em especial a minha mãe, pois foi e é minha fortaleza nas horas mais difíceis em que me encontrei, aqui agradeço cada incentivo, puxões de orelhas e carinhos.

A toda minha família, tios e avós que me ampararam no momento mais difícil em que me encontrei sozinha e isolada em meio a uma pandemia, jamais esquecerei o quanto foram e são importantes para mim, pois sem vocês não teria conseguido chegar aqui. Agradeço também todo o apoio e incentivo recebido.

Aos meus amigos de graduação em especial Ellicy Micaely, Lucas Rocha, Gabryella Guedes, Maurício Matheus, Hiam Pinheiro, Fábio Pachú, Luana Noblat, Any Farias, Yorrana Araújo, Priscilla Brito, Lethycia Barros. A vocês agradeço pela amizade, companheirismo e por serem mais do que amigos verdadeiros irmãos, souberam partilhar além do conhecimento toda essência de uma amizade e união.

À minha orientadora, profa. Dra. Vanda Lucia Santos agradeço por ter dado a oportunidade e me acolhido no laboratório, por ter me ensinado a trabalhar em grupo e a cuidar dos animais além de por diversas vezes ter compreendido e acolhido com calma as minhas dúvidas e sempre ter apoiado cada sonho e conquista, sou muito grata.

Aos meus colegas de laboratório que acompanharam cada etapa deste trabalho, agradeço pela colaboração e por deixarem mais leve nossos encontros de pesquisa Fábio Pachú, Yasmin, Allan, Thássia, Vanessa, Rayane e Naara.

Agradeço aos colegas mestrandos e doutorandos Cris, Renally, Pablo, Daniella, Sonally e Joilly por repassarem seus conhecimentos e sua disposição em ensinar.

Agradeço a Universidade Estadual da Paraíba, ao ensino público e à Ciência!

Para tudo há uma ocasião certa; há um tempo certo para cada propósito debaixo do céu: Tempo de nascer e tempo de morrer, tempo de plantar e tempo de arrancar o que se (...)

(ECLESIASTES III)

RESUMO

ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA “IN SILICO” E TOXICIDADE DO DERIVADO N-ACILHIDRAZÔNICO SUBSTITUIDO: N’-2-CIANO-(4-(METILSULFONIL-BENZILIDENO) - ACETOHIDRAZIDA (JR04)

¹Janiely Brenda de Souza Almeida; ²Vanda Lucia dos Santos

^{1,2}Universidade Estadual da Paraíba-UEPB

¹janielybrendasouza@gmail.com

A inflamação é uma resposta de defesa à estimulação, onde possui características como vermelhidão, inchaço, calor, dor e disfunção. Compostos que atuam modulando a atividade das enzimas COXs são compostos promissores no combate a inflamação, a exemplo dos derivados N-acilhidrazônicos que mostram ser eficazes em modelos clássicos de inflamação tendo despertado o interesse dos pesquisadores. Este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade anti-inflamatória e predições farmacocinéticas *in silico* e toxicidade *in vitro* e *in vivo* do composto N’-2-Ciano - (4 - (Metilsulfonil-Benzilideno) - Acetohidrazida (JR04). Inicialmente foi realizado o estudo de *docking* molecular do composto JR04 utilizando Discovery Studio Visualizer 2017, nas estruturas das isoformas de cicloxigenase (COXs). As predições farmacocinéticas foram realizadas utilizando a plataforma *Swiss ADME*. Em seguida foi avaliada a toxicidade aguda não clínica de dose única (procedimento aprovado pelo CEUA/CESED sob o nº5905022016) e a citotoxicidade em eritrócitos. O resultado *in silico* mostrou que o JR04 interage de forma inespecífica com o sítio catalítico das COXs, onde apresentou energia livre de ligação (-8.55 Kcal/mol) com menor afinidade para isoforma COX-2 quando comparado com o celecoxibe (-11.04 Kcal/mol). Na isoforma COX-1 o JR04 apresenta maior afinidade com energia livre de ligação (-11.32 Kcal/mol) comparado com o celecoxibe (-8.42 Kcal/mol). Assim, JR04 mostrou maior afinidade pela COX 1, pois quanto menor a energia de ligação maior a afinidade com o alvo. De acordo com os resultados obtidos com as predições farmacocinéticas foi possível observar que o JR04 possui propriedades moleculares desejáveis quando relacionamos aspectos ligados à absorção e permeabilidade em membranas biológicas, e que possui TPSA abaixo de $140(A^\circ)^2$ e ABS entre 71,82% indicando boa absorção gastrointestinal. No ensaio de toxicidade aguda nenhuma morte foi registrada e não foram evidenciados sinais clínicos relevantes, mas foi observado pequenas lesões ulcerativas gástricas em concordância com a afinidade pela COX 1 mostrada *in silico*. Quanto à atividade hemolítica o composto apresentou baixa atividade (2,16% de hemólise). Dessa forma, o composto JR04 mostrou segurança quanto ao seu uso, podendo contribuir para validação do potencial biológico desse derivado, tornando-o candidato a fármaco anti-inflamatório.

Palavras Chaves: Inflamação. *Docking* molecular. Hidrazona.

ABSTRACT

STUDY OF THE ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY OF THE SUBSTITUTED N-ACYLHYDRAZONE DERIVATIVE: N'-2-CYAN-(4-(METHYLSULFONYL-BENZYLIDENE) - ACETOHYDRAZIDE (JR04)

¹Janiely Brenda de Souza Almeida; ²Vanda Lucia dos Santos

^{1,2}Universidade Estadual da Paraíba-UEPB

¹janielybrendasouza@gmail.com

Inflammation is a defense response to stimulation, where it has characteristics such as redness, swelling, warmth, pain, and dysfunction. Compounds that act modulating the activity of COX enzymes are promising, compounds to combat inflammation, such as the N-acylhydrazonic derivatives that show to be effective in classical models of inflammation, having aroused the interest of researchers. This work aimed to evaluate the *in silico* anti-inflammatory activity and pharmacokinetic predictions, and *in vitro* and *in vivo* toxicity of the compound N'-2-Cyano - 4 - (Methylsulfonyl-Benzylidene) - Acetohydrazide (JR04). Initially, a molecular *docking* study of compound JR04 using Discovery Studio Visualizer 2017 was performed on the structures of cyclooxygenase isoforms (COXs). Pharmacokinetic predictions were performed using the SwissADME platform. Then single-dose acute non-clinical toxicity (procedure approved by CEUA/CESED number 5905022016) and cytotoxicity in erythrocytes were evaluated. The *in silico* result showed that JR04 interacts nonspecifically with the catalytic site of COXs, where it showed binding free energy (-8.55 Kcal/mol) with lower affinity for COX-2 isoform when compared with celecoxib (-11.04 Kcal/mol). In COX-1 isoform, JR04 showed a higher affinity with binding free energy (-11.32 Kcal/mol) compared to celecoxib (-8.42 Kcal/mol). Thus, JR04 showed a higher affinity for COX-1 because the lower the binding energy, the higher the affinity for the target. According to the results obtained with the pharmacokinetic predictions, it was possible to observe that JR04 has desirable molecular properties when we relate aspects linked to absorption and permeability in biological membranes and has TPSA below $140(\text{Å})^2$ and ABS between 71.82% indicating good gastrointestinal absorption. In the acute toxicity assay no death was recorded and no relevant clinical signs were evident, but small gastric ulcerative lesions were observed in agreement with the affinity for COX-1 shown *in silico*. As for the hemolytic activity, the compound showed low activity (2.16% of hemolysis). Thus, the compound JR04 showed safety for its use and can contribute to the validation of the biological potential of this derivative, making it a candidate for an anti-inflammatory drug.

Keywords: Inflammation. *Docking* molecular. Hydrazone.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Via de Metabolismo do Ácido Araquidônico.....	17
Figura 2 - Classificação dos anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) com base na estrutura.....	19
Figura 3 - Reação geral de formação de uma Hidrazona.....	22
Figura 4 - Mecanismo de reação de formação de hidrazonas via catálise ácida.....	23
Figura 5 - Estrutura do JR04.....	25
Figura 6 - Representação 2D das interações entre o composto JR04 (A) e o ligante CEL (B) com o alvo COX-1.....	34
Figura 7 - Representação 2D das interações entre o composto JR04 (A) e o ligante CEL (B) com o alvo COX-2.....	36
Figura 8 – Correlação entre WlogP e TPSA, na forma de BOILED-Egg para o JR04.....	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Atividades biológicas dos derivados hidrazônicos.....	24
Tabela 2 - <i>Redocking</i> molecular como método de validação do estudo (PDB ID 3KK6).....	32
Tabela 3 - <i>Docking</i> molecular com JR04 no alvo COX-1 (PDB ID 3KK6).....	32
Tabela 4 - <i>Redocking</i> molecular como método de validação do estudo (PDB ID 3LN1).....	35
Tabela 5 - <i>Docking</i> molecular com JR04 no alvo COX-2 (PDB ID 3LN1).....	36
Tabela 6 - Estudos de ADME.....	37
Tabela 7 - Consumo de água e ração e evolução ponderal, dos animais tratados com JR04.....	40
Tabela 8 - Peso relativo dos órgãos de camundongos tratadas com JR04.....	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg	microgramas
2D	2 dimensões
AA	ácido araquidônico
ABS	absorção
ADME	Absorção Distribuição Metabolismo Excreção
AINEs	anti inflamatórios não esteroidais
ALH	aceptores de hidrogênio
CEL	Celecoxibe
CESED	Centro de Ensino Superior e Desenvolvimento
CEUA	Comitê de Ética em Uso Animal
cLogP	coeficiente de lipofilicidade
CONCEA	Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal
COX	Ciclooxigenase
CYP450	citocromo P450
DCV	Doença crônica vascular
DLH	doadores de hidrogênio
DTT	1,2-ditiol-3-tionas
E.P.M.	erro padrão das médias
H ₂ S	sulfeto de hidrogênio
HS-AINE	AINEs liberadores de sulfeto de hidrogênio
Kcal	Kilocalorias
Kg	Kilogramas

LAC laboratório de análises clínicas

LogS logaritmo S

LOX lipoxigenase

Mg Miligramas

mL mililitros

MM2 mecânica molecular

MOL molecular

Nm constante de afinidade

NO Óxido nítrico

OECD Diretrizes da Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico

PAF fator de ativação plaquetária

PDB Protein Data Bank

PG prostaglandina

PGHS prostaglandina-H sintases

RMSD (root-mean-square-deviation)

RPM rotação por minutos

TNF fator de necrose tumoral

TPSA Topological Polar Surface Area

V.O. via oral

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	14
2.1	Objetivo Geral	14
2.2	Objetivos Específicos	14
3	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	15
3.1	Processo inflamatório	15
3.2	Anti-inflamatórios não esteroidais	17
3.3	Desenvolvimento dos AINEs	19
3.4	Derivados acilhidrazônicos: síntese e propriedades biológicas	20
3.5	Docking Molecular	24
4	Metodologia	26
4.1	Obtenção do composto e Local da Pesquisa	26
4.2	Animais e Procedimentos éticos	26
4.3	Ensaio de modelagem molecular in silico	26
4.4	Estudos farmacocinéticos in silico	27
4.5	Ensaio de Citotoxicidade	28
4.6	Preparo da substância	28
4.7	Toxicidade aguda	28
4.8	Análise estatística	29
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
5.1	Docking Molecular do alvo COX- 1	30
5.2	Docking Molecular do alvo COX- 2	34
5.3	Estudos farmacocinéticos in silico	36
5.4	Citotoxicidade	38
5.5	Toxicidade Aguda	38
6	CONCLUSÃO	41
	REFERÊNCIAS	42
	ANEXO 1	47

1 INTRODUÇÃO

A inflamação é uma resposta defensiva à estimulação, caracterizada por vermelhidão, inchaço, calor, dor e disfunção. Em geral, quando de curto prazo a inflamação é benéfica sendo uma resposta de defesa automática do corpo humano, mas também pode ser prejudicial quando ataca o próprio tecido do corpo, persiste e se transforma em crônica (DE LAVOR, 2018).

As terapias farmacológicas empregadas no tratamento clínico das doenças inflamatórias englobam os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) e esteroidais (AIEs)(WANG *et al* 2019).Estudos recentes apontam os AINEs como os medicamentos mais eficazes para o tratamento da dor associada à crise de cálculo renal, sendo superior inclusive aos opióides (PATAN; MITRA; CAMERON, 2018).

A ação farmacológica dos AINEs depende da dose e do tempo utilizado, o que predispõe acometimento de órgãos específicos, os efeitos colaterais mais importantes dos AINEs ocorrem no aparelho gastrointestinal, sendo o segundo mais acometido o rim (BATLOUNI, 2010; WEHLING, 2014). Além das complicações renais, os AINES podem ocasionar alteração gastrointestinal (perfuração e ulceração gástrica), hepática (cirrose), cardiovascular e plaquetário (eventos trombóticos), corroborando para cautela e indicações adequadas na sua prescrição (KUMMER; COELHO, 2002 *apud* CAVALCANTI *et al.*,2019).

Uma vez que os AINEs estão associados a toxicidades graves, novas abordagens ou estratégias alternativas foram adotadas para diminuir os efeitos colaterais tóxicos sem comprometer seus efeitos benéficos à saúde (PEESA, 2016). Baseando-se nas estratégias de bioisosterismo, algumas séries de N-acilhidrazonas foram sintetizadas e avaliadas farmacologicamente, de forma a permitir o estudo das relações entre a estrutura química e suas respectivas atividades biológicas (FONTENELE, 2020).

Diante disto, o presente estudo visa analisar a atividade anti-inflamatória do derivado N-acilhidrazônico (JR04), através de ancoragem molecular, bem como avaliar sua toxicidade *in vitro* e *in vivo* utilizando testes em células sanguíneas e em modelos animais.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a atividade anti-inflamatória *in silico*, predição farmacocinética e toxicidade do composto N'-2-Ciano - (4 - (Metilsulfonil-Benzilideno) - Acetohidrazida (JR04).

2.2 Objetivos Específicos

- Realizar ensaios *in silico* de modelagem molecular para demonstrar possível interação da molécula JR04 com a COX e prever parâmetros farmacocinéticos;
- Realizar ensaio de citotoxicidade do composto;
- Determinar a toxicidade *in vivo* do composto.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Processo inflamatório

O processo inflamatório é uma reação natural do organismo a danos, injúria ou lesões teciduais devidas à presença de um corpo estranho, trauma (mecânico, químico ou térmico), infecções, reações imunológicas e necrose tecidual. Esta resposta está associada à liberação de substâncias químicas como as citocinas e quimiocinas (TNF- α , lipoxinas, cininas, prostaglandinas, leucotrienos) e proteínas de sinalização celular no ambiente tecidual e células migratórias com a função de bloquear, inativar ou eliminar o agente causador (LAMONTAIN *et al*, 2019).

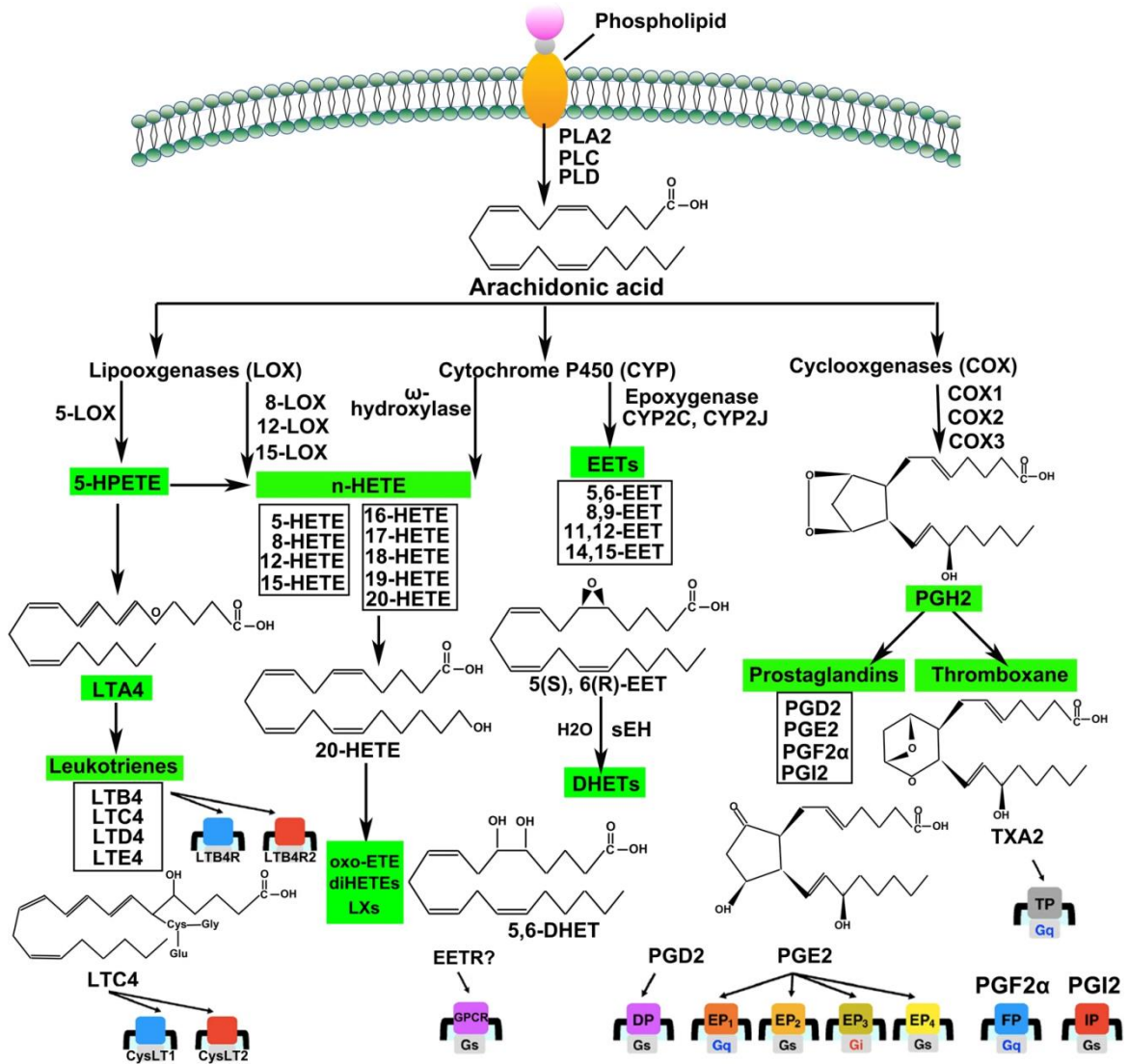
A inflamação aguda é classificada de acordo com as características do exsudato, com o tipo, duração e intensidade da agressão. Os mediadores envolvidos no processo agudo são as aminas vasoativas, metabólitos do ácido araquidônico, que incluem as prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos, o fator de ativação plaquetária (PAF), quimiocinas, fator de necrose tumoral (TNF), e citocinas, com as interleucinas (IL) IL-1 β , IL-6 e IL-18. Este processo é, na realidade, uma complexa resposta fisiológica do organismo para neutralizar, inativar e eliminar o agente causador da inflamação, substituindo os tecidos danificados por fibrose, culminando com o reparo tecidual e bloqueio da resposta inflamatória (SINGH *et al*, 2016).

A inflamação crônica é caracterizada pela ocorrência simultânea da ativação inflamatória e destruição tecidual. Em geral, o processo inflamatório crônico evolui gradualmente, sendo dependendo do tempo da injúria, permanência do agressor e persistência de sucessivas inflamações agudas e da dificuldade do organismo em eliminar o dano tecidual ou celular, evoluindo e exacerbando a congestão, o aumento da permeabilidade vascular e a produção de exsudato inflamatório, juntamente com a produção de linfócitos (VERDAM *et al*, 2017).

Uma vez instalada a lesão tecidual, a liberação de mediadores inflamatórios e a degradação dos fosfolípidios de membrana ativam a produção de ácido araquidônico (AA), que passa a ser o substrato de enzimas, gerando as diferentes famílias de eicosanóides, por duas vias distintas (Figura 1). Em uma primeira via, o AA é substrato das prostaglandina-H sintases (PGHS), também conhecidas como cicloxigenases (COX), sofrendo ciclização e levando à formação em cascata de

diversas prostaglandinas (PGs), além dos tromboxanos A2 e B2. Em uma segunda via metabólica, o AA é alvo da ação da lipoxigenase (LOX), gerando uma série de leucotrienos (GUSTAFSON *et al*, 2009; SINGH *et al*, 2016; PRASHER *et al*, 2019).

Figura 1 - Via de Metabolismo do Ácido Araquidônico.



Fonte: Wang, B. *et al.*(2021)

Uma vez produzidos, os eicosanóides participam do aparecimento e progressão dos sinais cardinais da inflamação aguda, condição em que as prostaglandinas exercem uma vasta gama de funções em diferentes processos fisiológicos e patológicos, incluindo vasodilatação ou vasoconstrição, resposta imunológica e hiperalgesia (COUTINHO; MUZITANO; COSTA, 2009).

Existem três tipos de COX: COX-1, COX-2 e COX-3. As mais estudadas são a COX-1 e COX-2, uma vez que a COX-3 só foi descoberta posteriormente (GELLER *et al.*, 2012).

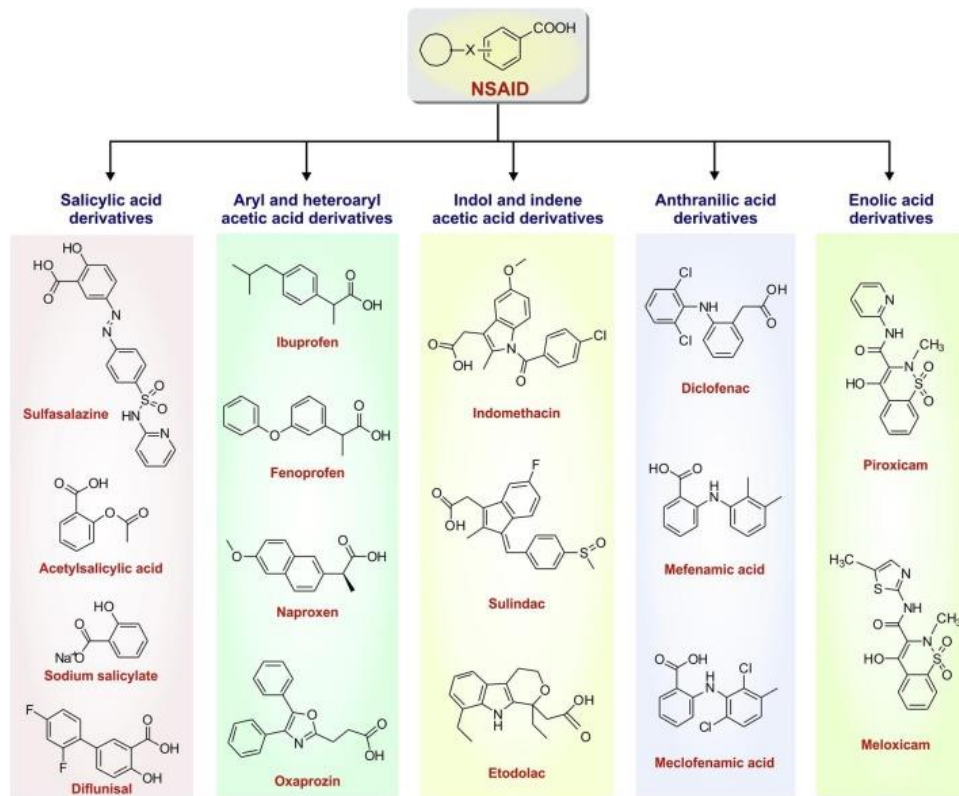
A isoforma COX-1 é constitutiva e se encontra nos tecidos, enquanto a COX-2 é encontrada em casos de inflamações. A COX-1 é fundamental para manter o estado de homeostase, e tem função de proteger a mucosa gastrointestinal, fluxo sanguíneo renal, respostas autoimunes, funções pulmonares e do sistema nervoso central, cardiovasculares e reprodutivas. A COX-2 é induzida pela inflamação, e assim tem-se ação de citocinas, endotoxinas e reprodutivas. Além disso, pode estar presente em vários tecidos durante condições fisiológicas, inclusive em células vasculares. Existem estudos que confirmam a existência de uma isoforma COX-3, mas ainda sem detalhes significativos (ROMAINE; LOUREIRO; DA SILVA, 2021; MENDES, 2012).

Os AINEs são ótimos fármacos para tratar os efeitos indesejáveis da inflamação. Eles agem amenizando o edema, a hiperemia, a febre, e a dor. Apresentam segurança significativa, mas podem apresentar vários efeitos adversos, que podem ir desde uma dispepsia até o óbito decorrente de uma úlcera perforada ou hemorragia. Logo, seu uso deve ser seguro, para que possa ter mais benefícios do que riscos para a saúde do paciente, devendo ser sempre prescrito e acompanhado por profissional (SILVA, *et al.*, 2019).

3.2 Anti-inflamatórios não esteroidais

Com base em sua estrutura química, os AINEs podem ser amplamente classificados em salicilatos, derivados do ácido aril e heteroarilacético, derivados do ácido indol / indolacético, antranilatos e oxicams (Figura 2) (BINDU *et al.*, 2020).

Figura 2. Classificação dos anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) com base na estrutura.



Fonte: Bindu *et al.* (2020)

Desde o isolamento do salicilato da casca do salgueiro por volta de 1830, seguido pela descoberta da aspirina (ácido acetilsalicílico) por Felix Hoffman da indústria Bayer, Alemanha, em 1897, os antiinflamatórios não esteroidais (AINEs) têm desfrutado de um sucesso de vendas status na indústria farmacêutica (MONTINARI; MINELLI; DE CATERINA, 2019). Os fármacos mais vendidos no mundo são os AINEs. Por serem indicados na terapêutica para o alívio da dor, febre e inflamação. Estudos afirmam que na maioria das vezes os AINEs são vendidos sem prescrição médica, favorecendo o aumento nos casos de reações adversas, onde os idosos são as pessoas mais atingidas. Outro resultado parecido diz que os AINEs estavam entre os medicamentos mais vendidos correspondendo a 89,7% do total de vendas das farmácias comunitárias envolvidas no estudo (AOYAMA; DELMAO, 2021).

Alguns AINEs são inibidores não específicos de ambas as enzimas COX, enquanto outros são específicos, notadamente “coxibes” que inibem especificamente o COX-2 (BECKER; DOMSCKE; POHLE, 2004; DARLING *et al*, 2004).

3.3 Desenvolvimento dos AINEs

A busca por anti-inflamatórios, mais potentes, eficientes e menos tóxicos, estimulada pelo interesse de mercado da Indústria Farmacêutica Mundial, despertou vários estudos acadêmicos e industriais voltados ao desenvolvimento de novos candidatos a fármacos, culminando com a descoberta de várias classes químicas, grupos e atributos funcionais e possíveis mecanismos de ação alternativos com perfil terapêutico desejado (COUTINHO; MUZITANO; COSTA, 2009; BATLOUNI, 2020).

O planejamento de estruturas moleculares visando a obtenção de novos candidatos a fármacos é o passo inicial e, provavelmente, o mais importante para o desenvolvimento de um novo medicamento (DECKER, 2017).

As moléculas que contêm o composto N-acilhidrazona em sua fórmula caracterizam-se por possuir uma diversidade estrutural que é importante na construção de distintas famílias de compostos protótipos e possíveis candidatos a fármacos. Baseando-se nas estratégias de bioisosterismo, algumas séries de N-acilhidrazonas foram sintetizadas e avaliadas farmacologicamente, de forma a permitir o estudo das relações entre a estrutura química e suas respectivas atividades biológicas (FONTENELE, 2020).

O Bioisosterismo consiste em ser uma estratégia baseada em uma modificação que cause uma variação em alguma característica físico-química ou estrutural do protótipo, mas mantenha o seu efeito biológico e o reconhecimento do fármaco pelo biorreceptor alvo (LIMA & BARREIRO, 2005; RODRIGUES, 2008).

O *fragment-based drug discovery* FBDD usa bibliotecas relativamente pequenas de compostos de baixa complexidade que representam fragmentos de compostos maiores mais semelhantes a drogas. Ao reduzir a complexidade dos produtos químicos selecionados, mais dos locais de ligação em potencial de uma

proteína alvo podem ser explorados por meio da promiscuidade de ligação dos fragmentos (THOMAS *et al.*, 2017).

Onde os fragmentos se ligam, embora com menor potência do que as moléculas semelhantes a drogas de *high-throughput screening* (HTS), eles oferecem bons pontos de partida para projetar ligantes de maior afinidade usando o conhecimento da estrutura da proteína como um modelo para gerar compostos com maior eficiência de ligante (melhor ligação por átomo energia para o alvo) (PATEL *et al.*, 2014).

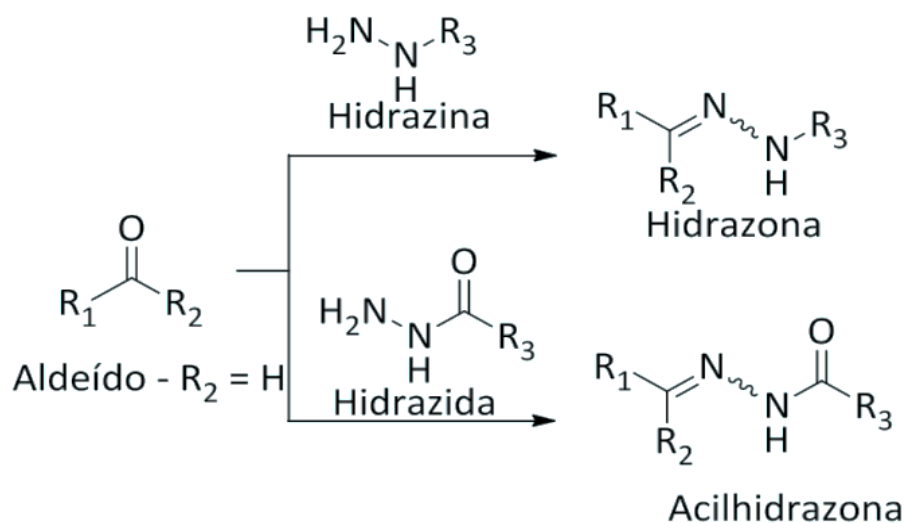
O FBDD oferece uma abordagem atraente para explorar efetivamente o espaço químico para a ligação de uma proteína alvo. Em campanhas convencionais de HTS, grandes bibliotecas de compostos muitas vezes complexos são selecionadas para atividade contra um alvo (HALL *et al.*, 2014).

A proposta é que estes estudos auxiliam na busca de novos agentes baseados em planejamentos químicos racionais, resultando na obtenção de substâncias com maior eficácia, seletividade e conseqüentemente, menor toxicidade. Nesse contexto, a capacidade de interagir com sistemas biológicos coloca os grupos funcionais hidrazona e N-acilhidrazona em destaque entre os compostos químicos para fins medicinais (SOUZA, 2020).

3.4 Derivados acilhidrazônicos: síntese e propriedades biológicas

As hidrazonas pertencem a uma classe de compostos com estrutura geral – $C=N-NH$, sendo obtidas normalmente pela condensação de hidrazinas com cetonas ou aldeídos. Uma vez que a hidrazina seja uma N-acilhidrazina (ou hidrazida), o produto é uma N-acilhidrazona (Figura 3) (SUGIURA & KOBAYASHI, 2005).

Figura 3. Reação geral de formação de uma Hidrazona

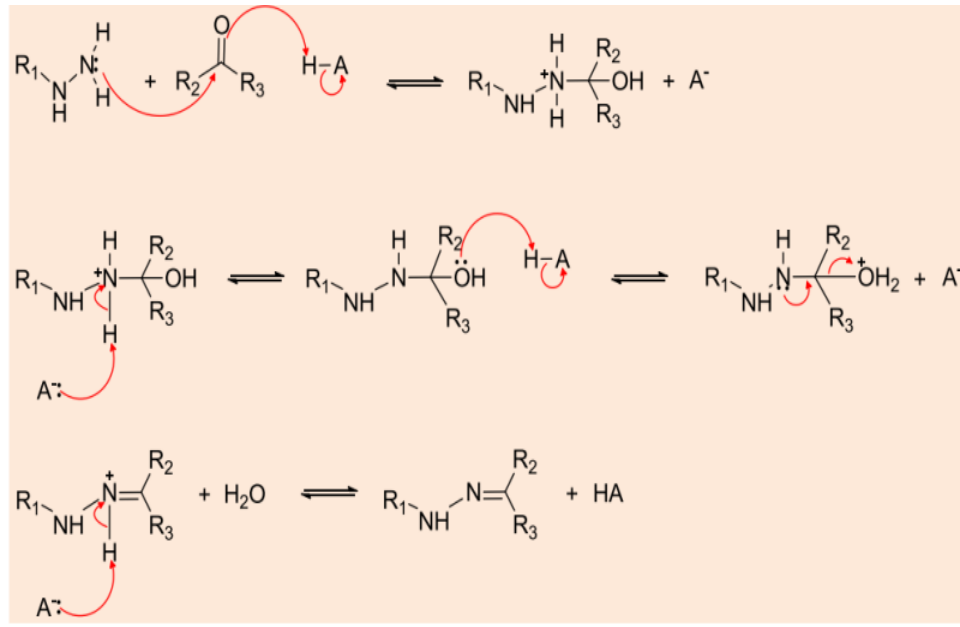


Fonte: Guimarães, D. G. *et al.* (2017)

O grupo funcional hidrazona tem despertado crescente interesse científico, em virtude de seu amplo espectro de aplicações e propriedades químicas, terapêuticas, biológicas e industriais (LÓPEZ-TORRES; ZANI; MENDIOLA, 2011; DESPAIGNE *et al.*, 2010). Outros atrativos desta função que justificam sua relevância são suas variadas propriedades estruturais, a facilidade de síntese e a estabilidade à hidrólise (LÓPEZ-TORRES; ZANI; MENDIOLA, 2011; FERRARESI-CUROTTO, 2017).

De maneira geral, as hidrazonas são sintetizadas através da condensação equimolar de hidrazinas ou hidrazidas com aldeídos e cetonas. O emprego de catálise ácida é comum para este tipo de reação, onde resumidamente, ocorre a adição nucleofílica seguida da transferência de prótons (Figura 4) (CAREY & SUNDBERG, 2007). Frequentemente são utilizados o ácido acético, ácido clorídrico ou o ácido sulfúrico, como catalisadores (CACHIBA *et al.*, 2012).

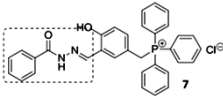
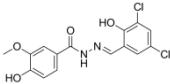
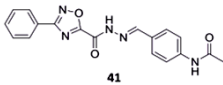
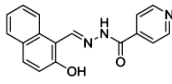
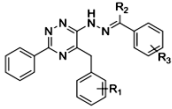
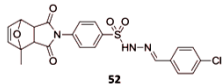
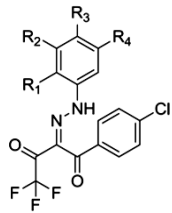
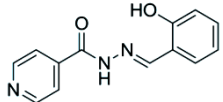
Figura 4. Mecanismo de reação de formação de hidrazonas via catálise ácida



Fonte: Guimarães *et al.* (2017)

Guimarães *et al* (2017) relataram em seu estudo de revisão que existem variadas atividades biológicas dos derivados hidrazônicos como apresentado na tabela 1.

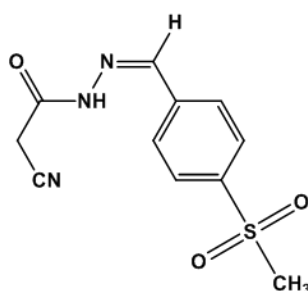
Tabela 1 - Atividades biológicas dos derivados hidrazônicos.

Estrutura	Atividade	Referência
 <p>7</p>	Antineoplásica	Chew <i>et al</i> (2014)
	Antimicrobiana	Wang <i>et al</i> (2012)
 <p>41</p>	Tripanocida	Santos filho <i>et al</i> (2009)
	Antimalárica	Walcourt <i>et al</i> (2013)
	Anticonvulsivante	Amir <i>et al</i> (2014)
 <p>52</p>	Antidepressiva	Oliveira <i>et al</i> (2011)
	Anti inflamatória	El-Sayed <i>et al</i> (2011)
	Cardioprotetora	Simunek <i>et al</i> (2008)

Fonte: adaptada de Guimarães *et al* (2017).

Nosso grupo de pesquisa em 2016 iniciou o estudo com o derivado *N*-acilhidrazônico substituído (JR04) (Figura 5), realizando a caracterização, elucidação estrutural, avaliação do potencial anti-inflamatório e antinociceptivo *in vivo* e atividade microbiana, ensaios esses bastante promissores, que favoreceram a continuação de estudos farmacológicos (APOLINÁRIO, 2016; SILVA, 2017a).

Figura 5 - Estrutura do JR04



Fonte: Apolinário (2016)

Posteriormente, Silva (2017)_b objetivando averiguar uma possível interação molecular dos compostos da série JR sobre as enzimas COX-1 e COX-2 realizou o ensaio de ancoragem molecular que permitiu avaliar a relação estrutura-atividade e o comportamento desse composto quando ligado às enzimas COXs. Obtendo como resultado que o JR04 possui uma melhor interação com a COX-1 apresentando resultados de maior afinidade comparado com fármacos como Diclofenaco e Nimesulida.

3.5 Docking Molecular

O *docking* molecular, ou modelagem molecular, é uma abordagem *in silico* (computacional) baseada em um processo natural celular, envolvendo ligantes (pequenas moléculas) em configurações apropriadas para interagir com um receptor para a formação de um complexo estável, sendo tal abordagem de grande interesse para o ponto de vista medicinal (SUPRIYA *et al.*, 2016).

Essa metodologia vem se tornando cada vez mais popular entre diversos pesquisadores da química medicinal, posto que, se mostra um método fácil, barato,

eficaz e que viabiliza a economia de tempo e material superando, por vezes, abordagens como *High Throughput Screening* HTS (SALMASO; MORO, 2018; SUPRIYA *et al.*, 2016).

O *docking* molecular utiliza duas abordagens principais: 1) abordagem de simulação, onde o ligante e o alvo são separados por uma distância física e aos poucos vão se aproximando após “tempos definidos de movimentos” em seus espaços conformacionais; 2) abordagem de complementaridade da forma, onde a energia de interação molecular se dá através das características estruturais superficiais do alvo e do ligante (DAR; MIR, 2017).

O desenvolvimento de novos fármacos a partir de estruturas químicas de fármacos já conhecidos (*ligand-based drug discovery*) baseia-se na comparação das estruturas dos compostos em estudo com estruturas químicas, ou perfis gerados a partir da estrutura química, de ligantes ativos testados *in vivo* ou *in vitro* (KOUTSOUKAS *et al.*, 2011).

Perante o exposto, levando em consideração a hipótese de que o derivado N-acilhidrazônico substituído: N-2-ciano-(4-(metilsulfonil- benzilideno) - acetohidrazida (JR04) apresenta atividade anti-inflamatória, objetivamos realizar ensaios *in silico* para demonstrar interação da molécula com a COX e prever parâmetros farmacocinéticos. Além de realizar e determinar ensaio de citotoxicidade e a toxicidade aguda do composto.

4 Metodologia

4.1 Obtenção do composto e Local da Pesquisa

O composto foi fornecido pela equipe do Laboratório de Síntese e Vetorização Molecular da Universidade Estadual da Paraíba, em Campina Grande coordenado pelo Prof. Dr. Ricardo Olimpio Moura.

O teste de toxicidade *in vivo* foi desenvolvido no Laboratório de Ensaio Farmacológicos, do complexo integrado Três Marias, da Universidade Estadual da Paraíba, em Campina Grande.

O ensaio de citotoxicidade em eritrócitos foi realizado no Laboratório de Desenvolvimento e Ensaio de Medicamentos da Universidade Estadual da Paraíba, em Campina Grande.

4.2 Animais e Procedimentos éticos

Foram utilizados camundongos albinos Swiss (*Mus musculus*) adultos, fêmeas, pesando entre 25 e 35g. Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas, com temperatura e umidade ambiente ($23 \pm 2^\circ\text{C}$), respeitando-se o ciclo claro-escuro de 12h, com ração e água *ad libitum*.

Os protocolos experimentais foram submetidos ao Comitê de Ética em Uso de Animais (CEUA) do Centro de Ensino Superior e Desenvolvimento (CESED) sob número: 5905022016 e conduzidos de acordo com as diretrizes éticas propostas pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA).

4.3 Ensaio de modelagem molecular *in silico*

A estrutura do composto sintetizado foi convertida pela técnica *Chem3D* 15.1 criando um modelo 3D, seguido de uma minimização da energia molecular usando a mecânica molecular (MM2). Os ligantes otimizados foram salvos como arquivos MOL2.

Com o uso do *AutoDockTools*-1.5.6, os hidrogênios não-polares foram fundidos com os carbonos correspondentes, então a carga parcial de átomos foi calculada usando o procedimento Gasteiger implementado no pacote *AutoDockTools*. As ligações rotativas dos ligantes foram definidas, e as estruturas salvas como *pdbqt* e usadas para estudos de *docking*.

As estruturas cristalográficas utilizadas de COX-1 e COX-2 foram complexadas com o ligante para definir os sítios catalíticos, o celecoxib (PDB 3KK6, para COX-1 e PDB 3LN1, para COX-2) como ligante seletivo, baixada do *RCSB Protein Data Bank*.

Com o uso do *PyMol 3D*, moléculas de água e outros heteroátomos foram removidos. Então, usando *AutoDockTools*, os hidrogênios não polares foram fundidos e os hidrogênios polares foram adicionados à estrutura das proteínas. As cobranças de Kollman foram adicionadas e uma estrutura foi salva como *pdbqt* para os estudos de *docking*. O algoritmo genético Lamarckiano no *AutoDock 4.2.2* foi aplicado para buscar a melhor conformação e orientação dos ligantes. A otimização global foi iniciada com uma população de 150 indivíduos posicionados aleatoriamente com um máximo de 2.500.000 avaliações de energia e um máximo de 27.000 gerações. Durante cada experimento de *docking*, 100 corridas foram realizadas, gerando 100 conformações. As poses de encaixe resultantes foram analisadas usando o *Discovery Studio Visualizer 2017* (Cliente R2) (R. Rondla).

Para validação do estudo de ancoragem molecular (*redocking*) foram utilizados os programas *AutoDock Tools 1.5.6* e *Discovery Studio 2.0*, possibilitando a observação da sobreposição entre o ligante cristalizado e a molécula.

4.4 Estudos farmacocinéticos *in silico*

As predições farmacocinéticas foram realizadas utilizando plataformas *online*, disponibilizadas de maneira gratuita e, que apresentam graficamente resultados mais propícios para discussões e correlações. O programa utilizado para prever propriedades de absorção (gastrointestinal e hematoencefálica) log P, log S, e inibidores da CYP450, como também, comparações de “druglikeness” foi o *Swiss ADME* desenvolvido pela *Swiss Institute of Bioinformatics* na Suíça, com referências disponibilizadas no artigo de Daina, Michielin e Zoete (2017). Parâmetros

relacionados ao metabolismo e os pontos de ataque enzimáticos, foram realizados através da plataforma *Xenosite*, desenvolvido pela Universidade de Medicina de Washington, EUA. Baseado em 56 artigos como Zaretzki, Matlock e Swamidass (2013) e Dang *et al.* (2016), apresenta uma interface que necessita apenas que sua estrutura esteja no formato *smiles*, formato este gerado pelo *ChemDraw Ultra 12.0*.

4.5 Ensaio de Citotoxicidade

Para o teste de citotoxicidade o sangue tipo O + foi doado pelo Laboratório de Análises Clínicas (LAC) e acondicionado em tubo com heparina. O plasma foi retirado do tubo após centrifugação a 2500 rpm por 5 minutos.

Posteriormente a suspensão de hemácias foi lavada três vezes, com solução salina 0,9%. As hemácias foram ressuspendidas novamente com a mesma solução e o volume ajustado para 5%. Então, foi colocado 2 mL da suspensão de hemácias a 5% junto com 2 mL da solução do JR04 na concentração de 500 µg/mL em tubos de ensaio, deixados em repouso durante 1 hora à temperatura ambiente para que aconteça a hemólise. Após esse período, cada tubo foi centrifugado a 2500 rpm por 5 minutos, sendo retirado o sobrenadante para leitura em espectrofotômetro em um comprimento de onda de 540 nm. Como controle positivo, foi utilizado o líquido de Turk a 2% uma vez que, essa substância causa 100% de hemólise e como controle negativo solução salina a 0,9%, que não causa hemólise alguma. A análise foi realizada em triplicata.

4.6 Preparo da substância

Para realização do teste farmacológico de toxicidade aguda a molécula foi dissolvida em solução salina e administrada por gavagem (via oral).

4.7 Toxicidade aguda

O teste de toxicidade aguda oral foi realizado segundo metodologia do Guia 423 (adaptado), das Diretrizes da Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD, 2011). Foram utilizados grupos de 3 animais fêmeas. Os

animais do grupo controle negativo, foram tratados com o veículo (solução salina 0,9%) e os animais do grupo teste tratados com o composto JR04 na dose de 300 mg. Kg⁻¹, via oral. Após o tratamento, foram realizadas observações comportamentais sistemáticas segundo metodologia descrita por Almeida (1999), (Anexo 1) nos tempos de 15 minutos, 1 hora, 2 horas, 3 horas e 4 horas após administração. Parâmetros como massa corporal, consumo de água e ração foram observados a cada 24 horas durante 14 dias. No décimo quarto dia, os animais foram pesados, e em seguida eutanasiados por deslocamento cervical, sendo os órgãos (fígado, baço, coração e rins) retirados, pesados e avaliados macroscopicamente. Também foi retirado o estômago para verificar a formação de úlceras gástricas.

4.8 Análise estatística

Os dados são apresentados como média \pm erro padrão das médias (E.P.M.) das medidas feitas com 3 animais em cada grupo. Foi utilizado o programa Prisma 5.0. e os dados analisados pelo teste T, com nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para melhor compreensão do mecanismo anti inflamatório do composto JR04, o *docking* molecular foi realizado com a estrutura cristalográfica da COX-1 (PDB ID 3KK6) e COX-2 (PDB ID 3LN1). Para validação do método utilizado, foi realizado o procedimento de *redocking* com o ligante co-cristalizado. Esse procedimento permite obter, a partir da realização do *docking* entre o ligante co-cristalizado e o biorreceptor em questão, a preservação da orientação espacial do ligante.

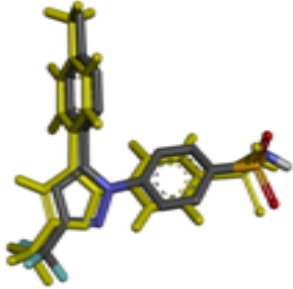
5.1 *Docking* Molecular do alvo COX- 1

O *Redocking* do ligante com a enzima apresenta importantes interações, enfatizando que quanto menor a energia livre de ligação maior será a interação do ligante com a enzima. A avaliação da metodologia se dá pelos valores de *Root-mean-square-deviation* (RMSD) que deve apresentar valores $< 2,0 \text{ \AA}$.

O método de redocagem baseia-se em submeter o mesmo ligante co-cristalizado com o biorreceptor em questão aos estudos de ancoragem molecular e observar se as interações com os resíduos de aminoácidos chave e a orientação espacial do ligante são preservadas, ou seja, que no RMSD entre o ligante cristalográfico e a proteína ou enzima seja menor possível, de modo a comprovar a capacidade preditiva do modelo *in silico* (MOURA, 2019).

A tabela 2 mostra que o posicionamento espacial dos átomos do CEL redocado é semelhante ao mesmo ligante co-cristalizado com a estrutura 3KK6.

Tabela 2 - *Redocking* molecular como método de validação do estudo (PDB ID 3KK6):

Ligante co-cristalizado CEL	RMSD	GRID BOX
	0.63 Å	40 x-points
		40 y-points
		40 z-points
		Coordinates of Central Grid Point of Maps = (-32.531, 43.584, -6.345)

Fonte: Elaborada pelo autor, 2021.

Na tabela 3 podemos observar os resultados do *Docking* molecular obtido para o alvo terapêutico Ciclooxygenase -1 em que o JR04 possui menor energia livre de ligação e menor constante de afinidade (-11.32 Kcal/mol 5.05 nM) quando comparado com o ligante CEL que possui maior energia livre de ligação (-8.42 Kcal/mol) e maior Constante de afinidade (668.02 nM).

Tabela 3 - *Docking* molecular com JR04 no alvo COX-1 (PDB ID 3KK6):

Composto	Energia livre de ligação	Constante de Afinidade
Ligante CEL	-8.42 Kcal/mol	668.02 nM
JR04	-11.32 Kcal/mol	5.05 nM

Fonte: Elaborada pelo autor, 2021.

Os dados apresentados sugerem que o JR04 possui boa interação molecular com a COX-1, onde o valor de energia de ligação é menor que a do CEL que é um composto que apresenta baixa interação com esta enzima.

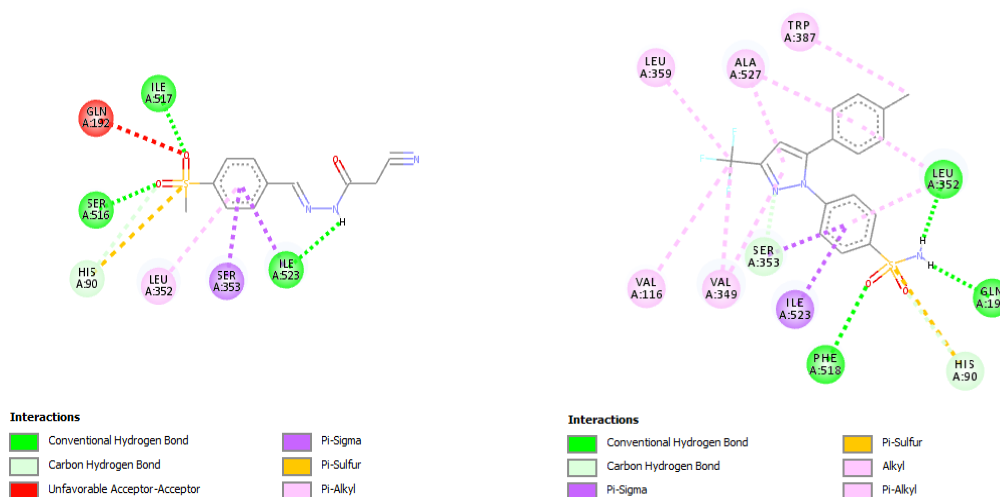
Em outro estudo com derivados hidrazônicos El sayed *et al* (2011), utilizaram compostos onde acoplaram no sítio ativo do COX-1 com sucesso, mas a ligação foi

insuficiente de ambos os compostos podendo ser explicada em termos da ocorrência de ligações de hidrogênio serem muito fracas.

De acordo com Osmaniye *et al* (2021) em resultados de estudos de encaixe utilizando um composto N-acilhidrazônico ligando-se ao sítio ativo da COX-2, formou uma interação adicional (ligação de halogênio) através do substituinte do átomo de cloro. Assim, evidenciaram que modificações estruturais podem ser feitas com base nos novos derivados de N-acilhidrazona-metissulfonil para procurar compostos com maior atividade inibitória contra a enzima COX-2.

A figura 6 mostra as interações ocorridas entre o composto JR04 e o ligante CEL com a enzima COX-1. Algumas interações do composto JR04 são semelhantes às do ligante CEL, como por exemplo, a ligação de hidrogênio convencional com GLN A:192, Pi-sigma ILE A:523, ligação carbono hidrogênio HIS A :90, LEU A:352, SER A:353. No entanto, observamos que o ligante CEL apresentou mais regiões de interação, tendo ele maior interação com o alvo quando comparado com o composto JR04. Sugerindo-se que esta interação possa ser devido ao tamanho da molécula do CEL no sítio ativo, que apesar de ter maior número de interações não forma complexos estáveis com o alvo.

Figura 6 - Representação 2D das interações entre o composto JR04 (A) e o ligante CEL (B) com o alvo COX-1



Fonte: Elaborada pelo autor, 2021.

Moraes *et al* (2018) relataram em seu estudo com derivados indol-acilhidrazônicos que as posições de acoplamento obtidas para COX-1 mostram conformações distintas. No sítio ativo menos volumoso da COX-1, assume uma conformação onde o anel indol é apontado para o bolso lateral hidrofílico do sítio ativo através de uma ligação carbono-hidrogênio. E podem manter uma conformação similar quando comparado com o sítio ativo COX-2.

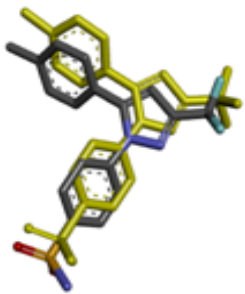
Quando observamos através do *docking* que a interação do JR04, os valores de energia de ligação e constante de afinidade possuem melhor resultado de inibição com a COX-1, sugerimos que estas interações estão relacionadas ao tipo de grupamento que a mesma possui.

O composto JR04 apresenta uma estrutura diferenciada em relação às demais moléculas da série, apresentando um grupamento metilssulfonil ligado ao anel benzilidênico. Para Silva (2017)_b tal substituinte é encontrado nos inibidores seletivos da COX-2, sugerindo uma possível ação seletiva para esta isoforma. No entanto, os dados apresentados não condizem com esta afirmação, pois o JR04 ao ser ancorado demonstrou afinidade pela COX-1.

5.2 Docking Molecular do alvo COX- 2

Analisando a tabela 4 é possível verificar o posicionamento espacial dos átomos do CEL co-cristalizado estrutura 3LN1, estando com o valor de RMSD dentro dos parâmetros estabelecidos na Tabela 3. O pequeno aumento do valor de RMSD na estrutura de 0.95 Å indica que essa estrutura apresenta pequenas variações.

Tabela 4 - *Redocking* molecular como método de validação do estudo (PDB ID 3LN1):

Ligante co-cristalizado CEL	RMSD	GRID BOX
	0.95 Å	40 x-points
		40 y-points
		40 z-points
		Coordinates of Central Grid Point of Maps = (30.597, -22.559, -15.758)

Fonte: Elaborada pelo autor, 2021.

Na tabela 5 estão expostos os resultados do *Docking* molecular obtido para o alvo terapêutico COX-2, onde é possível observar que o JR04 possui maior energia de ligação (-8.55 Kcal/mol) e constante de afinidade (544.24 nM) quando comparado com o ligante CEL que apresentou menor Energia Livre de Ligação (-11.04 Kcal/mol) e menor Constante de afinidade (8.11 nM).

Como a afinidade de um ligante pelo seu sítio ativo está representada pela energia de ligação do complexo ligante-receptor, em que quanto menor a energia, maior será a afinidade com o alvo (BALI; OHRI; DEB, 2012), nossos dados mostram que o JR04 possui baixa interação molecular com a COX-2 apresentando maior energia de ligação, ou seja, menor afinidade com o alvo.

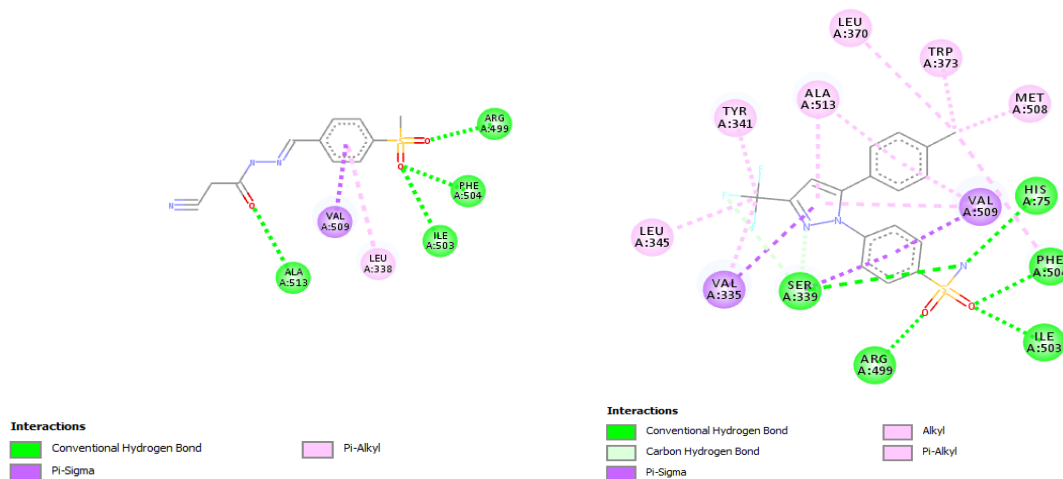
Tabela 5 - *Docking* molecular com JR04 no alvo COX-2 (PDB ID 3LN1):

Composto	Energia livre de ligação	Constante de Afinidade
Ligante CEL	-11.04 Kcal/mol	8.11 nM
JR04	-8.55 Kcal/mol	544.24 nM

Fonte: Elaborada pelo autor, 2021.

A figura 7 mostra as interações ocorridas entre o composto JR04 com a enzima COX-2. Como pode-se observar, o composto JR04 apresenta interações semelhantes ao ligante CEL, como por exemplo, a ligação de hidrogênio convencional com ILE A:503, PHE A:504, ARG A:499, Pi-alquil ALA A:513, Pi-sigma VAL A:509. Observamos que o ligante CEL apresentou mais regiões de interação, tendo ele maior interação com o alvo quando comparado com o composto JR04.

Figura 7 - Representação 2D das interações entre o composto JR04 (A) e o ligante CEL (B) com o alvo COX-2



Fonte: Elaborada pelo autor, 2021.

O número de aminoácidos (aa) que compõem as duas isoformas COX-1 e COX-2 é bem semelhante e possuem a mesma afinidade pelo AA, diferindo no sítio de ligação das COXs na posição 523, onde na COX-1 observa-se a presença de um resíduo de Ile 523 e na COX-2 um resíduo de Val. A presença do resíduo de Val na estrutura da COX-2 confere a enzima uma maior acessibilidade de um possível

ligante de maior massa molecular uma vez que a cadeia lateral deste aa é menor do que a Ile, aumentando em muitas vezes o volume do sítio ativo ligante da COX-2 (EL-SAYED, et al., 2011).

Os resultados apresentados mostram que o JR04 possui uma maior afinidade pela COX-1. Demonstrando que possui uma maior afinidade quando correlacionada com o fármaco Celecoxibe.

Através disto podemos observar em relação às interações ocorridas entre o composto e o ligante que as interações com o ligante COX-1 são melhores quando comparadas com as interações com a COX-2. Assim, pode-se sugerir que o JR04 possui melhor interação com COX-1.

Os resultados obtidos nestes estudos de ancoragem sugeriram que o composto JR04 foi ajustado no sítio ativo da enzima para formar as interações de ligação, conforme indicado por seu padrão de encaixe em comparação com o do celecoxibe. No geral, essas interações e padrões de ligação no sítio ativo da COX-1 explicam a notável atividade inibitória e anti inflamatória do JR04.

5.3 Estudos farmacocinéticos *in silico*

De acordo com os resultados obtidos através da abordagem *in silico* mostrados é possível observar que o JR04 possui propriedades moleculares desejáveis quando relacionamos aspectos ligados à absorção e permeabilidade em membranas biológicas, já que obedeceu à regra dos 5 de Lipinski, ou seja, peso molecular ≤ 500 g/mol; número de aceptores de hidrogênio (ALH) ≤ 10 , número de doadores de hidrogênio (DLH) ≤ 5 e coeficiente de lipofilicidade (cLogP) ≤ 5 (LIPINSKI *et al.*, 1997). O valor de Log S calculado mostrou que o fármaco é solúvel em água.

Tabela 6 - Estudos de ADME (Absorção Distribuição Metabolismo Excreção)

Composto	Peso Molecular g/mol	Doadores de ligação de H	Aceptores de ligação de H	Ligações Rotativas	Log P	Log S	TPSA	Absorção Intestinal (%)	Refratividade Molar
JR04	265,29	1	5	5	0,87	-2,13	107,77	71,82%	65,36

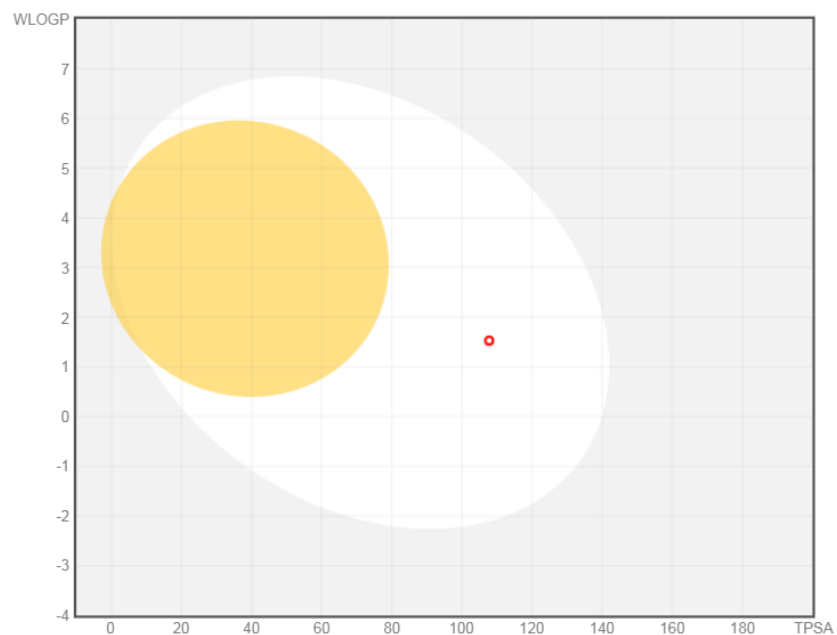
Fonte: Elaborada pelo autor, 2021.

Sabendo que os valores de Log S representam solubilidade de acordo com a seguinte escala: insolúvel <-10<pouco solúvel<-6<moderado<-4<solúvel<-2< muito solúvel <0<altamente solúvel (BORGES, 2018). A partir dos valores da Topological Polar Surface Area (TPSA) foi calculado a porcentagem de absorção gastrointestinal pela fórmula (ZHAO *et al*; 2013).:

$$\%ABS: 109 - [0,345 \times TPSA]$$

O TPSA é um parâmetro relacionado com o transporte molecular passivo através das membranas e permite a predição da absorção intestinal humana e passagem na barreira hematoencefálica, no qual valores de $TPSA < 140(\text{Å}^2)$ são considerados desejáveis para indicar boa absorção gastrointestinal e passagem na barreira hematoencefálica (BORGES, 2018). É possível observar que o JR04 possui TPSA abaixo de $< 140(\text{Å}^2)$ e %ABS entre 71,82% indicando boa absorção gastrointestinal.

Figura 8 – Correlação entre WlogP e TPSA, na forma de BOILED-Egg para o JR04.



Fonte: Daina *et al.* (2016)

Legenda: BHE AGI p-GP+ p-GP-

BHE - Moléculas na área amarela do gráfico que são capazes de atravessar a barreira hematoencefálica;

AGI – Moléculas absorvidas passivamente pelo trato gastrointestinal;

p-GP+ - Moléculas que associam-se a p-glicoproteína;

p-GP- - Moléculas que não associam-se a p-glicoproteína.

Correlacionando a figura 8 com as propriedades de WlogP e TPSA na forma de *BOILED – Egg*, o JR04 demonstrou possuir capacidade de ser absorvido passivamente pelo trato gastrointestinal quando observamos o ponto vermelho (molécula do JR04) localizado na clara do *BOILED – Egg*, relacionando esta propriedade a uma possível administração oral do fármaco. Além disso, o mesmo não se associou a glicoproteína-p e não atravessa a BHE.

No estudo *in silico* na plataforma SwissADME o JR04 apresentou propriedades *drug-likeness* adequadas e não violou os filtros de Lipinski, Veber, Muegge, Ghose e Egan. Onde está de acordo com os resultados apresentados na tabela 6.

As propriedades *drug-likeness* podem ser caracterizadas como um conjunto de características estruturais e físico-químicas que indicam se um uma substância apresenta similaridade com fármacos biodisponíveis por via oral, sugerindo o potencial dessa substância como candidato a fármaco (PIANTA, 2021).

5.4 Citotoxicidade

Em relação a citotoxicidade o composto JR04 apresentou 2,16% de hemólise no tipo sanguíneo O +. Assim, podemos observar que a molécula testada (JR04) não causa hemólise nas hemácias, pois seu percentual não foi significativo, sendo portanto, uma molécula de baixa toxicidade para as hemácias humanas.

De acordo com os parâmetros estabelecidos pela literatura o percentual de hemólise será considerado como baixo quando estiver situado entre 0 e 4%, moderado quando estiver entre 40 e 80% e alto quando estiver acima de 80% (RANGEL, 1997; DANTAS, 2017).

5.5 Toxicidade Aguda

O composto JR04, foi avaliado através da administração v.o., de uma dose fixa de 300 mg.kg⁻¹, onde durante as primeiras 4 horas foram avaliados os reflexos

autonômicos, parâmetros fisiológicos e comportamentais, segundo protocolo estabelecido por Almeida (1999).

Após administração do composto, as únicas alterações observadas foram aumento da micção, perda da coordenação motora e diminuição dos reflexos da dor, ocasionado ao pressionar a cauda dos animais, sendo indicativo que o composto apresenta atividade analgésica. Durante os 14 dias consecutivos, não houve morte, nem sinais clínicos e de toxicidade geral.

Foi possível observar que ocorreu diminuição do consumo de ração quando comparamos com o grupo controle, mas a alteração do peso dos animais foi insignificante (Tabela 7) e não alterou a saúde do animal, assim é possível evidenciar a baixa toxicidade apresentada pelo composto.

Tabela 7 - Consumo de água e ração e evolução ponderal, dos animais tratados com JR04.

Consumo	Salina	JR04
Ração(g)	15.54±0.70	11.92±0.47***
Água(mL)	18,3±1,13	21,0±0,808 ^{ns}
Evolução ponderal(g)	2.00±0.09	2.333±0.33 ^{ns}

Os valores foram expressos como média ± E.P.M (n=3 animais em cada grupo); nível de significância de 5% (p<0,05).

Na análise macroscópica dos órgãos, foram observadas pequenas ulcerações gástricas quando comparada ao controle, porém sem significância estatística, em concordância com a afinidade pela COX 1 mostrada *in silico*. Porém, nenhuma alteração macroscópica foi observada nos demais órgãos (Tabela 8).

Tabela 8 - Peso relativo dos órgãos de camundongos tratadas com JR04

Órgãos	Salina	JR04
Coração	0.367±0.047	0.435±0.031 ^{ns}
Rins	0.968±0.086	1.008±0.050 ^{ns}
Fígado	4.704±0.345	4.721±0.103 ^{ns}
Baço	0.278±0.058	0.313±0.018 ^{ns}
Pulmão	0.471±0.044	0.510±0.113 ^{ns}

Os valores foram expressos como média ± E.P.M (n=3 animais em cada grupo); nível de significância de 5% (p<0,05).

Estes resultados mostram que o composto JR04 apresenta baixa toxicidade nas condições avaliadas, contribuindo para validação do potencial biológico desse derivado, tornando-o candidato a fármaco anti-inflamatório, o que nos dá garantia de continuar os estudos com este promissor composto.

6 CONCLUSÃO

Através das avaliações *in silico*, *in vivo* e *in vitro* realizadas foi possível observar que o composto JR04:

- possui boa interação com enzimas ligadas ao processo inflamatório (COXs), sinalizando que a inibição destas enzimas está relacionada com sua atividade;
- possui propriedades moleculares desejáveis quando relacionamos aspectos ligados à absorção e permeabilidade em membranas biológicas, pois obedece a regra dos 5 de Lipinski e apresentou propriedades *Drug-likeness*;
- apresenta boa absorção gastrointestinal;
- mostra segurança quanto ao seu uso, pois apresentou baixa toxicidade *in vitro* e *in vivo*.

Assim, esses resultados contribuem para validação do potencial biológico desse derivado, tornando-o candidato a fármaco anti-inflamatório.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, R.N. et al. Metodologia para avaliação de plantas com atividade no sistema nervoso central e alguns dados experimentais. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, [s. l.], v. 80, n. 1, p. 72-76, 1999.
- AMIR, M.; ALI, I.; HASSAN, M. Z.; MULAKAYALA, N. Design, synthesis, and biological evaluation of hydrazone incorporated 1,2,4- triazines as anticonvulsant agents. *Archiv der Pharmazie Chemistry in Life Sciences* n. 347, p. 958, 2014.
- AOYAMA, E. A., DELMÃO, F. M. Anti-inflamatórios não esteroides (AINES) mais vendidos em farmácias comunitárias: revisão de literatura. *Rev Bras Interdiscip Saúde - REBIS*, v. 3 n. 2, p. 29-35, 2021.
- APOLINÁRIO, N. M. Elucidação estrutural e avaliação do potencial biológico de novos derivados N-acilhidrazônicos. 2016. 113 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2016.
- BALI, A.; OHRI, R.; DEB, P.K. Synthesis, evaluation and docking studies on 3-alkoxy-4-methanesulfonamido acetophenone derivatives as non ulcerogenic anti-inflammatory agents. *Eur J Med Chem*, [s. l.], v. 49, p. 397-405, 2012.
- BATLOUNI, M. Anti-inflamatórios não esteroides: Efeitos cardiovasculares, cérebro-vasculares e renais. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*. v. 94, n. 4, p. 556-563, 2010.
- BATLOUNI, M. Anti-Inflamatórios Não Esteroides: Efeitos Cardiovasculares, Cérebro-Vasculares e Renais. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v. 4, p.522, 2020.
- BECKER, J.C.; DOMSCHKE, W.; POHLE, T. Current approaches to prevent NSAID-induced gastropathy—COX selectivity and beyond. *Br. J. Clin. Pharmacol.* v.58, n.6, p. 587–600, 2004.
- BINDU, S.; MAZUMDER, S.; BANDYOPADHYAY, U. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and organ damage: A current perspective. *Biochemical Pharmacology*, v. 180, n. July, 2020.
- BORGES, N.H.P.B. Análise in silico das propriedades farmacológicas e toxicológicas dos organosselênios e ensaios in vitro de atividades antibacteriana e moduladora da resistência a drogas em *Staphylococcus aureus*. 2018. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, [S. l.], 2018.
- CACHIBA, T. H.; CARVALHO, B. D.; CARVALHO, D. T.; CUSINATO, M.; PRADO, C. G.; DIAS, A. L. T. Síntese e avaliação preliminar da atividade antibacteriana e antifúngica de derivados N- acilidrazônicos. *Química Nova*. v.35, p.1566,2012.
- CAREY, F. A.; SUNDBERG, R. J. *Advanced Organic Chemistry*, 5a. ed Springer: Charlottesville, 2007.
- CAVALCANTI, L.G.N. et al. Pathophysiological aspects of nephropathy caused by non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Brazilian Journal of Nephrology* [online]. 2019, v. 41, n. 1 [Acessado 10 junho 2021], pp. 124-130. Disponível em:

<<https://doi.org/10.1590/2175-8239-JBN-2018-0107>>. Epub 21 Set 2018. ISSN 2175-8239.

CHEW, S. T.; LO, K. M.; LEE, S. K. et al. Copper complexes with phosphonium containing hydrazone ligand: topoisomerase inhibition and cytotoxicity study. *European Journal of Medicinal Chemistry* n.76, p. 397, 2014.

COUTINHO, M. A. S.; MUZITANO, M. F. COSTA, S. S. *Revista Virtual de Química*, v. 1, p.241, 2009.

DAINA, A.; ZOETE, V. A BOILED – Egg To predict gastrointestinal Absorption na Brain Penetration of Small Molecules. *ChemMedChem* v. 11, p. 1117-1121. 2016.

DANTAS, T. B. Avaliação da toxicidade e atividade antifúngica In Vitro do Timol sobre linhagens de *Penicillium Citrinum*. 2017. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Universidade Federal da Paraíba. [S. l.], 2017.

DARLING, R.L.; ROMERO, J.J.; DIAL, E.J.; AKUNDA, J.K.; LANGENBACH, R.; LICHTENBERGER, L.M. The effects of aspirin on gastric mucosal integrity, surface hydrophobicity, and prostaglandin metabolism in cyclooxygenase knockout mice, *Gastroenterology* v.127,n.1,p. 94–104, 2004.

DE LAVOR, E.M.; FERNANDES, A.W.C.; DE ANDRADE TELES, R.B.; LEAL, A. E, et al. Essential oils and their major compounds in the treatment of chronic inflammation: a review of antioxidant potential in preclinical studies and molecular mechanisms. *Oxidative Med Cell Longev.* v.1, p. 1-23, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/6468593>.

DECKER, M. *Design of Hybrid Molecules for Drug Development*. [s.l.] Elsevier Science, 2017.

DESPAIGNE, A. A. R.; VIEIRA, L. F.; MENDES, I. C.; COSTA, F. B.; SPEZIALI, N. L.; BERALDO, H. Organotin (IV) complexes with 2- acetylpyridine benzoyl hydrazones: antimicrobial activity. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. v.21, p. 1247, 2010.

EL-SAYED, M. A. A.; ABDEL-AZIZ, N. I.; ABDELAZIZ, A. A. M.; EL-AZAB, A. S.; ASIRI, Y. A.; ELTAHIR, K. E. H. Design, synthesis, and biological evaluation of substituted hydrazone and pyrazole derivatives as selective COX-2 inhibitors: Molecular docking study. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* n.19, p. 3416, 2011.

FERRARESI-CUROTTO, V.; ECHEVERRÍA, G. A.; PIRO, O. E.; PIS-DIEZ, R.; GONZÁLEZ-BARÓ, A. C. Synthesis and characterization of a series of isoniazid hydrazones. Spectroscopic and theoretical study. *Journal of Molecular Structure*. v. 436, p.1133,2017.

FONTENELE, A. M. Atividade antioxidante e anti-inflamatória mediada pelo composto LASSBIO-294 no modelo experimental de colite ulcerativa induzida por ácido acético. 2020.

GELLER, M.; KRYMCHANTOWSKI, A. V.; STEINBRUCH, M. et al. Utilização do diclofenaco na prática clínica: revisão das evidências terapêuticas e ações farmacológicas. *Revista Brasileira Clínica Médica*, V.10, n.1, p. 29-38, 2012.

- GUIMARÃES, D. G.; ROLIM, L. A.; GONSALVES, A. D. A.; ARAÚJO, C. R. M. Biological potential of synthetic hydrazones in the last decade: A systematic review. *Revista Virtual de Química*, v. 9, n. 6, p. 2551–2592, 2017.
- GUSTAFSON, B.; GOGG, S.; HEDJAZIFAR, S.; JENNDAHL, L.; HAMMARSTEDT, A.; SMITH, U. Inflammation and impaired adipogenesis in hypertrophic obesity in man. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, ed. 999, n. 297, 2009.
- HALL, R. J., MORTENSON, P. N., AND MURRAY, C. W. Efficient exploration of chemical space by fragment-based screening. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* n.116, p. 82–91, 2014.
- KOUTSOUKAS A, SIMMS B, KIRCHMAIR J, et al. From in silico target prediction to multitarget drug design: Current databases, methods and applications. *J Proteom* v.74,n.12,p. 2554-2574, 2011.
- KUMMER CL, COELHO TCRB. Antiinflamatórios Não Esteróides Inibidores da Ciclooxigenase-2 (COX-2): Aspectos Atuais. *Rev Bras Anesthesiol* v. 52, p.498-512, 2002.
- LAMONTAIN, V.; SCHMID, T.; WEBER-STEFFENS, D. et al. Stimulation of TNF receptor type 2 expands regulatory T cells and ameliorates established collagen-induced arthritis in mice. *Cellular & Molecular Immunology*, [s. l.], v. 16, n. 65, 2019.
- LIMA, L.M.; BARREIRO, E.J. Bioisosterism: a useful strategy for molecular modification end drug design, *curr. Med.chem*; v.12, n.1, p.23-49, 2005.
- LIPINSKI, C.A.; LOMBARDO, F.; DOMINY, B.W.; FEENEY, P.J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced drug delivery reviews*, [s. l.], v. 23, n. 1-3, p. 3-25, 1997.
- LÓPEZ-TORRES, E.; ZANI, F.; MENDIOLA, M. A. Antimicrobial activity of organotin (IV) complexes with the ligand benzyl is benzoyl hydrazone ad , '-bipyridyl as coligand. *Journal of Inorganic Biochemistry* v.105,p. 600, 2011.
- MENDES, R.T.et al. Inibição seletiva da ciclo-oxigenase-2: riscos e benefícios. *Revista Brasileira de Reumatologia*, v. 52, n. 5, p. 774-782, 2012.
- MONTINARI,M.R.; MINELLI, S.; DE CATERINA, R. The first 3500 years of aspirin history from its roots - A concise summary, *Vasc.Pharmacol.*v.113,p. 1–8, 2019.
- MORAES, A. D. T. DE O. et al. (2018). Synthesis, in vitro and in vivo biological evaluation, COX-1/2 inhibition and molecular docking study of indole- N - acylhydrazone derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*.
- MOURA, W.C.S. Estudo in silico, síntese e avaliação in vitro de novos derivados acridínicos com possível ação antitumoral. 2019. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual da Paraíba, [S. l.], 2019.
- OECD. Organization for Economic Cooperation and Development. Guideline 423: Acute Oral Toxicity - Acute Toxic Class Method. OECD, Paris, 2001. 14p.

- OLIVEIRA, K. N.; COSTA, P.; SANTIN, J. R. et al. Synthesis and antidepressant-like activity evaluation of sulphonamides and sulphonyl-hydrazones. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* n.19, p. 4295, 2011.
- OSMANIYE, D., SAĞLIK, B. N., LEVENT, S., ÖZKAY, Y., & KAPLANCIKLI, Z. Design, synthesis and biological evaluation of new N-acyl hydrazones with a methyl sulfonyl moiety as selective COX-2 inhibitors. *Chemistry & Biodiversity*. 2021
- PATEL, D., BAUMAN, J. D., AND ARNOLD, E. Advantages of crystallographic fragment screening: functional and mechanistic insights from a powerful platform for efficient drug discovery. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* n. 116, p.92–100, 2014.
- PEESA JAYA PREETHI, P.R.Y.; RASHEED, A.; MANDAVA, V.B.R. A perspective review on role of novel NSAID prodrugs in the management of acute inflammation, *J. Acute Dis.* v. 5, n.5, p. 364–381, 2016.
- PIANTA, V. B. Synthesis and antibacterial activity of 4-Hydroxycordoin and its analogs against *Helicobacter Pylori*. 2021. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", 2021.
- PRASHER, P.; MUDILA, H.; SHARMA, M.; KHATI, B. Developmental perspectives of the drugs targeting enzyme-instigated inflammation: a mini review. *Medicinal Chemistry Research*, v.28, n.417, 2019.
- RANGEL, M.; MALPEZZI, E.L.A.; SUSINI, S.M.M.; FREITAS, J.C. Hemolytic activity in extracts of the Diatom *Nitzschia*. *Toxicon*, [s. l.], v. 35, p. 305-309, 1997.
- RODRIGUES, A. P.C. Otimização estrutural do protótipo 2-furanil-1,3-benzodioxolil-N-acilhidrazônico LASSBIO-129. Dissertação de Mestrado, LASSBIO, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2008.
- ROMAINE, A. P.; LOUREIRO, F. F.; DA SILVA, F. V. M. Reações adversas no uso de Anti-inflamatório não esteroidais (AINES) no Brasil: uma revisão sistemática. *Brazilian Journal of Development*, v. 7, n. 6, p. 54653-54661, 2021.
- SALMASO, V.; MORO, S. B. Molecular Docking to Molecular Dynamics in Exploring Ligand-Protein Recognition Process: An Overview. *Frontiers in pharmacology*, v. 9, n.923, p. 1-16, 2018.
- SANTOS FILHO, J. M.; LEITE, A. C. L.; OLIVEIRA, B. G. et al. Design, synthesis and cruzain docking of 3-(4-substituted-aryl)-1,2,4-oxadiazole-N-acylhydrazones as anti-Trypanosoma cruzi agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, n.17, p.6682, 2009.
- SILVA, M. M. et al. O uso crônico de anti-inflamatórios não-esteroidais e seus efeitos adversos. *Cadernos da Medicina-UNIFESO*, v. 2, n. 2, p. 90–100, 2019.
- SILVA, P. R. Avaliação da atividade anti-inflamatória e toxicológica de um derivado N-acilhidrazônico. 2017. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2017.
- SILVA, S. A. S. Estudo in silico, in vitro e in vivo dos possíveis mecanismos de ação anti-inflamatória de derivados N-acilhidrazônicos substituídos. 2017. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2017.

SIMUNEK, T.; STERBA, M.; POPELOVÁ, O.; KAISEROVÁ, H.; ADAMCOVÁ, M.; HROCH, M.; HASKOVÁ, P.; PONKA, P.; GERSL, V. Anthracycline toxicity to cardiomyocytes or cancer cells is differently affected by iron chelation with salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone. *British Journal of Pharmacology* n.155, p.138, 2008.

SINGH, G.; PASSARI, A.K.; LEO, V.V.; MISHRA, V.K. et al. Evaluation of Phenolic Content Variability along with Antioxidant, Antimicrobial, and Cytotoxic Potential of Selected Traditional Medicinal Plants from India. *Frontiers in Plant Science* , [s. l.], n. 7, 2016.

SUGIURA, M.; KOBAYASHI, S. N-Acylhydrazones as versatile electrophiles for the synthesis of nitrogen-containing compounds. *Angewandte Chemie International Edition* v. 44, p.5176, 2005.

THOMAS, S. E., MENDES, V., KIM, S. Y., MALHOTRA, S., OCHOA-MONTAÑO, B., BLASZCZYK, M., et al. Structural biology and the design of new therapeutics: from HIV and cancer to mycobacterial infections. *J. Mol. Biol.* n. 429, p. 2677–2693, 2017.

VERDAM, M.C. dos S.; GUILHON-SIMPLICIO, F.; ANDRADE, K.C. et al Analgesic, Anti-Inflammatory, and Antioxidant Activities of *Byrsonima duckeana* (Malpighiaceae). *The Scientific World Journal* , [s. l.], n. 1, 2017.

WALCOURT, A.; KURANTSIN-MILLS, J.; KWAGYAND, J. et. Antiplasmodial activity of aroylhydrazone and thiosemicarbazone iron chelators: effect on erythrocyte membrane integrity, parasite development and the intracellular labile iron pool. *Journal of Inorganic Biochemistry* n.129, p.43, 2013.

WANG, B., WU, L., CHEN, J. et al. Metabolism pathways of arachidonic acids: mechanisms and potential therapeutic targets. *Sig Transduct Target Ther.* v.6, n. 94 2021. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00443-w>

WANG, J.; GAO, Y.; LIN, F.; HAN, K.; WANG, X. Omentin-1 attenuates lipopolysaccharide (LPS)-induced U937 macrophages activation by inhibiting the TLR4/MyD88/NF- κ B signaling. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, p. 108187, 2019.

WANG, X-L.; ZHANG, Y-B.; TANG, J-F. et al. Design, synthesis and antibacterial activities of vanillic acylhydrazone derivatives as potential b-ketoacyl-acyl carrier protein synthase III (FabH) inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry* n. 57, p. 373, 2012.

WEHLING, M. Non-steroidal anti-inflammatory drugs use in chronic pain conditions with special emphasis on the elderly and patients with relevant comorbidities: management and mitigation of risks and adverse effects. *Eur J Clin Pharmacol* v. 70, p.1159-72, 2014.

ZHAO, G. et al. Enhanced intestinal absorption of etoposide by self-microemulsifying drug delivery systems: roles of P-glycoprotein and cytochrome P450 3^a inhibition. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, [s. l.], v. 50, n. 3-4, p. 429-439, 20 nov. 2013.

ANEXO 1

1. Protocolo utilizado na triagem farmacológica comportamental

Atividade farmacológica	Quantificação dos efeitos (0) sem efeito, (-) efeito diminuído, (+) efeito presente, (++) efeito intenso				
	até 30'	1 h	2 h	3 h	4 h
1 – SNC					
a – Estimulante					
Hiperatividade					
Iritabilidade					
Agressividade					
Tremores					
Convulsões					
Piloereção					
Movimento intenso das vibrissas					
Outras					
b – Depressora					
Hipnose					
Ptose					
Sedação					
Anestesia					
Ataxia					
Reflexo do endireitamento					
Catatonía					
Analgesia					
Resposta ao toque diminuído					
Perda do reflexo corneal					
Perda do reflexo auricular					
c – Outros comportamentos					
Ambulação					
Bocejo excessivo					
Limpeza					
Levantar					
Escalar					
Vocalizar					
Sacudir a cabeça					
Contorções abdominais					
Abdução das patas do trem posterior					
Pedalar					
Estereotípia					
2 - SN AUTÔNOMO					
Diarréia					
Constipação					
Defecação aumentada					
Respiração forçada					
Lacrimejamento					
Micção					
Salivação					
Cianose					
Tono muscular					
Força para agarrar					
3 – MORTE					
Observações complementares:					

Fonte: Almeida et al. (1999).