



UEPB

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

MARIA CRISLÂNDIA FREIRE DE ALMEIDA

**ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DE UM COMPOSTO HÍBRIDO INDÓLICO
FENILACRILAMIDA**

**CAMPINA GRANDE
2019**

MARIA CRISLÂNDIA FREIRE DE ALMEIDA

**ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DE UM COMPOSTO HÍBRIDO INDÓLICO
FENILACRILAMIDA**

Trabalho de Conclusão de Curso da
Universidade Estadual da Paraíba, como
requisito parcial à obtenção do título de
graduado em Farmácia Generalista.

Área de concentração: Saúde

Orientadora: Profa. Dra. Vanda Lucia dos Santos

Coorientador: Pablo Rayff da Silva

**CAMPINA GRANDE
2019**

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, Maria Crislandia Freire de.
Atividade anti-inflamatória de um composto híbrido indólico fenilacrilamida [manuscrito] / Maria Crislandia Freire de Almeida. - 2019.
46 p. : il. colorido.
Digitado.
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2019.
"Orientação : Profa. Dra. Vanda Lúcia dos Santos ,
Coordenação do Curso de Farmácia - CCBS."
"Coorientação: Prof. Me. Pablo Rayff da Silva ,
Coordenação do Curso de Farmácia - CCBS."
1. Anti-inflamatórios. 2. Edema de pata. 3. Peritonite. 4.
Toxicidade gástrica. I. Título
21. ed. CDD 615.1

MARIA CRISLÂNDIA FREIRE DE ALMEIDA

ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DE UM COMPOSTO HÍBRIDO INDÓLICO
FENILACRILAMIDA

Trabalho de Conclusão de Curso da
Universidade Estadual da Paraíba, como
requisito parcial à obtenção do título de
Graduado em Farmácia Generalista.

Área de concentração: Saúde.

Aprovada em: 12/11/2019.

BANCA EXAMINADORA

Vanda Lucia dos Santos

Profa. Dra. Vanda Lucia dos Santos (Orientador)
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

Ivana Maria Fechine

Profa. Dra. Ivana Maria Fechine
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

Maria Elaine Cristina Araruna

Profa. Me. Maria Elaine Cristina Araruna
Faculdade Rebouças (FRCG)

“Há tempo de nascer, e tempo de morrer;
tempo de plantar, e tempo de arrancar o
que se plantou.” Eclesiastes 3:2

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela dádiva da vida e por me permitir realizar tantos sonhos nesta existência. Obrigado por me permitir errar, aprender e crescer, por Sua eterna compreensão e tolerância, por Seu infinito amor, pela Sua voz “invisível” que não me permitiu desistir e me prova a todo instante que “tudo tem o seu tempo determinado, e há tempo para todo propósito debaixo do céu” (Eclesiastes- 3:1). Gratidão!

Dedico este trabalho à minha família, vocês têm a minha gratidão eterna e eu nunca esquecerei tudo que fizeram por mim. Pai, obrigada por sempre nos poupar nos desvios e pelo incentivo de sempre para conclusão dos meus estudos, pelo seu sacrifício diário para que isso fosse possível, obrigada por acreditar antes que eu, que daria certo. Mãe, minha rainha, serei sempre grata pelo apoio, por sacrificar seu tempo, sua saúde e suas conquistas para que eu pudesse estudar, obrigada também pelos cuidados de sempre.

Aos meus irmãos, que são verdadeiros presentes de Deus. Carla, minha segunda mãe, sou grata por tanto! Sou prova que já eras mãe antes mesmo de ter gerado em seu ventre um ser lindo, gratidão. Kelly, és uma mulher que exala forças, obrigada por estar presente e pelo apoio de sempre. Jefferson, o detentor da minha inspiração diária, deixo aqui explícito que você vai na frente desbravando os caminhos e eu vou em seguida. Obrigada por tudo, meus amados, é muito bom ser a caçula entre vocês. Agradeço também as minhas sobrinhas (flores do meu jardim) que me divertiram tanto nos meus momentos de desânimo, vocês acalmam o meu coração, amo vocês.

A Jefferson Diego, namorado, amigo e companheiro sou imensamente grata. Obrigada pela paciência e compreensão nos meus momentos de desânimo e de ausência, por sempre dar o seu jeitinho para me fazer sorrir. Sou grata por tanto e por tudo, meu amor.

Aos meus amigos e familiares que sempre foram o meu local de refúgio. Larissa, Mychele, Joyce, Rayssa e Jéssica, vocês são essenciais na minha vida. Obrigada por serem tão compreensivas ao longo desses anos, que mesmo na ausência se fizeram presentes a todo momento.

Aos amigos que conquistei ao longo da graduação, vocês são muito especiais! Obrigada por sempre terem paciência comigo, por me incentivarem a ir mais um pouco, a continuar. Rommel, obrigada pelas conversas, pelas canções,

pelos aprendizados. Livia obrigada por tanto carinho para com todos, Thamyres é uma mulher incrível, obrigada pela amizade. Cristina, Miqueas e Renata gosto especialmente de vocês. Obrigada pelos cafés acompanhados de risadas, conversas aleatórias que iam de assuntos de trabalhos, artigos, projetos até aos assuntos mais íntimos, familiares. Sei que fomos unidos por um propósito, agora que esses encontros serão cada vez mais escassos deixo aqui registrado essas lembranças. Obrigada Renata pela frase mais dita ao longo dessa graduação “Tudo Passa”, passou!

A minha orientadora, Professora Dra. Vanda Lúcia, sou grata por toda a paciência, empenho e sentido prático com que sempre me orientou neste trabalho e em todos aqueles que realizei durante a minha graduação. Muito obrigada por me ter corrigido quando necessário sem nunca me desmotivar, por sempre me motivar nas minhas decisões acadêmicas e por todas as oportunidades oferecidas, também agradeço pela mulher/mãe que és, és inspiração.

Aos membros da banca examinadora, Prof^a Dra Ivana Maria Fachine, Prof^a Me. Maria Elaine Cristina Araruna, que tão gentilmente aceitaram participar e colaborar com esta conclusão de curso, obrigada! Agradeço também por terem compartilhado em dados momentos os seus conhecimentos.

Agradeço a todos os professores por me proporcionar o conhecimento não apenas racional, mas a manifestação do caráter e afetividade da educação no processo de formação profissional, por tanto que se dedicaram, não somente por terem me ensinado, mas por terem me feito aprender. Em especial aos professores doutores Ricardo Olímpio de Moura, Lindomar Farias Belém, Cinthya Maria Pereira, Thúlio Antunes de Arruda e Ana Claudia Dantas de Medeiros. A palavra mestre, nunca fará justiça aos professores que são. Os meus eternos agradecimentos.

Aos amigos de laboratório agradeço pelo conhecimento compartilhado ao longo dos anos e dos experimentos realizados. Todos são importantes, agradeço em especial a Me. Ítala Samara e Pablo Raiff, os quais pude acompanhar e aprender ao longo desse período, a vocês minha gratidão.

A esta universidade, seu corpo docente, direção e administração, obrigada. Aos técnicos de laboratório que sempre se propuseram a ajudar. As todas agentes de limpeza, dona Arlete em especial que sempre foi solicita quando necessário. Gratidão! Assim como agradeço ao apoio do CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil para a realização deste trabalho.

RESUMO

A inflamação é uma resposta não específica resultante da microcirculação e lesão dos tecidos, podendo ser provocada por estímulos biológicos, físicos, químicos ou combinação destes. É caracterizada por calor, rubor, edema, dor podendo culminar em perda da função tecidual. A união destes fatores leva a uma cascata de eventos bioquímicos, que provocam a ativação de enzimas envolvidas na liberação de mediadores, fenestração endotelial, extravasamento de líquido, migração de células, quebra e reparo de tecidos. No tratamento comumente são utilizados os agentes anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) e os esteroidais (AIEs), que não são livres de eventos secundários, o que torna promissora a busca de novas moléculas anti-inflamatórias. O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial anti-inflamatório de um novo composto híbrido indólico fenilacrilamida denominado ICMD na busca por respostas farmacológicas potencializadas. A atividade anti-inflamatória foi avaliada em camundongos adultos pesando de 25 a 30 g, nos modelos de edema de pata e peritonite, utilizando como agente inflamatório o CFA e *zymosan*, respectivamente. A segurança de uso foi avaliada nos ensaios de citotoxicidade em eritrócitos humanos frescos, toxicidade aguda de dose única e gástrica em camundongos. Os ensaios foram aprovados no Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFBA) sob número 135/2018. Os resultados mostram que o composto ICMD não apresenta citotoxicidade nem toxicidade aguda significativa. Nas doses de 25, 50 e 100 $mg\ kg^{-1}$ reduziu significativamente o edema de pata nas 6 primeiras horas, mostrando seu potencial anti-inflamatório e antiedematogênico. O composto também reduziu a migração de leucócitos para a cavidade peritoneal dos camundongos, evento este importante no processo inflamatório. Quando utilizado por 7 dias consecutivos, também não provocou ulcerações gástricas mostrando uma certa segurança gástrica. Estes resultados indicam a efetividade das propriedades anti-inflamatórias do composto ICMD com perspectivas para o desenvolvimento de um novo medicamento.

Palavra-chave: Derivado indólico fenilacrilamida. Edema de pata. Peritonite. Toxicidade gástrica.

ABSTRACT

Inflammation is a non-specific response resulting from microcirculation and tissue damage and can be caused by biological, physical, chemical or combination of these stimuli. It is characterized by heat, flushing, edema and pain. The union of these factors leads to a cascade of biochemical events that trigger the activation of enzymes involved in mediator release, endothelial fenestration, fluid leakage, cell migration, tissue breakdown and repair. Non-steroidal anti-inflammatory agents (NSAIDs) and steroidal anti-inflammatory agents (EIAs), that are not free of secondary events, are commonly used in the treatment, which makes the search for new anti-inflammatory molecules promising. The aim of this study was to evaluate the anti-inflammatory potential of a new indole phenylacrylamide hybrid compound named ICMD in search of potentiated pharmacological responses. Anti-inflammatory activity was evaluated in adult mice weighing 25 to 30 g, in the models of paw edema and peritonitis, using CFA and zymosan as the inflammatory agent, respectively. Safety of use was evaluated in cytotoxicity assays in fresh human erythrocytes, acute single dose and gastric toxicity in mice. The trials were approved by the Animal Use Ethics Committee (CEUA-UFBA) under number 135/2018. The results show that the ICMD compound shows no significant cytotoxicity or acute toxicity. At doses of 25, 50 and 100 mg kg⁻¹ significantly reduced paw edema in the first 6 hours, showing its anti-inflammatory and antiedematogenic potential. The compound also reduced leukocyte migration to the peritoneal cavity of mice, an important event in the inflammatory process. When used for 7 consecutive days, it also did not cause gastric ulcerations showing some gastric safety. These results indicate the effectiveness of the anti-inflammatory properties of the compound ICMD with prospects for the development of a new drug.

Keywords: Indolic phenylacrylamide derivative. Paw edema. Peritonitis. Gastric Toxicity

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Mecanismo inicial da resposta inflamatória.....	16
Figura 2 – Vias de metabolização do ácido araquidônico.....	19
Figura 3 – Estrutura química do indol.....	23
Figura 4 – Estrutura química da indometacina.....	24
Figura 5 – Estrutura química do paracetamol.....	25
Figura 6– Influência do tratamento com o composto ICMD sob o edema de pata induzido por CFA.....	35
Figura 7– Influência do tratamento com o composto ICMD sob a contagem total de leucócitos na peritonite induzida por <i>zymosan</i>	37
Figura 8 – Imagens dos estômagos do grupo controle e tratados com ICMD 50 mg·kg ⁻¹ por 7 dias consecutivos.....	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Consumos e evolução ponderal dos animais tratados com composto ICMD-01 (2000 $mg \cdot kg^{-1}$), durante 14 dias.....	31
Tabela 2 – Peso relativo dos órgãos e evolução ponderal dos animais tratados com composto ICMD-01 (2000 $mg \cdot kg^{-1}$), durante 14 dias.....	32
Tabela 3 – Determinação dos parâmetros bioquímicos dos animais tratados com composto ICMD-01 (2000 $mg \cdot kg^{-1}$), durante 14 dias.....	32
Tabela 4 – Determinação dos parâmetros hematológicos dos animais tratados com composto ICMD-01 (2000 $mg \cdot kg^{-1}$), durante 14 dias.....	33

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Ácido Araquidônico
AES	Anti-inflamatórios Esteroidais
AINE	Anti-inflamatórios Não Esteroidais
BK	Bradicinina
CADD	Computeraided drug design
CFA	Adjuvante Completo de Freund
COX	Cicloxygenase
CP	Controle Positivo
GI	Gastrointestinais
HCT	Hematócrito
HDL	High Density Lipoproteins
HGB	Hemoglobina
HM	Hibridação Molecular
ICMD	2-ciano-3(indol-3-yl)-N-fenilacrilamida
IL	Interleucina
IL-1 β	Interleucina-1 beta
iNOS	Óxido Nítrico-Sintase Induzida
NAPQI	Lipopolissacarídeos
NF-kB	Fator Nuclear kappa B
NFR2	N-acetil-p-benxo-quinoimina
NO	Óxido Nítrico
NOS	Óxido Nítrico-Sintase
PCR	Proteína C Reativa
PG	Prostaglandina
PLT	Plaquetas
PLA2	Fosfolipase A2
QSAR	Quantitative structure–activity relationship
RBC	Eritrócitos
SNC	Sistema Nervoso Central
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TGO	Transaminase glutâmico-oxalacética

TGP	Transaminase glutâmico-pirúvica
WBC	Contagem de Leucócitos

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVOS	16
2.1	Objetivo geral	16
2.2	Objetivo específico	16
3	REFERENCIAL TEÓRICO.....	17
3.1	Fisiopatologia da inflamação.....	17
3.1.1	<i>Principais mediadores pró-inflamatórios.....</i>	19
3.1.1.1	<i>Óxido Nítrico (NO)</i>	19
3.1.1.2	<i>Prostaglandinas (PG)</i>	20
3.2	Anti-inflamatórios esteroidais e não esteroidais.....	21
3.3	Planejamento racional de fármacos.....	22
3.3.1	<i>Hibridação molecular.....</i>	23
3.3.2	<i>Atividade biológica de compostos indólicos</i>	24
3.3.3	<i>Atividade biológica de compostos fenilacrilamida.....</i>	25
3.3.4	<i>Propriedades físico-químicas do composto ICMD-01.....</i>	25
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
4.1	Obtenção do composto.....	27
4.2	Local da pesquisa.....	27
4.3	Animais e procedimentos éticos.....	27
4.4	Investigação da atividade anti-inflamatória.....	27
4.4.1	<i>Ensaio de toxicidade in vitro</i>	27
4.4.2	<i>Toxicidade aguda.....</i>	28
4.4.3	<i>Edema de pata induzido por CFA.....</i>	28
4.4.4	<i>Peritonite induzida por zymozan.....</i>	29
4.4.5	<i>Toxicidade gástrica.....</i>	29
4.5	Análise estatística.....	30
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	31
5.1	Avaliação da atividade hemolítica.....	31
5.2	Avaliação da atividade inflamatória.....	31
5.2.1	<i>Toxicidade aguda.....</i>	31
5.2.2	<i>Edema de pata induzido por CFA.....</i>	35

5.2.3	<i>Peritonite induzida por zymozan</i>	37
5.2.4	<i>Toxicidade gástrica</i>	39
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	41
	REFERÊNCIAS	42

1 INTRODUÇÃO

A inflamação é um processo fisiológico designado a alertar o sistema imunológico da presença de patógenos, lesão tecidual ou outras agressões. Este processo é crucial para a defesa do organismo e requer uma regulação rígida das suas funções o que é determinante na ação do sistema imunológico, no controle de infecções e na resolução da inflamação. Apesar da inflamação não ser um processo patológico, quando há uma exacerbação ou prolongamento dos estímulos inflamatórios, esse passa a induzir danos aos tecidos (GRIVENNIKOV; GRETEN; KARIN, 2010; KOTAS; MEDZHITOV, 2015; XU; LARBI, 2018).

A fim de evitar tais danos, foram desenvolvidos fármacos que atuam impedindo ou diminuindo o processo inflamatório. Dentre eles, os anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) representam uma das classes de maior diversidade de fármacos clinicamente disponíveis no Brasil (MENDES et al., 2012). Esses medicamentos de grande variedade estrutural atuam inibindo de maneira seletiva ou não as isoformas da enzima cicloxigenase (COX). As isoformas principais são: a COX-1, expressa constitutivamente para manutenção das funções homeostáticas, como a integridade gastrointestinal e a COX-2, indubitavelmente expressa em resposta a estímulos patológicos (RAO; KABIR; MOHAMED, 2010; KALINSKI, 2012; ZEINALI et al., 2017).

Com relação aos problemas relacionados aos eventos secundários da terapia convencional com AINEs, têm-se os distúrbios gastrointestinais (GI), que ocorre em função da inibição da COX-1, comprometendo produção das prostaglandinas citoprotetoras, e da presença de frações ácidas desses fármacos em contato direto com a mucosa, causando lesões ulcerativas (VENERITO; WEX; MALFERTHEINER, 2010; KAJAL et al., 2014; MARCÉN; SOSTRES; LANAS, 2016).

Na tentativa de contornar a toxicidade gástrica, foram desenvolvidas drogas mais seletivas para COX-2, os “Coxibes”. Essas novas drogas, apesar de um perfil gástrico mais seguro, apresentaram uma ocorrência elevada de eventos cardiovasculares- e aterotrombóticos associado ao uso crônico, portanto, alguns desses fármacos foram proscritos (ROSTOM et al., 2007; MONTEIRO et al., 2008; PATRONO et al., 2016).

Para minimizar esses efeitos indesejáveis promovidos pelos agentes terapêuticos disponíveis no mercado, busca-se o desenvolvimento de novos

compostos químicos sintéticos com potencial efeito terapêutico anti-inflamatório, maior segurança, com baixo custo de produção e sem que haja o comprometimento dos recursos naturais. E isso vem sendo possível graças ao advento da química medicinal e sintética que otimiza as etapas de planejamento de fármacos, elegendo moléculas promissoras para diversas atividades biológicas (CAMBELL; MACDONALD; PROCOPIOU, 2018).

Com base nos aspectos abordados, foi sintetizado um composto indólico fenilacrilamida, obtido pela estratégia de hibridação molecular, constituindo em sua estrutura dois fragmentos importantes para atividade anti-inflamatória (o núcleo indólico e a fração n-fenilacetamida). Desse modo, este estudo teve como proposta, avaliar o potencial anti-inflamatório do composto híbrido 2-ciano-3(indol-3-yl)-N-fenilacrilamida (ICMD), na expectativa de obter respostas farmacológicas potencializadas com menores eventos secundários responsáveis por causar reações adversas, como os distúrbios gastrointestinais e a nefrotoxicidade associada ao uso prolongado dos medicamentos convencionais.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o perfil anti-inflamatório e toxicológico de um derivado híbrido indólico fenilacrilamida.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o potencial anti-inflamatório *in vivo* através dos modelos de edema de pata induzido por CFA e peritonite induzida por zymosan;
- Avaliar o potencial toxicológico do derivado híbrido através do ensaio de toxicidade aguda de dose única;
- Verificar o possível efeito ulcerogênico do composto através do ensaio de toxicidade gástrica;
- Determinar o potencial hemolítico do composto indólico fenilacrilamida.

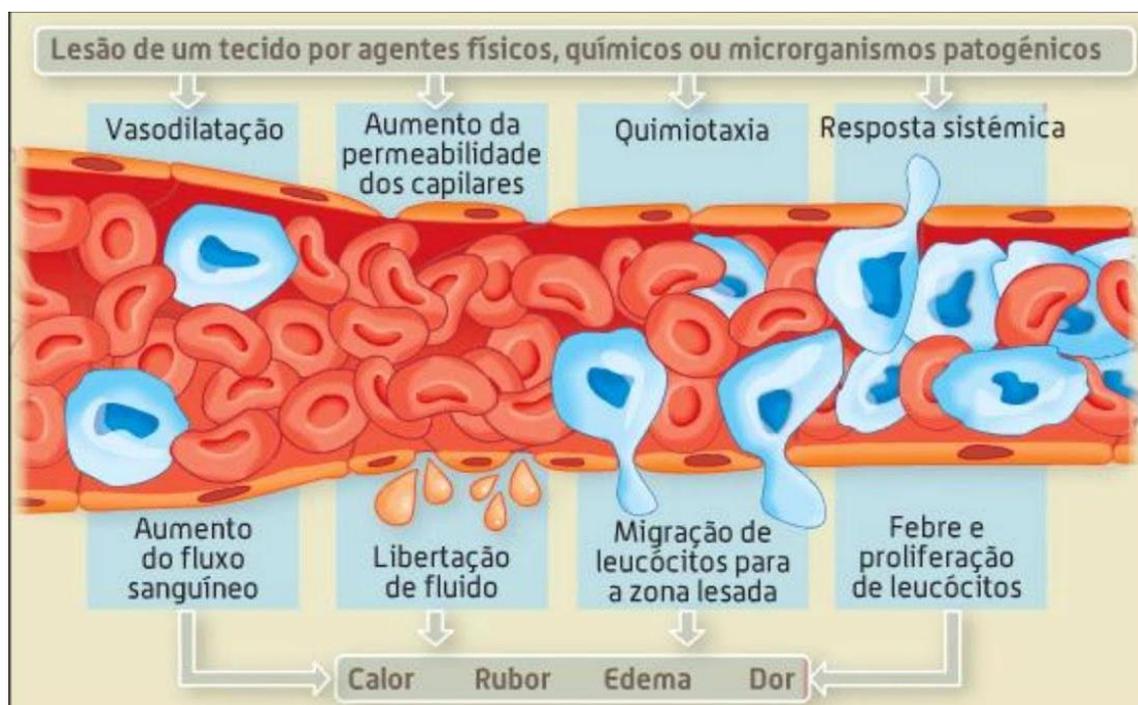
3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Fisiopatologia da inflamação

A inflamação é um mecanismo de defesa inespecífico desencadeado em resposta a desafios extremos à homeostase, como infecções ou lesões teciduais. Apesar da inflamação não ser um processo patológico, quando há uma exacerbação ou prolongamento do estímulo inflamatório, este passa a induzir danos aos tecidos (GRIVENNIKOV; GRETEN; KARIN, 2010; KOTAS; MEDZHITOV, 2015).

No que diz respeito a fisiopatologia da inflamação, o mecanismo inicial de ação não difere de acordo com o agente lesivo, sendo caracterizada pela vasodilatação local, aumento da permeabilidade vascular, infiltração de leucócitos e células fagocíticas, podendo culminar na degeneração tecidual e fibrose. O que justifica os sinais clínicos clássicos que incluem eritema, edema, hipersensibilidade e dor, podendo culminar em perda da função tecidual (figura1) (APOLINÁRIO, 2016; GOODMAN; GILMAN, 2015).

Figura 1 – Mecanismo inicial da resposta inflamatória.



Fonte: Google fotos. Disponível em <<http://www.interacaomedicamentosa.com/2018/04/inflamacao-aguda.html>>.

De modo ilustrativo, a inflamação pode ser dividida em cinco fases principais que podem ocorrer simultaneamente durante o processo:

- 1ª fase: Após a lesão em um tecido haverá modificações fisiológicas e funcionais da região, com a liberação de mediadores químicos, o que caracteriza a primeira fase da inflamação, que irá desencadear as demais.
- 2ª fase: Na fase capilar ocorre a liberação de enzimas, como a calicreína, essas enzimas atuam sobre os cininogênios originando as cininas (bradicinina (BK), calidina e Met-Lys-bradicinina).
- 3ª fase: A junção da BK com outras citocinas como o fator de necrose tumoral (TNF), a interleucina-1 (IL-1) e a interleucina-8 (IL-8), iniciam acentuadamente o ciclo da dor inflamatória, além de provocar intensa dilatação dos vasos sanguíneos com consequente aumento da permeabilidade capilar. Esse aumento caracteriza a fase exsudativa, que é quando ocorre a migração de líquidos e células para o local lesionado, a fim de recrutar células do sistema imunológico para o local da inflamação na tentativa de controlar os danos e lesões associados ao agente agressor.
- 4ª fase: Nessa fase, no local da inflamação restará apenas, células lisadas, necrosadas e produtos de degeneração, caracterizando a fase degenerativa-necrótica.
- 5ª fase: Por fim, dar-se início a fase produtiva-reparativa onde ocorre a multiplicação de células e reparação tecidual, na intenção de recompor o tecido lesionado (PECONICK; KALKS, 2011).

3.1.1 Principais mediadores pró-inflamatórios

3.1.1.1 Óxido nítrico (NO)

Dentre as principais células envolvidas na modulação da resposta imune durante a inflamação, têm-se os macrófagos. Esses ao serem ativados por estímulos extracelulares incita a produção de mediadores pró-inflamatórios como o NO (LEE et al., 2017). O NO é mensageiro/modulador em diversos processos biológicos, porém, em situações de estresse oxidativo, deficiência do sistema antioxidante e na geração de intermediários de oxigênio, o NO pode ser potencialmente tóxico. Essa citotoxicidade é resultante da ação direta do NO ou da sua reação com outros

compostos liberados durante o processo inflamatório (ROCHA, 2018; DUSSE; VIEIRA; CARVALHO, 2003).

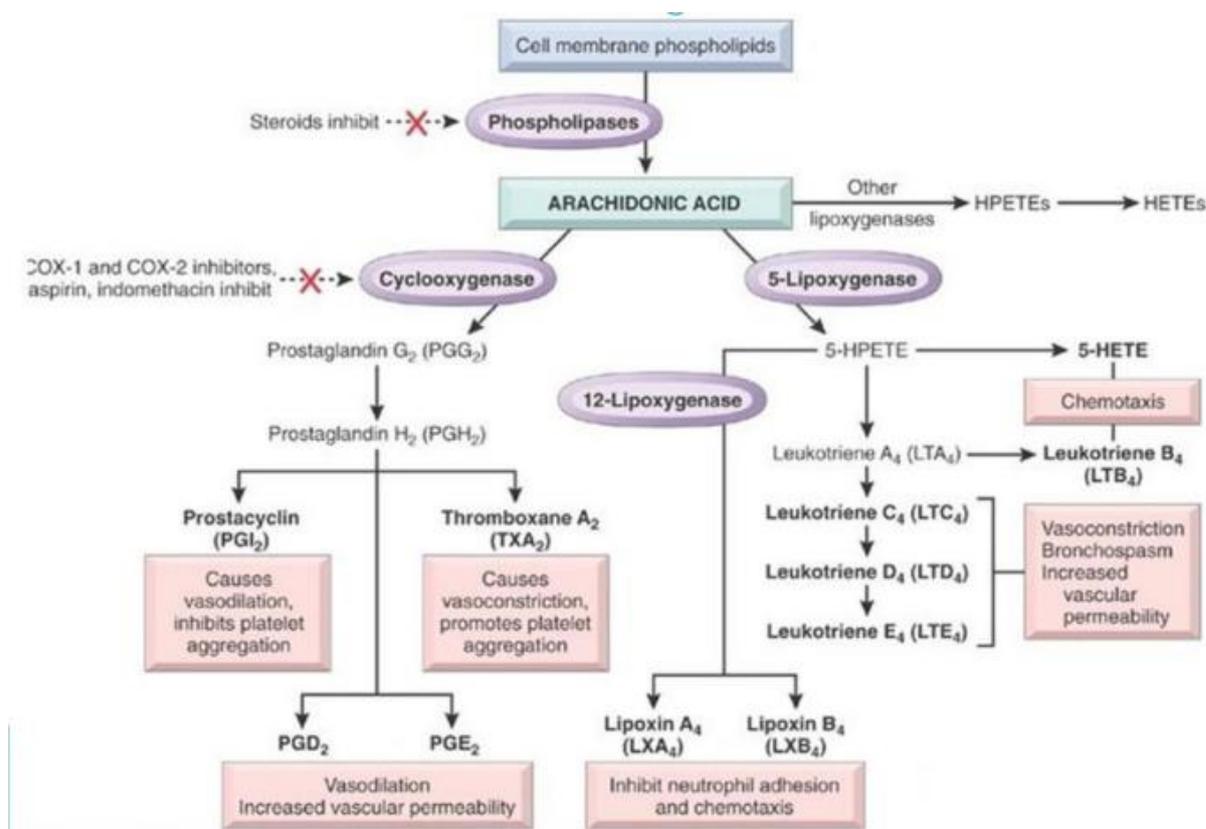
O NO é sintetizado a partir do aminoácido L-arginina mediado pela ação da enzima óxido nítrico-sintase (NOS). Sabe-se da existência de três isoformas de NOS, duas constitutivas e uma induzível. A isoforma induzível, nomeada, óxido nítrico-sintase induzida (iNOS), está intimamente relacionada ao processo inflamatório e a condições patológicas. Esta produz e libera grandes quantidades de NO mediante ativação de células - macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, células endoteliais e células epiteliais - nos processos inflamatórios e infecciosos (SILVA, 2017).

3.1.1.2 Prostaglandinas (PG)

As prostaglandinas estão intimamente ligadas a superexpressão das enzimas COXs. Essas enzimas atuam metabolizando o Ácido Araquidônico (AA). O AA é derivado do ácido linoleico sendo, portanto, um dos ácidos graxos que constituem os fosfolípidios das membranas celulares, quando ocorre a ruptura dessa membrana estes ficam dispersos no citoplasma (HILARIO; TERRERI; LEN, 2006).

Desse modo, a síntese da cascata do AA é iniciada após a liberação desse ácido graxo, devido a alguma ruptura na membrana celular, estes sofrem ação de enzimas, como a Fosfolipase A2 (PLA2), que irá liberar o AA (figura 2). Uma vez livre o AA pode ser direcionado e metabolizado por três vias diferentes: a via da lipoxigenase (formando principalmente leucotrienos e lipoxinas), via do Citocromo P450 e via das cicloxigenase. Essa última gera as prostaglandinas, responsáveis por mediar uma variedade de ações biológicas envolvidas na fisiopatologia vascular e no aparecimento dos sinais e sintomas cardinais da inflamação (HILARIO; TERRERI; LEN, 2006; PARK; PILLINGER; ABRAMSON, 2006; MEIRA et al., 2018; SILVA, 2016; BATLOUNI, 2010).

Figura 2 – Vias de metabolização do ácido araquidônico.



Fonte: Silva (2016). Disponível em: <<https://slideplayer.com.br/slide/12723457/>>

Atualmente tem-se o conhecimento da existência de três isoformas de cicloxigenases - COX-1; COX-2; COX-3 - cujos mecanismos melhor esclarecidos são das isoformas 1 e 2. A COX-1 é classificada como constitutiva, sua expressão ocorre na maioria dos tecidos e nas plaquetas e sua produção está associada a produção de prostanoídes envolvidos em processos homeostáticos (citoproteção gástrica, manutenção da homeostase renal, agregação plaquetária). Quanto a COX-2, sua expressão é induzida na maioria dos tecidos por estímulos inflamatórios e traumas tissulares, sendo esta responsável pela produção aumentada das prostaglandinas (PGI₂; PGD₂; PGE₂; PGF₂) e tromboxanos A₂, além de também ser expressa em diversos tipos de câncer e estar em níveis detectáveis no sistema nervoso central (SNC), rins e coração (BORGES, 2016; BATLOUNI, 2010). A COX-3 é uma isoforma da COX-1 (também é nomeada COX 1-b), sendo expressa principalmente no SNC. Fármacos que atuam nessas enzimas possuem efeito central e são potentes agentes antipiréticos e analgésicos (MÜHLBAUER, 2016).

As prostaglandinas são mediadores pró-inflamatórios que estão diretamente relacionadas aos cinco sinais cardinais da inflamação. Elas favorecem a

vasodilatação prolongada além de aumentar o fluxo sanguíneo e potencializar a ação de substâncias, como da bradicinina, histamina e serotonina. Também são capazes de aumentar a permeabilidade vascular e ativar as terminações nervosas (CASTEL-BRANCO, et al., 2013; MIOTI; CASTRO, 2017). A PG mais típica, produzida no processo inflamatório, é a PGE 2. Sua atuação ocorre em quatro subtipos de receptores (EP1-EP4), a literatura aborda as principais atividades atreladas a ativação desses receptores, mediante inflamação induzida em camundongos. Através do EP3 ocorre a ativação de mastócitos, por meio da ativação do receptor EP2/4 têm-se o controle das células T Helper. Esses mecanismos são responsáveis pelo desempenho das PGE2 na patogênese dos distúrbios imunológicos (KOHICHI et al, 2015).

Nota-se que os mediadores químicos desempenham papéis específicos durante todo o processo inflamatório, contanto, quando há liberação excessiva ou mantêm-se a liberação a longo período dessas substâncias químicas, acarretam efeitos contrários, causando danos teciduais, o que pode resultar na inflamação crônica. Desse modo, desenvolver compostos capazes de inibir a expressão ou a atividade destas substâncias, geralmente induzidas por citocinas inflamatórias, é obter potentes agentes anti-inflamatórios.

3.2 Anti-inflamatórios esteroidais e não esteroidais

Atualmente há diversos fármacos anti-inflamatórios disponíveis à população e esses são classificados em duas classes principais: os anti-inflamatórios esteroidais (AIEs) que são denominados de corticosteroides e os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs). Essa segunda classe de medicamentos é diversificada e inclui a aspirina e outros inibidores da COX, seletivos ou não (OLIVEIRA, et al.,2019).

Dentre os medicamentos mais prescritos estão os AINEs, utilizados no tratamento da inflamação, dor, edema, osteoartrites, artrite reumatoide e distúrbios músculo esqueléticos. Suas propriedades anti-inflamatórias, antipiréticas e analgésicas são amplamente aceitas, entretanto, seu uso não é inócuo e está associado a um amplo espectro de efeitos adversos. Os AINEs inibem a COX de maneira não seletiva, promovendo o aumento do risco de danos na mucosa gástrica, reações alérgicas e broncoespasmos resultantes do aumento dos níveis de

leucotrienos (JACOB, et al., 2018; VILLARINO; LÁZARO, 2012; OLIVEIRA, et al, 2019).

No intuito de diminuir tais efeitos, os AINEs com inibição seletiva de COX-2 foram concebidos para reduzir os riscos gastrointestinais (GIs), porém, esta inibição seletiva substitui a ação protetora exercida pelo COX-2 na relação entre plaquetas e células endoteliais. Este desequilíbrio resulta em um excesso de tromboxano não contrabalançada por prostaciclina o que pode explicar o aumento do risco cardiovascular dos coxibs (KUMMER, 2002; MORA, 2011).

Ainda na classe dos AINEs, há fármacos com mecanismos diferenciados quando se trata da inibição da COX, ditos AINE atípico. Dentre eles o paracetamol, também conhecido como acetaminofeno ou N-acetilparaminofenol, difere da maioria dos AINEs por apresentar um baixo poder anti-inflamatório e baixa incidência dos efeitos colaterais relacionados à inibição da enzima COX, isso ocorre devido à alta afinidade deste pela isoforma COX-3 expressa no SNC, o que justifica o seu melhor desempenho no controle térmico. Sua utilização em níveis elevados ou em associação com outros fármacos que possuam metabolismo hepático está associada a lesões hepáticas (MÜHLBAUER, 2016).

Tal situação estimula a busca por novas moléculas, potencialmente úteis no tratamento da inflamação e capazes de diminuir tais efeitos adversos a fim de possibilitar ao paciente maior eficácia ao tratamento.

3.3 Planejamento racional de fármacos

O planejamento racional de fármacos é uma técnica amplamente utilizada no desenvolvimento de novos compostos de interesse medicinal e na síntese de fármacos promissores. Essa técnica se baseia principalmente na fisiopatologia das doenças e nas vias bioquímicas para selecionar e identificar a estrutura dos possíveis alvos moleculares. Isso é possível nos dias atuais devido a gama de informações fornecidas pelas ferramentas biotecnológicas disponíveis, com elas é possível ter entendimento de propriedades importantes da molécula, como potência, afinidade e seletividade com o alvo (SANG, 2016; GUIDO; ANDRICOPULO; OLIVA, 2010).

A química medicinal tem sido essencial nesse processo. Com o avanço tecnológico é possível a atuação dela com novas funcionalidades, cuja finalidade

está no isolamento e identificação de substâncias bioativas, assim como no desenvolvimento de compostos-líderes que forneçam mecanismos e propriedades farmacodinâmicas e farmacocinéticas otimizadas. Desse modo, pode-se analisar o espaço químico delineando o trabalho de identificação, seleção e otimização na investigação da capacidade de pequenas moléculas interagirem com possíveis alvos (GUIDO; ANDRICOPULO; OLIVA, 2010; MIKOVSKI, et al., 2018; SANGI, 2016).

O Planejamento Racional de Fármacos Auxiliado por Computador, do inglês *Computer-aided drug design (CADD)*, é um conjunto de métodos computacionais que auxiliam na otimização da busca de novos compostos bioativos. Dentre eles têm-se a Docagem molecular (*Docking molecular*) e os métodos de Relação Quantitativa Estrutura-Atividade, do inglês *Quantitative structure-activity relationship (QSAR)*. Esse conjunto permite obter informações úteis para o estudo da natureza estérica, eletrônica e lipofílica da molécula analisada, assim como, é capaz de simular a interação do fármaco com o provável receptor, também estabelece as relações quantitativas entre a estrutura química e a atividade biológica de vários compostos, auxiliando na compreensão do mecanismo de ação responsável pelo efeito biológico reduzindo assim, tempo e custo no desenvolvimento do fármaco (RIBEIRO, 2018).

Nesse contexto, a síntese de coleções focadas empregando a química combinatória emergiu como uma das principais ferramentas na busca por novos fármacos, sendo possível gerar modificações estruturais nos compostos, com a finalidade diminuir a toxicidade de fármacos já existentes ou aumentar a atividade biológica já exercida (MIKOVSKI, et al., 2018; SANGI, 2016).

3.3.1 Hibridação molecular (HM)

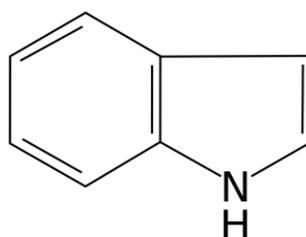
No âmbito da pesquisa que visa o planejamento racional de fármacos, a estratégia de Hibridação Molecular (HM) é utilizada frequentemente para melhorar as propriedades físico-químicas ou potencializar as atividades farmacológicas de um composto pré-existente. A HM pode ser obtida com a junção de dois fármacos ou a partir de dois grupos farmacofóricos distintos através de uma ligação covalente sendo, portanto, uma alternativa eficaz para o desenvolvimento de fármacos mais seletivos e com menos efeitos colaterais (BATISTA, 2007; LEITE, 2015; ARAÚJO, et al., 2015).

A HM é realizada a fim de obter os seguintes objetivos: sinergismo da ação farmacológica; terapia de dupla ação farmacológica; ou modulação de efeitos secundários indesejáveis (ARAÚJO, et al., 2015). Nesse sentido, foi planejado um novo composto utilizando a estratégia de HM contendo duas subunidades farmacofóricas, importantes para atividade anti-inflamatória: o grupo indol e a função fenilacrilamida (ALMEIDA, 2017; GU, et al., 2019).

3.3.2 Atividade biológica dos compostos indólicos

Um sistema biciclo heteroaromático, contendo um grupo benzeno fundido a um pirrol através dos carbonos 2 e 3, é o que caracteriza uma estrutura indólica (figura 2). Moléculas que contém esse núcleo vem sendo estudada a centenas de anos devido as diversas atividades biológicas exercida por esse derivado - anti-inflamatória, anticonvulsivante, antibacteriano, cardiovascular, entre outras - (GUERRA, 2011; ALMEIDA, 2017).

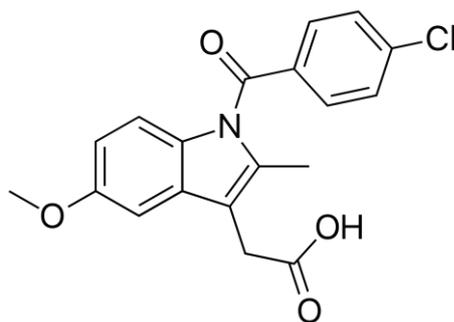
Figura 3 – Estrutura química do indol.



Fonte: Guerra (2011).

Dentre os anti-inflamatórios que apresentam a estrutura indol, têm-se a indometacina (Figura 3), um AINE, pertencente aos fármacos da classe II (por apresentar solubilidade reduzida e elevada permeabilidade), com grande eficácia clínica e ampla utilização (CERNUDA, 2004).

Figura 4 – Estrutura química da indometacina.



Fonte: Cernuda (2004)

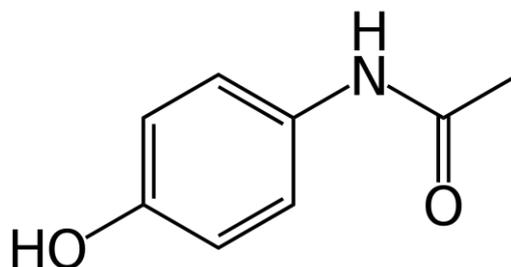
A indometacina é utilizada principalmente no tratamento de inflamações das articulações. Como a maioria dos AINEs disponíveis a indometacina pode ocasionar irritação no trato gastrointestinal, possivelmente por inibir a COX de modo não seletivo, ao contato prolongado com a mucosa gástrica relacionados à dosagem, ao tempo de tratamento e também devido à sua baixa solubilidade (LÓPEZ, et al., 2012; RANG, et al., 2007).

3.3.3 Atividade biológica de derivados fenilacrilamida

A função fenilacrilamida é utilizada para obtenção de diversos efeitos farmacológicos, a principal delas, é a atividade antitumoral, com a função antiproliferativa. Apesar desse conhecimento, pouco se sabe da sua utilização no controle da inflamação. Investigações recentes sugerem que essas moléculas podem ser uma pista promissora para o desenvolvimento de novos agentes antioxidantes e anti-inflamatórios (XI, et al., 2012; GU, et al., 2019).

O N-acetilparaminofenol, popularmente comercializado como paracetamol, possui em seu esqueleto estrutural função semelhante (Figura 5) com ação já comprovada, sabe-se que este composto é responsável pela formação de metabólitos possivelmente tóxico responsáveis por se ligarem covalentemente as moléculas hepáticas, gerando a lesão do tecido e conseqüentemente diminuição da função do mesmo (MÜHLBAUER, 2016).

Figura 5 – Estrutura química do paracetamol.



Fonte: Mühlbauer (2016).

Embasado nas informações aqui apresentadas, propõe-se nesse trabalho a investigação da atividade anti-inflamatória do composto indólico fenilacrilamida, cujo processo utilizado para a síntese baseou-se na união desses dois diferentes grupos farmacóforos importantes para atividade farmacológica. Espera-se, portanto, que haja a redução dos efeitos adversos atrelados aos fármacos já disponíveis no mercado que possuam essas estruturas químicas e que o potencial efeito anti-inflamatório seja mantido ou potencializado.

3.3.4 Propriedades físico-químicas do composto ICMD-01

As propriedades físico-químicas são intrinsecamente relacionadas à estrutura e interações moleculares. Após a síntese do composto ICMD-01 alguns testes físico-químicos foram determinados (dados ainda não publicados, dissertação de mestrado em andamento). O composto se apresenta como pó amarelado, possui coeficiente de partição teórico de 2,62 P, cuja massa molar é de 248,09 g/mol, parâmetros como o fator de retenção 0,45¹ também foi determinado além do rendimento do composto que foi de 62,33%, a faixa de fusão encontra-se entre 273-275°C. Esse composto se mostrou solúvel em diversos solventes orgânicos – acetato, acetona, DMSO, etanol e clorofórmio.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Obtenção do composto

O composto híbrido 2-ciano-3(indol-3-yl)-N-fenilacrilamida (ICMD-01) utilizado nesta pesquisa foi fornecido pela equipe do Laboratório de Desenvolvimento e Síntese de Fármacos (LDSF) coordenado pelo professor Dr. Ricardo Olímpio Moura.

4.2 Local da Pesquisa

A avaliação da atividade farmacológica desenvolvida nos Laboratórios de Ensaio Farmacológicos da UEPB sob coordenação da professora Dra. Vanda Lúcia dos Santos e no Laboratório de Farmacologia e Terapêutica Experimental, da Universidade Federal da Bahia, sob coordenação da professora Dra. Cristiane Flora Villarreal.

4.3 Animais e Procedimentos éticos

Para os testes farmacológicos foram utilizados camundongos albinos *Swiss* (*Mus musculus*) adultos, machos e fêmeas, com peso entre 25 e 35g. Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas, sob temperatura e umidade controlada ($23 \pm 2^{\circ}\text{C}$), 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) Instituto de Ciências da Saúde – ICS, da Universidade Federal da Bahia - UFBA número 135/2018, com vigência até 02/2023.

4.4 Investigação da atividade toxicológica e anti-inflamatória

4.4.1 Ensaio de citotoxicidade *in vitro*

A preparação das hemácias para o teste de citotoxicidade seguiu a metodologia descrita por Cruz-Silva et al (2000), com algumas modificações. Para tal, utilizou-se eritrócitos humanos frescos (tipo O+) doado pela própria analista. A quantidade necessária foi coletada pelo laboratório de Análises Clínicas da UEPB e

acondicionado em tubos com heparina. O plasma foi retirado após centrifugação a 2500 rpm por 5 minutos. Posteriormente, a suspensão de hemácias foi lavada com solução salina 1% três vezes. As hemácias foram ressuspensas com a mesma solução e o volume foi ajustado para 10%. Em seguida, colocou-se 2 mL desta suspensão em tubo de ensaio e homogeneizadas com 2 mL do composto diluído na concentração de 500µg/mL, aguardou uma hora e centrifugou por 5 minutos a 2500rpm. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (540 nm), utilizando como branco a solução salina 1%, para confirmar os resultados da leitura visual. O controle negativo utilizado foi a suspensão de hemácias 10% mais a solução salina e controle positivo uma solução de ácido acético a 2%.

4.4.2 Toxicidade aguda

O teste de toxicidade aguda foi realizado utilizando-se 12 camundongos, correspondendo a 2 grupos de 6 animais (6 machos e 6 fêmeas), em jejum prévio de 12 horas. Os grupos controles foram tratados, com o veículo (solução salina + Tween 5%) e o grupo teste foram tratados com 2000 $mg \cdot kg^{-1}$ de ICMD-01, por via oral (gavagem). Após os tratamentos, os animais foram observados durante 30 min, 1, 2, 4, e a cada 24 horas por até 72 horas: o estado de consciência e a disposição geral dos animais, a coordenação motora, o tônus muscular, os reflexos e a atividade do sistema nervoso autônomo, conforme o protocolo de Almeida (2006). Parâmetros como massa corporal, consumo de água e de ração foram observados a cada 24 horas durante 14 dias. Ao final, os animais foram pesados e anestesiados para coleta de sangue por punção cardíaca e em seguida sacrificados por deslocamento cervical, sendo os órgãos (fígado, baço, coração e rins) retirados, pesados e avaliados macroscopicamente (CUNHA et al., 2013, com adaptações).

4.4.3 Edema de pata induzido por CFA

Os camundongos foram mantidos em jejum prévio de 12 horas, divididos em grupos experimentais (grupo n=7). E o volume basal da pata traseira direita determinado antes da administração das substâncias. Os camundongos foram levemente anestesiados com halotano e receberam 20 µL de adjuvante completo de Freund (CFA 1 $mg \cdot kg^{-1}$ de Mycobacterium tuberculosis inativados em 85% de óleo de

parafina e 15% de mannidemonoleato; Sigma) na região plantar da pata traseira direita, método previamente relatado por Lima et al. (2013). Os níveis de edema foram medidos por plestismômetro. Os camundongos foram injetados com ICMD-01 (25, 50 e 100 $mg \cdot kg^{-1}$), veículo (50% de propilenoglicol em soro fisiológico) e o grupo de controle com dexametasona (2 $mg \cdot kg^{-1}$, fármaco de referência) por via intraperitoneal 40 minutos antes da CFA. A quantidade de inchaço da pata direita traseira de cada camundongo foi avaliada em tempo determinado e os dados foram representados como variação do volume da pata (Δ , mm³).

4.4.4 Peritonite induzida por zymozan

Para a realização do teste de peritonite foram utilizados camundongos (grupo n=6) em jejum prévio de 6 horas, foram tratados por via oral com veículo (salina, 10 $mL \cdot kg^{-1}$), indometacina (10 $mg \cdot kg^{-1}$) e o composto ICMD-01 (50 $mg \cdot kg^{-1}$). Após 30 minutos, foi injetada 0,25mL de *zymozan* a 2% na cavidade intraperitoneal. Quatro horas após a indução da inflamação, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e injetou-se 2 mL de solução tampão fosfato (PBS pH 7.2) na cavidade intraperitoneal. O abdômen do animal foi levemente massageado e, através de incisão foram coletados os fluidos peritoneais para realizar a contagem de leucócitos totais em câmara de Neubauer, sob microscopia óptica. Foram expressos como resultados, as médias dos números de leucócitos totais/mm³ de cada grupo experimental e a percentagem de inibição da migração de leucócitos comparativamente ao grupo experimental controle.

4.4.5 Toxicidade gástrica

Para avaliar o potencial ulcerogênico do composto (ICMD-01) os animais foram divididos em dois grupos (n=6), o grupo controle foi tratado com solução salina + tween 5% e o grupo teste com 50 $mg \cdot kg^{-1}$ do composto. Após exposição da dose por sete dias consecutivos foi realizada a análise macroscópica da mucosa do estômago de camundongos. A preparação da substância foi administrada por via oral. No sétimo dia os animais foram eutanasiados, os estômagos retirados e abertos ao longo da curvatura maior para a avaliação das lesões em microscópio.

4.5 Análise estatística

Os dados são apresentados como média \pm erro padrão das médias (EPM) das medidas feitas em 5 a 6 animais em cada grupo. As comparações entre três ou mais tratamentos foram feitas usando ANOVA unidirecional com teste post-hoc de Tukey, ou para medidas repetidas, ANOVA two-way com teste post-hoc de Bonferroni, como apropriado, seguido, quando necessário, pelo teste de Dunnett. Para os testes de toxicidade aguda foi realizado o teste T. Todos os dados foram analisados utilizando o Software de Computador Prism 5 (GraphPad, San Diego, CA, EUA). As diferenças estatísticas foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Avaliação da atividade hemolítica

A avaliação da atividade citotóxica em eritrócitos é empregada para avaliar o potencial do composto estudado em causar lesões na membrana plasmática das hemácias, seja pela formação de poros ou pela ruptura total. A interação de substâncias químicas com eritrócitos pode acelerar o envelhecimento ou levar a um processo prematuro de destruição dessas células com liberação de hemoglobina (SILVA, 2017). Portanto, os resultados obtidos permitem investigar a ação de compostos em sangue humano, sendo um indicador de citotoxicidade e bioatividade (OLIVEIRA et al., 2009).

Segundo Serafim (2014), o teste permite utilizar uma concentração relativamente alta do composto a fim de determinar a capacidade do mesmo em romper com as membranas eritrocitárias. Para tanto, utilizou a concentração de $500\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, obtendo um grau de hemólise de 4,7%. Esse achado demonstra que o composto ICMD não apresenta citotoxicidade significativa (poder hemolisante abaixo de 10%), pois não foi capaz de romper as membranas das hemácias de forma relevante.

Esse é um ponto positivo na investigação, visto que, as pesquisas realizadas com produtos naturais e/ou sintéticos têm sido concentradas não só na busca de compostos com atividade farmacológica, mas também de compostos com menor toxicidade e menos efeitos colaterais.

5.2 Avaliação da atividade anti-inflamatória

5.2.1 Toxicidade Aguda

O teste de toxicidade aguda é indicado para analisar os possíveis efeitos de novas substâncias ao entrar em contato com o organismo, classificando-a conforme seu potencial letal e/ou tóxico, segundo estabelece a legislação. Além disso, a avaliação da toxicidade aguda em animais garante segurança aos seres humanos, evitando que estes sejam submetidos à estudos clínicos com moléculas que já

demonstraram toxicidade em contato com o organismo animal (VALADARES, 2006; APOLINÁRIO, 2016).

Para a realização do ensaio foi administrada a dose de $2000 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ do composto ICMD-01 no grupo teste e no grupo controle salina + Tween 5% ($10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) por via oral, priorizando a mesma via de administração que pretende ser utilizada pelo humano. Após a administração os animais foram observados nos primeiros nas primeiras 4 horas e durante 72 horas, quanto ao estado de consciência, a disposição geral, a coordenação motora, o tônus muscular, os reflexos e a atividade do sistema nervoso autônomo e não houve alterações comportamentais nem fisiologicamente visíveis, indicando baixa toxicidade.

Até o décimo quarto dia foram mensuradas as quantidades de água e ração consumidas por estes animais, os resultados podem ser visualizados na tabela a seguir, onde estão expressos os consumos de água e ração pelo grupo controle e também pelo grupo teste.

Tabela 1 – Consumos e evolução ponderal dos animais tratados com composto ICMD-01 ($2000 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), durante 14 dias.

Consumos	Controle	ICMD-01
Consumo de ração (g)	$20,77 \pm 1,758$	$18,00 \pm 1,472$
Consumo de água (mL)	$16,31 \pm 0,809$	$17,77 \pm 0,744$

Fonte: Elaborada pelo autor, 2019. Os dados são expressos como média \pm SEM; n = 13 determinações por grupo. * Significativamente diferente do grupo controle tratado com salina + Tween 5% ($p < 0,05$).

Esses resultados não sugerem alterações significativas ao ser comparado com o grupo controle. Quando há alterações nesses parâmetros, possíveis efeitos adversos do produto testado podem estar relacionados.

Outro parâmetro que o teste de toxicidade aguda permite analisar é a relação entre a substância testada com possível atuação tóxica em órgãos alvo. Para tanto, os órgãos retirados dos animais (coração, pulmão, rins, fígado e baço) foram submetidos a análise macroscópica e nenhum deles apresentou alteração morfológica, nem mudanças da coloração. A evolução ponderal dos animais teste também se manteve semelhante ao grupo controle, assim como os pesos relativos dos órgãos expressos na tabela 2.

Tabela 2 – Peso relativo dos órgãos e evolução ponderal dos animais tratados com composto ICMD-01 ($2000 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), durante 14 dias.

Órgãos	Controle	ICMD-01
Coração	$0,400 \pm 0,039$	$0,440 \pm 0,017$
Pulmão	$0,572 \pm 0,041$	$0,524 \pm 0,058$
Rins	$1,069 \pm 0,010$	$1,085 \pm 0,038$
Fígado	$4,944 \pm 0,177$	$5,517 \pm 0,154$
Baço	$0,305 \pm 0,068$	$0,512 \pm 0,021$
Evolução ponderal (g)	$5,333 \pm 0,882$	$3,667 \pm 1,333$

Fonte: Elaborada pelo autor, 2019. Os dados são expressos como média \pm SEM; n = 3 determinações por grupo. * Significativamente diferente do grupo controle tratado com salina + Tween 5% ($p < 0,05$).

Em relação aos parâmetros bioquímicos foi observado a diminuição significativa dos níveis séricos de TGO e do triglicerídeos no grupo teste. Os demais parâmetros não apresentaram alterações significativas. Em relação aos parâmetros hematológicos, as alterações ocorreram nas plaquetas e no número total de leucócitos, como expresso nas tabelas (3 e 4) a seguir.

Tabela 3 – Determinação dos parâmetros bioquímicos dos animais tratados com composto ICMD-01 ($2000 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), durante 14 dias.

Dosagens Bioquímicas	Controle	ICMD-01
Ureia (mg/dL)	$59,00 \pm 5,196$	$61,33 \pm 5,364$
Creatinina (mg/dL)	$0,36 \pm 0,048$	$0,41 \pm 0,061$
TGO (U/L)	$121,00 \pm 5,568$	$86,67 \pm 3,528^{**}$
TGP (U/L)	$86,00 \pm 18,930$	$85,67 \pm 18,100$
Ácido úrico (mg/dL)	$2,03 \pm 0,0333$	$2,07 \pm 0,088$
Colesterol total (mg/dL)	$88,33 \pm 6,839$	$76,33 \pm 5,840$
HDL (mg/dL)	$42,00 \pm 1,528$	$41,00 \pm 0,577$
Triglicerídeos (mg/dL)	$206,0 \pm 4,583$	$157,0 \pm 11,79^*$
Glicose (mg/dL)	$264,7 \pm 10,59$	$257,7 \pm 14,24$

Fonte: Elaborada pelo autor, 2019. TGO (transaminase glutâmico-oxalacética); TGP (transaminase glutâmico-pirúvica); HDL (High Density Lipoproteins).

Tabela 4 – Determinação dos parâmetros hematológicos dos animais tratados com composto ICMD-01 (2000 mg kg⁻¹), durante 14 dias.

Dosagens Hematológicas	Controle	ICMD-01
RBC	7,28 ± 1,135	9,67 ± 0,276
HGB	11,17 ± 1,507	14,80 ± 0,264
HCT	33,63 ± 5,341	45,87 ± 0,463
PLT	508,70 ± 129,80	1201 ± 69.340**
WBC	3,53 ± 1,162	10,03 ± 1,372*

Fonte: Elaborada pelo autor, 2019. RBC (contagem de hemácias); HGB (hemoglobina); HCT (hematócrito); PLT (plaquetas); WBC (contagem de leucócitos). Os dados são expressos como média ± SEM; n = 3 determinações por grupo. * Significativamente diferente do grupo controle tratado com salina + Tween 5% (p <0,05).

Os parâmetros hematológicos e bioquímicos são os principais métodos laboratoriais utilizados para investigação de possíveis discrasias sanguíneas e alterações funcionais dos órgãos alvo, respectivamente, o que pode ser apontado como uma reação adversa ao medicamento utilizado (MIOTRI; CASTRO, 2017). As alterações expressas nas dosagens hematológicas, podem ser em razão do aumento da agregação plaquetária atribuída ao mecanismo de ação dessas drogas, esse e o aumento da contagem total de leucócitos deve ser melhor investigada posteriormente.

Özdemir et al., (2015) avaliou a atividade das enzimas marcadoras da função hepática, após indução de inflamação sistêmica em camundongos, utilizando derivados indol, incluindo a indometacina, os resultados obtidos comprovam a atuação destes compostos na diminuição da enzima transaminase glutâmico-oxalacética (TGO) além de diminuir os níveis da Proteína C Reativa (PCR), demonstrando a contenção da inflamação exercida pela atuação desses compostos.

Portanto, é sugestivo que o processo de hibridização molecular não tenha alterado a função anti-inflamatória atribuída a estrutura indol, visto que, o composto ICMD-01 apresentou baixa toxicidade na dose testada, evidenciada pela ausência de morte e alterações comportamentais nos ensaios toxicológicos. Apesar de conter em sua estrutura a função fenilacrilamida, que também é encontrada no fármaco paracetamol, os resultados não sugerem hepatotoxicidade nos animais. Esse achado é um importante parâmetro a ser enaltecido, pois é sugestivo da diminuição

da toxicidade atrelado a esse composto. Vale ressaltar que no processo de metabolização do paracetamol, pode ocorrer a formação de um metabólito tóxico conhecido como NAPQI (N-acetil-p-benzo-quinonaimina) e na depleção dos níveis de glutathiona, o mesmo pode se ligar covalentemente as moléculas hepáticas, gerando lesão ao tecido e conseqüentemente diminuição da função do mesmo (TERRES, 2015).

5.2.2 Edema de pata induzido por CFA

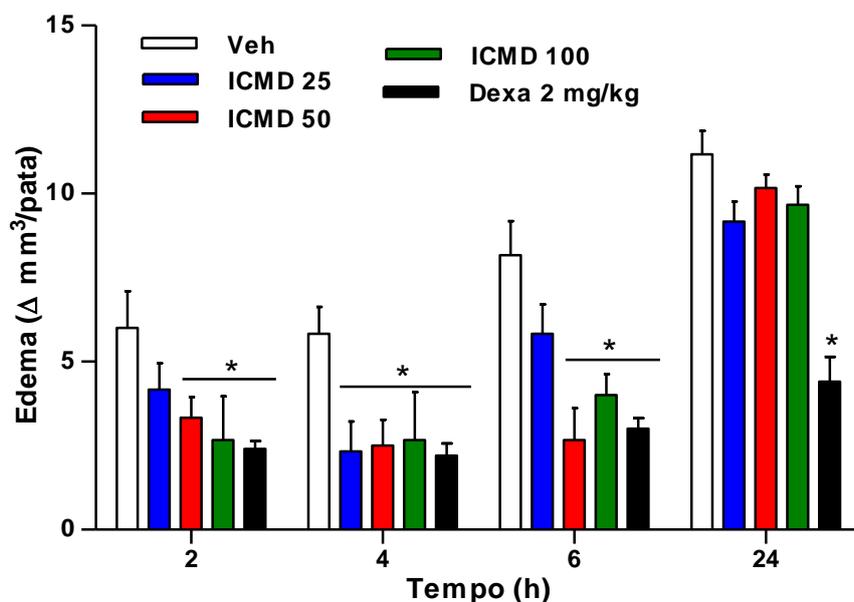
Em estudos pré-clínicos de dor inflamatória, o modelo de inflamação periférica induzida pelo Adjuvante Completo de Freund (CFA) está bem estabelecido e permite a quantificação dos mediadores envolvidos nas alterações celulares durante o processo inflamatório. Este modelo caracteriza-se por infiltração de neutrófilos, bem como pela liberação de outros mediadores químicos a partir dos neutrófilos ativados, tais como as citocinas inflamatórias. Entre as substâncias pró-inflamatórias, o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) e as interleucina-1 beta (IL-1 β) são as principais citocinas que sensibilizam, e/ou ativam, os neurônios da via da dor. A inibição desses mediadores constitui alvos terapêuticos importantes no controle da dor crônica (MADEIRA, 2016).

Este processo consiste em duas fases cruciais, na primeira, em que a inflamação é mediada pela atuação do sistema complemento C3a e C5a. Essas substâncias são responsáveis por recrutar células como mastócitos e basófilos, estas por sua vez, liberam histamina e serotonina; na segunda fase, diferentes substâncias participam da ativação da cascata de reações sendo responsáveis pela síntese e liberação de metabólitos oriundos do AA, fator de ativação plaquetária, espécies reativas de oxigênio e citocinas, dentre elas a TNF- α . A ação combinada dos mediadores químicos são responsáveis pela resposta inflamatória observada na formação do edema (SANTOS, 2015).

No modelo de edema de pata, foi verificado que as três concentrações (25, 50 e 100 $mg \cdot kg^{-1}$) do ICMD-01 reduziram significativamente o edema quando comparadas com o controle negativo (figura 6). Porém, a dose de 25 $mg \cdot kg^{-1}$ só apresentou atividade na 4ª hora. Como estatisticamente a dose de 50 e 100 $mg \cdot kg^{-1}$ promovem respostas semelhantes, a dose de 50 $mg \cdot kg^{-1}$ foi selecionada para a

realização dos demais testes farmacológicos, reduzindo assim o número de animais utilizados.

Figura 6 – Influência do tratamento com o composto ICMD sob o edema de pata induzido por CFA.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2019. Veh (veículo); Dexa (dexametasona). Os dados são expressos como média \pm SEM; n = 6 animais por grupo. * Significativamente diferente do grupo controle ($p < 0,05$). ANOVA de duas vias seguida do teste de Bonferroni.

A primeira hora da inflamação promovida pelo CFA é caracterizada pela liberação de histamina e bradicinina, a partir da segunda hora ocorre a maior produção de mediadores químicos como PGs (SANTOS, 2015). Nossos resultados sugerem que a maior atuação do ICMD-01 é na inibição da produção desses fatores. O composto ICMD-01 pelo estudo de docking, realizado pelo aluno de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UEPB, mostra a atuação desse composto nas isoformas 1 e 2 da COX (dado ainda não publicado – dissertação em andamento), o que justificaria tal achado, porém novos testes devem ser realizados para comprovação.

A figura também expressa que na sexta hora a dose de $25 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ não mais apresentou efeito anti-inflamatório e o mesmo aconteceu com todas as doses, do ICMD-01, após 24 horas. Resultados que difere dos expressos por Shahiwala et al, (2002) em que foi utilizado a nimesulida incorporadas em niassomas, cuja inibição do edema foi efetiva em 66,68% após 24 horas da indução. Porém tal efeito pode

estar atrelado ao sistema de liberação desse fármaco. Estes resultados reforçam a afirmativa anterior, demonstrando que essa ação do composto híbrido pode ser comparável ao mecanismo exercido pelos AINEs, onde a via da COX é inibida impedindo a sua ação havendo conseqüentemente a inibição das PGs inflamatórias.

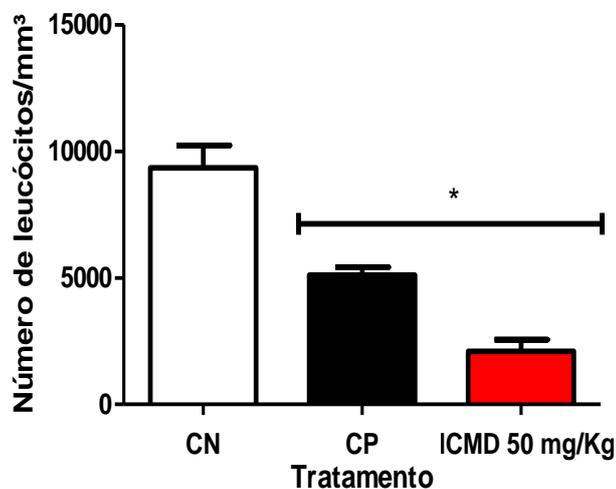
5.2.3 Peritonite induzida por zymozan

O teste de peritonite induzida por *zymozan* objetiva verificar se a atividade antiedematogênica apresentada pelo composto está relacionada com a inibição da migração leucocitária para o local da inflamação (PEREIRA, 2013).

Durante o processo inflamatório ocorre a migração de leucócitos para o tecido lesionado através de mecanismos como a vasodilatação dos capilares na membrana peritoneal que permite a elevação do fluxo sanguíneo; alterações estruturais na microcirculação, favorecendo o extravasamento de proteínas plasmáticas para o interstício em forma de exsudato inflamatório; além de migração celular de leucócitos da microcirculação e seu acúmulo no local de lesão inicial. Essas células contribuem para destruição de patógenos e cicatrização dos tecidos, porém a permanência destas no local inflamado ocasionam danos teciduais gerando doenças inflamatórias (PEREIRA, 2013; APOLINÁRIO, 2016;). O mesmo ocorre ao se administrar um agente flogístico no peritônio dos camundongos, esse deslocamento de leucócitos é quantificado e mensurado após o processo inflamatório agudo.

Os resultados obtidos nessa avaliação (figura 7) demonstram que a migração leucocitária foi reduzida de forma significativa após quatro horas de administração do *zymozan* quando comparado com o grupo controle. O que sugere que o ICMD-01 na concentração de $50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ inibe a migração celular de modo mais significativo que o grupo controle com a droga padrão (indometacina $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$).

Figura 7 – Influência do tratamento com o composto ICMD-01 sob a contagem total de leucócitos na peritonite induzida por *zymosan*.



Fonte: Elaborada pelo autor, 2019. CN (controle negativo); CP (controle positivo). Os dados são expressos como média \pm SEM; n = 6 animais por grupo. * Significativamente diferente do grupo controle ($p < 0,05$). ANOVA de duas vias seguida do teste de Bonferroni.

Anti-inflamatórios em potencial podem reduzir a migração leucocitária para a cavidade peritoneal por dois mecanismos: impedindo a síntese e/ou liberação de mediadores quimiotáticos ou inibindo a expressão de moléculas de adesão, já que é necessária a presença de substâncias quimiotáticas que facilitem sua migração para o local da injúria para que possam desencadear seus efeitos na tentativa de destruir o agente agressor (CARVALHO, 2011).

No que se refere a atividade anti-inflamatória de compostos híbridos indólico fenilacrilamida há poucos relatos na literatura. No entanto, os resultados obtidos permitem sugerir que esse composto possui atividade anti-inflamatória relacionada à capacidade de suprimir a ação e/ou liberação de aminas vasoativas, NO e possivelmente das PGs, sendo capaz assim de inibir a migração leucocitária, além de apresentar potencial ação imunomoduladora e analgésica, possivelmente devido capacidade de ativação de fatores antioxidantes.

Resultado sugestivo também foi evidenciado por Gu et al., (2019), no qual foi realizado uma série de testes *in vitro* utilizando células mesangiais para avaliar a atividade antioxidantes de compostos derivados de fenilacrilamida, os resultados sugerem que o possível mecanismo de ação está associado a ativação do Fator Nuclear Eritróide 2 (NFR2) (é uma das principais enzimas antioxidantes, reguladora

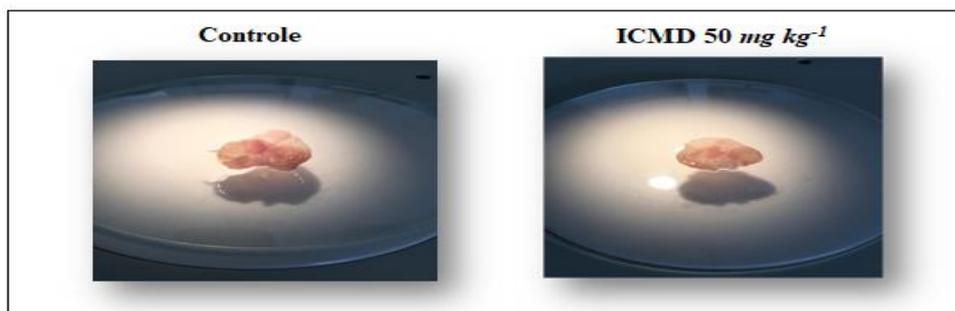
de células para proteger e combater o estresse oxidativo) e ao aumento de proteínas responsáveis por estimula a expressão de enzimas antioxidantes. Ainda no mesmo estudo, o autor sugere que essas moléculas também reduzem a produção de NO e aumentam a atividade do Fator Nuclear kappa B (NF-kB) nas células testadas, previamente estimuladas por LPS, justificando a sua potencial ação anti-inflamatória.

5.2.4 Toxicidade gástrica

A determinação da toxicidade gástrica (potencial ulcerogênico) avalia a possibilidade de compostos químicos naturais e ou sintéticos apresentarem como efeitos secundários a indução das úlceras pépticas. Deve-se ressaltar que esses eventos são amplamente induzidos por fármacos anti-inflamatórios não esteroidais mais especificamente com os não seletivos para COX-2, que agem suprimindo a produção de prostaglandinas citoprotetoras da mucosa pela inibição da COX-1. São esses eventos gástricos adversos que comprometem o tratamento com os AINEs, o que justifica o desenvolvimento de fármacos que apresentem menores efeitos adversos (GRASSI; ARAÚJO, 2012; SILVA, 2017).

Na avaliação da possível atividade ulcerogênica os camundongos foram tratados com o composto ICMD $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (dose terapêutica estabelecida pelos ensaios farmacológicos) por 7 dias consecutivos, respeitando o prazo de 24 horas, e comparado com os animais tratados com salina acrescida de Tween 5%. Com relação aos resultados, o grupo controle apresentou índice de lesões ulcerativas (ILU) de $2,6 \pm 0,60$ e o grupo teste $3,8 \pm 0,73$. Esses valores mostram que não há diferença estatística entre os dois grupos, como pode ser visualizado na figura 8.

Figura 8 – Imagens dos estômagos do grupo controle e tratados com ICMD-01 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$.



Fonte: Registrado pelo autor, 2019.

O mesmo achado foi descrito por Santos, (2015) ao tratar camundongos da raça *Wistar* utilizando duas doses diárias por cinco dias consecutivos de derivados indólicos. Isso demonstra que esses derivados são seguros por não produzir formação e/ou indução ulcerativa no TG quando administrado cronicamente. No entanto, como dito anteriormente, o composto ICMD-01 apresentou pelo estudo de docking, uma não seletividade pelas isoformas 1 e 2 da COX (dados ainda não publicado – dissertação em andamento), sendo necessário avaliar o perfil de segurança gástrica por outros testes, como o teste de microscopia de varredura *in vitro* para melhor esclarecimento do mecanismo de ação.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados descritos neste estudo demonstram que a hibridização do composto ICMD-01 é uma proposta promissora.

O composto ICMD-01 nas doses de 25, 50 e 100 $mg \cdot kg^{-1}$ foi capaz de inibir a formação do edema de pata e a migração leucocitária para o peritônio em camundongos. Além de apresentar baixo índice de toxicidade aguda, em eritrócitos e gástrica nas condições testadas.

O composto apresenta potencial efeito farmacológico sem o efeito secundário gástrico comum aos demais AINEs.

No entanto, outros testes precisam ser realizados a fim de determinar os possíveis mecanismos de ação, como a quantificação de citocinas, visando contribuir para o desenvolvimento futuro de um medicamento, que exerça efeito anti-inflamatório com efeitos adversos reduzidos e permita o uso prolongado nos casos de doenças crônicas.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, Renan do Canto Borges de. **Síntese de indóis e N-hidróxi-indóis polifuncionalizados e de análogos do mitotano partindo de 3,3-diaril-cinamatos substituídos**. 2017. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química. – Campinas, São Paulo, 2017.
- ARAUJO, C. R. M. et al. Drug development by molecular hybridization: a medicinal chemistry practice class using paracetamol and sulfadiazine tablets and the virtual TOOLSciFinder®. **Química Nova**, [s.l.], p.1-9, 2015.
- APOLINÁRIO, Nadjaele de Melo. **Elucidação estrutural e avaliação do potencial biológico de novos derivados N-acilhidrazônicos**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2016.
- BATISTA, Daniel da Costa. **Planejamento, síntese e avaliação farmacológica de novos candidatos a protótipos de fármacos anti-inflamatórios**. Dissertação (Mestrado em Biologia) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 425 f. 2017
- BATLOUNI, M. Anti-Inflamatórios Não Esteroides: Efeitos Cardiovasculares, Cérebro Vasculares e Renais. **Arq Bras Cardiol**, v.94(4), p. 556-563, 2010.
- BORGES, Alexandre. **Estudos de modelagem molecular de lignanas em complexos com ciclooxigenases-1 e 2**. Tese (doutorado) Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira, São Paulo, 134f. 2016.
- CAMPBELL, Ian B.; MACDONALD, Simon J.f.; PROCOPIOU, Panayiotis Medicinal chemistry in drug discovery in big pharma: past, present and future. **Drug Discovery Today**, v. 23, n. 2, p.219-234, fev. 2018.
- CASTEL-BRANCO, M.M. et al. As bases farmacológicas dos cuidados farmacêuticos: o caso dos AINEs. **Acta Farmacêutica Portuguesa**. vol. 2, n. 2, 2013.
- CERNUDA, R. F.B., et al. *Perforación ileal por indometacina*. **Gastroenterología y Hepatología**, v.27(1), p.18–20, 2004.
- DE MIRANDA, A. S., et al. Design, Synthesis, Antinociceptive and Anti-Inflammatory Activities of Novel Piroxicam Analogues. **Molecules**, v. 17, n. 12, p. 14126-14145, 2012.
- DUSSE, L. M. S.; VIEIRA, L. M.; CARVALHO, M. G. Revisão sobre óxido nítrico. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. Rio de Janeiro. v. 39, n. 4, p. 343-351. 2003.
- GOODMAN, S. L.; GILMAN, G. A. **Manual de farmacologia e terapêutica de Goodman e Gilman**. 2. ed. Porto Alegre: AMGH, 2015.

GORANTLA, V.; GUNDLA, R.; JADAY, S. S. et al. Molecular hybrid design, synthesis and biological evaluation of N-phenyl sulfonamide linked N-acyl hydrazone derivatives functioning as COX-2 inhibitors: new anti-inflammatory, anti-oxidant and anti-bacterial agents. **New Journal of Chemistry**, v. 22, n. 13185-14002, 2017.

GRIVENNIKOV, S. I.; GRETEN, F. R.; KARIN, M. Immunity, Inflammation, and cancer. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 883-99, 2010.

GUIDO, R. V. C.; ANDRICOPULO, A. D.; OLIVA, G. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. **Estudos Avançados**, [s.l.], v. 24, n. 70, p.81-98, 2010.

HILARIO, M. O. E.; TERRERI, M. T.; LEN, C. A. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs: cyclooxygenase 2 inhibitors. **Jornal de Pediatria**, v. 82, n.5, 2006.

HUSSAIN, I.; ALI, A. Exploring the Pharmacological Activities of Hydrazone Derivatives: A Review. **Journal of Phytochemistry e & Biomemistry**, v. 1, n. 1, 2017.

JACOB, J.P. et al. Safer anti-inflammatory therapy through dual COX-2/5-LOX inhibitors: A structure-based approach. **European Journal Of Pharmaceutical Sciences**. v. 121, p.356-381, ago. 2018.

KALINSKI, P. Regulation of immune responses by prostaglandin E2. **Journal of Immunology**, v. 188, n.1, p. 21-8, 2012.

KAWAHARA, Kohichi et al. Prostaglandin E2-induced inflammation: Relevance of prostaglandin E receptors. **Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - Molecular And Cell Biology Of Lipids**, v. 1851, n. 4, p.414-421, abr. 2015.

KOTAS, E. M.; MEDZHITOV, R. Homeostasis, Inflammation, and Disease Susceptibility. **Cell**, v.160, n.5, p. 816-827, 2015.

LEE, M.; REY, K.; BESLER, K.; WANG, C.; CHOY, J. Immunobiology of Nitric Oxide and Regulation of Inducible Nitric Oxide Synthase. **Results and Problems in Cell Differentiation**, v. 62, p. 181-207, 2017.

LEITE, Karla Carneiro de Siqueira. **Caracterização eletroquímica do composto LQFM-091, obtido por hibridação molecular a partir dos protótipos nimesulida e BF-389**. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Faculdade Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Goiânia, 2015.

LÓPEZ, J.R.M. et al., Disolución comparativa de indometacina en cápsulas utilizando los Aparatos 1 y 4 USP. **Rev. mex. ciênc. farm México**, vol.43 no.3 jul./sep. 2012.

MARCÉN, B; SOSTRES, C; LANAS, A. AINE y Riesgo Digestivo. **Atención primaria**, v.48, n.2 p.73-76, 2016.

MENDES, RT, et al. Inibição seletiva da ciclo-oxigenase-2: riscos e benefícios. **Rev. Bras. Reumatol.** 52(5): 767-782, 2012.

MEIRA, C. S.; DOS SANTOS-FILHO, J. M.; SOUSA, C. C. et al. Structural design, synthesis and substituent effect of hydrazone-N-acylhydrazones reveal potent immunomodulatory agents. **Bioorganic e Medicinal Chemistry**, v.26, n.8, p. 1971-1985, 2018.

MIKOVSKI, D. et al. Química Medicinal E A Sua Importância No Desenvolvimento De Novos Fármacos. **Revista Saúde e Desenvolvimento**. vol.12, n.13, p. 29-44, 2018.

MIOTI, A.G.X.; CASTRO, G.F.P. Alterações hematológicas induzidas por anti-inflamatórios não-esteroidais. **Revista transformar**, v.10, 2017/1. p. 170 -184.

MONTEIRO, E. C. A.; TRINDADE, J. M. F.; DUARTE, A. L. B. P.; CHAHADÉ, W, H. Os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs). **Temas de Reumatologia Clínica**, v.9, n.2, p.53-63, 2008.

MOURA, Willian Charles da Silva. **Planejamento, síntese e avaliação preliminar da atividade antibacteriana de derivados N-acilhidrazônicos substituídos**. 2016. 64 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia). Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2016.

MÜHLBAUER, M. PARACETAMOL, UM AINE PARTICULAR. **Ciência Atual**, Rio de Janeiro, v.7, n. 1, p. 02-10, 2016.

OECD- Organization for Economic Cooperation and Development. Guideline 423: Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method. OECD, Paris, 2001. 14p.

OLIVEIRA, M.M.C. et al. O uso crônico de anti-inflamatórios não esteroidais e seus efeitos adversos, **Revista Caderno de Medicina** V. 2. p. 90-101. 2019.

ÖZDEMİR, Ahmet et al. Synthesis and evaluation of new indole-based chalcones as potential antiinflammatory agents. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, v. 89, p.304-309, jan. 2015.

PARK, J. Y.; PILLINGER, M. H.; ABRAMSON, S. B. Prostaglandin E2 synthesis and secretion: The role of PGE2 synthases. **Clinical Immunology**, v.119, n.3, p.229-240, 2006.

PATRONO, C. Cardiovascular effects of cyclooxygenase-2 inhibitors: a mechanistic and clinical perspective. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 82, n. 4, p. 957-964, 2016.

PECONICK, A. P.; KALKS, K. H. M. **Resposta inflamatória aguda sob a ótica imunológica**. Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011. 23 p.

RANG, H.P. et al. **Farmacologia**. Elsevier, 6ª ed. 2007.

RAO, P. P. N.; KABIR, S. N.; MOHAMED, T. Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs): Progress in Small Molecule Drug Development. **Pharmaceuticals**, v.3, n.5, p. 1530-1549, 2010.

RIBEIRO, FREDERICO FÁVARO. **Uso de ferramentas do planejamento racional de fármacos auxiliado por computador aplicado a uma série de tiossemicarbazonas e seus bioisómeros frente à doença de Chagas**. Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica, Recife, 2018.

ROCHA, Thalita Leone Alves. **Avaliação do status antioxidante, das citocinas inflamatórias e metaloproteínases em ratos anestesiados com isoflurano e sevoflurano**. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu, 2018.

ROLLAS, S.; KÜÇÜKGÜZEL, S. G. Biological activities of hydrazone derivatives. **Molecules**, v.12, n.8, p. 1910-39, 2007.

ROSTOM, A.; MUIR, K.; DUBE, C. et al. Gastrointestinal Safety of Cyclooxygenase-2 Inhibitors: A Cochrane Collaboration Systematic Review. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 5, n. 7, p. 818-28, 828 e 1-5, 2007.

SANTOS, Ewerton Alves Portela. **Estudo do mecanismo de ação anti-inflamatório de protótipos candidatos a fármaco para o tratamento da artrite reumatoide**. 2015. Tese (Doutorado em Farmacologia e Química Medicinal) Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2015.

SHAHIWALA, A. MISRA, A. Studies in topical application niosomally entrapped nimesulida. **Journal of Pharmaceutes Sciences**. v.5 (3), p. 220-225, 2002.

SILVA, Carlos Antônio Trindade. **O Uso terapêutico de mediadores anti-inflamatórios da via do ácido araquidônico**. Tese (doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. Universidade Federal de Uberlândia - MG, 2016.

SILVA, Simone Angêla Soares. **Estudo in Silico, In Vitro e In Vivo dos Possíveis Mecanismos de Ação Anti-inflamatória de Derivados N-acilhidrazônicos Substituídos**. 2017. 76 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2017.

TERRES, D. R. POTENCIAL TOXICOLÓGICO DE MEDICAMENTO DE VENDA LIVRE: ÊNFASE NO PARACETAMOL. **Revista Científica**, Colider, n. 08, 2015.

VENERITO, M.; WEX, T.; MALFERTHEINER, P. Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drug-Induced Gastroduodenal Bleeding: Risk Factors and Prevention Strategies. **Pharmaceuticas** (Basel), v. 3, n. 7, p. 2225-237, 2010.

VERMA, G.; MARELLA, A.; SHAQUIQUZZAMAN, M. et al. A review exploring biological activities of hydrazones. **Journal of Pharmacy e BioAllied Sciences**, v. 6, n. 2, p. 69-80, 2014.

XU, W.; LARBI, A. Immunity and Inflammation: From Jekyll to Hyde. **Experimental Gerontology**, [s.l.], v. 107, p.98-101, jul. 2018.

ZEINALI, M.; TABESHPOUR, J.; MAZIAR, S. V. et al. Prescription Pattern Analysis of Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs in the Northeastern Iranian Population. **Journal of Research in Pharmacy Practice**, v.6, n.4, p.206-210, 2017.