



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

NADJAELE DE MELO APOLINÁRIO

**ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOLÓGICO DE
NOVOS DERIVADOS *N*-ACILHIDRAZÔNICOS**

CAMPINA GRANDE – PB
DEZEMBRO/2016

NADJAELE DE MELO APOLINÁRIO

**ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOLÓGICO
DE NOVOS DERIVADOS N-ACILHIDRAZÔNICOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual da Paraíba como exigência para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de Concentração: Obtenção e avaliação da atividade biológica de produtos naturais e sintéticos de interesse farmacêutico.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Vanda Lucia dos Santos

Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Raïssa Mayer Ramalho Catão

É expressamente proibida 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 da dissertação.

A643e Apolinário, Nadjaele de Melo.

Elucidação estrutural e avaliação do potencial biológico de novos derivados N-acilhidrazônicos [manuscrito] / Nadjaele de Melo Apolinário. - 2016.

114 p. : il. color.

Digitado.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2016.

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

"Co-Orientação: Profa. Dra. Raissa Mayer Ramalho Catão, Departamento de Farmácia".

1. Inflamação. 2. Hidrazonas. 3. Atividade anti-inflamatória. 4. Farmacologia. I. Título.

21. ed. CDD 615.1

NADJAELE DE MELO APOLINÁRIO

**ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOLÓGICO DE
NOVOS DERIVADOS N-ACILHIDRAZÔNICOS**

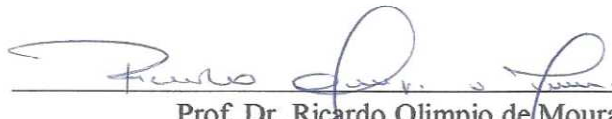
Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual da Paraíba como exigência para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em: 22/12/2016


Banca Examinadora



Prof.^a Dr.^a Vanda Lucia dos Santos
Orientadora/DF/CCBS/UEPB



Prof. Dr. Ricardo Olimpio de Moura
Examinador Interno/DF/CCBS/UEPB



Prof.^a Dr.^a Alyné da Silva Portela
Examinadora Externa – FACISA/CG

Dedicatória

Aos meus pais, irmã e namorado por todo o apoio, paciência e amor que fizeram com que todas as dificuldades e contrariedades ficassem para trás, DEDICO.

Agradecimentos

Um trabalho científico não é construído apenas por experimentos no laboratório, ou nas planilhas de um computador, mas através das diversas formas de apoio que nos é atribuído a cada dia. Em virtude disso, seguem os meus agradecimentos àqueles que contribuíram de forma tão relevante para a concretização deste trabalho.

A *Deus*, o centro e fundamento de tudo em minha vida, por renovar a cada momento a minha força e pelo discernimento concedido ao longo desta jornada.

Ao meus pais *Apolinário* e *Carmemlúcia* por sempre investirem no meu potencial e me apoiarem incessantemente, sobretudo durante o período do mestrado que se mostrou árduo por diversas vezes. Vocês são exemplos de perseverança, coragem e fé.

À minha irmã *Nadyely*, pelo carinho e companheirismo que tornam os nossos laços fraternos inquebráveis.

Ao meu namorado *Marcus Vinícius* que compartilhou comigo momentos de desânimo e me ajudou a vencê-los. Seu amor, compreensão e cumplicidade tornaram meus dias mais felizes. Obrigada por me fazer sonhar, crescer e realizar.

À minha orientadora, professora *Dra Vanda Lucia dos Santos*, por me receber como sua aluna e confiar no meu empenho. Obrigada pela orientações indispensáveis recebidas ao longo deste estudo, pela dedicação e pela amizade.

À minha co-orientadora, professora *Dra Raïssa Mayer Ramalho Catão*, por sua amizade, motivação e disponibilidade em momentos decisivos desta jornada. Obrigada por suas instruções que certamente contribuíram para a minha formação acadêmica e profissional.

Ao professor *Dr Ricardo Olímpio de Moura* e equipe, que me proporcionaram a oportunidade de desenvolver esta dissertação. Obrigada por gentilmente ceder as moléculas utilizadas neste trabalho e por sua prestatividade.

À professora *Me. Zilka Nanes Lima*, por sua amizade, incentivo e apoio prestados desde a graduação, durante a monitoria, que me impulsionaram a seguir a carreira acadêmica.

Ao professor *Dr João Walter Silveira*, pela disponibilidade em ajudar na execução de alguns experimentos.

À *Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)* e ao *Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas*, pela oportunidade de realizar este trabalho.

Ao *Comitê de Ética em Uso de Animais (CEUA/CESED)*, pela avaliação e aprovação do meu projeto de pesquisa.

À equipe de laboratório, que se tornaram grandes amigos: *Elaine, Simone, Helimarcos, Jhonatta, Cris, Pablo, Raiff, Renaly, Ingrid, Hilton, Sabrina, Ítala, Júnior*. Obrigada por dedicaram seu tempo para aprendermos juntos e por terem tornado esta dissertação possível.

Aos funcionários da UEPB, *Dilma, Lidiane, Luis Augusto, Silvana e Wilma Raianny*, pela presteza e atendimento quando necessário.

Aos colegas do mestrado pela amizade, companheirismo e apoio.

Aos amigos e familiares que torceram por mim e entenderam minha ausência em alguns momentos.

À banca examinadora por aceitar o convite e pela disponibilidade em contribuir para a melhoria deste trabalho.

Muito obrigada!

*“Toda a grande obra supõe um sacrifício; e no
próprio sacrifício se encontra a mais bela
e a mais valiosa das recompensas”*

Agostinho da Silva

RESUMO

Apolinário, N. M. **Elucidação estrutural e avaliação do potencial biológico de novos derivados *N*-acilhidrazônicos**. Dissertação de mestrado. Campina Grande: UEPB, 2016.

A funcionalidade *N*-acilhidrazona tem sido relatada como o grupo farmacofórico de compostos com uma ampla variedade de propriedades biológicas, incluindo as atividades anti-inflamatória, analgésica e antimicrobiana. O objetivo deste estudo foi elucidar estruturalmente e avaliar o potencial analgésico, anti-inflamatório e antimicrobiano dos derivados *N*-acilhidrazônicos (JR04, JR09 e JR19). Os compostos previamente sintetizados foram caracterizados físico-quimicamente e a elucidação estrutural foi realizada pelas técnicas espectrométricas e espectroscópicas. Nos ensaios farmacológicos foram utilizados camundongos albinos Swiss adultos de ambos os sexos. Os modelos utilizados para atividade anti-inflamatória foram: peritonite e edema de pata induzido por carragenina, e bolsão de ar subcutâneo. Para o potencial antinociceptivo foi realizado: nocicepção induzida por formalina e dor orofacial induzida por formalina. Foi realizado também o teste de toxicidade aguda. Nos ensaios microbiológicos foram utilizadas linhagens bacterianas e fúngicas padrão *American Type Culture Collection (ATCC)* pelos métodos de disco-difusão e microdiluição. Os compostos apresentaram rendimentos acima de 50%. Em relação a faixa de fusão, a variação de temperatura para a maioria dos compostos foi de até 3°C. Todos os compostos apresentaram $\text{LogP} < 5$, estando de acordo com a regra de Lipinsk, e sinais de deslocamento químico característicos das estruturas propostas, como sendo 2-ciano-*N*'-[4-(metilssulfonil)benzilideno]-acetohidrazida (JR04), *N*'-(benzilideno)-2-cianoacetohidrazida (JR09) e *N*'-[(1-*H*-indol-3-il)-metileno]-2-cianoacetohidrazida (JR19) nos espectros de RMN de ^1H e RMN de ^{13}C DEPT-Q. No modelo de peritonite induzida por carragenina, a administração oral dos compostos JR04 (10 e 20mg/Kg), JR09 (20mg/kg) e JR19 (10 e 20mg/Kg) inibiram de forma significativa em 48, 54, 61, 59 e 52%, respectivamente, a migração leucocitária quando comparado com o grupo controle, não havendo diferença significativa entre as doses de 10 e 20 mg/Kg de JR04 e JR19. A dose de 10mg/kg foi selecionada para os demais testes. No bolsão de ar subcutâneo, todos os compostos inibiram significativamente a migração celular quando comparados ao controle negativo, em 55, 52 e 66%, para JR04, JR09 e JR19, respectivamente. Reduziram também o edema de pata induzido por carragenina, especialmente os composto JR19. Confirmando a atividade anti-inflamatória no edema de pata, os compostos reduziram significativa a concentração sérica da proteína C reativa (PCR) quando comparados ao grupo controle. Nos modelos de nocicepção induzida por formalina e dor orofacial induzida por formalina, os compostos JR09 e JR19 foram ativos apenas na segunda fase, sugerindo ser desprovido de efeito analgésico central e possivelmente retentor de ação anti- inflamatória. O composto JR04 aumentou o tempo de reatividade nas duas fases nestes modelos, isto é sugestivo de um aumento na síntese e/ou liberação inicial de BK promovendo uma intensificação da ação deste peptídeo vasoativo. Na avaliação da toxicidade aguda dos compostos JR09 e JR19 na dose de 100mg/Kg não houve morte nem alterações comportamentais ou fisiológicas, indicando baixa toxicidade das moléculas testadas. Nos testes de atividade antimicrobiana, não foi verificada inibição do crescimento dos microrganismos testados, apontando ausência de atividade antimicrobiana, pelos métodos utilizados. Os resultados obtidos indicam a efetividade dos derivados *N*-acilhidrazônicos como anti-inflamatórios, tornando favoráveis as perspectivas para sua futura utilização com esse objetivo terapêutico.

Palavras-chave: hidrazonas, inflamação, microrganismos.

ABSTRACT

Apolinário, N. M. **Structural elucidation and evaluation of the biological potential of new *N*-acylhydrazone derivatives.**

The *N*-acylhydrazone functionality has been reported as the pharmacophoric group of compounds with a wide variety of biological properties, including anti-inflammatory, analgesic and antimicrobial activities. The objective of this study was to elucidate structurally and to evaluate the analgesic, anti-inflammatory and antimicrobial potential of *N*-acylhydrazone derivatives (JR04, JR09 and JR19). The previously synthesized compounds were physico-chemically characterized and the structural elucidation was performed by spectroscopic and spectroscopic techniques. In the pharmacological tests Swiss adult albino mice of both sexes were used. The models used for anti-inflammatory activity were: peritonitis and paw edema induced by carrageenan, and pockets of subcutaneous air. For the antinociceptive potential was performed: formalin-induced nociception and orofacial pain induced by formalin. The acute toxicity test was also performed. In the microbiological assays *American Type Culture Collection* (ATCC) standard bacterial and fungal strains were used by disc diffusion and microdilution methods. The compounds showed yields above 50%. Regarding the melting range, the temperature variation for most compounds was up to 3° C. All compounds presented LogP <5, being in agreement with the rule of Lipinsk, and chemical displacement signals characteristic of the proposed structures as being (2-cyano-*N*-[4-(methylsulfonyl) benzylidene] acetohydrazide (JR04), *N*-(benzylidene)-2-cyanoacetohydrazide (JR09) and *N*-[(1-H-indol-3-yl)methylene]-2-cyanoacetohydrazide (JR19) in RMN of ¹H and RMN of ¹³C DEPT-Q spectra. In the carrageenan-induced peritonitis model, oral administration of the compounds JR04 (10 and 20mg/kg), JR09 (20mg/kg) and JR19 (10 and 20mg/kg) inhibited significantly at 48, 54, 61, 59 and 52%, respectively, leukocyte migration when compared to the control group, and there was no significant difference between doses of 10 and 20 mg/Kg of JR04 and JR19. The dose of 10mg/kg was selected for the other tests. In the pockets of subcutaneous air, all compounds significantly inhibited cell migration when compared to the negative control, at 55, 52 and 66%, for JR04, JR09 and JR19, respectively. They also reduced carrageenan-induced paw edema, especially compounds JR19. Confirming the anti-inflammatory activity in paw edema, the compounds significantly reduced serum C-reactive protein (CRP) concentration when compared to the control group. In the models of formalin-induced nociception and orofacial pain induced by formalin, compounds JR09 and JR19 were active only in the second phase, suggesting to be devoid of central analgesic effect and possibly anti-inflammatory action retainer. The compound JR04 increased the reactivity time in the two phases in these models, this is suggestive of an increase in the synthesis and/or initial release of BK promoting an intensification of action of this vasoactive peptide. In the evaluation of the acute toxicity of compounds JR09 and JR19 at the dose of 100mg/Kg there was no death or behavioral or physiological changes, indicating low toxicity of the molecules tested. In the tests of antimicrobial activity, no inhibition of the growth of the tested microorganisms was observed, indicating absence of antimicrobial activity, by the methods used. The results indicate the effectiveness of the *N*-acylhydrazone derivatives as anti-inflammatory, favoring the prospects for its future use with this therapeutic objective.

Key words: hydrazones, inflammation, microorganisms.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fases da reação inflamatória.....	24
Figura 2 – Visão geral da inflamação	26
Figura 3 – Mediadores químicos da inflamação.....	28
Figura 4 – Enzimas cicloxigenases 1 e 2, diferenciadas pelos aminoácidos isoleucina e valina, respectivamente	29
Figura 5 – Representação da biossíntese de prostaglandinas e tromboxanos a partir do metabolismo do ácido araquidônico via COX-1/COX-2	31
Figura 6 – Componentes de um nervo cutâneo característico.....	35
Figura 7 – Sequência de eventos da nocicepção estimulada pela lesão tecidual.....	36
Figura 8 – Dor inflamatória.....	38
Figura 9 – Mecanismo de ação dos glicocorticoides	39
Figura 10 – Mecanismo de ação geral dos AINEs	42
Figura 11 – Esqueleto hidrazônico	45
Figura 12 – Estrutura básica da função <i>N</i> -acilhidrazona	46
Figura 13 – Estrutura da nifuroxazida	46
Figura 14 – Estrutura da isoniazida	47
Figura 15 – Derivado acilhidrazônico com atividade anti-inflamatória	47
Figura 16 – Derivado acilhidrazônico com atividade antibacteriana	48
Figura 17 – Derivado acilhidrazônico com atividade antifúngica.....	48
Figura 18 – Derivado acilhidrazônico com atividade antiparasitária	49
Figura 19 – Derivado acilhidrazônico com atividade antiviral	49
Figura 20 – Representação esquemática do modelo de peritonite induzida por carragenina .	65
Figura 21 – Representação esquemática do modelo de bolsão de ar subcutâneo	66
Figura 22 – Representação esquemática do modelo de edema de pata induzido por carragenina	67
Figura 23 – Representação esquemática do modelo de nocicepção induzida por formalina..	68
Figura 24 – Representação esquemática do modelo de dor orofacial induzida por formalina	69
Figura 25 – Representação esquemática do teste de toxicidade aguda.....	70
Figura 26 – Representação esquemática do método de disco-difusão	71
Figura 27 – Representação esquemática da avaliação da atividade antibacteriana por microdiluição	73

Figura 28 – Representação esquemática da avaliação da atividade antifúngica por microdiluição para leveduras de importância clínica	75
Figura 29 – Curvas termogravimétricas dos compostos JR04 (A), JR09 (B) e JR19 (C)	77
Figura 30 – Influência do tratamento com os compostos JR04, JR09 e JR19 sob a contagem total de leucócitos, para o modelo da peritonite induzida por carragenina (1%)	78
Figura 31 – Influência do tratamento com os compostos JR04, JR09 e JR19 sob a contagem total de leucócitos no modelo de bolsão de ar subcutâneo.....	83
Figura 32 – Influência do tratamento com os compostos JR04, JR09 e JR19 sob o edema de pata induzido por carragenina.....	84
Figura 33 – Influência do tratamento com os compostos JR04, JR09 e JR19 sobre o tempo de reatividade a dor na fase I do teste de formalina intraplantar	87
Figura 34 – Influência do tratamento com os compostos JR04, JR09 e JR19 sobre o tempo de reatividade a dor na fase II do teste de formalina intraplantar	87
Figura 35 – Influência do tratamento com os compostos JR04, JR09 e JR19 sobre o tempo de reatividade a dor na fase I do teste de dor orofacial induzida por formalina	89
Figura 36 – Influência do tratamento com os compostos JR04, JR09 e JR19 sobre o tempo de reatividade a dor na fase II do teste de dor orofacial induzida por formalina	89
Figura 37 – Evolução ponderal dos animais tratados com JR09 100mg/kg	92
Figura 38 – Evolução ponderal dos animais tratados com JR19 100mg/kg	92
Figura 39 – Avaliação da atividade antimicrobiana por disco-difusão de derivados <i>N</i> -acilhidrazônicos frente à <i>S. aureus</i> ATCC 25922	95
Figura 40 – Avaliação da atividade antimicrobiana de derivados <i>N</i> -acilhidrazônicos frente às linhagens de <i>S. aureus</i> ATCC 25923 (Linhas A e B), <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 (Linhas C e D) e <i>E. coli</i> ATCC 25922 (Linhas E e F)	96
Figura 41 – Avaliação da atividade antimicrobiana de derivados <i>N</i> -acilhidrazônicos frente às linhagens de <i>C. albicans</i> ATCC 76645 (Linhas A e B), <i>C. crusei</i> ATCC 40147 (Linhas C e D) e <i>C. tropicalis</i> ATCC 13803 (Linhas E e F)	97
Figura 42 – Derivado acilhidrazônico com potencial atividade antibacteriana	98
Figura 43 – Derivado acilhidrazônico com potencial atividade antifúngica	98

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação dos AINEs de acordo com a estrutura química ou mecanismo de ação	41
Tabela 2 – Características físico-químicas dos novos derivados <i>N</i> -acilhidrazônicos.....	76
Tabela 3 – Dados de termogravimetria referentes às etapas de decomposição dos compostos JR04, JR09 e JR19	77
Tabela 4 – Compostos sintetizados referente a série JR e suas respectivas estruturas	80
Tabela 5 – Influência do tratamento com os compostos JR04, JR09 e JR19 nos valores de PCR-ultrassensível no modelo de edema de pata induzida por carragenina em camundongos	85
Tabela 6 – Consumos de água e ração de camundongos Swiss, machos e fêmeas tratados com 100mg/kg de JR09, JR19 e animais controle	91
Tabela 7 – Peso relativo dos órgãos (%) de camundongos do grupo controle e tratados com o JR09 e JR19 na dose de 100mg/kg por via oral após 14 dias	93
Tabela 8 – Determinação dos parâmetros hematológicos de camundongos Swis tratados com JR19 100mg/kg.....	93
Tabela 9 – Determinação dos parâmetros bioquímicos de camundongos Swis tratados com JR19 100mg/kg	94

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 – Reação geral de formação de uma hidrazona	46
Esquema 2 – Reação geral de formação de uma <i>N</i> -acilhidrazona.....	46

LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

- 5-HEPTE – 5-hidroperoxieicosatetraenóico
- 5-LOX – 5-lipoxigenase
- AIEs – Anti-inflamatórios esteroides
- AINEs – Anti-inflamatórios não esteroides
- AMH – Agar Mueller-Hinton
- AMPA – Ácido α -amino-3-hidróxi-5-metil-4-isoxazol propiônico
- AMS – Agar Manitol Salgado
- ANOVA – Análise de variância
- ASD – Agar Sabouraud Dextrose
- BAB – Blood Agar Base
- BHI – Caldo Brain Heart Infusion
- BK – Bradicinina
- CESED – Centro de Ensino Superior e Desenvolvimento
- CEUA – Comitê de Ética em Uso de Animais
- CGRP – Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
- CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute
- CMH – Caldo Mueller-Hinton
- CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
- COX-1 – Cicloxigenase-1
- COX-2 – Cicloxigenase-2
- CSD – Caldo Sabouraud Dextrose
- DL₅₀ – Dose Letal
- FAP – Fibras aferentes primárias
- FDA – Food and Drug Administration
- FTC β – Fator transformador de crescimento β
- GLU – Glutamato
- GR – Receptores de glicocorticoides
- HIV-1 – Vírus da imunodeficiência humana do tipo 1
- HIV-2 – Vírus da imunodeficiência humana do tipo 2
- IFN – Interferons
- IL – Interleucinas
- IL-1 – Interleucina-1

IL-8 – Interleucina-8
iNOS – Óxido nítrico sintase induzível
LSVM – Laboratório de Síntese e Vetorização Molecular
LTB₄ – Leucotrieno B₄
LTs – Leucotrienos
NaCl – Cloreto de sódio
NAP – Neurônio aferente primário
nNOS – Óxido nítrico-sintase neural
NO – Óxido nítrico
NOS – Óxido nítrico-sintase
NSP – Neurônios sensitivos primários
PAF – Fator de ativação plaquetária
PBS – Tampão fosfato
PCR – Proteína C Reativa
PFA – Proteína de fase aguda
PGE₂ – Prostaglandina E₂
PGHS – Prostaglandina H sintase
PGI₂ – Prostaglandina I₂
PGs – Prostaglandinas
pH – Potencial Hidrogeniônico
PIs – Prostaciclina
PLA₂ – Fosfolipase A₂
RNAm – Ácido ribonucleico mensageiro
SP – Substância P
TGA – Análise termogravimétrica
TGI – Trato gastrointestinal
TNF – Fator de necrose tumoral
TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa
TXs – Tromboxanos
UEPB – Universidade Estadual da Paraíba
UFC – Unidade Formadora de Colônia
v. o. – Via oral

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 OBJETIVOS	21
2.1 Objetivo Geral	22
2.2 Objetivos Específicos	22
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	23
3.1 Fisiopatologia da inflamação	24
3.1.1 <i>Inflamação aguda</i>	26
3.1.2 <i>Inflamação crônica</i>	27
3.3.3 <i>Mediadores envolvidos no processo inflamatório</i>	27
3.1.3.1 <i>Mediadores inflamatórios derivados do ácido araquidônico</i>	28
3.1.3.2 <i>Aminas vasoativas</i>	32
3.1.3.3 <i>Citocinas e quimiocinas</i>	32
3.1.3.4 <i>Óxido nítrico</i>	33
3.2 Dor	34
3.2.1 <i>Nocicepção</i>	34
3.3 Anti-inflamatórios esteroides e não esteroides	38
3.3.1 <i>Anti-inflamatórios esteroides (AIEs)</i>	38
3.3.2 <i>Anti-inflamatórios não esteroides (AINEs)</i>	39
3.4 Agentes antimicrobianos e resistência microbiana	43
3.5 Compostos químicos sintéticos como fonte de novos fármacos	45
3.6 Propriedades biológicas das acilhidrazonas	47
REFERÊNCIAS	51

CAPÍTULO 1 – ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOLÓGICO DE NOVOS DERIVADOS N-ACILHIDRAZÔNICOS

1 INTRODUÇÃO	61
2 MATERIAIS	62
2.1 Obtenção dos compostos <i>N</i> -acilhidrazônicos acridínicos substituídos	63
2.2 Substâncias	63
2.3 Animais	63
2.4 Linhagens microbianas	63
3 MÉTODOS	64

3.1 Local da pesquisa	64
3.2 Procedimentos éticos	64
3.3 Caracterização dos compostos <i>N</i> -acilhidrazônicos acridínicos substituídos.....	64
3.3.1 <i>Características físico-químicas e elucidação estrutural</i>	64
3.3.2 <i>Análise termogravimétrica (TGA)</i>	64
3.4 Preparo da diluição das substâncias em estudo	65
3.5 Avaliação do potencial anti-inflamatório	65
3.5.1 <i>Peritonite induzida por carragenina</i>	65
3.5.2 <i>Bolsão de ar subcutâneo</i>	66
3.5.3 <i>Edema de pata induzido por carragenina</i>	66
3.6 Avaliação do potencial antinociceptivo	67
3.6.1 <i>Nocicepção induzida por formalina</i>	67
3.6.2 <i>Dor orofacial induzida por formalina</i>	68
3.7 Avaliação da toxicidade	69
3.7.1 <i>Teste de toxicidade aguda</i>	69
3.7.2 <i>Determinação dos parâmetros hematológicos</i>	70
3.7.3 <i>Determinação dos parâmetros bioquímicos</i>	70
3.8 Avaliação da atividade antimicrobiana por disco-difusão.....	70
3.9 Avaliação da atividade antimicrobiana por microdiluição.....	72
3.9.1 <i>Determinação da atividade antibacteriana</i>	72
3.9.2 <i>Determinação da atividade antifúngica</i>	74
3.10 Análise estatística	75
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	76
4.1 Caracterização dos compostos <i>N</i> -acilidrazônicos acridínicos substituídos.....	76
4.1.1 <i>Caracterização físico-química</i>	76
4.1.2 <i>Análise termogravimétrica</i>	76
4.1.3 <i>Caracterização estrutural</i>	78
4.1.3.1 <i>Dados espectrais</i>	79
4.2 Avaliação do potencial anti-inflamatório de JR04, JR09 e JR19	80
4.2.1 <i>Peritonite induzida por carragenina</i>	80
4.2.2 <i>Bolsão de ar subcutâneo</i>	82
4.2.3 <i>Edema de pata induzido por carragenina</i>	83
4.2.3.1 <i>Determinação da concentração sérica da proteína C reativa (PCR)</i>	85
4.3 Avaliação do potencial antinociceptivo de JR04, JR09 e JR19	86

4.3.1 Nocicepção induzida por formalina	86
4.3.2 Dor orofacial induzida por formalina	88
4.4 Avaliação da toxicidade aguda	90
4.4.1 Avaliação comportamental dos camundongos	91
4.4.2 Consumo de água e ração e evolução ponderal	91
4.4.4 Análise macroscópica e peso dos órgãos	92
4.4.5 Determinação dos parâmetros hematológicos	93
4.4.6 Determinação dos parâmetros bioquímicos	93
4.5 Avaliação da atividade antimicrobiana por disco-difusão	94
4.6 Avaliação da atividade antimicrobiana por microdiluição	95
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	99
REFERÊNCIAS	100
ANEXOS	104
ANEXO 1. Documento emitido pelo CEUA/CESED aprovando os métodos utilizados na pesquisa	105
ANEXO 2. Protocolo utilizado na triagem farmacológica comportamental	106
ANEXO 3. Espectros de RMN¹H, RMN¹³C e IV referentes ao derivado JR04	107
ANEXO 4. Espectros de RMN¹H, RMN¹³C e IV referentes ao derivado JR09	109
ANEXO 5. Espectros de RMN¹H, RMN¹³C e IV referentes ao derivado JR19	111

1 INTRODUÇÃO

O processo inflamatório é definido como a resposta a um estímulo prejudicial provocado por uma variedade de agentes nocivos, infecções, anticorpos e ferimentos físicos. De acordo com Goodman & Gilman (2015), essa resposta é caracterizada por vasodilatação local e aumento da permeabilidade celular, infiltração de leucócitos e células fagocíticas, degeneração tecidual e fibrose.

Enzimas como óxido nítrico-sintase (NOS) e cicloxigenase-2 (COX-2) estão envolvidas na inflamação, tendo papel importante na resposta dos tecidos ao dano e a agentes infecciosos. Apesar da atividade fisiológica destas enzimas ser benéfica ao organismo, a sua expressão excessiva está associada à patogenia de diversas doenças. Agentes que possam inibir a expressão ou a atividade destas enzimas, geralmente induzidas por citocinas inflamatórias, são potenciais agentes anti-inflamatórios (VECHIA, GNOATTO, GOSMANN; 2009).

Os anti-inflamatórios não esteroides (AINEs) tradicionais disponíveis agem, em geral, inibindo as enzimas cicloxigenases. A inibição da COX-2 está associada às ações antipiréticas, analgésicas e anti-inflamatórias dos AINEs. A inibição simultânea da cicloxigenase-1 (COX-1) e COX-2 responde pelos efeitos adversos indesejáveis sobre o trato gastrointestinal (TGI). Diante disso, propôs-se que o desenvolvimento de fármacos com inibição seletiva para a COX-2, inclusive os coxibes, apresentariam mais vantagens terapêuticas, uma vez que a COX-2 é predominante nos tecidos inflamados enquanto a COX-1 é fonte de prostaglandinas (PGs) citoprotetoras do TGI (GOODMAN; GILMAN, 2015).

Atualmente, evidências indicam que os inibidores da COX-2 ocasionam riscos cardiovasculares, tais como infarto do miocárdio, acidente vascular encefálico, hipertensão sistêmica e pulmonar, insuficiência cardíaca congestiva e morte súbita; justificados pela supressão das PGs cardioprotetoras derivadas da COX-2, ativação das plaquetas, proliferação e reorganização dos vasos sanguíneos, hipertensão e aterogênese. Apesar dos efeitos adversos mais frequentes estarem associados à inibição seletiva da COX-2, a ausência de seletividade para essa isoenzima não elimina completamente o risco de eventos cardiovasculares, de modo que todos os fármacos de largo espectro dos AINEs somente devem ser prescritos após a análise do risco/benefício (BATLOUNI, 2010).

Desse modo, os efeitos secundários indesejáveis promovidos por esses agentes terapêuticos, tem direcionado a busca por novos compostos, cujo potencial anti-inflamatório seja acompanhado de um mínimo de efeitos colaterais e um baixo custo de produção, seja por

síntese baseada em moléculas de fármacos já existentes no mercado ou por moléculas presentes em diferentes fontes naturais como plantas.

Outro fator que contribui para a investigação do potencial bioativo de novas moléculas é a problemática da resistência a antimicrobianos convencionais adquirida por diversos microrganismos. Tal resistência é claramente uma das principais causas da reemergência das doenças infecciosas e do aumento da morbidade, mortalidade e custos em saúde decorrentes da redução das opções terapêuticas eficazes contra os microrganismos resistentes. As diversas ações internacionais conjuntas que têm sido desenvolvidas nas últimas décadas, com vista à vigilância e controle das resistências dos microrganismos aos antimicrobianos, são reflexos da importância que se atribui a este fenômeno a nível mundial (SILVA, 2009).

Em virtude da necessidade de novas terapias para as mais variadas enfermidades, os derivados acilhidrazônicos surgem como prováveis moléculas para o desenvolvimento de novos e eficientes fármacos. Já foram relatadas, para diversos compostos dessa natureza, ação antimicrobiana, antiparasitária, analgésica, anti-inflamatória, anticonvulsivante, anti-agregante plaquetária, além de atividades antituberculose, antitumoral entre outras (LIMA et al., 2000; ALMEIDA et al., 2002; ROLLAS; KÜÇÜKGÜZEL, 2007).

A presente proposta presume ressaltar o potencial terapêutico de novos derivados *N*-acilhidrazônicos na prevenção e no combate a diversas doenças, através da obtenção de novos compostos com atividade biológica comprovada, gerando subsídios para estudos futuros em torno das moléculas em questão. Neste contexto, muito há de se progredir, especialmente em relação à eficácia destes compostos em estudos clínicos e a determinação inequívoca do perfil toxicológico, bem como a necessidade de elucidação dos mecanismos moleculares de ação envolvidos nas ações biológicas dos mesmos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Caracterizar estruturalmente e avaliar o potencial biológico dos novos derivados *N*-acilhidrazônicos JR04, JR09 e JR19.

2.2 Objetivos Específicos

- Determinar as características físico-químicas e realizar a elucidação estrutural dos compostos JR04, JR09 e JR19 previamente sintetizados;
- Avaliar a atividade anti-inflamatória e antinociceptiva dos derivados *N*-acilhidrazônicos em camundongos;
- Avaliar a toxicidade aguda pré-clínica dos compostos com melhor potencial anti-inflamatório e antinociceptivo;
- Avaliar a atividade antimicrobiana dos derivados *N*-acilhidrazônicos por diferentes métodos.

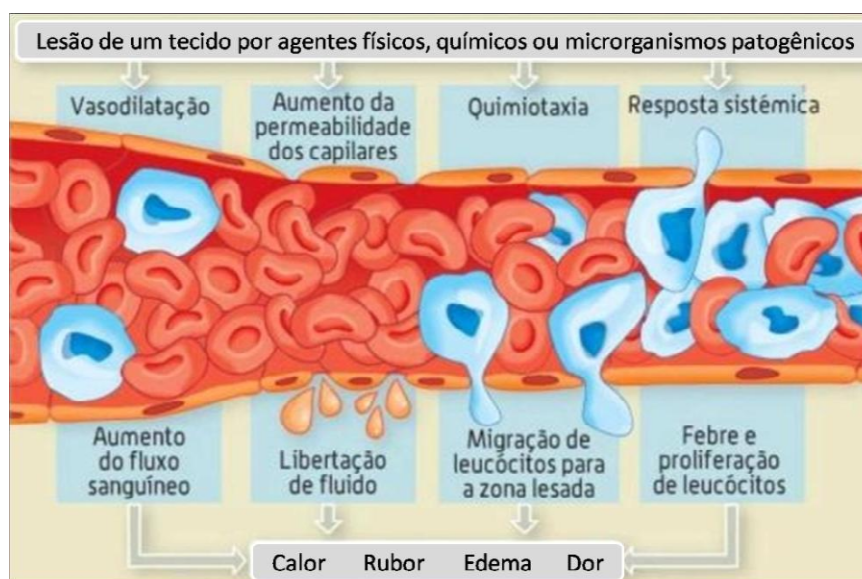
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Fisiopatologia da inflamação

A inflamação é definida como um complexo processo de defesa, desencadeado por estímulos nocivos incluindo infecções, reações imunológicas e lesões teciduais. A resposta inflamatória é caracterizada por acúmulo de fluidos e de leucócitos com o intuito de eliminar o agente nocivo (HERNÁNDEZ et al., 2013). Embora esses fenômenos estejam divididos em fases, todos eles acontecem simultaneamente, fazendo da inflamação um processo dinâmico.

Na fase irritativa ocorrem modificações morfológicas e funcionais dos tecidos agredidos promovendo a liberação de mediadores químicos, que irão desencadear as outras fases inflamatórias. Na fase vascular são observadas alterações hemodinâmicas da circulação e da permeabilidade vascular no local da agressão. A fase exsudativa é característica deste processo, ocorrendo migração de líquidos e células para o foco inflamatório, oriundos do aumento da permeabilidade vascular. A fase degenerativa-necrótica é composta por células mortas, necrosadas e produtos de degeneração, consequentes das fases anteriores. Na fase produtiva-reparativa ocorre a multiplicação de células e reparação tecidual, visando recompor o tecido lesionado (PECONICK; KALKS, 2011). Independente do estímulo inicial os sinais clínicos clássicos incluem eritema, edema, hipersensibilidade e dor, podendo culminar com a perda da função (Figura 1).

Figura 1 – Fases da reação inflamatória



Fonte: <http://www.getlinkyoutube.com/watch?v=5mmzDyrL-Ng>. Acesso em: 04 mai. 2016.

Durante esse processo as células do tecido lesado liberam enzimas como a calicreína para o meio extracelular que degradam ácidos graxos de cadeia longa e atuam sobre os

cininogênios, originando as cininas – bradicinina (BK), calidina e Met-Lys-bradicinina. As cininas são oligopeptídeos presentes no plasma e/ou líquido intersticial, envolvidas numa série de eventos biológicos, incluindo vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, modulação da dor, contração/relaxamento da musculatura lisa e efeitos na proliferação celular (DUNDER, 2009; FANTONI, 2011).

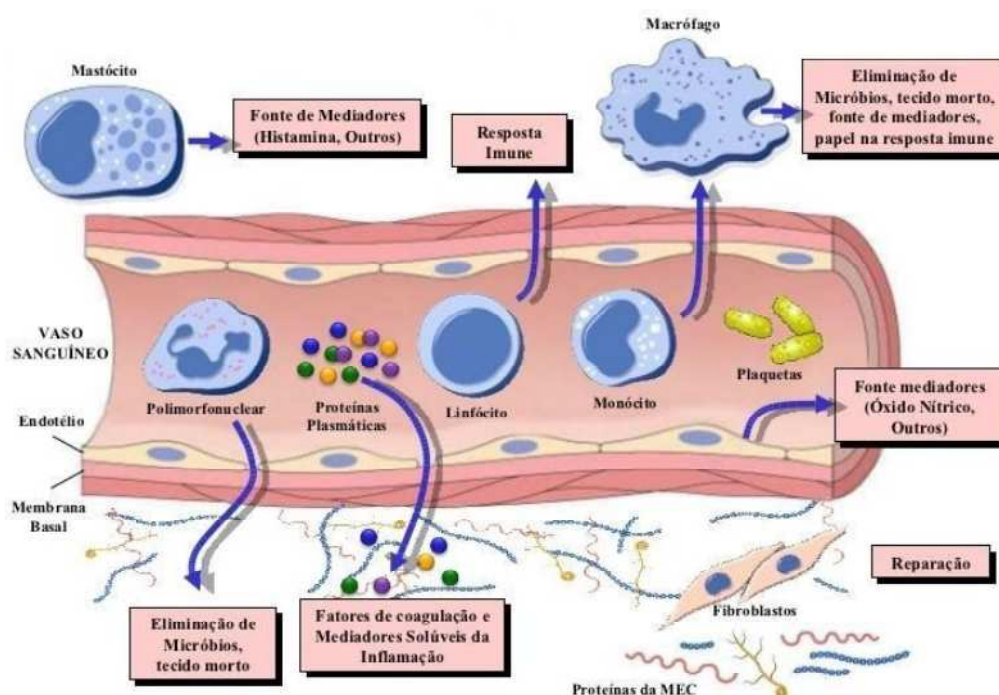
Uma vez formada, a BK provoca intensa dilatação arteriolar e aumento da permeabilidade capilar, contribuindo para a propagação da reação inflamatória. A BK associada a outras citocinas como o fator de necrose tumoral (TNF), a interleucina-1 (IL-1) e a interleucina-8 (IL-8), iniciam acentuadamente o ciclo da dor inflamatória (CHOPAIDE; MULLA, 2010).

A IL-1 promove a ativação da enzima COX, responsável pela produção de PGs, prostaciclina (PGI) e tromboxanos (TXs), enquanto a IL-8 atua na liberação local de aminas simpatomiméticas. Em virtude do acúmulo local de PGs, TXs e demais mediadores químicos, ocorre a indução de nociceptores sensitivos primários (NSP), aumentando sua sensibilização pela redução do limiar de ativação desses nociceptores e pela facilitação da condução neuronal ao tornar funcionais uma família de canais de sódio, conhecidas como tetrodoxina-resistentes (TTX-r) (CASTRO, 2011). Segundo Basbaum e Julius (2006), esses canais são específicos dos neurônios nociceptivos inflamatórios.

A vasodilatação característica da inflamação aguda é mediada pelo óxido nítrico (NO) e por prostaglandinas vasodilatadoras (PGE2 e PGI2). Os leucócitos ativados produzem óxido nítrico sintase induzível (iNOS) após exposição a produtos de origem microbiana e citocinas pró-inflamatórias (CHIU et al., 2011).

O edema ocorre em função do extravasamento de proteínas, eletrólitos e água, conhecido como exsudato, do leito vascular para o interstício pela ação de mediadores como a histamina, BK, leucotrienos (LTs), substância P (SP), componentes do sistema complemento e fator de ativação plaquetária (PAF), possibilitando um aumento da permeabilidade vascular ao plasma e proteínas (MOTA, 2013).

No decorrer do processo, leucócitos circulantes (especialmente neutrófilos e monócitos) migram significativamente para o tecido inflamado. A migração de eosinófilos também pode ocorrer em processos inflamatórios associados a reações alérgicas e infecções parasitárias. Outras células envolvidas, como células endoteliais, células mesoteliais, mastócitos, macrófagos e alguns linfócitos já estão presentes no tecido afetado (FRANCISCHETTI et al., 2010). Na figura 2 é possível ter uma visão geral da inflamação.

Figura 2 – Visão geral da inflamação

Fonte: <http://enfermagemparaamar.blogspot.com.br/2013/05/mecanismo-da-inflamacao.html>. Acesso em: 04 mai. 2016.

Normalmente, quando o processo reparatório se completa, os sinais de inflamação desaparecem. No entanto, apesar de extremamente necessário, esse processo poderá em determinadas situações levar a uma lesão tecidual exacerbada e persistente, sem benefício aparente e resultando em diversas desordens como as doenças reumáticas, asma, diabetes, doença de Alzheimer e aterosclerose (CASTRO, 2011; MOTA, 2013). De acordo com a persistência da lesão, os sintomas clínicos e a natureza da resposta imune, a inflamação divide-se em padrões agudo e crônico.

3.1.1 Inflamação aguda

O processo inflamatório agudo apresenta como principais características o acúmulo de líquidos e componentes do plasma no tecido afetado, estimulação intravascular de plaquetas e a migração de leucócitos polimorfonucleares (PMN) do espaço intraluminal até o tecido extravascular (ÁVILA, 2010).

A inflamação aguda pode durar minutos, horas ou dias, independente da natureza do agente agressor, apresentando resposta semelhante a estímulos distintos. Na primeira fase (0-1 hora), verifica-se a liberação de histamina e serotonina; na segunda e última fase (5-6 horas após a lesão), conhecida como fase tardia, ocorre liberação de BK e PGs, havendo acúmulo de células inflamatórias no local da lesão com migração leucocitária e formação de exsudato,

finalizando assim que o estímulo causador da injúria for removido e a liberação de mediadores envolvidos nesse processo seja inibida (ZHANG, 2008).

3.1.2 Inflamação crônica

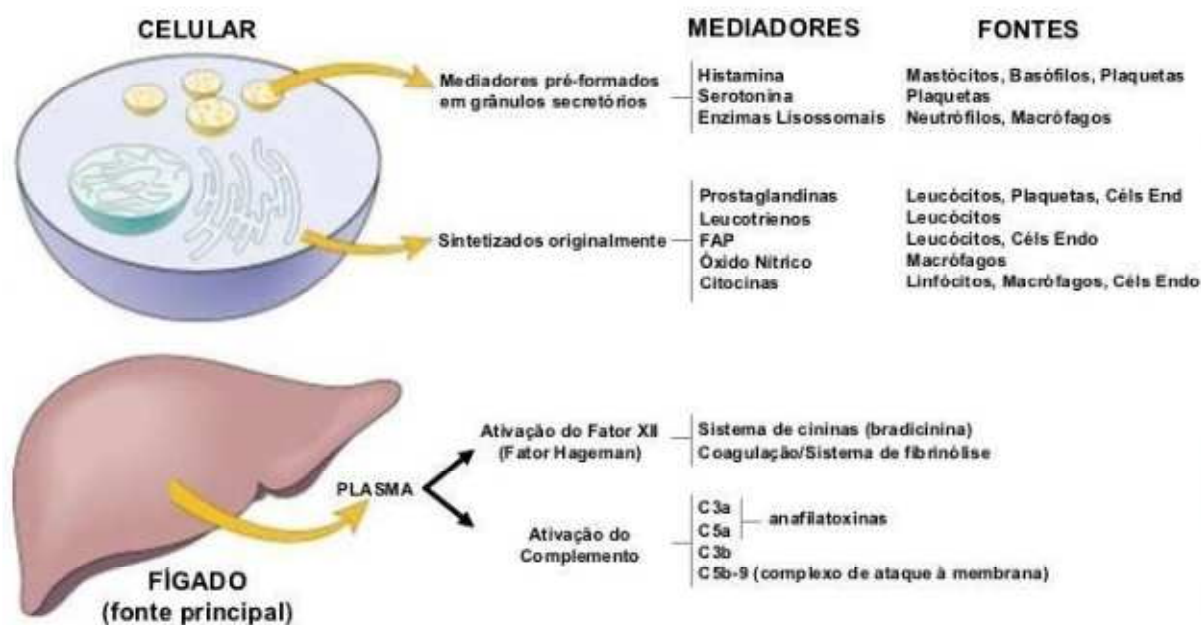
A resposta inflamatória crônica, por sua vez, é caracterizada pelo acentuado aumento na produção de mediadores inflamatórios quando há um estímulo agressor persistente, ocasionando destruição contínua dos tecidos e tentativas de cicatrização por reparo fibroso além de respostas auto-imunes. Esse processo perdura por um período indeterminado (ZHANG; CAO; ZHANG, 2009).

Após a injúria, os mediadores do processo inflamatório são produzidos e liberados no local onde se deflagrou o processo. Os macrófagos realizam a sinalização do local onde há material estranho ou lesão através destes mediadores, que irão atrair as células circulantes (leucócitos PMN, macrófagos, eosinófilos, linfócitos) as quais apresentam um papel amplificador no processo inflamatório. Os macrófagos ativados secretam vários mediadores da inflamação, os quais, se não controlados, podem levar à destruição tecidual e fibrose características desse tipo de inflamação (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2013).

3.1.3 Mediadores envolvidos no processo inflamatório

Diversas moléculas estão envolvidas na promoção e na resolução do processo inflamatório (Figura 3), podendo ser de origem tissular, como as aminas vasoativas, eicosanoides, citocinas, NO, PAF, e neuropeptídeos; ou de origem plasmática, como os sistemas de coagulação, do complemento, das cininas e fibrinolítico (CRUVINEL et al., 2010).

Figura 3 – Mediadores químicos da inflamação



Fonte: <http://pt.slideshare.net/raytostes/aula-de-inflamacao>. Acesso em: 04 mai. 2016.

3.1.3.1 Mediadores inflamatórios derivados do ácido araquidônico

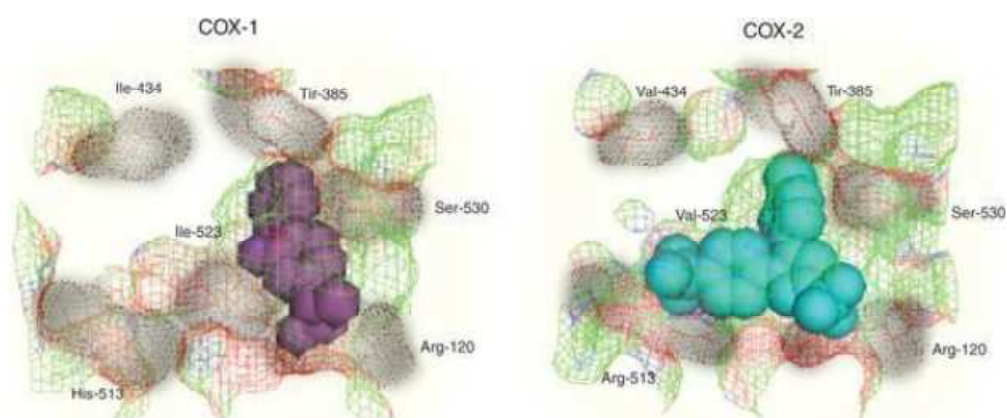
A ação da fosfolipase A (PLA_2) na membrana celular, através de estímulos químicos, inflamatórios, traumáticos ou mitogênicos, provoca a liberação de ácido araquidônico (AA), um dos três ácidos graxos essenciais, incorporado como éster de fosfo lipídeo nas membranas celulares, inclusive de mastócitos e outras células inflamatórias (eosinófilos e macrófagos) (ÁVILA, 2010).

O AA possui um papel fundamental na inflamação, uma vez que é metabolizado por três sistemas enzimáticos principais: a COX, obtendo-se as PGs, PGI e TXs; a lipoxigenase (15-LOX e 5-LOX), produzindo LTs e lipoxinas; e o citocromo P450, de cuja atuação obtêm-se os denominados produtos da via da epoxigenase (DUNDER, 2009; FANTONI, 2011). Os produtos do metabolismo do AA são conhecidos como eicosanoides, possuem elevada potência e amplo espectro de atividades biológicas, desempenhando importante função na indução e na facilitação de patologias, principalmente as doenças inflamatórias. Dessa forma, a supressão de suas ações tem sido um alvo significativo para o desenvolvimento de fármacos anti-inflamatórios (CASTRO, 2011).

A enzima COX, também conhecida como prostaglandina H sintase (PGHS), é composta por três isoformas: a COX-1, a COX-2 e a COX-3. Essas enzimas desempenham no

organismo diferentes funções fisiológicas. Embora apresentem semelhança em sua estrutura protéica, são codificadas por genes diferentes. A COX-1 e a COX-2 têm cerca de 60% de homologia genética. O sítio ativo da COX-2 é mais largo em aproximadamente 27%, devido a presença de uma pequena molécula de valina (Val) na posição 523 da cadeia protéica, ao contrário da COX-1 que apresenta nessa posição uma molécula de isoleucina (Ile) (Figura 4); isso torna o sítio de ligação da COX-2 mais acessível, podendo acomodar moléculas com cadeias laterais mais volumosas (CARVALHO, 2011).

Figura 4 – Enzimas cicloxigenases 1 e 2, diferenciadas pelos aminoácidos isoleucina e valina, respectivamente



Fonte: Goodman e Gilman (2015)

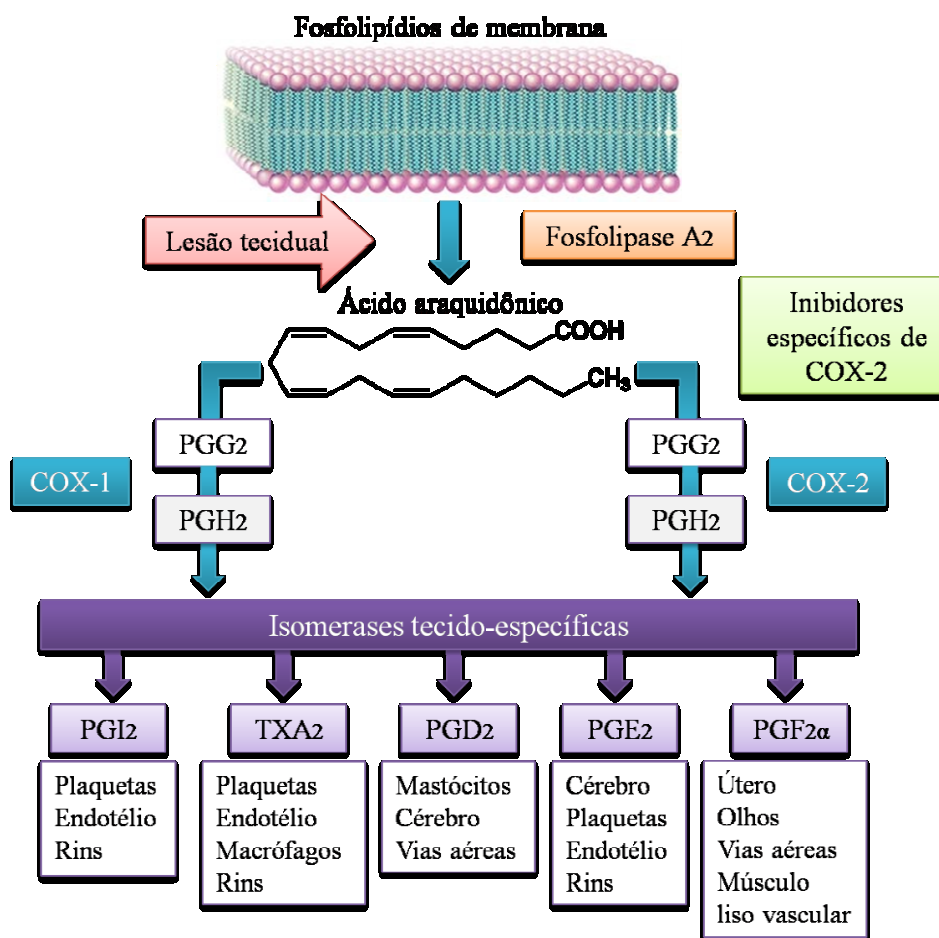
A COX-1 é considerada a forma constitutiva predominante e está expressa em todo o organismo, exceto nos eritrócitos. É fonte de PGs para funções de manutenção, como a citoproteção epitelial gástrica, agregação plaquetária, homeostase vascular e conservação do fluxo sanguíneo renal (ZHANG; CAO; ZHANG, 2009). Em contrapartida, a COX-2 é induzida por citocinas, estresse de cisalhamento e estimulantes tumorais, sendo expressa em resposta ao estímulo inflamatório e possivelmente ao câncer. Essa isoforma está presente em diferentes tecidos como: útero, cartilagens, ossos, rins, ovário e endotélio vascular. No sistema nervoso central (SNC) auxilia na neurotransmissão e na consolidação da memória. No tecido renal colabora para a manutenção dos níveis de reabsorção de sódio e de água. No sistema vascular, por sua vez, assegura a produção de PGIs que produzem efeitos vasodilatadores e evitam a agregação plaquetária (LINO, 2011; GOODMAN; GILMAN, 2015). É importante ressaltar que ambas as enzimas contribuem para a homeostase e podem contribuir também para a produção das PGs que são mediadores da dor e do processo inflamatório.

A COX-3 é considerada uma variante da COX-1, sendo expressa no córtex cerebral, no coração, no endotélio vascular, nos rins e nos tecidos neuronais (KAM; SO, 2009). A sua função ainda é pouco conhecida, contudo, acredita-se que esta isoforma não produza prostanoídes pró-inflamatórios, mas sim substâncias anti-inflamatórias, o que poderia explicar os períodos de remissão visto em casos de doenças inflamatórias crônicas, como a artrite reumatoide (KUMMER; COELHO, 2002).

Essa enzima é seletivamente inibida por drogas analgésicas e antipiréticas, como paracetamol e dipirona. Essa inibição pode representar um mecanismo primário central pelo qual essas drogas diminuem a dor e possivelmente a febre. A relevância dessa isoforma ainda não está clara. Pesquisas recentes indicam que o paracetamol inibe a síntese de PGs nas células que têm uma baixa taxa de síntese e baixos níveis de peróxido, inibindo também outras isoformas. Quando os níveis de AA são baixos, o paracetamol parece ser um inibidor seletivo da COX-2. Apresenta efeitos predominantes sobre o SNC, porque o peróxido e os níveis de AA no cérebro são mais baixos do que em locais periféricos de inflamação (KAM; SO, 2009; KLOPCIC et al., 2015).

A síntese de PGs (Figura 5) tem início com a atividade da COX catalisando a adição do oxigênio molecular ao AA, formando a prostaglandina G_2 (PGG_2). A mesma enzima, catalisa a redução desta prostaglandina para formar a PGH_2 . A PGG_2 e a PGH_2 são substratos para a formação de diferentes PGs e TXs ativos, como PGD_2 , PGE_2 , $PGF_{2\alpha}$, prostaciclina (PGI_2) e tromboxano A_2 (TXA_2), de acordo com a presença de sintases específicas (ÁVILA, 2010). Essas PGs exercem suas ações ligando-se a uma família de receptores, localizados nas membranas celulares, acoplados à proteína G e a outros receptores. A ativação da proteína G resulta na estimulação de sistemas efetores responsáveis pela liberação de segundos mensageiros em diversos tecidos, desencadeando processos fisiológicos ou patológicos (CARVALHO, 2011; LINO, 2011).

Figura 5 – Representação esquemática da biossíntese de prostaglandinas e tromboxanos a partir do metabolismo do ácido araquidônico via COX-1/COX-2



Fonte: <http://www.prograd.uff.br/farmacoclinica/sites/default/files/AINES>. (Adaptação) Acesso em: 06 mai. 2016.

As lipoxigenases (LOXs) são enzimas responsáveis pela produção de LTs, importantes mediadores químicos em diversas condições inflamatórias e alérgicas. Essas enzimas estão presentes nos pulmões, plaquetas, mastócitos e leucócitos, especialmente no citosol. A 5-LOX é a principal enzima deste sistema, atuando sobre o AA e produzindo o ácido 5-hidroperoxieicosatetraenóico (5-HPETE), um composto quimiotático para leucócitos, posteriormente convertido em leucotrieno A₄ (LTA₄), que pode ser convertido em leucotrieno B₄ (LTB₄). Este último é responsável pelo aumento da permeabilidade vascular, aderência, quimiotaxia e ativação de PMN e monócitos, estimulando também a proliferação de macrófagos e linfócitos e a produção de citocinas por estas células (GOMES et al., 2009; CASTRO, 2011; MOTA, 2013).

A via das LOXs também origina as lipoxinas, especificamente a lipoxina A₄ (LXA₄), e B₄ (LXB₄), com a finalidade de limitar o recrutamento de PMN, quimiotaxia e aderência ao

local da inflamação (LEO, 2015). As ações pró-inflamatórias de inúmeras PGs e LTs são reguladas por essas moléculas.

3.1.3.2 Aminas vasoativas

As aminas vasoativas, histamina e serotonina, são de grande importância no processo inflamatório uma vez que encontram-se disponíveis em vesículas no interior de macrófagos, mastócitos e plaquetas, e são responsáveis por alterações vasculares como: vasodilatação, aumento do fluxo sanguíneo, aumento da permeabilidade vascular e exsudação plasmática. Estão entre os primeiros mediadores a serem liberados após o estímulo inflamatório e atuam sinergicamente com a BK induzindo hiperalgesia térmica, além de participarem dos processos de nocicepção em condições inflamatórias e formação do edema (CRUVINEL et al., 2010).

A histamina é o principal mediador da inflamação, da anafilaxia e da secreção ácida do estômago. É expressa em várias células incluindo neurônios, células parietais da mucosa gástrica, mastócitos e basófilos. Também está envolvida na proliferação e diferenciação celular, regeneração e cicatrização de feridas e na regulação do sistema imune (PASTORINO, 2010). Já a serotonina é produzida por células enterocromafins do epitélio do trato gastrointestinal e absorvida pelas plaquetas, sendo ativada pelo PAF. Sua liberação é estimulada quando as plaquetas se agregam após contato com colágeno, trombina, difosfato de adenosina (ADP) e complexo antígeno-anticorpo. Possui ações semelhantes a da histamina. (KATZUNG, 2014).

3.1.3.3 Citocinas e quimiocinas

As citocinas representam um grupo de moléculas multifuncionais que modulam a atividade celular, em especial, no sistema imune. São produzidas por diversos tipos de células no local da lesão e por células do sistema imunológico através da ativação de proteinoquinas ativadas por mitógenos. Diferentemente dos hormônios clássicos, as citocinas não são armazenadas como moléculas preformadas e atuam especialmente por mecanismos parácrino (em células vizinhas) e autócrino (nas próprias células produtoras). Sua secreção é transitória e estreitamente regulada. Incluem as interleucinas (IL), linfocinas, interferons (IFN) e o TNF (SOMMER; WHITE, 2010; OLIVEIRA et al., 2011).

Algumas citocinas são pró-inflamatórias (IL-1, IL-2, IL6, IL-7 e TNF), sendo consideradas mediadores inflamatórios extremamente potentes; enquanto outras suprimem a inflamação (IL-4, IL-10, IL-13 e fator transformador de crescimento β – FTCT β). Essas moléculas interligam, amplificam e propagam a resposta imune, recrutando as células para

áreas de inflamação, estimulando sua divisão, proliferação e diferenciação. As ILs anti-inflamatórias inibem a liberação de citocinas pró-inflamatórias e reduzem a expressão da COX-2, ao passo que as ILs pró-inflamatórias migram e atuam na região lesionada, sinalizando a inflamação (FRANCISCHETTI et al., 2010).

O TNF- α é um agente quimiotático para neutrófilos e monócitos, estimula a fagocitose, adesão ao endotélio e produção de superóxido por estas células, além de estimular a produção de outras citocinas pró-inflamatórias. É produzido em resposta a diversos estímulos extracelulares como outras citocinas, choque térmico, isquemia, luz ultravioleta e infecções microbianas (OLIVEIRA et al., 2011).

As quimiocinas, como a IL-8, são quimioatratadores para tipos específicos de leucócitos, controlam seletiva e especificamente a adesão, quimiotaxia e ativação leucocitária, estando, por isso, envolvidas na inflamação, na homeostasia e também no desenvolvimento orgânico. São produzidas essencialmente por monócitos e macrófagos, e também por células estruturais, células endoteliais e fibroblastos (GUERREIRO; SANTOS-COSTA; AZEVEDO-PEREIRA, 2011).

3.1.3.4 Óxido nítrico

O NO endógeno é produzido a partir da L-arginina por um grupo de enzimas conhecidas como NO sintases (NOS). Existem pelo menos três isoformas dessa enzima caracterizadas sendo duas constitutivas (NOS endotelial (eNOS), NOS neural (nNOS)) e uma induzível (iNOS). O óxido nítrico oriundo da NOS constitutiva é um importante regulador da homeostase física, incluindo os sistemas cardiovascular, imune e nervoso; enquanto a maior parte de NO produzido pelas iNOS está intimamente relacionada com a fisiopatologia de doenças inflamatórias (ZHANG; CAO; ZHANG, 2009; SANSBURY et al., 2012).

Essa molécula é reconhecida como um sinalizador celular endógeno essencial com potenciais aplicações terapêuticas. A sua importância na inflamação está associada a diversas funções, tais como: a vasodilatação em resposta ao estresse de cisalhamento ou vários agentes vasodilatadores, a inibição da agregação e aderência plaquetárias e a citotoxicidade mediada por macrófagos; contribuindo para a instalação do processo inflamatório (MAZZEI; DOCHERTY; MANUCHA, 2015; BRADLEY; STEINERT, 2016; CAMARGO; MANUCHA, 2016).

3.2 Dor

A dor é frequentemente correlacionada a processos penetrantes ou destrutivos dos tecidos (queimaduras, contorções, dilacerações, compressões) e/ou com uma reação corporal ou emocional. Além disso, é uma sensação desagradável, acompanhada de ansiedade e do desejo de interrompê-la. Tais propriedades demonstram que a dor é uma experiência sensorial e emocional (LONGO, et al., 2013).

Apesar de permitir a consciência de que a integridade do organismo está sendo ameaçada ou que existe alguma disfunção, a dor pode trazer consequências indesejáveis como sofrimento, estresse, prejuízo nas relações sociais e econômicas, devendo ser rápida e efetivamente controlada (FERREIRA et al., 2016).

Num contexto temporal, a dor pode ser classificada como aguda ou crônica. É considerada aguda a dor resultante de lesão traumática, cirúrgica ou infecciosa que surge de forma repentina e tem duração limitada. Possui função fisiológica atuando como um sinal de alarme e defesa do organismo e em geral responde bem à terapia analgésica. A dor que persiste por longos períodos ou que é recorrente após uma lesão ou trauma tecidual, mesmo depois da recuperação completa da lesão, é considerada crônica. Diferente da dor aguda, a dor crônica não tem função protetora, e por manter-se mesmo após a recuperação tecidual é de difícil tratamento (FANTONI, 2011).

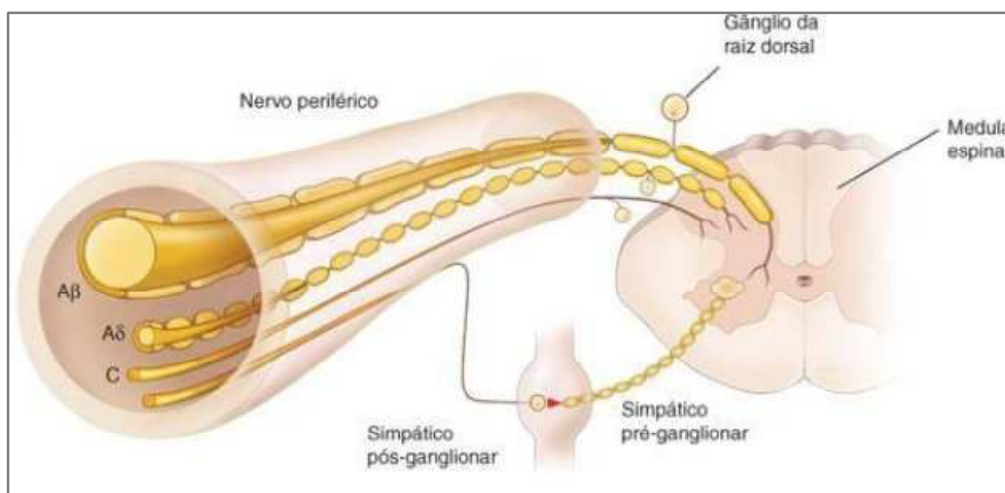
Quanto a sua fisiopatologia, a dor pode ser classificada em nociceptiva, quando a sua origem está associada a estimulação excessiva de nociceptores presentes na pele, vísceras ou outros órgãos; neuropática, proveniente de uma lesão no tecido neuronal da periferia ou do SNC, podendo envolver um nervo ou grupo de nervos; e psicogênica, quando ocorre mesmo sem que haja lesão aparente, podendo refletir predomínio de fatores psicológicos (GONÇALVES, 2011).

3.2.1 Nociceção

O componente sensorial da dor é denominado nociceção, *noci* é uma palavra derivada do latim *nocere*, que significa ferir. A nociceção refere-se a resposta neurofisiológica promovida pela ativação de nociceptores em virtude de um dano tissular. Os nociceptores representam as terminações livres do axônio periférico do Neurônio Aferente Primário (NAP). Em geral, a dor provocada pela lesão dos tecidos, como queimaduras, incisões, abrasão da pele, inflamação articular e lesão musculoesquelética, é considerada como nociceptiva (MENDES, 2010).

Os nociceptores estão associados as fibras não mielinizadas A δ e C e seus corpos celulares estão situados no gânglio da raiz dorsal (Figura 6). Essas fibras são encontradas nos nervos que suprem a pele, estruturas somáticas e vísceras profundas e são capazes de traduzir um estímulo agressivo de natureza térmica, química ou mecânica, em estímulo elétrico que será transmitido até o SNC e interpretado no córtex cerebral como dor. As fibras A β são responsáveis pelo envio das demais modalidades somestésicas (LINLEY et al, 2010; SARZI-PUTTINI et al., 2010).

Figura 6 – Componentes de um nervo cutâneo característico



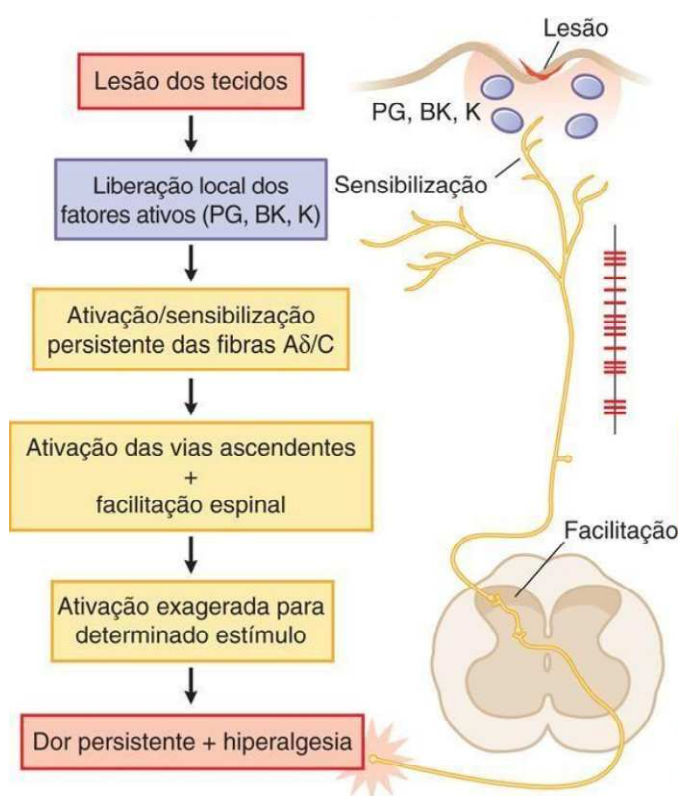
Fonte: Longo, et al. (2013)

A sensação dolorosa é acompanhada de alterações sensoriais manifestadas na forma de hiperalgesia (aumento da sensibilidade para um estímulo doloroso) e alodinia (aumento da sensibilidade para um estímulo inócuo, dor ao toque suave). Dessa forma, o tecido inflamado torna-se mais sensível a estímulos que em condições normais produzem pouca ou nenhuma dor (FANTONI, 2011).

A sensibilização pode ocorrer periféricamente ou em nível central. A sensibilização periférica ocorre no local da injúria, quando são aplicados estímulos intensos, repetidos ou prolongados a tecidos lesados ou inflamados. O pH baixo e diversos mediadores inflamatórios, como a BK, algumas PGs e LTs contribuem para esse processo ao ativarem a transdução de sinais nos nociceptores intracelulares, aumentando a produção, transporte e inserção na membrana de canais iônicos ativados quimicamente e ativados por voltagem. Essas alterações aumentam a excitabilidade dos terminais nociceptores, reduzindo o seu limiar de ativação. Assim, os nociceptores passam a perceber estímulos nocivos com maior intensidade e estímulos não nocivos (tato) como dolorosos (COSTANZO, 2011; WOOLF, 2011).

A sensibilização central pode ser entendida como uma facilitação do SNC à passagem de estímulos nociceptivos (Figura 7). O tráfego aferente contínuo desencadeado pela lesão provoca a ativação das vias facilitadoras espinais, amplificando a atividade periférica. Essa facilitação é, provavelmente, a responsável pelos estados de hiperalgesia (MOFFAT; RAE, 2010).

Figura 7 – Sequência de eventos da nocicepção estimulada pela lesão tecidual



Fonte: Goodman e Gilman (2015)

O impulso nociceptivo é modulado pelo sistema nervoso periférico através da liberação de neuropeptídeos, além de serotonina, BK, leucotrieno B₄ (LTB₄) e PGE₂; e no SNC pela liberação de neurotransmissores como a dopamina (SOUZA, 2009).

Neuropeptídeos são neurotransmissores liberados logo após a estimulação de nociceptores presentes nas fibras de NAP, podendo atuar sobre as próprias células nervosas, regiões medulares específicas, e sobre o tecido adjacente. Existem vários peptídeos envolvidos no processo inflamatório e na dor inflamatória, dentre eles: a SP, atuando como um mediador da primeira sinapse da transmissão dolorosa; e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), modulando a transmissão nervosa em nível de SNC e na inflamação periférica (CASTRO, 2011).

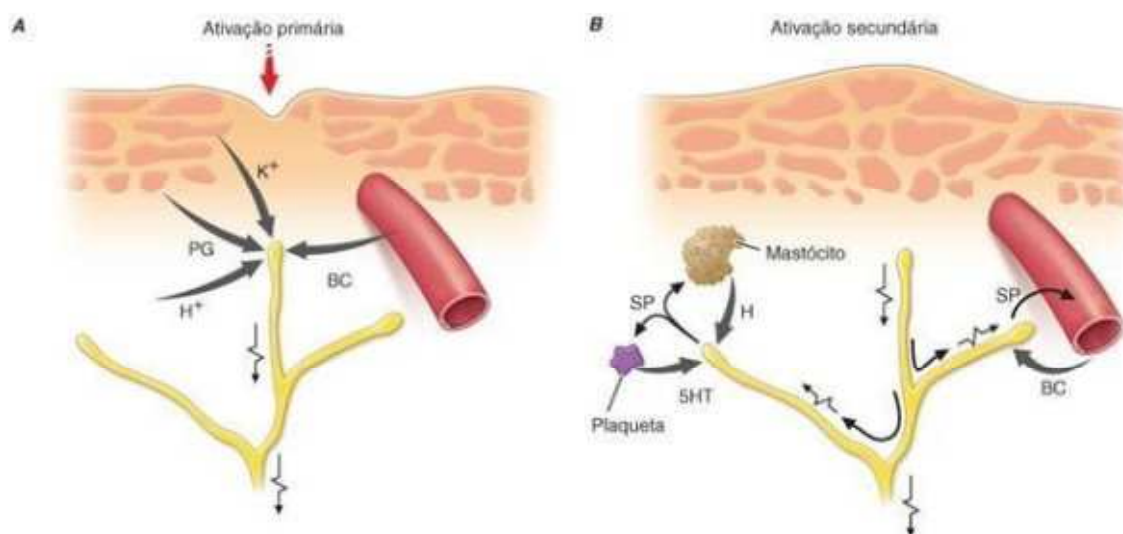
O CGRP, na medula espinhal, atua sobre receptores CGRP1 e CGRP2, onde, após uma série de eventos intracelulares, permite a fosforilação de receptores AMPA (ácido α -amino-3-hidróxi-5-metil-4-isoxazol propiônico), que aumenta a excitação neuronal, contribuindo com o estabelecimento da hiperalgesia. Ele facilita a nocicepção por retardar o metabolismo da SP e, também, aumentar a sua liberação e do glutamato (GLU) nas terminações centrais das fibras aferentes primárias (FAP) (OLIVEIRA; ISSY; SAKATA, 2010).

O GLU é um aminoácido livre abundante no SNC, atuando como principal neurotransmissor excitatório. Participa consideravelmente no desenvolvimento neural, no aprendizado, na memória, na epilepsia, na isquemia neural, na tolerância e na dependência a drogas, na dor neuropática, na ansiedade e na depressão (FEATHERSTONE, 2010; VALLI; SOBRINHO, 2014).

O NO, assim como algumas PGs, citocinas pró-inflamatórias, TNF- α e o fator de crescimento neural promovem a ativação e/ou sensibilização do nociceptor, gerando hiperalgesia (CARVALHO, 2011).

A BK é um peptídeo vasoativo derivado do cininogênio que contribui para as respostas inflamatórias, sendo considerado um composto algio gênico que atua localmente, causando dor, vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular (GOODMAN; GILMAN, 2015).

De modo geral, durante a ativação primária, a lesão celular reduz o pH (H^+) e leva à liberação de potássio (K^+) e à síntese de PGs e BK. As PGs aumentam a sensibilidade do terminal à BK e às outras substâncias promotoras de dor. Na ativação secundária, os estímulos gerados se propagam na medula espinhal, bem como em outros ramos terminais, induzindo a liberação da SP (Figura 8). Esse peptídeo produz vasodilatação e edema com acúmulo adicional de BK e promove a liberação de histamina pelos mastócitos e de serotonina pelas plaquetas (LONGO, et al., 2013).

Figura 8 – Dor inflamatória

Fonte: Longo et al. (2013)

Os AINES são os fármacos utilizados como analgésicos periféricos e mostram-se principalmente eficazes no controle da dor associada à inflamação ou à lesão tecidual, visto que diminuem a produção das PGs que sensibilizam os nociceptores (RANG et al., 2012).

3.3 Anti-inflamatórios esteroides e não esteroides

3.3.1 Anti-inflamatórios esteroides (AIEs)

Os AIEs, também chamados de glicocorticoides, exibem atividade anti-inflamatória e imunossupressora, estando entre os fármacos mais utilizados mundialmente com eficácia comprovada no tratamento de uma variedade de doenças inflamatórias e imunológicas, incluindo asma, dermatites, artrite reumatoide a alguns casos de câncer (DE BOSSCHER; BECK; HAEGEMAN, 2010).

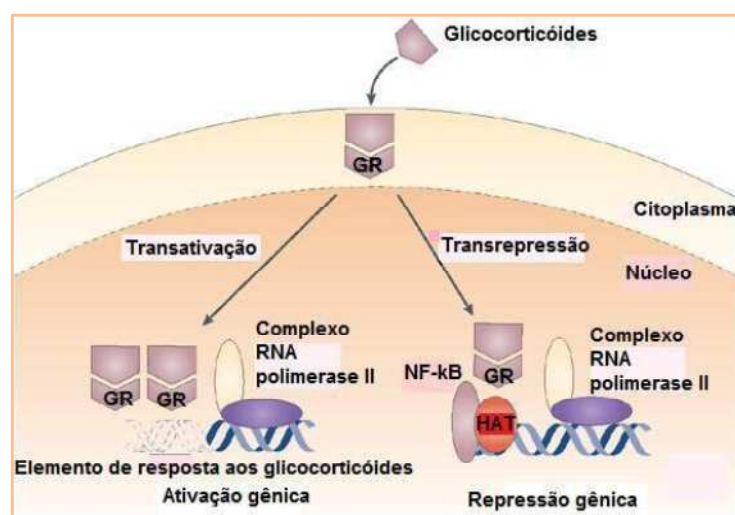
Quanto ao mecanismo de ação (Figura 9), os glicocorticoides ligam-se a receptores de glicocorticoides (GR) nos tecidos-alvo para regular a expressão de genes-alvo, modificando, assim, os níveis e o conjunto de proteínas sintetizadas, de maneira positiva (transativação) ou negativa (transrepressão) (DEJEAN; RICHARD, 2013).

A ligação à região promotora de genes sensíveis aos glicocorticoides leva ao mecanismo de transativação, com transcrição de genes que codificam mediadores anti-inflamatórios. Essa indução envolve a formação de RNAm específicos, que regulam a síntese de proteínas específicas, como a lipocortina-1 (ou anexina-1) e P11 (calpactina), importante na inibição da PLA₂. Como consequência, impedem a formação das PGs e dos

LTs; ativação de inibidores de proteases de leucócitos e antagonistas do receptor de IL-1, sendo responsáveis pelos efeitos terapêuticos dos glicocorticoides no controle da resposta imune inflamatória, reduzindo o infiltrado inflamatório, restaurando a integridade do epitélio e do depósito de fibras colágenas abaixo da membrana basal (DEJEAN; RICHARD, 2013; ERRANTE et al., 2014).

No mecanismo de transrepressão, o complexo glicocorticoide-receptor se liga a moléculas co-ativadoras, promovendo a ativação de fatores de transcrição nuclear pró- inflamatórios (ERRANTE et al., 2014). Dessa forma, não há expressão de genes como os que controlam a síntese da COX-2, citocinas, moléculas de adesão, dentre outras.

Figura 9 – Mecanismo de ação dos glicocorticoides



Fonte: Errante et al. (2014)

Esses fármacos exercem ações mais amplas que os AINEs sobre o processo inflamatório e, atualmente, são os fármacos mais potentes utilizados no tratamento da inflamação. Apresentam um amplo espectro de efeitos adversos, associado principalmente a sua ação metabólica e à administração prolongada ou em altas doses (MOTA, 2013). Em virtude disso, apesar do uso sistêmico ser amplamente empregado em várias especialidades médicas, em muitos casos a terapia anti-inflamatória com glicocorticoides é realizada na forma tópica, como inaláveis, pomadas, cremes, colírios, loções, soluções, géis, suspensões. Além disso, os glicocorticoides tópicos apresentam alta eficácia mesmo em baixas doses (DE BOSSCHER; BECK; HAEGEMAN, 2010).

3.3.2 Anti-inflamatórios não esteroides (AINEs)

Os AINEs, estão entre os fármacos mais prescritos e utilizados no mundo,

sendo também responsáveis por aproximadamente um quarto de todas as notificações de reações adversas (JOSÉ, 2014). São reconhecidos pelo seu potencial analgésico e antipirético e considerados os fármacos de primeira escolha no tratamento da inflamação geral, bem como de doenças reumáticas (MATEUS, 2014). Os AINES podem ser classificados de acordo com a estrutura química ou mecanismo de ação. Na tabela 1 observamos os principais fármacos de acordo com estas classificações.

Tabela 1 – Classificação dos AINES de acordo com a estrutura química ou mecanismo de ação

(continua)

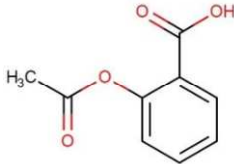
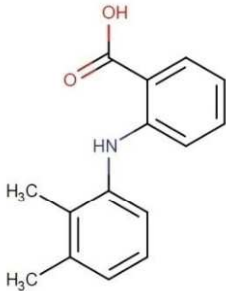
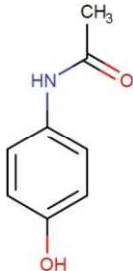
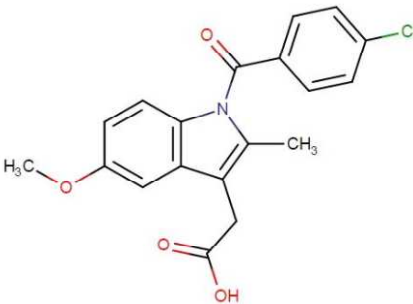
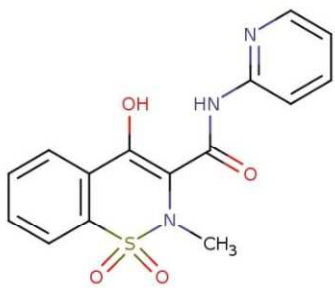
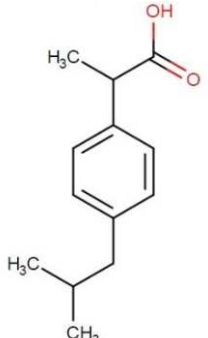
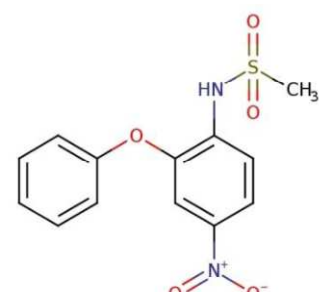
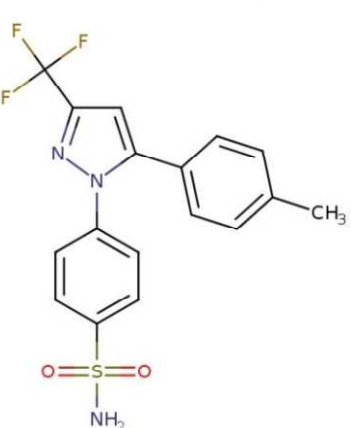
Classes terapêuticas	Nome químico	Estrutura molecular	Mecanismo de ação
Salicilatos	Ácido acetilsalicílico (AAS)		Inibidores não seletivos da COX
Fenamatos	Ácido mefenâmico		Inibidores não seletivos da COX
Derivado do paraminofenol	Paracetamol		Inibidores não seletivos da COX
Derivados do ácido acético	Indometacina		Inibidores não seletivos da COX

Tabela 1 – Classificação dos AINEs de acordo com a estrutura química ou mecanismo de ação

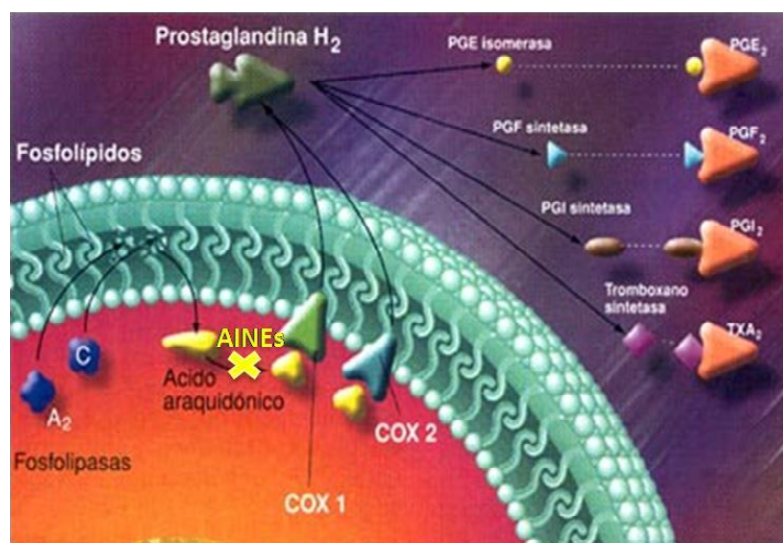
(conclusão)

Classes terapêuticas	Nome químico	Estrutura molecular	Mecanismo de ação
Derivados do ácido enólico	Piroxicam		Inibidores não seletivos da COX
Derivados do ácido propiônico	Ibuprofeno		Inibidores não seletivos da COX
Sulfonânilida	Nimesulida		Inibidores seletivos da COX-2
Derivados coxibes	Celecoxibe		Inibidores altamente seletivos da COX-2

Fonte: Goodman e Gilman (2015); <https://www.drugbank.ca/> (Adaptação). Acesso em 10 jan. 2017

OS AINES são um grupo de fármacos estruturalmente diferentes que compartilham o mesmo mecanismo de ação e apresentam diversas propriedades em comum (VONKEMAN; LAAR, 2010). O principal mecanismo de ação dos AINEs envolve a inibição da COX, reduzindo a conversão do AA em PGs e TX (Figura 10). A maioria destes fármacos age de forma reversível e não seletiva sobre as mesmas enzimas (MONTEIRO et al., 2008).

Figura 10 – Mecanismo de ação geral dos AINEs



Fonte: http://www.uff.br/mfl/outras_disciplinas/med_integral_infancia_adolescente/cox2.htm. (Adaptação). Acesso em 28 nov. 2016

A COX-1 é expressa de maneira significativa nas células epiteliais gástricas, sendo considerada a principal fonte de PG citoprotetora, associada a produção de muco e inibição da secreção ácida gástrica (CARVALHO, 2013). Nas plaquetas, está associada à síntese do tromboxano A₂, mediador que favorece a agregação e adesão plaquetária. Portanto, os fármacos que atuam na inibição dessa isoforma provocam diversos distúrbios no trato digestivo e podem estar relacionados ao risco de sangramento cutâneo e gastrointestinal (GI) (GRASSI; ARAÚJO, 2012). São esses eventos gástricos adversos que comprometem o tratamento com os AINEs, o que justifica o desenvolvimento de fármacos específicos para a COX-2.

Dessa forma, foram desenvolvidos inibidores seletivos de COX-2 com o objetivo de promover eficácia semelhante aos AINEs com melhor tolerância GI. Seis fármacos foram inicialmente aprovados para uso nos Estados Unidos: celecoxibe, rofecoxibe, valdecoxibe, parecoxibe, etoricoxibe e lumiracoxibe. A maioria desses inibidores da COX-

2 especialmente lançados para esse fim, foi gravemente restringida em seu uso ou retirada do mercado, em virtude da gravidade de seus efeitos adversos. Atualmente, o celecoxibe é o único fármaco desse tipo licenciado para uso nos Estados Unidos (GOODMAN; GILMAN, 2015).

3.4 Agentes antimicrobianos e resistência microbiana

O desenvolvimento de fármacos visando a prevenção e a cura de infecções microbianas foi uma das maiores contribuições à longevidade e à qualidade de vida do homem. Atualmente, vários estudos estão sendo conduzidos para a descoberta de novos agentes antimicrobianos provenientes de plantas ou obtidos a partir de compostos químicos sintéticos, visando o desenvolvimento de fármacos eficazes contra a resistência dos microrganismos patogênicos, porém, com menor toxicidade e menor impacto ambiental.

Os antimicrobianos estão entre os fármacos mais utilizados no mundo, no entanto, estão também entre os fármacos mais utilizados de forma incorreta. Seu uso indiscriminado eleva os custos de assistência médica, promove um excesso de efeitos colaterais e interações medicamentosas e ainda favorece o desenvolvimento de resistência microbiana, tornando inúteis fármacos que até então eram considerados valiosos (LONGO, et al., 2013).

Em alguns países, antimicrobianos são utilizados sem prescrição médica em até dois terços das situações. Mesmo quando formalmente prescritos, sua indicação pode ser desnecessária em até 50% dos casos. Embora sejam universalmente reconhecidos pela sua ausência de atividade antiviral, 80% dos pacientes com diagnóstico de infecção viral das vias respiratórias são tratados com terapia antimicrobiana. Além disso, o emprego ambulatorial de antimicrobianos concentra 80% do consumo humano, assim, a promoção do seu uso racional neste contexto é fundamental, uma vez que infecções causadas por bactérias comunitárias resistentes são de difícil tratamento e estão associadas a maior morbidade (MACGOWAN, 2008; COSTELLOE, 2010; OLIVEIRA; MUNARETTO, 2010).

A essência da terapia antimicrobiana é a inibição seletiva do crescimento do microrganismo sem causar danos ao hospedeiro. Isto é obtido explorando-se as diferenças entre o metabolismo e estrutura do microrganismo e as características correspondentes das células humanas (LEVINSON; JAWETZ, 2010).

Além da ação seletiva, um antimicrobiano ideal deve ser eficaz por via oral e parenteral, capaz de atingir o sítio de infecção, não produzir graves efeitos adversos e não induzir resistência do microrganismo. Contudo, é difícil encontrar um antimicrobiano ideal, de modo que, o fármaco de escolha é o que se adapta à realidade, levando em consideração as condições gerais do paciente, tratando-se do fármaco mais ativo, menos tóxico, de menor custo e que seja capaz de atingir o local da infecção (SILVA, 2015a).

Atualmente, todas as classes de antibióticos estão associadas ao desenvolvimento de resistência significativa em virtude da evolução e de práticas clínicas/ambientais. Diz-se que uma bactéria é resistente a um determinado antibiótico quando a mesma é capaz de crescer *in vitro* em presença da concentração inibitória que este fármaco atinge no sangue. Denomina-se resistência simples quando o microrganismo é resistente a um só fármaco; resistência múltipla quando é resistente simultaneamente a dois ou mais fármacos. Diz-se resistência cruzada quando o mecanismo bioquímico de resistência a um fármaco é o mesmo para outros (TAVARES, 2009).

O desenvolvimento da resistência pode acontecer em função de diversos fatores, tais como: acesso reduzido do fármaco ao patógeno, aumento da eliminação do fármaco por bombas de efluxo, liberação de enzimas microbianas que destroem o fármaco, alterações das proteínas microbianas que transformam os pró-fármacos em moléculas ativas, alterações de proteínas-alvos, desenvolvimento de vias metabólicas alternativas às que foram suprimidas pelo fármaco; pode-se incluir ainda a aquisição de elementos genéticos que codificam o mecanismo resistente, as mutações que ocorrem em decorrência da pressão exercida pelos antimicrobianos, ou a indução constitutiva (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010).

A terapia antimicrobiana com fármacos convencionais é efetiva no tratamento das infecções causadas por microrganismos, no entanto, a crescente descoberta de novos mecanismos de resistência microbiana, exige a contínua busca por novas soluções (OSTROSKY, 2009). De acordo com Santos (2012), a busca por fármacos com mecanismos de ação inéditos constitui uma trajetória importante para o sucesso da quimioterapia antibacteriana e antifúngica. Assim, a investigação da potencialidade antimicrobiana de produtos vegetais e compostos químicos sintéticos está em constante expansão.

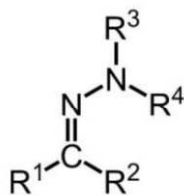
3.5 Compostos químicos sintéticos como fonte de novos fármacos

A Química Medicinal é responsável, entre outras atribuições, pela descoberta e desenvolvimento de novas substâncias químicas bioativas; síntese ou modificação molecular; extração, isolamento, identificação e elucidação estrutural de princípios ativos oriundos de plantas, animais ou minerais; compreensão, a nível molecular, de processos bioquímicos, toxicológicos e farmacocinéticos e a criação de relações entre estrutura química e atividade farmacológica (COSTA, 2015).

A pesquisa por novos fármacos que possam ser empregados como alternativas aqueles já consolidados no mercado caracteriza-se por sua complexidade, diante dos múltiplos fatores que envolvem o planejamento molecular de novas estruturas com potenciais efeitos farmacológicos, biodisponibilidade adequada ao seu emprego terapêutico, segurança e conforto (BARREIRO, 2002). Neste contexto, a busca por novos esqueletos carbônicos com estruturas privilegiadas tem sido uma das principais ferramentas da química medicinal.

Moléculas contendo a função hidrazona vêm sendo amplamente estudadas com o intuito de desenvolver novos e eficientes fármacos para as mais variadas enfermidades. As hidrazonas, descobertas em 1883 por Emil Fischer, são bases de Schiff pertencentes a uma classe de compostos caracterizada por conter o esqueleto $R_1R_2C=N-NR_3R_4$ (Figura 11) (CAXEIRO, 2007; PARRILHA, 2012). Esses compostos podem ser obtidos pela reação entre aldeídos ou cetonas com hidrazina apresentando aplicações químicas e farmacológicas (COSTA, 2015).

Figura 11 – Esqueleto hidrazônico



Fonte: Santos (2012)

Em geral, uma reação de condensação entre um aldeído ou uma cetona com uma hidrazina produz uma hidrazona, conforme esquema 1 (MARCH, 1992). Quando essa hidrazina é uma *N*-acilhidrazina (ou hidrazida), o produto é considerado uma *N*-acilhidrazona, de acordo com o esquema 2 (SUGIURA; KOBAYASHI, 2005).

Esquema 1. Reação geral de formação de uma hidrazona.

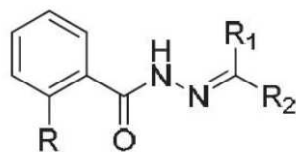


Esquema 2. Reação geral de formação de uma *N*-acilhidrazona.



A funcionalidade *N*-acilhidrazona (Figura 12) consiste no grupo farmacofórico de inúmeras substâncias, induzindo às atividades analgésica, anti-inflamatória, antimicrobiana, antiparasitária, anti-trombótica, antituberculose, antitumoral e outras (LIMA et al., 2000; ALMEIDA et al., 2002; ROLLAS; KÜÇÜKGÜZEL, 2007). Segundo Reddy et al. (2010), sua estrutura química apresenta uma gama de propriedades farmacológicas, podendo ser empregadas como modelos para o planejamento de candidatos a novos fármacos.

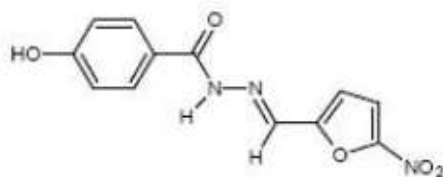
Figura 12 – Estrutura básica da função *N*-acilhidrazona.



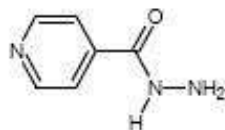
Fonte: Mota (2013)

Diante da necessidade de novos fármacos para o tratamento das mais variadas enfermidades, os derivados acilhidrazônicos surgem como prováveis moléculas para o desenvolvimento de novos e eficientes fármacos. Exemplos de moléculas conhecidas comercialmente são a nifuroxazida (Figura 13), princípio ativo de um medicamento indicado como antisséptico intestinal e a isoniazida (Figura 14), ativa contra todas as formas de tuberculose pulmonar (ROLLAS; KÜÇÜKGÜZEL, 2007; RAITZ, 2012). Seus derivados de hidrazona estão em estudo e testes *in vivo* são considerados promissores.

Figura 13 – Estrutura da nifuroxazida



Fonte: Rollas; Küçükgül (2007)

Figura 14 – Estrutura da isoniazida

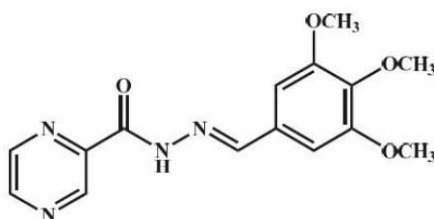
Fonte: Raitz (2012)

3.6 Propriedades biológicas das acilhidrazonas

Os derivados acilhidrazônicos destacam-se como uma importante classe de compostos químicos sintéticos por suas diversas propriedades biológicas (SILVA, 2015b). De acordo com Reis et al. (2011) substâncias que contêm em suas estruturas uma porção hidrazona têm sido relatadas na literatura como inibidoras da COX e 5-LOX, apresentando, portanto, pronunciadas atividades analgésica e anti-inflamatória.

Silva et al. (2010) demonstraram a atividade analgésica de derivados *N*-acilhidrazônicos empregando o modelo de contorção abdominal induzida por ácido acético em camundongos. Alguns dos compostos mostraram-se significativamente mais ativos do que os fármacos celecoxibe, indometacina, talidomida; utilizados como padrão para o teste.

Silva et al. (2014) demonstraram o potencial anti-inflamatório de uma série de *N*-acilhidrazonas, a exemplo do composto observado na figura 15. Os compostos não demonstraram toxicidade renal ou hepática nem atividade imunossupressora.

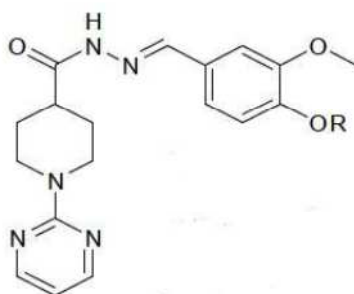
Figura 15 – Derivado acilhidrazônico com atividade anti-inflamatória

Fonte: Silva, et al. (2014)

No estudo de Rollas e Küçükgülzel (2007) foi verificado que o potencial antimicrobiano de um conjunto de hidrazonas derivadas do ácido 4-fluorbenzóico hidrazida. Essas substâncias inibiram o crescimento das bactérias *Staphylococcus aureus*, apresentando valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) na mesma faixa observada para o agente antibacteriano ceftriaxona.

Govindasami et al. (2011) estudaram a atividade antimicrobiana de derivados acilhidrazônicos, a exemplo do composto observado na figura 16, frente a uma cepa de *Pseudomonas aeruginosa* e *S. aureus*, onde estes compostos apresentaram inibição de até 12 mm/halo.

Figura 16 – Derivado acilhidrazônico com atividade antibacteriana

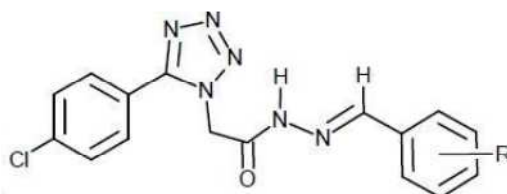


Fonte: Govindasami, et al. (2011)

Cachiba et al. (2012) avaliaram a sensibilidade bacteriana e fúngica de cinco derivados *N*-acilhidrazônicos pelo método de microdiluição seriada frente a seis microrganismos patogênicos (fungos *Candida albicans*, *C. krusei* e *C. tropicalis*, bactérias *S. aureus*, *Escherichia coli* e *P. aeruginosa*), com destaque para a atividade antifúngica de um dos derivados contra *C. krusei*, não responsiva ao antifúngico fluconazol e responsável por infecções significativas especialmente em pacientes imunocomprometidos.

A atividade antifúngica também já foi constatada em outro estudo para derivados acilhidrazônicos frente a diferentes espécies do gênero *Candida* sp., como o composto observado na figura 17 (MALIK; AL- THABAITI; MALIK, 2012).

Figura 17 – Derivado acilhidrazônico com atividade antifúngica



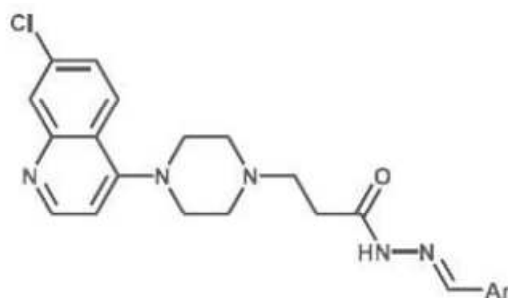
Fonte: Malik; Al-Thabaiti; Malik (2012)

Uma série de *N*-acilhidrazonas demonstraram ação inibitória do crescimento *in vitro* de formas epimastigotas do protozoário *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas, no estudo de Romeiro et al. (2009).

Inam et al. (2014), por sua vez, avaliou as propriedades antimalárica e amebicida de

diversos compostos derivados *N*-acilhidrazônicos, como o composto observado na figura 18 contra trofozoítos de *Plasmodium falciparum* resistentes à cloroquina e *Entamoeba histolytica*. Os agentes antimaláricos e amebicidas mais potentes e seletivos identificados no estudo inibiram, respectivamente, o crescimento plasmodial, assim como o ciclo de vida do parasita e apresentaram maior potência amebicida do que o metronidazol, tratamento de escolha, exibindo também menor citotoxicidade.

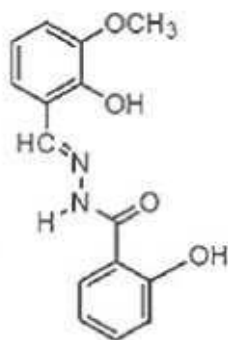
Figura 18 – Derivado acilhidrazônico com atividade antiparasitária



Fonte: Inam et al. (2014)

Rogolino et al. (2015) realizaram estudos *in vitro* para avaliação da atividade antiviral de compostos *N*-acilhidrazônicos, como o composto observado na figura 19, em culturas de células utilizando uma ampla variedade de vírus, incluindo o vírus da herpes, vaccinia, vírus da gripe humana e o vírus da imunodeficiência humana do tipo 1 e tipo 2 (HIV-1 e HIV-2). Os autores relataram atividade promissora contra o vírus da herpes simples e o vírus vaccinia.

Figura 19 – Derivado acilhidrazônico com atividade antiviral



Fonte: Rogolino et al. (2015)

Além das propriedades biológicas já mencionadas, podem ser citadas, estes derivados apresentam também as atividades tripanocida (CARVALHO et al., 2014), leishmanicida (HERNANDEZ et al., 2013), antimicobacteriana (LANNES, 2010), antitrombótica

(SATHLER et al., 2014), hipoglicêmica (FREDERICO et al., 2012), hipolipidêmica (MARQUES et al., 2015) e antiproliferativa de células tumorais (CONGIU; ONNIS, 2013).

Os derivados acilhidrazônicos se mostram como uma classe de compostos químicos sintéticos com propriedades biológicas promissoras. Algumas destas substâncias já se encontram em uso na terapêutica e outras surgem como prováveis líderes para o desenvolvimento de novos e eficazes fármacos contra as mais variadas enfermidades.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, V. M.; DE ALMEIDA, G. C.; DE ANDRADE, J. J.; GÓES, A. J. S.; LIMA, J. G.; CORREIA, C. R. D.; FARIA, A. R. Síntese de hidrazidas e *N*-acil-aryl-hidrazonas, potencialmente bioativas, derivadas do azabiciclopirrolidina [3,2-d]2-isoxazolina. In: **Anais da 25ª Reunião da Sociedade Brasileira de Química**, Poços de Caldas, 2002.

ÁVILA, R. M. D. **Planejamento síntese e avaliação farmacológica de derivados indano-hidrazônicos, candidatos a protótipos de fármacos anti-inflamatórios**. 2010. 110 f. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, 2010.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M.; MIRANDA, A. L. P.; RODRIGUES, C. R. A química medicinal de novos de *N*-acilidrazonas: novos compostos-protótipos de fármacos analgésicos, antiinflamatórios e anti-trombóticos. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 1, p. 129-148, 2002.

BASBAUM, A. I.; JULIUS, D. Novos alvos contra a dor. **Scientific American Brasil**, São Paulo, v.50, p.76-83, 2006.

BATLOUNI, M. Anti-inflamatórios não esteroides: efeitos cardiovasculares, cérebrosvasculares e renais. **Sociedade Brasileira de Cardiologia**, São Paulo, v. 94, n. 4, p. 556-563, 2010.

BRADLEY, S. A.; STEINERT, J. R. Nitric oxide-mediated posttranslational modifications: Impacts at the synapse. **Oxidative Medicine Cellular Longevity**, Austin, p. 1-9, 2016.

CACHIBA, T. H.; CARVALHO, B. D.; CARVALHO, D. T. CUSINATO, M.; PRADO, C. G.; DIAS, A. L. T. Síntese e avaliação preliminar da atividade antibacteriana e antifúngica de derivados *N*-acilidrazônicos. **Química Nova**, São Paulo, v. 35, n. 8, p. 1566-1569, 2012.

CAMARGO, A. B.; MANUCHA, W. Potencial rol protector del óxido nítrico y Hsp70 asociado a alimentos funcionales en la aterosclerosis. **Clínica e Investigación en Arteriosclerosis**, Barcelona, p. 1-10, 2016.

CARVALHO, A. M. R. **Estudo da atividade antinociceptiva e antiinflamatória da riparina II (O-metil-n-2-hidroxi-benzoil tiramina) em modelos experimentais**. 2011. 101 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia). Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2011.

CARVALHO, M. M. C. M. **Úlcera péptica: etiopatogenia, diagnóstico, aspetos clínicos e tratamento**. 2013. 74 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2013.

CARVALHO, S.A.; KAISER, M.; BRUN, R.; SILVA, E.F.; FRAGA, C.A. Antiprotozoal activity of (e)-cinnamic *N*-acylhydrazone derivatives. **Molecules**. New York, v. 19, n. 12, p. 20374-20381. 2014.

CASTRO, R. A. **Avaliação do potencial analgésico e anti-inflamatório do composto pirazólico 1,5-difenil-3-hidrazinopirazol (a)**. 2011. 93 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

- CAXEIRO, J. M. R. **Dialquilfosforilidrazonas e N,N'bis(diisobitilfosforiltoamida)diaminas: síntese, caracterização, modelagem molecular e estudo da atividade biológica**. 2007. Tese (Doutorado em Química Orgânica). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2007.
- CHIU, Y.; HUANG, T.; CHIU, C.; LU, T.; CHEN, Y.; PENG, W.; CHEN, C. Analgesic and antiinflammatory activities of the aqueous extract from *Plectranthus amboinicus* (Lour.) spreng, both in vitro and in vivo. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, Oxford, v. 2012, p. 1-11, 2011.
- CHOPADE, A. R.; MULLA, W. A. Novel strategies for the treatment of inflammatory hyperalgesia. **European Journal of Clinical Pharmacology**, Edelberga, v. 66, p. 429-444, 2010.
- CONGIU, C.; ONNIS, V. Synthesis and biological evaluation of novel acylhydrazonederivatives as potential antitumor agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Oxford, v. 21, p. 6592-6599, 2013.
- 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.
- COSTANZO, L. **Fisiologia**. 4 ed. Rio de Janeiro, Elsevier, p. 31-32, 2011.
- COSTELLOE, C. M. et al. Effect of antibiotic prescribing in primary care on antimicrobial resistance in individual patients: systematic review and metaanalysis. **British Medical Association**, London, v. 340, p. 2096, 2010.
- CRUVINEL, W. M.; MESQUITA-JÚNIOR, D.; ARAÚJO, J. A. P.; CATELAN, T. T. T.; SOUZA, A. W. S.; SILVA, N. P.; ANDRADE, L. E. C. Sistema imunitário – Parte I: Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista Brasileira de Reumatologia**, Rio de Janeiro, v. 50, n. 4, p. 434-461, 2010.
- DE BOSSCHER, K.; BECK, I. M.; HAEGEMAN, G. Classic glucocorticoids versus non-steroidal glucocorticoid receptor modulators: survival of the fittest regulator of the immune system? **Brain, Behavior, and Immunity**, São Diego, v. 24, n. 7, p. 1035-1042, 2010.
- DEJEAN C, RICHARD D. Mechanisms of action of glucocorticoids. **Revue de Medicine Interne**, Paris, v. 34, n. 5, p. 264-268, 2013.
- DUNDER, R. J. **Avaliação das atividades analgésica e anti-inflamatória da fração hexânica *Agave siusalana***. 2009. 89 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Funcional e Molecular). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.
- ERRANTE, P. R.; MENEZES-RODRIGUES, F. S.; TAVARES, J. G. P.; REIS, M. C. M.; ICIMOTO, M. Y.; FERRAZ, R. R. N.; CARICATI-NETO, A. Mecanismos de ação e resistência ao uso de glicocorticóides. **Revista de Pesquisa e Inovação Farmacêutica**, São Paulo, v. 6, n. 2, p. 01-11, 2014.
- FANTONI, D.T. **Tratamento da dor na clínica de pequenos animais**. 1. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011. 537 p.

- FEATHERSTONE D. E. Intercellular glutamate signaling in the nervous system and beyond. **ACS Chemical Neuroscience**, Washington, v. 1, p. 4-12, 2010.
- FERREIRA, S.H.; FERRARI, L.F.; CUNHA, T.M.; NASCIMENTO, P.G.B.D.; VERRI, W.A.; CUNHA, F.Q. **Dor inflamatória**. Disponível em: <<http://www.dol.inf.br/html/DorInflamatoria.html>> Acesso em mai. 2016.
- FRANCISCHETTI, I.; MORENO, J. B.; SCHOLZ, M.; YOSHIDA, S. M. Os leucócitos e a resposta inflamatória na lesão de isquemia-reperusão. **Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular**, São Paulo, v. 25, n.4, p.575-584, 2010.
- FREDERICO, M. J. S. CASTRO, A. J. G.; MASCARELLO, A.; MENDES, C. P.; KAPPEL, V. D.; STUMPF, T. R.; LEAL, P. C.; NUNES, R. J.; TUNES, R. A.; SILVA, F. R. M. B. Acylhydrazones contribute to serum glucose homeostasis through dual physiological targets. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, Hilversum, v. 12, p. 2049-2058, 2012.
- GOMES, A.; FERNANDES, E.; SILVA, A. M.; PINTO, D. C.; SANTOS, C. M.; CAVALEIRO, J. A.; LIMA, J. L. Anti-inflammatory potential of 2-styrylchromones regarding their interference with arachidonic acid metabolic pathways. **Biochemical Pharmacology**, Boston, v. 78, p. 171-177, 2009.
- GONÇALVES, J. F. **Controlo de sintomas no cancro avançado**. 2. ed. Lisboa: Coisas de ler, 2011. 231 p.
- GOODMAN, S. L.; GILMAN, G. A. **Manual de farmacologia e terapêutica de Goodman e Gilman**. 2. ed. Porto Alegre: AMGH, 2015. 1204 p.
- GOVINDASAMI, T.; PANDEY, A.; PALANIVELU, N.; PANDEY, A. Synthesis, characterization and antibacterial activity of biologically important vanillin related hydrazone derivatives. **International Journal of Organic Chemistry**, London, v. 1, p. 71-77. 2011.
- GRASSI, E. A.; ARAÚJO, M. C. Antiplatelet: growing knowledge. **Disciplinarum Scientia**, Santa Maria, v. 13, n. 1, p. 131-143, 2012.
- GUERREIRO, R.; SANTOS-COSTA, Q.; AZEVEDO-PEREIRA, J. M. As quimiocinas e os seus receptores, **Acta Médica Portuguesa**, Lisboa, v. 24, n. 4, p. 967-976, 2011.
- GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 3, p. 667-679, 2010.
- HERNÁNDEZ, P.; ROJAS, R.; GILMAN, R. H.; SAUVAIN, M.; LIMA, L. M.; BARREIRO, E. J.; GONZÁLEZ, M.; CERECETTO, H. Hybrid furoxanyl *N*-acylhydrazone derivatives as hits for the development of neglected diseases drug candidates. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Paris, v. 7, n. 59C, p. 64-74. 2013.
- INAM, A.; SIDDIQUI, S. M.; MACEDO, T. S.; MOREIRA, D. R. M.; LEITE, A. C. L.; SOARES, M. B. P.; AZAM, A. Design, synthesis and biological evaluation of 3-[4-(7-chloroquinolin-4-yl)-piperazin-1-yl]-propionic acid hydrazones as antiprotozoal agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Paris, v. 75, p. 67-76, 2014.

- JOSÉ, F. F. O papel dos anti-inflamatórios não hormonais no tratamento da dor musculoesquelética. **Jornal Brasileiro de Medicina**, v. 102, n. 5, p. 24-26, 2014.
- KAM, P. C. A.; SO, A. COX-3: uncertainties and controversies. **Current Anaesthesia & Critical Care**, v. 20, p. 50-53, 2009.
- KATZUNG, B. G. **Farmacologia básica e clínica**. 12. ed. Porto Alegre: AMGH, 2014. 1242 p.
- KLOPCIC, I; POBERZNIK, M.; MAVRI, J.; DOLENC, M. S. A quantum chemical study of the reactivity of acetaminophen (paracetamol) toxic metabolite *N*-acetyl-*p*-benzoquinone imine with deoxyguanosine and glutathione. **Chemico-Biological Interactions**, Amsterdam, 242, p. 407-414, 2015.
- KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; ASTER, J. C. **Patologia básica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013. 928 p.
- KUMMER, C. L.; COELHO, T. C. R. B. Antiinflamatórios não esteróides inibidores da ciclooxigenase-2 (COX-2): aspectos atuais. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, Campinas, v. 52, n. 4, p. 498-512, 2002.
- LANNES, A. C. **Cepas bacterianas: susceptibilidade a derivados da classe acilhidrazona em amostras do Hospital Universitário Antônio Pedro**. 2010. Dissertação (Mestrado em Patologia). Universidade Federal Fluminense, Niterói. 2010.
- LEO, L. M. **Papel da lipoxina A4 na fisiologia do sistema nervoso central e no dano cognitivo associado à neuroinflamação**. 2015. 78 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular). Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2015.
- LEVINSON, W.; JAWETZ, E. **Microbiologia Médica e Imunologia**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 632 p.
- LIMA, P. C.; LIMA, L. M.; DA SILVA, K. C. M.; LÉDA, P. H. O.; MIRANDA, A. L. P; FRAGA, C. A. M.; BARREIRO, E. J. Synthesis and analgesic activity of novel *N*-acylarylhydrazones and isosters, derived from natural safrole. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Paris, v. 35, p. 187-203, 2000.
- LINLEY, J. E.; ROSE, K.; OOI, L.; GAMPER, N. Understanding inflammatory pain: ion channels contributing to acute and chronic nociception. **European Journal of Physiology**, v.459, p. 657–669, 2010.
- LINO, R. C. **Estudos dos mecanismos envolvidos nos efeitos analgésico e antiinflamatório de dois candidatos a protótipos de fármacos - LQFM 002 e 015**. 2011. 85 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2011.
- LONGO, D. L.; FAUCI, A. S.; KASPER, D. L.; HAUSER, S. L.; JAMESON, J. L.; LOSCALZO, J. **Medicina interna de Harrison**. 18. ed. Porto Alegre: AMGH, 2013. 4016 p.
- MACGOWAN, A. Clinical implications of antimicrobial resistance for therapy. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Oxford, v. 62, n. 2, p. 105-114, 2008.

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

MARCH, J. **Advanced organic chemistry: reactions, mechanisms and structure**. 4th. ed. New York: John Wiley & Sons, 1992. 1495 p.

MARQUES, E. B.; MOTTA, N. A V.; KUMMERLE, A. E.; FRAGA, C. A. M.; BARREIRO, E. J.; BRITO, F. C. F.; SCARAMELLO, C. B. V. In vivo effect of LASSBio-785, a lipid-lowering and anti-inflammatory agent, on cardiac Ca²⁺-ATPases from hypercholesterolemic rats. **International Journal of Cardiology**, Amsterdam, v. 201, p. 282-284, 2015.

MATEUS, A. F. G. **O uso clínico dos anti-inflamatórios não esteróides**. 2014. 48 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2014.

MAZZEI, L.; DOCHERTY, N. G.; MANUCHA, W. Mediators and mechanisms of heat shock protein 70 based cytoprotection in obstructive nephropathy. **Cell Stress Chaperones**, New York, v. 20, p. 893-906, 2015.

MENDES, C. C. B. **Síntese e avaliação das atividades antinociceptiva e antichagásica de hidrazonas e semicarbazona derivadas do novo heterociclo pirrolidina[1,2-d][1,2,4]- 2-oxadiazolina**. 2010. 107 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2010.

MOFFAT, R.; RAE, C. Anatomy, physiology and pharmacology of pain. **Anesthesia and Intensive Care Medicine**, Abingdon, v. 12, n. 1, p. 12-15, 2010.

MONTEIRO, E. C. A.; TRINDADE, J. M. F.; DUARTE, L. B. P.; CHAHADE, W. H. Os anti-inflamatórios não esteroidais (AINES). **Temas de Reumatologia Clínica**, São Paulo, 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.

OLIVEIRA, C. M. B.; SAKATA, R. K.; ISSY, A. M.; GEROLA, L. R.; SALOMÃO, R. Citocinas e dor. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, Campinas, v. 61, n. 2, p. 255-265, 2011.

OLIVEIRA, C.M.B.; ISSY, A.M.; SAKATA, R.K. Fisiopatologia da dor pós operatória. **Revista Brasileira de Medicina**, São Paulo, v. 11, n. 67, p.415-418, 2010.

OLIVEIRA, K. R.; MUNARETTO, P. Uso racional de antibióticos: responsabilidade de prescritores, usuários e dispensadores. **Contexto & Saúde**, Ijuí, v. 9, n. 18, p. 43-51, 2010.

OSTROSKY, E. A. **Avaliação da eficácia e segurança do extrato de folhas de *R. rosaefolius* Sm. visando a aplicação como conservante em produtos cosméticos**. 2009. 174 f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

PARRILHA, G. L. **Complexos metálicos de hidrazonas, tiossemicarbazonas e lapachol: atividades farmacológicas e relações de estrutura-atividade**. 2012. 154 f. Tese (Doutorado em Química). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012.

PASTORINO, A. C. Revisão sobre a eficácia e segurança dos anti-histamínicos de primeira e segunda geração. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**, São Paulo, v. 33, n. 3, p. 88-92, 2010.

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

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**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012. 808 p.

REDDY, L.V.; SUMAN, A.; BEEVI, S. S. MANGAMOORI, L. N.; MUKKANTI, K.; PAL, S. Design and synthesis of 1-aryloyl-2-ylidene hidrazines under conventional and microwave irradiation conditions and their cytotoxic activities. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v.21, n.1, p.98-104, 2010.

REIS, S. L. G. B.; ALMEIDA, V. M.; ALMEIDA, G. C. BOAVIAGEM, K. M.; MENDES, C. C. B.; FARIA, A. R.; GOÉS, A. J. S.; MAGALHÃES, L. R.; DA SILVA, T. G. Síntese e avaliação preliminar da atividade antinociceptiva de novas isoxazolil-aril-hidrazonas. **Química nova**, São Paulo v.34, n.1, p.76-81, 2011.

ROGOLINO, D.; CARCELLI, M.; BACCHI, A.; COMPARI, C.; CONTARDI, L.; FISICARO, E.; GATTI, A.; SECHI, M.; STEVAERT, A.; NAESSENS, L. A versatile salicylhydrazonic ligand and its metal complexes as antiviral agents. **Journal of Inorganic Biochemistry**, New York, v. 150, p. 9-17, 2015.

ROLLAS, S.; KÜÇÜKGÜZEL, G. Biological activities of hydrazone derivatives. **Molecules**, New York, v. 12, p. 1910-1939, 2007.

ROMEIRO, N. C.; AGUIRRE, G.; HERNÁNDEZ, P.; GONZÁLEZ, M.; CERECETTO, H.; ALDANA, I.; PÉREZ-SILANES, S.; MONGE, A.; BARREIRO, E. J.; LIMA, L. M.; Synthesis, trypanocidal activity and docking studies of novel quinoxaline-N-acylhydrazones, designed as cruzain inhibitors candidates. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Oxford, v. 17, n. 2, p. 641-652, 2009.

SANSBURY, B. E.; CUMMINS, T. D.; TANG, Y.; HELLMANN, J.; HOLDEN, C. R.; HARBESON, M. A.; CHEN, Y.; PATEL, R. P.; SPITE, M.; BHATNAGAR, A.; HILL, B. G. Overexpression of endothelial nitric oxide synthase prevents diet-induced obesity and regulates adipocyte phenotype. **Circulation Research**, New York, v. 111, p.1176-1189, 2012.

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.

SARZI-PUTTINI, P.; ATZENI, F.; LANATA, L.; BAGNASCO, M.; COLOMBO, M.; FISCHER, F. D'IMPORZANO, M. Pain and ketoprofen: what is its role in clinical practice? **Reumatismo**, Milão, v. 62, n.3, p.172-188, 2010.

SATHLER, P. C.; LOURENÇO, A. L.; RODRIGUES, C. R.; DA SILVA, L. C. R. P.; CABRAL, L. M.; JORDÃO, A. K.; CUNHA, A. C.; VIEIRA, M. C. B.; FERREIRA, V. F.; CARVALHO-PINTO, C. E.; KANG, H. C.; CASTRO, H. C. In vitro and in vivo analysis of the antithrombotic and toxicological profile of new antiplatelets *N*-acylhydrazone derivatives and development of nanosystems: determination of novel NAH derivatives antiplatelet and nanotechnological approach. **Thrombosis Research**, Oxford, v. 134, p. 376-383, 2014.

SILVA, M. F. **Escherichia coli e a resistência antibiótica**: Uma análise do padrão de evolução da resistência da *Escherichia coli* aos antibióticos no distrito de Castelo Branco. 2009. 22 p. Dissertação (Mestrado em Medicina). Universidade da Beira Interior, Covilhã, 2009.

SILVA, M. G. **Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato aquoso de *Allium sativum* contra cepas bacterianas resistentes de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* isoladas no hospital geral público de Palmas – TO**. 2015. 37 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia). Centro Universitário Luterano de Palmas, Palmas, 2015a.

SILVA, S. C. **Caracterização farmacológica pré-clínica da atividade anti-inflamatória de novos derivados *N*-acilhidrazônicos**. 2015. 87 f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2015b.

SILVA, Y. K. C.; AUGUSTO, V. V.; DE CASTRO BASBOSA.; MELO, G. M. A.; QUEIROZ, A. C.; DIAS, T. L. M. F.; BISPO JÚNIOR, W.; BARREIRO, E. J.; LIMA, L. M.; ALEXANDRE-MOREIRA, M. S. Synthesis and pharmacological evaluation of pyrazine *N*-acylhydrazone derivatives designed as novel analgesic and anti-inflammatory drug candidates. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Oxford, v. 18, p. 5007-5015, 2010.

SILVA, Y. K.; REYES, C. T.; RIVERA, G.; ALVES, M. A.; BARREIRO, E. J.; MOREIRA, M. S.; LIMA, L. M. 3-aminothiophene-2-acylhydrazones: non-toxic, analgesic and anti-inflammatory lead-candidates. **Molecules**. New York, v. 19, n. 6, p. 8456-71, 2014.

SOMMER, C.; WHITE, F. Cytokines, Chemokines, and Pain. **Pharmacology of Pain**. 1th ed., Seattle, IASP Press, p. 279-302, 2010.

SOUZA, J. B. Poderia a atividade física induzir analgesia em pacientes com dor crônica? **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**. São Paulo, v. 15, n. 2, p. 145-150, 2009.

SUGIURA, M.; KOBAYASHI, S. *N*-Acylhydrazones as versatile electrophiles for the synthesis of nitrogen-containing compounds. **Angewandte Chemie International Edition**, Weinheim, v. 44, p. 5176-5186, 2005.

TAVARES, W. **Antibióticos e quimioterápicos para o clínico**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2009.

VALLI, L. G.; SOBRINHO, J. A. Mecanismo de ação do glutamato no sistema nervoso central e a relação com doenças neurodegenerativas. **Revista Brasileira de Neurologia e Psiquiatria**, Rio de Janeiro, v. 18, n. 1, p. 58-67, 2014.

VECHIA, L. D.; GNOATTO S. C. B.; GOSMANN, G. Derivados oleananos e ursanos e sua importância na descoberta de novos fármacos com atividade antitumoral, anti-inflamatória e antioxidante. **Quimica Nova**, São Paulo, vol. 32, n. 5, p. 1245-1252, 2009.

VONKEMAN, H. E.; LAAR, M.A.F.J. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs: adverse effects and their prevention. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, Nova York, v. 39, p. 294-312, 2010.

WOOLF, C. Central sensitization: implications for the diagnosis and treatment of pain. **Pain**, Amsterdam, v. 152, n.3, p. 3, 2011.

ZHANG, C. The role of inflammatory cytokines in endothelial dysfunction. **Basic Research in Cardiology**, Darmstadt, v. 103, n. 5, p. 398-406, 2008.

ZHANG, X.; CAO, J.; ZHONG, L. Hydroxytyrosol inhibits pro-inflammatory cytokines, iNOS, and COX-2 expression in human monocytic cells Naunyn-Schmied. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, Edelberga, v. 379, p. 581-586, 2009.

Capítulo 1

*Elucidación estructural e avaliação do potencial biológico de novos derivados
N-acilhidrazônicos*

1 INTRODUÇÃO

A pesquisa por novos fármacos tem motivado a realização de estudos através de ensaios experimentais a fim de fornecer evidências científicas da eficácia de diversas substâncias, comprovando a sua ação e validando o seu uso. Além de estabelecerem um campo abundante de conhecimentos científicos, os estudos direcionados à atividade biológica podem contribuir notavelmente para o aprimoramento da medicina.

A funcionalidade *N*-acilhidrazona tem sido relatada como o grupo farmacofórico de compostos com uma ampla variedade de propriedades biológicas, incluindo a anti-inflamatória, analgésica e antimicrobiana (GOVINDASAMI et al., 2011; MALIK; AL-THABAITI; MALIK, 2012; SILVA et al., 2014).

Considerando os danos gastrointestinais e a nefrotoxicidade associada ao uso prolongado dos AINEs, torna-se obrigatório o desenvolvimento de novos agentes analgésicos e anti-inflamatórios (HERNÁNDEZ et al., 2013). Além disso, o decréscimo constante observado no número total de novos antimicrobianos aprovados pelo Food and Drug Administration (FDA); demonstra a necessidade de fármacos que atuem por mecanismos de ação inéditos (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010).

Com o intuito de investigar novos agentes mais seguros e potentes para o tratamento de doenças inflamatórias e infecciosas, este estudo propôs-se a avaliar derivados *N*-acilhidrazônicos em modelos animais de dor e inflamação, bem como avaliar o potencial antimicrobiano *in vitro* sobre microrganismos clinicamente importantes.

2 MATERIAIS

2.1 Obtenção dos compostos *N*-acilhidrazônicos acridínicos substituídos

Os compostos *N*-acilhidrazônicos *N'*-2-ciano-(4-(metilsulfonil-benzilideno)-acetohidrazida (JR04), *N*-benzylidene-2-cyanoacetohydrazide (JR09) e *N'*-(1*H*-indol-3yl)metileno)-2-cianoacetohidrazida (JR19) foram sintetizados e cedidos pelo Laboratório de Síntese e Vetorização Molecular (LSVM) ligado a UEPB, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Ricardo Olímpio de Moura, de acordo com as técnicas desenvolvidas e padronizadas por este laboratório. As metodologias referentes à obtenção desses compostos encontram-se descritos no Trabalho de Conclusão de Curso de Moura (2016).

2.2 Substâncias

- Água destilada;
- Solução salina estéril (NaCl 0,9%);
- Resazurina (Sigma Aldrich®, USA);
- Indometacina (Sigma Aldrich®, USA);
- Carragenina (Sigma Aldrich®, USA);
- Formalina;
- Heparina sódica 5.000 UI/ml (Cristália®);
- Cloridrato de quetamina (Vetbrands®);
- Cloridrato de xilazina (Vetbrands®);
- Meios de cultura para bactérias: Blood Agar Base (BAB), Agar Manitol Salgado (AMS), Agar Mueller-Hinton (AMH), Caldo Brain Heart Infusion (BHI) e Caldo Mueller-Hinton (CMH), todos de marca Difco®.
- Meios de cultura para leveduras: Agar Sabouraud Dextrose – ASD (Difco), Caldo Sabouraud – CS (Difco®).

2.3 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, ciclo claro-escuro de 12 horas e comida e água *ad libitum*.

2.4 Linhagens microbianas

As linhagens selecionadas foram: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Candida albicans* ATCC 76645, *Candida tropicalis* ATCC 13803 e *Candida crusei* ATCC 40147. Essas linhagens foram estocadas e mantidas em meios de culturas apropriados, de acordo com as recomendações do fornecedor.

3 MÉTODOS

3.1 Local da pesquisa

Os testes farmacológicos foram realizados no Laboratório de Ensaios Farmacológicos e as atividades antimicrobianas no Laboratório de Pesquisa Antimicrobiana, ambos na Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), em Campina Grande – PB.

3.2 Procedimentos éticos

Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Uso de Animais (CEUA) do Centro de Ensino Superior e Desenvolvimento (CESED), sob o nº 5905022016 (Anexo 1) e conduzidos de acordo com as diretrizes éticas propostas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

3.3 Caracterização dos compostos *N*-acilhidrazônicos acridínicos substituídos

3.3.1 Características físico-químicas e elucidação estrutural

Após a síntese dos compostos foi realizada a caracterização físico-química dos mesmos sendo avaliado: solubilidade (por meio de solventes como clorofórmio e acetato de etila destilado), aparência, cálculo de fator de retenção (R_f) – por meio de cromatografia de camada delgada analítica (CCDA), faixa de fusão (F.F) – através do aparelho Quimis Modelo Q-340M, rendimento (%), peso molecular (P.M), fórmula molecular e coeficiente de partição teórico ($\log P$) através do programa ChemDraw Ultra 12.0. E por último, todos os compostos tiveram suas estruturas elucidadas através de espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e de Carbono (RMN de ^1H e RMN de ^{13}C DEPT-Q) através do aparelho Bruker Avance Spectrometer (AC-400 ou AC-500). (500 MHz para ^1H e 125 MHz para ^{13}C). Os espectros de IV foram obtidos através da leitura dos discos de KBr+compostos em Espectrofotômetro de FTIR, IRPrestige-21, da Shimadzu®, com os dados tratados com auxílio do software Origin 8.0.

3.3.2 Análise termogravimétrica (TGA)

As curvas termogravimétricas foram obtidas utilizando-se um analisador simultâneo TG/DTA/DSC, modelo STD Q600 (TA Instruments), utilizando-se cadinho de alumina contendo amostras de $5,00 \pm 0,05$ mg, em atmosfera de nitrogênio, sob um fluxo 50 mL min^{-1} , em temperaturas de 25 a 900°C , vazão de aquecimento de $10^\circ\text{C min}^{-1}$.

3.4 Preparo da diluição das substâncias em estudo

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

Para a realização dos testes de atividade antimicrobiana, as substâncias foram diluídas, inicialmente, em tubo estéril, de forma a obter uma concentração de 2000 µg/mL:

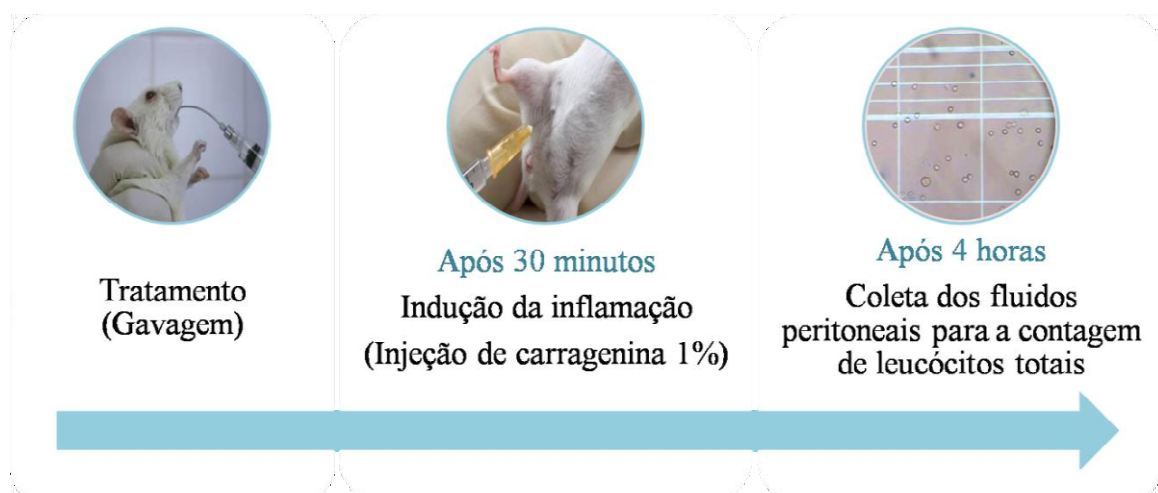
- Pesou-se 0,02 g da substância em estudo;
- Solubilizou-se em 10 mL de solução salina estéril;
- Em seguida, a mistura foi colocada em banho de ultrassom a 26°C por 5 minutos.

3.5 Avaliação do potencial anti-inflamatório

3.5.1 Peritonite induzida por carragenina

A fim de realizar um *screening* da atividade anti-inflamatória, camundongos (grupo n=5) em jejum prévio de 6 horas, foram tratados por via oral com veículo (salina, 10 mL/kg) e os compostos em estudo, JR04 (10 e 20 mg/kg), JR09 (20 mg/kg), e JR19 (10 e 20 mg/kg). Após 30 minutos, foi injetada 0,25mL de carragenina a 1% 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 abdomen 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 (Figura 20). 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.

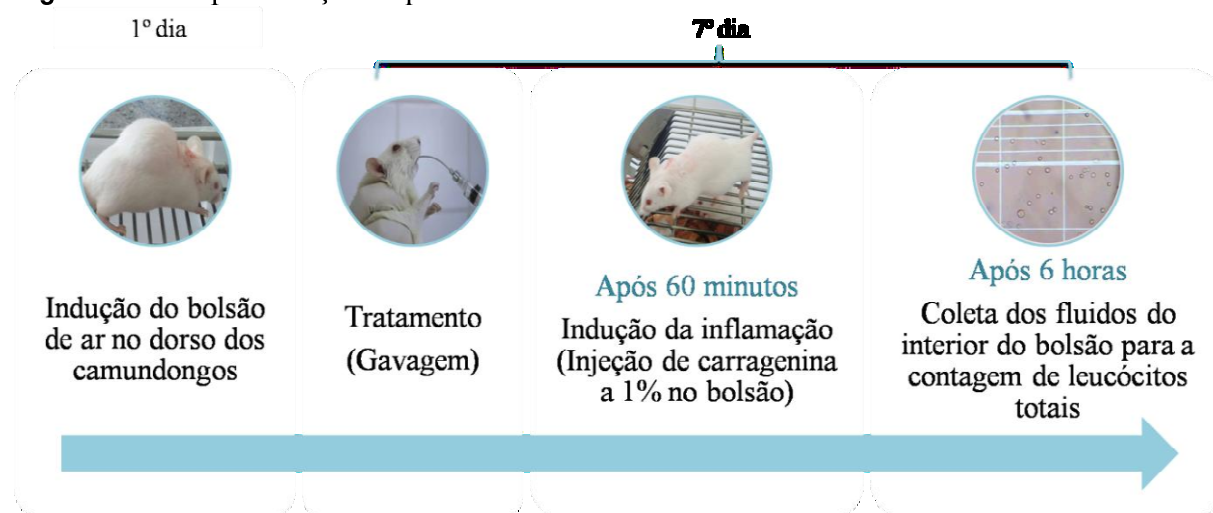
Figura 20 – Representação esquemática do modelo de peritonite induzida por carragenina



3.5.2 Bolsão de ar subcutâneo

A indução de uma bolsa de ar no dorso de camundongos (grupo n=6) foi feita através da injeção de ar estéril. No primeiro dia injetou-se 2,5 mL de ar estéril no dorso do animal, em jejum prévio de 4 horas, repetindo-se o procedimento após 72 horas. No sétimo dia do ensaio os animais (jejum prévio de 12 horas) receberam, por via oral, veículo (salina, 10 mL/kg), indometacina (10 mg/kg), JR04 (10 mg/kg), JR09 (10 mg/kg) e JR19 (10 mg/kg). Para indução da inflamação foi injetado 1,0 mL de uma solução de carragenina a 1% dentro da bolsa de ar uma hora após a administração dos compostos. Decorridas 6 horas após a aplicação do agente flogístico, os animais foram sacrificados com éter, em virtude da localização do bolsão de ar no dorso dos camundongos o que impede o seu sacrifício por deslocamento cervical, e as bolsas lavadas com 3,0 mL de solução tampão fosfato (PBS pH 7.2) contendo heparina como líquido de arraste. A contagem de leucócitos totais foi realizada em câmara de Neubauer, sob microscopia óptica (Figura 21). 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.

Figura 21 – Representação esquemática do modelo do bolsão de ar subcutâneo

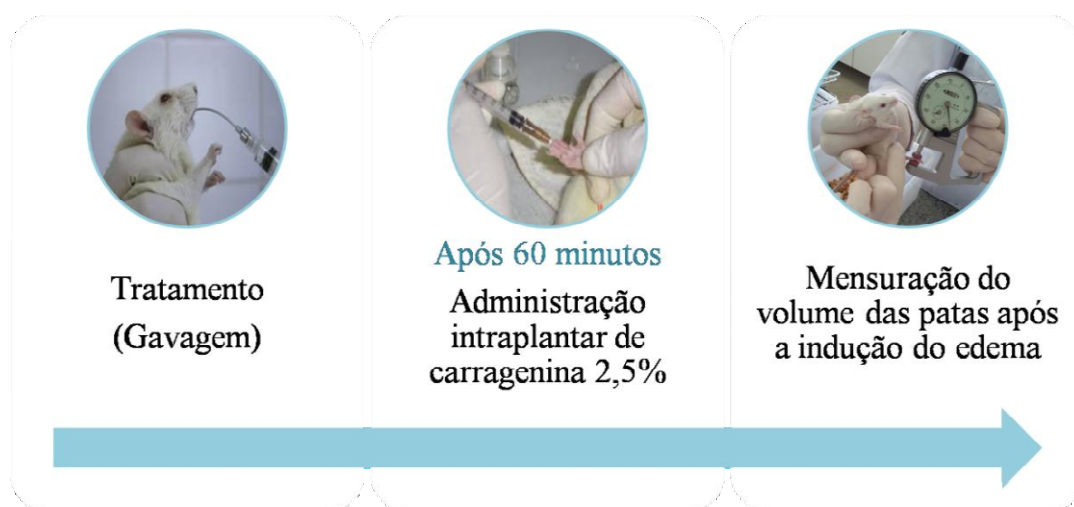


3.5.3 Edema de pata induzido por carragenina

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 de qualquer substância. Posteriormente, foram administradas salina (10 mL/kg), indometacina (10 mg/kg), JR04 (10 mg/kg), JR09 (10 mg/kg) e JR19 (10 mg/kg), 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 (Figura 22). Os resultados foram apresentados como a variação do volume da pata (mL) em relação aos valores basais. Foram coletadas amostras de sangue com gel separador para obtenção do soro, destinado à dosagem de PCR ultrasensível (Bioclin®) em aparelho Metrolab 2300®, por imunoturbidimetria.

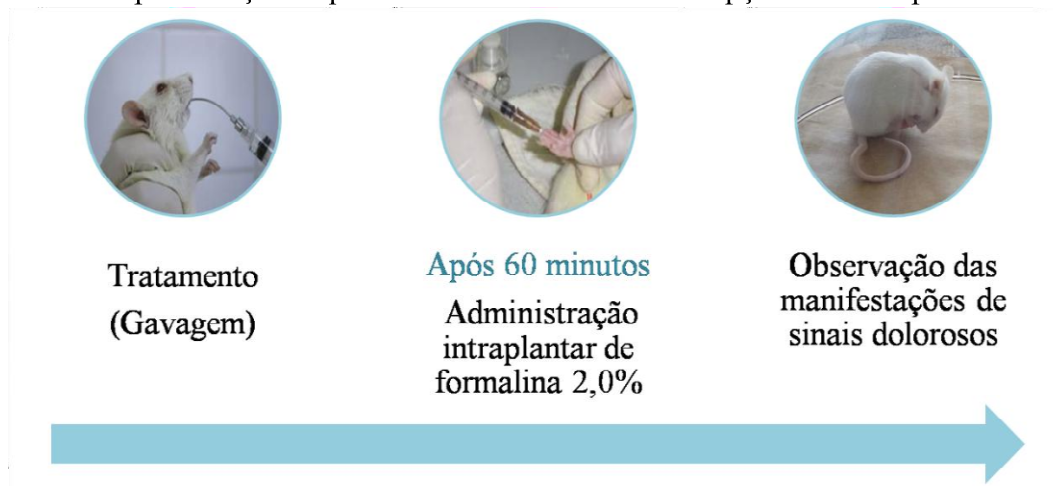
Figura 22 – Representação esquemática do modelo do edema de pata induzido por carragenina



3.6 Avaliação do potencial antinociceptivo

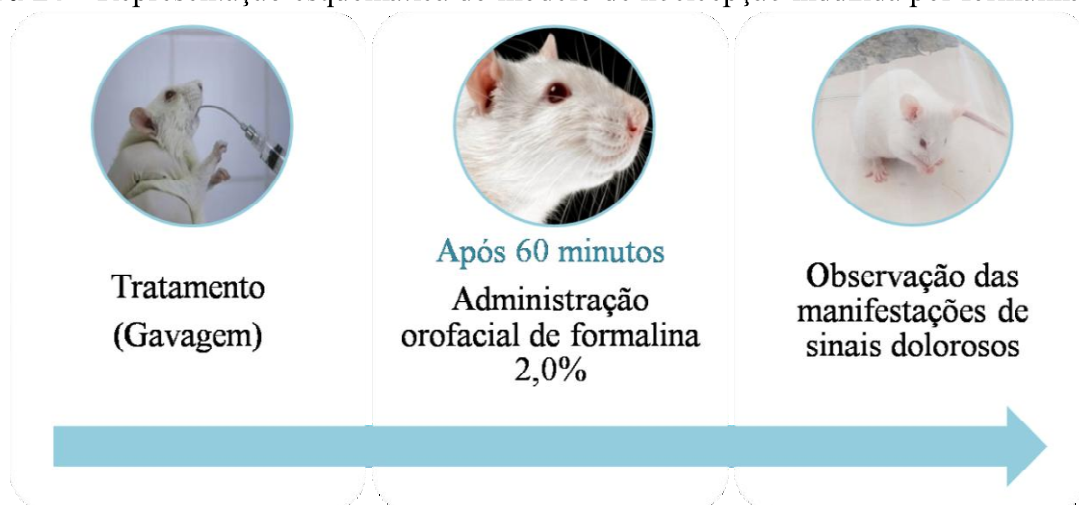
3.6.1 Nocicepção induzida por formalina

Camundongos em jejum prévio de 8 horas (grupo n=6) foram tratados oralmente com salina (10 mL/kg), indometacina (10 mg/kg), JR04 (10 mg/kg), JR09 (10 mg/kg) e JR19 (10 mg/kg). Após 60 minutos, foi administrado 20 μ L de solução de formalina a 2,0% sob o coxim plantar da pata traseira direita. Imediatamente após, foi cronometrado o tempo, em segundos, que os animais manifestaram sinais dolorosos com diferentes comportamentos: elevação da pata, lambidas, mordidas, balanço da pata injetada, redução do peso em cima da pata (Figura 23). A redução desses comportamentos é interpretada como um efeito antinociceptivo. Com base no padrão de respostas foi possível estabelecer dois períodos: primeira fase, primeiros cinco minutos e segunda fase, quinze a trinta minutos após a injeção, que estavam respectivamente relacionados à fase neurogênica e fase inflamatória. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão de cada grupo experimental, em segundos.

Figura 23 – Representação esquemática do modelo de nocicepção induzida por formalina

3.6.2 Dor orofacial induzida por formalina

Camundongos em jejum prévio de 8 horas (grupo $n=6$) foram tratados oralmente com salina (10 mL/kg), indometacina (10 mg/kg), JR04 (10 mg/kg), JR09 (10 mg/kg) e JR19 (10 mg/kg). Após 1 hora, a solução de formalina (2,0% em salina 0,9%) foi administrada no lábio superior direito (área perinasal), em volume de 20 μ L (QUINTANS-JÚNIOR et al., 2010), os camundongos foram observados e o tempo gasto friccionando a área injetada com as patas posteriores e/ou anteriores foi mensurado durante 5 minutos (primeira fase, dor neurogênica) e entre 15-30 minutos após a injeção de formalina (segunda fase, dor inflamatória) (Figura 24). As principais respostas comportamentais características da dor e observadas durante a execução deste modelo experimental são: medida do tempo ou dos reflexos de autolimpeza (*grooming*) direcionados ao local da injeção de formalina, vocalização espontânea, tremores vigorosos do corpo (*shaking*) associados ao ato de lamber as patas dianteiras e proteger vigorosamente a face e trismo mandibular (PERLA, 2007; SILVA, 2013).

Figura 24 – Representação esquemática do modelo de nocicepção induzida por formalina

3.7 Avaliação da toxicidade

3.7.1 Teste de toxicidade aguda

O teste de toxicidade aguda foi realizado utilizando-se 24 camundongos, correspondendo a 4 grupos de 6 animais (12 machos e 12 fêmeas), em jejum prévio de 12 horas. Os grupos controles foram tratados, com o veículo e os grupos teste foram tratados com 100 mg/Kg de JR09, por via oral (gavagem). Posteriormente, foi realizado o teste de toxicidade aguda do composto JR19. 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) (Anexo 2). 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 (Figura 25) (CUNHA et al., 2013, com adaptações).

Figura 25 – Representação esquemática do teste de toxicidade aguda

3.7.2 Determinação dos parâmetros hematológicos

Os parâmetros hematológicos dos camundongos tratados com JR19 100 mg/kg foram obtidos em um analisador automático. Com as amostras de sangue dos tubos contendo anticoagulante foram determinados os valores para leucócitos, hemácias, hemoglobina, hematócrito, plaquetas e índices hematimétricos de volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM).

3.7.3 Determinação dos parâmetros bioquímicos

Os parâmetros bioquímicos dos camundongos tratados com JR19 100 mg/kg foram determinados utilizando-se kits específicos. As amostras de sangue coletadas com o gel separador foram centrifugadas por 10 minutos a 3500rpm, para obtenção do soro, destinado às dosagens dos seguintes parâmetros: glicose, colesterol, triglicerídeos, HDLplus, proteínas, albumina, creatinina, ácido úrico e ureia.

3.8 Avaliação da atividade antimicrobiana por disco-difusão

Realizou-se um *screening* da atividade antimicrobiana dos compostos JR04, JR09 e JR19 pelo método de disco-difusão em meio sólido.

Preparo do inóculo

As linhagens selecionadas foram semeadas em meios de culturas apropriados após reativação em BHI, em $35\pm 2^{\circ}\text{C}/24$ hs de incubação. Os inóculos foram preparados e padronizados em solução salina estéril com turbidez equivalente ao tubo nº 0,5 da escala McFarland, com concentração em cerca de 10^6 UFC/mL (CLSI, 2015).

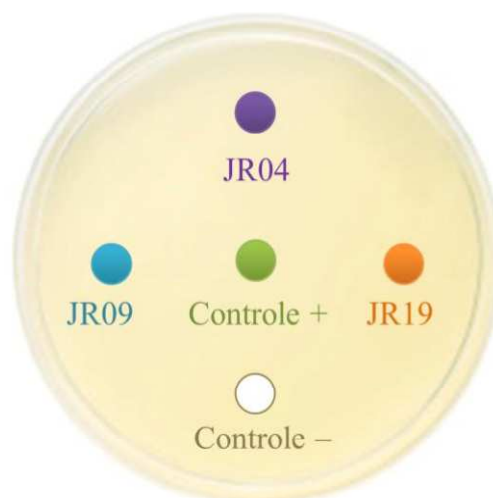
Inoculação

A inoculação foi realizada semeando a suspensão microbiana com auxílio de *swab* estéril em toda a superfície do ágar, de forma a obter um crescimento uniforme e confluyente.

Os discos de papel, previamente impregnados com 50 μL das soluções em estudo, foram dispostos equidistantes sobre a superfície do ágar de modo a não sobrepor as zonas de inibição (Figura 26). As placas foram incubadas por 24 hs a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ para as linhagens bacterianas e por 48hs a $30\pm 2^{\circ}\text{C}$ para as linhagens fúngicas. A leitura foi realizada após este período, verificando a presença ou ausência de halos de inibição de crescimento. O diâmetro dos halos (mm) foi medido com auxílio de um halômetro.

Os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados expressos pela média aritmética dos diâmetros dos halos de inibição de crescimento. Os produtos testados foram considerados ativos, ou seja, com atividade biológica quando a média dos halos de inibição foi igual ou superior a 8 mm de diâmetro para bactérias e 10 mm para leveduras (CATÃO et al., 2010).

Figura 26 – Representação esquemática do método de disco-difusão



Legenda: JR04 [1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$], JR09 [1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$], JR19 [1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$], controle + = Gentamicina [120 μg], controle - = Solução salina (NaCl 0,9%)

3.9 Avaliação da atividade antimicrobiana por microdiluição

3.9.1 Determinação da atividade antibacteriana

Preparo do inóculo

O inóculo foi preparado fazendo-se uma suspensão direta a partir de uma cultura jovem (24hs) utilizando colônias isoladas e selecionadas que foram diluídas em solução salina estéril (NaCl 0,9%). A suspensão bacteriana foi ajustada comparando-se ao tubo 0,5 da escala de McFarland, que deve conter aproximadamente 10^8 UFC/mL. De acordo com o CLSI (2015), o inóculo bacteriano para a realização dos testes por microdiluição deve ser de 10^4 UFC/mL, devido ao pequeno volume de meio de cultura em cada cavidade. Deste modo, o inóculo teste foi preparado adicionando-se 400 μ L do inóculo padrão de McFarland a 3,6 mL de CMH. Esse procedimento foi realizado em mais três tubos.

Inoculação

Foi distribuído, assepticamente, 100 μ L do CMH, preparado conforme as indicações do fabricante, em microplacas estéreis de 96 cavidades com fundo em forma de “U”, providas de tampa.

Colocou-se 100 μ L da substância diluída na concentração inicial de 2000 μ g/mL na primeira coluna da placa; posteriormente, foram realizadas diluições seriadas, retirando 100 μ L da coluna 1 e transferindo para a coluna 2; homogeneizou-se, enchendo e esvaziando as ponteiros e assim sucessivamente até a coluna 12 de onde foram descartados 100 μ L. As concentrações testadas variaram entre 1000 μ g/mL e 0,5 μ g/mL.

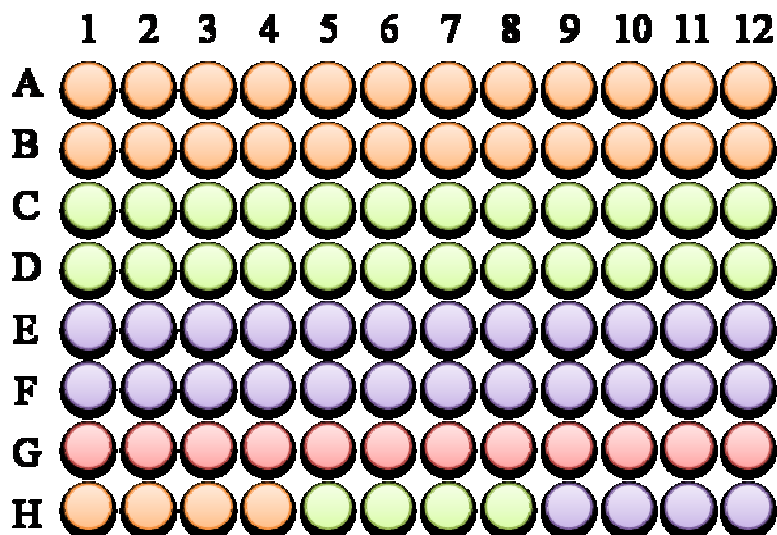
A linha G foi utilizada como controle da esterilidade do meio de cultura e das substâncias testadas, recebendo apenas a substância e o caldo de cultura correspondente. A linha H foi usada como controle do crescimento microbiano. Não recebendo as substâncias testes, mas meio de cultura e inóculo (Figura 27).

Colocou-se 100 μ L do cada inóculo teste previamente preparado nas cavidades correspondentes, em duplicata. Posteriormente, as placas foram tampadas e incubadas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24hs.

Passado o período de incubação foi adicionado 20 μ L da solução aquosa de resazurina (Sigma-Aldrich) a 0,01% em cada cavidade, como indicador colorimétrico de óxido-redução para caracterizar a viabilidade celular. As placas foram mantidas a

temperatura ambiente por 2hs e lidas após esse tempo (CLSI, 2015). Considerou-se como Concentração Inibitória Mínima (CIM) a menor concentração do composto capaz de inibir o crescimento bacteriano, o que foi visualizado pela mudança de coloração.

Figura 27 – Representação esquemática da avaliação da atividade antibacteriana por microdiluição



Legenda:

- Staphylococcus aureus* ATCC 25923
 - Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
 - Escherichia coli* ATCC 25922
 - Controle negativo (meio de cultura + substância testada)
 - Meio de cultura + *S. aureus*
 - Meio de cultura + *P. aeruginosa*
 - Meio de cultura + *E. coli*
- } Controle positivo de crescimento bacteriano

3.9.2 Determinação da atividade antifúngica

Preparo do inóculo

O inóculo foi preparado fazendo-se uma suspensão direta a partir de uma cultura jovem (24hs) utilizando colônias isoladas e selecionadas que foram diluídas em solução salina estéril (NaCl 0,9%). A suspensão fúngica foi ajustada comparando-se ao tubo 0,5 da escala de McFarland.

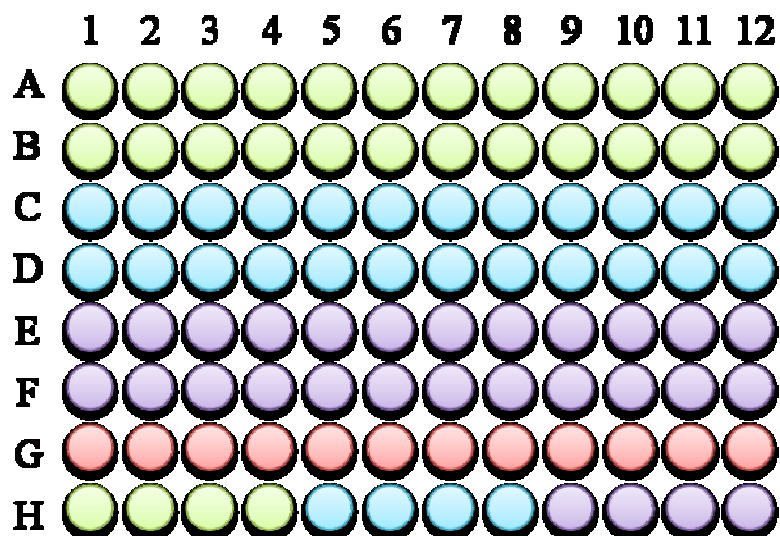
Esse procedimento fornece uma suspensão padrão de levedura contendo 10^6 UFC/ml. De acordo com o CLSI (2015), o inóculo para a realização dos testes por microdiluição deve ser de 10^3 UFC/mL, devido ao pequeno volume de meio de cultura em cada cavidade. Deste modo, o inóculo teste foi preparado retirando-se 50 μ L do inóculo padrão de McFarland e completando-se com 9,95 ml ou 9950 μ L CSD.

Inoculação

Foi utilizado o caldo Sabouraud Dextrose, preparado de acordo com as indicações do fabricante. O procedimento técnico realizado seguiu os mesmos parâmetros daqueles anteriormente citados na determinação da atividade antibacteriana (Figura 28).

Após colocar os inóculos, as placas foram tampadas e incubadas a $30\pm 2^\circ\text{C}$ por 48hs. Passado o período de incubação foi adicionado 20 μ L da solução aquosa de resazurina (Sigma-Aldrich) a 0,01% em cada cavidade. As placas foram mantidas a temperatura ambiente por 2hs e lidas após esse tempo (CLSI, 2015). Considerou-se como Concentração Inibitória Mínima (CIM) a menor concentração do composto capaz de inibir o crescimento fúngico, o que foi visualizado pela mudança de coloração.

Figura 28 – Representação esquemática da avaliação da atividade antifúngica por microdiluição para leveduras de importância clínica



Legenda:

- Candida albicans* ATCC 76645**
 - Candida tropicalis* ATCC 13803**
 - Candida crusei* ATCC 40147**
 - Controle negativo (meio de cultura + substância testada)**
 - Meio de cultura + *C. albicans***
 - Meio de cultura + *C. tropicalis***
 - Meio de cultura + *C. crusei***
- } **Controle positivo de crescimento fúngico**

3.10 Análise estatística

Os resultados das atividades anti-inflamatória, analgésica e de toxicidade aguda foram avaliados utilizando a análise de variância de uma via (ANOVA) seguido do pós-teste de Dunnett ou Tukey. Todos os resultados foram expressos como média desvio padrão (d.p.) e o nível de significância mínimo foi de $p < 0,05$ analisados pelo software *GraphPad Prisma 5.0* (BARROS, et. al, 2004).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização dos compostos *N*-acilhidrazônicos acridínicos substituídos

4.1.1 Caracterização físico-química

Foram sintetizados 3 compostos codificados como JR04, JR09 e JR19. De acordo com a tabela 2, que apresenta as características físico-químicas dos derivados *N*-acilhidrazônicos, todas as moléculas apresentaram rendimentos acima de 50% comprovando a boa exequibilidade da rota sintética adotada e fácil metodologia de purificação. Em relação à faixa de fusão a variação de temperatura para a maioria dos compostos foi de até 3°C, o que garante um certo grau de pureza dos compostos.

Todos os compostos apresentaram LogP <5, estando de acordo com a regra de Lipinsk, que estabelece as condições favoráveis para a absorção de um fármaco pelo organismo humano. Para apresentar boa solubilidade e permeabilidade em sistemas biológicos, os compostos devem apresentar, entre outras propriedades, LogP <5. Este parâmetro é indicativo de um bom perfil de biodisponibilidade (BARREIRO, 2009), podendo resultar em um aumento de sua ação farmacológica.

Tabela 2 – Características físico-químicas dos novos derivados *N*-acilhidrazônicos

Composto	Rend (%)	Rf	Faixa de Fusão (°C)	Massa Molecular (g/mol)	Fórmula Molecular	Log P
JR04	88,19	---	217-219	265,05	C ₁₁ H ₁₁ N ₃ O ₃ S	0,37
JR09	54,05	0,5 ^a	180-182	187,20	C ₁₀ H ₉ N ₃ O	1,67
JR19	89,00	0,66 ^b	233-236	226,09	C ₁₂ H ₁₀ N ₄ O	1,21

Rend (%): Rendimento; Rf: Fator de Retenção; Log P: Coeficiente de Partição; ^aAcetato de Etila, ^bHexano/Acetato de Etila (6:4)

4.1.2 Análise termogravimétrica

As curvas termogravimétricas dos compostos JR04, JR09 e JR19 apresentaram três etapas de perda de massa (Figura 29). O primeiro evento para o JR04 ocorreu entre 34,26 e 193,03°C e apresentou perda de massa de 4,11%; para o JR09 foi entre 55,59 e 170,52°C, com perda de massa de 4,08%; para o JR19 foi entre 61,51 e 165,78 °C, com perda de massa de 7,08%. Essa perda de massa foi atribuída à perda de umidade dos compostos. A segunda etapa, que corresponde ao início do seu processo de decomposição ocorreu entre 206,06 e 325,74°C, com perda de massa de 12,96% (JR04); entre 191,85 e 316,26°C, com perda de massa de 19,61% (JR09); entre 184,74 e 273,60°C, com perda de massa de 19,26% (JR19). A

terceira etapa ocorreu entre 325,74 e 589,96°C, com perda de massa de 42,80% (JR04); entre 328,11 e 695,41°C, com perda de massa de 39,11% (JR09); entre 281,90 e 657,50°C, com perda de massa de 22,59% (JR19). No final deste processo verificou-se a presença de um resíduo mineral, o qual não se decompõe, na sua totalidade até 900°C, que corresponde ao teor de cinzas das amostras, que foi de 30,90 (JR04), 24,46 (JR09) e 38,69 (JR19) (Tabela 3).

Verificou-se que os compostos JR04 e JR19 são mais resistentes à degradação térmica quando comparados ao composto JR09, que não apresenta os grupamentos substituintes. Isso porque a adição dos grupamentos favorece interações intermoleculares.

Figura 29 – Curvas termogravimétricas dos compostos JR04 (A), JR09 (B) e JR19 (C)

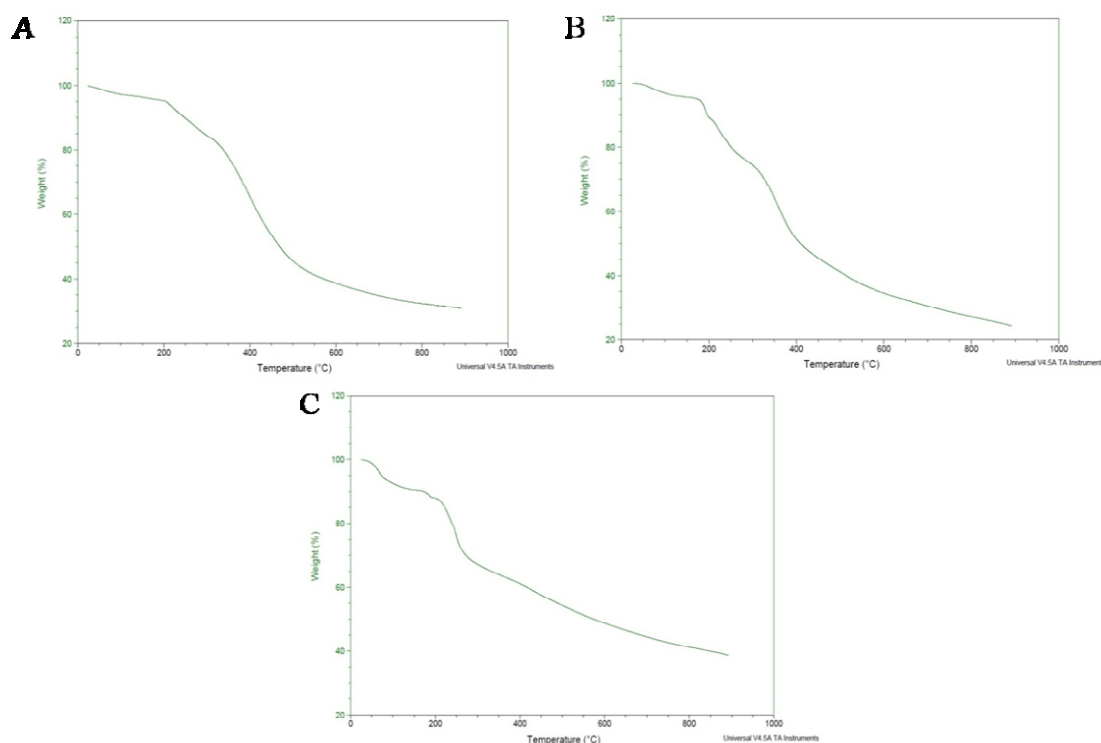


Tabela 3 – Dados de termogravimetria referentes às etapas de decomposição dos compostos JR04, JR09 e JR19

Compostos	Etapas de decomposição	Início (°C)	Final (°C)	Perda de massa (%)	Resíduo
JR04	Primeira	34,26	193,03	4,11	30,9
	Segunda	206,06	325,74	12,96	
	Terceira	325,74	589,96	42,80	
JR09	Primeira	55,59	170,52	4,088	24,46
	Segunda	191,85	316,26	19,61	
	Terceira	328,11	695,41	39,11	
JR19	Primeira	61,51	165,78	7,088	38,69
	Segunda	184,74	273,6	19,26	
	Terceira	281,90	657,5	22,59	

A análise termogravimétrica é uma técnica termoanalítica que acompanha a variação da massa da amostra, em função da programação de temperatura (BRASIL, 2010). No âmbito farmacêutico, a relevância dessa análise para o futuro da indústria farmacêutica é crescente, demonstrada através da caracterização dos fármacos com seus eventos térmicos definidos, bem como estudo de pureza. Estudos desse tipo tem sido amplamente utilizados como ferramenta para avaliação de pré-formulações e, definição da estabilidade dos fármacos e da formulação farmacêutica (OLIVEIRA et al., 2011).

4.1.3 Caracterização estrutural

Os dados espectrais dos compostos (anexos 3, 4 e 5) apresentaram sinais de deslocamento químico característicos das estruturas propostas, como por exemplo, o sinal do NH variando entre 12,06 e 11,64 ppm na forma de um singleto, os sinais N=CH (imínico) que caracteriza a reação de condensação, variando entre 8,00 e 8,17 ppm, além dos sinais aromáticos característicos de cada estrutura. Vale salientar que a maioria dos sinais encontra-se duplicados, sendo isso uma característica comum para muitos derivados *N*-acilidrazônicos. De acordo com a literatura, tais derivados podem apresentar configuração *Z* e *E*, devido a sua função imina (N=CH), ou conformação *syn* e *anti-periplanar*, devido a função amida (CO-NH), o que justificaria a duplicidade dos sinais (LOPES, 2013).

Além disso, o espectro de infravermelho apresenta as principais bandas características dos principais grupos funcionais das moléculas propostas, como a presença da banda da Nitrila (CN) variando entre 2258 a 2276 cm^{-1} , as bandas das carbonilas das amidas variando entre 1674 a 1693 cm^{-1} . Esses sinais são comuns a todas as moléculas, entretanto cada uma delas apresentam sinais característicos dos respectivos grupos funcionais tais como, uma banda em 3304 cm^{-1} para a molécula JR19 referente ao NH indólico e duas bandas características em 1365 e 1149 cm^{-1} para a molécula JR04 referentes aos deslocamentos SO_2 das deformações axiais simétricas e assimétricas respectivamente. O JR 09 por não apresentar substituição no seu anel benzilidênico, não foram observados sinais característicos para a molécula, porém fica muito nítido os sinais 3213 cm^{-1} do NH da amida e outro em 3080 cm^{-1} provavelmente do CH imínico.

A partir destes dados espectrais foi possível propor as estruturas (tabela 4) para os compostos JR04, JR09 e JR19.

4.1.3.1 Dados espectrais

Espectro RMN¹H e RMN¹³C do composto 2-ciano-*N'*-[4-(metilssulfonil)benzilideno]-acetohidrazida (JR04)

(500 MHz, DMSO-*d*₆): 12,06 (s, 1H, NH); 8,26 (s, N=CH, conf), 8,17 (s, N=CH, conf), 8,10 (s, 1H, N=CH), 7,99 (m, 4H, Ar); 4,29 (s, 2H, CH₂), 3,80 (s, CH₂ conf); 3,27 (s, 3H, CH₃). ¹³C NMR-DEPT Q - 24,95, 25,47 (conf); 43,88; 116,52; 127,92, 128,00 (conf); 128,15, 128,37 (conf), 139,00; 141,94; 142,99; 165,76. IV (KBr) cm⁻¹= 3304 (NH indol); 2953 (CH); 2276 (CN); 1674 (C=O amida). (Anexo 3).

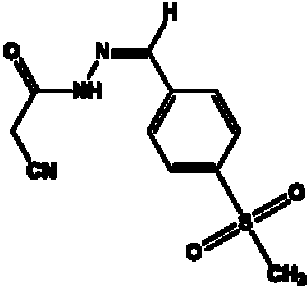
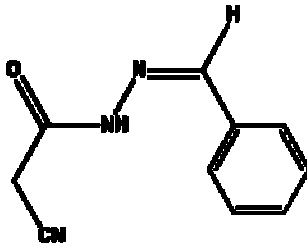
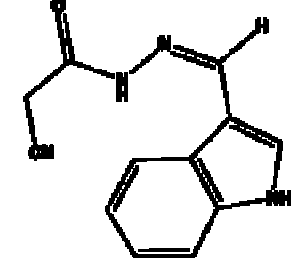
Espectro RMN¹H e RMN¹³C do composto *N'*-(benzilideno)-2-cianoacetohidrazida (JR09)

(500 MHz, DMSO-*d*₆): 11,81 (s, 1H, NH), 11,73 (s, NH conf), 8,16 (s, N=CH, conf), 8,00 (s, 1H N=CH), 7,70 (t, 2H, J= 10 Hz, j= 5Hz, Ar-H), 7,44 (q, 3H, j=5Hz, Ar-H), 4,21 (s, 2H,CH₂) e 3,81 (s, CH₂, conf); ¹³C NMR-DEPT Q (125 MHz, DMSO-*d*₆): (24,86 conf), 24,36, (115,78 conf) 116,10, 127,02, 128,79, (128,84 conf), 130,15, (130,36 conf) 133,78, 144,36, 147,74 conf), (158,93 conf), 164,85. IV (KBr) cm⁻¹= 3190 (NH imida); 3095 (CH); 2266 (CN); 1693 (C=O amida); 1365 e 1149 (SO₂) (Anexo 4).

Espectro RMN¹H e RMN¹³C do composto *N'*-[(1-*H*-indol-3-il)-metileno]- 2-cianoacetohidrazida (JR19)

(500 MHz, DMSO-*d*₆): 11,64 (s,1H, NH), 11, 62 (s, NH, conf); 11,50 (s, 1H, NH), 11,41 (s, NH, conf); 8,35 (s, N=CH, conf), 8,21 (s, 1H, N=CH); 8,14 (d, 1H, CH-Ar, J=10Hz); 7,86 (d, CH-Ar, conf), 7,83 (d, 1H, CH-Ar, j=3,5Hz); 7,45 (d, 1H, CH-Ar, J=10 Hz); 7,24-7,15 (m, 2H, CH-Ar); 4,24 (s, 2H, CH₂), 3,78 (s, CH₂ conf). ¹³C NMR-DEPT Q- 24,98; 111,60; 112,34; 116,86; 121,15; 123,18; 124,42; 131,46; 137,55; 142,45; 145,40; 164,31. MS calculada=226,2340, encontrada= 227,043. IV (KBr) cm⁻¹= 3213 (NH amida); 3080 (CH); 2258 (CN); 1678 (C=O amida) (Anexo 5).

Tabela 4 – Compostos sintetizados referente a série JR e suas respectivas estruturas

Composto	Nomenclatura	Estrutura Molecular
JR04	2-ciano- <i>N'</i> -[4-(metilssulfonil)benzilideno]-acetohidrazida	
JR09	<i>N</i> -benzilideno-2-ciano-acetohidrazida	
JR19	<i>N</i> -(3-(1 <i>H</i> -indol-3-il)benzilideno)-2-cianoacetohidrazida	

4.2 Avaliação do potencial anti-inflamatório de JR04, JR09 e JR19

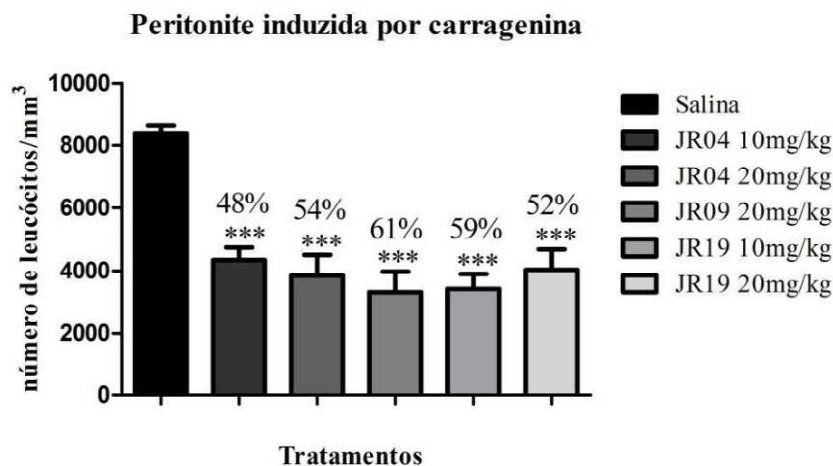
4.2.1 Peritonite induzida por carragenina

O ponto de partida deste estudo foi avaliar o potencial anti-inflamatório dos derivados *N*-acilhidrazônicos JR04, JR09 e JR19. Para tanto, foi realizado o teste de peritonite induzida por carragenina.

A carragenina é um polissacarídeo de origem vegetal, isolado de algas vermelhas, amplamente utilizado como agente flogístico, isto é, capaz de ativar quimicamente o processo inflamatório, ativando diversas vias da cascata inflamatória (MENDES, 2010).

Neste modelo experimental, a administração oral dos compostos JR04 (10 e 20 mg/Kg), JR09 (20 mg/kg) e JR19 (10 e 20 mg/Kg) inibiu de forma significativa em 48, 54, 61, 59 e 52%, respectivamente, a migração leucocitária para a cavidade peritoneal quando comparado com o grupo controle (Figura 30). Não houve diferença significativa entre as doses de 10 e 20 mg do JR04 e JR19, dessa forma, foi selecionada a dose de 10 mg/Kg para a realização dos demais testes farmacológicos com todas as moléculas.

Figura 30 – Influência do tratamento com os compostos JR04, JR09 e JR19 sob a contagem total de leucócitos, para o modelo da peritonite induzida por carragenina (1%)



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).

Durante a peritonite ocorre vasodilatação dos capilares na membrana peritoneal que levam a um aumento no fluxo sanguíneo; alterações estruturais na microcirculação, que permitem o extravasamento de proteínas plasmáticas para o interstício em forma de exsudato inflamatório (edema); além da migração celular de leucócitos da microcirculação e seu acúmulo no local de lesão inicial (PAULINO et al., 2008; FRANCISCHETTI et al., 2010).

Substâncias com atividade anti-inflamatória podem reduzir a migração de leucócitos para a cavidade peritoneal por dois mecanismos: impedindo a síntese e/ou liberação de mediadores quimiotáticos ou inibindo a expressão de moléculas de adesão, uma vez 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 (MULLER, 2002; SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004).

Os leucócitos apresentam um papel preponderante na defesa e reparo exercidos pela resposta inflamatória, embora plaquetas e eritrócitos também participem. Em função da liberação de mediadores químicos da inflamação, os leucócitos migram por meio de junções interendoteliais (diapedese) e se dirigem aos sítios de inflamação. Além do efeito quimiotático, esses mediadores podem gerar uma cascata capaz de ampliar e liberar outros fatores estimulantes. A ativação de leucócitos resulta em produção de metabólitos do AA; degranulação e secreção de enzimas lisossômicas; secreção de citocinas, bem como maior expressão de moléculas de adesão e maior exposição das integrinas (FRANCISCHETTI et al., 2010).

Dessa forma, modelos animais de inflamação aguda que permitam a quantificação estimativa da migração desses leucócitos tem sido comumente empregados, possibilitando que a migração celular, mediadores inflamatórios e extravasamento plasmático sejam quantitativamente mensurados após um processo inflamatório agudo, induzido por diferentes agentes irritantes aplicados no interior da cavidade (SEDGWICK; LEES, 1986).

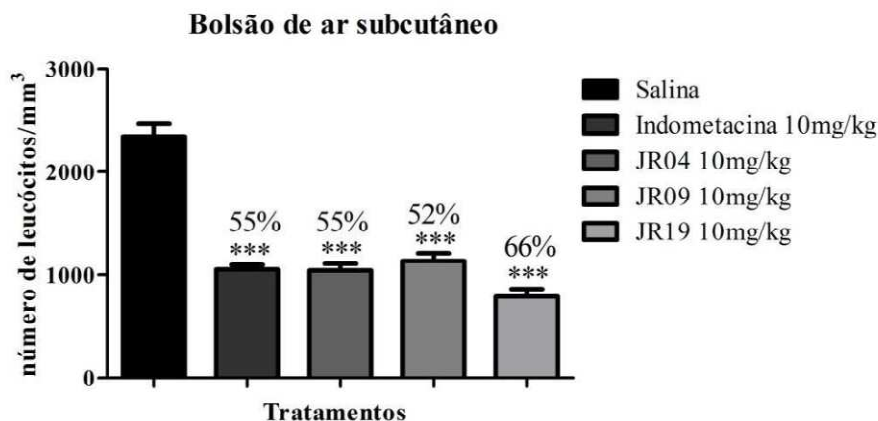
Os resultados obtidos neste *screening* sugerem que os compostos apresentam atividade anti-inflamatória relacionada à capacidade de suprimir a ação e/ou liberação de aminas vasoativas, NO e possivelmente das PGs. Os resultados obtidos neste estudo estão de acordo com aqueles descritos por outros autores como Silva (2012) que testou uma série de derivados cicloalquil-*N*-acilhidrazônicos (100 µmol/Kg) e evidenciou que todos os compostos foram ativos neste modelo.

4.2.2 Bolsão de ar subcutâneo

O modelo experimental de bolsão de ar é considerado uma importante ferramenta para avaliar a inflamação aguda. A administração de carragenina por via subcutânea, na bolsa de ar, induz uma rápida resposta inflamatória com elevados níveis de PGs e LTs no exudato (MOTA, 2013). Esse modelo mimetiza a artrite reumatoide, sendo utilizado como *screening* para potenciais candidatos a fármacos no tratamento da artrite, uma vez que a bolsa de ar previamente inoculada no dorso do animal forma uma membrana que se assemelha à membrana sinovial inflamada dos pacientes com a doença (JAIN; PARMAR, 2011; VANDOOREN et al., 2013).

Neste modelo todos os compostos apresentaram atividade anti-inflamatória indicada por uma diminuição significativa na migração celular quando comparados ao grupo controle. O fármaco padrão (indometacina) utilizado neste modelo foi testado conforme a sua dose terapêutica, 10 mg/Kg, apresentando inibição de 55%. Os resultados obtidos com a dose de 10 mg/kg dos compostos em estudo apresentou-se estatisticamente semelhante à resposta da indometacina, com inibição de 55, 52 e 66%, para o JR04, JR09 e JR19, respectivamente (Figura 31). Particularmente, o JR19 apresentou percentual de inibição superior à inibição da indometacina e o JR04 apresentou atividade igual a da indometacina.

Figura 31 – Influência do tratamento com os compostos JR04, JR09 e JR19 sob a contagem total de leucócitos no modelo de bolsão de ar subcutâneo



Valores são expressos em média \pm desvio padrão da média, $n = 6$. *** $p < 0,001$ significativamente diferente do grupo controle (ANOVA seguido pelo teste de Dunnett).

A principal diferença entre os modelos de bolsão de ar e peritonite induzida por carragenina consiste no tipo de célula em maior abundância no exsudato. No modelo do bolsão de ar subcutâneo os neutrófilos são as células mais abundantes, sendo responsáveis pela quimiotaxia. Enquanto que na peritonite induzida por carragenina existe elevada quantidade de macrófagos e mastócitos, atraídos para o local da inflamação por citocinas pró-inflamatórias, particularmente IL-1 β e TNF- α (RAMOS, 2014).

A partir dos resultados obtidos neste estudo, pode-se inferir que os compostos testados inibem especialmente a produção de mediadores por neutrófilos e macrófagos, tendo em vista a inibição significativa apresentada nos testes do bolsão de ar e peritonite, respectivamente.

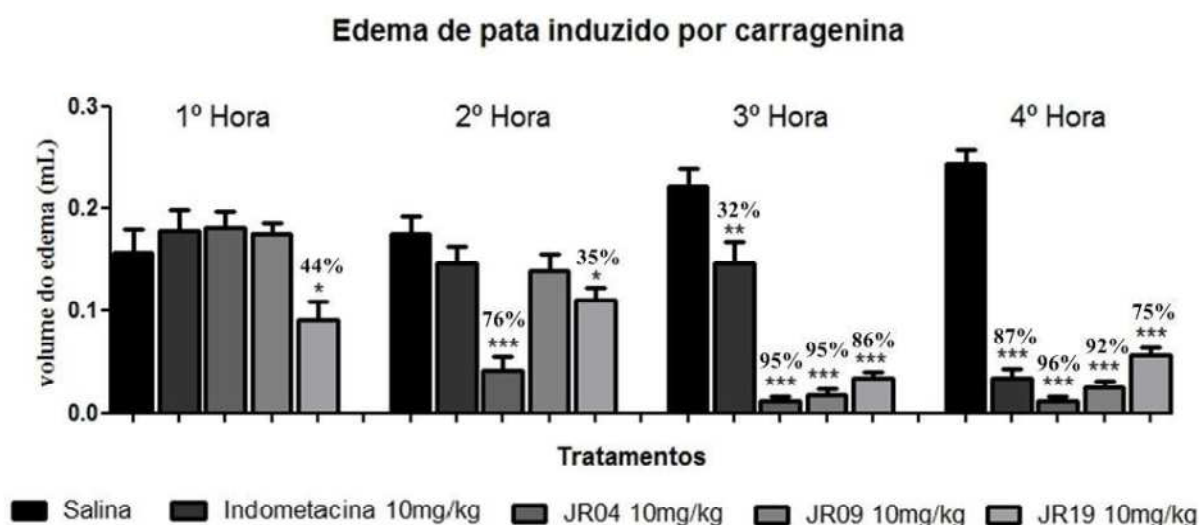
Mota (2013) testou derivados isoxazolina- acilhidrazônicos e também obteve resultados satisfatórios no modelo de bolsão de ar subcutâneo. As doses testadas de 3,0 e 30 mg/Kg apresentaram-se estatisticamente semelhantes ao fármaco padrão, indometacina (10 mg/Kg).

4.2.3 Edema de pata induzido por carragenina

Os animais que receberam injeção intraplantar de carragenina tiveram indução de edema, verificado pelo aumento no volume das patas que receberam o estímulo em diferentes intervalos de tempo. Neste modelo o composto JR19 reduziu de maneira significativa o volume do edema na 1^a, 2^a, 3^a e 4^a hora, com inibição de 44, 35, 86 e 75%, respectivamente. O

composto JR04 foi ativo na 2^a, 3^a e 4^a hora, com inibição de 76, 95 e 96%. Enquanto as demais substâncias mostraram-se ativas apenas a partir da 3^a hora após a indução do edema, o composto JR09 (95 e 92%) e o controle positivo, (indometacina 10 mg/Kg) (32 e 87%) (Figura 32).

Figura 32 – Influência do tratamento com os compostos JR04, JR09 e JR19 sob o edema de pata induzido por carragenina



Valores são expressos em média \pm desvio padrão da média, $n = 7$. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ significativamente diferente do grupo controle (ANOVA seguido pelo teste de Dunnett).

O modelo de edema de pata induzido por carragenina é amplamente utilizado para triagem de agentes anti-inflamatórios e tem sido frequentemente utilizado para avaliar a ação anti-edematogênica de diversos compostos (THOMAZZI et al., 2010). Pesquisadores da Merck, Sharp & Dohme demonstraram a atividade anti-inflamatória da indometacina através do modelo de edema de pata induzido por carragenina. Em virtude disso, esse modelo foi, e continua sendo de grande relevância no desenvolvimento de novos fármacos com potencial anti-inflamatório (MORRIS, 2003).

Segundo Mendes et al. (2010) a resposta inflamatória induzida pela carragenina é caracterizada por uma resposta bifásica, com formação de edema em virtude da rápida produção de mediadores inflamatórios. Compreende uma fase inicial (entre 60 e 90 minutos) e uma fase tardia (com o pico do edema na quarta hora após a indução da inflamação). O edema inflamatório decorre da interação entre substâncias que promovem o aumento da permeabilidade vascular, como a histamina e a BK, por exemplo, com mediadores que causam não somente vasodilatação, como é o caso das PGE_2 . Embora estes últimos, por si só, sejam incapazes de induzir edema, eles potencializam a atuação de outros mediadores, por

aumentarem o aporte sanguíneo, e conseqüentemente a pressão de perfusão nas vênulas da região inflamada (LAPA et al., 2007). Esta resposta inflamatória é quantificada pelo aumento na espessura da pata (edema) sendo modulada por inibidores de moléculas específicas dentro da cascata inflamatória, como os AINEs (MORRIS, 2003).

Com base nestes resultados, pode-se sugerir que a ação anti-inflamatória dos novos derivados *N*-acilhidrazônicos envolve mecanismos relacionados com a síntese de PGs, sendo comparável a ação exercida pelos AINEs, onde a via da COX é inibida impedindo a sua formação. O composto JR19 reduziu o edema até a quarta hora, podendo estar associado à redução de mediadores pró-inflamatórios tanto da fase inicial como da segunda fase desse modelo. Resultados semelhantes foram obtidos no estudo de Mota (2013), onde o derivado isoxazolina-acilhidrazona R-99 (15 mg/Kg) foi capaz de inibir o edema causado pela carragenina em todos os tempos observados. Já o composto JR09 apresentou atividade apenas na segunda fase.

4.2.3.1 Determinação da concentração sérica da proteína C reativa (PCR)

Com o intuito de confirmar a atividade anti-inflamatória dos compostos JR04, JR09 e JR19, foi determinada a concentração sérica de PCR. Houve uma redução significativa dos valores de PCR da indometacina e dos compostos em estudo quando comparados ao grupo controle que recebeu apenas salina (Tabela 5).

Tabela 5 – Influência do tratamento com os compostos JR04, JR09 e JR19 nos valores de PCR-ultrassensível no modelo de edema de pata induzida por carragenina em camundongos

Tratamentos (v. o.)	PCR ultrassensível (mg/dL)	% de Inibição
Salina	5,899 ± 1,5	-
Indometacina 10mg/kg	1,300 ± 0,54**	78
JR04 10mg/kg	0,640 ± 0,11***	89
JR09 10mg/kg	1,017 ± 0,53***	83
JR19 10mg/kg	1,050 ± 0,32***	82

Valores são expressos em média ± desvio padrão da média, n = 4. **p<0,01, ***p<0,001 significativamente diferente do grupo controle (ANOVA seguido pelo teste de Dunnett).

Aguiar et al. (2013) declaram não existir um teste único ideal para a detecção de estados inflamatórios, mas que existem várias análises sanguíneas de clínica laboratorial que indicam a existência de inflamação orgânica. Uma das mais sensíveis é a PCR que consiste na dosagem da concentração sanguínea da Proteína C Reativa, uma das proteínas de fase aguda (PFA) cuja solicitação tem crescido exponencialmente em vários países, incluindo o Brasil. Na presença de quadros inflamatórios suas concentrações séricas alteram-se rapidamente (24

a 48 horas), podendo também sofrer alterações durante inflamações crônicas. Segundo Farias (2007), a dosagem de PCR não é influenciada por fatores não associados a processos inflamatórios, tornando essa proteína um precoce indicador de processos infecciosos e inflamatórios, podendo alcançar valores 2000 vezes maiores que o valor de referência.

Em conjunto, os dados obtidos nos experimentos evidenciam que os derivados *N*-acilhidrazônicos testados apresentam propriedades anti-inflamatórias promissoras. Desta forma, as perspectivas são favoráveis para o desenvolvimento de novos estudos (farmacodinâmicos, farmacocinéticos e toxicológicos) que determinem a possibilidade da sua utilização no tratamento de diferentes doenças inflamatórias em relação aos inúmeros fármacos anti-inflamatórios comumente utilizados na clínica médica.

4.3 Avaliação do potencial antinociceptivo de JR04, JR09 e JR19

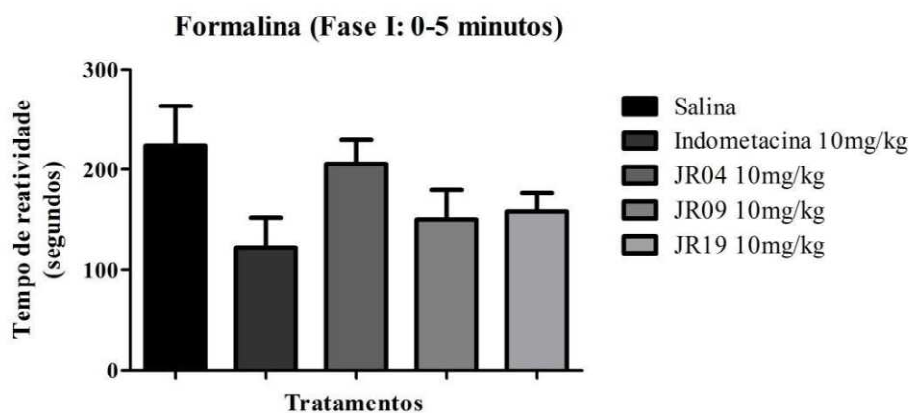
4.3.1 Nocicepção induzida por formalina

Dando início à investigação dos efeitos antinociceptivos utilizou-se o modelo de nocicepção induzida por formalina. Este modelo permite identificar candidatos à fármacos com efeito analgésico dependente de uma ação anti-inflamatória.

Neste modelo, pode-se observar duas fases de comportamento nociceptivo que são indicativos do envolvimento de diversos mediadores químicos. A primeira fase é caracterizada por intensa dor neurogênica, em que estão envolvidos os mediadores químicos como a SP, o GLU e a BK. A segunda fase parece ser causada por mudanças teciduais e funcionais no corno dorsal da medula espinhal e envolve mediadores como histamina, serotonina, PGs e BK, não sendo a segunda a consequência da primeira. Entre uma fase e outra ocorre o período chamado de quiescência em que não há manifestação de estímulos (SOARES, 2011; SILVA, 2012; BRASIL, 2014).

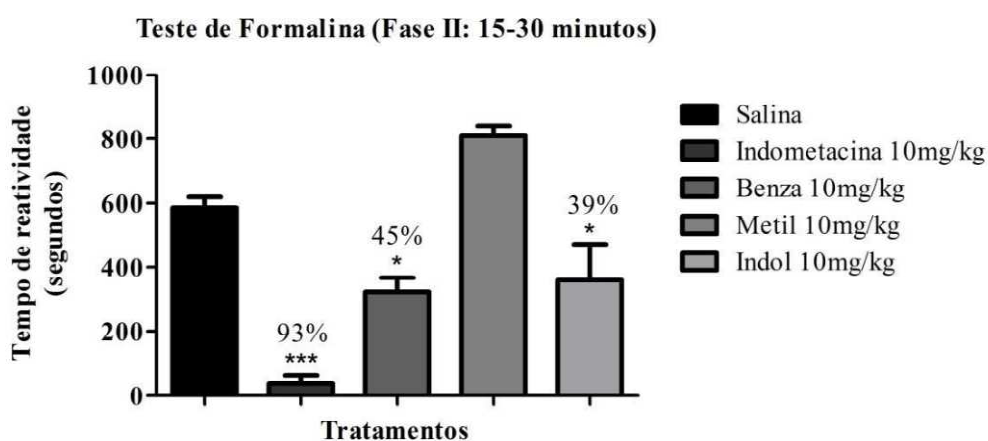
A administração oral dos compostos JR04, JR09 e JR19 ou indometacina na dose de 10 mg/kg não influenciaram a primeira fase de nocicepção (dor neurogênica) deste modelo (Figura 33).

Figura 33 – Influência do tratamento com os compostos JR04, JR09 e JR19 sobre o tempo de reatividade a dor na fase I do teste de formalina intraplantar



Na segunda fase da nocicepção (dor inflamatória), os compostos JR09, JR19 e o controle positivo, indometacina, promoveram redução significativa em 45, 39 e 93%, respectivamente, no tempo de reatividade dos animais produzida pela injeção intraplantar de formalina, quando comparado ao grupo controle veículo (Figura 34). O derivado JR04, assim como na primeira fase, não apresentou atividade, chegando mesmo a aumentar a reatividade dos animais nesta segunda fase.

Figura 34 – Influência do tratamento com os compostos JR04, JR09 e JR19 sobre o tempo de reatividade a dor na fase II do teste de formalina intraplantar



Valores são expressos em média \pm desvio padrão da média, $n = 6$. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ significativamente diferente do grupo controle (ANOVA seguido pelo teste de Dunnett).

As duas fases do teste da formalina tem propriedades diferenciais sendo útil tanto para avaliar as substâncias analgésicas, como para elucidar o mecanismo de analgesia. A primeira fase é caracterizada pela propagação imediata de impulsos para o sistema nervoso central, ocorre durante os 5 primeiros minutos após a aplicação do agente flogístico e é sensível a

fármacos que interagem com o sistema opioide, como a morfina. Essa dor é causada pela ação direta da formalina, especialmente nas fibras sensoriais aferentes C e em parte nas fibras aferentes A δ (YOON; CHOI, 2003; KANG et al., 2007). A segunda fase é prolongada, 15-30 minutos após a injeção de formalina, está associada ao desenvolvimento de uma resposta inflamatória e pode ser inibida por anti-inflamatórios não esteroides como a indometacina. Sendo assim, fármacos de ação central (opioides) são capazes de inibir ambas as fases, enquanto que fármacos que atuam periféricamente agem somente inibindo a segunda fase (GUIMARÃES et al., 2010).

Os compostos JR09 e JR19 foram ativos apenas na segunda fase, confirmando ser desprovido de efeito analgésico central e possivelmente retentor de ação anti-inflamatória. Esse efeito pode ser devido à inibição da síntese de mediadores inflamatórios, como as PGs, TXs, LTs entre outros. Pode-se inferir a partir destes resultados que o efeito antinociceptivo apresentado envolve mecanismos periféricos, atuando na dor anti-inflamatória.

O composto JR04 apresenta uma estrutura diferenciada em relação aos demais compostos estudados, apresentando um grupamento metilsulfonil. Tal substituinte é encontrado nos inibidores seletivos da COX-2, sugerindo uma possível ação seletiva para esta isoforma. Este composto não apresentou atividade antinociceptiva em nenhuma das fases, aumentando inclusive o tempo de reatividade na segunda fase. Isso pode estar relacionado a um aumento pelo menos inicial na síntese e/ou liberação de BK, considerado um composto algio gênico que atua localmente, causando dor, vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular; promovendo desta forma uma intensificação da sua ação (GOODMAN; GILMAN, 2015).

Estes resultados sustentam a hipótese de que os novos derivados *N*-acilhidrazônicos JR09 e JR19 podem possuir atividade antinociceptiva periférica, possivelmente através da inibição da síntese de PGs, ou inibição da liberação e/ou produção de mediadores inflamatórios, como: citocinas, histamina e serotonina; entre outros.

Em seu estudo, Soares (2011) avaliou a atividade antinociceptiva de uma série de novos derivados 1,3-benzodioxolil-*N*-acilhidrazônicos. Os compostos apresentaram um relevante perfil antinociceptivo, inibindo significativamente a manifestação dolorosa em diferentes fases do ensaio de nocicepção induzida por formalina.

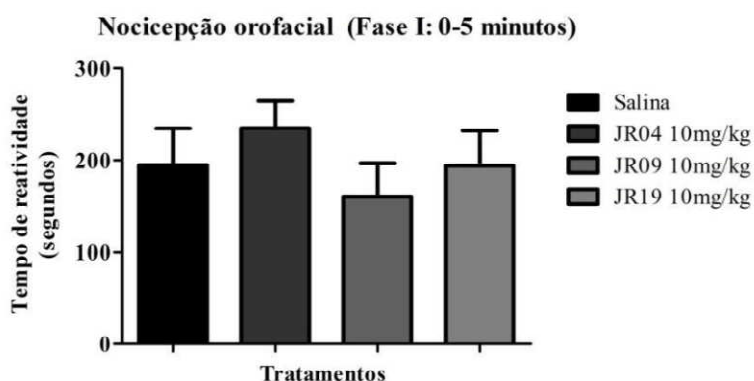
4.3.2 Dor orofacial induzida por formalina

Dando continuidade ao estudo do efeito antinociceptivo dos compostos em teste, foi realizado o modelo de dor orofacial induzida por formalina que consiste numa adaptação do

teste da formalina administrada na superfície plantar de animais (DUBUISSON; DENNIS, 1977, RABOISSON; DALLEL, 2004). Entre os modelos nociceptivos experimentais de dores orofaciais e cefálicas, este teste é um dos mais relevantes em termos de aplicabilidade experimental e clínica, quando se estuda dores agudas (PERLA, 2007). Este modelo avalia a nocicepção trigeminal através da aplicação de estímulo químico (administração subcutânea de uma solução de formalina, 2,0%) na região orofacial (SILVA, 2013).

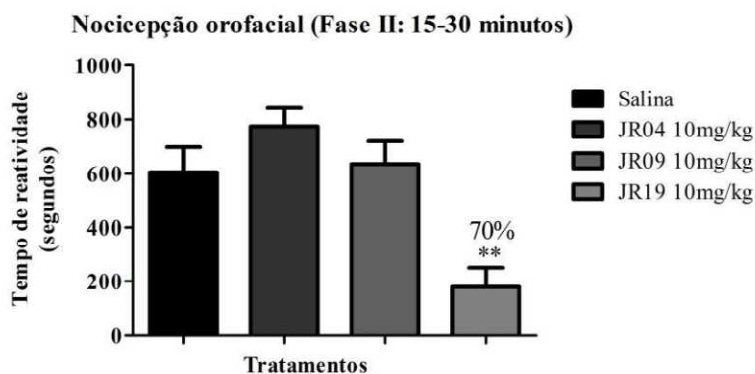
A administração oral dos compostos JR04, JR09 ou JR19 na dose de 10mg/kg não apresentou resultados estatisticamente significativos (Figura 35).

Figura 35 – Influência do tratamento com os compostos JR04, JR09 e JR19 sobre o tempo de reatividade a dor na fase I do teste de dor orofacial induzida por formalina



Na segunda fase da nocicepção orofacial, apenas o composto JR19 promoveu redução no tempo de reatividade dos animais quando comparado ao grupo controle veículo, com inibição de 70%. Os derivados JR04 e JR09, assim como na primeira fase, não apresentaram atividade (Figura 36).

Figura 36 – Influência do tratamento com os compostos JR04, JR09 e JR19 sobre o tempo de reatividade a dor na fase II do teste de dor orofacial induzida por formalina



Valores são expressos em média \pm desvio padrão da média, $n = 6$. ** $p < 0,01$ significativamente diferente do grupo controle (ANOVA seguido pelo teste de Dunnett).

Assim como no teste da aplicação de formalina subplantar, os parâmetros indicativos de dor para este modelo também podem ser observados imediatamente após a aplicação do agente químico e, posteriormente, após o período de quiescência. Segundo Dubuisson & Dennis (1977), no modelo nociceptivo trigeminal, a dor é inicialmente resultante da reação inflamatória gerada pela ligação da formalina às proteínas teciduais, por meio da formação de pontes primárias de carbono (propriedade fixadora do tecido). Tal reação inflamatória na área de injeção persiste por período relativamente longo. A resposta inicial (primeira fase) possivelmente decorre da estimulação direta dos nociceptores, enquanto que a segunda fase do teste deve-se à inflamação e sensibilização central.

De modo geral, resultados da avaliação farmacológica utilizando o modelo de nocicepção induzida por formalina 2,0% demonstraram que o derivado JR19 apresentou atividade na fase inflamatória sugerindo, assim como no modelo anterior, um possível mecanismo de ação periférico na dessensibilização de nociceptores através da diminuição da liberação de mediadores químicos produzidos pela lesão tecidual e pela inflamação gerada em decorrência da administração orofacial do agente algio gênico, diminuindo assim a dor inflamatória.

O composto JR09 não foi ativo em nenhuma das fases deste modelo. Enquanto o composto JR04, aumentou o tempo de reatividade nas duas fases deste modelo, sugerindo como no modelo anterior, estar relacionado a um aumento na síntese e/ou liberação de BK; promovendo desta forma uma intensificação da ação da BK. Apesar disso, esse não é um fator limitante para a sua utilização, visto que o composto JR04 apresenta propriedades anti-inflamatórias interessantes.

A partir dos resultados obtidos na avaliação do potencial antinociceptivo dos novos derivados *N*-acilhidrazônicos, pode-se inferir que o composto JR19 apresentou resultados satisfatórios, sendo considerado o mais promissor no tratamento da dor inflamatória.

4.4 Avaliação da toxicidade aguda

O teste de toxicidade aguda objetiva determinar a capacidade de novas substâncias causarem danos à saúde humana, classificando-as apropriadamente de acordo com o seu potencial de letalidade ou toxicidade, conforme estabelecido pela legislação (VALADARES, 2006). Uma boa correlação tem sido reportada em estudos toxicológicos entre roedores e humanos.

A DL_{50} não foi utilizada nesse trabalho, sendo substituída pelo teste de dose fixa, no qual a substância a ser testada é administrada em uma dose específica (ALMEIDA, 2006).

Assim, foi administrada a dose de 100 mg/kg de JR09 e JR19, dose dez vezes maior que a utilizada nos testes farmacológicos (SILVA et al., 2012). Além disso, o teste de toxicidade aguda deve priorizar a mesma via de administração que pretende ser utilizada pelo humano, isto é, a v. o..

4.4.1 Avaliação comportamental dos camundongos

Após a administração de 100 mg/kg, v. o. de JR09 e de JR19 ou solução salina no grupo controle, os animais foram observados por um período de até 4 horas e durante 14 dias consecutivos para avaliar sinais de toxicidade e morte. Não houve morte nem alterações fisiológicas ou comportamentais, conforme o protocolo de Almeida (2006), indicando baixa toxicidade das moléculas testadas.

4.4.2. Consumo de água e ração e evolução ponderal

O monitoramento do ganho de peso e consumo de alimentos e água em estudos com animais pode ser um indicador do estado de saúde geral do animal, e alterações de diminuição dos valores nesses parâmetros são indicadores de efeitos adversos de um produto teste.

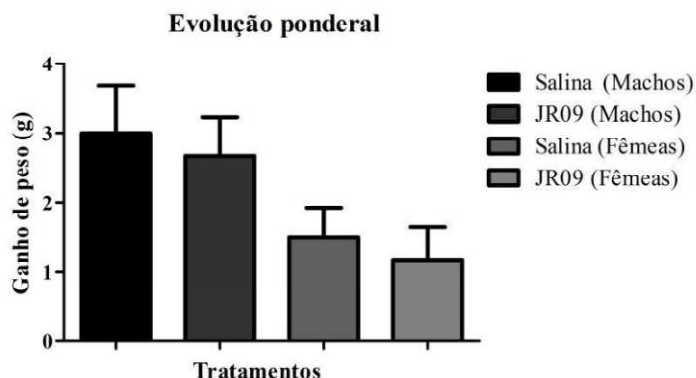
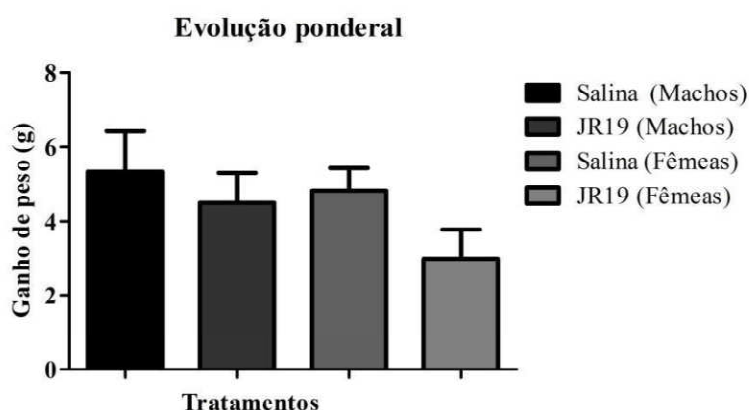
O consumo de água e ração pelos camundongos tratados com os compostos JR09 e JR19 não sofreu alterações significativas (Tabela 6).

Tabela 6 – Consumos de água e ração de camundongos Swiss, machos e fêmeas tratados com 100mg/kg de JR09, JR19 e animais controle

Tratamento	Machos		Fêmeas	
	Consumo de água (ml)	Consumo de ração (g)	Consumo de água (mL)	Consumo de ração (g)
Salina	48,57 ± 5,70	27,57 ± 4,57	33,57 ± 10,46	25,57 ± 3,92
JR09 100mg/kg	34,64 ± 7,20	26,00 ± 3,94	28,93 ± 5,60	23,07 ± 2,70
Salina	57,64 ± 5,27	37,36 ± 5,41	45,79 ± 5,49	38,71 ± 6,94
JR19 100mg/kg	61,57 ± 5,03	31,57 ± 4,73	42,86 ± 6,99	32,71 ± 5,27

Valores são expressos em média ± desvio padrão da média, n = 6.

Não houve também mudanças significativas no peso corporal dos camundongos tratados com JR09 (Figura 37) e JR19 (Figura 38) na dose de 100 mg/kg, v.o. e os respectivos grupos controle a partir do dia 1 ao dia 14.

Figura 37 – Evolução ponderal dos animais tratados com JR09 100mg/kg**Figura 38** – Evolução ponderal dos animais tratados com JR19 100mg/kg

4.4.4 Análise macroscópica e peso dos órgãos

O teste de toxicidade aguda fornece ainda informações preliminares sobre o modo de ação tóxica e possíveis órgãos alvo da substância. Quanto à análise macroscópica dos órgãos avaliados, nenhum deles apresentou alteração morfológica. Houve apenas redução do peso dos fígados e dos rins de camundongos machos tratados com o JR09, e redução do peso dos fígados de camundongos fêmeas tratados com JR19 (Tabela 7), porém não foi considerado relevante, já que não apresentaram alterações macroscópicas nem coloração diferentes do grupo controle.

Tabela 7 – Peso relativo dos órgãos (%) de camundongos do grupo controle e tratados com o JR09 e JR19 na dose de 100mg/kg por via oral após 14 dias

Animais	Tratamento	Órgãos			
		Coração	Fígado	Baço	Rins
Machos	Salina	0,49 ± 0,08	5,36 ± 0,60	0,45 ± 0,13	1,43 ± 0,20
	JR09 100mg/kg	0,43 ± 0,05	4,39 ± 0,33**	0,37 ± 0,01	1,18 ± 0,09*
	Salina	0,36 ± 0,06	4,14 ± 0,26	0,45 ± 0,10	1,05 ± 0,07
	JR19 100mg/kg	0,40 ± 0,03	4,51 ± 0,50	0,38 ± 0,07	1,14 ± 0,12
Fêmeas	Salina	0,39 ± 0,03	4,75 ± 0,27	0,45 ± 0,07	1,03 ± 0,10
	JR09 100mg/kg	0,41 ± 0,05	4,52 ± 0,22	0,50 ± 0,17	0,99 ± 0,11
	Salina	0,34 ± 0,02	4,63 ± 0,53	0,47 ± 0,09	0,88 ± 0,07
	JR19 100mg/kg	0,35 ± 0,04	3,78 ± 0,52*	0,44 ± 0,07	0,88 ± 0,06

Valores são expressos em média ± desvio padrão da média, n = 6. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ significativamente diferente do grupo controle (ANOVA seguido pelo teste de Dunnett).

4.4.5 Determinação dos parâmetros hematológicos

Não houve diferença significativa nos parâmetros hematológicos avaliados entre os grupos tratados e os grupos controle (Tabela 8).

Tabela 8 – Determinação dos parâmetros hematológicos de camundongos Swis tratados com JR19 100mg/kg

Parâmetros hematológicos	Machos		Fêmeas	
	Controle	Tratamento	Controle	Tratamento
Leucócitos ($10^3/\text{mm}^3$)	3,7 ± 0,9	3,4 ± 0,5	3,9 ± 1,6	3,1 ± 1,5
Hemácias ($10^6/\text{mm}^3$)	6,4 ± 1,0	6,1 ± 0,9	5,7 ± 0,9	6,4 ± 1,0
Hemoglobina (g/dL)	10,1 ± 1,5	9,3 ± 1,7	9,7 ± 1,4	10,4 ± 1,5
Hematócrito (%)	31,2 ± 5,5	31,7 ± 6,6	28,5 ± 5,4	35,0 ± 5,8
VCM (μm^3)	48,8 ± 3,6	51,2 ± 2,9	50,0 ± 2,4	55,0 ± 1,9
HCM (μg)	15,9 ± 1,6	15,2 ± 0,6	17,2 ± 1,2	16,4 ± 0,8
CHCM (%)	32,5 ± 1,5	29,8 ± 1,4	34,2 ± 2,0	29,7 ± 0,7
Plaquetas ($10^3/\text{mm}^3$)	1993 ± 698,4	1604 ± 472,9	1457 ± 288,4	1410 ± 306,8

4.4.6 Determinação dos parâmetros bioquímicos

Não houve diferença significativa no parâmetros bioquímicos avaliados entre os grupos tratados e os grupos controle, exceto com relação à albumina das fêmeas e aos triglicerídeos dos machos tratados com JR19 (Tabela 9).

Tabela 9 – Determinação dos parâmetros bioquímicos de camundongos Swis tratados com JR19 100mg/kg

Parâmetros Bioquímicos	Machos		Fêmeas	
	Controle	Tratamento	Controle	Tratamento
Albumina (g/dL)	0,3 ± 0,01	0,3 ± 0,01	0,320 ± 0,04	0,375 ± 0,05*
Colesterol (mg/dL)	90,0 ± 19,36	93,5 ± 27,07	81,0 ± 18,91	89,1 ± 11,02
Creatinina (mg/dL)	48,8 ± 3,6	51,2 ± 2,9	50,0 ± 2,4	55,0 ± 1,9
Glicose (mg/dL)	170,0 ± 57,4	173,2 ± 73,1	126,6 ± 42,8	150,2 ± 50,2
HDLplus (mg/dL)	36,6 ± 7,1	50,0 ± 16,7	40,4 ± 6,4	41,0 ± 7,4
PT (g/dL)	8,2 ± 2,1	8,6 ± 0,6	7,9 ± 1,2	9,6 ± 1,5
Triglicerídeos (mg/dL)	73,8 ± 14,9	163,5 ± 38,3***	69,2 ± 8,7	101,5 ± 11,4
Ácido úrico (mg/dL)	4,2 ± 1,5	2,7 ± 1,0	3,0 ± 1,4	3,4 ± 1,5
Ureia (mg/dL)	74,6 ± 15,7	78,0 ± 8,8	75,6 ± 8,5	83,5 ± 10,1

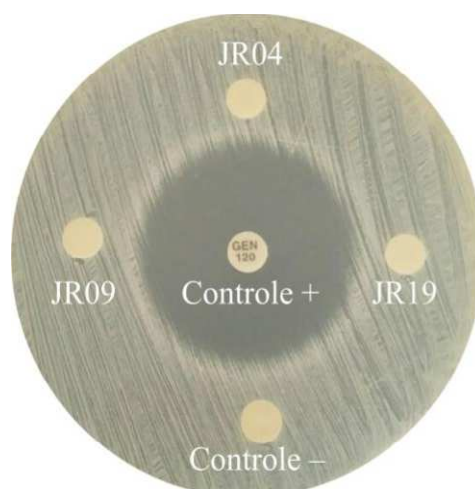
Valores são expressos em média ± desvio padrão da média, n = 6. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ significativamente diferente do grupo controle (ANOVA seguido pelo teste de Dunnett).

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. Os compostos JR09 e JR19 apresentaram baixa toxicidade na dose testada, evidenciada pela ausência de alterações comportamentais nos ensaios toxicológicos. Adicionalmente, não ocorreram mortes durante todo o período de observação, sendo observadas poucas diferenças significativas em todos os órgãos analisados bem como na avaliação de parâmetros hematológicos, bioquímicos e no consumo de água e ração dos grupos tratados em relação aos grupos controle. Esta é uma importante evidência, que viabiliza estudos *in vivo* a fim de promover a sua utilização no tratamento da dor e de doenças inflamatórias.

4.5 Avaliação da atividade antimicrobiana por disco-difusão

Inicialmente, avaliou-se os efeitos dos derivados *N*-acilhidrazônicos JR04, JR09 e JR19 sobre o crescimento dos microrganismos patogênicos de importância clínica pelo método de disco-difusão. As linhagens microbianas selecionadas foram: *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *C. albicans*, *C. Tropicalis* e *C. crusei*. A ausência da formação de halos de inibição do crescimento microbiano indica que as substâncias em estudo não apresentaram atividade nas concentrações testadas por esta metodologia (Figura 39).

Figura 39 – Avaliação da atividade antimicrobiana por disco-difusão de derivados *N*-acilhidrazônicos frente à *S. aureus* ATCC 25922

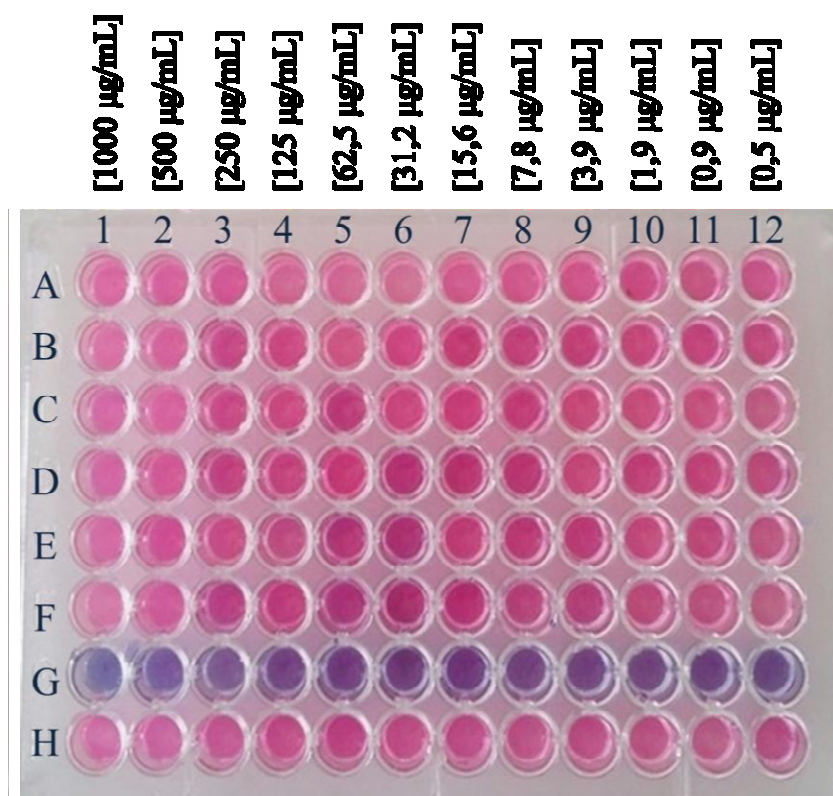


Legenda: JR04 [1000 μ g/mL], JR09 [1000 μ g/mL], JR19 [1000 μ g/mL], controle + = Gentamicina [120 μ g], controle - = Solução salina (NaCl 0,9%)

4.6 Avaliação da atividade antimicrobiana por microdiluição em caldo

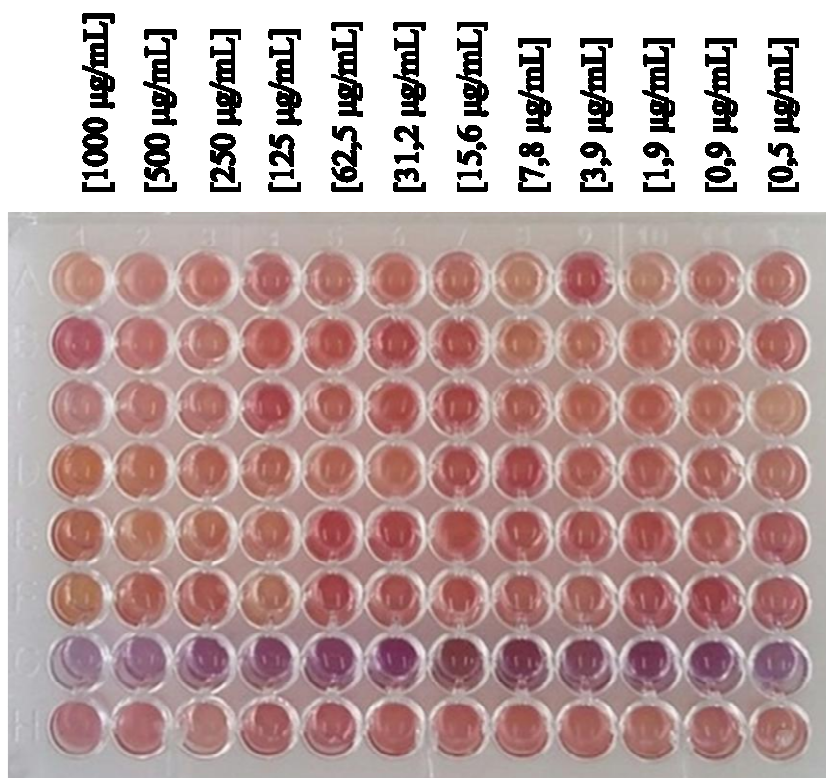
Posteriormente, foi realizado método de microdiluição em caldo, confirmando a ausência de atividade antimicrobiana das substâncias frente as linhagens de importância clínica utilizadas no experimento.

Figura 40 – Avaliação da atividade antimicrobiana de derivados *N*- acilhidrazônicos frente às linhagens de *S. aureus* ATCC 25923 (Linhas A e B), *P. aeruginosa* ATCC 27853 (Linhas C e D) e *E. coli* ATCC 25922 (Linhas E e F)



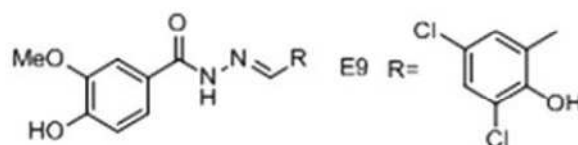
Legenda: Foram utilizadas diferentes concentrações, iniciando com 1000 µg/mL na coluna 1, seguindo de diluições seriadas até a coluna 12. Linha G = Controle negativo (meio de cultura + substância testada). Linha H = Controle positivo (meio de cultura + inóculo bacteriano) = *S. aureus* (Colunas 1-4), *P. aeruginosa* (Colunas 5-8), *E. coli* (Colunas 9-12).

Figura 41 – Avaliação da atividade antimicrobiana de derivados *N*- acilhidrazônicos frente às linhagens de *C. albicans* ATCC 76645 (Linhas A e B), *C. crusei* ATCC 40147 (Linhas C e D) e *C. tropicalis* ATCC 13803 (Linhas E e F)



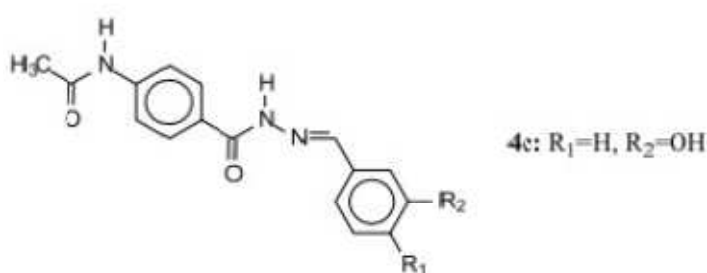
Legenda: Foram utilizadas diferentes concentrações, iniciando com 1000 µg/mL na coluna 1, seguindo de diluições seriadas até a coluna 12. Linha G = Controle negativo (meio de cultura + substância testada). Linha H = Controle positivo (meio de cultura + inóculo bacteriano) = *C. albicans* (Colunas 1-4), *C. tropicalis* (Colunas 5-8), *C. crusei* (Colunas 9-12).

Estudos anteriores evidenciaram a atividade antimicrobiana de compostos dessa natureza. No estudo de Wang et al. (2012) uma série de derivados acilhidrazônicos foram ativos contra linhagens bacterianas. O composto E9 ((E)-*N*-(3,5-dichloro-2-hydroxybenzylidene)-4-hydroxy-3-methoxybenzohydra-zide) foi o que exibiu melhor atividade, com valores de CIM de 0,39, 0,39, 1,56 e 0,78 ug/mL contra *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *Bacillus subtilis* (Figura 42).

Figura 42 – Derivado acilhidrazônico com potencial atividade antibacteriana

Fonte: Wang et al. (2012)

Cachiba et al. (2012) avaliou a sensibilidade bacteriana e fúngica frente a derivados *N*-acilhidrazônicos, não foi observada atividade de destaque contra as bactérias empregadas no ensaio. Por outro lado, pode-se destacar a atividade antifúngica relevante do composto 4C (*N*-(4-{[(2*E*)-2-(3-hidroxibenzilideno)hidrazino]carbonil}fenil)acetamida) contra *C. krusei*, não responsiva ao antifúngico fluconazol e responsável por infecções de grau significativo, sobretudo em pacientes imunocomprometidos (Figura 43).

Figura 43 – Derivado acilhidrazônico com potencial atividade antifúngica

Fonte: Cachiba et al. (2012)

A atividade antimicrobiana encontrada nos trabalhos supracitados provavelmente está relacionada aos grupamentos que foram combinados com a porção acilhidrazônica que já possuem um histórico para tal atividade e diferem dos compostos testados neste trabalho, que apresentam outros grupamentos, sugerindo a realização de estudos relação estrutura-atividade.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com os resultados obtidos neste estudo pode-se concluir que:

- Todos os derivados acilhidrazônicos previamente sintetizados tiveram suas características físico-químicas determinadas, com rendimentos plausíveis, de 54% a 89%, indicando rota sintética satisfatória;
- Todas as moléculas sintetizadas tiveram suas estruturas elucidadas por espectroscopia de RMN de ^1H e RMN de ^{13}C DEPT-Q, apresentando padrões de deslocamento e absorvância de acordo com a literatura confirmando a existências das mesmas, como sendo os compostos 2-ciano-*N'*-[4-(metilssulfonil)benzilideno]-acetohidrazida (JR04), *N'*-(benzilideno)-2-cianoacetohidrazida (JR09) e *N'*-[(1-*H*-indol-3-il)-metileno]-2-cianoacetohidrazida (JR19);
- De acordo com os resultados de RMN, foi observado a duplicidade dos picos, o que pode estar diretamente relacionado à configuração ou conformação adotada pelas moléculas podendo estar em configuração *Z* e *E* (isômeros) ou na conformação *syn* e *anti-periplanar* (confôrmeros);
- Os derivados *N*-acilhidrazônicos JR04, JR09 e JR19 apresentaram atividade anti-inflamatória promissora nos modelos de peritonite induzida por carragenina, bolsão de ar subcutâneo e edema de pata induzido por carragenina, com redução significativa da migração leucocitária e do edema, respectivamente;
- Não houve diferença significativa entre as doses de 10 e 20 mg do JR04 e JR19, dessa forma, foi selecionada a dose de 10mg/kg;
- Os derivados JR09 E JR19 foram ativos na fase inflamatória do modelo de nocicepção induzida por formalina;
- No modelo de dor orofacial induzida por formalina, não houve atividade dos compostos na fase neurogênica, na fase inflamatória apenas o composto JR19 foi ativo, sugerindo que o mesmo está envolvido com mecanismos periféricos, atuando na dor inflamatória;
- Na avaliação da toxicidade aguda dos compostos JR09 e JR19 não houve morte nem alterações comportamentais ou fisiológicas, indicando baixa toxicidade dos compostos testadas na dose de 100mg/kg por v.o..
- O composto JR19 apresentou atividades anti-inflamatória e antinociceptiva promissoras em comparação com os demais compostos estudados;
- Neste estudo, não foi observada inibição do crescimento dos microrganismos

testados, indicando ausência de atividade antimicrobiana dos compostos em questão, pelos métodos de disco-difusão e microdiluição em caldo;

- Sugere-se a realização de mais estudos, incluindo estudos pré-clínicos, clínicos e até mesmo o desenvolvimento de uma formulação com os compostos relatados.

REFERÊNCIAS

AGUIAR, F. J. B.; FERREIRA-JÚNIOR, M.; SALES, M. M.; CRUZ-NETO, L. M.; FONSECA, L. A. M.; SUMITA, N. M.; DUARTE, N. J. C.; LICHTENSTEIN, A.; DUARTE, A. J. S. Proteína C reativa: aplicações clínicas e propostas para utilização racional. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 59, n.1, p. 85-92, 2013.

ALMEIDA, R. N. Triagem farmacológica comportamental. In: **Psicofarmacologia: fundamentos práticos**. 1ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap. 11, p.131-137, 2006.

BARREIRO, E. J. A. Química medicinal e o paradigma do composto-protótipo. **Revista Virtual de Química**, v. 1, n. 1, p. 26-34, 2009.

BARROS, F.E.V.; SOUSA, M.G.T.; COSTA, J.L.; OLEA, R.S.G.; FREIRE, S.M.F.; BORGES, A.C.R.; BORGES, M.O.R. Avaliação das atividades analgésica e antiinflamatória do extrato metanólico de *Calotropisprocera*, R. Br. (ciúme). **Infarma**, v.16, n.9-10, p.60-64, 2004.

BRASIL. Farmacopeia Brasileira, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília, 5 ed., 2010. 546 p.

BRASIL. Ministério da Educação. Universidade Federal de Lavras, Departamento de Medicina Veterinária. **Métodos de avaliação laboratorial da atividade antinociceptiva e anti-inflamatória de produtos naturais**. Lavras, 2014.

GOVINDASAMI, T.; PANDEY, A.; PALANIVELU, N.; PANDEY, A. Synthesis, characterization and antibacterial activity of biologically important vanillin related hydrazone derivatives. **International Journal of Organic Chemistry**, London, v. 1, p. 71-77. 2011.

CACHIBA, T. H.; CARVALHO, B. D.; CARVALHO, D. T. CUSINATO, M.; PRADO, C. G.; DIAS, A. L. T. Síntese e avaliação preliminar da atividade antibacteriana e antifúngica de derivados *N*-acilidrazônicos. **Química Nova**, São Paulo, v. 35, n. 8, p. 1566-1569, 2012.

CATÃO, R. M. R.; BARBOSA FILHO, J. M.; LIMA, E. O.; FERREIRA, M. S. V.; SILVA, M. A. R. S.; ARRUDA, T. A.; ANTUNES, R. M. P. Avaliação da atividade antimicrobiana e efeitos biológicos de riparinas sobre eliminação de resistência a drogas em amostras de *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, Rio de Janeiro, v. 42, n. 1, p. 9-14, 2010.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: 25º Suplemento Informativo**. M100-S25, v. 35, n. 3, Wayne, Pensylvania, 2015.

CUNHA, L.C.; MELO, D. F. A.; PEREIRA, M. E.; MELO, D. S.; PARENTE, L. L.; SILVA, M. A. C.; CONCEIÇÃO, E. C.; GONZAGA, L. Q. S. Avaliação da toxicidade aguda do extrato aquoso de *Apeiba tibourbou* Aubl (Tiliaceae), em camundongos e ratos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, São Paulo, v.34, n.3, p.357-352, 2013.

DUBUISSON, D.; DENNIS, S.G. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. **Pain**, Amsterdam, v.4, p.161-174, 1977.

- FARIAS, S. R. **Bioquímica Clínica: uma abordagem geral**. Campina Grande: EDUEP, 2007. 292 p.
- FRANCISCHETTI, I.; MORENO, J. B.; SCHOLZ, M.; YOSHIDA, S. M. Os leucócitos e a resposta inflamatória na lesão de isquemia-reperusão. **Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular**, São Paulo, v. 25, n.4, p.575-584, 2010.
- GOODMAN, S. L.; GILMAN, G. A. **Manual de farmacologia e terapêutica de Goodman e Gilman**. 2. ed. Porto Alegre: AMGH, 2015. 1204 p.
- GOVINDASAMI, T.; PANDEY, A.; PALANIVELU, N.; PANDEY, A. Synthesis, characterization and antibacterial activity of biologically important vanillin related hydrazone derivatives. **International Journal of Organic Chemistry**, London, v. 1, p. 71-77. 2011.
- GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 3, p. 667-679, 2010.
- GUIMARÃES, H. A.; NASCIMENTO, M. V. M.; TAVARES, A.; GALDINO, P. M.; PAULA, J. R.; COSTA, E. A. Effects of ethanolic extract of leaves of *Lafoensia pacari* A. St.-Hil., Lythraceae (pacari), in pain and inflammation models. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. São Paulo, v. 20, n.3, p. 328-333, 2010.
- HERNÁNDEZ, P.; ROJAS, R.; GILMAN, R. H.; SAUVAIN, M.; LIMA, L. M.; BARREIRO, E. J.; GONZÁLEZ, M.; CERECETTO, H. Hybrid furoxanyl *N*-acylhydrazone derivatives as hits for the development of neglected diseases drug candidates. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Paris, v. 7, n. 59C, p. 64-74. 2013.
- JAIN, M.; PARMAR, H. S. Evaluation of antioxidative and anti-inflammatory potential of hesperidin and naringin on the rat air pouch model of inflammation. **Inflammation Research**, Basel, v. 60, n. 5, p. 483-91, 2011.
- KANG, S.; KIM, C. H.; LEE, H.; KIM, D. Y.; HAN, J. I.; CHUNG, R. K.; LEE, G. Y. Antinociceptive Synergy between the cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 and bupivacaine in the rat formalin test. **Anesthesia & Analgesia**, Baltimore, v. 104, n. 3, p.719-725, 2007.
- LAPA, A. J. et al. **Métodos de avaliação da atividade farmacológica de plantas medicinais**. 5.ed. São Paulo: Setor de Produtos Naturais, Departamento de Farmacologia, UNIFESP/EPM, 2007. 119 p.
- LOPES, A. B.; MIGUEZ, E.; KÜMMEERLE, A. E.; RUMJANEK, V. M.; FRAGA, C. A. M.; BARREIRO, E. J. Characterization of amide bond conformers for a novel heterocyclic template of *N*-acylhydrazone derivatives. **Molecules**, v. 18, p. 11683-11704, 2013.
- MALIK, M. A.; AL-THABAITI, S. A.; MALIK, M. A. Synthesis, structure optimization and antifungal screening of novel tetrazole ring bearing acyl-hidrazones. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v.13, p. 10880-10898. 2012.
- MENDES, S. S.; BOMFIM, R. R.; JESUS, H. C.; ALVES, P. B.; BLANK, A. F.; ESTEVAM, C. S.; ANTONIOLLI, A. R.; THOMAZZI, S. M. Evaluation of the analgesic

- and anti-inflammatory effects of the essential oil of *Lippia gracilis* leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, Amsterdam, v.129, p. 391-397, 2010.
- MORRIS, C. J. **Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse**. In: Methods in Molecular Biology, Humana Press Inc., Totowa, 2003. p. 115-121.
- 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.
- MULLER, W. A. Leukocyte-endothelial cell interactions in the inflammatory response. **Laboratory Investigation**, New York, v. 82, p. 521-533, 2002.
- OLIVEIRA, M. A.; YOSHIDA, M. I.; GOMES, E. C. L.; Análise térmica aplicada a fármacos e formulações farmacêuticas na indústria farmacêutica. **Química Nova**, São Paulo, v. 34, n. 7, p. 1224-1230, 2011.
- PAULINO, N.; ABREU, S. R. L.; UTO, Y.; KOYAMA, D.; NAGASAWA, H.; HORI, H.; DIRSCH, V. M.; VOLLMAR, A. M.; SCREMIN, A.; BRETZ, W. A. Anti-inflammatory effects of a bioavailable compound, Artepillin C, in Brazilian propolis. **European journal of pharmacology**, Amsterdam, v. 587, p. 1-3, 2008.
- PERLA, A. S. **Estudo do comportamento nociceptivo, por meio dos reflexos de auto-limpeza e retirada de cauda, em modelo de ativação periférica e sistêmica de vias trigeminais**. 2007. Dissertação (Mestrado em Neurociências), Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2007.
- QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; MELO, M. S.; SOUSA, D. P.; ARAÚJO, A. A. S.; ONOFRE, A. C. S.; GELAIN, D. P.; GONÇALVES, J. C. R.; ARAÚJO, A. A. M.; ALMEIDA, J. R. G. S.; BONJARDIM, L. R. Antinociceptive effects of citronella in formalin, capsaicin, and glutamate – induced orofacial nociception in rodents and its action on nerve excitability. **Journal of Orofacial Pain**, v. 24, n. 3, p. 305 – 312, 2010.
- RABOISSON, P.; DALLEL, R. The orofacial formalin test. **Neuroscience Biobehavioral Reviews**, v. 28, n. 2, p. 219 – 226, 2004.
- RAMOS, E. H. S. **Avaliação das atividades biológicas do óleo essencial do látex de *Mangifera indica* L. (var. espada e rosa)**. 96 f. Tese (Doutorado em Inovação Terapêutica) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2014.
- SEDGWICK, A. D.; LEES, P. A comparison of air pouch, sponge and pleurisy models of acute carrageenan inflammation in the rat. **Agents and Actions**, Basel, v. 18, p. 439-446, 1986.
- SHERWOOD, E. R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best practice & research. Clinical anaesthesiology**, London, v. 18, p. 385-405, 2004.

- SILVA, J. C. **Efeito antinociceptivo e anti-inflamatório de *Annona vepretorum* mart. (annonaceae) em roedores.** 2013. 183 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Naturais do Semiárido). Universidade do Vale do São Francisco, Petrolina, 2013.
- SILVA, S. N.; ABREU, I. C.; SILVA, G. F. C.; RIBEIRO, R. M.; LOPES, A. S.; CARTÁGENES, M. S. S.; FREIRE, S. M. F.; BORGES, A. C. R.; BORGES, M. O. R. The toxicity evaluation of *Syzygium cumini* leaves in rodents. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, 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, Y. K.; REYES, C. T.; RIVERA, G.; ALVES, M. A.; BARREIRO, E. J.; MOREIRA, M. S.; LIMA, L. M. 3-aminothiophene-2-acylhydrazones: non-toxic, analgesic and anti-inflammatory lead-candidates. **Molecules**. New York, v. 19, n. 6, p. 8456-71, 2014.
- SOARES, T. A. **Síntese e avaliação farmacológica de uma nova série de derivados indolil-N-acilidrazônicos planejados como ligantes canabinóides.** 195 f. 2011. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.
- THOMAZZI, S.M.; SILVA, C. B.; SILVEIRA, D. C.; VASCONCELLOS, C. L.; LIRA, A. F.; CAMBUI, E. V.; ESTEVAM, C. S.; ANTONIOLLI, A. R. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of *Bowdichia virgilioides* (sucupira). *Journal of Ethnopharmacology*, v. 127, p. 451-456, 2010.
- VALADARES, M. C. Avaliação de toxicidade aguda: Estratégias após a “Era do Teste DL50”. **Revista Eletrônica de Farmácia**, Goiás, v. 3, p. 93-98, 2006.
- VANDOOREN, J.; BERGHMANS, N.; DILLEN, C.; VAN, A. I.; RONSSE, I.; ISRAEL, L. L.; ROSENBERGER, I.; KREUTER, J.; LELLOUCHE, J. P.; MICHAELI, S.; LOCATELLI, E.; FRANCHINI, M. C.; AIERTZA, M. K.; SÁNCHEZ-ABELLA, L.; LOINAZ, I.; EDWARDS, D. R.; SHENKMAN, L. OPDENAKKER, G. Intradermal air pouch leukocytosis as an in vivo test for nanoparticles. **International Journal of Nanomedicine**, Babol, v. 8, p. 4745-56, 2013.
- YOON, M. H.; CHOI, J. I. Pharmacologic interaction between cannabinoid and either clonidine or neostigmine in the rat formalin test. **Anesthesiology**, Philadelphia, v. 99, p. 701-707, 2003.
- WANG, X. L.; ZHANG, Y. B.; TANG, J. F.; YANG, Y. S.; CHEN, R. Q.; ZHANG, F.; ZHU, H. L. Design, synthesis and antibacterial activities of vanillic acylhydrazone derivatives as potential b-ketoacyl-acyl carrier protein synthase III (FabH) inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Paris, v. 57, p. 373-382, 2012.

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: **Vanda Lúcia dos Santos**
Título do Projeto: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTIMICROBIANA DE DERIVADOS N-ACILIDRAZÔNICOS

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 a 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
Tharcia Kiara B. de Oliveira
 Coordenadora do CEUA-CESED

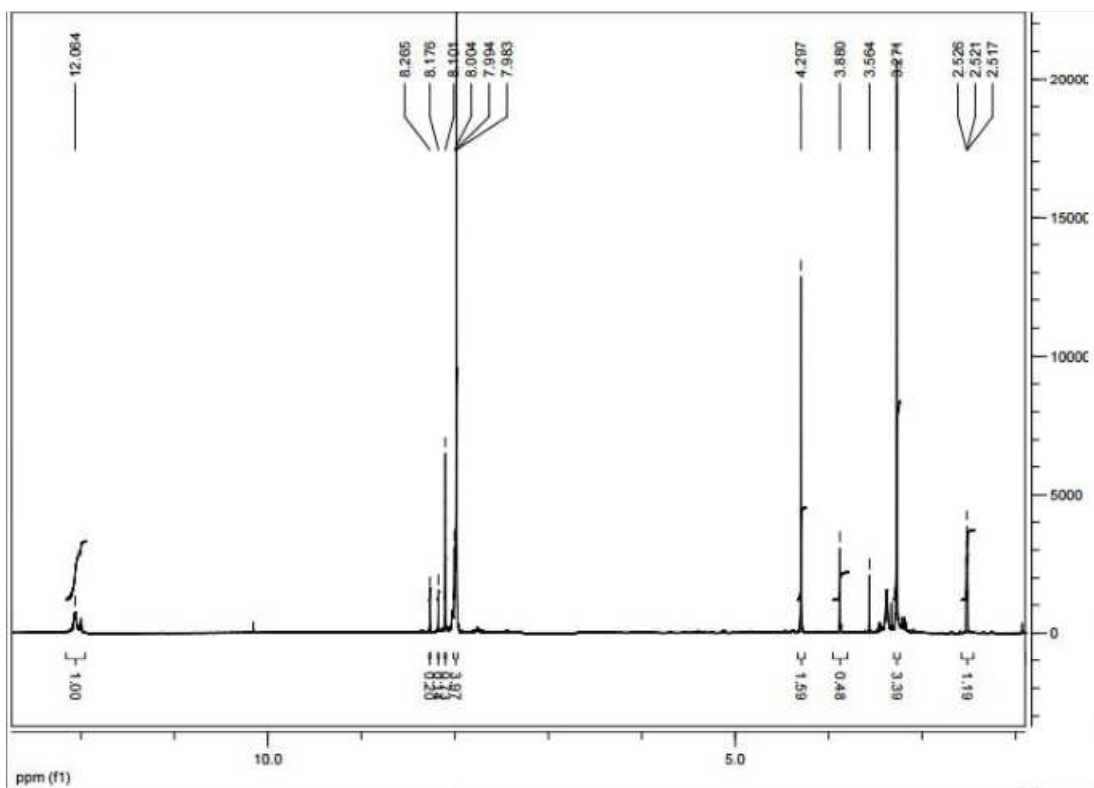
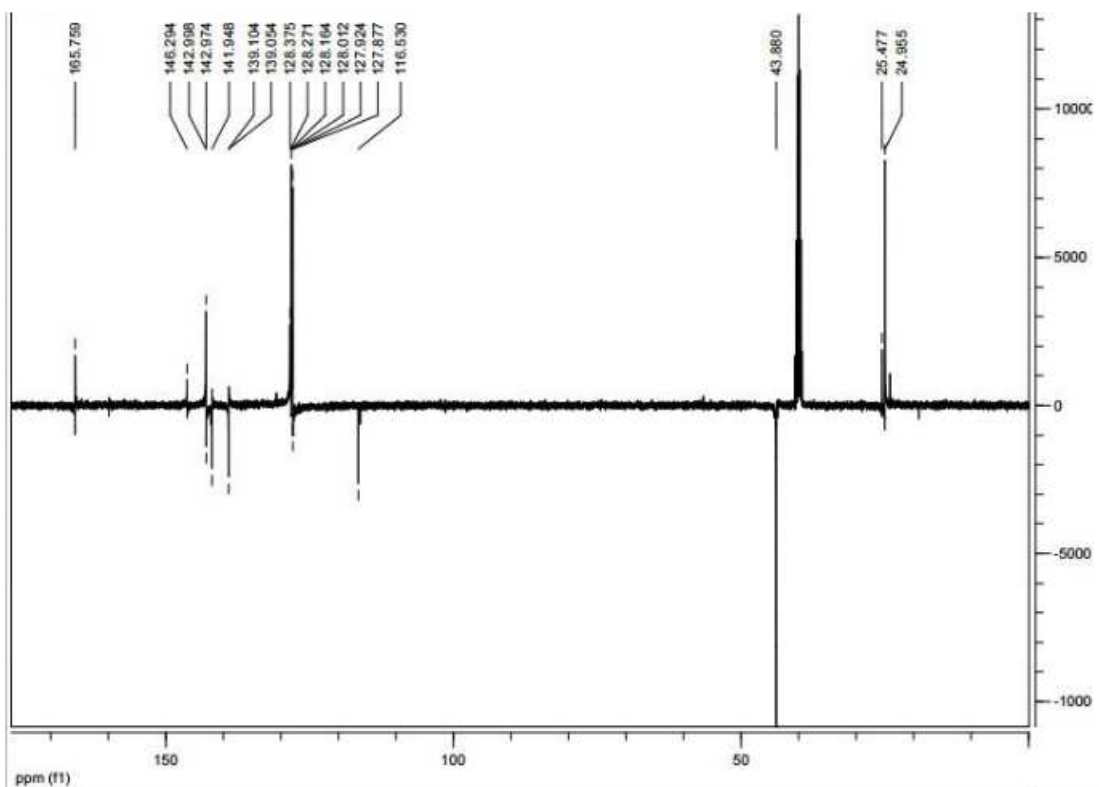


Av. Senador Argemiro de Figueiredo, 1501 - Jararú
 CEP: 58104-590 - Campina Grande, PB Fone: 83 2101.8800

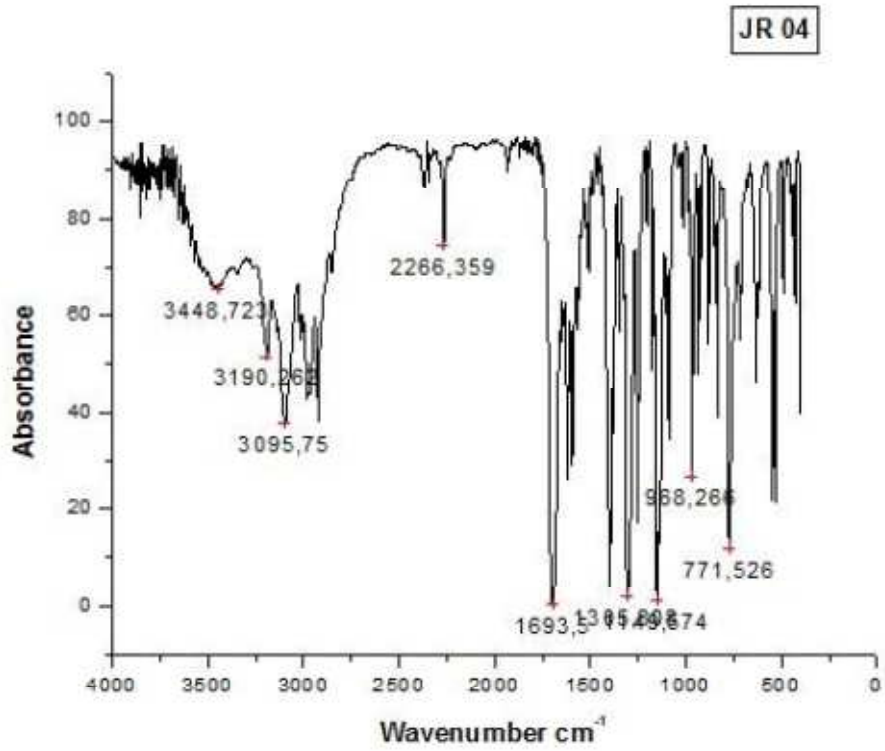
ANEXO 2. Protocolo utilizado na triagem farmacológica comportamental

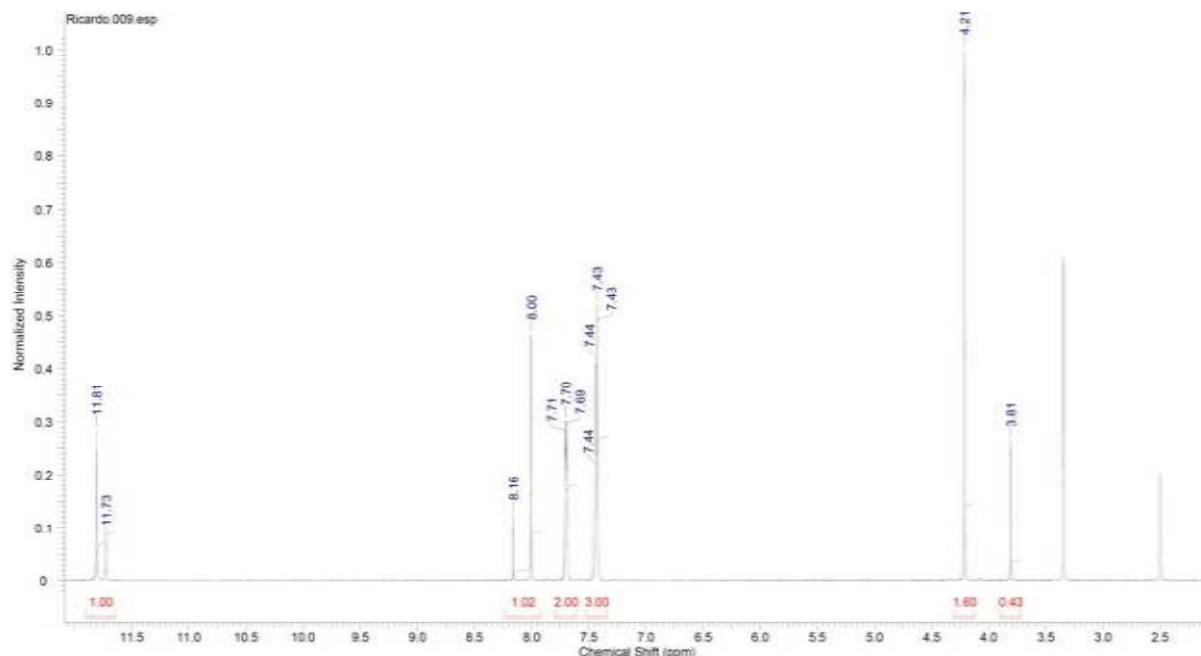
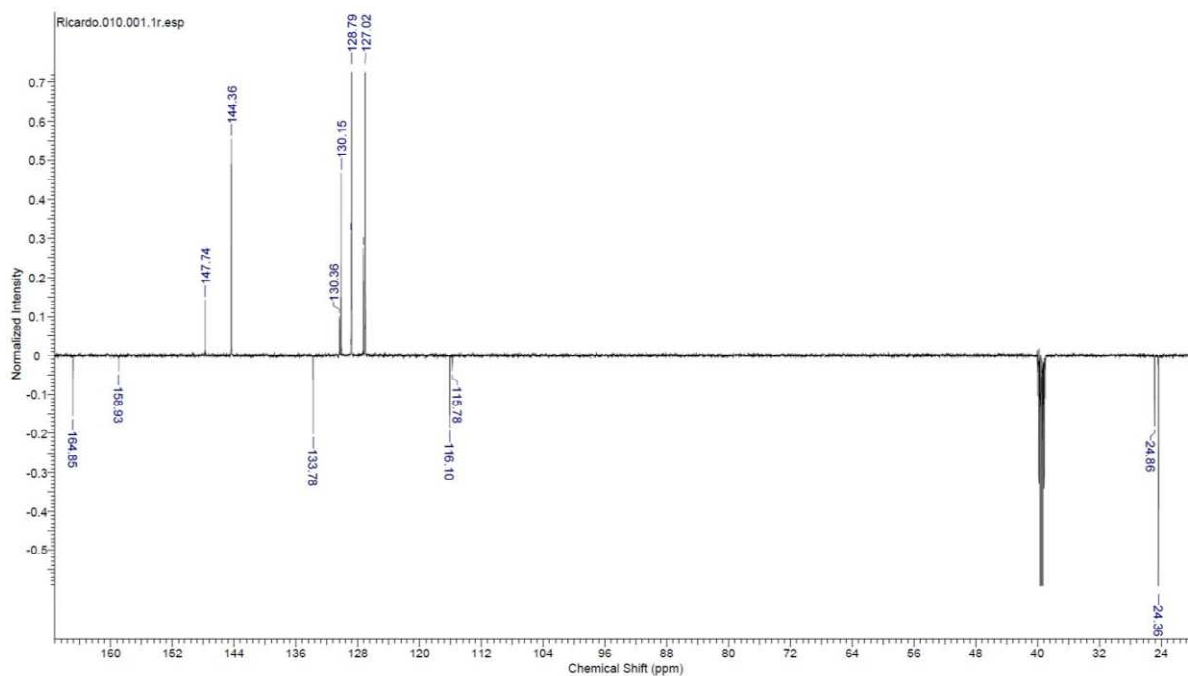
Atividade farmacológica	Quantificação dos efeitos (0) sem efeito, (-) efeito diminuído, (+) efeito presente, (++) efeito intenso				
	até 30`	1 h	2 h	3 h	4 h
1 – SNC					
a – Estimulante					
Hiperatividade					
Irritabilidade					
Agressividade					
Tremores					
Convulsões					
Piloereção					
Movimento 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					
Estereotípia					
2 - SN AUTÔNOMO					
Diarréia					
Constipação					
Defecação aumentada					
Respiração forçada					
Lacrimejamento					
Micção					
Salivação					
Cianose					
Tono muscular					
Força para agarrar					
3 – MORTE					

Observações complementares: _____

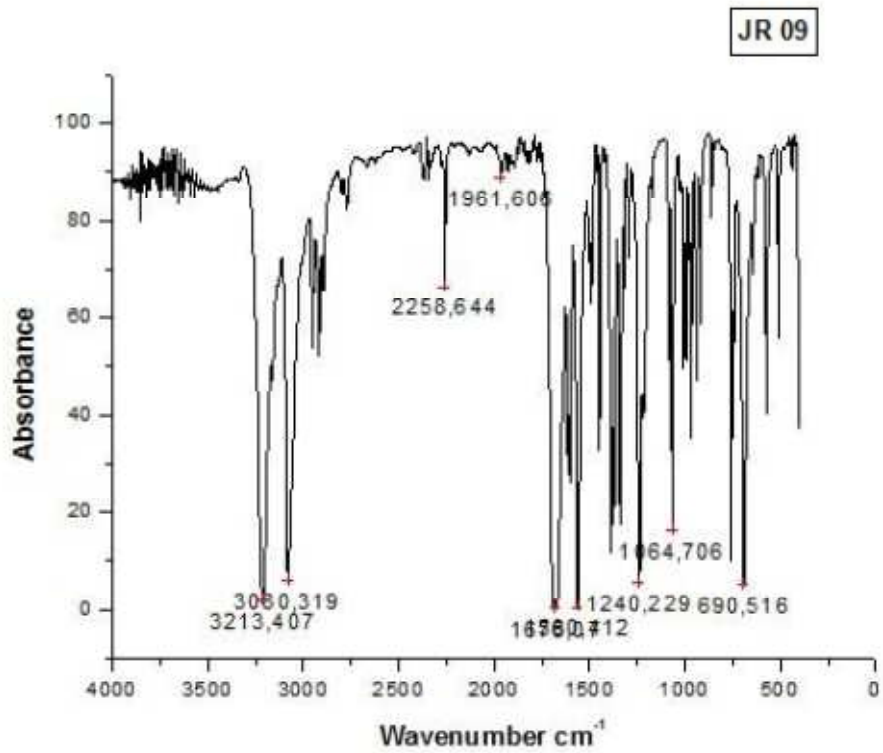
ANEXO 3. Espectros de RMN¹H, RMN¹³C e IV referentes ao derivado JR04**E1 – Espectro de RMN ¹H do derivado JR04 (500 MHz, DMSO-d₆)****E2 – Espectro de RMN ¹³C do derivado JR04 (125 MHz, DMSO-d₆)**

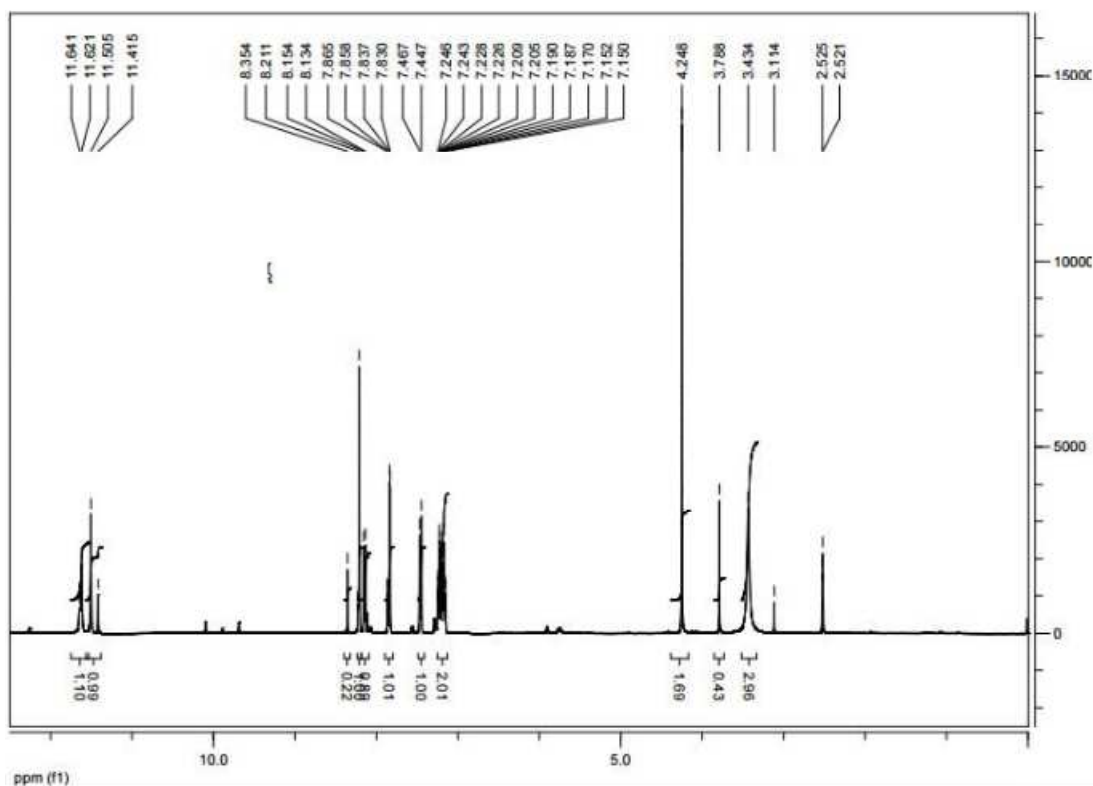
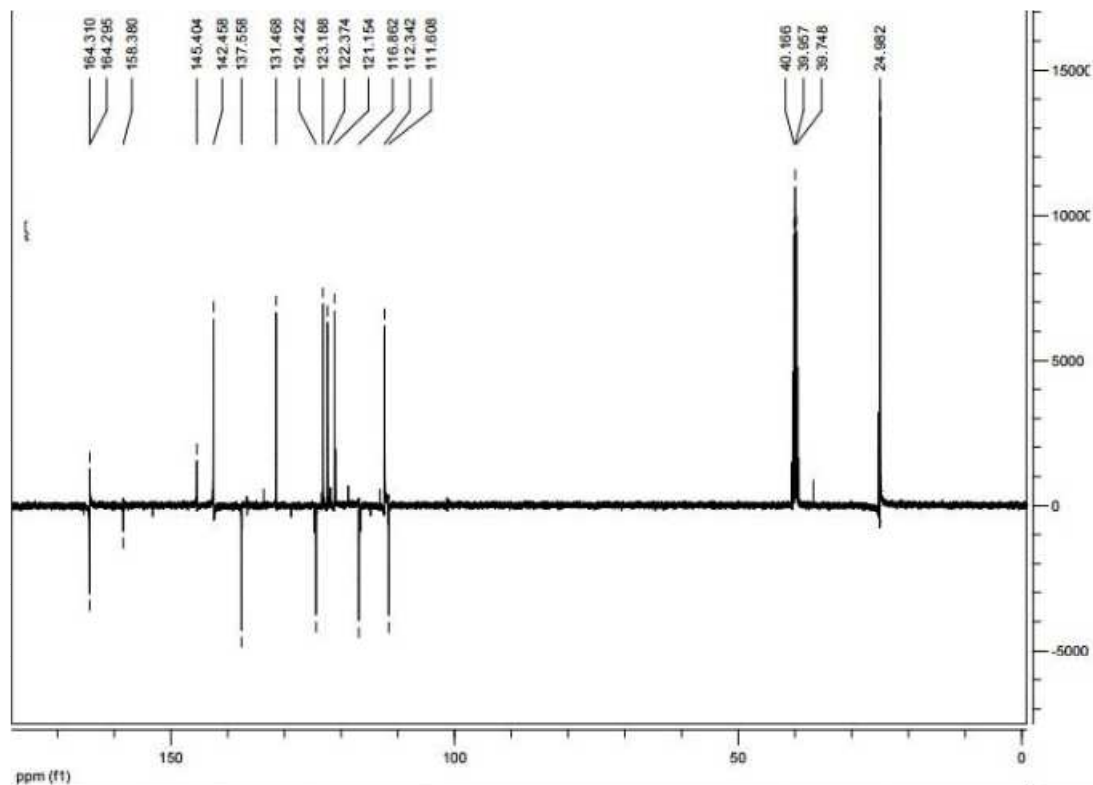
E3 – Espectro de IV do derivado JR04 (KBr)



ANEXO 4. Espectros de RMN¹H, RMN¹³C e IV referentes ao derivado JR09**E1 – Espectro de RMN ¹H do derivado JR09 (500 MHz, DMSO-d₆)****E2 – Espectro de RMN ¹³C do derivado JR09 (125 MHz, DMSO-d₆)**

E3 – Espectro de IV do derivado JR09 (KBr)



ANEXO 5. Espectros de RMN¹H, RMN¹³C e IV referentes ao derivado JR19E1 – Espectro de RMN ¹H do derivado JR19 (500 MHz, DMSO-d₆)E2 – Espectro de RMN ¹³C do derivado JR19 (125 MHz, DMSO-d₆)

E3 – Espectro de IV do derivado JR19 (KBr)

