



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

PABLO RAYFF DA SILVA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E TOXICOLÓGI-
CA DE UM DERIVADO N-ACILHIDRAZÔNICO**

**CAMPINA GRANDE-PB
2017**

PABLO RAYFF DA SILVA

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E TOXICOLÓGICA DE UM DERIVADO N-ACILHIDRAZÔNICO

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

Área de concentração: Farmácia

Orientador: Prof. Dra. Vanda Lucia dos Santos

**CAMPINA GRANDE-PB
2017**

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.

S586a Silva, Pablo Rayff da.
Avaliação da atividade anti-inflamatória e toxicológica de um derivado *N*-acilhidrazônico [manuscrito] : / Pablo Rayff da Silva. - 2017.
45 p. : il. colorido.

Digitado.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2017.

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

1. Hidrazonas. 2. Atividade anti-inflamatória . 3. Química medicinal. 4. Química farmacêutica.

21. ed. CDD 615.19

PABLO RAYFF DA SILVA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E
TOXICOLÓGICA DE UM DERIVADO N-ACILHIDRAZÔNICO**

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

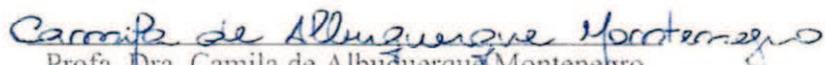
Área de concentração: Farmácia

Aprovada em: 23/10/2017.

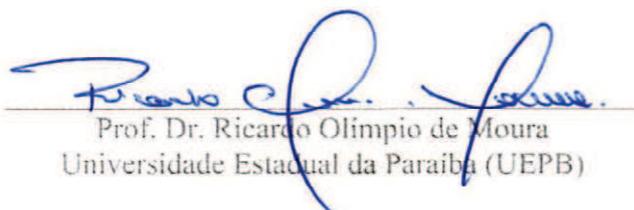
BANCA EXAMINADORA



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



Profa. Dra. Camila de Albuquerque Montenegro
Universidade Federal de Campina Grande (UFCG)



Prof. Dr. Ricardo Olimpio de Moura
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

DEDICATÓRIA

A Deus pela sua infinita bondade e a minha família,
por todo esforço e dedicação que me fizeram chegar
até aqui, DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Apesar de estar chegando ao que parece ser um ponto final, contemplando cada passo dado nesta jornada, hoje opto por enxergar o próximo passo como um novo horizonte que se abre para irmos além dos nossos sonhos, escolhas e projetos.

A caminhada não foi fácil, mas isso me fez nunca perder de vista o ponto de partida! Olhar para trás é enxergar as noites de estudos, os esforços feitos, as ausências na família, para hoje chegar a concretização de mais uma conquista.

Olhar para trás é enxergar todos os percalços, e para ir adiante também é necessário lembrar o quanto um dia precisamos uns dos outros. Nessa vitória, há uma certeza, não estou sozinho!

Á Deus e a Nossa Senhora, minha eterna gratidão, por me direcionar naquilo que já tinha sido planejado para minha vida.

Á meus pais e irmãos, sobrinhos e cunhado, por serem sustento, espelho, e acima de tudo, meus maiores incentivadores. Não foi fácil, e sei o quanto batalharam para que juntos possamos desfrutar dessa vitória.

Aos meus amigos, de universidade e da vida, pelo suporte na caminhada e por trazerem mais leveza à graduação.

A minha Orientadora Vanda Lúcia dos Santos, pela humanidade, competência e incentivo ao longo desses anos de pesquisa. Seus ensinamentos foram essenciais para minha formação.

Ao professor Ricardo Olímpio de Moura, por sua disponibilidade, parceria e amizade ao longo dessa trajetória científica.

A professora Camila Montenegro, por toda motivação, carinho, apoio e por aceitar fazer parte desse momento de grande importância

Aos meus amigos do Laboratório de Ensaio Farmacológicos e de Síntese, Camila, Cris, Elaine, Hilton, Helimarcos, Ítala, Ingrid Raiff, Renaly e Nadjale, pela paciência, companheirismo e dedicação.

A instituição, UEPB, por ter me acolhido e possibilitado a minha formação e a todos os professores, que me instigaram durante toda a caminhada acadêmica.

A todos, o meu muito obrigado!

“Combati o bom combate, terminei a minha carreira, guardei a fé.” (2 Tm, 4)

"Entregar meus sonhos nas mãos de Deus
não é garantia de que terei sucesso, mas a
certeza de que eles serão fecundos"
(Abner Santos)

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	–	Visão Geral da Inflamação	17
Figura 2	–	Produção de eicosanoides a partir do Ácido Araquidônico	20
Figura 3	–	Enzimas cicloxigenases 1 e 2, diferenciadas pelos aminoácidos isoleucina e valina, respectivamente	21
Figura 4	–	Esqueleto carbônico da hidrazona obtido por reação de condensação	24
Figura 5	–	Reação de formação de hidrazonas e <i>N</i> -acilhidrazona	24
Figura 6	–	Esqueleto carbônico <i>N</i> -acilhidrazônico	24
Figura 7	–	Inibição da migração leucocitária do composto JR04, frente ao controle negativo, utilizando o ensaio de peritonite induzido por carragenina	30
Figura 8	–	Avaliação da inibição do volume do edema de pata induzida pela carragenina, frente ao grupo controle e grupo teste	31
Figura 9	–	Inibição da migração celular pelo composto JR04, no modelo de bolsão de ar subcutâneo	33

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs)	22
Quadro 2 – Atividades Biológicas de derivados acilhidrazônicos	25

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Consumos e evolução ponderal dos animais submetidos ao teste de toxicidade, tratados pelo composto JR04 (100 mg.kg^{-1}), durante 14 dias 34
- Tabela 2** – Peso relativo dos órgãos de camundongos fêmeas tratadas com o JR04 na dose de 100 mg.kg^{-1} via oral, após 14 dias 35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5 - LOX	5 Lipoxigenase
ACH	Adrenocorticotrófico
A.A	Ácido Araquidônico
AMPc	Monofosfato cíclico de adenosina
AINEs	Anti-inflamatórios não esteroidais
BK	Bradicinina
CESED	Centro de Ensino Superior e Desenvolvimento
CEUA	Comitê de Ética em Uso de Animais
COX-1	Cicloxygenase – 1
COX-2	Cicloxygenase – 2
COX-3	Cicloxygenase – 3
GI	Gastrointestinal
GMPc	Monofosfato Cíclico de Guanosina
IP ₃	Inositol Trifosfato
IFN	Interferons
IL-1	Interleucina -1
IL-2	Interleucina -2
IL-6	Interleucina – 6
IL-8	Interleucina – 8
IL-17	Interleucina – 17
IKK β	Proteína quinase de KK β
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
LAEF	Laboratório de Ensaios Farmacológicos
LSVM	Laboratório de Síntese e Vetorização Molecular
LTs	Leucotrienos
LTA ₄	Leucotrieno A ₄
LTB ₄	Leucotrieno B ₄
LTC ₄	Leucotrieno C ₄
LTD ₄	Leucotrieno D ₄
LTE ₄	Leucotrieno E ₄
LTh	Linfócito T Helper
NOS	Óxido Nítrico Sintase

NF-KB	Fator nuclear kappa B
OCDE	Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico
PBS	Solução Tampão Fosfato
pH	Potencial Hidrogeniônico
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PGD ₂	Prostaglandina D ₂
PGI ₂	Prostaglandina I ₂
PGs	Prostaglandinas
PIs	Prostaciclina
PLA ₂	Fosfolipase A ₂
RNA _m	Ácido ribonucleico mensageiro
sGV	Guanilato Ciclase solúvel
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral alfa
TGF α_1	Fator de transformação do crescimento alfa 1
TXs	Tromboxano
TX A ₂	Tromboxano A ₂
UEPB	Universidade Estadual da Paraíba
v.o	Via oral

RESUMO

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E TOXICOLÓGICA DE UM DERIVADO *N*-ACILHIDRAZÔNICO

¹ Pablo Rayff da Silva; ² Vanda Lúcia dos Santos

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

¹ pablo-rayff@hotmail.com

Com o advento da química medicinal, houve uma maior diversidade de estruturas químicas privilegiadas com as mais diversas potencialidades terapêuticas. Dentre as estruturas carbônicas promissoras, tem-se os derivados *N*-acilhiazônicos, que contém grupos farmacofóricos importantes, que os torna grande candidatos a fármacos com atividade anti-inflamatória. Esta pesquisa teve como objetivo avaliar a atividade anti-inflamatória e toxicológica do composto derivado *N*-acilhiazônico: 2-ciano-*N*'-[4- (metilssulfonil) benzilideno]-acetohiazida (JR04). Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) de ambos os sexos. A atividade anti-inflamatória foi avaliada pelos modelos de peritonite, edema de pata e bolsão de ar subcutâneo, utilizando como agente inflamatório a carragenina. A segurança de uso foi verificada pelo teste de toxicidade aguda de dose única e a avaliação comportamental segundo o protocolo da triagem farmacológica proposta por Almeida et. al. (1999). Os resultados foram expressos utilizando a análise de variância, seguido do pós teste de Dunnet ou Tukey, tratados pelo Software GraphPad Prisma. O projeto foi aprovado pela comissão de ética no uso de animais (CEUA) sob número: 5905022016. No modelo de peritonite induzida por carragenina, o composto JR04 apresentou uma inibição da migração leucocitária em 48,3 e 54,1 %, para as doses de 10 e 20 mg.kg⁻¹, respectivamente. Como não houve diferença significativa entre as duas doses, foi escolhida a dose de 10 mg.kg⁻¹ para os demais experimentos. No modelo de edema de pata a inibição do edema foi de 76, 95 e 96% na segunda, terceira e quarta hora, respectivamente. No bolsão de ar subcutâneo, o JR04 inibiu a migração celular em 55%. Na avaliação da toxicidade aguda do composto JR04 (100 mg.kg⁻¹) não produziu alteração fisiológica ou comportamental, indicando baixa toxicidade. Os resultados obtidos mostram o potencial terapêutico do composto JR04 como anti-inflamatório, entretanto, faz necessária à continuação desses estudos, para ratificar a segurança do seu uso, e elucidar os possíveis mecanismos envolvidos na resposta farmacológica.

Palavras-Chave: Hidrazonas. Inflamação. Química Medicinal.

ABSTRACT

EVALUATION OF THE ANTI-INFLAMMATORY AND TOXICOLOGICAL ACTIVITY OF A *N*-ACYLHYDRAZONE COMPOUND

¹ Pablo Rayff da Silva; ² Vanda Lúcia dos Santos

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

¹ pablo-rayff@hotmail.com

With the emergence of medical chemistry, there was a greater diversity of privileged chemical structures with the most diverse therapeutic potentialities. Among the promising carbonic structures, there are the *N*-acylhydrazonic derivatives, which contain important pharmacophoric groups that make them great candidates to use as drugs with anti-inflammatory activity. The aim of this study was to evaluate the anti-inflammatory and toxicological activity of the derivative compound *N*-acylhydrazonic: 2-cyano-*N*'-[4-(methylsulfonyl)benzylidene]acetohydrazide (JR04). Mice (*Mus Musculus*) of both sexes were used. The anti-inflammatory activity was evaluated by the models of peritonitis, paw edema and subcutaneous air pocket, using carrageenan as an inflammatory agent. The safety of use was assessed by the acute toxicity test of single-dose and the behavioral evaluation according to the pharmacological screening protocol proposed by Almeida et. al. (1999). The results were expressed using the analysis of variance, followed by the Dunnett or Tukey tests, treated by the GraphPad Prisma Software. The project was approved by the Animal Ethics Committee, number: 5905022016. In the carrageenan-induced peritonitis model, the compound JR04 presented a leukocyte migration inhibition at 48.3 and 54.1%, for 10 and 20 mg.kg⁻¹ doses, respectively. Since there was no significant difference between the two doses, the chosen dose for the other experiments was of 10 mg.kg⁻¹. In the paw edema model, inhibition of edema was of 76, 95 and 96% in the second, third and fourth hours, respectively. By the subcutaneous air pocket model, JR04 inhibited cell migration at 55%. The acute toxicity evaluation of the compound JR04 (mg.kg⁻¹) did not produce physiological or behavioral changes, indicating low toxicity. The obtained results showed the therapeutic potential of JR04 compound as anti-inflammatory, however, it is necessary to continue on the studies to confirm the safety of its use and clarify the possible mechanisms of pharmacological response.

Keywords: Hydrazonas. Inflammation. Medical Chemistry.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	16
2.1 Objetivo geral	16
2.2 Objetivos específicos	16
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	17
3.1 Fisiopatologia da inflamação	17
3.2 Anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs)	21
3.3 Compostos químicos sintéticos como fonte de novos fármacos	23
3.4 Propriedades biológicas de compostos derivados acilhidrazônicos	24
4 METODOLOGIA	28
4.1 Obtenção do composto <i>N</i> -acilhidrazônico acridínicos substituído (JR04)	28
4.2 Animais	28
4.3 Local da Pesquisa	28
4.4 Procedimentos Éticos	28
4.5 Preparo das Substâncias	28
4.6 Avaliação da atividade anti-inflamatória	28
4.6.1 Peritonite induzida por Carragenina	28
4.6.2 Edema de pata induzido por Carragenina	29
4.6.3 Bolsão de ar subcutâneo	29
4.7 Toxicidade aguda	29
4.8 Análise Estatística	29
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
5.1 Peritonite induzida por Carragenina	30
5.2 Edema de pata induzido por Carragenina	31
5.3 Bolsão de ar Subcutâneo	32
5.4 Toxicidade aguda	33
6 CONCLUSÃO	377
REFERENCIAS	38
ANEXOS	44

1. INTRODUÇÃO

A inflamação é um mecanismo de defesa inespecífico, mediado por substâncias pró-inflamatórias que sinalizam injúrias celulares e/ou teciduais. Essas substâncias desencadeiam processos dinâmicos, celulares e bioquímicos, que promovem reações vasculares e tissulares com o objetivo de extinguir o agente patogênico, reestabelecer a homeostasia e iniciar os processos de reparo (HERNÁNDEZ et al., 2013).

Apesar da inflamação não ser um processo patológico, pode haver uma exacerbação dessa resposta, devido a uma tentativa ineficaz do organismo contra o agente agressor, potencializando a permeabilidade celular, infiltração leucocitária e de células fagocíticas mononucleares, que contribui com o aparecimento dos sinais cardinais da inflamação (rubor, edema, hipertermia, dor, podendo ocasionar perda da função do tecido mesenquimal) (GOODMAN, GILMAN, 2015; VERDASCA, 2015).

Nesse contexto, faz-se necessário o uso de alternativas farmacológicas, e dentre as principais classes de fármacos utilizados na terapia convencional, e uma das mais prescritas, tem-se os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs). Esses compostos possuem estruturas químicas diversas, de natureza ácida ou alcalinas que atuam inibindo de maneira seletiva, ou não, as enzimas cicloxigenases (COX), responsáveis por catalisar a síntese de prostaglandinas, principal mediador do processo inflamatório (MONTEIRO, 2008; BATLOUNI, 2010).

Um dos problemas ligados a terapia convencional com os AINEs, ocorre devido a sua seletividade e do contato direto da fração ácida com a mucosa. Os inibidores não seletivos clássicos induzem ao aumento significativo da incidência de distúrbios gastrointestinais (GI). Para burlar esses eventos gástricos, foram desenvolvidas drogas mais seletivas para COX-2, que apesar de um perfil de toxicidade (GI) mais seguro, passou a ter uso proscrito, devido a maior incidência de efeitos deletérios sobre o sistema cardiovascular (MARCÉN; SOSTRES; LANAS, 2016).

Diante disso percebido a necessidade de desenvolvimento de drogas anti-inflamatórias com maiores eficácias e menores efeitos secundários. E isso vem sendo possível, com o advento da química medicinal, que possibilita a diversidade de estruturas carbônicas com grupos farmacofóricos importantes para inúmeras atividades biológicas. A exemplo têm-se os compostos *N*-acilhidrazônicos, obtidos pela reação entre aldeídos ou cetonas com as *N*-hidrazinas, cuja estrutura privilegiada apresenta diversas aplicações químicas e farmacológicas, dentre elas: ação antimicrobiana, antiparasitária, analgésica, anti-inflamatória, inibidor da agregação

plaquetária, antitumoral dentre outras (GOVINDASAMI et al., 2011; MALIK, AL-THABAITI, MALIK, 2012; SILVA et al., 2014).

O presente estudo busca investigar a possível atividade anti-inflamatória de um derivado *N*-acilhidrazônico, bem como avaliar o perfil toxicológico, utilizando testes em modelos animais. Esses estudos pioneiros para o JR04 podem tornar esses derivados, fortes candidatos a medicamentos anti-inflamatórios, com possibilidades de respostas farmacológicas mais eficazes e menos efeitos indesejáveis, como os danos gastrointestinais e a nefrotoxicidade associada ao uso prolongado dos fármacos convencionais.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade anti-inflamatória do composto derivado *N*- acilhidrazônico: 2-ciano-*N'*-[4- (metilssulfonil) benzilideno]-acetohidrazida (JR04) em modelos animais.

2.2 Objetivos específicos

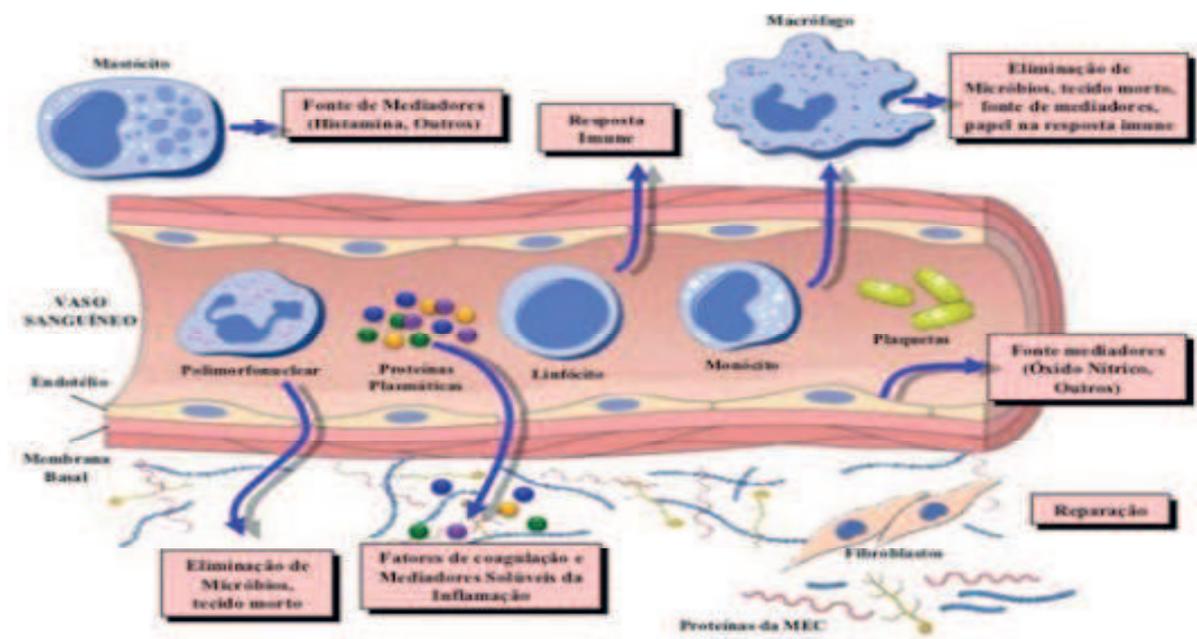
- Realizar ensaios *in vivo* (peritonite e edema de pata induzidos por carragenina, bolsão de ar subcutâneo) para avaliar a atividade anti-inflamatória do JR04.
- Realizar estudos de segurança, através do teste de toxicidade aguda de dose única do composto JR04.
- Realizar a triagem farmacológica de avaliação comportamental dos animais submetidos ao teste de toxicidade de dose única do composto JR04.

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Fisiopatologia da inflamação

A inflamação pode ser definida como um mecanismo de defesa natural do organismo, em resposta a sinalização de injúrias celulares e teciduais. De acordo com Goodman e Gilman (2015) este fenômeno ocorre em detrimento a qualquer agente lesivo, seja de natureza física, química ou biológica, e quando deflagrado envolve uma série de eventos bioquímicos e celulares, caracterizado pela liberação de mediadores solúveis, migração celular (polimorfonucleares), extravasamento de fluídos, sensibilização e ativação de receptores, dentre outros processos biomoleculares (Figura 1).

Figura 1. Visão Geral da Inflamação



Fonte: <<https://www.farmaceticocurioso.com%2F2015%2F03%2Finflamacao-silenciosa-quando-um-fogo.html&psig=AFQjCNEzYZf1VF1b3fxmR>>. Acesso em: 02 de mai. 2017.

Quando se fala no processo fisiopatológico da inflamação, compreende-se as fases irritativa, exsudativa e necrótica, que resultam na liberação de mediadores químicos pró-inflamatórios, alterações hemodinâmicas, migração de fluido extracelular e o aparecimento de produtos de degradação que ocorre em função da necrose celular. Esses fatores contribuem para os sintomas característicos da inflamação: eritema, edema, calor e dor, que podem progredir para a perda da função do órgão ou tecido (PECONICK; KALKS, 2011).

A inflamação, também é classificada de acordo com a duração dos eventos, podendo ser agudos ou crônicos. Na fase aguda a característica marcante é o aparecimento do líquido tecidual ou plasmático formando o edema, além da migração de polimorfonucleares (PMN),

plaquetas e a liberação de mediadores solúveis como histamina e serotonina. Deve-se salientar que ao fim do estímulo, cessa a liberação dessas substâncias. Já na fase crônica, ocorre a extensa liberação de mediadores, cuja quimiotaxia favorece a extensão do processo inflamatório, mesmo ao extinguir o agente agressor. Nessa fase também ocorre necroses teciduais, respostas imunológicas e tentativas de reparação por células especializadas (MESQUITA et al., 2008; MEIER, BANRETI, 2016).

Os mediadores da inflamação podem ser originados de proteínas plasmáticas ou de células, atuando na modulação de biomacromoléculas específicas, seja na ativação direta dos receptores, ação na atividade enzimática direta, ou causando danos oxidativos. Os principais agentes destacados no processo inflamatório são as cininas, citocinas, óxido Nítrico e os derivados do ácido Araquidônico (REGINATO; SILVA; BAUERMANN, 2015).

As cininas são peptídios, de nove a onze aminoácidos do sistema renina/caliceína, incluindo Bradicinina (BK), Calidina, T- Cinina, e seus metabólitos potencialmente ativos. Essas cadeias peptídicas podem ser originadas a partir da ação de caliceína sob o cininogênio plasmático, ou pela hidrólise do cininogênio, obtendo-se respectivamente a BK e a Calidina. As Cininas estão envolvidas nos eventos observados nos processos inflamatórios como a vasodilatação, permeabilidade vascular, migração celular e algesia (OLIVEIRA-JUNIOR; PORTELLA-JUNIOR; COHEN, 2016).

As citocinas são substâncias produzidas localmente por diversos tecidos e células, capazes de interagir com receptores das membranas celulares, estando envolvidas na quimiotaxia do infiltrado leucocitário, restabelecimento epitelial e angiogênese. Das citocinas pró-inflamatórias de grande relevância, têm-se as Interleucinas (IL), em especial a (IL-1) e o Fator de Necrose Tumoral (TNF) (CASTILLO et al., 2017).

Essas citocinas são chamadas de pró-inflamatórias, devido a sua capacidade de indução de outras citocinas, por exemplo, a (IL-2). Estas por sua vez, são responsáveis pela modulação da atividade imunológica durante o processo inflamatório, ativando linfócito T auxiliar pela ação das células apresentadoras de antígenos, diferenciação dos linfócitos B, secreção de corticotrofina, e conseqüentemente a indução da liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), que culmina na produção de glicocorticoide pelas supra-renais (REGINATO; SILVA; BAUERMANN, 2015).

A IL-6 produz efeitos semelhantes, porém menos expressivos em condições fisiológicas quando comparado com a IL-1 e TNF. É importante ressaltar, que esse tipo de Citocina não induz a produção de novos tipos, apenas corrobora o aumento da potência dos efeitos quando associados a atividade de outras Citocinas. Já a IL-17, produzida por linfócitos T Hel-

per (LTh) e neutrófilos, é fundamental na regulação imunológica, sendo potencialmente ativadora de neutrófilo e reguladora da expressão proteica de quimiocinas (CHAMUSCA et al., 2010; LEMOS et al., 2009).

As quimiocinas são um grupo de citocinas, formadas por cadeias polipeptídicas, variando de acordo com o tipo de aminoácido. Segundo Palomino e Marti (2015) estes mediadores, tem como função principal a quimiotaxia de células mononucleadas para o foco inflamatório, e a adesão dessas células ao endotélio. Seu mecanismo constitui na ativação de receptores acoplados a proteína G, que como resposta da transdução, produz monofosfato cíclico de adenosina (AMPc) e inositol trifosfato (IP₃) (CRUVINEL et al., 2010).

Quando essa transdução se processa, ativam-se os leucócitos induzindo-os a liberar selectina e integrinas, que são responsáveis pela sua adesão a parede do endotélio, liberação de compostos oxidantes de origem fagocitária e liberação de histamina e proteases pelos basófilos e neutrófilos (REGINATO; SILVA; BAUERMANN, 2015).

O óxido nítrico (NO) é um importante modulador fisiológico (constitutivo ou induzido), formado pelo aminoácido L-arginina, na presença de oxigênio molecular, pela ação da enzima óxido nítrico sintase (NOs). Sua produção ocorre a nível neural e endotelial, sendo catalisadas por isoformas distintas da NOs. Na inflamação, este composto auxilia na vasodilatação, inibição da agregação plaquetária e citotoxicidade (CASTRO et al., 2014).

A vasodilatação é explicada devido a capacidade de estimulação da enzima Guanilato Ciclase solúvel (sGV), formando o Monofosfato Cíclico de Guanosina (GMPC) intracelular. Este por sua vez, inibe a liberação do cálcio presente nos retículos sarcoplasmáticos, resultando no relaxamento da musculatura lisa do endotélio vascular. A vasodilatação, também facilita a chegada de outros mediadores, que concomitantemente auxilia no processo patológico da inflamação (SILVA; CERCHIARO; HONÓRIO, 2011).

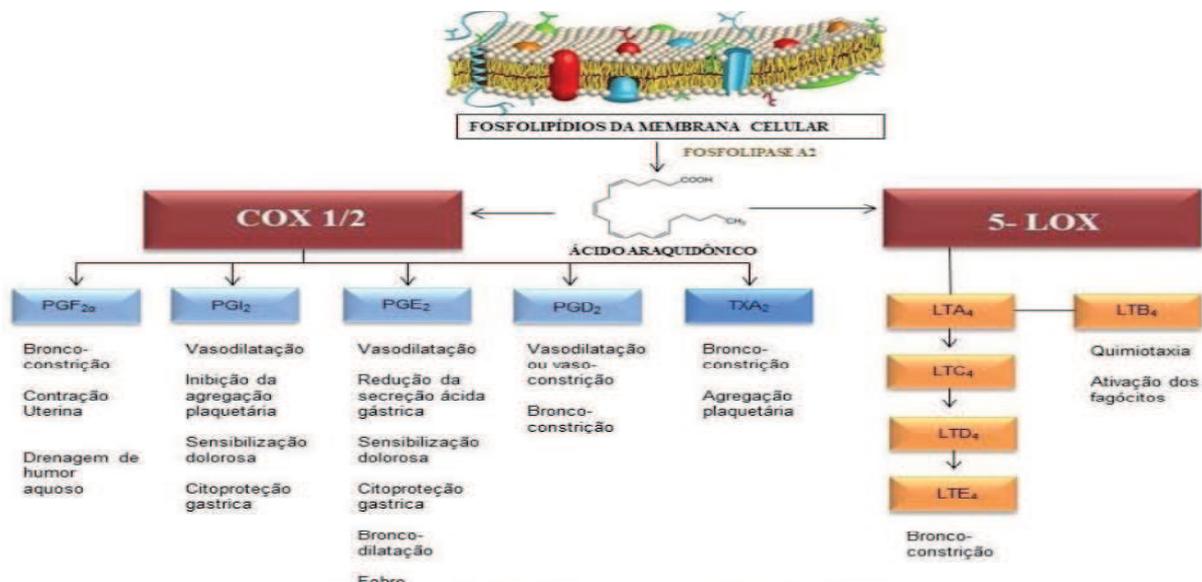
Segundo Giménez et al. (2017), na tentativa do reestabelecimento da homeostasia, algumas Citocinas podem suprimir a produção de óxido nítrico sintase induzível (iNOS). Isso é explicado pela ação do NO, que modula a produção de algumas citocinas, a exemplo: (IL-8, TGF α 1, o TNF, IL-1 e a IL-6).

Um outro mediador importante da inflamação é o ácido araquidônico (A.A), que constitui um ácido graxo de cadeia longa poli-insaturado, liberado a partir da ação das fosfolipases sobre os fosfolipídios de membrana. Ao ser produzido, o ácido araquidônico servirá como substrato das cicloxigenase (COX) formando as prostaglandinas (PGs) e tromboxanos (TX), ou das lipoxigenases (5-LOX) gerando os leucotrienos (LT) (Figura 2). Os prostanóides pos-

suem atividades biológicas diversas, dentre elas: regulação cardiovasculares, gastrointestinal, urogenital, além dos processos inflamatórios (KIRBY et al., 2012).

Dentre os eicosanoides, as prostaglandinas constituem o principal mediador do processo inflamatório. Inicialmente, foram descobertas no líquido seminal, recebendo o sufixo “glandinas” para referir-se a glândula. Hoje, sabe-se que são encontradas em todos os sistemas orgânicos, desempenhando várias funções biológicas. As prostaglandinas, assim, como os leucotrienos, tem sua síntese desencadeada por estímulos nas membranas celulares, que pode ter natureza fisiológica, farmacológica ou patológica (RUALES et al., 2013).

Figura 2. Produção de eicosanoides a partir do Ácido Araquidônico:



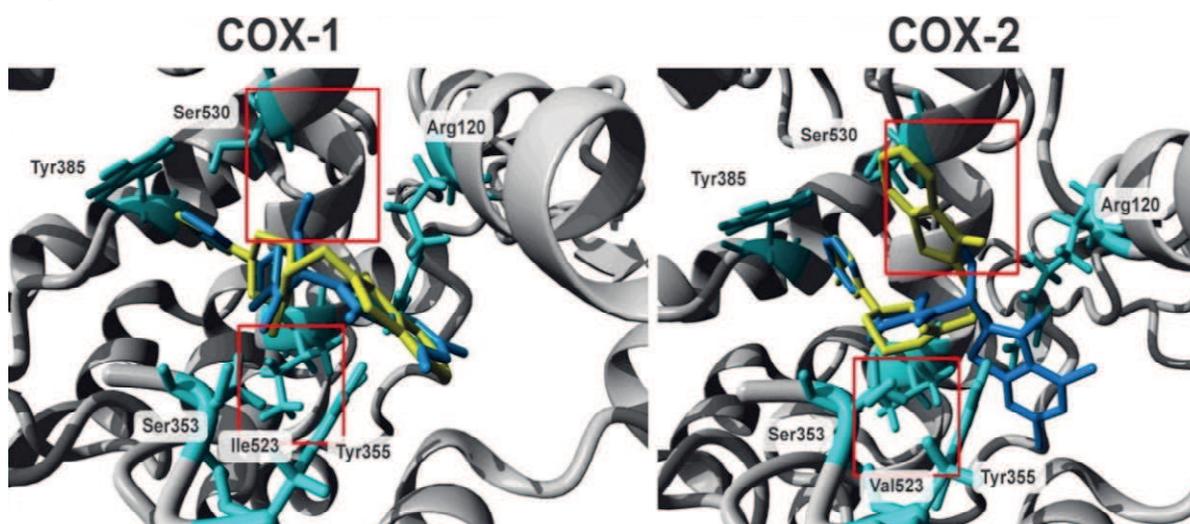
Fonte: ADAPTAÇÃO Goodman e Gilman (2015).

Com relação a COX que metaboliza o AA, tem-se várias isoformas: COX-1, presente na forma constitutiva, produzida em pequenas quantidades para garantir a manutenção de condições fisiológicas, como a citoproteção gástrica, regulação do fluxo sanguíneo renal e agregação plaquetária; COX-2, que é predominantemente induzida quando existe algum processo inflamatório ou mitogênico, regulando a permeabilidade vascular, febre e dor (BAUTISTA, VERA, 2010; COSTA et al., 2015). Esta última isoforma também é expressa constitutivamente em células vasculares e endoteliais, onde é produzida a prostaciclina em respostas a condições de estresse de cisalhamento. Isso explica a toxicidade cardiovascular associada à sua inibição. Recentemente, foram descobertas outras isoformas, a exemplo a COX-3, presente principalmente no Sistema Nervoso (Córtex) sendo possível moduladoras da atividade analgésica e antipirética (KIRBY et al., 2012).

A COX-1 e a COX-2 possuem praticamente os mesmos sítios ativos, diferindo apenas em um único resíduo na posição 523. Na COX-1, o aminoácido é uma isoleucina, e na COX-2, valina (Figura 3). Essa diferença no resíduo permite que a COX-2 apresente um bolsão hidrofóbico maior. O conhecimento dessas estruturas, permite a aplicação de estratégias de planejamento de fármacos com diferentes seletividades, baseado na estrutura do alvo cuja estratégia denomina-se (SBDD, do inglês *structure-based drug design*), podendo-se desenvolver fármacos com diferentes seletividades a COX (KIRBY et al., 2016).

Outra possível estratégia de planejamento de fármacos anti-inflamatórios, fundamenta-se em mimetizar a estrutura do ácido araquidônico, substrato das enzimas COX. Essa estratégia intitula-se LBDD (*Ligand-Based Drug Design*) (REIS et al., 2011).

Figura 3. Enzimas cicloxigenases 1 e 2, diferenciadas pelos aminoácidos isoleucina e valina, respectivamente.

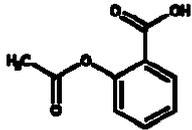
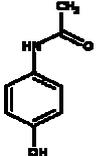
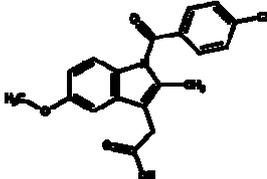
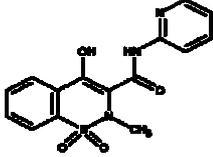
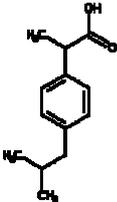
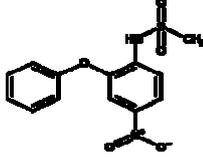
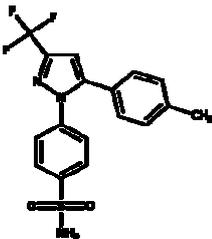


Fonte: Kirby et al. (2016)

3.2 Anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs)

Os AINEs constituem um grupo heterogêneo de compostos (Quadro 1), que em grande maioria, apresenta um ou mais anéis aromáticos, ligado a um resíduo ácido funcional, que caracteriza um grupamento farmacofóricos importante para atividade anti-inflamatória. Em geral, são ácidos orgânicos fracos, que atuam nos sistemas inflamados, bloqueando a ação das enzimas cicloxigenases, suprimindo a produção das prostaglandinas, principal substância envolvida no processo inflamatório. Estes fármacos são um dos principais medicamentos prescritos, sendo também responsáveis pelo acentuado número de eventos adversos (FERNÁNDEZ-LIZ; SUAUI, 2014).

Quadro 1. Anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs)

Classe Terapêutica	Fármaco Representante	Mecanismo de Ação	Estrutura Química
Salicilatos	Ácido Acetilsalicílico	Inibidor Não Seletivo da COX	
Acetaminofeno	Paracetamol	Inibidor não Seletivo da COX	
Derivados do Ácido Acético	Indometacina	Inibidores não Seletivos da COX	
Derivado do Ácido Enólico	Piroxican	Inibidores não Seletivos da COX	
Derivado do Ácido Propiônico	Ibuprofeno	Inibidores não Seletivos da COX	
Sulfonanilida	Nimesulida	Inibidores Seletivos da COX-2	
Coxibes	Celecoxibe	Inibidores Altamente Seletivos para COX-2	

Fonte: Rang & Dale, (2012); <https://www.drugbank.ca/> (Adaptação).

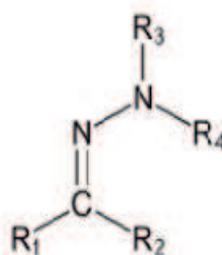
Os principais efeitos adversos desses compostos ocorrem em detrimento a sua seletividade. Os não seletivos são os principais responsáveis pelos distúrbios gastrintestinais, por inibir a produção fisiológica de prostaglandinas citoprotetoras da mucosa, pelo bloqueio do sítio ativo da COX-1. Já os inibidores seletivos da COX-2, promovem um desequilíbrio dos prostanóides; Tx e PGI₁, e o excesso de TX contribui para o aumento da incidência dos eventos trombóticos (FRIEDEWALD et al., 2010).

3.3 Compostos químicos sintéticos como fonte de novos fármacos

Para o desenvolvimento de novos medicamentos, estima-se um gasto de US \$ 4 bilhões. O alto dispêndio, principalmente durante a fase pré-clínica é um dos grandes desafios da indústria de desenvolvimento farmacêutico. Com o advento da química medicinal, e o conhecimento da química combinatória, pode-se minimizar esses gastos, identificando moléculas promissoras, e ampliando as chances de descoberta de potenciais compostos farmacológicos (PANCOTE, 2013; PLOWRIGHT et al., 2017).

Dentre as moléculas com estrutura carbônica privilegiadas de grande interesse da química medicinal, tem-se as hidrazonas (Figura 1). As hidrazonas fazem parte de uma classe orgânica especial, pertencente à família das bases de Schiff, cujos centros ativos, constituídos de carbono e nitrogênio são responsáveis pelas suas propriedades físico-químicas. Devido à reatividade e a susceptibilidade aos ataques nucleofílicos e eletrofílicos desses centros, as hidrazonas são amplamente utilizadas na síntese de compostos heterocíclicos, destinando-se a aplicações a uma diversidade de atividades biológicas (COSTA, 2015; KAJAL et al., 2014; SANTOS, 2013).

Figura 4. Esqueleto carbônico da hidrazona obtido por reação de condensação



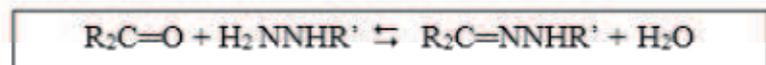
Fonte: Hydrazone. Disponível em: < <http://www.organic-chemistry.org/synthesis/C1N/hydrazines.shtml>>. Acesso em 23 de agosto de 2017.

Estas moléculas podem ser obtidas através da reação de aldeídos ou cetonas com hidrazinas. Na rota sintética, também pode se obter um composto azometino, cuja reação é se-

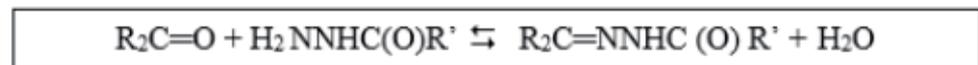
melhante a formação das hidrazonas, no entanto a hidrazina é uma *N*-acilhidrazina (Figura 5) (COSTA, 2015; GENG et al., 2017).

Figura 5. Reação de formação de hidrazona e de *N*-acilhidrazona

Reação geral da formação de uma hidrazona:



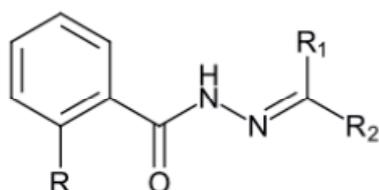
Reação geral da formação de uma *N*-acilhidrazona:



(Fonte: SUGIURA; KOBAYASHI, 2005)

Como produto dessa reação, obtém-se a *N*-acilhidrazona cujo esqueleto carbônico está representado na Figura 6.

Figura 6. Esqueleto carbônico *N*-acilhidrazônico



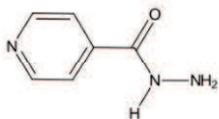
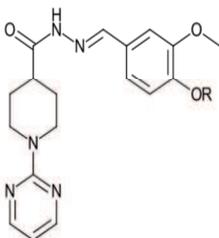
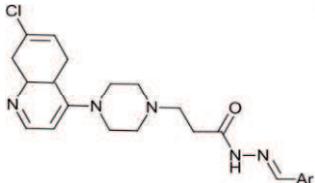
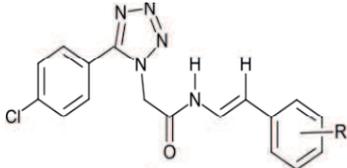
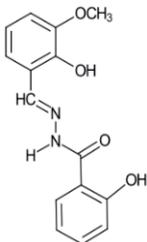
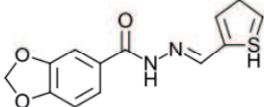
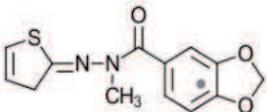
Fonte: Mota, (2013)

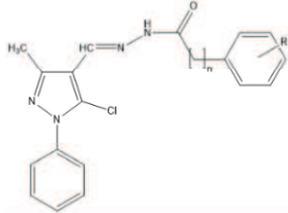
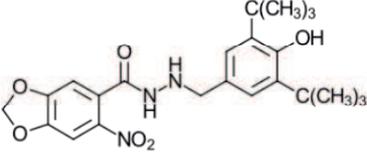
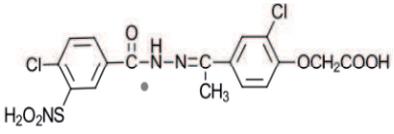
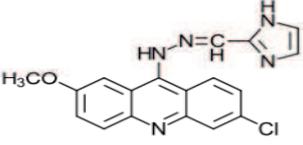
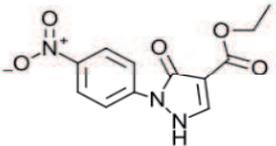
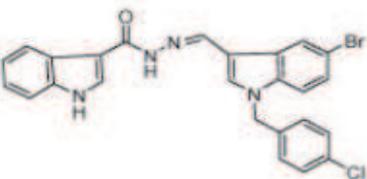
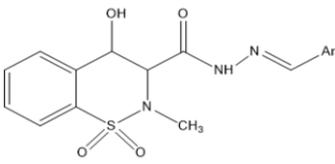
3.4 Propriedades biológicas de compostos derivados acilhidrazônicos

Os derivados acilhidrazônicos possuem um grande potencial biológico, podendo ser utilizadas como estrutura de planejamento de candidato a novos fármacos, com diversas aplicações terapêuticas (BARREIRO, FRAGA, 2015; REDDY et al., 2010).

Na literatura, já foram descritas potencialidades anti-inflamatória analgésicas, antimicrobiana, antifúngica, antiviral e antiparasitária, antimalárica, hipoglicemiante, antioxidante, antitumoral e antitrombótica, anticonvulsivante, vasodilatador (Quadro 2), dentre outras atividades que as tornam moléculas de grande interesse da química medicinal.

Quadro 2. Atividades Biológicas de derivados acilhidrazônicos

Atividade Biológica	Estrutura Química	Autor
Antibacteriano (<i>Mycobacterium tuberculosis</i>)		Raitz (2012)
Antibacteriano (<i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>S. aureus</i>)		Govindasami, et al. (2011)
Antiparasitário (Antimalárico e Amebicida)		Inam et al. (2014)
Antifúngico (<i>Candida</i> sp)		Malik; Al-Thabaiti; Malik (2012)
Antiviral (Herpes simples e Vírus Vaccínia)		Rogolino et al. (2015)
Antiplaquetário		Brito et al. (2010)
Vasodilatador		Silva et al. (2009)

Anticonvulsivante		Kaushjik et al. (2010)
Antioxidante		Belhiheiri et al. (2010)
Diurético		Smirnov et al. (2011)
Antimalárico		Gemma et al. (2006)
Hipoglicemiante		Dias et al. (2008)
Antitumoral		Kumar et al. (2012)
Anti-inflamatório e Analgésico		Miranda et al. (2012)

(Conclusão)

Com relação à atividade anti-inflamatória, vários compostos *N*-acilhidrazônicos vem sendo estudados. Silva et al. (2010) sintetizou e avaliou a atividade farmacológica de pirazinas *N*-acilhidrazonas. A série testada foi planejada por simplificação molecular de protótipos hidrazônicos, no qual mostrou atividade em todos os modelos de inflamação.

Miranda et al. (2012), sintetizou uma série de benzotiazinas *N*-acilhidrazonas, planejadas por modificação estrutural de Piroxicam. Os compostos derivados denominados (LASS-Bio-1637/1639) inibiram acima de 70% a migração leucocitária considerando-os potenciais protótipos anti-inflamatórios, com atividade superior ao controle positivo tratados com o piroxicam.

Também foi relatada a possibilidade de hibridização molecular de derivados *N*-acilhidrazônicos. Hernández et al. (2013) otimizou o furoxanil-*N*-acilhidrazona com o derivado benzofuroxanilo, no qual houve inibição significativa da liberação de IL8, NFκB, *in vitro*, e LOX, COX-1, COX-2 e IL-8 *in vivo*.

Segundo Kajal, et al. (2014) os compostos *N*-acilhidrazônicos contém grupos farmacofóricos importantes, responsáveis pelo bloqueio dos sítios ativos das COX e 5-LOX. Em seus estudos, Reis et al. (2011), projetou compostos inibidores de (LOX) no qual exibia atividade anti-inflamatória devido às suas propriedades de eliminação de radicais livres, que impedem o acúmulo de neutrófilos na cavidade pleural.

Diante disso, consideramos a hipótese do derivado *N*-acilhidrazônico 2-ciano-*N'*-[4-(metilssulfonil) benzilideno]-acetohidrazida apresentar a atividade anti-inflamatória, visto que substituinte metilssulfonil é encontrado em fármacos inibidores seletivos da COX-2, já utilizado na clínica.

4. METODOLOGIA

4.1 Obtenção do composto *N*-acilhidrazônico acridínicos substituído (JR04)

O composto (2-ciano-*N*'-[4- (metilssulfonil) benzilideno]-acetohidrazida. (JR04), foi sintetizado, caracterizado e cedido pelo Laboratório de Síntese e Vetorização Molecular (LSVM), ligado à Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), sob responsabilidade do Prof. Dr. Ricardo Olímpio de Moura. As metodologias referentes à obtenção e caracterização desses compostos encontram-se descritos no Trabalho de Conclusão de Curso de Moura (2016).

4.2 Animais

Foram utilizados camundongos albinos Swiss (*Mus musculus*) adultos, machos e fêmeas, pesando entre 25 e 35g. Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas, sob temperatura e umidade ambiente, respeitando o ciclo claro-escuro de 12h, e comida e água ad *libitum*.

4.3 Local da Pesquisa

Os testes farmacológicos foram desenvolvidos no Laboratório de Ensaios Farmacológicos da Universidade Estadual da Paraíba, em Campina Grande, Paraíba.

4.4 Procedimentos Éticos

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

4.5 Preparo das Substâncias

Para realização dos testes farmacológicos, as moléculas foram dissolvidas em solução salina e administradas por via oral (gavagem).

4.6 Avaliação da atividade anti-inflamatória

4.6.1 Peritonite induzida por Carragenina

Camundongos (n=5) em jejum prévio de 6 horas, foram tratados com veículo (solução salina 10mL/kg) ou o composto em estudo (10 ou 20 mg.kg⁻¹), por via oral. Após 30 minutos, foi injetado 0,25mL de carragenina a 1% na cavidade intraperitoneal. Quatro horas após a indução da inflamação, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical. Em seguida foi administrado 2 mL de solução tampão fosfato (PBS pH 7.2) na cavidade intraperitoneal, massageando levemente o abdômen e através de incisão coletou-se o fluido peritoneal para realizar a contagem de leucócitos totais em câmara de Neubauer, sob análise por microscopia óptica (CUNHA, 1989).

4.6.2 Edema de pata induzido por Carragenina

Camundongos, em jejum prévio de 12 horas, foram divididos em grupos experimentais (grupo n=7). O volume basal da pata traseira direita foi determinado antes da administração das substâncias. Os animais foram então tratados com salina (10 mL/kg), indometacina (10 mg.kg⁻¹) e o JR04 (10 mg.kg⁻¹), uma hora antes da injeção intraplantar de 20 µL de carragenina (2,5%). O volume da pata foi medido 1, 2, 3 e 4 h após a injeção do estímulo indutor da inflamação, com auxílio de um paquímetro digital. Os resultados foram apresentados como a média da variação do volume da pata (mL) em relação aos valores basais (CASTRO et al., 2003).

4.6.3 Bolsão de ar subcutâneo

A indução de uma bolsa de ar no dorso de camundongos (n=6) foi feita através da injeção de ar estéril. No primeiro dia foi injetada 2,5 mL de ar no dorso do animal repetindo-se o procedimento após 72 horas. No sétimo dia os animais foram tratados por via oral com veículo (solução salina 10 mL.kg⁻¹), indometacina (10 mg.kg⁻¹) e o composto derivado *N*-acilhidrazônico JR04. Depois de 1h foi administrado 1,0 mL de uma solução de carragenina a 1% dentro da bolsa de ar. Decorridas 6 horas, os animais foram sacrificados com éter, e as bolsas lavadas com 3,0 mL de solução tampão fosfato (PBS pH 7.2) contendo heparina. Foi coletado o fluido de dentro do bolsão para contagem de leucócitos totais utilizou-se a câmara de Neubauer, sob microscopia óptica (EDWARD et al., 1981).

4.7 Toxicidade aguda

O ensaio de toxicidade aguda foi realizado de acordo com a diretriz 423 (Adaptado), da Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE, 2011a). Camundongos fêmeas em jejum de 8 horas foram divididas em dois grupos. O grupo controle negativo foi tratado com solução salina, e o grupo teste, com o composto JR04, na dose de 100 mg.kg⁻¹, via oral. Após os tratamentos, os animais foram observados durante 30 min, 1, 2, 4 e a cada 24 horas, durante 14 dias. Como parâmetro da triagem farmacológica comportamental foi utilizado o protocolo de Almeida (1999), (Anexo 1). No décimo quarto dia, os animais foram pesados, e em seguida eutanaseados por deslocamento cervical, sendo os órgãos (fígado, baço, coração e rins) retirados, pesados e avaliados macroscopicamente.

4.8 Análise Estatística

Os resultados foram avaliados utilizando a análise de variância de uma via (ANOVA) seguido dos pós teste de Dunnett ou Tukey. Todos os resultados foram expressos como média desvio padrão (d.p.) com nível de segurança mínimo (p<0,05), analisados pelo software GraphPad Prisma 5.0 (BARROS et al, 2004).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

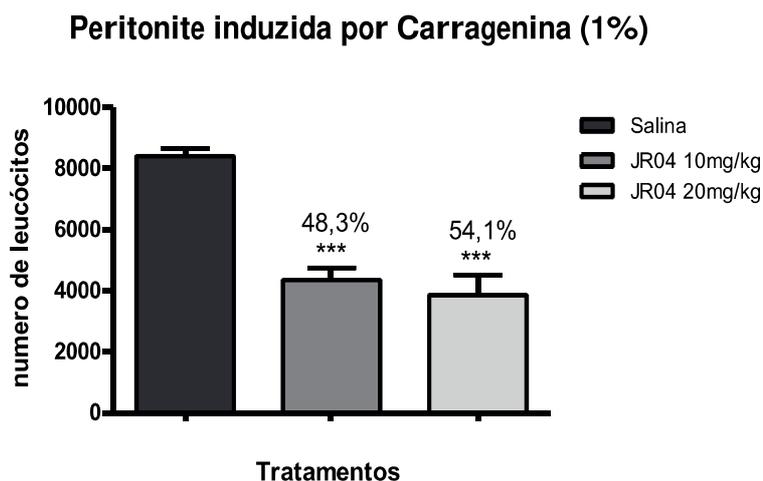
5.1 Peritonite induzida por Carragenina

A triagem da atividade anti-inflamatória do composto derivado *N*-acilhidrazônico JR04 (10 e 20 mg.kg⁻¹), foi realizada através do ensaio de peritonite induzido por carragenina (1%). A carragenina é um polissacarídeo linear sulfatado, obtido a partir de extratos de algas marinhas, que atua como um agente flogístico, capaz de ativar o processo inflamatório na cavidade peritoneal em um mecanismo bifásico (WANG et. al., 2014).

Na primeira fase, ocorre a liberação de aminas biogênicas, que propiciam os eventos vasculares. Na fase tardia (segunda fase), ativam-se as citocinas (IL-1 e TNF- α) que induzem a liberação de prostaglandinas e óxido nítrico, que corroboram para a formação do exsudato inflamatório, migração leucocitária e a presença de espécies reativas de oxigênio (SHREE et al., 2017; ZHANG et al., 2011).

Como resultado para o modelo de peritonite induzido por carragenina, foi verificado para as doses de 10 e 20 mg.kg⁻¹ de JR04, uma inibição de 48,3 e 54,1%, respectivamente, da migração leucocitária, quando comparado ao controle negativo (Figura 7). Não havendo diferença significativa entre as duas doses, foi selecionada a de 10 mg.kg⁻¹, para os demais experimentos de avaliação da potencialidade anti-inflamatória do composto JR04.

Figura 7. Inibição da migração leucocitária do composto JR04, em comparação ao controle negativo, utilizando o ensaio de peritonite induzida por carragenina.



Valores são expressos em média \pm desvio padrão da média, n = 5. *** p < 0,001 significativamente diferente do grupo controle (ANOVA seguido pelo teste de Dunnett).

O modelo de peritonite permite prever o carácter anti-inflamatório de moléculas farmacologicamente ativas. Isso devido a inibição da migração leucocitária, que acontece em resposta a infecções ou injúrias teciduais. Segundo Wang et al. (2013), quando deflagra o pro-

cesso, ocorre o recrutamento de leucócitos para o tecido inflamado, iniciado por moléculas da família selectina, que facilita o rolamento celular e a ativação quimiotática de integrinas β_2 , que medeia a adesão e a migração através das paredes dos vasos sanguíneos.

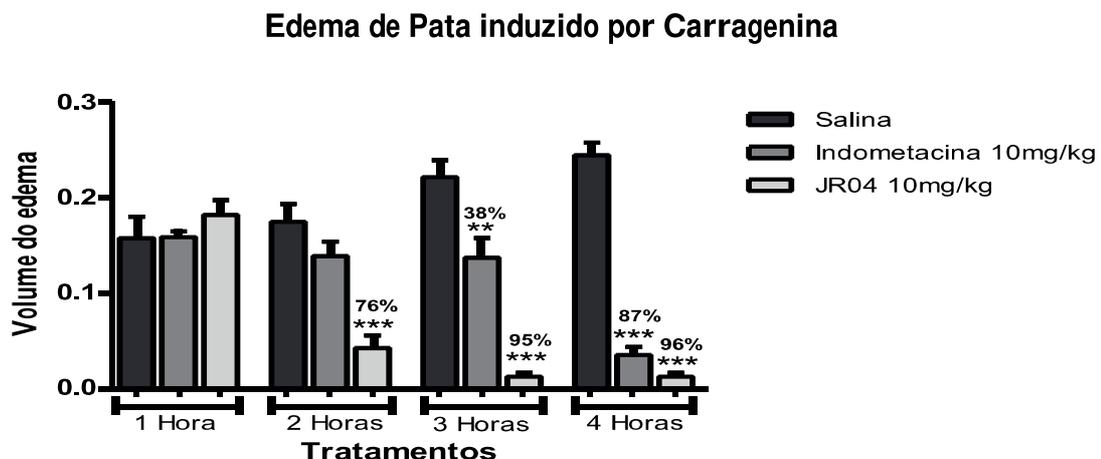
Avaliando o resultado do teste, pode-se presumir que a atividade anti-inflamatória do composto JR04, pode estar relacionada com a inibição da síntese de mediadores químicos pró-inflamatórios, ou suprimindo a expressão gênica e a ativação quimiotática de selectina, e moléculas de adesão. Resultados semelhantes foram observados por Silva (2012), que ao testar diversos compostos derivados cicloalquil-*N*-acilhidrazônicos, observou uma inibição significativa da migração leucocitária, utilizando o ensaio de peritonite.

5.2 Edema de pata induzido por Carragenina

O modelo de edema de pata induzido por carragenina caracteriza uma representação do mecanismo fisiopatológico da inflamação, que acontece nos estágios iniciais de um processo agudo. Isso é evidenciado através do aumento do volume das patas dos animais, que receberam a injeção intraplantar de carragenina, em diversos intervalos de tempo.

Para esse modelo, o composto JR04 foi ativo da segunda a quarta hora, apresentando inibição de 76, 95 e 96%, do volume do edema, respectivamente, quando comparado ao controle negativo. Com relação ao controle positivo tratado com indometacina, a atividade só se deu entre a 3ª e 4ª hora após a indução, apresentando uma inibição de 38 e 87% (Figura 8).

Figura 8. Avaliação da inibição do volume do edema de pata induzido pela carragenina, comparando-os ao grupo controle e grupo teste.



Valores são expressos em média \pm desvio padrão da média, $n = 5$. *** $p < 0,001$ significativamente diferente do grupo controle (ANOVA seguido pelo teste de Dunnett)

O edema de pata induzido por carragenina é amplamente empregado para a avaliação da atividade antiedematogênica de compostos naturais e sintéticos. Segundo Bahamonde et al. (2013), o edema se instala em detrimento a resposta ao agente flogístico. Na primeira fase, durante a primeira hora, o processo é mediado pela liberação de histamina, 5-hidrotriptamina, leucotrienos, quinases e cicloxigenases. E na segunda fase, estão associadas as prostaglandinas, bradicininas, e o infiltrado de leucócitos.

A carragenina ao desencadear o evento inflamatório promove uma contração momentânea dos vasos, seguido por uma vasodilatação, que culmina com o aumento do fluxo sanguíneo para área. Essas alterações vasculares aumentam a permeabilidade, resultando no extravasamento de proteínas plasmáticas e o aumento de mediadores, o que leva a formação do edema, principal sinal cardinal do processo inflamatório (GUPTA et al., 2015).

O resultado obtido do experimento, sugere que o efeito anti-inflamatório do composto derivado *N*-acilhidrazônico (JR04) pode ser resultante da inibição da produção de prostaglandinas, visto que sua ativação se inicia na fase tardia. É importante ressaltar que esse efeito é semelhante aos fármacos anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), no entanto o mecanismo exato de como o composto inibe a síntese PGs, seriam parte de estudos futuros.

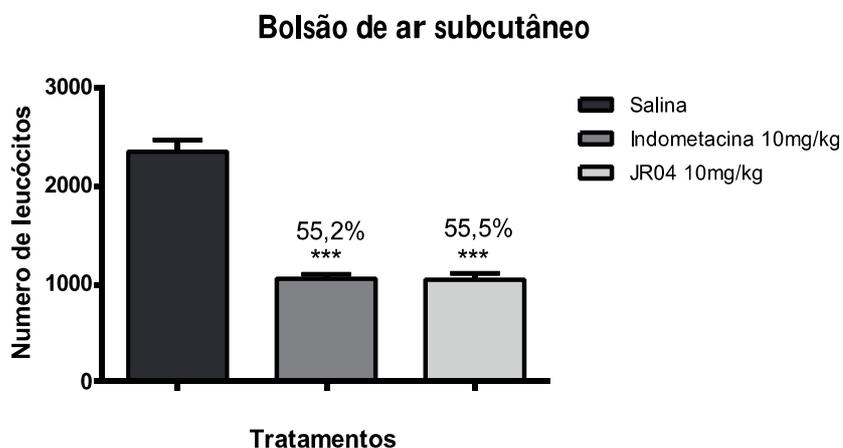
Mota (2013) avaliou a atividade anti-inflamatória do composto derivado isoxazolina-acilhidrazona R-99. A sua inibição edematogênica, se deu em todos os tempos observados, diferindo do composto JR04, que se mostrou ativo a partir da segunda hora. Estes estudos corroboram a possível potencialidade terapêutica de derivados *N*-acilhidrazônicos, como moléculas promissoras para a atividade anti-inflamatória.

5.3 Bolsão de ar Subcutâneo

No bolsão de ar subcutâneo ou *air pouch* a administração de carragenina, induz a uma resposta inflamatória local, no qual a bolsa de ar forma uma membrana com características semelhantes a membrana sinovial inflamada da artrite reumatoide. Esse modelo permite localizar o foco inflamatório, para realização do screening de potenciais candidatos com atividade anti-inflamatória (GIRARD, 2014; VANDOOERN et al., 2013).

Para este protocolo, o composto JR04 apresentou propriedades anti-inflamatória, evidenciada pela redução da migração celular em 55,5%. Esta inibição mostrou-se semelhante a do grupo controle tratados com indometacina, que inibiu em 55,2% esta migração (Figura 9).

Figura 9. Inibição da migração celular pelo composto JR04, no modelo de bolsão de ar subcutâneo.



Valores são expressos em média \pm desvio padrão da média, $n = 5$. *** $p < 0,001$ significativamente diferente do grupo controle (ANOVA seguido pelo teste de Dunnett).

Cordeiro et al. (2016), testou novos derivados *N*-acilhidrazônicos e análogos ao LAS-SBio-1524, cujos resultados indicaram atividade anti-inflamatória no modelo de bolsão de ar subcutâneo. Este estudo viabilizou a possibilidade desses compostos atuarem bloqueando a via $\text{IKK}\beta$ -NF- κB , visto a atividade semelhante ao seu inibidor. Também foi verificando uma redução dos níveis de NO, sugerindo que estas substâncias podem inibir diretamente a iNOS, seja pela redução da sua atividade enzimática, ou inibindo a expressão em sua biossíntese.

Resultados semelhantes também foram observados no estudo de Silva (2015), que ao testar os compostos *N*-acilhidrazônicos AMZ-Bz e AMH, verificou uma inibição significativa na produção de TNF- α , IL-1 β , óxido nítrico e mieloperoxidase, além da resposta farmacológica semelhante a indometacina.

Com isso, pode-se sugerir que esse composto pode interferir nas vias de sinalização do processo inflamatório, suprimindo a produção de mediadores químicos pelas células do sistema imune. Isto foi comprovado pelos testes de bolsão de ar e peritonite, que mostrou a significativa inibição da migração leucocitária.

5.4 Toxicidade aguda

A toxicidade de uma substância é a sua capacidade intrínseca de causar efeitos nocivos ao organismo. Estudos podem avaliar esses efeitos durante o período de experimentação, onde animais são submetidos a administração de dose única ou múltiplas durante um período não superior a 24h. Estes testes permitem verificar o perfil toxicológico de compostos naturais e

sintéticos, determinando o potencial risco de causar danos ao organismo humano (ANVISA, 2013; VALADARES, 2006).

O composto JR04, foi avaliado através da administração v.o, de uma dose fixa de 100 mg.kg⁻¹, que corresponde a dez vezes a dose utilizada na avaliação farmacológica (SILVA et al., 2012). Essa dose também foi preconizada na avaliação toxicológica dos derivados *N*-acilhidrazônicos dos estudos de Apolinário (2016).

Durante as primeiras horas, seguido dos 14 dias consecutivos do experimento, foram avaliados os reflexos autonômicos, parâmetros fisiológicos, e comportamentais, segundo o protocolo da triagem farmacológica comportamental estabelecida por Almeida (1999) (Anexo 2).

Ao avaliar as primeiras quatro horas, após a administração do composto, a única alteração observada, foi a diminuição dos reflexos aos estímulos dolorosos, ao pressionar a cauda dos animais. Porém, isso pode não estar relacionado a um efeito nocivo, mas sim, com a possível atividade antinociceptiva do composto *N*-acilhidrazônico JR04 na dose de 100 mg.kg⁻¹.

Estudos como o de Silva et al., (2014) evidenciaram a atividade analgésica de derivados *N*-acilhidrazônicos, utilizando o ensaio de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético em camundongos. Como resultado, esses compostos apresentaram atividade farmacológica superior ao grupo controle, tratados com os fármacos utilizados na terapia convencional (celecoxibe e indometacina).

Durante os demais 14 dias consecutivos, não houve morte, nem sinais expressivos de toxicidade geral, apenas, foi verificado uma redução do consumo de ração, levando ao comprometimento da evolução ponderal dos animais (Tabela 3). Este efeito pode estar relacionado com a ação direta desses compostos nos centros hipotalâmicos, ou uma possível interferência na liberação de hormônios peptídicos envolvidos no controle da saciedade.

Tabela 3. Consumos e evolução ponderal, dos animais submetidos ao teste de toxicidade, tratados pelo composto JR04 (100 mg.kg⁻¹), durante 14 dias

Consumos	Salina	JR04 (100 mg.kg ⁻¹)
Consumo de ração (g)	117.4 ± 15,99	55,08 ± 7,077***
Consumo de água (mL)	36.54 ± 5,911	32,69 ± 5,633
Evolução ponderal (g)	3.333 ± 0,516	2,000 ± 1,65*

Os valores foram expressos como Média ± D.P.M. (n= 6 animais em cada grupo); *p<0,05 e ***p < 0,0001 comparado ao grupo controle.

De acordo com Ribeiro e Santos (2013), os principais reguladores hormonais da fome, saciedade e dos níveis de adiposidade, são as leptinas, grelina e a insulina, que atuam nos circuitos cerebrais hipotalâmicos e do tronco cerebral, estimulando ou inibindo o apetite como forma de manter o balanço energético adequado.

Apesar da diminuição do consumo da ração, a alteração do peso dos animais não foi expressivamente significativa, e não alterou de maneira geral a saúde do animal. Logo, é possível evidenciar a baixa toxicidade do composto, e uma mínima interferência no sistema nervoso autônomo e/ou central.

Na análise macroscópica dos órgãos, também não foi verificado nenhuma alteração anatômica, ou variações significativas nos pesos dos órgãos dos animais (Tabela 4).

Tabela 4. Peso relativo dos órgãos de camundongos fêmeas tratadas com o JR04, na dose de 100 mg.kg⁻¹ via oral, após 14 dias.

Órgãos	Salina	JR04 (mg.kg ⁻¹)
Coração	0,1593 ± 0,0223	0.1456 ± 0,0155
Rins	0,3489 ± 0,0263	0,3237 ± 0,0186
Fígado	1,6930 ± 0,2060	1.4480 ± 0,1875
Baço	0,1552 ± 0,0259	0.1350 ± 0,0298

Os valores foram expressos como Média ± D.P.M. (n= 6 animais em cada grupo); *p<0,05 e ***p < 0,0001 comparado ao grupo controle.

Esses resultados encontrados corroboram o estudo toxicológico de Apolinário (2016), que avaliou a segurança dos compostos derivados *N*-acilhidrazônicos (JR09 e JR19) nas doses de 100 mg.kg⁻¹. Com isso, ratifica-se a segurança do uso do composto JR04, e a baixa toxicidade nos sistemas orgânicos.

A atividade anti-inflamatória dos compostos *N*-acilhidrazônicos, pode ser explicada devido a existência do hidrogênio da função amida, que de acordo com Hernández et al. (2013) propiciam a acidez, e a capacidade de estabilização de radicais livres, permitindo que esses compostos mimetizem a fração bis-alílica de ácidos graxos e amidas não saturadas, semelhantes ao do ácido araquidônico.

Outro possível mecanismo molecular da resposta farmacológica pode estar relacionado com a ação enzimática da COX, que atua nos derivados hidrazônicos promovendo o desencadeamento de reações radicalares (atividade redox), que levam à formação do radical fenila. A fenila por sua vez, se complexa com o grupamento ferro III da enzima, inativando-a.

Dessa forma, não há a produção de prostaglandinas, principal mediador do processo inflamatório, entretanto, é necessário estudos, que viabilizem uma melhor elucidação dos mecanismos de ação desses compostos, sendo assim parte de estudos futuros (MAHY, GASPARD, MANSUY, 1993 apud PAIVA et al., 2014).

6. CONCLUSÃO

- O derivado *N*-acilhidrazônicos JR04 mostrou-se ativo nos modelos de peritonite e edema de pata induzido por carragenina e bolsão subcutâneo. No qual os torna candidatos promissores para a atividade anti-inflamatória.
- O composto JR04 não provocou alterações morfológicas, fisiológicas ou comportamentais nos animais submetidos à experimentação, podendo assim sugerir baixa toxicidade do derivado *N*-acilhidrazônico.
- O JR04 apresenta o grupo metilsulfonil também encontrados em fármacos inibidores seletivos da COX-2, podendo sugerir uma maior seletividade a essa isoforma.
- Esses resultados permitem prever a grande potencialidade desse composto se tornar medicamentos anti-inflamatórios, substituindo as terapias convencionais.
- É necessária a continuidade dos estudos para essa molécula, desvendando os possíveis mecanismos biomoleculares envolvidas na resposta inflamatória.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, R.N. et al. Metodologia para avaliação de plantas com atividade no Sistema Nervoso Central e alguns dados experimentais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.80, n.1 p.72-76, 1999.
- APOLINÁRIO, N. M. Elucidação estrutural e avaliação do potencial biológico de novos derivados N-acilhidrazônicos. 2016. 114 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2016.
- BAHAMONDE, S. M. A. et al. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of an aqueous extract of *Chilothrichum diffusum*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, n.23, v.4, p. 699-705, 2013.
- BATLOUNI, M. Anti-inflamatórios Não Esteroides: Efeitos Cardiovasculares, Cérebro Vasculares e Renais. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.94, n.4, p. 556–563, 2010.
- BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. Química Medicinal: As bases moleculares da ação dos fármacos. São Paulo: **Artmed**, 243 p. 2015.
- BAUTISTA, L. E.; VERA, L.M.; Antihypertensive Effects of Aspirin: What is the Evidence?. **Current Hypertension Report**, v.12 n.4, p. 282-289, 2010.
- BELKHEIRI, N. et al. Synthesis and antioxidant activity evaluation of a syringic hydrazones family. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.45, n.7, p. 3010-3026, 2010.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos- Brasília, DF, 31 de janeiro de 2013-versão 2.
- BRITO, F. C. et al. Novel thienylacylhydrazone derivatives inhibit platelet aggregation through cyclic nucleotides modulation and thromboxane A2 synthesis inhibition. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.638, n.1-3, p.5-12, 2010.
- CASTILLO, H. J. et al. A obesidade é um determinante da resistência à insulina mais importante do que os níveis circulantes de citocinas pró- inflamatórias em pacientes com artrite reumatoide. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v.57, n.4, p.320-329, 2017.
- CASTRO, K. N. C et al. Preliminary in vitro studies on the *Marsipianthes chamaedrys* (bóia-caá) extracts at fibrinoclotting induced by snake venoms. **Toxicon**, v.41, p.929-932, 2003.

CASTRO, A. J. G. et al. Anti-inflammatory, anti-angiogenic and antioxidant activities of polysaccharide-rich extract from fungi *Caripia montagnei*. **Biomedicine & Preventive Nutrition**, v.4, n.2, p. 121-129, 2014.

CHAMUSCA, F. V. et al. Mediadores do efeito sistêmico do processo inflamatório e terapias fotobiomoduladoras: uma revisão de literatura. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 11, n.1, p.70-78, 2010.

CORDEIRO, N. M.; FREITAS, R. H.; FRAGA, C. A.; FERNANDES, P. D. Discovery of Novel Orally Active Tetrahydro-Naphthyl-N-Acylhydrazones with In Vivo Anti-TNF- α Effect and Remarkable Anti-Inflammatory Properties. **Plos one**, v.11, n.5, p.11-15, 2016.

COSTA, M. M. Síntese de azinas assistida por micro-ondas e avaliação da atividade anticolinesterásica. 2015. 147 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Moleculares). Universidade Estadual de Goiás, Anápolis, 2015.

CRUVINEL, W. M. et al. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v.50, n.4, p.434-61, 2010.

CUNHA, F.Q. et al. In-vivo blockage of neutrophil migration by LPS is mimicked by a factor released from LPS-stimulated macrophages. **British Journal of Experimental Pathology**, v. 70, n. 1, p. 1-8, 1989.

EDWARDS, J. C. W.; SEDGWICK, A. D.; WILLOUGHBY, D. A. The formation of a structure with the features of synovial lining by subcutaneous injection of air: an in vivo tissue culture system. **The Journal of Pathology**, v. 134, n. 2, p. 147-156, 1981.

FERNÁNDEZ-LIZ, E.; SUAÚ, M. R. R. Antiinflamatorios no esteroideos y riesgo cardiovascular: implicaciones para la práctica clínica. **Atención Primaria**, v.46, n.7, p.323-325, 2014.

FRIEDEWALD, V. E. et al. Selective and Nonselective Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs and Cardiovascular Risk. **The American Journal of Cardiology**, v.106, n.6, p. 873-884, 2010.

GEMMA, S. et al. Synthesis of N1-arylidene-N2-quinolyl- and N2-acrydinyldhydrazones as potent antimalarial agents active against CQ-resistant *P. falciparum* strains. **Bioorganic Medicinal Chemistry**, v.16, n.3, p. 5384-5388, 2006.

GENG, J. et al. From heterocyclic hydrazone to hydrazone-azomethine dyes: Solvent and pH induced hydrazone and azo-keto transformation for a family of pyrazolone-based heterocyclic dyes. **Dyes and Pigments**, v. 137, n.73, p. 101-110, 2017.

GIMENÉZ, V. M. M. et al. Nanotecnología, un nuevo paradigma en el tratamiento de la aterosclerosis. **Clínica e Investigación en Aterosclerosis**, v. 29, n. 5 p. 224-230 2017.

GIRARD, D. Using the air pouch model for assessing in vivo inflammatory activity of nanoparticles. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, n.7, p. 1105-1109, 2014.

GUPTA, A. et al. Analgesic and Anti-Inflammatory Properties of Gelsolin in Acetic Acid Induced Writhing, Tail Immersion and Carrageenan Induced Paw Edema in Mice. **Plos One**, v. 10, n.8, p.355-58, 2015.

GOODMAN, S. L.; GILMAN, G. A. **Manual de farmacología e terapêutica de Goodman e Gilman**. 2. ed. Porto Alegre: AMGH, 2015. 1204 p.

GOVINDASAMI, T. et al. Synthesis, characterization and antibacterial activity of biologically important vanillin related hydrazone derivatives. **International Journal of Organic Chemistry**, v.79, n. 1, p.71-77, 2011.

HERNÁNDEZ, P. et al. Hybrid furoxanyl N-acylhydrazone derivatives as hits for the development of neglected diseases drug candidates. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.59, n.7, p. 64-74. 2013.

INAM, A et al. Design, synthesis and biological evaluation of 3-[4-(7-chloro-quinolin-4-yl)-piperazin-1-yl]-propionic acid hydrazones as antiprotozoal agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 75, n.2, p. 67-76, 2014.

KAJAL, A. et al. Therapeutic Potential of Hydrazones as Anti-Inflammatory Agents. **International Journal of Medicinal Chemistry**, v. 2014, n.18, p. 1-11, 2014.

KAUSHJIK, D. et al. N'-[(5-chloro-3-methyl-1-phenyl-1H-pyrazol-4-yl) methylene] 2/4-substituted hydrazides: Synthesis and anticonvulsant activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.45, n.9, p. 3943-3949, 2010.

KIRBY, N. S. et al. Cyclooxygenase-1, not cyclooxygenase-2, is responsible for physiological production of prostacyclin in the cardiovascular system. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.109, n. 43, p. 17597-602, 2012.

KIRKBY, N. S. et al. Systematic study of constitutive cyclooxygenase-2 expression: Role of NF- κ B and NFAT transcriptional pathways. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.113, n.2. p. 434-439, 2016.

KUMAR, D. et al. Novel bis (indolyl) hydrazide-hydrazones as potent cytotoxic agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.22, n.1, p. 212-215, 2012.

LEMOS, H. P. et al. Prostaglandin mediates IL-23/IL-17-induced neutrophil migration in inflammation by inhibiting IL-12 and IFN α production. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n.14, p.5954-5959, 2009.

MAHY, J.P.; GASPARD, S.; MANSUY, D. Phenylhydrazones as new good substrates for the dioxygenase and peroxidase reactions of prostaglandin synthase: formation of iron (III)- σ -phenyl complexes. **Biochemistry**, v.32, p.4014-4021, 1993.

MALIK, M. A.; AL-THABAITI, S. A.; MALIK, M. A. Synthesis, structure optimization and antifungal screening of novel tetrazole ring bearing acyl-hydrazones. **International Journal of Molecular Sciences**, v.13, n.9, p.10880-10898, 2012.

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

MEIER, P.; BANRETI, A. Tissue Repair: How to Inflamm Your Neighbours. **Current Biology**, v.26, n.5, p.192-194, 2016.

MIRANDA, A, S. et al. Design, síntese, atividades antinociceptivas e anti-inflamatórias de novos análogos de Piroxicam. **Moléculas**, n.17, v.12. p.14126-14154, 2012.

MESQUITA, J. R. et al. Aspectos celulares e moleculares da inflamação. **Revista Brasileira de Medicina**, 2008. Disponível em: < http://www.moreirajr.com.br/revistas.asp?fase=r0&id_materia=4053. Acesso em 11 de agosto de 2017.

MONTEIRO, E. C. A. et al. Os antiinflamatórios não esteroidais (AINEs). **Temas de Reumatologia Clínica**, v.9, n.2, p.53-63, 2008.

MOTA, F. V. B. Estudo das atividades anti-inflamatória e antinociceptiva de novos derivados isoxazolinaacilhidrazonas. 2013. 98 f. Dissertação (Mestrado em Inovação Terapêutica). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2013

MOURA, W. C. S. Planejamento, síntese e avaliação preliminar da atividade antibacteriana de derivados N-acilidrazônicos substituídos. 2016. 64 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia). Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2016.

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

OLIVEIRA-JUNIOR, J. O.; PORTELLA-JUNIOR, C. S. A.; COHEN, C. P. Mediadores inflamatórios na dor neuropática. **Revista dor**, v.17, n.1, p. 35-42, 2016.

PAIVA, A. K, A. et al. Otimização de Compostos Derivados N-acilhidrazônicos com atividade Analgésica por Avaliação de Parâmetros Eletrônicos. **Simpósio de Ciências Farmacêuticas**. Disponível em: < <http://www.saocamilo-sp.br/novo/eventos-noticias/simposio/14/SCF009> > Acesso em 09 de outubro de 2017, às 20h.

PALOMINO, D. C.; MARTI, L. C. Quimiocinas e imunidade. **Revista Einstein**, v.13, n.3, p. 469-73, 2015.

PANCONTE, C. G.; CERA, T. P. Planejamento de Fármacos. **Revista Científica Unilago**, v.8, n.2, p.137-142, 2013.

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

PLOWRIGHT, A. T. Joining Forces: The Chemical Biology–Medicinal Chemistry Continuum. **Cell Chemical Biology**, v.24, n.9, p.1058-1065, 2017.

RAITZ, I. Síntese de derivados N-acilidrazônicos com potencial atividade antiparasitária. 2012. 118 p. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.

RANG, H.P., DALE, M.M., RITTER, J.M., Flower, R.J., Henderson, G. Farmacologia. 7ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.

RIBEIRO, G.; SANTOS, O. Recompensa alimentar: mecanismos envolvidos e implicações para a obesidade. **Revista Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo**, v.8, n.2, p.82-88, 2013.

REDDY, L. V, et al. Design and synthesis of 1-Aroyl-2-yidene Hidrazines under conventional and microwave irradiation conditions and their citotoxic activities. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.21, n.1, p.98-104, 2010.

REGINATO, F. Z; SILVA, A. R. H., BAUERMAN, L. F. Avaliação do uso de flavonoides no tratamento da inflamação. **Revista Cubana de Farmácia**, v. 49, n.3, p. 569-582, 2015.

REIS, S. L. G. B.; et al. Síntese e avaliação preliminar da atividade antinociceptiva de novas isoxazolilaril-hidrazonas. **Química Nova**, v.34, n.1, p.76-81, 2011.

RUALES, F. L, M. D. et al. Hiperostosis associada a prostaglandinas. Reporte de tres casos, **Revista Colombiana de Cardiologia**, v.20, n.3, p.172-175, 2013.

ROGOLINO, D. et al. A versatilsalicylhydrazonicligand and its metal complexes as antiviral agents. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v.150, p. 9-17, 2015

SANTOS, J. C. S. Síntese, elucidação estrutural e avaliação biológica preliminar de derivados N-acilidrazônicos, 2012. 59 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biologia). Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2012.

SHRRE, N.; et al. Treatment with adipose derived mesenchymal stem cells and their conditioned media reverse carrageenan induced paw oedema in db/db mice. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.90, n.12, p.350-353, 2017.

- SILVA, A. G. et al. Synthesis and vasodilatory activity of new N-acylhydrazone derivatives, designed as LASSBio-294 analogues. **Bioorganic Medicinal Chemistry**, v.13, n.10 p.3431-3447, 2009.
- SILVA, Y. K. et al. Synthesis and pharmacological evaluation of pyrazine N-acylhydrazone derivatives designed as novel analgesic and anti-inflammatory drug candidates. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.18, n.14, p.5007-5015, 2010.
- SILVA, D. C. S.; CERCHIARO, G.; HONÓRIO, K. M. Relações Patofisiológicas entre estresse oxidativos e arteriosclerose. **Química Nova**, v.34, n.2, p. 300-305, 2011.
- SILVA, S. N. The toxicity evaluation of *Syzygium cumini* leaves in rodents. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.22, n.1, p. 102-108, 2012.
- SILVA, T. F. Planejamento, síntese e avaliação farmacológica de uma nova série de derivados cicloalquil-N-acilidrazonas: análogos de LASSBio-294. 2012. 280 f. Dissertação (Mestrado em Química), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.
- SILVA, S. C. Caracterização Farmacológica Pré Clínica da atividade antiinflamatória de novos derivados N-acilhidrazônicos. 2015. 280 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2015.
- SMIRNOV, V. A; SIMERZINA, L. V. Synthesis and diuretic activity of 3- sulfamoyl-4-chlorobenzoylhydrazones of 4-acetylphenoxyacetic acid and its derivatives. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v.31, n.10, p.37-30, 2011.
- SUGIURA, M.; KOBAYASHI, S. N-Acyhydrazones as versatile electrophiles for the synthesis of nitrogen-containing compounds. **Angewandte Chemie International Edition**, v.44, n.33 p. 5176-5186, 2005.
- VALADARES, M. C. Acute toxicity evaluation: strategies post “DL50 test era”, **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.3, n.8, p.93-98, 2006.
- VANDOOREN, J. et al. Intradermal air pouch leukocytosis as an in vivo test for nanoparticles. **International Journal of Nanomedicine**, v.8, p.4745-56, 2013.
- VERDASCA, A. C.R. Utilização dos Anti-inflamatórios Não Esteroides (AINES) em Medicina Dentária: Indicações, Contraindicações e Efeitos Adversos f. Dissertação (Mestrado Integral em Medicina Dentária), Universidade do Porto, Porto, 2015.
- WANG, J. et al. Neutrophil infiltration during inflammation is regulated by PILR α via modulation of integrin activation. **Nature Immunology**, v, 14, n.1, p.34-40, 2013.
- WANG, Y. et al. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of extract and two isolated flavonoids of *Carthamus tinctorius* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v.151, n. 2, p. 944-950, 2014.
- ZHANG, C. X.; DAI, Z. R.;CAI, Q. X. Anti-inflammatory and anti-nociceptive activities of *Sipunculus nudus* L. extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v.137, n.3, p.1177 - 1182, 2011.

ANEXO 1. Documento emitido pelo CEUA/CESED aprovando os métodos utilizados na pesquisa





PARECER
NÚMERO DO PROJETO/ PROTOCOLO : 5905022016
CIAEP/CONCEA Nº: 01.001.2012
DATA DO PARECER: 05/02/2016

1. Pesquisador Responsável: **Vandra Lúcia dos Santos**
Título do Projeto: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTIMICROBIANA DE DERIVADOS N-ACILIBRAZÓNICOS
2. Considerações: Este projeto envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794 de 08 de outubro de 2008, do decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA, e foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do CESED, em reunião de 05 / 02 / 2016. No entanto há uma divergência no número de animais à serem utilizados, na folha de rosto com o número do projeto impresso. Sendo liberado para execução 100 camundongos e não 162.

Vigência do Projeto	01 de março de 2016 à 01 de março de 2017
Espécie / linhagem	Camundongos Swiss
Nº de animais	100
Peso / idade	2 meses / 25 a 35 gramas
Sexo	Feminino e masculino
Origem	Universidade Estadual da Paraíba

Parecer Final: APROVADO



Tharcia Kiara B. de Oliveira
Coordenadora do CEUA/CESED



Av. Senador Argemiro de Figueiredo, 1501 - Itajari
CEP: 58104-900 - Campina Grande, PB Fone: 83 2101.6800

ANEXO 2. Protocolo utilizado na triagem farmacológica comportamental

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

Observações complementares: _____

Fonte: Almeida et al. (1999)