



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CAMPUS I – CAMPINA GRANDE
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BACHARELADO EM FARMÁCIA GENERALISTA**

JOSÉ ELIZANDRO BATISTA DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE SUBCRÔNICA E DO POTENCIAL TERAPÊUTICO
DE UM DERIVADO N-ACILHIDRAZÔNICO EM MODELO EXPERIMENTAL DE
COLITE ULCERATIVA**

**CAMPINA GRANDE - PB
2025**

JOSÉ ELIZANDRO BATISTA DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE SUBCRÔNICA E DO POTENCIAL TERAPÊUTICO
DE UM DERIVADO N-ACILHIDRAZÔNICO EM MODELO EXPERIMENTAL DE
COLITE ULCERATIVA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Coordenação do Curso de Farmácia da
Universidade Estadual da Paraíba, como pré-
requisito parcial para à obtenção do título de
BACHAREL EM FARMÁCIA.

Orientadora: Prof. Dra. Vanda Lucia dos Santos

Coorientadora Prof. Dra. Maria Elaine Cristina Araruna

**CAMPINA GRANDE - PB
2025**

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto em versão 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.

O48a Oliveira, José Elizandro Batista de.

Avaliação da toxicidade subcrônica e do potencial terapêutico de um derivado n-acilhidrazônico em modelo experimental de colite ulcerativa [manuscrito] / José Elizandro Batista de Oliveira. - 2025.
34 f. : il. color.

Digitado.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia)
- Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2025.

"Orientação : Prof. Dra. Vanda Lucia dos Santos, Departamento de Farmácia - CCBS".

"Coorientação: Prof. Dra. Maria Elaine Cristina Araruna, Farmácia".

1. N-acilhidrazônico. 2. Inflamação intestinal. 3. Colite ulcerativa. 4. Toxicidade subcrônica. I. Título

21. ed. CDD 615

JOSE ELIZANDRO BATISTA DE OLIVEIRA

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE SUBCRÔNICA E DO POTENCIAL TERAPÊUTICO
DE UM DERIVADO N-ACILHIDRAZÔNICO EM MODELO EXPERIMENTAL DE
COLITE ULCERATIVA

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Coordenação do Curso
de Farmácia da Universidade Estadual
da Paraíba, como requisito parcial à
obtenção do título de BACHAREL EM
FARMÁCIA

Aprovada em: 27/05/2025.

BANCA EXAMINADORA

Documento assinado eletronicamente por:

- **Vanda Lucia dos Santos** (***.424.493-**), em **12/06/2025 20:59:33** com chave **49a125ae47e911f0a5dc06adb0a3afce**.
- **Katharina Rodrigues de Lima Porto Ramos** (***.911.674-**), em **13/06/2025 10:39:06** com chave **c6adda0c485b11f0ac1a06adb0a3afce**.
- **Francisco José Batista de Lima júnior** (***.667.653-**), em **12/06/2025 21:47:54** com chave **0ac0c48c47f011f0ae441a7cc27eb1f9**.

Documento emitido pelo SUAP. Para comprovar sua autenticidade, faça a leitura do QrCode ao lado ou acesse https://suap.uepb.edu.br/comum/autenticar_documento/ e informe os dados a seguir.

Tipo de Documento: Folha de Aprovação do Projeto Final

Data da Emissão: 13/06/2025

Código de Autenticação: c2ce62



AGRADECIMENTOS

Á Deus, Nossa Senhora e o meu anjinho da guarda que sempre acalmaram meu coração em situações em que me senti encurralado, perdido ou com medo, me mostrando que qualquer dificuldade é passageira.

Á minha mãe Elza, que mesmo com muita preocupação, confiou em mim e me deixou sair de casa para seguir meus sonhos em outra cidade, além de proporcionar todo o sustento e conforto, sempre deixando claro o quanto o seu amor por mim é gigantesco e imensurável.

Ao meu irmão Edygar, que muitas vezes fez papel de pai, me incentivando de inúmeras formas, espero um dia conseguir retribuir toda a ajuda que você me fez.

Ao meu pai Edielson, sempre demonstrou cuidado, preocupação e carinho, do seu jeito, sempre acreditando e se orgulhando de mim.

Aos meus melhores amigos de graduação: Bárbara, Felipe, Wallyson, Gabrielly, Bruna e Isaque que tornaram todo o caminho acadêmico mais leve, divertido e proveitoso, graças ao companheirismo e vontade de vencer juntos. Sou profundamente grato por cada segundo que passei ao lado de vocês.

Á minha melhor amiga Kailane, que sempre esteve do meu lado, me apoiando, me motivando e me ajudando em qualquer situação, você foi um presente de Deus na minha vida.

Á minha orientadora Vanda, por me aceitar como aluno voluntário em seu laboratório, permitindo com que eu me apaixonasse pelo mundo da pesquisa, e por seus ensinamentos que foram essenciais para minha formação.

Á minha coorientadora Elaine, por contribuir para o meu aprendizado, por me guiar pela iniciação científica, e por sempre me tratar com respeito, carinho e humanidade.

Aos integrantes do LABENFARM, por sua disponibilidade e apoio durante todo o processo de experimentação do PIBIC, e pela oportunidade de aprendizado em outros ensaios farmacológicos.

A instituição UEPB, por possibilitar minha formação com excelentes professores capacitados que mesmo na falta de recurso davam o seu melhor para passar o máximo de conhecimento aos seus alunos.

Ao CNPQ e PROEX por financiar e apoiar o desenvolvimento das pesquisas e do projeto de extensão, me permitindo conhecimento em diversos âmbitos.

RESUMO

As doenças inflamatórias intestinais (DIIs) envolvem um conjunto divergente de doenças que geram inflamação aguda ou crônica na mucosa do trato gastrointestinal (TGI). As DIIs representam um importante problema de saúde pública por apresentarem alta taxa de recorrência e um longo curso clínico, com significativo impacto na vida dos indivíduos portadores. Diante das limitações terapêuticas atuais, o desenvolvimento de novos fármacos seguros e eficazes torna-se imperativo. Os derivados N-acilhidrazônicos são amplamente estudados na química medicinal por ser uma classe de compostos orgânicos com versatilidade estrutural, conferindo uma ampla gama de atividades biológicas, como propriedades anti-inflamatória e antioxidante entre outras. O composto 2-ciano-N'-(3-etoxi-4 hidroxibenzilideno)- acetohidrazida (JR-12) é caracterizado por possuir grupos funcionais que favorecem interações com alvos moleculares envolvidos em processos inflamatórios. Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo analisar a segurança não-clínica e a atividade anti-inflamatória do composto JR-12. O Estudo de Toxicidade de doses repetidas foi realizado baseado na Diretriz 407 da OECD. Foram utilizados camundongos Swiss divididos em seis grupos, os quais foram tratados por via oral durante 28 dias com o JR-12 (10 ou 20 mg/kg) ou veículo (controle negativo). Foram avaliados a massa corporal, o peso médio dos órgãos (coração, rins, baço, fígado e estômago), média do consumo de água e ração, aspectos macroscópicos e parâmetros hematológicos. A atividade anti-inflamatória do JR-12 foi estudada por meio do modelo agudo de colite induzida por ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfônico (TNBS), no qual ratos Wistar foram divididos em seis grupos, que após um jejum de oito horas receberam a administração de 10 mg TNBS solubilizados em 0,25 mL de etanol 50% v/v via retal por meio de sonda. Dentre a divisão de grupos, o não colítico foi submetido apenas aos procedimentos de anestesia e inserção de sonda, os demais foram pré-tratados com JR-12 (10 ou 20 mg/kg), prednisolona (controle positivo) ou veículo (controle negativo), 48, 24 e 1 hora antes da administração do agente inflamatório. Após a indução da inflamação, foram avaliados a área de lesão ulcerativa, porcentagem de inibição, escore de lesão, e relação peso/comprimento do segmento cólico retirado. Os protocolos foram aprovados pela CEUA/UEPB sob o número 033/2023. Os resultados demonstraram segurança toxicológica do JR-12, sem alterações significativas nos parâmetros avaliados ($p > 0,05$). No modelo de colite, o composto promoveu redução dose-dependente das lesões ulcerativas (87% e 92% de inibição para 10 e 20 mg/kg, respectivamente; $p < 0,001$), além de diminuir significativamente o escore de

lesão e a relação peso/comprimento do cólon. Conclui-se que o JR-12 apresenta perfil toxicológico favorável e expressiva atividade anti-inflamatória intestinal, sustentando seu potencial como candidato a fármaco para DIIs. Estudos dos mecanismos envolvidos na sua atividade biológica são necessários para elucidar seus alvos moleculares.

Palavras-Chave: n-acilhidrazônico; inflamação; colite ulcerativa; toxicidade subcrônica.

ABSTRACT

Inflammatory bowel diseases (IBDs) comprise a heterogeneous group of disorders characterized by acute or chronic inflammation of the gastrointestinal tract (GIT) mucosa. IBDs represent a significant public health concern due to their high recurrence rate and prolonged clinical course, which have a substantial impact on the lives of affected individuals. Given the limitations of current therapeutic options, the development of new, safe, and effective drugs is imperative. N-acylhydrazone derivatives are widely investigated in medicinal chemistry, as they constitute a class of organic compounds with structural versatility, conferring a broad spectrum of biological activities, including anti-inflammatory and antioxidant properties, among others. The compound 2-cyano-N'-(3-ethoxy-4-hydroxybenzylidene)-acetohydrazide (JR-12) is characterized by the presence of functional groups that facilitate interactions with molecular targets involved in inflammatory processes. In this context, the present study aimed to evaluate the non-clinical safety and anti-inflammatory activity of the compound JR-12. The Repeated Dose Toxicity Study was conducted in accordance with OECD Guideline 407. Swiss mice were divided into six groups and treated orally for 28 days with JR-12 (10 or 20 mg/kg) or vehicle (negative control). Parameters assessed included body weight, mean organ weights (heart, kidneys, spleen, liver, and stomach), average food and water intake, macroscopic aspects, and hematological parameters. The anti-inflammatory activity of JR-12 was investigated using the acute colitis model induced by 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS). Wistar rats were divided into six groups, and after an eight-hour fasting period, received a rectal administration of 10 mg TNBS solubilized in 0.25 mL of 50% v/v ethanol via a probe. Among the experimental groups, the non-colitic group was subjected only to anesthesia and probe insertion procedures, while the remaining groups were pre-treated with JR-12 (10 or 20 mg/kg), prednisolone (positive control), or vehicle (negative control) at 48, 24, and 1 hour before administration of the inflammatory agent. Following the induction of inflammation, ulcerative lesion area, percentage of inhibition, lesion score, and the weight-to-length ratio of the excised colonic segment were evaluated. The protocols were approved by the Animal Ethics Committee of the State University of Paraíba (CEUA/UEPB) under number 033/2023. The results demonstrated the toxicological safety of JR-12, with no significant alterations observed in the evaluated parameters ($p > 0.05$). In the colitis model, the compound induced a dose-dependent reduction in ulcerative lesions (87% and 92% inhibition for 10 and 20 mg/kg, respectively; $p < 0.001$), in addition to significantly reducing both lesion scores and the colon weight-to-length ratio. In conclusion, JR-12 exhibits a favorable toxicological profile and

marked intestinal anti-inflammatory activity, supporting its potential as a drug candidate for the treatment of IBDs. Further studies are necessary to elucidate the molecular targets and mechanisms underlying its biological activity.

Keywords: n-acylhydrazone; inflammation; ulcerative colitis; subchronic toxicity

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Representação do esqueleto hidrazônico.....	14
Figura 2 – Esqueleto base das N-acilhidrazonas.....	14
Figura 3 – Exemplos de moléculas bioativas de derivados N-acilhidrazônicos.....	15
Figura 4 – Estrutura química do derivado 2-ciano-N'-(3-etoxi-4 hidroxibenzilideno) acetohidrazida)	20
Figura 5 – Esquema simplificado do ensaio de modelo agudo de colite induzida TNBS.....	22
Figura 6 – Efeito na área de lesão ulcerativa no modelo de colite aguda induzida por TNBS após o tratamento com o composto JR-12 e prednisolona	28
Figura 7 - Análise macroscópica dos segmentos cólicos dos ratos tratados com JR-12 e prednisolona.....	29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Critérios de determinação de severidade e extensão da lesão colônica	21
Tabela 2 – Efeito do JR-12 nas concentrações de 10 e 20mg/kg na massa corporal dos camundongos durante 28 dias de tratamento	24
Tabela 3 – Peso relativo dos órgãos de camundongos tratados com as doses de 10 e 20mg/kg de JR-12 e o controle negativo por 28 dias	24
Tabela 4 – Avaliação dos parâmetros hematológicos ao final do tratamento com as doses de 10 e 20mg/kg de JR-12 e o controle negativo por 28 dias com JR-12.	26
Tabela 5 – Atividade anti-inflamatória intestinal do composto JR-12 no modelo de colite aguda induzida por TNBS	29

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	OBJETIVOS	13
2.1	Objetivos gerais.....	13
2.2	Objetivos específicos.....	13
3	REFERENCIAL TEÓRICO	14
3.1	Derivados acilhidrazônicos.....	14
3.2	Atividades biológicas de derivados N-acilhidrazônicos.....	15
3.4	Ensaio de toxicidade.....	16
3.5	Colite ulcerativa.....	18
4	METODOLOGIA	20
4.1	Obtenção do derivado acilhidrazônico (JR-12).....	20
4.2	Animais.....	20
4.2.1	<i>Estudo de Toxicidade de 28 dias de Dose Repetida em Roedores</i>	20
4.2.2	<i>Modelo agudo de colite induzida com ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfônico (TNBS)</i>	21
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
5.1	Avaliação da toxicidade em dose repetida do composto JR-12.....	23
5.2	Avaliação da atividade anti-inflamatória no modelo agudo de colite ulcerativa induzida por TNBS.....	27
6	CONCLUSÃO	30
	REFERÊNCIAS	31

1 INTRODUÇÃO

As doenças inflamatórias intestinais (DIIs) envolvem um conjunto divergente de doenças que geram inflamação, aguda ou crônica, na mucosa do trato gastrointestinal (TGI). São distúrbios de natureza inflamatória geradas por respostas do sistema imunológico, podendo afetar desde as regiões iniciais até as finais do TGI, dentre elas destacam-se a Colite Ulcerativa (CU) e a Doença de Crohn (DC) (Cavalcante, *et al.*, 2020).

As DIIs representam um importante problema de saúde pública por apresentar alta taxa de recorrência e um longo curso clínico, o que gera impacto negativo na vida dos indivíduos. Estima-se que mais de 5 milhões de pessoas são portadoras de DIIs pelo mundo, destas, 1,4 milhões estão presentes nos Estados Unidos da América e 3 milhões na Europa. O aumento progressivo dos casos de DIIs em regiões nas quais os índices de ocorrência eram baixos, como na América Latina, Ásia e Oriente Médio, deve-se provavelmente ao estilo de vida, agentes infecciosos, fatores de risco ambiental, alterações na microbiota intestinal e aumento no número de notificações devido a melhoria no acesso aos serviços de saúde em países em desenvolvimento (Jess, Martinato, *et al.*, 2013; Munkholm, 2015; D'haens *et al.*, 2019).

A CU é uma das doenças inflamatórias intestinais mais prevalentes, sendo responsável por uma grande parcela dos casos diagnosticados. Os principais sintomas são caracterizados como dor abdominal, diarreia crônica e sanguinolenta e tenesmo, além disso, devido ao processo inflamatório podem ocorrer perda de peso, febre e fadiga. A Colite Ulcerativa é um fator para o potencial de desenvolvimento de câncer colorretal em pacientes que possuem casos mais graves. Por esse motivo, é necessária uma abordagem terapêutica multidisciplinar, com um acompanhamento rigoroso, além de colonoscopias regulares, monitoramento da atividade inflamatória e vigilância oncológica (Guo; Wang, 2023).

A terapia farmacológica atual tem como objetivo manter a doença em estado de remissão, pelo fato de não existir a cura para esta condição. No tratamento são utilizados anti-inflamatórios, imunobiológicos e imunossupressores. Porém, os tratamentos existentes não possuem potencial de cura e causam diversos efeitos colaterais aos pacientes (Geremia *et al.*, 2014; Ungaro *et al.*, 2017).

O desenvolvimento de novos fármacos com potenciais anti-inflamatórios e antioxidantes através da química medicinal, tornou-se uma alternativa promissora para o tratamento dessas doenças, através do desenho de compostos bioativos que utilizam em sua estrutura

grupos farmacofóricos que agem nos sítios de ligação desejados, promovendo a atividade farmacológica (Eder; Drani; Wiesmann, 2014; Tresadern *et al.*, 2017).

Os derivados N-acilhidrazônicos constituem uma classe de compostos orgânicos que tem despertado crescente interesse na química medicinal devido a ampla gama de atividades biológicas em virtude de sua versatilidade estrutural e da presença do grupamento N-acilhidrazona, um farmacóforo capaz de interagir com diversos alvos biológicos (Zanatta *et al.*, 2014).

Com base no exposto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a segurança do derivado N-acilhidrazônico: 2-ciano-N'-(3-etoxi-4 hidroxibenzilideno)-acetohidrazida (JR- 12), por meio do ensaio de toxicidade subcrônica, bem como realizar a análise da atividade anti- inflamatória intestinal no tratamento da colite ulcerativa.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Avaliar a segurança do derivado N-acilhidrazônico JR-12 por meio do ensaio de toxicidade de doses repetidas e analisar o potencial terapêutico no tratamento da colite ulcerativa *in vivo*.

2.2 Objetivos específicos

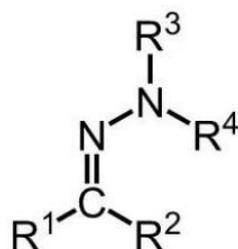
- Determinar alterações nos parâmetros bioquímicos e hematológicos induzidas pelo JR-12;
- Analisar macroscopicamente possíveis alterações nos órgãos (coração, baço, fígado e rins);
- Avaliar atividade anti-inflamatória intestinal do JR-12 no tratamento da colite ulcerativa.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Derivados acilhidrazônicos

As hidrazonas são compostos químicos que despertam intenso interesse científico devido a ampla gama de aplicabilidades biológicas, químicas e industriais. O grupo funcional hidrazona é caracterizado por possuir como estrutura base a porção triatômica C=N-N não pertencente a um heterociclo, que pode ser representado pela figura 1 (Kitaev; Buzykin, 1972).

Figura 1 – Representação do esqueleto hidrazônico

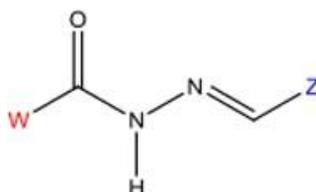


Fonte: Santos (2012).

As hidrazonas são substâncias atrativas devido a estabilidade à hidrólise e a facilidade de síntese, que é derivada da reação de hidrazinas com compostos carbonílicos (aldeídos ou cetonas). Quando a hidrazina é uma N-acilhidrazina o produto gerado é uma N-acilhidrazona (Guimarães *et al*, 2017).

N-acilhidrazonas (Figura 2) são estruturas privilegiadas por permitirem pontos de ligação para diversos receptores, resultando em uma grande variedade de alvos moleculares a partir de modificações em suas subunidades estruturais amídica (W) e imínica (Z), o que possibilita compostos com propriedades anti-inflamatórias, analgésica, antioxidante, antimicrobiana e entre outras (Barreiro; Fraga, 2015).

Figura 2 – Esqueleto base das N-acilhidrazonas

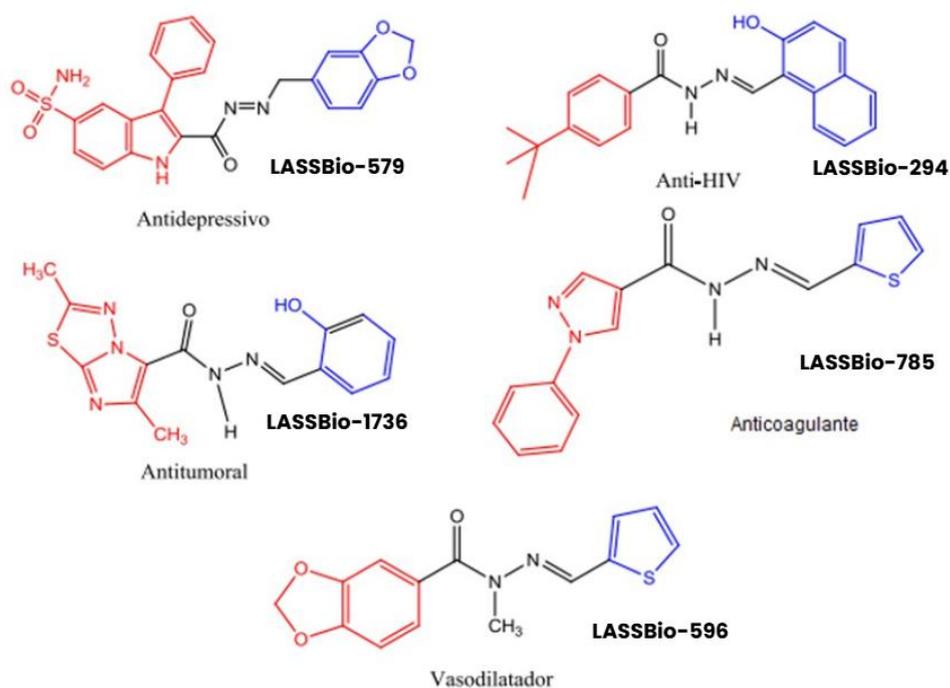


Fonte: ADAPTADO BARREIRO; FRAGA (2015)

3.2 Atividades biológicas de derivados N-acilhidrazônicos

A versatilidade dessa classe de compostos é gerada a partir de modificações estruturais que promovem um variado espectro de atividades, envolvendo uma série de mecanismos como a eliminação de radicais livres, inibição enzimática, quelação de íons, interações com o DNA, dentre outros (Figura 3) (Guimarães *et al.*, 2017).

Figura 3 – Exemplos de moléculas bioativas de derivados N-acilhidrazônicos



Fonte: ADAPTADO BARREIRO; FRAGA (2015)

Entre as principais atividades biológicas relatadas para os acilhidrazônicos, destacam-se as propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes, as quais têm sido extensivamente estudadas nos últimos anos. A atividade anti-inflamatória está associada à capacidade desses compostos em modular vias de sinalização celular envolvidas na inflamação, como a inibição da ciclooxigenase (COX), da lipoxigenase (LOX) e de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL-6 (Martins *et al.*, 2019).

Estudos demonstram que determinados derivados acilhidrazônicos apresentam atividade comparável à de anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) clássicos, mas com menor incidência de efeitos adversos gastrointestinais, sugerindo um potencial terapêutico promissor (Costa *et al.*, 2021). Essa ação tem sido atribuída à presença de grupos funcionais capazes de estabilizar a forma tautomérica ativa do composto, o que favorece sua interação com enzimas-alvo (Souza; Lima, 2017).

Além disso, os derivados acilhidrazônicos também têm se mostrado potentes agentes antioxidantes. Essa atividade é originada a partir da presença de átomos de nitrogênio e oxigênio em sua estrutura, os quais são capazes de quelar íons metálicos e neutralizar espécies reativas de oxigênio (ERO), prevenindo o estresse oxidativo e o dano celular (Ferreira *et al.*, 2020). Tal propriedade é relevante em patologias onde a inflamação e o estresse oxidativo geram danos em conjunto, como nas doenças neurodegenerativas, cardiovasculares e metabólicas (Almeida; Ribeiro, 2018).

A síntese de novos compostos acilhidrazônicos com substituintes eletrondadores ou eletroatradores têm possibilitado o desenvolvimento de compostos com maior seletividade e potência farmacológica. Essa modulação estrutural tem sido explorada como uma estratégia racional na busca por novos fármacos com perfil “multialvo”, atuando tanto como agentes antiinflamatórios quanto antioxidantes (Barros *et al.*, 2022).

A estrutura do composto JR-12 (Figura 4) é composta por um núcleo acilhidrazona ligado a um anel aromático com grupos etoxi (-OCH₂CH₃) e hidroxila (-OH), além de um grupo ciano terminal (-CN). A presença de grupos eletronegativos juntamente com a conjugação eletrônica permitem uma melhor estabilidade à molécula, favorecendo a biodisponibilidade e afinidade por receptores ligados ao processo inflamatório, tornando o JR-12 uma molécula promissora no desenvolvimento de novos fármacos anti-inflamatórios (Fraga *et al.* 2023).

3.4 Ensaios de toxicidade

O processo de desenvolvimento de novos fármacos inclui diversas etapas, entre elas pode-se destacar o planejamento de moléculas, síntese e caracterização de substâncias, ensaios toxicológicos não-clínicos e clínicos, introdução ao mercado, comercialização do fármaco e a farmacovigilância (Hornberg *et al.*, 2004). Os ensaios não-clínicos têm como objetivo avaliar os riscos potenciais do novo fármaco, a fim de evitar consequências indesejáveis à saúde dos indivíduos, dentre estes ensaios, as análises toxicológicas constituem um importante papel, pois permitem determinar os efeitos tóxicos de compostos a partir de exposições controladas e de populações padronizadas (Beck *et al.*, 2001).

Os testes *in vitro* são utilizados com o propósito de reduzir o uso animais em laboratório, seguindo o princípio da regra dos 3 R's (*replacement, reduction e refinement*) e também atuar como prévia de estudos *in vivo*, complementando e melhorando a sensibilidade e especificidade dos testes em animais (Repetto, 1995). As técnicas realizadas podem utilizar culturas celulares, cultura de tecidos, além de microrganismos como bactérias e fungos.

Os ensaios toxicológicos não-clínicos *in vivo* podem ser divididos em avaliação da toxicidade geral (dose única e repetida), carcinogenicidade, genotoxicidade, imunotoxicidade e toxicidade sobre a função reprodutiva. A função destes ensaios é caracterizar os possíveis efeitos tóxicos nos órgãos, avaliar a relação dose-resposta, bem como o intervalo terapêutico (Nugent, Duncan e Colagiovanni, 2013). A escolha do método utilizado é concretizada a partir do conhecimento das propriedades do composto a ser testado, desse modo, a seleção das espécies de animais são realizadas a partir da semelhança com o organismo humano no que diz respeito à fisiologia, bioquímica e morfologia, permitindo uma comparação viável de acordo com os resultados obtidos (Denny e Stewart, 2013).

A toxicidade aguda ou dose única é caracterizada como a etapa inicial da avaliação toxicológica da fase pré-clínica, onde a substância é testada em quantidade superior à dose terapêutica, podendo ser administrada uma única vez ou doses fracionadas durante vinte e quatro horas com a finalidade de obter-se a dose letal (DL50), além dos sinais de toxicidade e causa de morte (HAYES, 1994).

O estudo é realizado em no mínimo duas espécies de mamíferos, com grupos padronizados de ambos os sexos, nos quais a forma de administração do fármaco é estabelecida de acordo com a pretensão de administração para os humanos, podendo ser via oral, ocular, inalatória, dérmica e via parentérica (1000mg/kg/dia) (EMA, 2010). Após a administração, o estudo entra em um período de observação que possui a duração de quatorze dias, onde são observados alterações no peso dos animais, quantidade de alimento e água ingerida e comportamento (ANVISA, 2013).

A avaliação da toxicidade subcrônica tem a duração de 28 a 90 dias, na qual os animais, de ambos os sexos, são separados em grupos e expostos à substância pela via desejada (oral, inalação ou aplicação dérmica). O objetivo desta avaliação é identificar possíveis efeitos adversos e danos mais severos aos animais devido à exposição diária por um período moderado de tempo. Ao decorrer do estudo, são recolhidos dados referentes ao peso corporal, ingestão de alimento e água, características comportamentais e visuais dos animais, além disso, no final da avaliação são recolhidas amostras de sangue para as determinações bioquímicas e hematológicas e realiza-se a necrópsia dos órgãos (OECD, 2009).

3.5 Colite ulcerativa

A colite ulcerativa (CU) é uma doença inflamatória intestinal (DII) crônica que afeta especificamente o cólon e o reto, caracterizando-se por inflamação contínua da mucosa intestinal, formação de úlceras, sangramentos e sintomas clínicos como diarreia com muco e sangue, dor abdominal e perda de peso (CUNHA *et al.*, 2020).

Nas últimas décadas, tem-se apresentado um crescimento significativo de casos relatados no Brasil em função de fatores como a urbanização, mudança nos hábitos alimentares e maior número de notificações, com uma incidência estimada entre 7,1 a 15 casos por 100 mil habitantes por ano. O aumento progressivo gera um desafio para os serviços de saúde, pois como a CU é uma condição marcada por períodos de remissão e recaídas, é preciso um acompanhamento contínuo e recursos especializados que em grande maioria apresentam alto custo (Parente *et al.*, 2015).

A patogênese da CU envolve uma resposta imune desregulada a antígenos luminais em indivíduos geneticamente predispostos, além de fatores ambientais, microbiota intestinal alterada e estresse oxidativo (Faria; Souza, 2019).

O processo inflamatório crônico da colite ulcerativa está intimamente ligado à ativação de vias pró-inflamatórias, como a do fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B), que induz a produção de citocinas inflamatórias como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina-6 (IL-6) e interleucina-1 β (IL-1 β) (Oliveira; Marques, 2021). Essas moléculas perpetuam a inflamação e contribuem para o comprometimento da barreira epitelial intestinal, permitindo maior translocação de microrganismos, agravando o quadro clínico.

Além disso, a presença de espécies reativas de oxigênio (EROs) no ambiente inflamatório intestinal desempenha papel central na fisiopatologia da CU. As EROs são produzidas em excesso por células inflamatórias ativadas, como neutrófilos e macrófagos, e causam danos oxidativos a lipídios, proteínas e DNA, comprometendo a integridade das células epiteliais do cólon (Santos *et al.*, 2022). Esse estresse oxidativo acentua a resposta inflamatória e impede a regeneração adequada do tecido intestinal. Nesse contexto, estratégias terapêuticas que combinem ação anti-inflamatória e antioxidante têm se mostrado promissoras no controle da colite ulcerativa. Diversos estudos têm destacado compostos bioativos com essa dupla atividade como potenciais agentes adjuvantes ou alternativos aos medicamentos convencionais (Silva; Lopes, 2020). Os antioxidantes são capazes de neutralizar as EROs, reduzir o estresse oxidativo e restaurar o equilíbrio redox, contribuindo para a proteção da mucosa intestinal e favorecendo a reparação tecidual (Medeiros *et al.*, 2018).

Outrossim, os antioxidantes também exercem efeitos regulatórios sobre a resposta inflamatória, uma vez que as EROs atuam como sinalizadores intracelulares na ativação de vias pró-inflamatórias. Assim, a redução do estresse oxidativo pode levar à inibição da ativação do NF- κ B e à diminuição da expressão de citocinas inflamatórias (Costa *et al.*, 2021). Essa ação indireta reforça a importância de antioxidantes no manejo da colite ulcerativa, especialmente em fases ativas da doença.

A literatura recente também aponta que intervenções antioxidantes podem melhorar o perfil da microbiota intestinal, modular a produção de ácidos graxos de cadeia curta e restaurar a função de barreira da mucosa, aspectos diretamente associados ao controle da inflamação colônica (Moraes; Araújo, 2019).

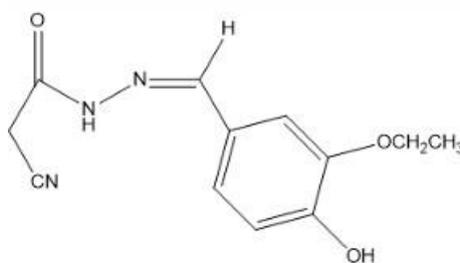
O tratamento da colite ulcerativa consiste em controlar a inflamação e na remissão dos sintomas, buscando melhorar a qualidade de vida dos pacientes. As terapias variam de acordo com a gravidade da doença, em casos leves a moderados, o tratamento de primeira linha são os derivados de 5-aminossalicílicos (5-ASA), como a mesalazina via oral ou retal. Em quadros moderados a graves, o uso de corticosteroides como a prednisolona torna-se necessário para induzir a remissão, porém, esses medicamentos não são indicados para uso prolongado por gerar efeitos adversos como a hipertensão, osteoporose e diabetes (Torres *et al.*, 2020). Além disso, o uso de imunossupressores como a azatioprina ou os antagonistas do fator de necrose tumoral (anti-TNF) como o infliximabe, apresentam limitações significativas, pois muitos pacientes não respondem ao tratamento inicial ou perdem a resposta com o tempo, o que exige a troca ou combinação de medicamentos e prejudica a adesão da terapia farmacológica (Ferrante *et al.*, 2021)

4 METODOLOGIA

4.1 Obtenção do derivado acilhidrazônico (JR-12)

O composto JR-12 (2-ciano-N'-(3-etoxi-4 hidroxibenzilideno)-acetohidrazida), conforme a figura 4, foi fornecido pelo Laboratório de Desenvolvimento e Síntese de Fármacos (LDSF) por meio da orientação do Professor Ricardo Olímpio de Moura, do departamento de Farmácia da Universidade Estadual da Paraíba.

Figura 4 - Estrutura química do derivado 2-ciano-N'-(3-etoxi-4 hidroxibenzilideno)-acetohidrazida)



Fonte: Silva (2015).

4.2 Animais

Para a avaliação da toxicidade em dose repetida do composto JR-12, foram utilizados camundongos *Mus musculus swiss* adultos, machos e fêmeas e no modelo agudo de colite foram envolvidos ratos *Rattus norvegicus wistar* adultos de ambos os sexos. Após a realização dos experimentos, os animais foram eutanasiados por excesso de associação de anestésico Cetamina 10% e Xilazina 2% via intraperitoneal como recomendado pelas Diretrizes da Prática de Eutanásia do CONCEA de 2018. Os protocolos foram aprovados pela CEUA/UEPB sob o número 033/2023, além de serem baseados na Diretriz 407 da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico (OECD)

4.2.1 Estudo de Toxicidade de 28 dias de Dose Repetida em Roedores.

Os animais foram divididos de acordo com seus pesos em 6 grupos (3 grupos de machos e 3 de fêmeas com n=6/grupo) e, foram tratados diariamente com solução salina + DMSO 5% (veículo - controle negativo) e o JR 12 solubilizado com solução salina + DMSO 5% (10 ou 20mg/kg). Durante o teste, os animais foram observados diariamente e pesados semanalmente para se necessário fazer ajuste da dose. Após a exposição, os camundongos foram anestesiados

e aproximadamente 1 mL de sangue foi retirado por punção cardíaca para ensaios bioquímicos e hematológicos. Em seguida, os animais foram eutanasiados. Os órgãos (coração, rins, baço, fígado e estômago) foram removidos para análises macroscópicas.

4.2.2 Modelo agudo de colite induzida com ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfônico (TNBS).

Após jejum de 8 horas, os animais foram anestesiados com associação dos anestésicos Xilazina a 2% e Cetamina a 10%, para a administração via retal do TNBS, 10 mg de TNBS foram solubilizados em 0,25 mL de etanol 50% v/v. A indução da inflamação foi realizada por meio de uma sonda (2 mm de diâmetro) inserida cerca de 8 cm através do reto do animal. Os animais foram divididos em 6 grupos (n=10), sendo um deles o não-colítico (basal), que foi submetido apenas aos procedimentos de anestesia e a inserção da sonda, mas não receberam o TNBS. Os outros grupos foram pré-tratados com veículo salina 10 mg/kg e DMSO 5% (controle negativo), prednisolona 2 mg/kg (controle positivo) e JR-12 nas concentrações de 10 ou 20 mg/kg v.o, nos intervalos de 48, 24 e 1 h antes da administração do TNBS/etanol 50%, assim como 24 h após a indução da colite. Após 48 h da indução do processo inflamatório, os animais foram eutanasiados (Xilazina 2% e Cetamina 10%), e o segmento cólico retirado e fotografado para quantificação da área de lesão ulcerativa (ALU) (mm²) utilizando o software ImageJ, além disso, foram analisados a porcentagem de inibição de lesão, escore de lesão, a severidade e extensão da lesão colônica (Tabela 1) e a relação peso/comprimento do cólon (Figura 5).

A seguir, apresenta-se o cálculo utilizado para a obtenção da porcentagem de cura:

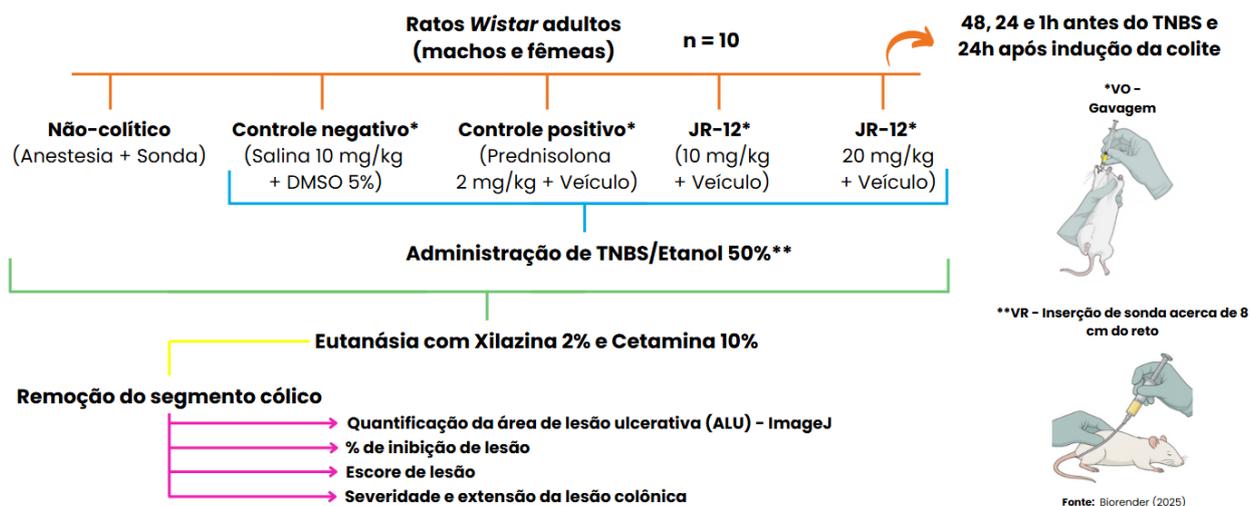
$$\text{Cura (\%)} = \frac{\text{ALU do controle negativo} - \text{ALU do grupo tratado}}{\text{ALU do controle negativo}} \times 100$$

Tabela 1 – Critérios de determinação de severidade e extensão da lesão colônica

Escore	Critério
0	Sem prejuízo
1	Hiperemia, sem úlceras
2	Úlcera linear sem inflamação significativa
3	Úlcera linear com inflamação em um sítio
4	Dois ou mais sítios de ulceração/inflamação
5	Dois ou mais sítios de ulceração/inflamação ou área inflamada maior que 1 cm
6-10	Prejuízo maior que 2 cm (escore aumenta 1 ponto por centímetro adicional)

Fonte: Bell *et al.* (1995)

Figura 5 – Esquema simplificado do ensaio de modelo agudo de colite induzida TNBS



Fonte: Elaborado pelo autor, 2025.

4.3 Análises estatísticas

Os resultados foram submetidos à análise de variância de uma via (ANOVA), seguida por teste de Dunnett ou Tukey e expressos como média \pm desvio padrão (d.p.) da média. Os dados foram analisados com a utilização do software GraphPad Prisma 6.0, San Diego, CA, EUA e o nível de significância mínimo será de $p < 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Avaliação da toxicidade em dose repetida do composto JR-12

A realização do teste de toxicidade aguda precede a avaliação da toxicidade em dose repetida pois tem como um dos objetivos estabelecer a dose letal média (DL_{50}), e gerar informações preliminares a respeito dos efeitos imediatos do composto. De acordo com a literatura, em um estudo realizado por Silva *et al.* (2015), no ensaio de toxicidade aguda por 14 dias utilizando a dose de 2000 mg/kg, o composto JR-12 não apresentou alterações sugestivas de toxicidade nos parâmetros avaliados, além disso, o estudo também forneceu informações a respeito da DL_{50} , considerada maior que 2000 mg/kg e menor que 5000 mg/kg de acordo com a OECD 407.

O teste de toxicidade de doses repetidas busca elucidar os possíveis efeitos tóxicos sistêmicos derivados da administração em dose repetida da substância estudada durante um período estabelecido entre 28 e 90 dias. Através do experimento, é possível identificar danos cumulativos aos órgãos e sistemas do animal, permitindo avaliar a segurança do novo composto e estabelecer limites seguros de exposição (OECD, 2008; ANVISA, 2013). A avaliação da toxicidade de doses repetidas em animais é uma análise promissora, visto que existe uma boa correlação dos resultados dos ensaios toxicológicos em roedores quando comparados aos resultados dos testes com o organismo humano (Chapman, 2015).

No decorrer do ensaio, não houveram mortes e nem alterações comportamentais nos camundongos em ambos os sexos e doses de tratamento (10 e 20mg/kg), ademais, o consumo de água e ração permaneceram normais quando comparados ao controle negativo durante todo o experimento.

A análise da evolução dos pesos dos camundongos, é um dos parâmetros utilizados para realizar o monitoramento do estado geral de saúde animal, pois variações bruscas podem indicar efeitos tóxicos e sistêmicos da administração do composto estudado. A perda de peso pode ser um indicativo da perda de apetite, distúrbios metabólicos, alterações gastrointestinais e entre outras problemáticas, por outro lado, o ganho ou manutenção do peso é um indicativo de boa tolerância a substância, além de altas chances da ausência de efeitos adversos (Santos *et al.* 2020).

Durante o todo o experimento, não houveram alterações significativas no peso dos animais em ambas as concentrações utilizadas quando comparadas ao controle negativo (Tabela 2), permanecendo em padrões normais pelos 28 dias.

Tabela 2 - Efeito do JR-12 nas concentrações de 10 e 20mg/kg na massa corporal dos camundongos durante 28 dias de tratamento.

Machos				Fêmeas			
Dias	Controle	JR-12 10mg/kg	JR-12 20mg/kg	Dias	Controle	JR-12 10mg/kg	JR-12 20mg/kg
1	31.50±0.55	32.17±1.32	30.00±1.58	1	23.00±1.55	23.00±1.09	23.17±3.06
7	31.33±0.52	32.00±1.26	30.20±1.30	7	22.33±0.51	22.67±1.03	23.17±3.02
14	31.17±0.89	32.33±1.97	30.17±2.13	14	23.10±0.89	22.67±1.52	24.00±2.53
21	31.33±0.52	32.50±1.76	30.00±2.00	21	23.33±1.03	22.78±1.03	24.17±2.71
24	32.00±0.20	32.53±1.96	30.20±2.48	24	24.00±1.55	23.50±0.84	24.33±2.50

Os resultados são expressos como média ± dpm. Anova, seguido do pós-teste de Dunnett. Não houve diferença estatística ($p > 0,05$) quando comparado ao controle negativo.

Fonte: Elaborado pelo autor, 2024.

Após a eutanásia dos animais, os órgãos (fígado, rins, baço, coração e estômago) foram removidos, pesados e analisados macroscopicamente. Todos os órgãos dos grupos do ensaio possuíam padrões normais de coloração, tamanho e demais características externas quando comparados ao grupo controle.

Tabela 3 - Peso relativo dos órgãos de camundongos tratados com as doses de 10 e 20mg/kg de JR-12 e o controle negativo por 28 dias.

Órgãos (Machos)	Controle	JR-12 10mg/kg	JR-12 20mg/kg	Órgãos (Fêmeas)	Controle	JR-12 10mg/kg	JR-12 20mg/kg
Fígado	5.52±0.29	5.05±0.17	5.13±0.90	Fígado	5.52±0.18	5.48±0.76	5.71±0.58
Rim direito	0.85±0.12	0.76±0.06	0.75±0.08	Rim direito	0.82±0.08	0.77±0.15	0.73±0.10
Rim esquerdo	0.86±0.13	0.83±0.11	0.78±0.10	Rim esquerdo	0.81±0.10	0.76±0.34	0.75±0.15
Baço	0.40±0.08	0.43±0.07	0.47±0.08	Baço	0.47±0.14	0.49±0.11	0.50±0.11
Coração	0.47±0.11	0.47±0.08	0.51±0.13	Coração	0.60±0.03	0.53±0.16	0.49±0.19
Estômago	1.11±0.27	1.04±0.13	1.17±0.13	Estômago	1.18±0.21	1.28±0.17	1.27±0.12

Os resultados são expressos como média ± dpm. Anova, seguido do pós-teste de Dunnett. Não houve diferença estatística ($p > 0,05$) quando comparado ao controle negativo.

Fonte: Elaborado pelo autor, 2024.

A avaliação dos pesos relativos e absolutos dos órgãos quando combinados com exames bioquímicos e histológicos são indicadores fundamentais durante estudos de toxicidade, pois alterações significativas podem revelar atrofia, hipertrofia, inflamação e ainda o acúmulo de compostos tóxicos. Para exemplificar, um aumento no peso do fígado poderia sugerir esteatose hepática, indução enzimática ou processos inflamatórios (Souza *et al.*, 2021).

Os órgãos dos animais que passaram pelo tratamento nas concentrações de 10 e 20 mg/kg do JR-12 apresentaram o peso padrão, havendo semelhanças com o grupo controle, sem possuir alterações significativas (Tabela 3), sendo assim um indicativo de segurança da molécula testada.

A análise dos parâmetros bioquímicos representa uma das etapas dos estudos de toxicidade de doses repetidas permitindo por meio da dosagem de marcadores séricos a presença de alterações que não são evidentes no comportamento e morfologia dos órgãos dos animais (AN VISA, 2013).

Tanto no corpo humano quanto no corpo animal podem ser observadas enzimas como a transaminase glutâmico-oxalacética (TGO) e transaminase glutâmico-pirúvica (TGP) que são encontradas em vários tecidos e órgãos. O aumento da concentração sérica de TGO é um indicativo de dano celular, pois está presente no citoplasma e nas mitocôndrias. TGP por sua vez, apresenta maior especificidade para o citoplasma das células hepáticas, logo, o seu aumento caracteriza possíveis lesões no fígado (Stryer, 2000).

O estado nutricional e acompanhamento de doenças hepáticas avançadas, doenças renais entre outras patologias podem ser monitoradas a partir da análise das proteínas totais. Como o fígado é o único órgão capaz de sintetizar albumina sérica, através de taxas alteradas desse parâmetro, juntamente com o resultado das proteínas totais são possíveis fatores indicativos de danos hepáticos (Santos *et al.*, 2004).

Na função renal, destacam-se os parâmetros ureia, creatinina e eletrólitos séricos, que refletem a capacidade de filtração glomerular e o equilíbrio hidroeletrólítico, logo, alterações nas concentrações destes fatores seria sugestivo de insuficiência renal aguda e nefrotoxicidade. Marcadores como glicose, triglicerídeos e colesterol são responsáveis por avaliar a homeostase geral do organismo após a administração em dose repetida da substância teste, visto que as taxas bioquímicas quando associadas a parâmetros de peso corporal e órgãos geram informações que podem ser correlacionadas (Souza *et al.*, 2021).

As análises bioquímicas não foram realizadas, no entanto, em um estudo realizado anteriormente por Silva *et al.* (2015), em uma avaliação da toxicidade aguda na qual foi utilizada a dose de 2000 mg/kg de JR-12, não houveram alterações em nenhum dos parâmetros

bioquímicos citados anteriormente quando comparados ao controle negativo, podendo sugerir que as doses utilizadas na avaliação da toxicidade de doses repetidas também não apresentam toxicidade hepática e renal.

Tabela 4 - Avaliação dos parâmetros hematológicos ao final do tratamento com as doses de 10 e 20mg/kg de JR-12 e o controle negativo por 28 dias com JR-12.

Parâmetro	Sexo	Controle	JR-12 10mg/kg	JR-12 20mg/kg
Hemácias ($10^6/\text{mm}^3$)	Machos	8,092± 0,68	8,059 ± 0,63	8,218± 0,53
	Fêmeas	7,840± 1,10	7,916 ± 0,60	8,034± 0,60
Hemoglobina g/Dl)	Machos	13,04 ± 0,36	12,44 ± 1,50	13,32 ± 1,08
	Fêmeas	12,18 ± 0,36	12,98 ± 1,02	12,40 ± 1,08
Hematócrito (%)	Machos	39,80 ± 2,14	34,95 ± 3,49	38,70 ± 3,92
	Fêmeas	36,30 ± 3,83	38,85 ± 2,15	36,56 ± 2,82
VCM (μm^3)	Machos	45,02± 3,06	32,84 ± 0,34	35,58 ± 2,02
	Fêmeas	32,13± 0,35	30,84 ± 1,81	34,30± 2,18
CHCM (g/dL)	Machos	45,02± 3,06	44,09 ± 3,28	47,64 ± 1,88
	Fêmeas	47,28± 1,89	45,08 ± 2,61	48,02 ± 2,92
Plaquetas($10^3/\text{mm}^3$)	Machos	1540± 232,4	1387 ± 191,1	1497± 159,9
	Fêmeas	1450± 268,4	1352 ± 178,9	1362± 180,8
Leucócitos ($10^3/\text{mm}^3$)	Machos	4,780 ± 2,23	4,800 ± 1,19	4,200 ± 1,78
	Fêmeas	4,340 ± 1,11	4,840 ± 1,14	5,076 ± 1,19
Segmentados (%)	Machos	12,03 ± 1,37	13,20 ± 1,85	12,10 ± 1,49
	Fêmeas	12,36 ± 1,38	11,64 ± 1,69	12,58 ± 1,92
Linfócitos (%)	Machos	80,65 ± 8,58	79,92 ± 9,13	77,60 ± 9,94
	Fêmeas	80,60 ± 8,10	81,00 ± 8,89	81,12 ± 9,78
Monócitos (%)	Machos	2,6 ± 1,52	2,8 ± 0,83	2,4 ± 1,14
	Fêmeas	2,6 ± 1,14	2,4 ± 1,51	2,5 ± 1,34
Eosinófilos (%)	Machos	2,2 ± 1,78	1,9 ± 1,95	2,1 ± 1,78
	Fêmeas	2,1 ± 1,02	1,8± 0,96	1,9 ± 0,89

Os resultados são expressos como média ± dpm. Anova, seguido do pós-teste de Dunnett. Não houve diferença estatística ($p > 0,05$) quando comparado ao controle negativo.

Fonte: Elaborado pelo autor, 2024.

Quanto as análises hematológicas, por meio dos principais parâmetros quantificados é possível fornecer informações a respeito do sistema hematopoiético, além do estado imunológico dos animais submetidos as dosagens do JR-12 pelo período do ensaio.

Os índices da série vermelha são importantes para a detectar anemias, hemólises ou alterações na produção de hemácias, sendo indicativos de danos diretos a medula óssea ou perda sanguínea. A série branca, pode revelar se o composto teste gerou respostas inflamatórias, reações alérgicas e outras informações como por exemplo a neutropenia (diminuição de neutrófilos) que indicaria uma imunossupressão. Além disso, a contagem de plaquetas é fundamental no monitoramento de distúrbios de coagulação e reação adversa imunomediada (Melo *et al.*, 2020).

Os resultados dos exames hematológicos (Tabela 4) revelaram que o JR-12, não gerou nenhuma alteração significativa nos fatores analisados, sem sinais de hemólise ou alterações no formato e tamanho das hemácias, além disso, a série branca permaneceu dentro da normalidade esperada para um composto não tóxico, corroborando com o estudo de toxicidade aguda realizado por Silva *et al.* (2015).

Dentre os tratamentos utilizados para o processo de remissão dos sintomas da CU, a prednisolona é um glicocorticoide amplamente utilizado por promover a inibição de citocinas pró-inflamatórias, suprimir a atividade de células pertencentes ao sistema imune e induzir a apoptose de linfócitos T.(Fauci *et al.*, 2020). A imunossupressão sistêmica induzida pelos corticosteroides pode aumentar em níveis significativos a suscetibilidade dos pacientes a infecções oportunistas e prejudicar a vigilância imunológica contra células cancerígenas (Abello *et al.*, 2017). O estudo sugere que o JR-12 apresenta vantagem terapêutica quando comparado a prednisolona, por não apresentar efeitos imunossupressores detectáveis.

5.2 Avaliação da atividade anti-inflamatória no modelo agudo de colite ulcerativa induzida por TNBS

A indução de colite ulcerativa aguda por TNBS destaca-se por reproduzir aspectos imunológicos e histológicos da colite humana em animais. O agente alquilante 2,4,6-trinitrobenzeno sulfônico gera reações com as proteínas da mucosa intestinal e leva a formação de antígenos que provocam uma resposta imunológica mediada por linfócitos T, o que favorece o processo inflamatório e a necrose tecidual (Melgar; Karlsson; Michaelsson, 2005).

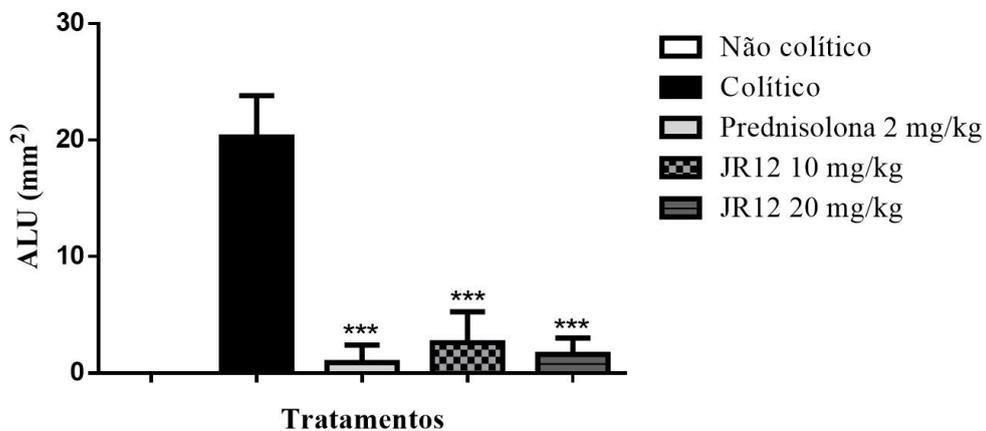
A área de lesão é um indicador direto do dano gerado pela inflamação induzida no

ensaio (Neurath, 2014). Como esperado, os animais do grupo colítico apresentaram necrose e inflamação, com a área de lesão de $20,26 \pm 3,56 \text{ mm}^2$. Os grupos tratados com prednisolona e o composto JR-12, apresentaram redução significativa da área lesada, indicando o efeito protetor (Figura 6).

A porcentagem de inibição da lesão quantifica a eficácia do composto testado por meio da comparação com o grupo colítico. A administração do JR-12 nas doses de 10 e 20 mg/kg gerou uma inibição significativa (87 e 92%, respectivamente) da lesão provocada pelo TNBS, quando comparado ao grupo colítico (Tabela 5), sugerindo uma resposta positiva ao tratamento.

De acordo com Zhou *et al.* (2019), a inibição pode ter relação com a redução de espécies reativas de oxigênio (ROS), ou da diminuição da migração de leucócitos, efeitos que já foram estudados em outros compostos bioativos com atividade anti-inflamatória intestinal.

Figura 6 - Efeito na área de lesão ulcerativa no modelo de colite aguda induzida por TNBS após o tratamento com o composto JR-12 e prednisolona

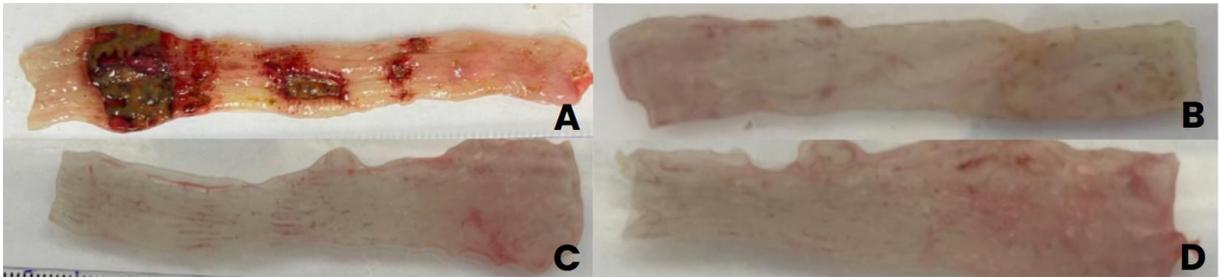


Os dados são expressos como média \pm desvio padrão da média. Foi utilizada ANOVA seguido do pós-teste de Dunnett ou Tukey. *** $p < 0,001$ quando comparado ao grupo controle negativo. Não houve diferença estatística entre as doses. ALU = Área de Lesão Ulcerativa

Fonte: Elaborado pelo autor, 2024.

O escore de lesão leva como consideração principal as características visuais do segmento cólico retirado, como a presença de ulcerações, espessamento da parede colônica, edema, hiperemia e necrose. Os grupos tratados com JR-12 em ambas as concentrações apresentaram escores semelhantes ao grupo tratado com prednisolona, indicando uma eficácia na supressão da inflamação semelhante aos fármacos imunomoduladores (Figura 7).

Figura 7 – Análise macroscópica dos segmentos cólicos dos ratos tratados com JR-12 e prednisolona



Imagens dos segmentos cólicos dos ratos tratados com JR-12 e prednisolona, revelando mudanças macroscópicas na área interna do segmento retirado. (A) grupo colítico; (B) grupo tratado com prednisolona; (C) grupo tratado com JR-12 10 mg/kg; (D) grupo tratado com JR-12 20 mg/kg.

Fonte: Elaborado pelo autor, 2024

A relação peso/comprimento reflete o grau de edema e infiltração celular. Os grupos tratados com JR-12 em ambas concentrações e a prednisolona apresentaram valores próximos quando comparados com o grupo não colítico, sugerindo que o derivado acilhidrazônico foi capaz de limitar o processo inflamatório (Tabela 5).

Tabela 5 – Atividade anti-inflamatória intestinal do composto JR-12 no modelo de colite aguda induzida por TNBS

Tratamentos	Área de lesão	% de inibição	Escore de lesão	Peso/Comprimento (mg/cm)
Não colítico	ND	ND	ND	93,3 ± 13,5
Colítico	20,26 ± 3,56 ^{###}	ND	8,4 ± 1,5 ^{###}	205,5 ± 15,4 ^{###}
Prednisolona	0,91 ± 1,50 ^{***}	95,51%	1,3 ± 1,0 ^{***}	108,8 ± 16,1 ^{***}
JR12 10 mg/kg	2,62 ± 2,64 ^{***}	87,07%	2,2 ± 1,8 ^{***}	131,1 ± 16,0 ^{***}
JR12 20 mg/kg	1,61 ± 1,40 ^{***}	92,05%	1,3 ± 0,8 ^{***}	123,3 ± 14,7 ^{***}

Os dados são expressos como média ± desvio padrão da média. Foi utilizada ANOVA seguido do pós-teste de Dunnet ou Tukey. *** $p < 0,001$ quando comparado ao grupo controle negativo, ### $p < 0,001$ comparado ao grupo não colítico. (n=7-10). ND = não detectável. Não houve diferença estatística entre as doses.

Fonte: Elaborado pelo autor, 2024

O aumento do peso do segmento colônico sugere a presença de inflamação aguda devido ao acúmulo excessivo de fluido e células no tecido, enquanto o comprimento reduzido é um fator característico do espessamento da parede intestinal com a presença de fibrose, levando ao encurtamento da camada muscular, logo reduzindo o tamanho do cólon (Singh *et al.* 2017).

Desse modo, o JR-12 por meio do ensaio de toxicidade em doses repetidas, demonstrou que ambas as doses de 10 e 20 mg/kg não geraram alterações em nenhum parâmetro toxicológico analisado, ademais foi evidenciado um efeito protetor e anti-inflamatório que resultou na diminuição da extensão e intensidade das úlceras induzidas pelo TNBS.

6 CONCLUSÃO

Por meio das avaliações de toxicidade de doses repetidas e atividade anti-inflamatória intestinal foi possível concluir que o derivado N-acilhidrazônico JR-12:

- Demonstrou segurança durante o ensaio de toxicidade em dose repetida por 28 dias nas doses de 10 e 20 mg/kg, sem provocar morte de nenhum animal;
- Não provocou alterações significativas comportamentais, nem na morfologia, dos órgãos dos animais submetidos ao ensaio;
- Apresentou atividade anti-inflamatória intestinal devido a uma redução dos parâmetros inflamatórios analisados quando comparados ao grupo controle, ao diminuir a severidade e tamanho das lesões provocadas pelo TNBS, sugerindo um efeito protetor da mucosa intestinal contra as ulcerações derivadas da inflamação;
- É um composto promissor para o tratamento das doenças inflamatórias intestinais, como a colite ulcerativa, desse modo, é necessário a continuidade dos estudos do JR-12 para desvendar os mecanismos envolvidos na sua atividade biológica.

REFERÊNCIAS

- ABELLO, A. *et al.* Risks of infection associated with corticosteroid therapy. **Current Opinion in Pulmonary Medicine**, v. 23, n. 3, p. 250–256, 2017.
- AGRAWAL, M.; COLOMBEL, J. F. Treat-to-Target in Inflammatory Bowel Diseases, What Is the Target and How Do We Treat?. **Gastrointestinal Endoscopy Clinics of North America**, v. 29, n. 3, p. 421–436, 2019.
- ALMEIDA, J. M. *et al.* Atividade antioxidante de acilhidrazonas: implicações para doenças inflamatórias intestinais. **Revista Brasileira de Química Medicinal**, v. 7, n. 1, p. 44–52, 2020.
- ALMEIDA, R. M.; RIBEIRO, J. F. Estresse oxidativo e inflamação: implicações farmacológicas e terapêuticas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 54, n. 2, p. 220–232, 2018.
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica**. Brasília: ANVISA, 2013. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa>. Acesso em: 20 abr. 2025.
- BARREIRO, E. J., FRAGA, C. A. M., MIRANDA, A. L. P., RODRIGUES, C. R. A química medicinal de n-acilhidrazonas: novos compostos-protótipos de fármacos analgésicos, antiinflamatórios e anti-trombóticos. **Química Nova**, v. 25, n. 1, p. 129–148, 2002.
- BARROS, L. C. *et al.* Desenvolvimento de acilhidrazonas bioativas com ação anti-inflamatória e antioxidante: uma abordagem racional. **Química Nova**, v. 45, n. 3, p. 378–385, 2022.
- BELL, C.J.; GALL, D.G.; WALLACE, J.L. Disruption of colonic electrolyte transport in experimental colitis. **Am J Physiol**, v.268, p. G622–630, 1995
- BURISCH, J.; MUNKHOLM, P. The epidemiology of inflammatory bowel disease. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 50, n. 8, p. 942–951, 2015.
- CAMPBELL, I. B.; MACDONALD, S. J. F.; PROCOPIOU, P. A. Medicinal chemistry in drug discovery in big pharma: past, present and future. **Drug Discovery Today**, v. 23, n. 2, p. 219–234, 2018.
- CAVALCANTE, R. M. S. *et al.* Inflammatory bowel diseases and diet: an integrative review. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 66, n. 10, p. 1449–1454, 2020.
- COSTA, A. V.; NOGUEIRA, T. F. Otimização estrutural de derivados acilhidrazônicos com atividade anti-inflamatória e antioxidante. **Química Nova**, v. 44, n. 4, p. 987–994, 2021.
- COSTA, F. M. *et al.* Papel das espécies reativas de oxigênio na colite ulcerativa: implicações para o tratamento antioxidante. **Revista de Gastroenterologia Clínica**, v. 17, n. 3, p. 201–210, 2021.
- COSTA, J. D. *et al.* Avaliação da atividade anti-inflamatória de novos derivados acilhidrazônicos. **Revista Brasileira de Farmacologia Experimental**, v. 31, n. 4, p. 456–463, 2021.
- CUNHA, R. J. *et al.* Colite ulcerativa: aspectos clínicos, patológicos e terapêuticos. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 25, n. 1, p. 55–64, 2020.

- EDER, J.; SEDRANI, R.; WIESMANN, C. The discovery of first-in-class drugs: origins and evolution. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 13, n. 8, p. 577–587, 2014.
- ESTERBAUER, H.; CHEESEMAN, K. H. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. **Methods in Enzymology**, v. 186, p. 407–421, 1990.
- FAUCI, A. S. *et al.* Harrison: princípios de medicina interna. 21. ed. Rio de Janeiro: **McGraw-Hill Education**, 2020. p. 215-238.
- FAURE, P.; LAFOND, J. L. Measurement of plasma sulfhydryl and carbonyl groups as a possible indicator of protein oxidation. In: FAVIER, A. E. *et al.* **Analysis of Free Radicals in Biological Systems**. Basel: Birkhäuser Basel, 1995. p. 237–248.
- FARIA, M. E. *et al.* Colite ulcerativa: aspectos patológicos e estratégias terapêuticas emergentes. **Jornal de Gastroenterologia e Hepatologia**, v. 33, n. 3, p. 213–220, 2019.
- FARIA, M. T.; SOUZA, L. C. Mecanismos imunológicos envolvidos na colite ulcerativa: uma revisão. **Revista Brasileira de Imunologia**, v. 10, n. 2, p. 88–97, 2019.
- FERNANDES, L. R. *et al.* Avaliação de derivados acilhidrazônicos em modelo murino de colite induzida por DSS. **Archives of Pharmacology and Experimental Medicine**, v. 15, n. 2, p. 101–110, 2023.
- FERRANTE, M. *et al.* Real-life experience with biologics in IBD: a review. **Therapeutic Advances in Gastroenterology**, v. 14, p. 1–15, 2021.
- FERREIRA, R. T. *et al.* Potencial antioxidante de acilhidrazonas: estudo in vitro e in silico. **Revista de Química Medicinal e Biológica**, v. 9, n. 1, p. 15–23, 2020.
- FRAGA, C. A. M. *et al.* A novel N-acylhydrazone derivative (JR-12) with anti-inflammatory activity in models of allergic asthma and pulmonary fibrosis. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 153, 2023.
- GEREMIA, A. *et al.* Innate and adaptive immunity in inflammatory bowel disease. **Autoimmunity**, v. 13, p. 3–10, 2014.
- KAPLAN, G. G. Evolving epidemiology of IBD. **Current Gastroenterology Reports**, v. 21, n. 40, 2019.
- MARQUES, C. R.; OLIVEIRA, J. A. Citocinas inflamatórias na colite ulcerativa: papel central da via NF- κ B. **Acta Médica Brasileira**, v. 37, n. 4, p. 331–338, 2021.
- MARTINS, A. C.; ALVES, P. R. Estresse oxidativo e inflamação na colite ulcerativa: papel de antioxidantes terapêuticos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 41, n. 2, p. 233–239, 2020.
- MARTINS, M. F. *et al.* Derivados acilhidrazônicos como inibidores de enzimas pró-inflamatórias: uma revisão. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 55, e18066, 2019.
- MEDEIROS, P. R. *et al.* Efeitos antioxidantes na inflamação intestinal: foco em doenças inflamatórias intestinais. **Revista Brasileira de Farmacologia Experimental**, v. 14, n. 2, p. 122–130, 2018.

MELO, C. S. *et al.* Avaliação hematológica em estudos toxicológicos pré-clínicos: importância e interpretação. **Revista de Toxicologia Experimental**, v. 11, n. 2, p. 60–68, 2020.

MELGAR, S.; KARLSSON, A.; MICHAËLSSON, E. Acute colitis induced by dextran sulfate sodium progresses to chronicity in C57BL/6 but not in BALB/c mice: correlation between symptoms and inflammation. **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 288, n. 6, p. G1328–G1338, 2005.

MORAES, A. L.; ARAÚJO, M. F. Interação entre antioxidantes, microbiota intestinal e colite ulcerativa: novas perspectivas terapêuticas. **Revista de Nutrição Clínica e Experimental**, v. 6, n. 1, p. 45–53, 2019.

NEURATH, M. F. Cytokines in inflammatory bowel disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, n. 5, p. 329–342, 2014.

NG, S. C. Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies. **Lancet**, v. 390, p. 769–778, 2018.

NIKKHAH-BODAGHI, M. *et al.* The effects of *Nigella sativa* on quality of life, disease activity index, and some of inflammatory and oxidative stress factors in patients with ulcerative colitis. **Phytotherapy Research**, v. 33, n. 4, p. 1027–1032, 2019.

OECD – Organisation for Economic Co-operation and Development. **Guidelines for the Testing of Chemicals: Repeated Dose 90-Day Oral Toxicity Study in Rodents (OECD TG 408)**. Paris: OECD Publishing, 2008.

PARENTE, J. M. L. *et al.* Inflammatory bowel disease in an underdeveloped region of northeastern Brazil. **World Journal of Gastroenterology**, v. 21, n. 4, p. 1197–1206, 2015.

PEREIRA, L. M.; SANTOS, F. D. Espécies reativas de oxigênio e mecanismos antioxidantes na inflamação intestinal. **Revista Brasileira de Ciências Biológicas**, v. 9, n. 1, p. 65–74, 2018.

PEREIRA, W. A.; OLIVEIRA, M. L. Acilhidrazonas: síntese, propriedades e aplicações farmacológicas. **Cadernos de Química**, v. 29, n. 1, p. 35–47, 2018.

PLOWRIGHT, A. T. *et al.* Joining forces: the chemical biology–medicinal chemistry continuum. **Cell Chemical Biology**, v. 24, n. 9, p. 1058–1065, 2017.

RAMOS, F. J. *et al.* Derivados acilhidrazônicos como anti-inflamatórios em modelos de doença inflamatória intestinal. **Acta Farmacêutica Latinoamericana**, v. 39, n. 3, p. 198–206, 2022.

SANTOS, F. T. *et al.* Avaliação do peso corporal como indicador de toxicidade em estudos pré-clínicos. **Revista Brasileira de Toxicologia Aplicada**, v. 16, n. 1, p. 21–29, 2020.

SANTOS, V. P. *et al.* Estresse oxidativo na colite ulcerativa: mecanismos de dano e possibilidades terapêuticas. **Revista de Ciências Biomédicas**, v. 11, n. 1, p. 17–25, 2022.

SILVA, D. F.; LOPES, M. C. Terapias antioxidantes no tratamento de doenças inflamatórias intestinais: uma abordagem baseada em evidências. **Cadernos de Farmácia**, v. 28, n. 2, p. 85–94, 2020.

- SILVA, S. C. da. Caracterização farmacológica pré-clínica da atividade anti-inflamatória de Acilhidrazônicos. 2015. 112 f. **Dissertação (Mestrado em Farmacologia)** – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2015.
- SILVA, T. S. *et al.* Síntese e avaliação biológica de derivados acilhidrazônicos com potencial farmacológico. **Acta Farmacêutica Bonaerense**, v. 39, n. 2, p. 198–204, 2020.
- SINGH, Y. *et al.* Novel anti-inflammatory therapy for ulcerative colitis: molecular targets and animal models. **Inflammopharmacology**, v. 25, p. 511–529, 2017.
- SOUZA, A. R. *et al.* Avaliação do peso de órgãos em estudos toxicológicos: implicações na interpretação de efeitos adversos. **Revista de Toxicologia Experimental**, v. 12, n. 1, p. 34–41, 2021.
- SOUZA, R. L. *et al.* Acilhidrazonas: potencial terapêutico em condições inflamatórias e oxidativas. **Revista Virtual de Química**, v. 13, n. 6, p. 1251–1264, 2021.
- SOUZA, R. L.; LIMA, K. C. Estrutura e atividade biológica de acilhidrazonas: uma análise da relação estrutura-atividade (SAR). **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 6, p. 2457–2470, 2017.
- SUN, Y.; OBERLEY, L. W.; LI, Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. **Clinical Chemistry**, v. 34, n. 3, p. 497–500, 1988.
- TORRES, J. *et al.* Crohn's disease. **The Lancet**, v. 389, n. 10080, p. 1741–1755, 2017.
- TORRES, J. *et al.* ECCO Guidelines on Therapeutics in Ulcerative Colitis: Medical Treatment. **Journal of Crohn's and Colitis**, v. 14, n. 1, p. 4–22, 2020.
- TRESADERN, G. *et al.* Industrial medicinal chemistry insights: neuroscience hit generation at Janssen. **Drug Discovery Today**, v. 22, n. 10, p. 1478–1488, 2017.
- UNGARO, R. *et al.* Ulcerative colitis. **The Lancet**, v. 389, p. 1756–1770, 2017.
- VENKATESAN, N.; RAMANATHAN, M. Preclinical toxicity studies – tool of drug discovery. **Pharmacovigilance & Pharmacoepidemiology**, p. 1–7, 2017.
- ZANATTA, S. D. *et al.* N-Acylhydrazones as privileged structures in medicinal chemistry: a review. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 4, p. 313–321, 2014.
- ZHOU, Y. *et al.* Anti-inflammatory activity of natural products for chronic diseases: a review. **Pharmaceuticals**, v. 12, n. 4, p. 1–27, 2019.