



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

PABLO RAYFF DA SILVA

**SÍNTESE E PERFIL ANTI-INFLAMATÓRIO *IN VITRO* E *IN VIVO* DE DERIVADOS
FENILACETAMIDA E FENILACRILAMIDA**

CAMPINA GRANDE

2020

PABLO RAYFF DA SILVA

**SÍNTESE E PERFIL ANTI-INFLAMATÓRIO *IN VITRO* E *IN VIVO* DE DERIVADOS
FENILACETAMIDA E FENILACRILAMIDA**

Dissertação de mestrado apresentado ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF) 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, sintéticos e biotecnológicos de interesse farmacêutico.

Orientadora:

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

Coorientador:

Prof. Dr. Ricardo Olímpio de Moura

CAMPINA GRANDE

2020

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

S586s Silva, Pablo Rayff da.
Síntese e perfil anti-inflamatório *in vitro* e *in vivo* de derivados fenilacetamida e fenilacrilamida [manuscrito] / Pablo Rayff da Silva. - 2020.
111 p. : il. colorido.
Digitado.
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2020.
"Orientação : Profa. Dra. Vanda Lucia dos Santos, Departamento de Farmácia - CCBS."
"Coorientação: Prof. Dr. Ricardo Olímpio de Moura, Departamento de Farmácia - CCBS."
1. Fenilacrilamida. 2. Imunomodulação. 3. Inflamação aguda. 4. Mediadores inflamatórios. I. Título
21. ed. CDD 615.1

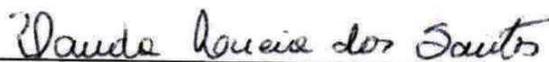
PABLO RAYFF DA SILVA

SÍNTESE E PERFIL ANTI-INFLAMATÓRIO *IN VITRO* E *IN VIVO* DE
DERIVADOS FENILACETAMIDA E FENILACRILAMIDA

Dissertação de mestrado apresentado ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF) da Universidade Estadual da Paraíba como exigência para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em: 17/02/2020.

Banca Examinadora



Prof.^a Dr.^a Vanda Lucia dos Santos (Orientadora)
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



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



Prof. Dr. Lúcio Roberto Cançado Castellano (Examinador interno)
Universidade Federal da Paraíba/ PPGCG (UFPB/UEPB)



Prof. Dr.^a Alyne da Silva Portela (Examinador externo)
(Unifacisa)

DEDICATÓRIA

A Deus por toda generosidade que me fez chegar até aqui e a minha família, por todo carinho, direcionamento e incentivo, *DEDICO*.

AGRADECIMENTOS

A gente sonha, Deus realiza! E foi justamente por acreditar que não se é colocado desejos irrealizáveis em nossos corações, hoje posso contemplar aquilo que já tinha sido sonhado desde a eternidade!

A Deus e a Nossa Senhora minha gratidão pelo sustento e por todas as demonstrações de cuidado representado por tantas pessoas que passaram por mim durante essa trajetória. Essa conquista me faz ter uma certeza, nunca estive sozinho!

Aos meus pais Sandra Maria Silva e Francisco Pereira da Silva Neto, irmãos: Flávia e Rodrigo, sobrinhos: Pedro, Manu e Mariana, cunhado: Alysson e cunhada: Nuêdja por acreditar, e acima de tudo, por me fazer enxergar que as dificuldades nos leva a caminhos extraordinários. Tenham essa frase como verdade. O acreditar de vocês me fez chegar muito além do que imaginava.

As minhas avós, Netinha e Severina, pelo grande exemplo de garra, sabedoria e simplicidade.

Ao meu afilhado Luiz Miguel, que apesar da pouca idade, ressignificar diariamente o real sentido da vida.

A minha Orientadora Vanda Lucia dos Santos, pelo exemplo de humanidade, competência e acima de tudo por ter acreditado e me acolhido desde a iniciação científica. Serei eternamente grato por todas as contribuições na minha formação acadêmica e pessoal.

Ao professor Ricardo Olímpio de Moura pela sua disponibilidade, parceria e amizade e por ter me aberto as portas do LDSF. Seus ensinamentos foram essenciais para a concretização dessa etapa tão importante.

A professora Cristiane Flora Villareal e toda sua equipe do Laboratório de Farmacologia e Terapêutica Experimental (LAFTE) em especial: Renan, Dourivaldo, Ilbele e Diego pelo acolhimento, contribuição e ajuda nos experimentos, e por tanto contribuir na execução desse projeto.

A professora Ana Claudia Dantas de Medeiros por todo incentivo e motivação durante esses dois anos de mestrado.

Aos professores Lucio Castellano e Alyne Portela por ter aceito compor a banca deste trabalho e por todas as contribuições de grande valia.

A UFBA, UFPB, UFPE, UFRRJ pelas parcerias na execução das análises das moléculas sintetizadas neste trabalho, e todos os técnicos e alunos envolvidos, em especial a Camila Melo, Gleyton e Malu.

Aos meus amigos da graduação que tanto contribuíram para eu estar aqui hoje: Alisson, Blenda, Dani, Geovana, Lucas, Mariana, Messias, Raiff, Rafael, Ranussa e Luiz Paulo. Lembrarei de vocês sempre com muito carinho e gratidão por tudo que vivenciamos e por tantas lições que carrego até hoje.

Aos meus amigos do mestrado: Amaro, Camila Melo, Demis, Gleyton, Fernanda, Isabela, Jéssica Cabral, Joandra, Larissa, Lucas Almeida, Layla, Máisa, Renaly, Sonaly, Willian e Widson. Pelo suporte, companheirismo e por estarmos partilhando as conquistas um dos outros.

A equipe do laboratório de ensaios farmacológicos, em especial minha aluna de iniciação científica, Cris, pela sua disponibilidade e contribuição nos experimentos.

A minha querida Dilma, ex secretária do PPFCE pela paciência, e por tantas vezes nos escutar com tanto carinho.

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

A FAPESQ (Capes) pelo financiamento de todo esse trabalho.

A todos, o meu muito obrigado!

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

“Entre a palavra e o cumprimento da palavra, Deus testa a sua fé. Entre o sonho e a realização do sonho, a história testa a sua perseverança. Entre o que você é e o que você será, a sociedade testa a sua paciência. Portanto, tenhamos fé, esperança e paciência. O tempo há de premiar quem as tem”.

(Samer Agi)

RESUMO

As abordagens terapêuticas para o tratamento de condições inflamatórias são focadas na supressão, bloqueio ou inibição de mediadores inflamatórios. Os medicamentos disponíveis no mercado para essas desordens apesar de efetivos, possuem como limitações os distúrbios gastrointestinais, renais, cardiovasculares e metabólicos, tornando o desenvolvimento de novos fármacos necessário. O objetivo desse estudo foi desenvolver, caracterizar e avaliar o perfil anti-inflamatório *in vitro* e *in vivo* dos derivados: 2-ciano *N*-fenilacetamida – JM-01; (E) -2-ciano-3-(1H-indol-3-il) -*N*-fenilacrilamida – ICMD-01 e (E) -2-ciano-*N*,3-difenilacrilamida – JMPR-01 e posteriormente determinar o potencial toxicológico do composto mais promissor. Os compostos foram obtidos por meio de uma reação de amidação entre anilinas substituídas e 2-cianoacetato de etila, seguido de uma reação de condensação do tipo *Knoevenagel* com aldeídos substituídos sendo a elucidação estrutural realizada por técnicas espectroscópicas e espectrométricas. Para avaliação do potencial anti-inflamatório *in vitro* foram realizados os ensaios de viabilidade celular, dosagens de citocinas e nitrito em culturas de macrófagos J774 e *in vivo*: peritonite induzida por *zymosan*, edema, hiperalgesia inflamatória, medições de citocinas e prostaglandina E₂ induzido por CFA. O efeito antinociceptivo e as alterações adaptativas motoras dos animais tratados com os compostos foram avaliados pelos ensaios *tail-flick* e *rota rod*. A determinação da segurança de uso foi realizada empregando-se os modelos de toxicidade aguda de dose única, atividade hemolítica *in vitro* e susceptibilidade ulcerogênica. As predições farmacocinéticas foram realizadas utilizando as plataformas *SwissADME* e *Xenosite*. A síntese dos compostos JM-01, JMPR-01 e ICMD-01 mostrou-se viável, com rendimentos satisfatórios fácil purificação e com resultados espectroscópicos e espectrométricos condizentes a estrutura. Os resultados *in vitro* para os compostos apresentaram inibições significativas ($p < 0,05$) da produção de nitrito e citocinas em concentrações de até 50 μM para o JM-01 e JMPR-01 e 100 μM para o ICMD-01. No teste de peritonite induzida por *zymosan* todos os derivados apresentaram inibição da migração leucocitária nas doses de (5, 10 e 50 mg kg^{-1}) significativamente diferente do grupo controle ($p < 0,05$) com atividade superior ao grupo tratado com indometacina na dose de 10 mg kg^{-1} . No edema de pata induzido por CFA o composto com melhor perfil de atividade antiedematogênica nos tempos de 2 a 6h foi o ICMD-01 (50 mg kg^{-1}), apresentando respectivamente inibição de 44,45, 57,14 e 67,34%. O ICMD-01 também apresentou redução significativa ($p < 0,05$) dos níveis locais de IL-1 β e TNF- α e PGE₂ quando comparado ao grupo controle. Para a IL-1 β e PGE₂ inibição promovida pelo ICMD-01 é comparável ao da dexametasona (2 mg kg^{-1}), enquanto para o TNF- α o composto mostrou-se superior. Com relação a atividade sedativa, antinociceptiva inflamatória e central nenhum dos compostos induziram efeitos consideráveis. No perfil toxicológico do ICMD-01, não foram evidenciados sinais clínicos relevantes nem morte durante a experimentação de toxicidade aguda, além de uma boa tolerabilidade gástrica. Também não foram evidenciados grau excedente de atividade hemolítica. Nas predições farmacocinéticas puderam-se observar que os compostos JM-01, JMPR-01 e ICMD-01, são potencialmente bem absorvidos pelo TGI e permeáveis a BHE além disso, apresentam pontos susceptíveis a metabolização que podem influenciar no efeito farmacológico. Esses estudos iniciais contribuem para validação do potencial biológico desses derivados, tornando-os fortes candidatos a fármacos anti-inflamatório com baixo potencial ulcerogênico.

Palavras chave: Fenilacrilamida. Imunomodulação. Inflamação aguda.

ABSTRACT

Therapeutic approaches to the treatment of inflammatory conditions are focused on suppressing, blocking or inhibiting inflammatory mediators. The drugs available on the market for these disorders, although effective, have as limitations gastrointestinal, renal, cardiovascular and metabolic disorders, making the development of new drugs necessary. The objective of this study was to develop, characterize and evaluate the *in vitro* and *in vivo* anti-inflammatory profile of the derivatives: 2-cyan N-phenylacetamide - JM-01; (E) -2-cyano-3- (1H-indol-3-yl) - N-phenylacrylamide - ICMD-01 and (E) -2-cyano-N,3-diphenylacrylamide -JMPR-01 and later determine the toxicological potential of the most promising compound. The compounds were obtained through an amidation reaction between substituted anilines and ethyl 2-cyanoacetate, followed by a *Knoevenagel*-type condensation reaction with substituted aldehydes, the structural elucidation being performed by spectroscopic and spectrometric techniques. To evaluate the anti-inflammatory potential *in vitro*, cell viability tests, cytokine and nitrite dosages in J774 macrophage cultures and *in vivo*: zymosan-induced peritonitis, edema, inflammatory hyperalgesia, cytokine and prostaglandin E₂ measurements CFA-induced. The antinociceptive effect and motor adaptive changes of animals treated with the compounds were evaluated by tail-flick and rota rod tests. The determination of safety of use was performed using single dose acute toxicity models, *in vitro* hemolytic activity and ulcerogenic susceptibility. Pharmacokinetic predictions were performed using the SwissADME and Xenosite platforms. The synthesis of the compounds JM-01, JMPR-01 and ICMD-01 proved feasible, with satisfactory yields easy to purify and with spectrometric and spectroscopic results consistent with the structure. *In vitro* results for the compounds showed significant inhibitions ($p < 0.05$) of nitrite and cytokine production in concentrations up to 50 μM for JM-01 and JMPR-01 and 100 μM for ICMD-01. In the zymosan-induced peritonitis test all the derivatives showed inhibition of leukocyte migration at doses of (5, 10 and 50 mg kg^{-1}) significantly different from the control group ($p < 0.05$) with activity higher than the group treated with indomethacin at doses of 10 mg kg^{-1} . In CFA-induced paw edema the compound with the best profile of antiedematogenic activity in times from 2 to 6 hours was the ICMD-01 (50 mg kg^{-1}), presenting respectively inhibition of 44.45, 57.14 and 67.34%. The ICMD-01 also showed a significant reduction ($p < 0.05$) of local IL-1 β and TNF- α and PGE₂ levels when compared to the control group. For IL-1 β and PGE₂ inhibition promoted by the ICMD-01 is comparable to that of dexamethasone (2 mg kg^{-1}), while for TNF- α the compound proved superior. Regarding the sedative, antinociceptive and central activity none of the compounds induced considerable effects. In the toxicological profile of ICMD-01, no relevant clinical signs or death were evidenced during the acute toxicity experiment, besides a good gastric tolerance. Also no excess degree of hemolytic activity was evidenced. In the pharmacokinetic predictions it was observed that the compounds JM-01, JMPR-01 and ICMD-01, are potentially well absorbed by the TGI and permeable to Hb in addition, have points susceptible to metabolization that can influence the pharmacological effect. These initial studies contribute to validate the biological potential of these derivatives, making them strong candidates for anti-inflammatory drugs with low ulcerogenic potential.

Key words: Phenylacrylamide. Immunomodulation. Acute inflammation.

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1.	Sinalização intracelular via receptores Toll like (TLRS)	26
Figura 2.	Caminhos canônicos e alternativos da via NF-κB	27
Figura 3.	Caminhos de sinalização da proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK)	28
Figura 4.	Via da sinalização celular JAK/STAT	29
Figura 5.	Biossíntese dos eicosanóides a partir do ácido araquidônico	32
Figura 6.	COX-1 e COX-2 diferenciadas pelos resíduos de aminoácidos isoleucina e valina, respectivamente na posição 523	33
Figura 7.	Mecanismo de ação dos glicocorticoides	36
Figura 8.	Desenho de híbrido por conjugação de farmacóforos e hibridação molecular	38
Figura 9.	Bioisosterismo clássico divalente CH ₂ /O de análogos a prostaciclina (iloprost e cicaprost)	40
Figura 10.	Bioisosterismo de anéis de fármacos anti-inflamatórios derivados dos oxicams (A) e de inibidores seletivos de COX-2 (B)	41
Figura 11.	Funções <i>N</i> -fenilacetamida e <i>N</i> -fenilacrilamida	42
Figura 12.	Calorimetria diferencial exploratória (DSC) dos compostos: JM-01 (A), JMPR-01 (B) e ICMD-01 (C)	59
Figura 13.	Curvas termogravimétricas dos compostos JM-01 (A), JMPR-01 (B) e ICMD-01 (C)	60
Figura 14.	Espectro de IV do JMPR-01	62
Figura 15.	Espectro de IV do ICMD-01	63
Figura 16.	Espectro de RMN ¹ H do JMPR-01	64
Figura 17.	Espectro de RMN ¹ H do ICMD-01	65
Figura 18.	Espectro de RMN ¹³ C do JMPR-01	66
Figura 19.	Espectro de RMN ¹³ C do ICMD-01.....	67
Figura 20.	Espectro de massa do JMPR-01.....	68
Figura 21.	Espectro de massa do ICMD-01	68
Figura 22.	Efeito citotóxico do composto JM-01 (A) JM-PR-01 (B) e ICMD-01 (C) frente a linhagem de macrófagos J774	69

Figura 23.	Modulação da produção de óxido nítrico pelo JM-01 (A), JMPR-01 (B) e ICMD-01 (C) em culturas macrófagos J774	71
Figura 24.	Modulação da expressão de IL-1 β (A) e TNF α (B) pelo composto ICMD-01 em cultura de macrófagos J774	72
Figura 25.	Modulação da expressão de IL-1 β (A) TNF α (B) pelo composto JMPR-01 em cultura de macrófagos J774	73
Figura 26.	Influência do tratamento com os compostos JM-01, ICMD-01 e JM-PR sob a contagem total de leucócitos, para o modelo da peritonite induzida por zymosan (2%)	75
Figura 27.	Influência do tratamento com os compostos JM-01, ICMD-01 e JM-PR sob o edema de pata induzido por CFA	77
Figura 28.	Influência do tratamento com os compostos JM-01, ICMD-01 e JMPR-01 na hiperalgesia inflamatória avaliada pelo <i>von frey</i>	78
Figura 29.	Avaliação da atividade analgésica central dos JM-01, JMPR-01 e ICMD-01 pelo ensaio <i>tail flick</i>	79
Figura 30.	Avaliação da atividade motora de camundongos tratados com JM-01, ICMD-01 e JMPR-01	79
Figura 31.	Curva dose resposta do fármaco ICMD-01 frente ao ensaio de edema de pata induzida por CFA	80
Figura 32.	Curva dose resposta do fármaco ICMD-01 em diferentes doses frente ao ensaio de hiperalgesia induzida por CFA (<i>von frey</i>)	81
Figura 33.	Efeitos do ICMD-01 nos níveis de citocinas da pata durante a inflamação induzida por CFA.....	81
Figura 34.	Efeitos do ICMD-01 nos níveis de PGE ₂ da pata durante a inflamação induzida por CFA.....	82
Figura 35.	Imagens dos estômagos do grupo controle e tratados com ICMD 50 mg kg ⁻¹	86
Figura 36.	Perfil de absorção dos compostos derivados fenilacriatoacetamida: JM-01, JM-PR-01 e ICMD-01 pelo modelo <i>in silico</i> (Boiled-egg) via SwissADME	88
Figura 37.	Predição dos sítios de metabolização do JM-01 (A), ICMD-01 (B) e JMPR-01 (C) via <i>Xenosite</i>	90

Figura 38. Predição dos sítios de metabolização do JMPR-02 (3A) e ICMD-02 (3B) 92
protegido pelo átomo de flúor *via Xenosite*

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1.	Características físico-químicas dos derivados fenilacrilamida e do intermediário fenilacetamida	58
Tabela 2.	Solubilidade dos derivados fenilacrilamida e do intermediário fenilacetamida em diversos solventes orgânicos	58
Tabela 3.	Dados termogravimétricos e calorimétricos dos compostos JM-01, JMPR-01 e ICMD-01	61
Tabela 4.	Dados do IV dos compostos ICMD-01 e JMPR-01	62
Tabela 5.	Dados dos espectros de RMN ¹ H dos compostos JMPR-01 e ICMD-01	64
Tabela 6.	Dados dos espectros de RMN ¹³ C dos compostos JMPR-01 e ICMD-01.....	66
Tabela 7.	Dados das respectivas massas dos íons moleculares dos compostos JMPR-01 e ICMD-01	67
Tabela 8.	Consumos dos animais submetidos ao teste de toxicidade, tratados pelo composto ICMD-01 (2000 mg kg ⁻¹), durante 14 dias.....	84
Tabela 9.	Peso relativo dos órgãos e evolução ponderal de camundongos fêmeas tratadas com o ICMD-01, na dose de 2000 mg kg ⁻¹ via oral, após 14 dias.....	84
Tabela 10.	Determinação dos parâmetros bioquímicos no soro de camundongos do grupo controle e tratados com o ICMD-01 na dose de 2000 mg kg ⁻¹ por via oral após 14 dias	84
Tabela 11.	Determinação dos parâmetros hematológicos dos camundongos do grupo controle e tratados com o ICMD-01 na dose de 2000 mg kg ⁻¹ por via oral após 14 dias	85
Tabela 12.	Inibição potencial <i>in silico</i> das isoformas do complexo citocromo P450 pelos compostos JM-01, JMPR-01 e ICMD-01	89

LISTAS DE ESQUEMAS

- Esquema 1.** Ressínteses do 2-ciano-*N*-fenilacetamida (JM-01) e do (E)-2-ciano-3-(1H-indol-3-il)-*N*-fenilacrilamida (ICMD-01) e obtenção do (E)-2-ciano-*N*,3-difenilacrilamida (JMPR-01)..... 45
- Esquema 2.** Mecanismo reacional da síntese dos derivados fenilacrilamida (ICMD-01 e JMPR-01)..... 56

LISTAS DE QUADROS

Quadro 1.	Principais citocinas, suas origens e respectivas funções celulares	30
Quadro 2.	Principais anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs)	34
Quadro 3.	Bioisósteros clássicos: grupos e átomos	39
Quadro 4.	Bioisósteros não clássicos	40
Quadro 5.	Atividades biológicas de derivados <i>N</i> - fenilacetamida (1) e <i>N</i> -fenilacrilamida (2)	43

SIGLAS E ABREVIACÕES

A.A	Ácido araquidônico
AIEs	Anti-inflamatório esteroidal
AINEs	Anti-inflamatórios não esteroidais
ALT	Transaminase glutâmico-pirúvica
APPs	Proteínas de fase aguda
AST	Transaminase glutâmico-oxalacética
BAFF	Fator de ativação de células beta
CaM	Cálcio-calmodulina
CCDA	Cromatografia de Camada Delgada Analítica
CD40	Cluster de diferenciação 40
CEUA/ICS	Comissão de Ética no Uso de Animais
CF	Conjugação de Farmacóforo
CLRs	Receptor de Lecitina do tipo C
COX	Ciclooxigenase
COX-1	Ciclooxigenase -1
COX-2	Ciclooxigenase -2
COX-3	Ciclooxigenase -3
c-Rel	Proto-oncogenese c-Rel
CYP450	Citocromo P450
DAMPS	Padrões moleculares associados a danos
DGI	Distúrbios gastrointestinais
DMSO	Dimetilsulfóxido
DSC	Calorimetria exploratória diferencial
DTG	Análise térmica diferencial
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
ERK	Proteína quinase regulada por estímulos extracelulares
F.F	Faixa de fusão
FBDD	Planejamento baseado na estrutura de fragmentos
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
GM-CSF	Fator estimulador de colônia de macrófagos e granulócitos
HCT	Hematócrito

HDL	Lipoproteína de alta densidade
HGB	Concentração de hemoglobina
HM	Hibridização molecular
i.p	Intraperitoneal
ICMD-01	2-ciano-3-(1H-indol-3-il)-N-fenilacrilamida
IFNs	Interferóns
IFN- γ	Interferon gama
IFN- γ	Interferon gama
IKB	IKB quinase
IKK α	IKB quinase alfa
IKK β	IKB quinase beta
IL-10	Interleucina-10
IL-11	Interleucina-11
IL-12	Interleucina-12
IL-1R	Receptor de Interleucina-1
IL-1 β	Interleucina -1 beta
IL-2	Interleucina -2
IL-6	Interleucina-6
IL-6R	Receptor de Interleucina-6
IL-7	Interleucina-7
IL-8	Interleucina-8
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
IRFs	Fatores reguladores de interferons
IV	Infravermelho
JAK/STAT	Transdutor do sinal de Janus quinase e ativador da transcrição
JAK-1	Janus quinase -1
JAK-2	Janus quinase -2
JAK-3	Janus quinase -3
JH -6	Domínio de ligação JH-6
JH-7	Domínio de ligação JH-7
JM-01	2-ciano N-fenilacetamida
JMPR-01	(E)-2-ciano-N,3-difenilacrilamida
JNK1	c Jun quinase N- terminal -1

JNK2	c Jun quinase N- terminal –2
JNK3	c Jun quinase N- terminal –3
LAFTE	Laboratório de Farmacologia e Terapêutica Experimental
LBDD	Planejamento baseado na estrutura do ligante
Log (P)	Coefficiente de partição teórico
LOX	Lipoxigenase
LPS	Lipopolisacarídeo
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
NEMO	Inibidor da subunidade gama do fator nuclear kappa beta
NFκB	Fator nuclear kappa beta
NLRs	Receptores similares ao domínio de oligomerização de nucleotídeos
Nnos	Óxido nítrico sintase neuronal
NO	Óxido nítrico
p38MAP	Proteínas cinases ativadas por mitógeno p38
p50	Proteína p50
p52	Proteína p52
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
PCR	Proteína C reativa
PGs	Prostaglandinas
PLT	Plaquetas
PRRs	Receptor de reconhecimento de padrões
RANKL	Ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa beta
RBC	Eritrócito
RelA	Fator nuclear p65
RelB	Fator nuclear p50
Rf	Fator de retenção
RLRs	Receptor do tipo NOD
RMN	Ressonância magnética nuclear
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SBDD	Planejamento baseado na estrutura do receptor
STAT 1–4	Transdutor de sinal e ativador da transcrição 1–4
STAT5b e 6	Transdutor de sinal e ativador da transcrição 5b e 6
TG	Termogravimetria

TGC	Triglicerídeos
TGF- β	Fator de transformação de crescimento beta
TLRs	Receptores Toll-like
TNFR	Receptor do fator de necrose tumoral
TNF α	Fator de necrose tumoral alfa
TX	Tromboxanos
TyK-2	Tirosina quinase-2
UEPB	Universidade Estadual da Paraíba
UFBA	Universidade Federal da Bahia
UFRRJ	Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
V.G	Violeta de Genciana
v.o	Via oral
WBC	Concentração de glóbulos brancos

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	22
2.	OBJETIVOS	24
2.1	Objetivos geral	24
2.2	Objetivos específicos	24
3.	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	25
3.1	Aspectos gerais da inflamação	25
3.2	Mecanismos deflagradores das respostas inflamatórias	25
3.3	Via do NF-κB (Fator nuclear kappa B)	27
3.4	Via da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK ou MAP quinase)	28
3.5	Via JAK-STAT (Janus quinase)	29
3.6	Mediadores inflamatórios	30
3.6.1	Citocinas	30
3.6.2	Proteínas e enzimas importantes no processo inflamatório.....	31
3.6.2.1	<i>Cicloxigenases e os derivados do ácido araquidônico</i>	31
3.6.2.2	<i>Óxido nítrico sintase /óxido nítrico</i>	33
3.7	Farmacologia da inflamação	34
3.7.1	Anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs).....	34
3.7.2	Anti-inflamatórios esteroidais (AIEs)	35
3.8	A importância da química medicinal no planejamento de fármacos	37
3.9	Estratégias de modificação molecular	38
3.9.1	Hibridização e conjugação de farmacóforos	38
3.9.2	Bioisosterismo	39
3.10	Derivados fenilacetamida e fenilacrilamida como potenciais agentes terapêuticos	42
4.	MATERIAL E MÉTODOS	45
4.1	Química	45
4.1.1.	Procedimento geral para obtenção dos compostos	45
4.1.2	Síntese do 2-ciano <i>N</i> -fenilacetamida – JM-01	45
4.1.3	Síntese do (E)-2-ciano-3- (1H-indol-3-il) - <i>N</i> -fenilacrilamida – ICMD-01	46
4.1.4	Síntese do (E) -2-ciano- <i>N</i> ,3-difenilacrilamida –JMPR-01	46
4.2	Caracterização físico-química	46
4.2.1	Caracterização térmica	46
4.2.1.1	<i>Calorimetria exploratória diferencial (DSC)</i>	46

4.2.1.2	<i>Termogravimetria (TG) e sua derivada (DTG)</i>	47
4.3	Elucidação estrutural	47
4.3.1	Ressonância Magnética Nuclear	47
4.3.2	Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)	47
4.3.3	Espectrometria de massas.....	47
4.4	Avaliação farmacológica	48
4.4.1	Local da pesquisa e procedimentos	48
4.4.2	Animais	48
4.4.3	Preparo das substâncias	48
4.4.4	Ensaio farmacológicos <i>in vitro</i>	49
4.4.4.1	<i>Viabilidade celular em culturas de macrófagos J774</i>	49
4.4.4.2	<i>Avaliação da produção de citocinas e óxido nítrico</i>	49
4.4.5	<i>Avaliação da atividade biológica in vivo</i>	50
4.4.5.1	<i>Peritonite induzida por zymosan</i>	50
4.4.5.2	<i>Edema de pata, hiperalgesia inflamatória e dosagens de citocinas e prostaglandinas locais em inflamação induzida por CFA</i>	50
	➤ <i>Avaliação da hiperalgesia inflamatória</i>	50
	➤ <i>Edema de pata induzida por CFA</i>	51
	➤ <i>Medição de citocinas por ELISA</i>	51
	➤ <i>Medição de PGE₂ em pele de pata</i>	51
4.4.5.3	<i>Tail flick</i>	52
4.4.5.4	<i>Ensaio de função motora</i>	52
4.4.6	<i>Avaliação da toxicidade in vivo</i>	53
4.4.6.1	<i>Toxicidade aguda</i>	53
4.4.6.2	<i>Susceptibilidade ulcerogênica</i>	53
4.4.7	<i>Avaliação da toxicidade in vitro</i>	54
4.4.7.1	<i>Atividade hemolítica</i>	54
4.5	Predições farmacocinéticas	54
4.6	Análise estatística	54
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
5.1	Síntese e caracterização físico-química dos derivados fenilacetamida (JM-01) e fenilacrilamida (JM-PR-01 e ICMD-01)	56
5.1.1	Caracterização térmica DSC e TG	59
5.3	Avaliação Farmacológica	69
5.3.1	Ensaio farmacológicos <i>in vitro</i>	69
5.3.1.1	<i>Citotoxicidade em macrófagos J774, dosagens de óxido nítrico e citocinas</i>	69

5.3.2	Ensaio farmacológico <i>in vivo</i>	74
5.3.2.1	<i>Peritonite induzida por Zymosan</i>	74
5.3.2.2	<i>Edema de pata induzida por CFA</i>	76
5.4	Avaliação toxicológica	83
5.4.1	Toxicidade aguda de dose única.....	83
5.4.2	Estudo de susceptibilidade ulcerogênica	85
5.5	Avaliação toxicológica <i>in vitro</i>	86
5.5.1	Atividade hemolítica	86
5.6	Predições farmacocinéticas	87
5.6.1	Proposta de bloqueio metabólico	92
6	CONCLUSÃO	95
	REFERENCIAS	97
	ANEXO A	111

1. INTRODUÇÃO

A inflamação é um mecanismo de defesa deflagrado em respostas a condições extremas a homeostase, mediado por substâncias pró-inflamatórias como o óxido nítrico, citocinas, espécies reativas, aminas vasoativas e eicosanóides. Essas substâncias são produzidas por células como macrófagos, linfócitos e mastócitos e tem como função desencadear processos dinâmicos, celulares e bioquímicos promovendo reações vasculares e tissulares com o objetivo de extinguir o agente patogênico e iniciar os processos de reparo (GRIVENNIKOV; GRETEN; KARIN, 2010; HERNÁNDEZ et al., 2013; KOTAS; MEDZHITOV, 2015; LEE et al., 2017).

O manejo da inflamação é considerado desafiador, visto a extensão dos fatores e vias que exercem influência durante o processo. Dentre as citocinas pró inflamatórias o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina-1beta (IL-1 β) induzem a condições inflamatórias crônicas e a progressão de doenças auto-imunes. A maioria desses mediadores são produzidos em resposta a ativação das vias de sinalização NF κ B, p38MAP quinase e JAK/STAT (KUMAR et al., 2019; TAMIYA et al., 2011; TANIGUCHI; KARIN, 2018).

Apesar da inflamação não ser um processo patológico, pode haver uma exacerbação dessa resposta, devido a uma tentativa ineficaz do organismo contra o agente agressor, potencializando a permeabilidade celular, infiltração leucocitária e liberação de mediadores, que contribui com o aparecimento dos sinais cardinais da inflamação (rubor, edema, hipertermia, dor, e perda da função tecidual) (GROSSER, SMYTH; FITZGERALD 2012; MURAKAMI; HIRANO, 2012).

As terapias farmacológicas empregadas no tratamento clínico das comorbidades inflamatórias englobam as drogas não esteroidais (AINEs) e esteroidais (AIEs). As drogas AIEs, representada pelos glicocorticóides são consideradas padrão ouro, atuando na modulação imunológica e nos processos inflamatórios. Entretanto, apresentam efeitos colaterais graves associados a distúrbios metabólicos e endócrinos quando utilizado por períodos prolongados (WANG; HAILE; JONES, 2013).

Os AINEs por sua vez são as drogas mais prescritas, sendo consumidos por cerca de 30% da população mundial diariamente com finalidade anti-inflamatória, analgésica e antipirética (BJARNASON et al., 2018). O uso dessas drogas é limitado devido aos riscos de nefrotoxicidade e do potencial ulcerogênico que acontece em razão da inibição de prostaglandinas citoprotetoras pela COX-1. Drogas seletivas para COX-2 foram desenvolvidas, porém muitas delas foram retiradas do mercado ou passaram a ter uso proscrito por aumentar a incidência de

eventos cardiovasculares (BATLOUNI, 2010; MARCÉN; SOSTRES; LANAS, 2016; MONTEIRO, 2008).

Esses panoramas têm desencadeado a necessidade de desenvolvimento de novos anti-inflamatórios. Uma das abordagens que vem sendo utilizada no planejamento de fármacos é a química medicinal, que possibilita a diversidade de estruturas carbônicas com fragmentos farmacofóricos importantes para o desenho de diversos compostos bioativos (EDER; SEDRANI; WIESMANN, 2014; PLOWRIGHT et al., 2017; TRESADERN et al., 2017). A exemplo, tem-se os derivados fenilacetamida e fenilacrilamida, obtidos por reações de amidação entre anilinas substituídas e condensações do tipo *Knovenagel*. Essas classes são pouco investigadas para condições inflamatórias, porém estudos pioneiros de Gu et. al. (2019), tem indicado atividades promissoras de seus compostos, que atuam como moduladores do complexo transcricional NF- κ B em células mesenquiais HBZY-1 estimuladas por LPS.

Assim, presente estudo teve como objetivo sintetizar e estabelecer as propriedades farmacológica do derivado fenilacetamida (2-ciano *N*-fenilacetamida – JM-01) e fenilacrilamida (2-ciano-3-(1H-indol-3-il)-*N*-fenilacrilamida – ICMD-01 e o (E)-2-ciano-*N*,3-difenilacrilamida – JMPR-01 em modelos *in vitro* e *in vivo* de inflamação, bem como avaliar a segurança de uso através dos ensaios de toxicidade aguda e gástrica. Esses ensaios iniciais podem tornar esses compostos fortes candidatos a medicamentos anti-inflamatórios com eficácia preservada e melhores perfis de segurança relacionados aos danos gastrointestinais associado ao uso prolongado dos fármacos convencionais.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos geral

Sintetizar e avaliar o potencial anti-inflamatório *in vitro* e *in vivo* dos compostos: 2-ciano *N*-fenilacetamida (JM-01), (E) -2-ciano-3- (1H-indol-3-il) -*N*-fenilacrilamida (ICMD-01) e o (E) -2-ciano-*N*,3-difenilacrilamida (JMPR-01).

2.2 Objetivos específicos

Este projeto teve como objetivos específicos:

- a) Sintetizar e determinar as características físico-químicas dos compostos (aparência, fator de retenção, faixa de fusão, rendimento, peso molecular, formula molecular e coeficiente de partição teórico);
- b) realizar a caracterização térmica pela técnica termogravimétrica (TG) e calorimetria diferencial exploratória (DSC) e a elucidação estrutural dos compostos por técnicas espectroscópicas e espectrométricas;
- c) avaliar *in vitro* a viabilidade celular, inibição de óxido nítrico e citocinas pelos compostos em culturas de macrófagos J774;
- d) avaliar o perfil anti-inflamatório dos compostos frente aos modelos de peritonite, hiperalgesia inflamatória, edema e níveis de citocinas e prostaglandina locais
- e) avaliar o potencial antinociceptivo dos compostos pelos ensaios *tail-flick* e *von frey*;
- f) avaliar a atividade motora dos animais tratados com os compostos pelo ensaio do *rota rod*;
- g) avaliar a toxicidade hemolítica *in vitro*, toxicidade aguda não clínica e gástrica do composto com melhor potencial anti-inflamatório.
- h) realizar as predições farmacocinéticas *in silico* utilizando as plataformas *SwissADME* e *Xenosite*.

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Aspectos gerais da inflamação

A inflamação é uma reação do organismo frente a um agente agressor de natureza química, física ou biológica, que promove a ativação coordenada das vias sinalizadoras com objetivo de instaurar os processos de reparo. Este processo é iniciado pela ativação de receptores padrões (*germline-encoded pattern-recognition receptors* (PRRs) de superfície celular que reconhecem esses estímulos lesivos, ativando uma cascata de sinalização intracelular, induzindo a translocação de diversos fatores de transcrição, resultando na expressão de diversos mediadores inflamatórios (CHEN et al., 2018; MORTAZ et al., 2017).

A nível tecidual durante a resposta inflamatória observa-se sinais típicos como: edema, rubor, calor, dor, podendo progredir para perda da função tecidual. Esta resposta inespecífica visa minimizar as lesões iminentes ou os quadros infecciosos na tentativa de extinguir o agente agressor. Este processo de mitigação corrobora com reestabelecimento da homeostase dos tecidos e a resolução do processo agudo. O processo agudo quando não resolvido pode se tornar crônico, fazendo parte da patogênese de diversas doenças crônicas incluindo o câncer (PETTER; LIBBY, 2007; ZHOU; ONG; HUANG, 2016). Os principais mediadores que influenciam a resposta inflamatória e vascular são as citocinas, espécies reativas de oxigênio, óxido nítrico, proteases, aminas vasoativas, eicosanóides e os fatores de crescimento (CHEN; NUÑEZ, 2010).

3.2 Mecanismos deflagradores das respostas inflamatórias

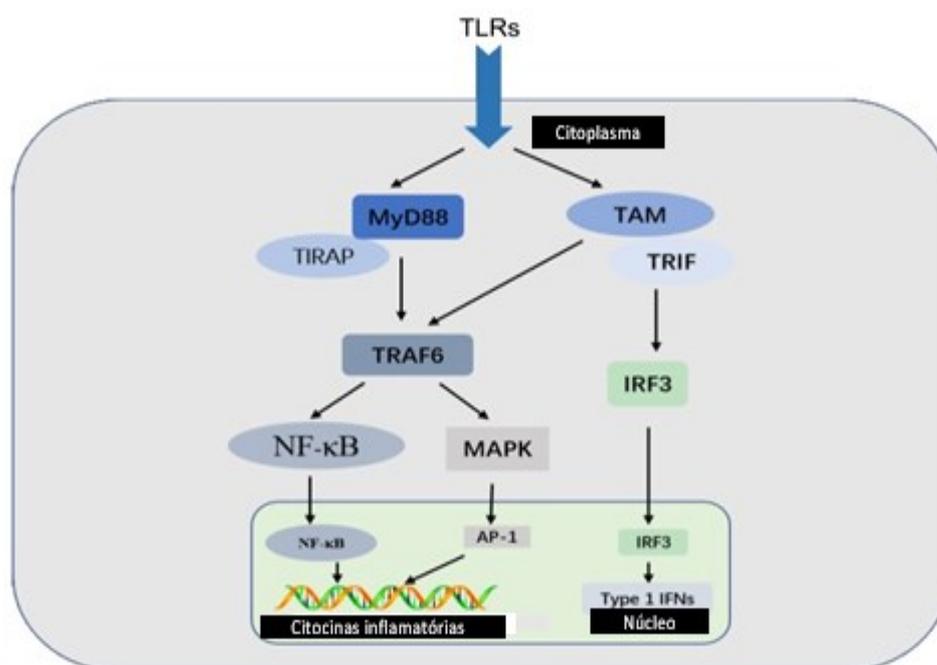
Apesar dos mecanismos das respostas inflamatórias estarem correlacionados com a natureza do agente deflagrador do estímulo e localidade do órgão ou tecido, todos eles convergem para uma via comum, de forma geral, receptores celulares PRRs reconhecem os padrões moleculares, ativam vias inflamatórias resultando na produção de mediadores inflamatórios e na migração de células do sistema imunológico (CHEN et al., 2018).

Os padrões moleculares podem ser estruturas microbianas, denominado padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), que inicia eventos intracelulares desencadeando a resposta inflamatória pela ativação de receptores codificados por linhagem germinativa (PRRs) expressos em células imunes e não imunes (CHEN et al., 2018; GUDKOV; KOMAROVA, 2016; TAGHAVI et al., 2017). Ou, de acordo com Xu e Dumman (2018), esses padrões também

podem ser oriundos de sinais endógenos ativados durante um dano celular ou tecidual, na ausência de agentes infecciosos, sendo definido como padrões moleculares associados ao perigo (DAMPs).

Dentre as classes de famílias de PRRs incluem-se os receptores Toll-like (TLRs), receptores de lecitina do tipo C (CLRs), receptores do tipo induzível pelo ácido retinóico (RIG) -I (RLRs) e receptores do tipo NOD (NLRs). A família TLR constitui a classe de receptores padrões mais importantes nos mamíferos, sendo amplamente expressos na membrana celular ou nos endossomos e sua ativação promove uma cascata de sinalização intracelular, mediado pelo fator de diferenciação mieloide -88 que promove a translocação de diversos fatores de transcrição (PA-1, NF- κ B e IRF3) (Figura 1) (ARANCIBIA et al., 2007; CHEN et al., 2018; CZERKIES; KWIATKOWSKA, 2014; WANG, 2018).

Figura 1. Sinalização intracelular via receptores Toll like (TLRS)



Fonte: adaptado de Chen et al. (2010).

As vias inflamatórias estão envolvidas na patogênese de diversas doenças crônicas, e sua ativação pode ser mediada pela atuação de algumas citocinas, a exemplo interleucina-1 β (IL-1 β), interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral- α (TNF- α), que agem como estímulos inflamatórios primários durante o processo de sinalização celular interagindo respectivamente com os receptores: TLRs, IL -1 receptor (IL-1R), receptor de IL-6 (IL-6R) e receptor de TNF

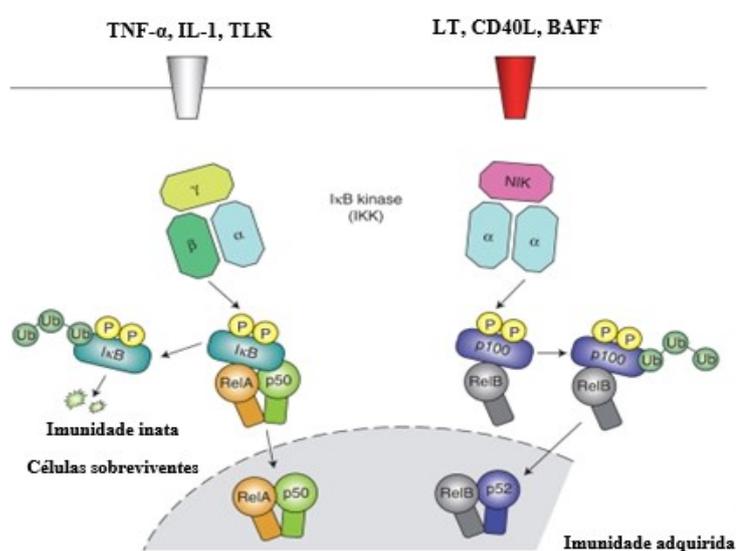
(TNFR) (KAMINSKA et al., 2009). A ativação do receptor propaga a sinalização de importantes vias, podendo citar a da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), do fator nuclear kappa-B (NF- κ B), Janus quinase (JAK) e do ativador da transcrição (STAT) (FRAZÃO; ERRANTE, CONDINO-NETO, 2013; MORTAZ et al., 2017; WALSH; LEE, CHOI, 2016).

3.3 Via do NF- κ B (Fator nuclear kappa B)

O NF- κ B é um complexo proteico que apresenta cinco fatores de transcrição que em mamíferos incluem: p50, p52, RelA (p65), RelB e c-Rel. Este complexo possui função essencial em processos biológicos e celulares e sua ativação acontece pela via canônica deflagrada por produtos microbianos, citocinas pró inflamatórias como TNF α e IL-1, ou pela via alternativa, cujo estímulo se dar por citocinas da família TNF - linfotóxina β (TNFSF3), ligante CD40 (CD40L e TNFSF5), fator de ativação de células B (BAFF e TNFSF13B) e ativador do receptor do ligante NF- κ B (RANKL e TNFSF11) (CHEN et. al., 2018; DIAMANT; DIKSTEIN, 2013; LAWRENCE, 2009).

Após a estimulação celular ocorre a fosforilação do I κ B (IKK) que consiste de subunidades de quinase catalítica (IKK α e IKK β) e a proteína reguladora não enzimática NEMO. Os heterodímeros NF- κ B são liberados do complexo NF- κ B/I κ B e translocados para o núcleo, o que leva a expressão gênica de citocinas e a quimiotaxia de células inflamatórias (Figura 2) (DIAMANT; DIKSTEIN, 2013; ZHU; GU; SHEN, 2019).

Figura 2. Caminhos canônicos e alternativos da via NF- κ B



Fonte: adaptado de Lawrence (2009).

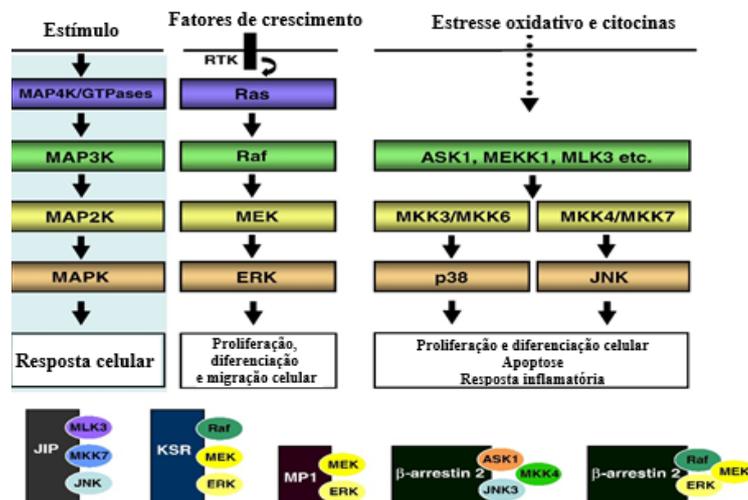
3.4 Via da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK ou MAP quinase)

As cascatas da MAPK são vias sinalizadoras importantes que regulam processos celulares como proliferação, diferenciação, apoptose e respostas induzidas por estímulos como estresse. Sendo assim, distúrbios no funcionamento dessas cascatas estão envolvidos no desenvolvimento de doenças inflamatórias e auto imunes (PLOTNIKOV et al., 2011).

As MAPKs são subdivididas em quatro subfamílias, proteína quinase 1 e 2 regulada por sinal extracelular (ERK1 e 2), quinases N-terminais c-Jun 1–3 (JNK1, JNK2 e JNK3), p38 MAPKs (p38a, p38b, p38g e p38d) e ERK5 (também conhecido como BMK). Cada via de sinalização inclui três quinases principais: MAPK Kinase Kinase (MAPKKKs), MAPK Kinase (MAPKKs) e MAPK (LIANG; YANG, 2019; CUENDA, 2019).

MAPKKKs fosforilam e ativam MAPKKs, que por sua vez fosforilam e ativam MAPKs. As ERKs são geralmente ativadas por mitógenos e sinais de diferenciação, enquanto estímulos inflamatórios e estresse ativam JNK e p38. A proteína MKK1 e MKK2 ativam ERK1 e 2; MKK4 e MKK7, que por sua vez ativam JNK, MKK3 e MKK6 que também ativam p38. A ativação das MAPKs, incluindo ERK1/2, de JNK, conduz a fosforilação e ativação da transcrição de p38 e fatores presente no citoplasma ou núcleo, o que inicia a resposta inflamatória (ADEWUMI; LÓPEZ; DAVIE, 2018; CHEN et al., 2018; DHILLON et al., 2007; KIM; CHOI, 2010).

Figura 3. Caminhos de sinalização da proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK)



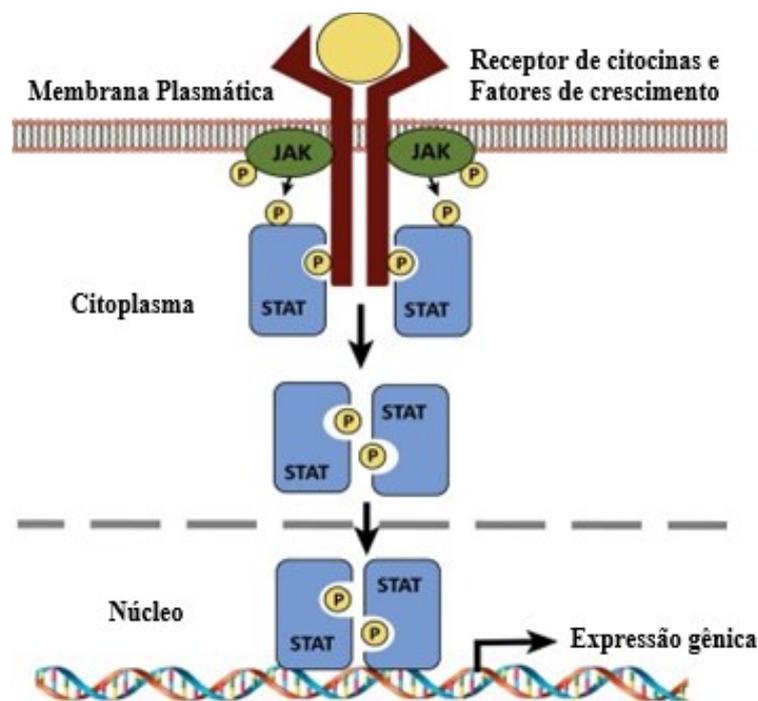
Fonte: adaptado de Kim e Choi (2010).

3.5 Via JAK-STAT (Janus quinase)

Segundo Ruan et al. (2019) a via JAK/STAT possui papel importante na regulação imunológica e em processos celulares, sendo constituído pelos receptores relacionados à tirosina quinase (JAK e STAT). Os receptores ao serem ativados por ligantes como citocinas (IL-2 e IL-7), fatores de crescimento, fator estimulante de colônia de granulócitos-macrófagos (GM-CSF) e interferon fosforilam a sua correspondente tirosina quinase JAK.

De acordo com Murray (2007), as famílias de proteínas consistem em JAK-1, JAK-2, JAK-3 e TyK-2, no qual possuem 7 domínios homólogos JAK (JH). O domínio JH-1 é um domínio quinase, e o JH-6 e JH-7, são domínios de ligação ao receptor. O fragmento de tirosina quinase JAK recruta e fosforila as proteínas da família STAT: STAT1-4, a, STAT5b e 6. Os STATs ativados ao entrarem no núcleo ligam-se a genes específicos, modulando também o processo de transcrição de proteínas de mediadores inflamatórios (O'SHEA; PLENGE, 2012).

Figura 4. Via da sinalização celular JAK/STAT



Fonte: adaptado de Dodington, Desai e Woo (2018).

Essas vias apresentadas são comuns a patogênese de diversas doenças inflamatórias, auto-imunes, metabólicas e câncer. Sua ativação é um processo complexo mediado por diversos

fatores no qual levam a transcrição da expressão gênica de citocinas, fatores tumorais e de crescimento, quimiocinas e eicosanoides. Essas substâncias produzidas modulam respostas fisiopatológicas e celulares e seus mecanismos precisam ser melhor esclarecidos para resolubilidade dos distúrbios patológicos inflamatórios.

3.6 Mediadores inflamatórios

3.6.1 Citocinas

As citocinas são as principais substâncias envolvidas na modulação de um processo inflamatório crônico e agudo, liberadas a partir de células do sistema imunológico incluindo monócitos, macrófagos e linfócitos. Pode-se visualizar resumidamente suas funções celulares no quadro 1.

Quadro 1. Principais citocinas, suas origens e respectivas funções celulares.

Citocinas pró e anti inflamatórias			
Citocina	Família	Origem celular	Funções celulares
IL-1 β	IL-1	Macrófagos e Monócitos	Pró- inflamatória, induz a proliferação celular, diferenciação e apoptose.
IL-1	IL-4	Linfócito T (helper)	Anti-inflamatória, proliferação e diferenciação de células T e B
IL-6	IL-6	Macrófagos, células T e adipócitos	Pró-inflamatória, indutora de citocinas e diferenciação celular
IL-8	CXC	Macrófagos, células endoteliais e epiteliais	Pró- inflamatória, induz a quimiotaxia e a anfigênese
IL-10	IL-10	Monócitos, células T e células B	Anti-inflamatória (inibição de citocinas pró-inflamatórias)
IL-11	IL-11	Fibroblastos, neurônios e células epiteliais	Anti-inflamatória, diferenciação celular e induz a proteína de fase aguda
IL-12	IL-12	Células dendríticas, macrófagos e neutrófilos	Pró-inflamatória, diferenciação celular e ativação de células NK
TNF α	TNF	Macrófagos, CD4, células NK	Pro-inflamatória, induz a produção de citocinas, proliferação e apoptose
IFN- γ	INF	Células T, NKT, e células B	Pró inflamatória (imunidade inata e adaptativa)
GM-CSF	IL-4	Células T, macrófagos e fibroblastos	Pró-inflamatória, ativação de macrófagos, neutrófilo e monócitos
TGF- β	TGF	Macrófagos e células T	Anti-inflamatória (inibição de citocinas pró-inflamatórias)

Fonte: Chen et. al. (2018); Turner et al. (2014) (Adaptado).

3.6.2 Proteínas e enzimas importantes no processo inflamatório

Os indícios clínicos do processo inflamatório nem sempre são observados, entretanto, alguns parâmetros bioquímicos e hematológicos podem ser úteis na detecção da condição inflamatória a partir diversos biomarcadores como as proteínas de fase aguda (APPs). Essas proteínas são sintetizadas em resposta a reação inata não específica e complexa desencadeada após a indução por estímulos patológicos (EL-DEEB et al., 2019; MERONI et al., 2019).

Dentre essas proteínas, destacam-se a haptoglobulina, amiloide sérica A, proteína C reativa (PCR), fibrinogênio e a glicoproteína alfa-1 (BARRACHINA et al., 2016; PIHL et al., 2013). De acordo com Aguiar et al. (2013) as (APPs) quando associado a evidências clínicas, são úteis no rastreamento de condições inflamatórias, porém é importante salientar que não é possível distinguir o mecanismo processual da doença. O aumento dessas proteínas está associado a casos de infecção ou inflamação sistêmica, a exemplo da artrite reumatoide, infarto agudo do miocárdio, neoplasias dentre outras condições. Outras duas enzimas importantes na modulação da atividade inflamatória são as cicloxigenases e a óxido nítrico sintase induzível.

3.6.2.1 *Cicloxigenases e os derivados do ácido araquidônico*

O ácido araquidônico é um fosfolípido de membrana liberado a partir da ação catalítica das fosfolipases. Ao ser produzido, essa substância servirá como substrato das cicloxigenase (COX) para formação das prostaglandinas (PGs) e tromboxanos (TX) ou das lipoxigenase (LOX), resultando na produção dos leucotrienos (LT) (figura 5). Esses prostanóides apresentam atividades fisiológicas distintas regulando vários sistemas orgânicos, além de estarem envolvidas na patogenia de doenças inflamatórias (BAUTISTA, VERA, 2010; MASEDA; RICCIOTTI; CROFFORD, 2019).

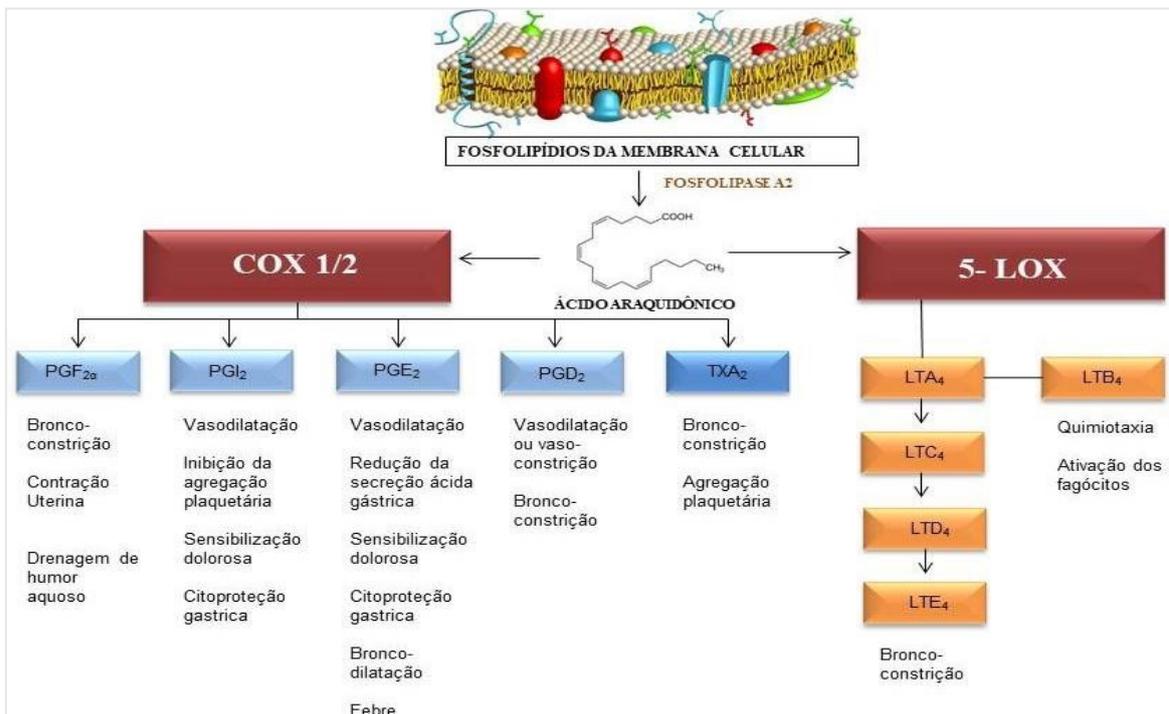
Com relação a COX, existem três isoformas identificadas: COX-1, COX-2 e COX-3. A COX-1 é considerada uma enzima de manutenção de condições fisiológicas como a citoproteção gástrica, manutenção do fluxo sanguíneo renal e agregação plaquetária, expressa em uma ampla gama de tecidos, incluindo o rim, pulmão, estômago, intestino delgado e cólon (MASEDA; RICCIOTTI; CROFFORD, 2019; TIWARI et al., 2019).

A COX-2 é uma enzima induzível, estando associado a processos inflamatórios, carcinogênicos e angiogênicos. Essa isoforma é expressa primariamente por células envolvidas no processo inflamatório, como macrófagos, monócitos e sinoviócitos. É importante ressaltar que

a COX-2 também é expressa constitutivamente, sendo corresponsável pela produção das prostaciclina, explicando assim a cardiotoxicidade associado a sua inibição. Com relação aos agentes indutores da COX-2, tem-se as citocinas (IL-1, IL-2 e fator de necrose tumoral (TNF), além de fatores de crescimento e endotoxinas (QUI et al., 2019; LAMIE; AZMEY, 2019).

Com relação a COX-3 acredita-se que seja uma variante alternativa de COX-1 presente no córtex cerebral, estando possivelmente envolvida na modulação da atividade analgésica e antipirética central. Essa isoforma pode ser o principal alvo de fármacos como acetaminofeno, fenacetina e dipirona (CHA; SOLNICA-KREZEL; DUBOIS, 2006; CHANDRASEKAHARAN et al., 2002; LIU, QU, YAN, 2015).

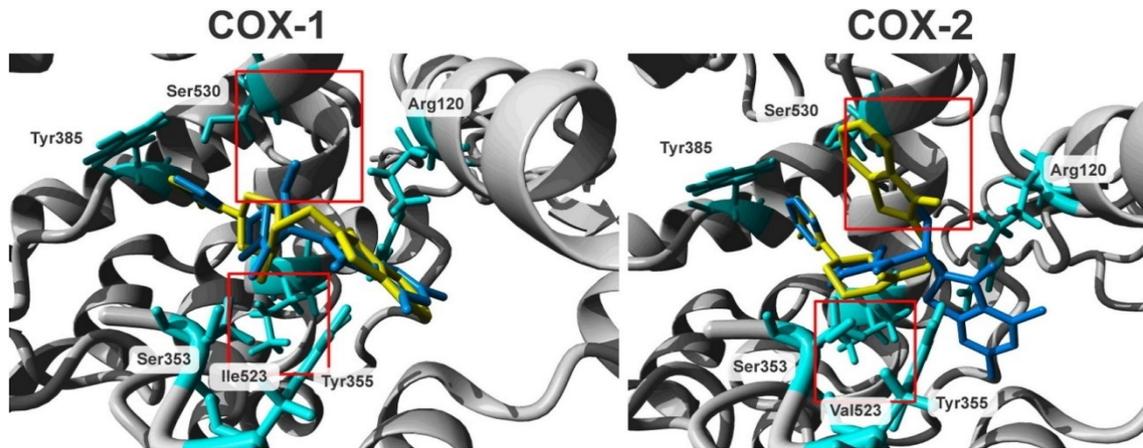
Figura 5. Biossíntese dos eicosanóides a partir do ácido araquidônico



Fonte: Silva (2017).

A COX-1 e a COX-2 possuem praticamente os mesmos sítios ativos, diferindo apenas em um único resíduo na posição 523. Na COX-1, o aminoácido é uma isoleucina, e na COX-2, valina (Figura 6). Essa diferença no resíduo permite que a COX-2 apresente um bolsão hidrofóbico maior. O conhecimento dessas estruturas, permite a aplicação de estratégias de planejamento de fármacos com diferentes seletividades, baseado na estrutura do alvo cuja estratégia denomina-se SBDD (do inglês *structure-based drug design*), podendo ser desenvolvidos fármacos com diferentes seletividades a COX (ŚWIATEK et al., 2017).

Figura 6. COX-1 e COX-2 diferenciadas pelos resíduos de aminoácidos isoleucina e valina, respectivamente na posição 523.



Fonte: Świątek et al. (2017).

3.6.2.2 Óxido nítrico sintase /óxido nítrico

O óxido nítrico (NO) é um neurotransmissor, responsável pela regulação de várias funções biológicas no organismo. A produção de NO fisiológico, é resultante da conversão de L-arginina em L-citrulina pela enzima óxido nítrico sintase (NOs). Essa enzima é apresentada em três isoformas importantes: NO sintase neuronal (nNOS/NOS₁) e NO sintase endotelial (eNOS/NOS₃) expressa constitutivamente na presença de cálcio, cuja ativação gera NO em concentrações nanomolares e a forma induzida (iNOS/NOS₂) que independe de cálcio com maior produção de NO (faixa micromolar) (VANNINI; KASHFI; NATH, 2015; ALDERTON; COOPER; KNOWLES, 2001).

Mediadores inflamatórios a exemplo do lipopolissacarídeo de produto bacteriano (LPS) e citocinas, como o interferon γ (IFN- γ), são potentes indutores da expressão do gene da iNOS. A ativação de todas as isoformas são dependentes da sua ligação com o cofator calmodulina (CaM). Para a nNOS e eNOS, esta ligação é facilitada pelo influxo de Ca^{2+} intracelular, já para iNOS o sítio ativo da CaM está constantemente ativo, uma vez expresso. Esta atividade contínua, gera a produção não fisiológica do NO, cujas funções são aplicáveis na defesa do hospedeiro e na lesão celular, como alterações na proliferação celular e indução das funções mitocondriais que induzem a apoptose celular. (WANG et al., 2018; WU et al., 2019). Afim de que

se possa minimizar os sintomas relacionados ao processo inflamatório, se faz necessário a utilização de medicamentos. Os principais grupos utilizados na terapêutica, são os anti-inflamatórios não (AINEs) e os anti-inflamatórios esteroidais, comumente denominado de corticoides.

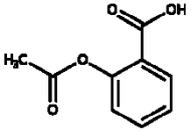
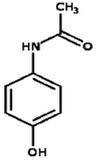
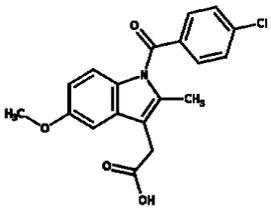
3.7 Farmacologia da inflamação

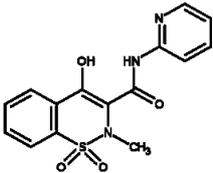
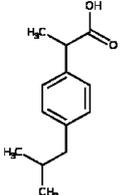
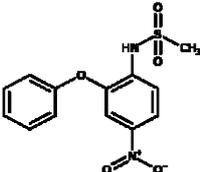
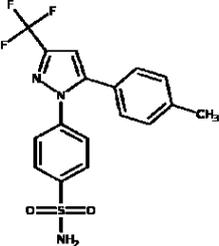
3.7.1 Anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs)

Os AINEs constituem um grupo heterogêneo de compostos aromáticos (Quadro 2), com a presença de resíduos funcionais importantes para as interações nos alvos farmacológicos. Em geral, apresentam-se sob ácidos ou bases orgânicas fracas, atuando nos sítios da inflamação, bloqueando a ação das cicloxigenases, suprimindo a produção das prostaglandinas. Estes fármacos são os principais empregados na terapêutica de doenças inflamatórias, sendo também responsáveis por um acentuado número de eventos adversos (SANDILANDS; BATEMAN, 2016).

Quadro 2. Principais anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs)

(Continua)

Classe terapêutica	Representante	Mecanismo	Estrutura química
Salicilatos	Ácido Acetilsalicílico	Inibidor não seletivo da COX	
Acetaminofeno	Paracetamol	Inibidor não seletivo da COX-3?	
Derivados do Ácido Acético	Indometacina	Inibidores não seletivos da COX	

Derivado do Ácido Enólico	Piroxican	Inibidores não seletivos da COX	
Derivado do Ácido Propiônico	Ibuprofeno	Inibidores não seletivos da COX	
Sulfonamida	Nimesulida	Inibidores seletivos da COX-2	
Coxibes	Celecoxibe	Inibidores altamente seletivos para COX-2	

Fonte: Silva (2017).

Os principais efeitos adversos desses compostos ocorrem em detrimento a sua seletividade. Os não seletivos ao bloquear o sítio catalítico da COX-1 inibem a síntese das prostaglandinas envolvidas nos processos fisiológicos normais, a exemplo da citoproteção gástrica e renal, sendo responsáveis respectivamente pelos distúrbios gastrointestinais e acentuação dos quadros de hipertensão e insuficiência cardíaca. Os inibidores seletivos de COX-2, apesar de um perfil de segurança gastrointestinal maior, promove um desequilíbrio entre as prostaciclina e tromboxanos, contribuindo para o aumento da incidência dos eventos trombóticos, passando a ter uso proscrito (MOORE et al., 2019).

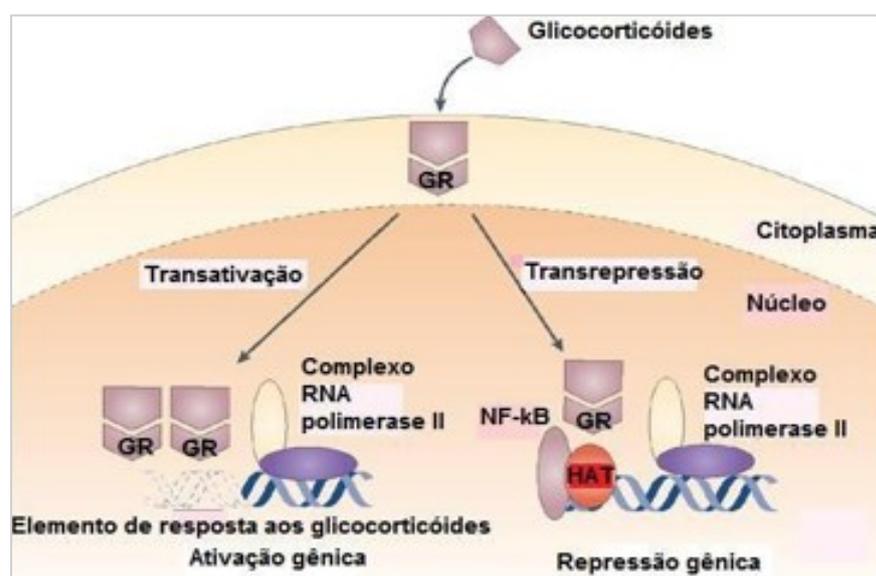
3.7.2 Anti-inflamatórios esteroidais (AIEs)

Os glicocorticoides são hormônios amplamente produzido pelas suprarrenais, atuando como anti-inflamatório endógeno e modulador de diversas funções metabólicas. A partir dessas

substâncias, foram desenvolvidas análogos sintéticos, utilizado em função dos seus efeitos imunossupressivo e anti-inflamatório no tratamento de diversas doenças de natureza inflamatória. Contudo, seu uso é limitado devido às diversas reações adversas provocadas, restringindo seu uso quando necessário a um período curto de tempo (DEJEAN; RICHARD, 2013; ORDUÑA-VALLS et al., 2016).

Essas substâncias de maneira geral atravessam a membrana celular devido a sua elevada lipossolubilidade, unindo-se a receptores citoplasmáticos específicos. O complexo glicocorticoide-receptor ao atingir o núcleo, se une ao DNA estimulando a transcrição de RNA mensageiro e RNA ribossômico, induzindo a síntese de diversas proteínas envolvidas na resposta inflamatória (transativação) ou inibindo-as (transrepressão) (Figura 7) (ALVARENGA; GIORGI; CHAHADE, 2008; DEYM; BISHAYI, 2019).

Figura 7. Mecanismo de ação dos glicocorticóides



Fonte: Errante et al. (2014).

A nível celular os glicocorticóides modificam o funcionamento normal dos leucócitos, limitando a síntese de mediadores da inflamação e citocinas responsável pela iniciação, manutenção e potencialização da cascata pró-inflamatória. Seu mecanismo culmina com a inibição da vasodilatação e transdução líquida, diminui o exsudato celular e o depósito na área inflamada, inibe a aderência dos neutrófilos na área inflamada, além de impossibilitar a liberação de A.A, impedindo a produção de mediadores como as prostaglandinas (ORDUÑA-VALLS et al., 2016).

Esses fármacos possuem ações mais amplificadas que os AINEs durante o processo inflamatório. Apresenta um amplo espectro de efeitos adversos associados principalmente aos distúrbios metabólicos, disfunções dos osteoblastos e reações idiossincráticas (WANG; HAILE; JONES, 2013). A terapia farmacológica AINEs e AIES, apesar de eficazes apresentam riscos, e o seu uso deve ser restrito com base no alívio sintomático.

3.8 A importância da química medicinal no planejamento de fármacos

Em decorrência do aumento e senescência da população mundial, pacientes necessitarão de novas estratégias terapêuticas para tratar suas doenças. Desse modo é indispensável a busca por novos fármacos que possam ser empregados como alternativos aqueles consolidados no mercado, com melhores perfis farmacológicos e de segurança de uso (EDER; SEDRANI; WISEMANN, 2014; PLOWRIGHT et al., 2017)

Uma das ciências envolvidas no avanço dessas descobertas é a química medicinal que tem como objetivo obter estruturas privilegiadas para diversos alvos, de acordo com os mecanismos biomoleculares envolvidos na fisiopatologia de diversas doenças além da compreensão dos fatores físico-químicos que podem estar relacionados a alterações na atividade biológica (CAMBELL, MACDONALD, PROCOPIOU, 2018; TRESADERN et al., 2017).

Os projetos de desenvolvimento de novos fármacos são realizados levando em consideração técnicas de planejamento, baseando-se em estruturas de proteínas alvos, fragmentos bioativos e ligantes endógenos. Essas estratégias são denominadas respectivamente de *Structure-based Drug Design* (SBDD), *Fragment based drug design* (FBDD) e *Ligand based Drug Design* (LBDD), cuja contribuição poderá racionalizar a etapa de descoberta, reduzindo o desgaste nos fracassos durante o processo de inovação (GUIDO; ANDRICOPULO; OLIVA, 2010; HERDIANTO et al., 2019).

A técnica SBDD é uma abordagem em que o conhecimento acerca da biomacromolécula alvo do fármaco é explorada para o desenvolvimento do seu agonista/antagonista. Comumente, essas informações poderão ser obtidas por técnicas como a cristalografia de raio-x, RMN ou previstas por modelos computacionais de modelagem. Quando não há informações tridimensionais do receptor, a técnica LBDD poderá ser empregada baseando-se em moléculas que se ligam ao alvo biológico. Por fim, uma outra técnica de racionalização consiste no embasamento de fragmentos considerado farmacóforos (FBDD) para diversas atividades biológicas. As relações estrutura atividade e a modelagem de farmacóforos são ferramentas de suma importância durante os processos de planejamento (APAROY; REDDY; REDDANNA, 2012).

3.9 Estratégias de modificação molecular

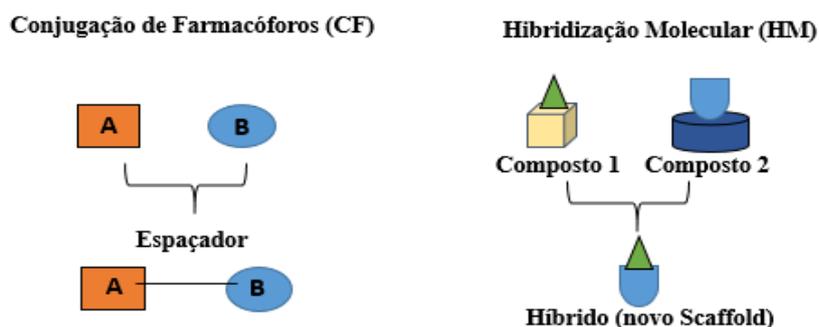
As estratégias de modificação molecular representam uma ferramenta útil na busca de novos compostos biologicamente ativos. Este processo é frequentemente empregado na otimização de estruturas privilegiadas na tentativa de melhorar as propriedades biológicas. A hibridização molecular e o bioisosterismo são dois dos mais importantes processos de modificação, sendo amplamente utilizados nos projetos de diversas classes terapêuticas (SERAFIM et al., 2014).

3.9.1 Hibridização e conjugação de farmacóforos

De acordo Zhang et al. (2019) e Viegas-Junior et al. (2007) a hibridização molecular (HM) é uma estratégia da química medicinal que busca otimizar o desenho de novos fármacos. Essa técnica tem como objetivo combinar grupamentos farmacofóricos de duas entidades químicas com a mesma função biológica (ou duas ou mais partes estruturais com diferentes bioatividades) levando ao projeto de novos compostos. Esses novos derivados apresentam as mesmas características pré selecionadas dos seus precursores, porém busca-se respostas farmacológicas potencializadas devido a uma maior afinidade, potência ou mecanismos duais.

Também pode ser obtido compostos multifuncionais através da conjugação de farmacóforos (CF) empregando um espaçador químico ou linker para conectar fragmentos ou subunidades bioativas. Esses compostos são considerados ligantes híbridos porém não alteraram significativamente a arquitetura do protótipo (ZHANG; SAATHOFF; ELE, 2017). A esquematização da (HM e (CF) encontra-se na figura 8.

Figura 8. Desenho de híbrido por conjugação de farmacóforos e hibridização molecular



Fonte: autoria (2019).

3.9.2 Bioisosterismo

O conceito de bioisosterismo resultou do princípio de isosterismo postulado por Langmuir em 1919, em estudos de comportamento químico e reatividade de átomos e grupos com o mesmo número de elétrons na camada de valência, a exemplo do (N_2 e CO). Em 1951, Friedman introduziu o termo bioisosterismo para descrever a influência dos isómeros sob a atividade biológica. Com isso, o bioisosterismo está correlacionado a estruturas heterocíclicas, átomos, grupos funcionais presentes em compostos bioativos, que tem volume molecular, forma, distribuição eletrônica e propriedades físico-químicas semelhantes (LIMA; BARREIRO, 2017; MEANWELL, 2011).

Esta modificação molecular é baseada na intercambialidade desses fragmentos, com o objetivo de melhorar os perfis farmacocinéticos, farmacodinâmicos e toxicológicos. Essa aplicação na química medicinal é interessante no desenvolvimento de novos fármacos, entretanto é importante associar ao conhecimento das subunidades moleculares farmacofóricas e auxofóricas do protótipo (LANGDON; ERTL; BROWN, 2010; SILVERMAN; HOLLADAY, 2014; WERMITH et al., 2007).

O bioisosterismo pode ser classificado em duas categorias: clássicos e não clássicos. O clássico constitui átomos, grupos e radicais cujas camadas periféricas de elétrons possuem a mesma valência, sendo estes dispostos em átomos ou grupos, mono, di, tri ou tetravalentes (quadro 3). O bioisosterismo não clássico não atende a regra do hidreto (Quadro 4) no entanto apresentam equivalência físico-química que os tornam potencialmente capazes de afetar os sistemas biológicos pela capacidade de serem reconhecidos por um biorreceptor, a exemplo tem-se as trocas de formas cíclicas e não cíclicas e a inversão de grupos funcionais (retro ésteres) (GRAHAM et al, 2014; LIMA; BARREIRO, 2017; STROPPA et al., 2017).

Quadro 3. Exemplos de bioisómeros clássicos: grupos e átomos

Monovalente	Divalente	Trivalente	Tetravalente
F, OH, NH_2 , CH_3 , OR	$-CH_2-$	$-CH-$	$=C=$
Cl, SH, PH_2 , SiR_3 , SR	$-O-$	$=N-$	$=Si=$
Brx	$-S-$	$=P-$	$=N^+=$
I	$-Se-$	$=As-$	$=P^+=$
	$-Te-$	$=Sb-$	$=As^+=$
			$=Sb^+=$

Fonte: adaptado de Lima e Barreiro (2017).

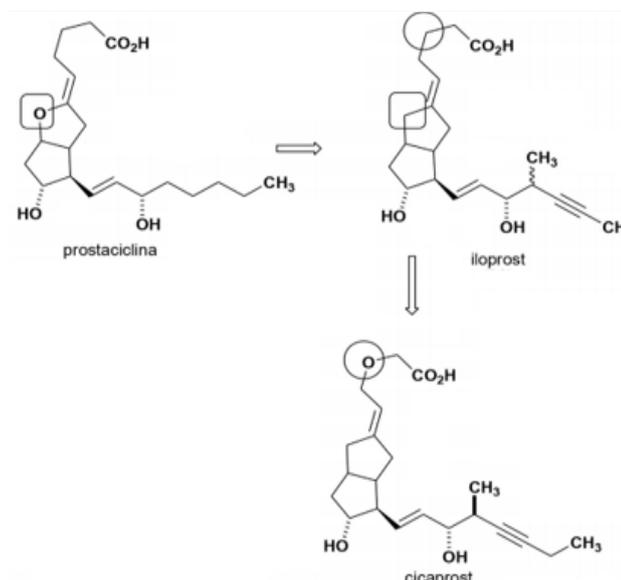
Quadro 4. Exemplo de bioisósteros não clássicos

- CO-	- COOH-	- SO ₂ NH ₂	- H	- CONH-	- COOH-
- CO ₂ -	- SO ₃ H-	- PO(OH)NH ₂	- F	- NHCO-	- ROCO-
- SO-	Tetrazol				
- SO ₂ NR-	- SO ₂ NHR-		- OH		Catecol
- CON-	3-Hidroxi-isoxa- zol		- CH ₂ OH		Benzimidazol
- (CH)CN-	3-Hidroxi-cro- meno		- NHCONH ₂		

Fonte: adaptado de Lima e Barreiro (2017).

Com relação aos exemplos de bioisosterismo clássico comumente empregados no desenvolvimento de fármacos, têm-se a substituição de funções enol e éter por grupos metilênicos. Inicialmente foi visto que essas funções eram responsáveis pela labilidade química dos eicosanóides, que ao serem substituídos permitiu a criação do iloprost, bioisósteros clássico ativo capaz de atuar como agonista dos receptores de prostaciclina, como agentes antiplaquetários. Posteriormente, também foi realizada outra substituição bioisostérica desse composto entre o grupo divalente CH₂/O na posição C-3, com o objetivo de prevenir a β- oxidação, que inativa os prostanóides e análogos, dando origem ao cicaprost (Figura 9) (BARREIRO; FRAGA, 2017; MEANWELL, 2011).

Figura 9. Bioisosterismo clássico divalente CH₂/O de análogos a prostaciclina (iloprost e cicaprost).



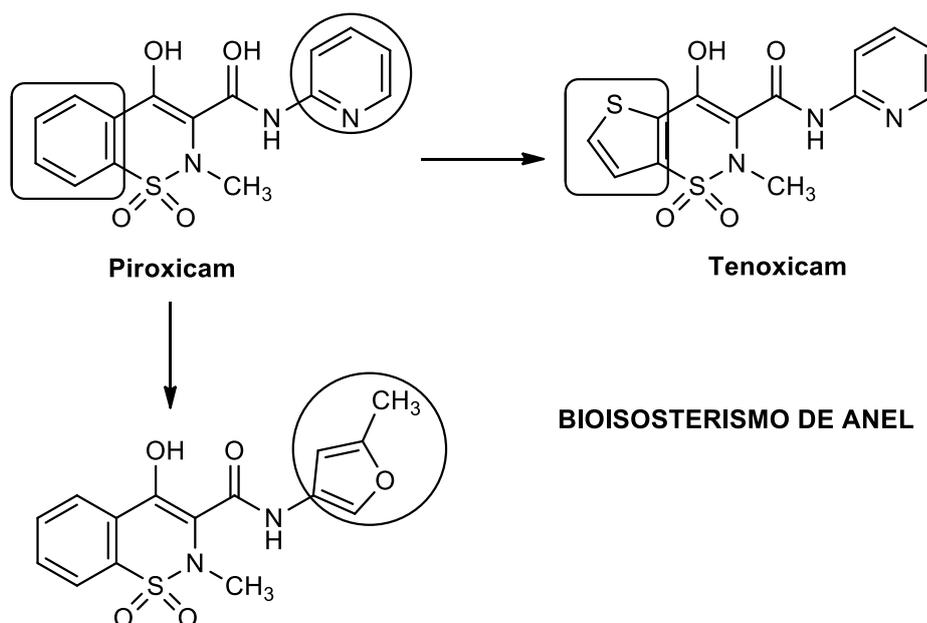
Fonte: adaptado de Lima e Barreiro (2017).

O bioisosterismo de anéis é uma estratégia de modificação molecular amplamente empregada no desenvolvimento de novas drogas anti-inflamatórias. O protótipo piroxicam apresenta um anel fenílico que foi substituído por um anel tiofênico e piridina resultando respectivamente na descoberta do tenoxicam e isoxicam (Figura 10). Essas técnicas foram empregadas na tentativa de melhorar a potência e perfil de segurança gástrica desses compostos, entretanto esses compostos permanecem indutores de danos a mucosa gástrica (SHU; ROUZER; MARNETT, 2014)

Para os compostos inibidores seletivos da COX-2, celecoxib e etorocoxib foram realizadas substituições bioisostéricas anelares (Figura 10 B). Comparando-se as duas estruturas, pode-se observar um sistema cíclico tertfenilo formado por um anel heterocíclico central pirazol para o celecoxib e uma piridina para o etorocoxib. As demais modificações foram resultantes da troca do grupo CH_3 para uma NH_2 , ambos monovalentes, concebendo a subunidade metilsulfona a partir do fragmento sulfonamidas, originando o etorocoxib.

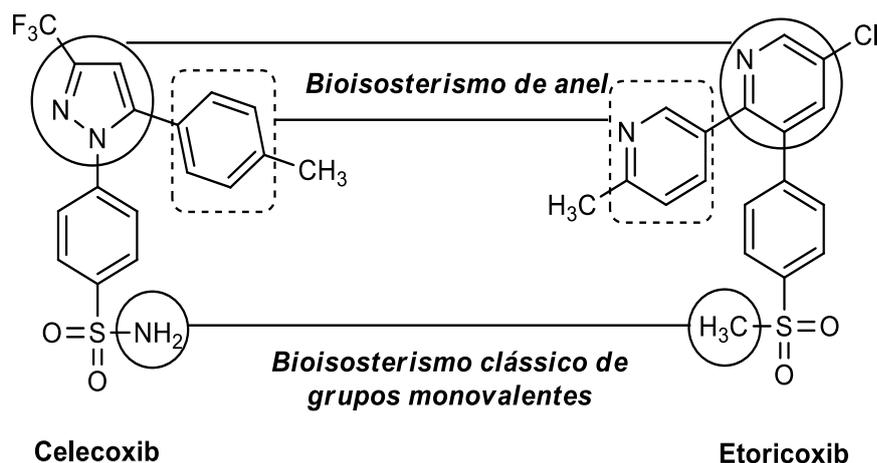
Figura 10. Bioisosterismo de anéis de fármacos anti-inflamatórios derivados dos oxicams (A) e de inibidores seletivos de COX-2 (B).

(A)



Fonte: adaptado de Lima e Barreiro (2017).

(B)

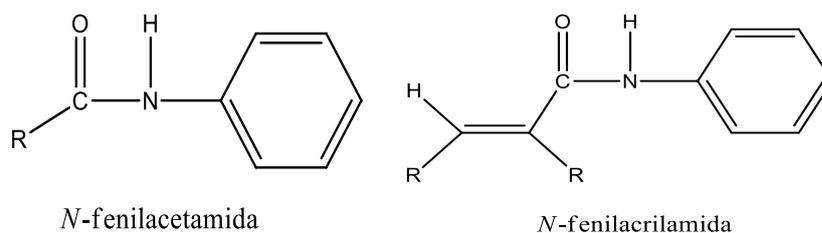


Fonte: adaptado de Lima e Barreiro (2017).

3.10 Derivados fenilacetamida e fenilacrilamida como potenciais agentes terapêuticos

Nos últimos anos, foi realizado uma extensa investigação de diferentes fragmentos privilegiados incluindo a função fenilacetamida e fenilacrilamida (Figura 11). Os compostos com essas funções são obtidos inicialmente por uma reação de amidação, seguida por condensações com diversos constituintes químicos. Muitos desses derivados possuem efeitos biológicos interessantes e potenciais, a exemplo de atividade antimicrobiana, antimalárico, anticonvulsivante, antineoplásica e anti-inflamatória (FARANI-MOHAMMADI, HEIDARIAN; ALIABADI, 2014) (Quadro 5).

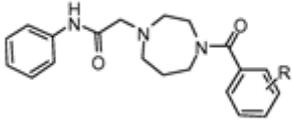
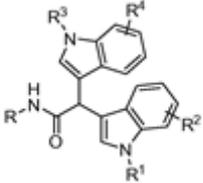
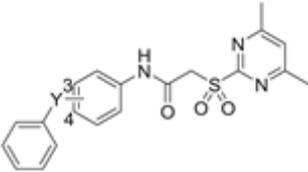
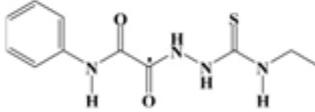
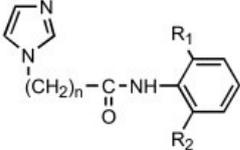
Figura 11. Funções *N*-fenilacetamida e *N*-fenilacrilamida

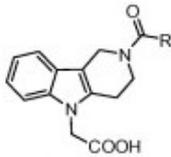
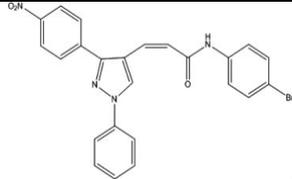
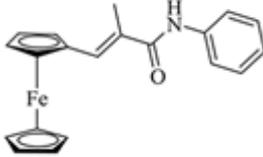


Fonte: autoria (2019).

Quadro 5. Atividades biológica de derivados *N*-fenilacetamida (1) e *N*-fenilacrilamida (2).

(Continua)

Atividade Biológica	Estrutura Química	Autor
<p>Antimalárico (Inibidor de Falcipain -2)</p> <p>(1)</p>	 <p>2-(4-(benzoyl)-1,4-diazepan-1-yl) - <i>N</i>-fenilacetamida</p>	<p>Mahesh et al. (2019).</p>
<p>Antitumoral (Câncer de Cólon)</p> <p>(1)</p>	 <p>2,2- di (1H-indol-3il)-<i>N</i>-fenilaceta- mida</p>	<p>Li et al. (2016).</p>
<p>Inibidor de Sirtuina Humana (Antitumoral/Anti-inflamatório)</p> <p>(1)</p>	 <p>2 -(4,6-dimetilpirimidin-2-il) tio) - <i>N</i>- fenilacetamida</p>	<p>Yang et al. (2017)</p>
<p>Antimicrobiano</p> <p>(1)</p>	 <p>(etilcarbamoioil) hidrazinil) -2- oxo- <i>N</i>- fenilacetamida</p>	<p>El-Gammal (2010).</p>
<p>Anticonvulsivante</p> <p>(1)</p>	 <p>ω-(1H-imidazol-1-yl)-<i>N</i>-phenylace- tamide</p>	<p>Soyer et al. (2004).</p>

<p>Anti-inflamatório (Inibidor de CRTH₂)</p> <p>(2)</p>	 <p>(<i>E</i>)-2-ciano-3- (<i>1H</i>-indol-3-il) acrilamida</p>	<p>Valdenaire et al. (2014)</p>
<p>Antitumoral (Inibidor de HDAC)</p> <p>(2)</p>	 <p>3- (1,3-difenil- <i>1H</i>-pirazol-4-il) - <i>N</i>- fenilacrilamida</p>	<p>Li et al. (2012)</p>
<p>Anticâncer</p> <p>(2)</p>	 <p>(<i>E</i>)-2-metil-3-ferrocenil- <i>N</i>- acrilamida</p>	<p>Liu et al. (2019)</p>

Com relação a atividade anti-inflamatória desses derivados, há poucos estudos empregando essa classe. Estudos preliminares de Gu et al. (2019) sintetizou uma serie de chalconas sintéticas fenilacrilamida, no qual apresentou mecanismo antioxidante via ativação Nrf2, induzindo a expressão de proteína e mRNA de enzimas antioxidantes e jusantes, indicando seu potencial anti-inflamatória.

Também foi avaliado o potencial anti-inflamatório do derivado (*E*)-2-ciano-3- (*1H*-indol-3-il) acrilamida frente aos receptores CRTH₂ acoplados a proteínas G. Esses receptores ao serem ativados agem promovendo quimiotaxia, levando ao recrutamento de granulócitos e células LTH₂ para o loca da inflamação. Segundo Valdenaire et al. (2014) inibição desse receptor pelo composto desta classe, pode ser útil no manejo de doenças inflamatórios como a asma.

Diante disso, consideramos a hipótese dos derivados JM-01, JMPR-01 e ICMD-01 apresentar a atividade anti-inflamatória, dando continuidade a investigação da atividade biológica desses compostos, atualmente pouco explorada. Como proposta para esses derivados serão empregadas técnicas de hibridação molecular e bioisosterismo de anel.

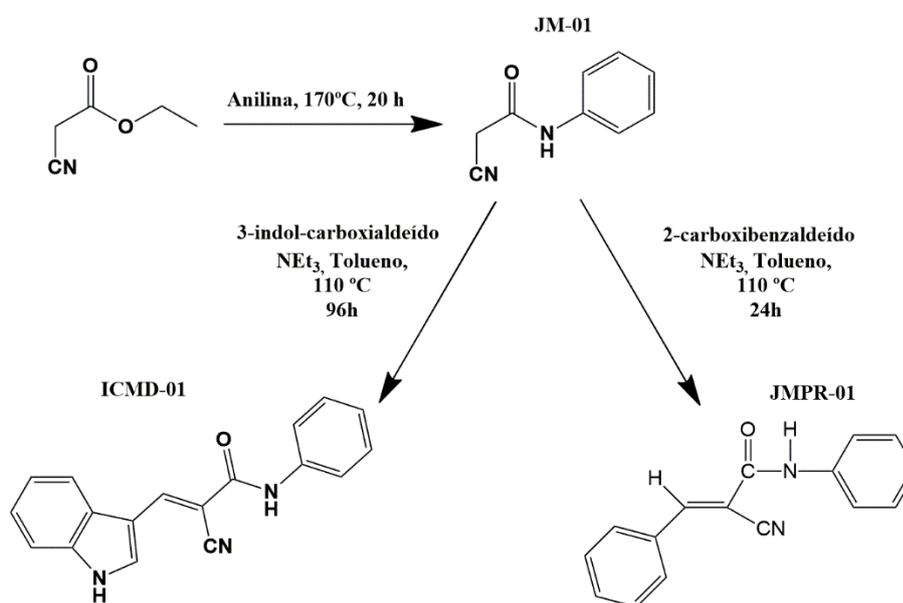
4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Química

4.1.1. Procedimento geral para obtenção dos compostos

O JM-01 e o ICMD-01, foram sintetizados segundo a metodologia previamente relatada por Silva (2018) com adaptações. Já o derivado JMPR-01 foi obtido a partir de uma rota linear, através da uma condensação proposta por *Knoevenagel* utilizando como intermediários o JM-01 e o 4- carboxibenzaldeído (*Sigma Aldrich*) (Esquema 1).

Esquema 1. Obtenção dos compostos 2-ciano-*N*-fenilacetamida (JM-01), 2-ciano-3-(1H-indol-3-il)-*N*-fenilacrilamida (ICMD-01) e (E)-2-ciano-*N*,3-difenilacrilamida (JMPR-01).



4.1.2 Síntese do 2-ciano *N*-fenilacetamida – JM-01

Em um balão de 50 mL foram adicionados 0,5000 mL (0,0047 mols) de 2-cianoacetato de etila com 0,4300 mL de anilina na proporção de 1:1 na presença de 5,000 mL de dimetilformamida – DMF sob agitação magnética com temperatura de aquecimento de 170 °C durante aproximadamente 20 horas. O andamento da reação foi acompanhado por CCDA, e ao não observar produto de partida finalizou-se a reação com água destilada, filtrando-se o precipitado. Os cristais obtidos foram purificados através de recristalização em etanol/água).

4.1.3 Síntese do 2-ciano-3- (1H-indol-3-il) -*N*-fenilacrilamida – ICMD-01

Em um balão de 50 mL foi solubilizado 0,2206 g (0,0014 mols) de JM-01 em 10 mL de tolueno e 6 gotas de NEt_3 deixando a mistura reacional em agitação magnética e temperatura ambiente por 5 minutos. Transcorrido esse tempo, adicionou-se 0,2000 g (em equivalência molar) de aldeído indólico e elevando a temperatura para aproximadamente 110 °C. A reação foi acompanhada por CCDA, finalizando-a após 96h forçando a precipitação com água destilada. Os cristais filtrados foram posteriormente purificados em uma mistura de etanol/água 1:1.

4.1.4 Síntese do (E) -2-ciano-*N*,3-difenilacrilamida –JMPR-01

Em um balão de 50 mL foi solubilizado 0,2206 g (0,0014 mols) de JM-01 em 10 mL de tolueno e 6 gotas de NEt_3 deixando a mistura reacional em agitação magnética e temperatura ambiente por 5 minutos. Transcorrido esse tempo, adicionou-se 0,2000 g (em equivalência molar) o carboxibenzaldeído elevando a temperatura para aproximadamente 110 °C. A reação foi acompanhada por CCD, finalizando-a após 24h forçando a precipitação com água destilada. Os cristais filtrados foram posteriormente purificados em uma mistura de etanol/água 1:1.

4.2 Caracterização físico-química

Foram avaliados parâmetros como: solubilidade em diferentes solventes orgânicos, aparência, fator de retenção (Rf) – por meio de cromatografia de camada delgada analítica (CCDA) em placas de sílica gel, faixa de fusão (F.F) – através do aparelho Quimis Modelo Q-340M e rendimento utilizando a equação matemática (1). A determinação da fórmula molecular, peso molecular e coeficiente de partição teórico ($\log P$) foi realizado utilizando o programa *Chemdraw* Ultra 12.0

$$\text{rendimento (\%)} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de mols do produto obtido} \times 100}{\text{n}^\circ \text{ de mols do produto de partida}} \quad (1)$$

4.2.1 Caracterização térmica

4.2.1.1 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

As curvas de calorimetria exploratória diferencial foram obtidas em módulo exploratório diferencial do calorímetro DSC Q20 (TA® - Instruments, New Castle, Delaware, EUA).

Foram utilizadas amostras de $2,00 \pm 0,05$ mg, acondicionadas em cadinhos de alumínio hermeticamente fechados, analisadas na razão de aquecimento de $10 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ com temperatura de $25 \text{ }^\circ\text{C}$ a $400 \text{ }^\circ\text{C}$, sob uma atmosfera de nitrogênio com fluxo de 50 mL min^{-1} .

4.2.1.2 Termogravimetria (TG) e sua derivada (DTG)

As curvas termogravimétricas foram obtidas em um módulo termogravimétrico modelo Pyris 1 TGA (Perkin Elmer®, Boston, Massachusetts, EUA). Foram utilizadas amostras de $5,00 \pm 0,05$ mg, acondicionadas em cadinhos de alumina para cada amostra, utilizando uma razão de aquecimento de $10 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$, com temperatura de $25 \text{ }^\circ\text{C}$ a $900 \text{ }^\circ\text{C}$, sob uma atmosfera de nitrogênio, com fluxo de 50 mL min^{-1} . Utilizou-se a derivada da curva termogravimétrica para auxiliar na interpretação do número de etapas.

4.3 Elucidação estrutural

4.3.1 Ressonância Magnética Nuclear

Os espectros de ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e de Carbono (RMN de ^1H e RMN de ^{13}C DEPT-Q) foram obtidos através do aparelho Bruker Avance Spectrometer (AC-500), com frequência de 500 MHz para ^1H e 125 MHz para ^{13}C . O tratamento dos espectros foram realizados pelo software MestReC 4.8.6.0. Essas análises foram realizadas em parcerias com a Universidade Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) pelo Laboratório de Diversidade Molecular e Química Medicinal sob a coordenação do Professor Dr. Arthur Eugen Kümmerle.

4.3.2 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)

Espectros de FT-IR foram obtidos em espectrofotômetro (modelo IRPrestige-21, SHIMADZU -Japão) pela técnica de refletância total atenuada (ATR) na faixa espectral de 4000 a 700 cm^{-1} . Após análise os dados foram tratados com auxílio do software Origin 8.0.

4.3.3 Espectrometria de massas

As medidas das massas exatas (EM) foram obtidas em espectrômetro de Massa MALDI-TOF Autoflex III (Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA). Laser Nd: YAG, smartbeam 1, 355

nm Freq. laser: 100 Hz, Programa: FlexControl Versão 3.0 (Bruker Daltonics) Placa MALDI: MTP 384 ground steel (Bruker), Adaptador p/ placa: MTP target frame III (Bruker). Exportação dos dados foi realizada no Programa FlexAnalysis Versão 3.0 (Bruker Daltonics) e a Calibração externa utilizando matriz alfa-ciano e mistura padrão de peptídeos (Bruker).

4.4 Avaliação farmacológica

4.4.1 Local da pesquisa e procedimentos

Os testes farmacológicos foram desenvolvidos no Laboratório de Ensaios Farmacológicos da UEPB sob responsabilidade da Professora Dra. Vanda Lucia dos Santos e no Laboratório de Farmacologia e Terapêutica Experimental (LAFTE) da Universidade Federal da Bahia, sob responsabilidade da Professora Dra. Cristiane Flora Villarreal.

4.4.2 Animais

Foram utilizados camundongos albinos Swiss *Webster* e *Mus Musculus* adultos, machos, pesando entre 25 e 30g obtidos do Instituto Gonçalo Moniz e do biotério da Universidade Federal de Pernambuco. Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas, sob temperatura e umidade ambiente ($23 \pm 2^{\circ}\text{C}$), respeitando-se o ciclo claro-escuro de 12h, alimentando-se com ração e água *ad libitum*. Os procedimentos de cuidados e manuseio de animais estavam em estrita conformidade com as recomendações do Guia para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório dos Institutos Nacionais de Saúde e do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal com comitê (CEUA/ICS UFBA: 135/2018) com vigência até 02/2023. Todo esforço foi feito para minimizar o número de animais usados e qualquer desconforto proveniente do experimento. Para os ensaios, os animais foram divididos em grupos experimentais (controle negativo, positivo e teste) de 6 a 9 animais.

4.4.3 Preparo das substâncias

Para realização dos testes farmacológicos, as moléculas foram dissolvidas em solução salina acrescidas de DMSO (5%) imediatamente antes da utilização e administradas por via oral (gavagem).

4.4.4 Ensaios farmacológicos *in vitro*

4.4.4.1 Viabilidade celular em culturas de macrófagos J774

A citotoxicidade dos compostos foi determinada utilizando a linhagem celular J774 segundo a metodologia proposta por Mosmann (1983), adaptado conforme Espirito-Santo (2017). As células foram semeadas em placas de 96 poços (2×10^5 células/poços) em meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Life Technologies®, GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD, EUA), suplementado com 10% de soro bovino fetal (Gibco®, USA), e 50 µg/mL de gentamicina (Novafarma, Anápolis, GO, Brasil). As células foram incubadas por 2h a 37° a uma atmosfera de 5% de CO₂. Os compostos a serem testados foram adicionados nas concentrações de (100, 50, 25, 12,5 e 6,25) µM aos poços em triplicatas, e novamente incubados por 72h. Como controle positivo, foi usado a violeta de genciana (Synth, São Paulo, Brasil) a 10 µM. Por fim, adicionou-se 20 µL/poço de Alamarblue (Invitrogen®, Carlsbad, CA) à placa incubando-se novamente durante 12h. As leituras colorimétricas foram realizadas a 570 a 600 nm.

4.4.4.2 Avaliação da produção de citocinas e óxido nítrico

Para determinação de citocinas e produção de óxido nítrico (NO), células J774 foram semeadas em placas de cultura de 96 poços na concentração de (2×10^5) células/poço em meio DMEM suplementado com 10% de FBS e 50 µg/mL de gentamicina, sendo incubado por 2 horas a 37°C e 5% de CO₂. As células foram então estimuladas com LPS (500 ng/mL, Sigma) e IFN-γ (5 ng/ml; Sigma) na presença dos compostos, nas concentrações não citotóxicas estabelecidas pelo ensaio de viabilidade celular, veículo ou dexametasona (40µM) e encubadas novamente 37° C. Os sobrenadantes das células foram coletadas 4 horas (para dosagem de TNF-α) e 24 horas (para quantificação de IL-1β e nitrito) sendo mantidas a -80 °C. As concentrações de citocina em sobrenadantes de culturas de macrófagos foram determinadas por ensaio imunoenzimático (ELISA), usando o kit DuoSet da R & D Systems (Minneapolis, MN, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. A quantificação do óxido nítrico foi realizada pelo método de Griess de acordo com Green et al. (1982).

4.4.5 Avaliação da atividade biológica *in vivo*

4.4.5.1 Peritonite induzida por zymosan

Camundongos (n=5) em jejum prévio de 6 horas, divididos em grupos: controle negativo, controle positivo e grupos testes foram tratados respectivamente com (solução salina 10 mL kg⁻¹), indometacina 10 mg kg⁻¹ e os derivados nas doses de (5, 10 e 50 mg kg⁻¹), por via oral. Após 30 minutos, foi injetado 0,25mL de zymosan a 2% na cavidade intraperitoneal. Quatro horas após a indução da inflamação, os animais foram eutanaseados por deslocamento cervical. Em seguida foi administrado 2 mL de solução tampão fosfato (PBS pH 7.2) na cavidade intraperitoneal, massageando levemente o abdômen e através de incisão coletou-se o fluido peritoneal para realizar a contagem de leucócitos totais em câmara de Neubauer, sob análise por microscopia óptica (CUNHA, 1989).

4.4.5.2 Edema de pata, hiperalgesia inflamatória e dosagens de citocinas e prostaglandinas locais em inflamação induzida por CFA

Os camundongos foram levemente anestesiados com halotano e receberam 20 µL de adjuvante completo de Freund (CFA 1 mg/mL de *Mycobacterium tuberculosis* inativados em 85% de óleo de parafina e 15% de mannidemonoleato; Sigma) na região plantar da pata traseira direita como previamente relatado por Lima et al. (2013). Hiperalgesia, edema, citocinas inflamatórias locais e prostaglandina E₂ foram medidos por filamentos de *von Frey*, pletismômetro e ELISA respectivamente, conforme descrito abaixo. Os camundongos, separados em grupos (n = 6) foram tratados com os compostos em diferentes doses v.o (25, 50 e 100 mg kg⁻¹), solução salina + 5% DMSO 10 mL kg⁻¹ (controle) e dexametasona 2 mg kg⁻¹, i.p 40 minutos antes do CFA. Para as dosagens de citocinas e PGE₂ foi escolhida a dose responsável pelo efeito máximo atribuída pelo teste do pletismômetro.

➤ Avaliação da hiperalgesia inflamatória

O limiar para a estimulação mecânica foi medido com filamentos de *Von Frey* (Stoelting, Chicago, IL, EUA). Em uma sala silenciosa, os animais foram colocados em gaiolas de acrílico (12 × 10 × 17 cm) com piso de grade de arame, 30 minutos antes do início do teste. O ensaio consistiu em evocar um reflexo de flexão da pata traseira com um de uma série de filamentos com rigidez logaritmicamente incremental (0,0045–28,84 g). Uma resposta positiva foi

caracterizada pela remoção da pata seguida de movimentos de pestanejar claros. Um espelho inclinado colocado sob a grade forneceu uma visão clara das patas traseiras dos camundongos. Um método up-down foi usado para registrar o limiar, que foi representado como o peso do filamento (g), no qual o animal responde em 50% das apresentações (CHAPLAN et al., 1994).

➤ *Edema de pata induzida por CFA*

O volume de cada pata de camundongo foi medido (mm^3) com um plestismômetro (Ugo Basile, Comerio, Itália) antes do tratamento e após a injeção de CFA, como descrito anteriormente por Lima et al. (2013). A quantidade de inchaço da pata foi determinada para cada animal e os dados foram representados como variação do volume da pata (Δmm^3).

➤ *Medição de citocinas por ELISA*

Os níveis de citocinas na pata foram determinados como descrito por Lima et al. (2013). Os tratamentos foram realizados 40 minutos antes da injeção de CFA. Os tecidos da pele foram removidos das patas 4 e 24 h após o CFA, em camundongos anestesiados terminalmente com halotano de cada grupo experimental. As proteínas teciduais foram extraídas de 100 mg de tecido/mL de solução salina tamponada com fosfato (PBS), na qual NaCl 0,4 M, Tween 20 a 0,05% e inibidores de protease (PMSF 0,1 mM, cloreto de benzetônio 0,1 mM, EDTA 10 mM e aprotinina A / 100 20 KI mL) foram adicionados (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, EUA). As amostras foram centrifugadas por 10 min a 3000 g e o sobrenadante foi congelado a -70°C para quantificação posterior. Os níveis de fator de necrose tumoral α (TNF- α) e interleucina-1 β (IL-1 β) foram estimados usando kits ELISA de imunoenensaio disponíveis comercialmente para camundongos (R&D System, Minneapolis, MN, EUA), de acordo com as instruções do fabricante.

➤ *Medição de PGE₂ em pele de pata*

O tecido plantar foi coletado 3 h após a injeção intraplantar de CFA (20 μL /pata). As patas foram injectadas com indometacina (50 μg /pata), 10 minutos antes da recolha de tecidos para bloquear produção de a PGE₂ durante o processamento do tecido. Os níveis de PGE₂ foram determinados por radioimunoensaio, como descrito anteriormente por Cunha et al.

(2010). Resumidamente, as amostras de tecido plantar foram homogeneizadas em uma mistura de 3,0 mL de solvente de extração (isopropanol/ acetato de etila/HCl 0,1 N, 3:3:1) e 3,0 mL de água destilada que continham 20 μ g/mL de indometacina. Os homogenatos foram centrifugados a 1500 \times por 10 min a 4 °C. A fase orgânica foi aspirada e evaporada até à secura em um evaporador centrífugo. O sedimento foi reconstituído em 500 μ L de tampão fosfato 0,1 M (pH 7,4) contendo 0,8% de azida de sódio e 0,1% de gelatina. Concentração da PGE₂ nestas amostras foi então medida por RIA utilizando um kit disponível comercialmente. Os resultados são expressos em picogramas de PGE₂ por miligrama de proteína.

4.4.5.3 Tail flick

O teste do movimento da cauda em camundongos foi conduzido Segundo Gama et al. (2013). Antes do experimento, cada animal estava habituado ao cilindro de contenção por 20 minutos /dia por 5 dias consecutivos. No dia do experimento, os camundongos separados em grupos (n= 6), foram tratados com morfina i.p (5 mg kg⁻¹), o composto na dose de (50 mg kg⁻¹) e salina (10 mL mg kg⁻¹) v.o. Após os tratamentos, os animais foram colocados no cilindro de contenção e a ponta da cauda (2 cm) foi submersa em banho-maria a 50 \pm 0,5 ° C. A latência do reflexo de retirada da cauda foi medida em segundos. Cada submersão foi terminada após 16 segundos para minimizar possíveis danos à pele. A latência da retirada da cauda foi medida antes (baseline) e após os tratamentos.

4.4.5.4 Ensaio de função motora

Para avaliar possíveis efeitos não-específicos de relaxante muscular ou sedativos dos compostos, camundongos foram submetidos ao teste de rota-rod. O aparelho de rota-rod (Insight, Ribeirão Preto, SP, Brasil) consiste de uma barra com diâmetro de 3 cm, subdividida em cinco compartimentos. A barra girou a uma velocidade constante de 6 rotações por minuto. Os animais foram selecionados 24 horas antes, eliminando aqueles animais que não permaneceram na barra por dois períodos consecutivos de 120 s. Os animais foram separados em grupos (n=6) e tratados, respectivamente com o composto na dose de 50 mg kg⁻¹ v.o e diazepam i.p (10 mg kg⁻¹) 40 minutos depois foram colocados numa haste rotativa. A resistência à queda foi medida por até 120 s. Os resultados são expressos como o tempo médio (s) que os animais permaneceram no rota-rod em cada grupo (GAMA et al., 2013).

4.4.6 Avaliação da toxicidade *in vivo*

4.4.6.1 Toxicidade aguda

O teste de toxicidade aguda oral foi realizado segundo metodologia descrita no Guia 423 das diretrizes da OECD (Organization for Economic Cooperation and Development). Foram utilizados grupos de 3 animais fêmeas. Os animais do grupo controle, receberam o veículo (v.o DMSO 5% acrescido de salina) enquanto que os animais do grupo tratados com ICMD-01 receberam uma dose de 2000 mg kg^{-1} v.o. Foram realizadas observações comportamentais sistemáticas nos tempos de 15min, 30 min, 1h, 2h, 4h e 8h após a administração e, a partir de então, diariamente, até o décimo quarto dia, por meio do screening hipocrático segundo Almeida (1999) (Anexo A). Parâmetros como massa corporal, consumo de água e ração foram observados a cada 24 horas durante 14 dias. Ao final do experimento, os animais foram pesados e anestesiados para coleta de punção cardíaca para análise bioquímica e em seguida submetidos a eutanásia, sendo os órgãos (fígado, baço, rins e estômago) retirados, pesados e avaliados microscopicamente.

4.4.6.2 Susceptibilidade ulcerogênica

A metodologia de susceptibilidade ulcerogênica foi realizada de acordo com Bakr, Ghoneim e Azouz (2019), com adaptações. Inicialmente os animais foram divididos em dois grupos (n=5) e submetidos a um jejum de 12h. O grupo controle foi tratado com salina acrescida de DMSO 5% e o grupo teste com o ICMD-01 (50 mg kg^{-1}). Os animais receberam a dose específica por via oral durante 7 dias sucessivos, respeitando-se o prazo de 24h. Ao final do sétimo dia, os animais foram eutanaseados por aprofundamento anestésico (xilazina 20 mg kg^{-1} e que-tamina 150 mg kg^{-1} ip) e os estômagos retirados e abertos ao longo da curvatura maior. As lesões ulcerativas foram quantificadas macroscopicamente através da utilização de uma lupa OLYMPUS SZ2-LGB para determinação do índice de lesão ulcerativa (ILU), conforme o número e severidade das lesões, seguindo a fórmula (2) (GONZALES et al., 2001).

$$\text{ILU} = \sum (\text{lesões de nível 1} \times 1) + (\text{lesões de nível 2} \times 2) + (\text{lesões de nível 3} \times 3) \quad (2)$$

Nível 1 = pontos hemorrágicos e ulcerações até 1 mm; nível 2 = ulcerações até 2 mm; nível 3 = ulcerações a partir de 3 mm.

4.4.7 Avaliação da toxicidade *in vitro*

4.4.7.1 Atividade hemolítica

A preparação das hemácias para o teste de citotoxicidade seguiu a metodologia descrita por Cruz-Silva et al (2000), com algumas modificações. Para tal, utilizou-se eritrócitos humanos frescos (tipo O+) doado pela própria analista. A quantidade necessária foi coletada pelo laboratório de Análises Clínicas da UEPB e acondicionado em tubos com heparina. O plasma foi retirado após centrifugação a 2500 rpm por 5 minutos. Posteriormente, a suspensão de hemácias foi lavada com solução salina 1% três vezes. As hemácias foram ressuspensas com a mesma solução e o volume foi ajustado para 10%. Em seguida, colocou-se 2 mL desta suspensão em tubo de ensaio e homogeneizadas com 2 mL do composto diluído na concentração de 500µg/mL, aguardou uma hora e centrifugou por 5 minutos a 2500rpm. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (540 nm), utilizando como branco a solução salina 1%, para confirmar os resultados da leitura visual. O controle negativo utilizado foi a suspensão de hemácias 10% mais a solução salina e controle positivo uma solução de ácido acético a 2%.

4.5 Predições farmacocinéticas

As predições farmacocinéticas foram obtidas pelas plataformas eletrônicas *SwissADME* (Swiss Institute of Bioinformatics, Suíça) e *Xenosite* (Universidade de Medicina de Washington, Estados Unidos), disponibilizadas gratuitamente. Como suporte teórico foram consultadas as referências de Daina, Michelin e Zoete (2017) e Zaretski, Matlock e Swamidass (2013). Para interface dos modelos preditivos é necessário que as estruturas estejam no formato smiles, podendo ser gerado pelo Chemdraw Ultra 12.0.

4.6 Análise estatística

Os dados são apresentados como média \pm erro padrão das médias (EPM) das medidas feitas em 5 a 6 animais em cada grupo. As comparações entre três ou mais tratamentos foram feitas usando ANOVA unidirecional com teste post-hoc de Tukey, ou para medidas repetidas, ANOVA two-way com teste post-hoc de Bonferroni, como apropriado. Para os testes de toxi-

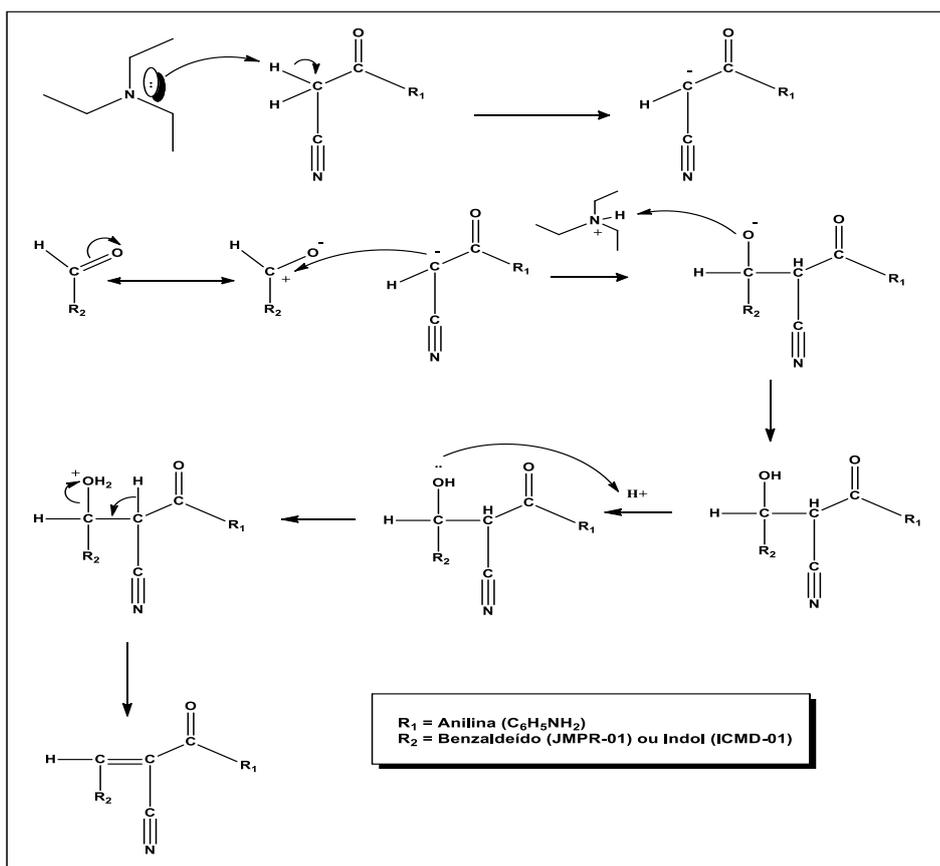
cidade aguda e susceptibilidade ulcerogênica foi realizado o teste T. Todos os dados foram analisados utilizando o Software de Computador Prism 5 (GraphPad, San Diego, CA, EUA). As diferenças estatísticas foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Síntese e caracterização físico-química dos derivados fenilacetamida (JM-01) e fenilacrilamida (JMPR-01 e ICMD-01)

Para obtenção dos compostos 2-ciano-*N*-3-difenilacrilamida (JMPR-01) e 2-ciano-3-(indol-3-yl)*N*-fenilacrilamida (ICMD-01) foi utilizado o intermediário 2-ciano-*N*-fenilacetamida (JM-01) previamente sintetizado e caracterizado por Silva (2018). As moléculas finais foram obtidas através de uma reação de condensação proposta por *Knoevenagel* apresentadas no esquema 2. O ICMD-01 foi resintetizado, mudando-se as condições reacionais na tentativa de otimizar a rota sintética. O composto JMPR-01 é inédito e seguiu a mesma proposta de mecanismo reacional.

Esquema 2. Mecanismo reacional da síntese dos derivados fenilacrilamida (ICMD-01 e JMPR-01).



Fonte: autoria (2019).

A condensação de *Knoevenagel* é uma reação orgânica importante na formação da ligação dupla carbono-carbono entre a função carbonila e grupos metilênicos ativados. Os produtos α , β -insaturados obtidos por esse tipo de condensação têm sido amplamente utilizados como intermediários na síntese de fármacos, produtos químicos, cosméticos, alimentícios e agroquímicos. Comumente essa reação ocorre sob presença de catalisadores como bases orgânicas, ácidos de Lewis, líquidos iônicos e organometálicos (APPATURI; SELVARAJ; HAMID, 2018; LI et al. 2019; WACH et al. 2015).

Com relação ao solvente para reação escolheu-se fazer a substituição do etanol pelo tolueno devido a sua natureza aprótica que favorece a atividade catalítica em temperaturas mais altas. Esta substituição do solvente permitiu o ganho no rendimento da reação em razão do aumento da reatividade favorecido pelo efeito de ressonância das ligações π da carbonila do aldeído facilitando o ataque nucleofílico do carbânion metilênico para formação da ligação C=C.

O catalizador utilizado foi trietilamina (NEt_3), cuja função no meio reacional foi abstrair um próton do carbono ligado diretamente a nitrila e a carbonila, que por efeito mesomérico negativo encontra-se deficiente de elétrons adquirindo uma carga parcialmente positiva. O efeito eletrônico exercido pelos ligantes torna o hidrogênio mais ácido, facilitando a perda do próton para formação do carbânion. Em seguida ocorre a condensação de *Knoevenagel* resultante do ataque nucleofílico do carbono do grupo carbonílico do aldeído pelo carbono deficiente de elétrons.

A trietilamina protonada transfere seu próton para o oxigênio do aldeído, forma uma hidroxila e restitui a base. O término da reação se processa com a protonação da hidroxila e sua saída plena em forma de água. Esse processo permite que o carbono oxide e culmine com a formação da ligação dupla.

Após a síntese, foram determinadas as propriedades físico-químicas dos compostos, estando estas intrinsecamente relacionadas à estrutura e interações moleculares. A determinação desses parâmetros é de grande importância para atividade farmacológica, nas fases farmacêutica, farmacocinética e farmacodinâmica. Sendo assim, foram determinados parâmetros como coeficiente de partição teórico (LogP) e massa molar (MM) utilizando o programa *Chemdraw 12.0*, além da faixa de fusão (FF), fator de retenção (Rf) e rendimento (tabela 1) e solubilidade (tabela 2).

Tabela 1. Características físico-químicas dos compostos: JM-01, JMPR-01 e ICMD-01

Compostos	Aparência	MM (g/mol)	Rend. (%)	FF (°C)	Rf ¹	FM*	Log (P)
JM-01	Pó marrom escuro	160,06	78,82	200-202	0,36 ¹	C ₉ H ₈ N ₂ O	1,14
ICMD-01	Pó amarelo	248,09	62,33	273-275	0,45 ¹	C ₁₈ H ₁₃ N ₃ O	2,62
JMPR-01	Pó cinza claro	287,11	72,37	230-232	0,60 ¹	C ₁₆ H ₁₂ N ₂ O	2,43

*FM = Fórmula molecular; ¹Rf: sistema hexano/AcOEt 7:3.

Tabela 2. Solubilidade dos compostos JM-01, JMPR-01 e ICMD-01 em diversos solventes orgânicos.

Compostos	Acetato	Acetona	DMSO	Etanol	Clorofórmio
JM-01	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
ICMD-01	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
JMPR-01	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim

Fonte: dados da pesquisa (2019).

O coeficiente de partição (LogP) é definido como a razão entre a concentração de soluto no solvente de partição (imiscível com água) e sua concentração em água. De acordo com Warin (2010) o papel da descrição de lipofilicidade é de grande importância na qualidade geral dos candidatos a fármacos, sendo o LogP implementado na regra de cinco de Lipinski (Ro5) (RYCKMANS et al., 2009).

Observando-se os LogP dos compostos, verifica-se valores menores que 5, estabelecendo uma das condições favoráveis para o processo de absorção. É importante salientar que uma droga para não ter um comprometimento farmacocinético, deve obedecer a outros parâmetros como: não mais de 5 doadores de ligação de hidrogênio, não mais que 10 aceptores de ligação de hidrogênio e uma massa molecular menor que 500 Da, sendo esses parâmetros não violados pelos compostos (CARON; VALLARO; ERMONDI, 2018).

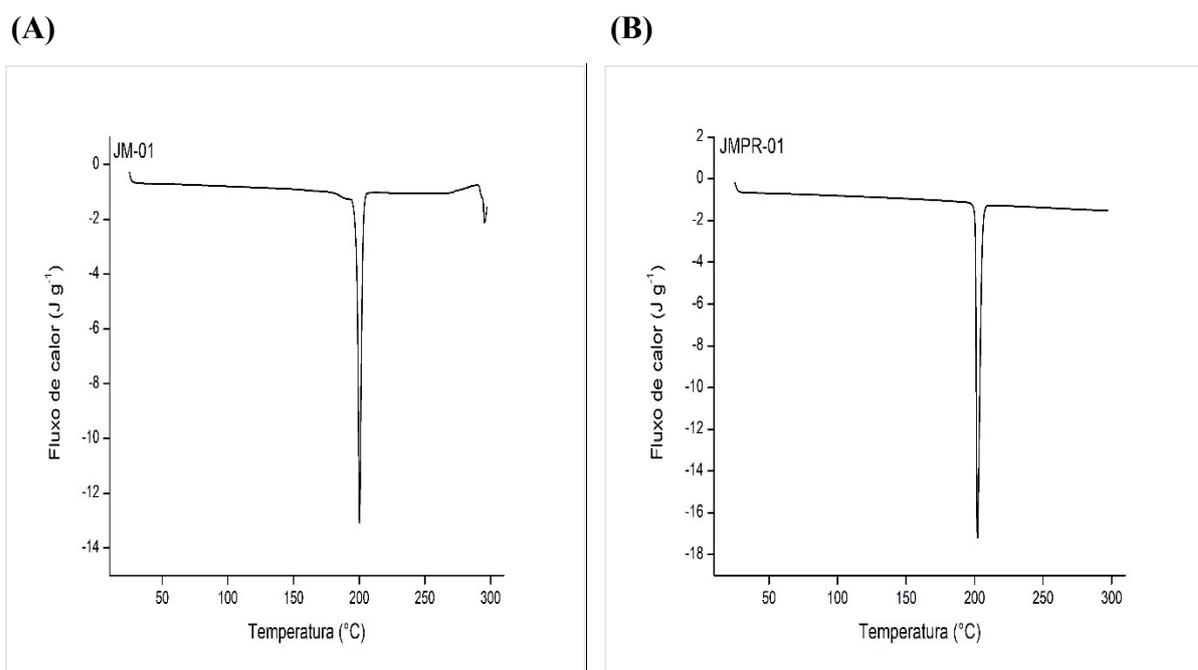
Todas as moléculas sintetizadas apresentaram rendimentos acima de 50% comprovando a boa exequibilidade da reprodução da rota sintética e fácil purificação. Em relação a faixa de fusão, pode-se observar uma variação de temperatura de aproximadamente 2°C. Esse intervalo relativo é medido entre o início e o fim do processo de fusão dos cristais, e sua pequena variação é característico de compostos puros (ROSA et al., 2016). A confirmação do ponto/faixa de fusão dos compostos e os seus respectivos graus de pureza foi realizado por técnicas termoanalíticas.

5.1.1 Caracterização térmica DSC e TG

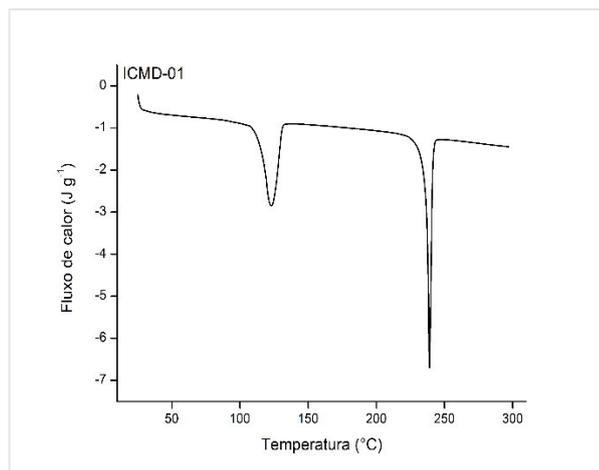
As técnicas termoanalíticas são amplamente utilizadas nos estudos de compostos farmacêuticos, com finalidade diversas, desde a estabilidade térmica, pureza e ponto de fusão à determinação de polimorfismos e estudos de compatibilidade (COLMAN et al., 2016; ZANGARO et al., 2019). Para este estudo, esta análise teve como objetivo identificar o ponto de fusão e o grau de pureza dos compostos sintetizados.

As curvas de DSC do JM-01 e JMPR-01 apresentaram pico endotérmico bem definido característico da sua fusão, ocorrendo a uma temperatura de 200,26 °C ($\Delta H = 222,5 \text{ J g}^{-1}$) e 202,08 °C ($\Delta H = 295,7 \text{ J g}^{-1}$) respectivamente. Já o composto ICMD-01 apresenta dois eventos térmicos, o primeiro ocorre em 123,16°C ($\Delta H = 126,1 \text{ J g}^{-1}$), relacionando-se a desidratação da amostra, e o segundo pico endotérmico apresentado em 238,89 ($\Delta H = 125,8 \text{ J g}^{-1}$) característico da sua fusão (Figura 12). Com relação ao grau de pureza, os compostos JM-01, JMPR-01 e ICMD-01 apresentaram respectivamente o seguinte percentual mol %: 99,42, 99,82 e 97,47.

Figura 12. Calorimetria diferencial exploratória (DSC) dos compostos: JM-01 (A), JMPR-01 (B) e ICMD-01 (C).



(C)

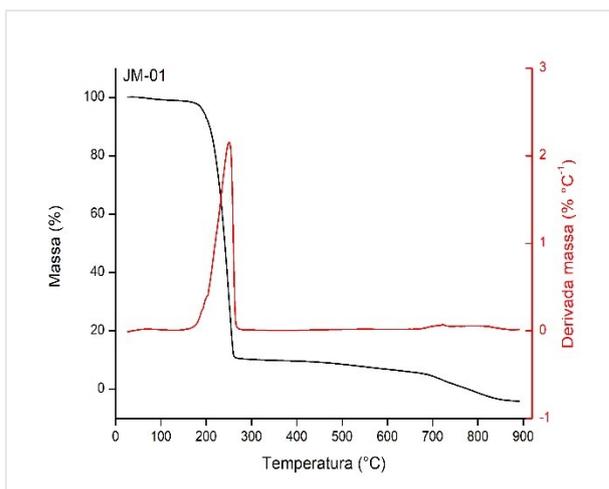


Fonte: dados da pesquisa (2019).

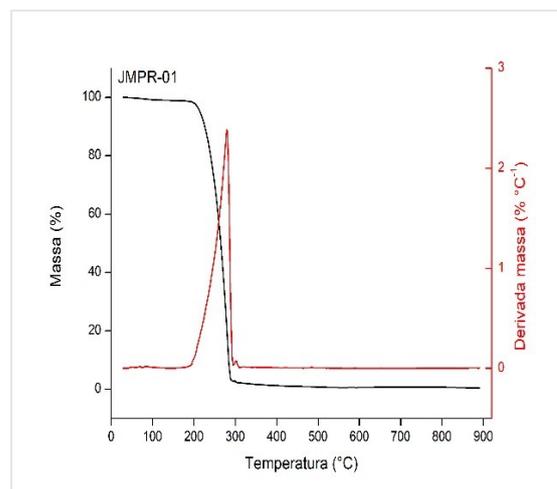
As curvas termogravimétricas dos compostos JM-01 e JMPR-01 apresentaram uma única etapa de degradação entre 143,15 - 278,33 °C e 174,35 - 319,92°C, respectivamente, com perdas de massa de 88,41 e 96,74%. Já o composto ICMD-01, apresentou duas etapas, a primeira entre 32,55 - 137,48 °C, característico da perda de umidade (7,14%) e uma etapa final entre 235,79 - 428,63 °C, com perda de massa de 54,84% (Figura 13). Ao final da análise foi verificado, exceto para o composto JM-01, a presença de resíduos inorgânicos que não se decompõem na sua totalidade até 900 °C, de 0,3545 % (JMPR-01) e 30,66 % (ICMD-01).

Figura 13. Curvas termogravimétricas dos compostos JM-01 (A), JMPR-01 (B) e ICMD-01 (C).

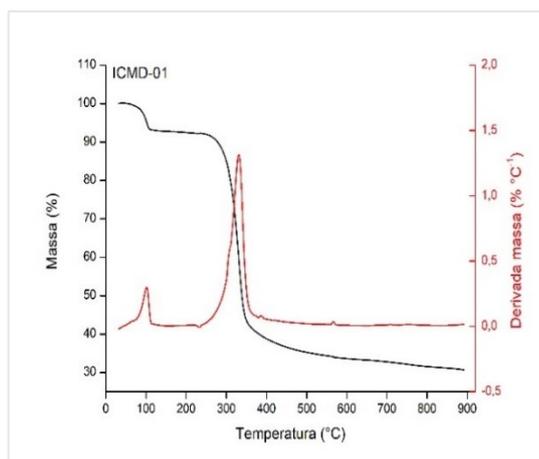
(A)



(B)



(C)



Fonte: dados da pesquisa (2019).

Tabela 3. Dados termogravimétricos e calorimétricos dos compostos JM-01, JMPR-01 e ICMD-01.

Compostos	TG		DSC			
	Estágio de perda	Faixa Temp. (°C)	Massa (%)	Eventos	T _{pico} (°C)	ΔH (J g ⁻¹)
JM-01	Primeira	143,15-278,33	88,41	1	200,26	222,5
JMPR-01	Primeira	174,35 - 319,92	96,74	1	202,08	295,7
ICMD-01	Primeira	32,55 - 137,48	7,174	1	123,16	126,1
	Segunda	235-79 – 428,63	54,84	2	238,89	125,8

Fonte: dados da pesquisa (2019).

5.2 Elucidação estrutural

A elucidação estrutural dos compostos JMPR-01 e ICMD-01 foi realizada por meio dos métodos espectroscópicos: infravermelho (IV) e ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono (RMN ¹H e ¹³C), além de espectrometria de massa (EM). Os valores espectrais obtidos foram comparados com os dados encontrados na literatura de acordo com Pavia, Lampman e Kriz (2010).

Na análise do espectro de IV do composto JMPR-01, foi possível visualizar respectivamente bandas de absorção entre 3317 cm⁻¹ e 1596 cm⁻¹ sugestivas de estiramento axial e dobramento de ligação -NH- referente à amida secundária. Já o espectro de IV do ICMD-01 apresentou uma única banda 3275 cm⁻¹ característico de estiramento N-H de amina e amida secundária.

Supostamente houve uma sobreposição de bandas em razão de absorções em frequências aproximadas.

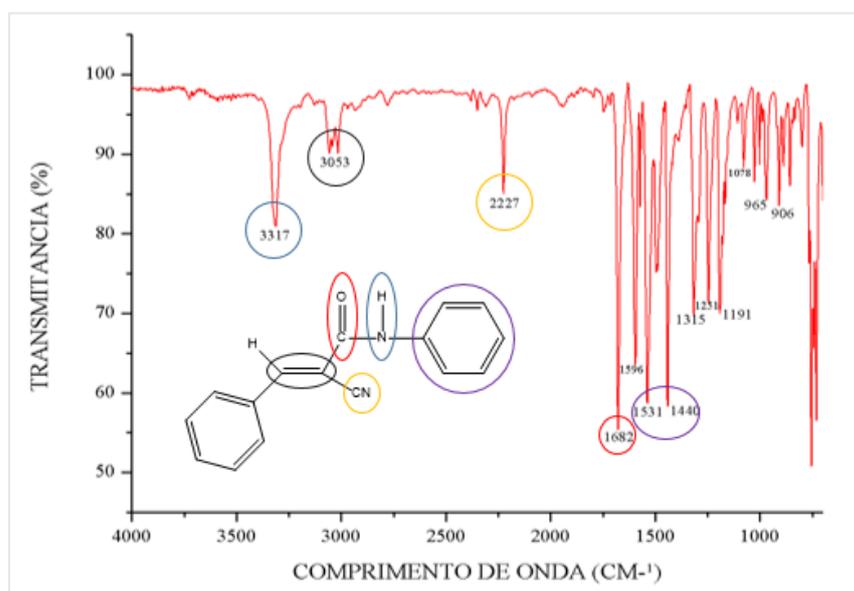
Para a função carbonila os derivados sintetizados apresentaram valores de absorção dentro de um intervalo de 1640 a 1682 cm^{-1} . De acordo com Pavia, Lampman e Kriz (2010) as amidas primárias e secundárias em fase sólida tem absorções C=O largas entre 1890 a 1620 cm^{-1} . Também foram observados os valores da banda de absorção do grupamento nitrila (CN) no intervalo de 2208 a 2260 cm^{-1} , faixa típica de absorção para esse grupamento (Tabela 4; Figura 14 e 15).

Tabela 4. Dados do IV dos compostos JMPR-01 e ICMD-01

Composto	IV (valores em cm^{-1})
JMPR-01	3317 (estiramento N-H da amida secundária); 3053 (estiramento =C-H); 2227 (estiramento CN); 1682 (estiramento C=O); 1596 (dobramento N-H da amida), 1531 e 1440 (estiramento C=C e aromático);
ICMD-01	3275 (estiramento N-H da amida e amina secundária); 3060 (estiramento =C-H); 2206 (estiramento CN); 1651 (estiramento C=O); 1600 (dobramento N-H da amida), 1575 e 1435 (estiramento C=C e aromático); 1497 (dobramento N-H da amina);

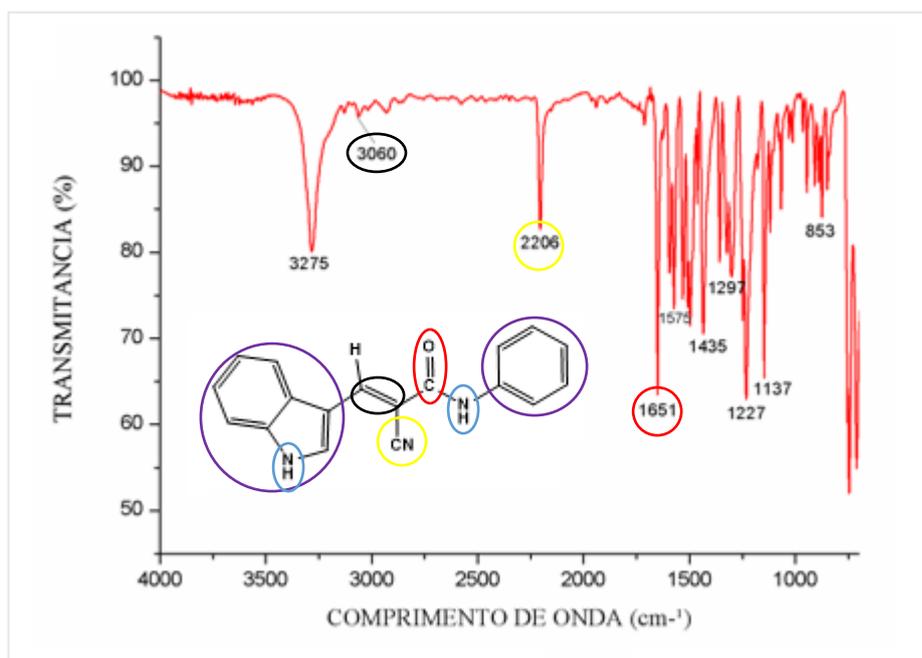
Fonte: dados da pesquisa (2019).

Figura 14. Espectro de IV do JMPR-01



Fonte: dados da pesquisa (2019).

Figura 15. Espectro de IV do ICMD-01



Fonte: dados da pesquisa (2019).

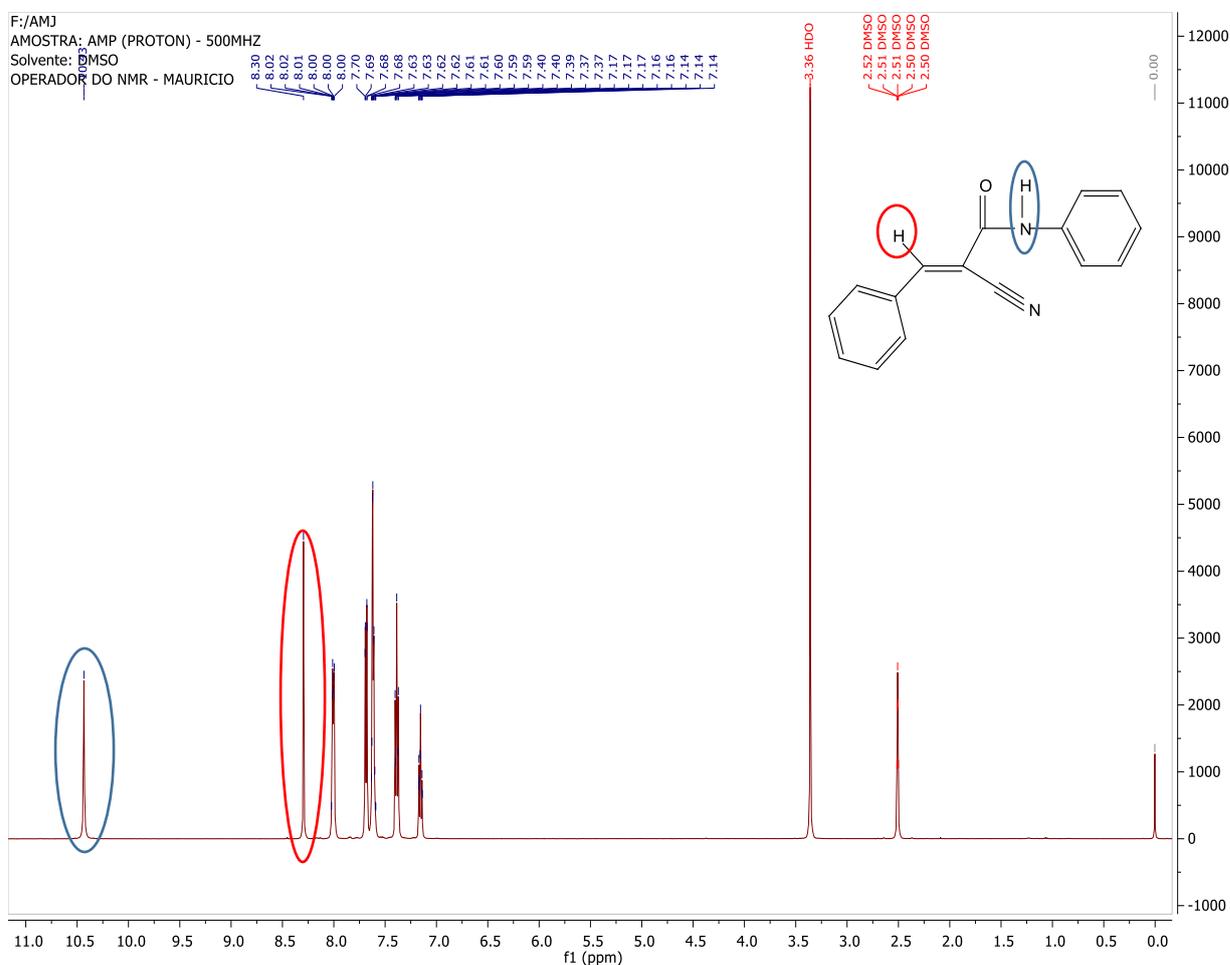
Após a identificação por IV, foram realizadas as análises de RMN de ^1H e ^{13}C (Tabela 5, Figura 16 e 17). Os espectros de RMN ^1H evidenciam singletos referentes ao grupo NH da amida, com deslocamento químico de 10,43 ppm para o JMPR-01 e 10,17 para o ICMD-01. Esses sinais encontram-se fora da faixa característica de 5,0 a 9,0 ppm em razão do efeito de anisotropia, que torna o H mais desblindado. Para o ICMD-01 também é possível identificar o pico de NH indólico em 12,54 ppm.

As duas moléculas apresentaram o singlete em 8,30 e 8,62 ppm, indicativo de condensação entre o aldeído e o grupo metilênico, culminando com a formação do grupo vinílico ($\text{C}=\text{CH}$), sendo considerados sinais diagnósticos da síntese. Os sinais dos hidrogênios aromáticos para o JMPR-01 apresentaram sinais de deslocamentos químicos em forma de tripleto e multiplete dentro de uma faixa variante de 7,12 a 8,05. Para o ICMD-01 pode-se distinguir os sinais característicos dos hidrogênios do anel indólico, que se encontram entre 7,29 a 8,04 e do anel fenilacetamida, encontrados entre 7,70 – 7,13 ppm. Todos os sinais dos aromáticos foram identificados sob forma de dubletos, tripletos e multipletos.

Tabela 5. Dados dos espectros de RMN ^1H dos compostos JMPR-01 e ICMD-01

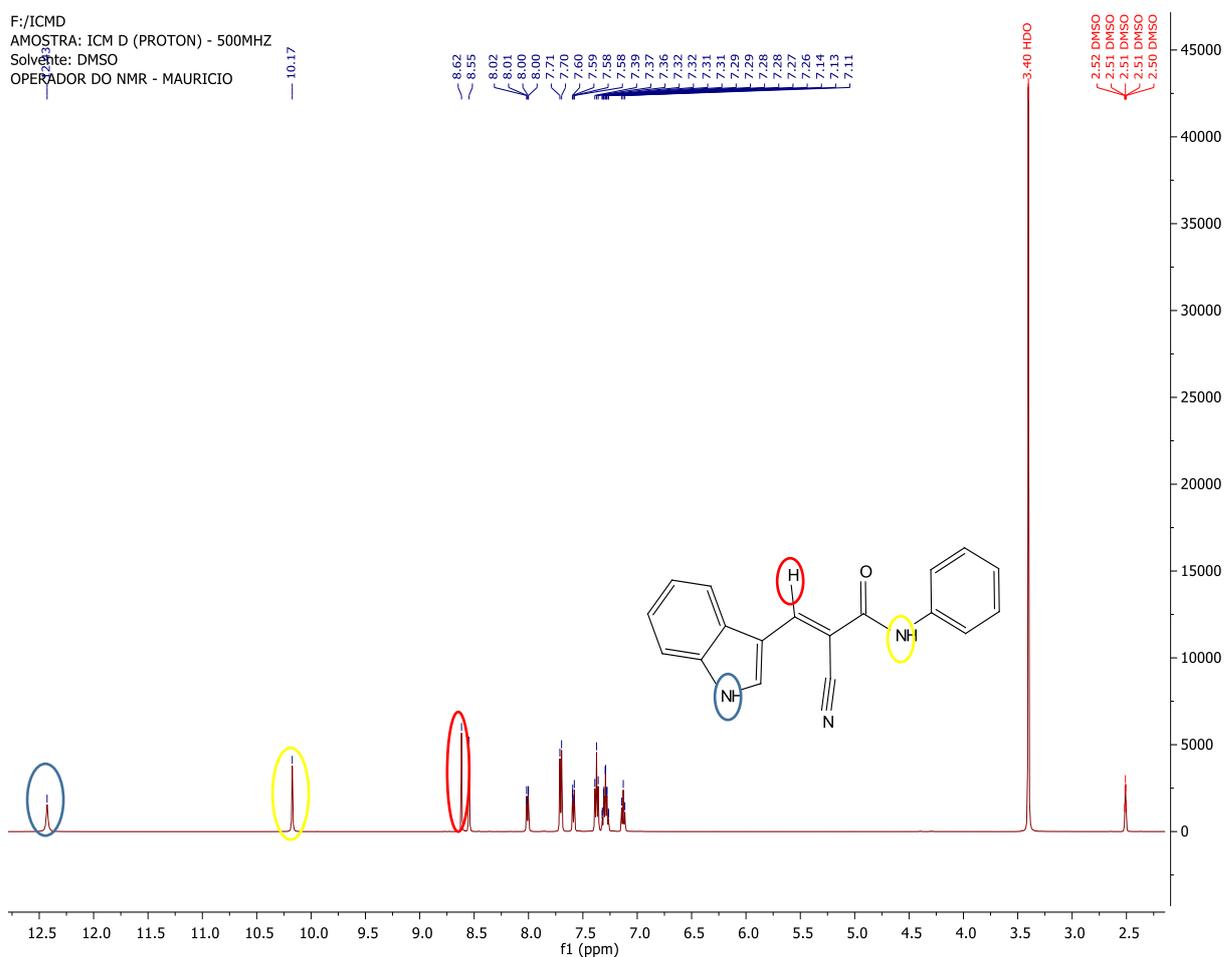
Composto	Deslocamento (δ em ppm DMSO d_6 , 500MHz; J em Hz)
JMPR-01	δ 10,43 (1H, s, NH amida); 8,30 (1H, s, C=CH); 8,05 – 7,96 (2H, m, Ar fenilacetamida), 7,72 – 7,66 (2H, m, Ar fenilacetamida), 7,67 – 7,57 (3H, m, Ar fenilacetamida), 7,39 (2H, t, $J=7.9$ Hz, Ar fenilacetamida), 7,19 – 7,12 (1H, m, Ar fenilacetamida).
ICMD-01	δ 12,43 (1H, s, NH indol); 10,17 (1H, s, NH amida); 8,62 (1H, s, C=CH); 8,55 (1H, s, C=CH indol); 8,04-7,98 (1H, m, Ar indol); 7,70 (2H, d, $J=7,9$, Ar fenilacetamida); 7,59 (1H, m, Ar indol); 7,37 (2H, m, Ar fenilacetamida); 7,29 (2H, m, Ar indol); 7,13 (1H, m, Ar fenilacetamida).

Fonte: dados da pesquisa (2019).

Figura 16. Espectro de RMN ^1H do JMPR-01

Fonte: autoria (2019).

Figura 17. Espectro de RMN ^1H do ICMD-01



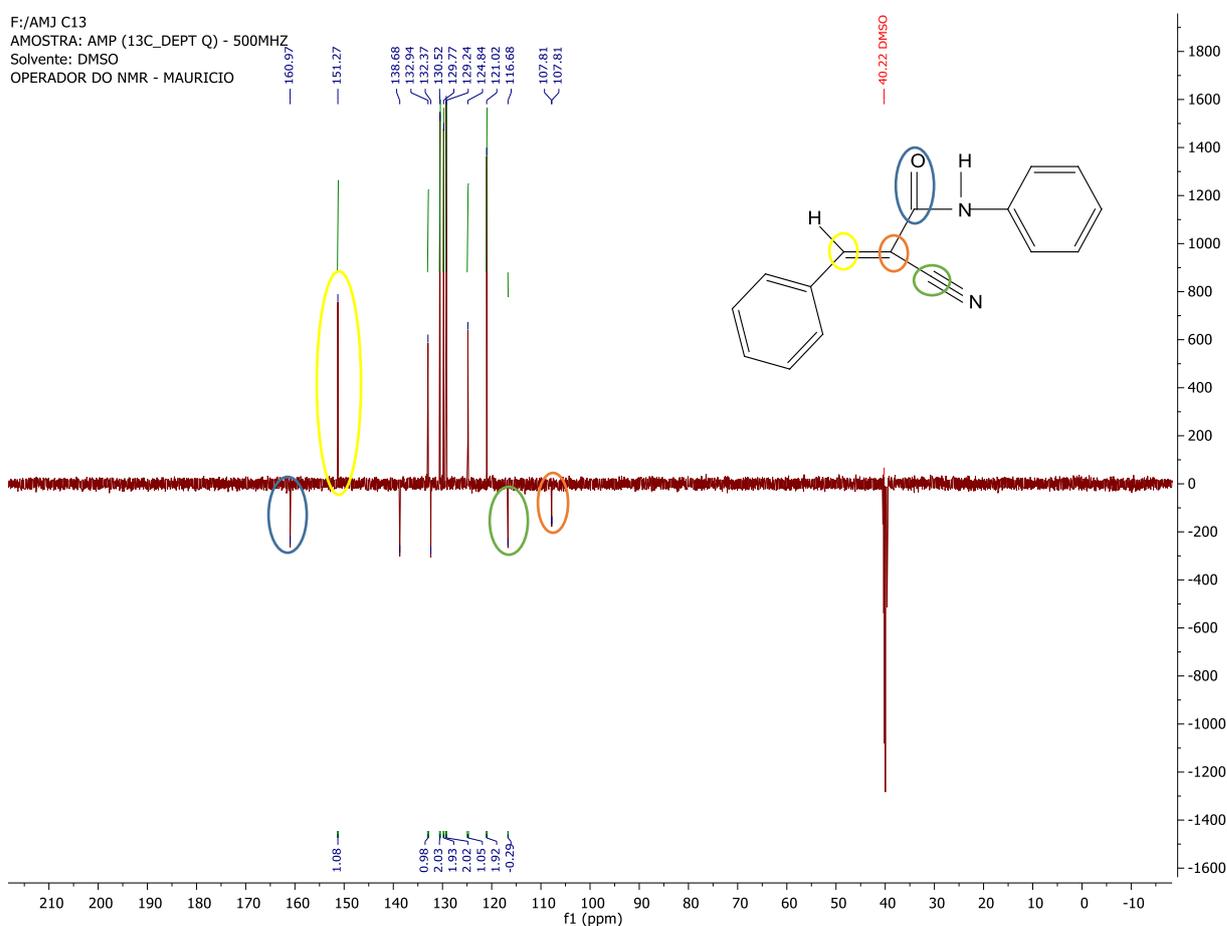
Fonte: autoria (2019).

Os resultados de RMN de ^{13}C para os compostos JMPR-01 e ICMD-01, apresentam respectivamente, sinais característicos de deslocamento e absorções de carbono vinílico em 151,27 e 142, 2 ppm, carbonila: 160,97 e 161,7 ppm, nitrila: 116,68 e 119,1 ppm, carbonos adjacentes em 107,81 e 110,2 ppm e C-N- aromático em 138,68 e 140,4. Os demais carbonos do JMPR-01, correspondem ao anel aromático, com faixas compreendidas de 121 e 132 ppm. O ICMD-01 apresenta dois anéis aromáticos, um indólico, cujos carbonos encontram-se numa faixa de 121 a 137 ppm, e o anel fenilacetamida, com carbonos na faixa de 121,1 e 131 ppm. Todos os picos identificados estão dentro dos seus respectivos intervalos encontrados na literatura citadas (Tabela 6; Figura 18 e 19).

Tabela 6. Dados dos espectros de RMN de ^{13}C dos compostos JMPR-01 e ICMD-01

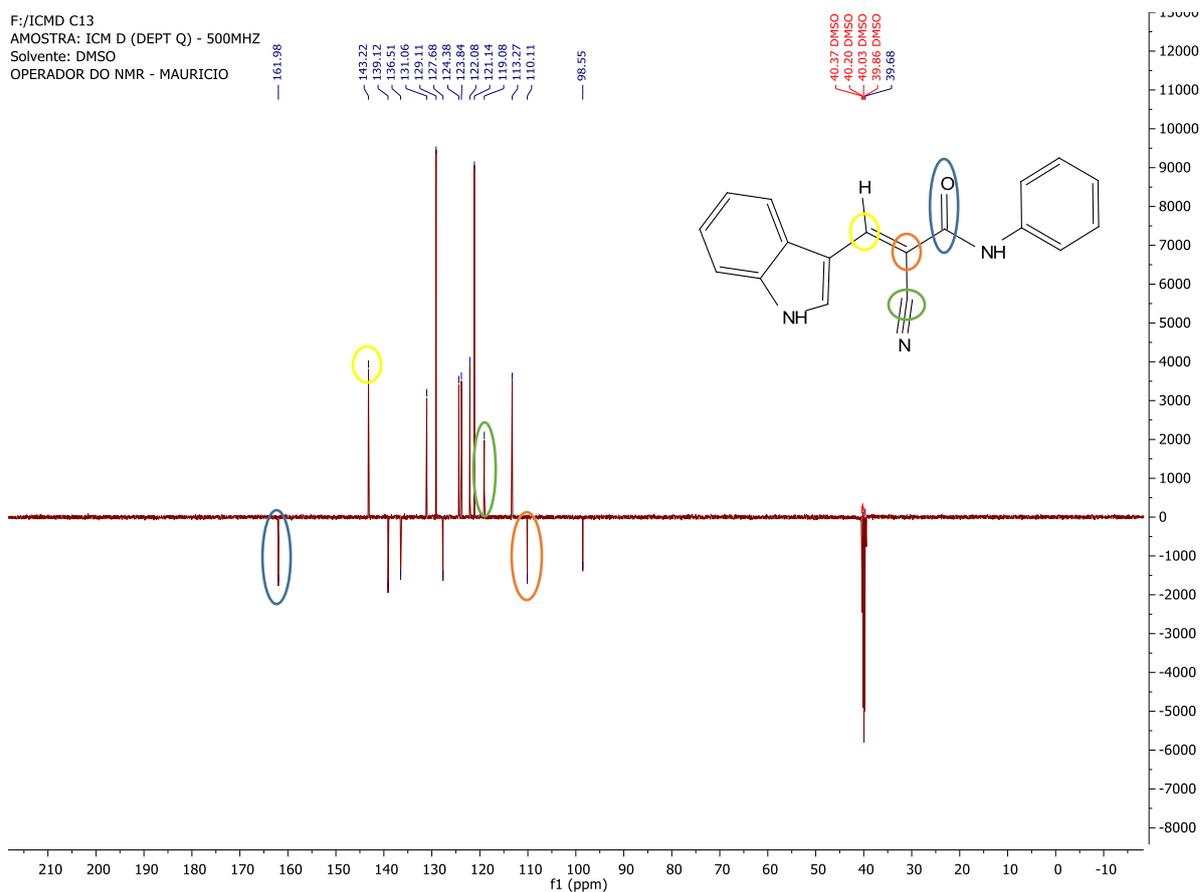
Composto	Deslocamento (δ em ppm $\text{DMSO}d_6$ 125 MHz; J em Hz)
JMPR-01	δ 160,97 (C, C=O), 151,27 (C, C=C), 138,68 (C, N- Ar), 132,94, (C, Ar), 132,37 (C, Ar), 130,52 (C, Ar), 129,77 (C, Ar) 129,24 (C, Ar), 124,84 (C, Ar), 121,02 (C, Ar), 116,68 (C, CN), 107,81 (C, adjacente a CN).
ICMD-01	δ 161,98 (C, C=O); 143,2 (C, C=C); 140,4(C, N- Ar); 137,0(C, Anel indólico); 131,1(C, Ar); 129,1(C, Anel indólico); 128,1(C, Ar); 124,4(C, Anel indólico); 123,8(C, Anel indólico); 122,1(C, Ar); 121,1(C, Anel indólico); 119,1(C, CN); 113,2(C, Anel indólico); 110,3(C, adjacente a CN).

Fonte: dados da pesquisa (2019).

Figura 18. Espectro de RMN ^{13}C do JMPR-01

Fonte: autoria (2019).

Figura 19. Espectro de RMN ^{13}C do ICMD-01



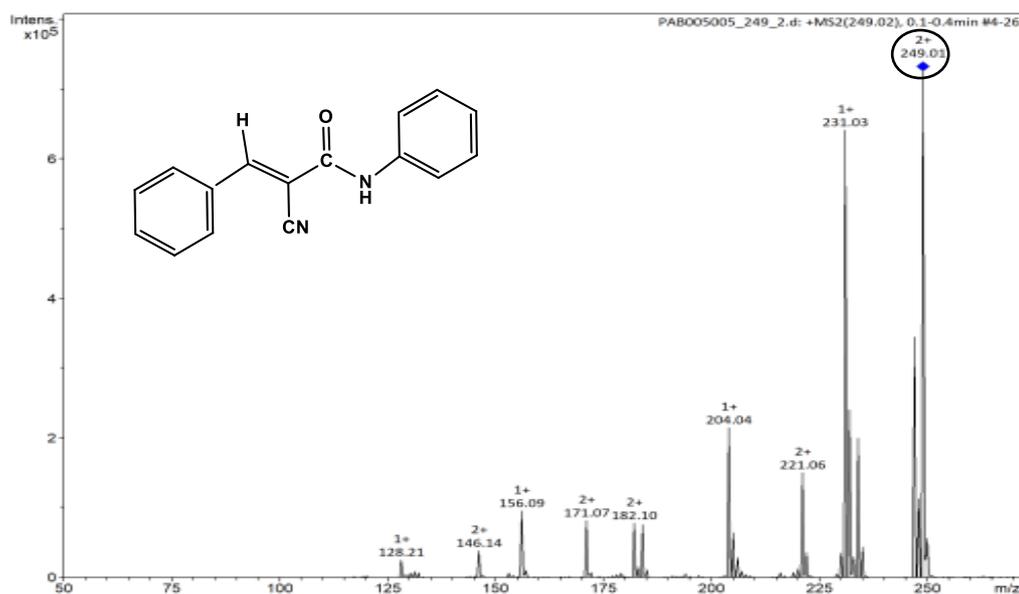
Fonte: autoria (2019).

Com relação aos espectros de massas realizados todos mostram-se condizentes as respectivas massas dos compostos ICMD-01 e JMPR-01 (Figura 20 e 21) corroborando com as demais análises espectroscópicas de elucidação estrutural. Na tabela 7 encontra-se os dados das massas dos íons moleculares (m/z), a massa calculada e as massas reais.

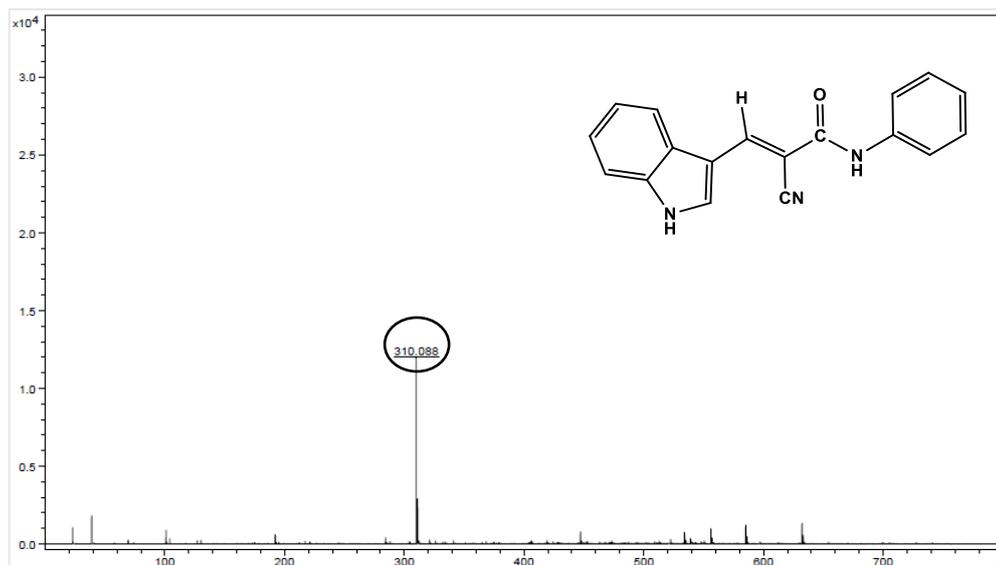
Tabela 7. Dados das respectivas massas dos íons moleculares dos compostos JMPR-01 e ICMD-01.

Composto	Massa exata (m/z)	$[\text{M}+\text{H}]^+$ ⁽¹⁾ / $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ⁽²⁾	Massa obtida
JMPR-01	248,09	249,09	249,02
ICMD-01	287,11	310,11	310,08

⁽²⁾. Análise feita na presença de Na. Fonte: dados da pesquisa (2019).

Figura 20. Espectro de massa do JMPR-01

Fonte: autoria (2019).

Figura 21. Espectro de massa do ICMD-01

Fonte: autoria (2019).

Todas as análises espectroscópicas e espectrométricas mostram-se concordantes às estruturas pré estabelecidas para os compostos sintetizados JMPR-01 e ICMD-01. A partir disso, foram iniciados os testes farmacológicos de avaliação do seu potencial anti-inflamatório *in vitro* e *in vitro*.

5.3 Avaliação Farmacológica

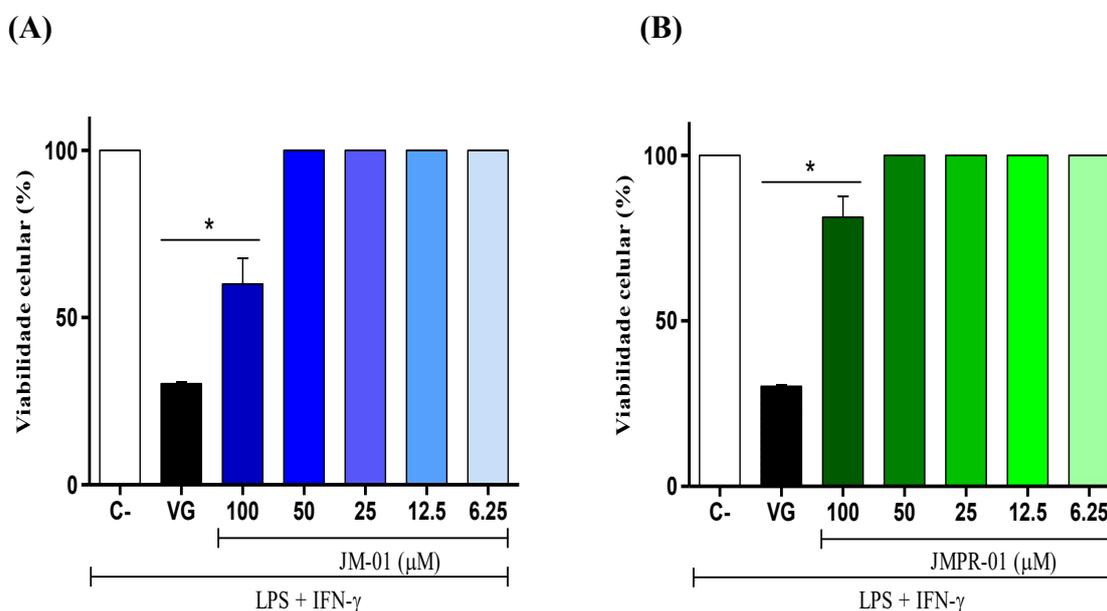
5.3.1 Ensaios farmacológicos *in vitro*

5.3.1.1 Citotoxicidade em macrófagos J774, dosagens de óxido nítrico e citocinas.

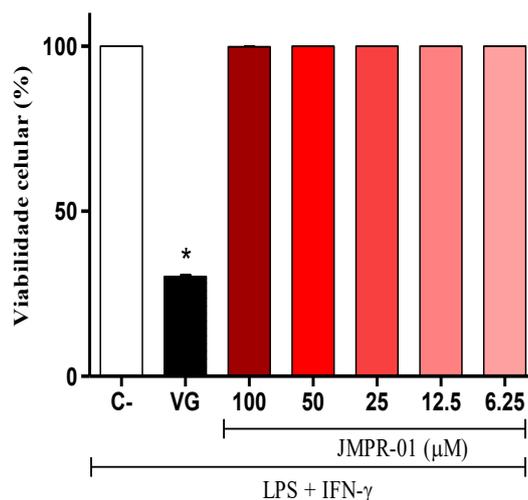
A avaliação farmacológica dos compostos fenilacetamida (JM-01) e fenilacrilamida (JM-PR-01 e ICMD-01) foram investigados por uma série de ensaios *in vitro*. Os efeitos desses compostos na viabilidade celular foram determinados pelo ensaio Alamar Blue colorimétrico 24 horas após a adição dos derivados. O alamar blue possui como ingrediente ativo a resazurina que age como um corante indicador de comprometimento do metabolismo celular evidenciado pela mudança de coloração quando reduzido por enzimas mitocondriais (RAMBERSAD, 2012).

Como pode ser observado na figura (22C), o ICMD-01 não apresentou indícios de citotoxicidade nas células J774 em nenhuma das concentrações testadas. Porém o JM-01 (22A) e o JM-PR-01 (22B) na concentração de 100 μM induziu efeitos citotóxicos. Sendo assim foram empregadas as concentrações de até 50 μM para o JM-01 e JM-PR-01 e 100 μM para o ICMD-01 nos ensaios subsequentes de dosagens de óxido nítrico e citocinas.

Figura 22. Efeito citotóxico do composto JM-01 (A) JM-PR-01 (B) e ICMD-01 (C) frente a linhagem de macrófagos murinos J774.



(C)

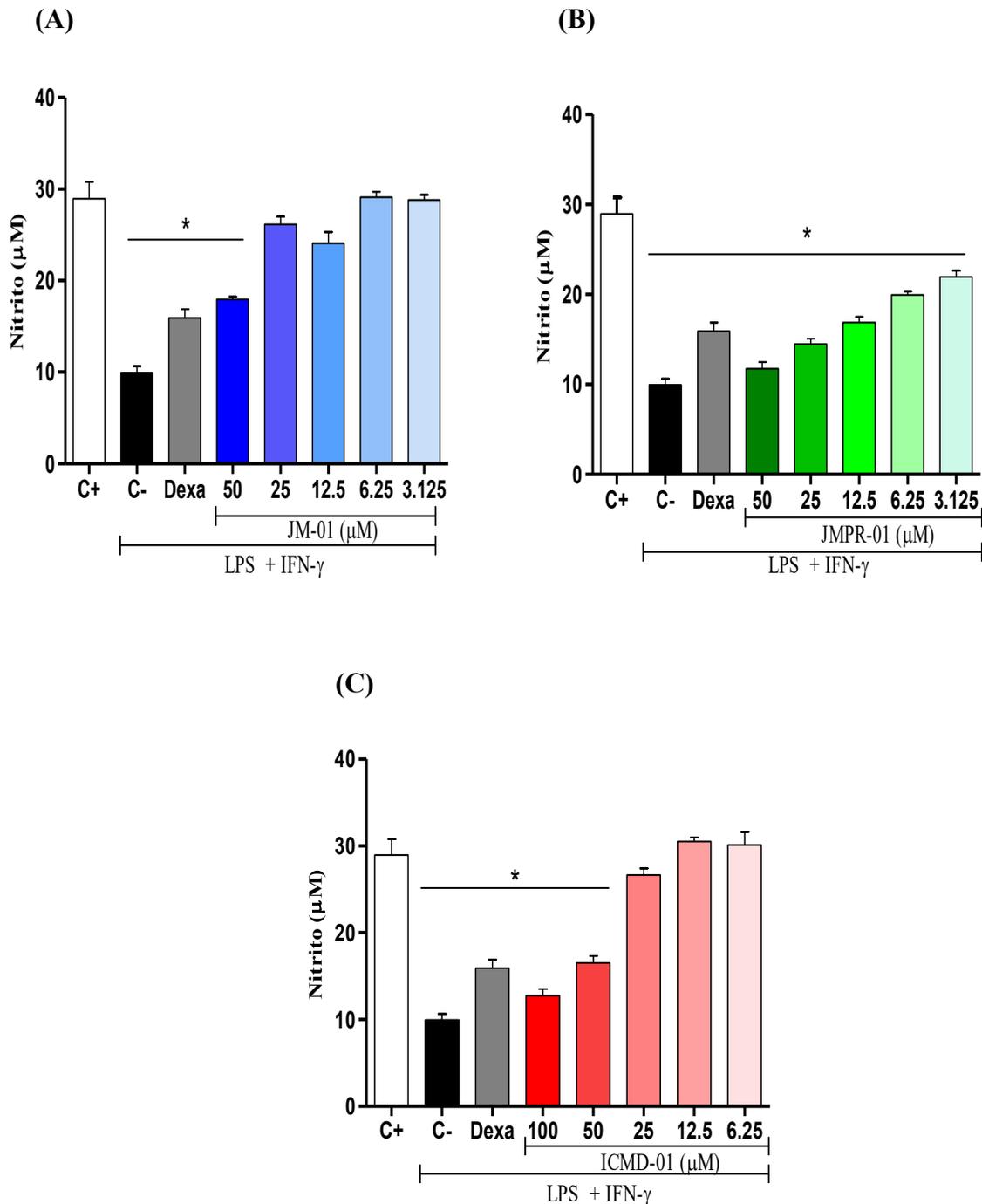


Os dados são expressos como média \pm SEM; n = 4 determinações por grupo. * Significativamente diferente das culturas tratadas com veículo ($p < 0,05$). ANOVA seguida do teste de comparação múltipla de Tukey.

A viabilidade celular é um dos indicadores mais importantes na avaliação toxicológica *in vitro*, sendo capazes de indicar o potencial citotóxico da substância em teste. A determinação da concentração não causadora da morte celular, permitiu mensurar de maneira fidedigna os efeitos modulatórios do JM-01, JMPR-01 e ICMD-01 sobre os macrófagos. Os macrófagos ao serem expostos ao LPS e a IFN- γ tem seu equilíbrio intracelular modificado. Isso acontece em razão da ativação de receptores padrões de superfícies da família Toll (TLR) que desencadeia vários processos de sinalização celular deflagrados por proteínas adaptadoras citosólica como fator de diferenciação mielóide 88 (MyD88) e ou IFN- γ [Trif] indutor de domínio Toll/IL-1R, ocasionando instantaneamente a deflagração de respostas inflamatórias agudas em macrófagos (WANG et al., 2019).

O NO, mediador amplamente expresso pelos macrófagos estimulados, pode ser mensurado a partir da quantificação de nitrito. Como mostrado na figura 23A, 23B e 23C o JM-01, JMPR-01 e ICMD-01 apresentaram respectivamente reduções significativas ($p < 0,05$) da produção de nitrito nas concentrações de 50 μ M, 50 – 3,125 μ M e 100 e 50 μ M. Como padrão foi utilizado a dexametasona (40 μ M).

Figura 23. Modulação da produção de óxido nítrico pelo JM-01 (A), JMPR-01 (B) e ICMD-01 (C) em culturas macrófagos J774.



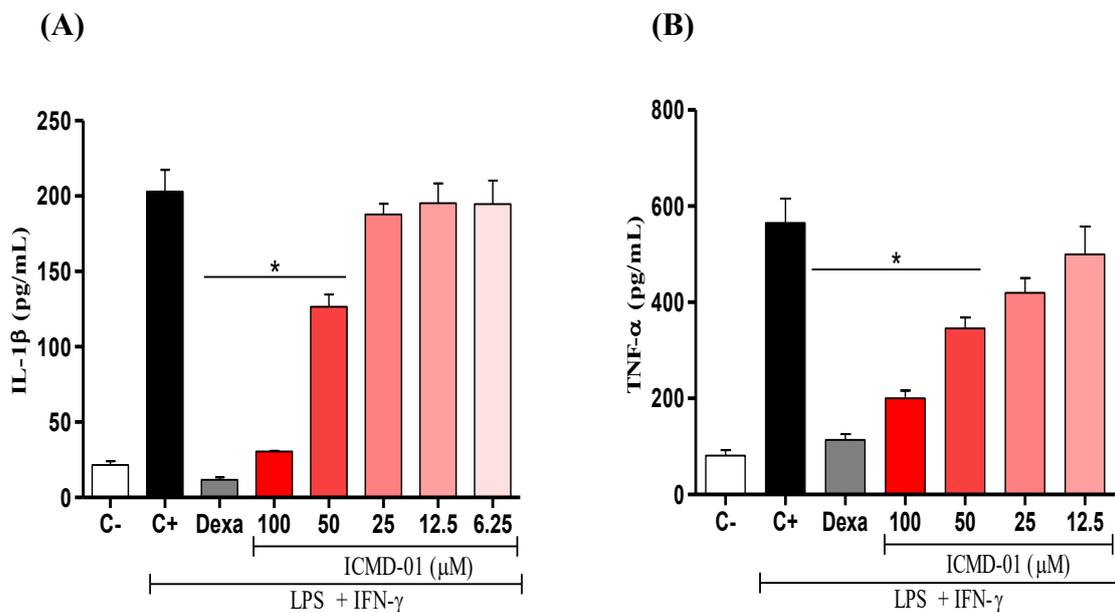
Os dados são expressos como média \pm SEM; $n = 6$ determinações por grupo. * Significativamente diferente das culturas tratadas com veículo estimuladas com LPS + IFN- γ ($p < 0,05$). ANOVA seguida do teste de comparação múltipla de Tukey.

O NO é uma molécula gasosa, sintetizado pela NOs, que utiliza como substrato a L-arginina, NADPH e oxigênio. Embora exista três isoformas distintas da enzima responsável

pela síntese do NO (endotelial, neuronal e induzível), apenas a iNOs é ativado por produtos microbianos em células inflamatórias, a exemplo dos macrófagos. Essa biomolécula tem funções diversas nas respostas fisiológicas e patológicas no organismo. Sua modulação pelo JM-01, JMPR-01 e ICMD-01 em condições inflamatórias poderá restringir respostas imunológicas envolvidas na defesa do hospedeiro, diminuindo os danos celulares induzidos pela produção de espécies reativas de oxigênio. (KAWAKAMI; KOIKE; AMANO, 2018; KORHONEN et al., 2005).

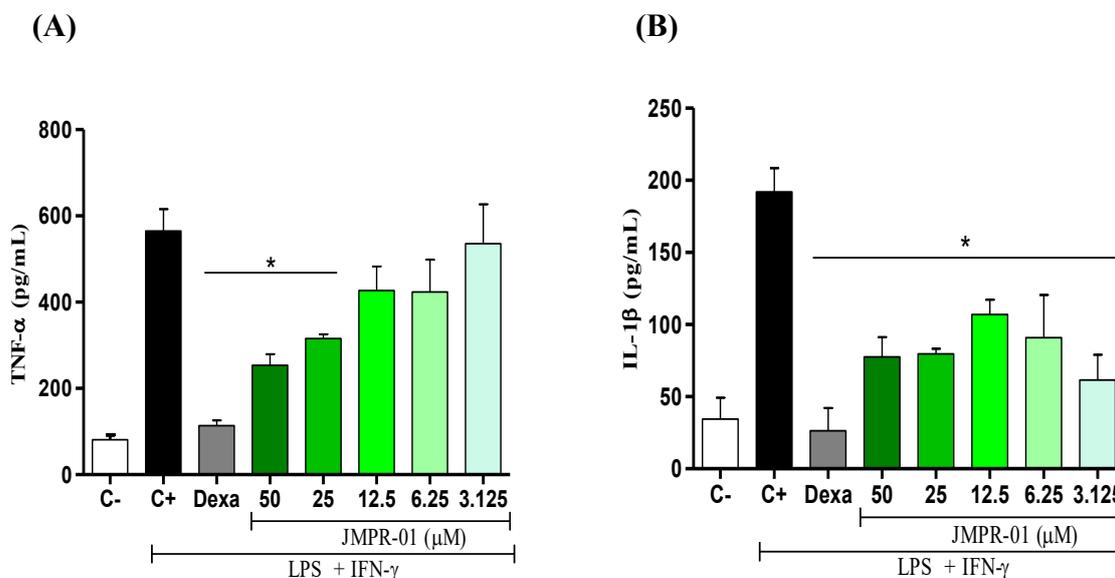
Com relação as citocinas pró-inflamatórias também expressas pela ativação dos macrófagos, o tratamento com o JMPR-01 e ICMD-01, respectivamente nas concentrações 50-3,125 μM e 100 e 50 μM , foi capaz de suprimir substancialmente ($p < 0,05$) a liberação de TNF- α e IL-1 β (Figura 24 e 25), essas duas moléculas foram escolhidas em razão dos melhores efeitos modulatórios frente a inibição de nitrito. A diminuição da liberação dessas citocinas pelos compostos em teste, pode limitar o processo inflamatório em razão da diminuição da ativação da via NF- κB , que atua como um fator transcricional desempenhando uma função primordial na indução de genes inflamatórios de moléculas pró-inflamatórias (GAO et al., 2012; JAWORSKA; JANOWSKI, 2019).

Figura 24. Modulação da expressão de IL-1 β (A) e TNF α (B) pelo composto ICMD-01 em cultura de macrófagos.



Os dados são expressos como média \pm SEM; $n = 6$ determinações por grupo. * Significativamente diferente das culturas tratadas com veículo estimuladas com LPS + IFN- γ ($p < 0,05$). ANOVA seguida do teste de comparação múltipla de Tukey.

Figura 25. Modulação da expressão de IL-1 β (A) TNF α (B) pelo composto JMPR-01 em cultura de macrófagos.



Os dados são expressos como média \pm SEM; n = 6 determinações por grupo. * Significativamente diferente das culturas tratadas com veículo estimuladas com LPS + IFN- γ (p < 0,05). ANOVA seguida do teste de comparação múltipla de Tukey

De acordo com Gu et al. (2019) o derivado de uma chalcona sintética (6a) da classe fenilacrilamida inibiu de forma dependente da dose a produção de NO e a atividade de NF- κ B em células mesangiais induzidas por LPS. Este mecanismo envolvia a ativação do fator Nrf2 (nuclear factor erythroid 2 related factor 2) que parece ser um dos principais envolvidos na expressão de proteínas antioxidantes, além de atuar na modulação das respostas inflamatórias e imunes.

Os genes antioxidantes dependentes de Nrf2, como heme-oxigenase-1 (OH-1) NADP desidrogenase quinona (NQO-1) bloqueiam TNF- α , além de diversas proteínas quimiotáticas de monócitos e proteínas inflamatórias de macrófagos, suprimindo diversos mediadores inflamatórios. A ativação de Nrf2 previne a regulação positiva transcricional de LPS de citocinas pró-inflamatórias incluindo a IL-1 β e TNF α (AHMED et al., 2017; KOBAYASHI et al. 2016).

Dessa forma pode-se inferir que esses derivados podem estar ativando a via do Nrf2, inibindo de forma indireta a produção de nitrito e de citocinas (IL-1 β e TNF α) nas culturas de macrófagos em concentrações não citotóxicas. Baseando-se na potencialidade anti-inflamatória *in vitro* dos compostos JM-01, JMPR-01 e ICMD-01 buscou-se dar continuidade ao estudo através dos ensaios *in vivo*, com objetivo de avaliar a interferência dos sistemas biológicos e as possíveis alterações na atividade farmacológica.

5.3.2 Ensaios farmacológicos *in vivo*

5.3.2.1 Peritonite induzida por Zymosan

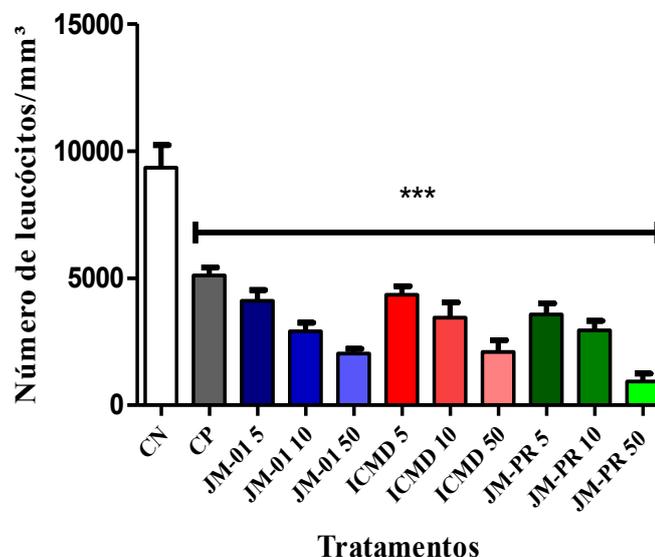
O ponto de partida dos ensaios *in vivo* se deu através do ensaio de peritonite induzida por zymosan, que tem como objetivo quantificar o recrutamento de leucócitos para cavidade peritoneal avaliando o efeito dessas novas drogas durante a resposta celular. Para este ensaio, foi utilizado o zymosan como agente flogístico que constitui um complexo proteína-carboidrato extraído da parede celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

Este agente é composto principalmente de β -glucanos além de uma mistura não uniforme de mananas, quitina, lipídios e várias proteínas. A base bioquímica para o desencadeamento da resposta inflamatória pelo zymosan é multifatorial devido a mistura complexa de componentes da parede celular dos fungos. Entretanto, sabe-se que o β -glucano ativa o receptor da dectina-1 e o receptor do tipo Toll-2 (TLR2) primordialmente, iniciando respostas fisiopatológicas por DAMPs liberados secundariamente à lesão tecidual (CASH; WHITEM GREAVES, 2009; LIMA et al., 2017; RODRIGUÉZ et al., 2016).

O plasma extravasado possui fatores quimiotáticos de primeira linha que irão mediar o influxo subsequente de leucócitos, acarretando seu acúmulo no tecido inflamado. De fato, o *zymosan* induziu o influxo celular no peritônio dos camundongos em teste, cuja concentração foi significativa após 4h da indução intraperitoneal.

Como pode ser observado (Figura 26) os compostos em todas as doses testadas apresentaram atividade anti-inflamatória, inibindo de maneira substancial a migração leucocitária, respectivamente nas doses de 5, 10 e 50 $mg\ kg^{-1}$ com percentual de 56,1; 68,9 e 78,3 % para o JM-01; 61,8; 68,5 e 90% para o JMPR-01, e 53,5, 63,2 e 77,6 % para o ICMD-01. Todos os compostos apresentaram atividade superior ao grupo tratado com indometacina na dose de 10 $mg\ kg^{-1}$, no qual apresentou inibição de 45,3%.

Figura 26. Influência do tratamento com os compostos JM-01, ICMD-01 e JM-PR sob a contagem total de leucócitos, para o modelo da peritonite induzida por zymosan (2%).



Valores são expressos em média \pm desvio padrão da média, $n = 5$. *** $p < 0,05$ significativamente diferente do grupo controle (ANOVA seguido pelo teste de Dunnett).

A migração leucocitária é um processo dinâmico, rigorosamente regulados por quimioquinas, citocinas e moléculas de adesão da família selectina. Esses componentes promovem o processo de rolamento celular dos PMN, em especial os neutrófilos ao sítio da injúria. Os compostos JM-01, JM-PR-01 e ICMD-01, podem atuar minimizando a diapedese por diversos mecanismos diretos ou indiretos, que atuem no sistema de adesão ou na expressão de ICAM-1 (molécula de adesão intercelular) L-selectina (Leukocyte endothelial cell adhesion molecule, LECAM; CD62L), E-selectina (Endothelial leukocyte adhesion molecule-1, ELAM-1; CD62E) e P-selectina (CD62P).

Os leucócitos ao se ligar nas selectinas, retarda o movimento de fluxo livre ao longo do endotélio. A efetividade da adesão se dar quando as células se ligam a CXCL-1, CXCL-2 ou CXCL-8. As moléculas de adesão são amplamente induzidas pelas citocinas e óxido nítrico produzidas por macrófagos e células residentes, logo, confrontando a potencialidade dos compostos *in vitro* frente a inibição de NO, sugere que os compostos podem apresentar atividade anti-inflamatória relacionada à capacidade de suprimir a ação e/ou liberação de NO e citocinas, em especial TNF- α e IL-1 β .

Estudo de Yang et al. (2016) observou a inibição de ICAM-1 induzida por TNF- α em células epiteliais de pigmento de retina humano tratadas com licopeno. Já o de Lee et al. (2007)

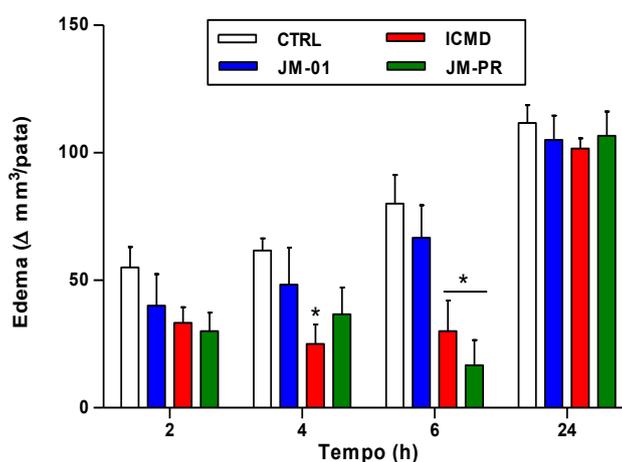
determinou a atividade anti-inflamatória de uma chacona sintética verificando a inibição de ICAM-1 e TNF- α e IL-1 β em tecido colônico de camundongos tratados com trinitrobenzeno sulfônico. Esses estudos mostram que a ativação positiva de Nrf2 modula citocinas pró inflamatórias e inibe a expressão de moléculas de adesão desempenhando papel de grande importância na regulação da diapedese no tecido inflamado.

Segundo Takashi et al. (2019), o zymosan tem como constituinte a fitoesfingosina que ao ativar o receptor CD300b estimula a produção de NO por células inflamatórias provocando o recrutamento de neutrófilos. Há evidencia que o NO derivado da iNOs regula a produção de quimiocinas CXC, MIP-2 e KC durante o processo inflamatório, além de modular citocinas inflamatórias a exemplo do TNF- α , favorecendo a migração de PMN. Segundo Vieira et al. (2018) e Hamada et al. (2018), o NO é de grande importância na interação leucócito-endotélio e a supressão enzimática é capaz de acarretar com ações anti-adesivas, além de regulador da transmigração de neutrófilo através da fibronectina dependente de MMP-9. Esses achados científicos podem justificar a possibilidade de mecanismo de ação dos compostos em testes.

5.3.2.2 *Edema de pata induzida por CFA*

A atividade anti-inflamatória dos compostos também foi avaliado pelo modelo de inflamação da pata induzida pelo Adjuvante Completo de Freund (CFA). Os compostos foram testados inicialmente em uma dose de 50 mg kg⁻¹ e administrados por via oral, 40 minutos antes do CFA. Como pode-se visualizar graficamente (Figura 27) o pré tratamento com o ICMD-01 apresentou diminuição edematogênica significativa ($p < 0,05$) nos tempos de 4 a 6h, não mantendo a atividade por 24h. O JMPR-01 apresentou uma atividade tardia no tempo de 6h, porém não se manteve ativo nos demais tempos. O JM-01 não mostrou atividade satisfatória neste ensaio.

Figura 27. Influência do tratamento com os compostos JM-01, ICMD-01 e JM-PR (50 mg kg^{-1}) sob o edema de pata induzido por CFA.



Os dados são expressos como média \pm SEM; $n = 6$ animais por grupo. * Significativamente diferente do grupo controle ($p < 0,05$). ANOVA de duas vias seguida do teste de Bonferroni.

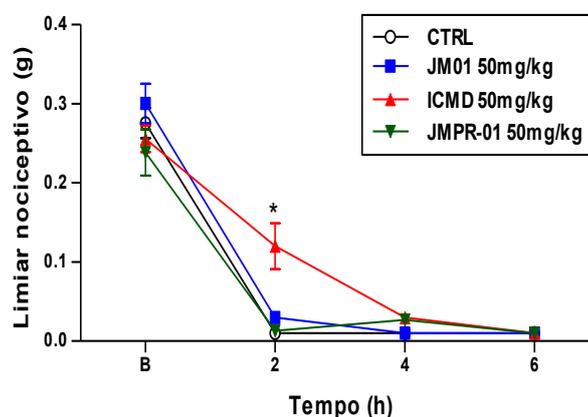
O CFA quando administrado por injeção intraplantar nos animais induz a uma resposta inflamatória persistente, local estável, provocando dor severa em torno da área inoculada. Este complexo é constituído de uma suspensão de *Mycobacterium tuberculosis* acrescidos de óleo mineral, que garante uma ação de depósito, formação de granulomas ricos em macrófagos e células imunocompetentes, além de uma ação a distância sobre órgãos linfoides (SANTOS et al., 2013; FEHRENBACHER; VASKO; DUARTE, 2012).

Esse agente flogístico é comumente empregado em modelos crônicos de artrite reumatoide, devido a potencialização da resposta inflamatória produzida. Este mecanismo envolve a fenestração de microvasos e o extravasamento de elementos para o tecido intersticial, favorecendo a migração de células do sistema imunológico, como os macrófagos e linfócitos (KUMAR et al., 2016). A resposta celular provocada induz a liberação exacerbada de uma série de mediadores inflamatórios, como citocinas, aminas vasoativas, fatores quimiotáticos, interferons e prostaglandinas. Esses mediadores em quadros agudos são responsáveis pela destruição da matriz óssea e cartilagens, além de sensibilizar as terminações nociceptivas (KUMAR et al. 2019).

Estes resultados sugerem que a atividade dos compostos JM-01 e ICMD-01 frente a inibição edematogênica, pode estar envolvido com a inibição de mediadores como as prostaglandinas, bradicinina, serotonina, citocinas pró-inflamatórias, espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico, principais responsáveis com a alteração da permeabilidade vascular e favorecimento do edema. *In vitro*, sabe-se que os compostos em estudos modulam TNF- α , IL-1 β e NO.

Juntamente com o ensaio de edema de pata, foi verificado os efeitos dos compostos na hiperalgesia inflamatória pelo ensaio de *von frey* (Figura 28). Após o estímulo com CFA foram utilizados filamentos que fornecem uma força calibrada a pata do animal avaliando-se a sensibilidade mecânica. Esse ensaio é amplamente empregado na medição precisa da mecanossensibilidade em animais na pesquisa da dor (MCMACKIN et al., 2016). Como resultado, observou-se que o ICMD-01 foi o único composto a apresentar um aumento no limiar nociceptivos na 2h após a sua administração. As demais substâncias em teste não mostraram atividade em nenhum dos tempos.

Figura 28. Influência do tratamento com os compostos JM-01, ICMD-01 e JMPR-01 na hiperalgesia inflamatória avaliada pelo *von frey*.

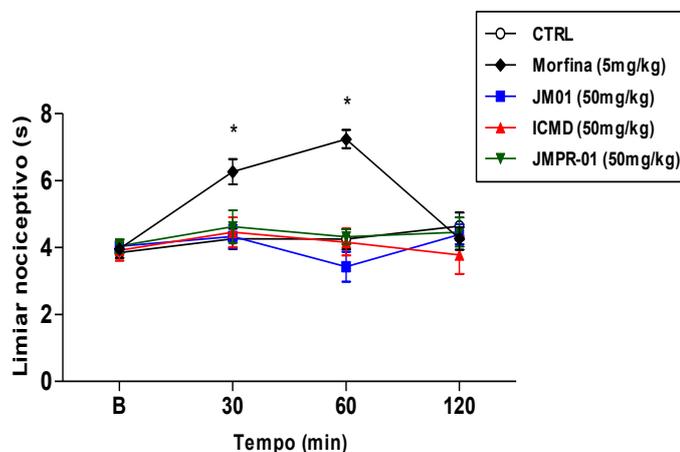


Os dados são expressos como média \pm SEM; n = 6 animais por grupo. * Significativamente diferente do grupo controle ($p < 0,05$). ANOVA de duas vias seguida do teste de Bonferroni.

A dor é considerada um fenômeno multifatorial complexo, envolvendo diversos fatores neurobiológicos. Pode ter base inflamatória, sensorial, afetivo-emocionais e cognitivos. Como os não apresentaram atividade analgésica periférica mostrada pelo *von frey*, investigamos a possibilidade de um mecanismo antinociceptivo central investigado pelo ensaio *tail flick*, que avalia a responsividade de retirada da cauda do animal frente ao estímulo térmico de calor irradiante. O aumento no tempo de reação é um parâmetro importante para atividade analgésica central pela supressão das respostas dos neurônios espinhais, semelhante aos fármacos opióides a exemplo da morfina (BROJENI; RASHVAND; HAGHPARAST, 2019). O JM-01, JMPR-01 e ICMD-01 não apresentaram atividade para este modelo, descartando-se a atividade analgésica central (Figura 29). Também não verificou-se alterações motoras ou sedativas avaliadas pelo

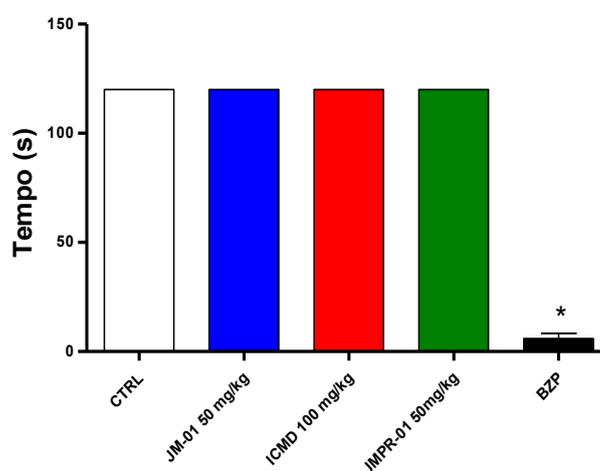
ensaio *rota rod* (Figura 30). Com base nesses resultados, pode-se presumir que essas substâncias não apresentam mecanismos centrais, nas condições testadas e não alteram a adaptabilidade à atividade motora nem provocam outro tipo de efeito como o relaxamento muscular.

Figura 29. Avaliação da atividade analgésica central dos JM-01, JMPR-01 e ICMD-01 pelo ensaio *tail flick*.



Os dados são expressos como média \pm SEM; n = 6 animais por grupo. * Significativamente diferente do grupo controle ($p < 0,05$). ANOVA de duas vias seguida do teste de Bonferroni.

Figura 30. Avaliação da atividade motora de camundongos tratados com JM-01, ICMD-01 e JMPR-01

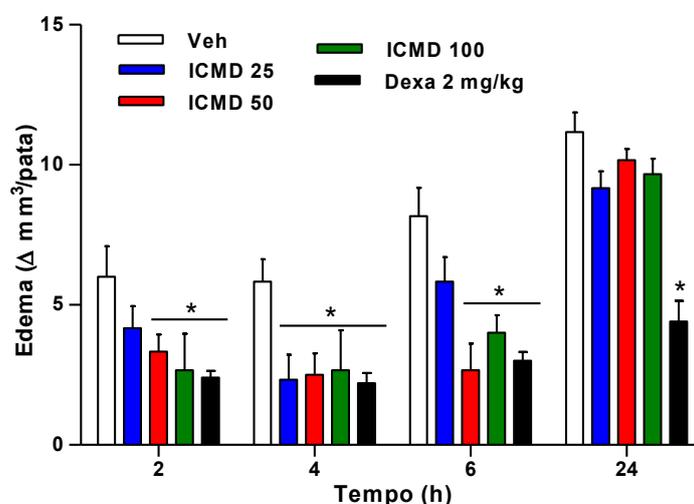


Os dados são expressos como média \pm SEM; n = 6 animais por grupo. * Significativamente diferente do grupo controle ($p < 0,05$). ANOVA de duas vias seguida do teste de Bonferroni.

Em razão do melhor efeito nos resultados do modelo inflamatório *in vivo* de edema da pata e hiperalgesia inflamatória induzida por CFA, o ICMD-01 foi novamente testado nas doses de 25, 50 e 100 $mg\ kg^{-1}$ afim de que se pudesse estabelecer a relação dose-resposta (figura 31). Como controle positivo foi utilizado a dexametasona (2 $mg\ kg^{-1}$).

No edema o grupo tratado com a dose de 25 mg kg^{-1} , apresentou percentual de inibição na 2, 4 e 6h de: 30,55, 60,0 e 28,58 %. O grupo tratado com a dose de 50 mg kg^{-1} inibiu em (44,45; 57,14 e 67,34%) e o grupo tratado com 100 mg kg^{-1} de (55,55; 54,28 e 51,02%) quando comparados ao grupo controle. As duas maiores doses apresentam perfis de atividade semelhante nos três tempos, sem diferença estatística, reduzindo o edema nos tempos de 2 a 6h. Esses resultados permitem estabelecer a dose terapêutica para esse composto em 50 mg kg^{-1} correspondendo ao seu efeito máximo. O grupo tratado com ICMD-01 mostrou resultados comparáveis ao grupo tratado com dexametasona que apresentou inibição média de 61,85% (Figura 31).

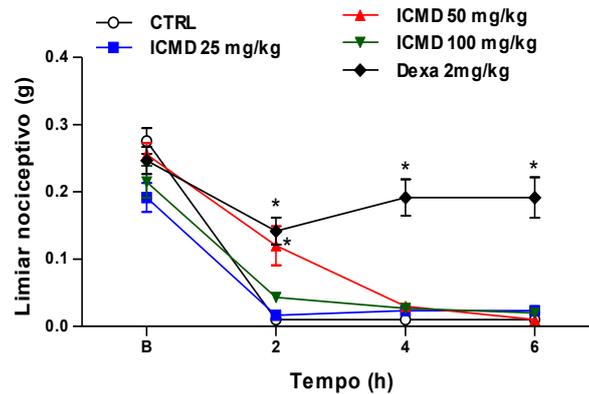
Figura 31. Curva dose resposta do fármaco ICMD-01 frente ao ensaio de edema de pata induzida por CFA.



Os dados são expressos como média \pm SEM; $n = 6$ animais por grupo. * Significativamente diferente do grupo controle ($p < 0,05$). ANOVA de duas vias seguida do teste de Bonferroni.

Para os resultados da atividade antinociceptiva as duas doses (25 e 50 mg kg^{-1}) não mostraram-se significativas ($p < 0,05$) (Figura 32). A diminuição do limiar nociceptivo só foi mantida por 2h na dose de 50 mg kg^{-1} . Acredita-se que o fármaco pode ser alterado devido aos efeitos de metabolismo ou de fato só apresente atividade anti-inflamatória. Estudos preditivos do perfil farmacocinético *in silico* de todos os derivados estudados foram realizados afim de que se pudesse melhor esclarecer as possíveis intercorrências de ADME (absorção, distribuição, metabolização e excreção).

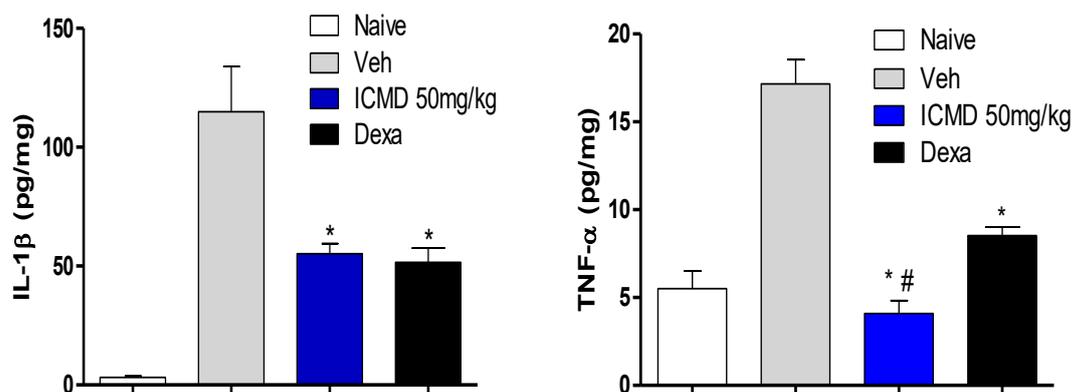
Figura 32. Curva dose resposta do fármaco ICMD-01 em diferentes doses frente ao ensaio de hiperalgesia induzida por CFA (*von frey*).



Os dados são expressos como média \pm SEM; n = 6 animais por grupo. * Significativamente diferente do grupo controle ($p < 0,05$). ANOVA de duas vias seguida do teste de Bonferroni.

Para validar o perfil anti-inflamatório foram mensurados o potencial modulador do ICMD-01 (50 mg kg^{-1} v.o) frente a produção de citocinas pró-inflamatórias e prostaglandina E_2 (PGE_2) *in vivo*. As citocinas constituem um grupo diversificado de mediadores extensamente liberados durante a inflamação. O composto ICMD-01, apresentou inibição estatisticamente significativa ($p < 0,05$) dos níveis locais de IL-1 β e TNF- α (Figura 33) quando comparado ao grupo controle. Para a IL-1 β a inibição promovida pelo ICMD-01 é comparável ao da dexametasona, enquanto para o TNF- α o composto mostrou-se superior.

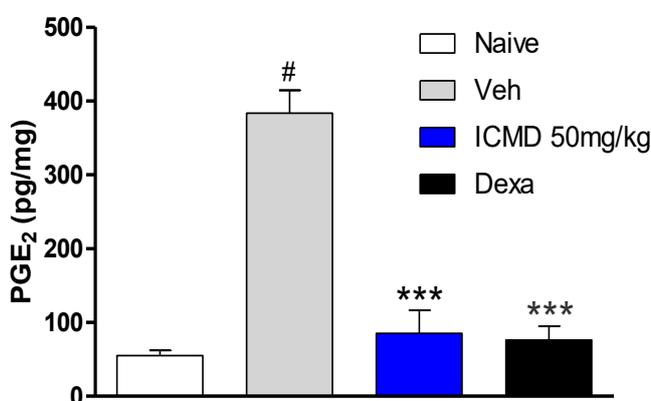
Figura 33. Efeitos do ICMD-01 nos níveis de citocinas da pata durante a inflamação induzida por CFA.



Os dados são expressos como média \pm SEM; n = 6 animais por grupo. * Significativamente diferente do grupo controle ($p < 0,05$). ANOVA de duas vias seguida do teste de Tukey.

A IL-1 β está associada ao aumento da excitabilidade e sensibilização das terminações nociceptivas, além de induzir a processos de apoptose durante respostas inflamatórias e carcinogênicas. O TNF- α , constitui uma citocina pleiotrópica, que induz a produção de outras citocinas como IL-1 e IL-6, promovendo a quimiotaxia, recrutamento celular, aumento de permeabilidade vascular e hiperalgesia (OPRETZKA et al., 2019; ZEESHAN et al, 2019). Também foi avaliado o efeito do ICMD-01 sobre os níveis locais de PGE₂ durante a inflamação provocada pelo CFA. Conforme mostrado pela análise, o ICMD-01 (50 mg kg⁻¹) inibiu os níveis de PGE₂ na pata inflamada ($p < 0,001$) quando comparado ao grupo controle, com resultados semelhantes ao do grupo tratado com dexametasona (2 mg kg⁻¹) (Figura 34).

Figura 34. Efeitos do ICMD-01 nos níveis de PGE₂ da pata durante a inflamação induzida por CFA.



Os dados são expressos como média \pm SEM; n = 6 animais por grupo. * Significativamente diferente do grupo controle ($p < 0,05$). ANOVA de duas vias seguida do teste de Tukey.

Após a estimulação inflamatória a extensa liberação de citocinas propiciam a transcrição de COX-2 em razão da ativação do fator NF κ B (MOREIRA et al., 2019). A COX-2 por sua vez é a enzima responsável pelas reações de peroxidação que irão dar origem as prostaglandinas (LEWANDOWSKA-POLAK, 2019; SURESH et al., 2019). A PGE₂ é um dos principais mediadores envolvidos no aparecimento dos sinais e sintomas processo inflamatório, provocando aumento da permeabilidade vascular, vasodilatação e edema, além de aumentar a sensibilidade das terminações nociceptivas provocando dor (HUSSEIN et al. 2012; OU et al., 2019).

Com base nestes resultados, sugere-se o potencial anti-inflamatório desses novos derivados, em especial o ICMD-01 nos modelos *in vivo* e *in vitro*. Esses compostos podem apresentar mecanismos envolvendo a inibição de citocinas pró-inflamatórias, óxido nítrico e prostaglandinas. Essa classe química apesar de pouco estudada para inflamação mostra atividade satisfatória,

evidenciada pela atividade comparável a dexametasona, anti-inflamatório esteroidal com uso restrito devido aos diversos efeitos deletérios sob funções metabólicas, endócrinas e imunes, sendo assim utilizado por períodos curtos de tempo.

Os ensaios farmacológicos evidenciaram a potencialidade terapêutica não clínica do ICMD-01, tornando-o forte candidato a um medicamento anti-inflamatório. Um dos maiores desafios para inserir um novo agente no mercado é garantir um menor perfil de toxicidade comumente visualizado pelos agentes disponíveis, como os danos gastrointestinais, cardiovasculares e nefrotóxicos. Para continuidade desses estudos com o ICMD-01, foram realizados a toxicidade aguda de dose única, susceptibilidade ulcerogênica e determinação do potencial hemolítico em culturas de hemácias.

5.4 Avaliação toxicológica

5.4.1 Toxicidade aguda de dose única

Para avaliar o perfil de segurança do ICMD-01 foi realizado o teste de toxicidade oral aguda segundo o protocolo 423 da OEDC (2001). Esse ensaio tem como intuito avaliar a segurança de uso de compostos naturais e sintéticos subsidiando os riscos à saúde após sua exposição. Desta forma administrou-se uma dose equivalente a 2000 mg kg^{-1} , avaliando sinais típicos de toxicidade e mortalidade nas primeiras horas, seguido de 14 dias de observação. Também foi realizado o screening hipocrático comportamental de acordo com o protocolo de Almeida (1999), durante as primeiras 4 horas após a administração do fármaco.

Como resultado, a dose de 2000 mg kg^{-1} não provocou morte e a triagem farmacológica apenas evidenciou diminuição responsiva ao estímulo doloroso na cauda do animal e micção aumentada com indícios de excreção, visualizado pela urina com coloração amarela característica do fármaco. Passada 24 horas não foi detectado nenhuma dessas alterações.

Com relação ao consumo e evolução ponderal, não foi apresentada diferenças significativas entre os animais tratados e o grupo controle (Tabela 8 e 9). Dos órgãos analisados apenas o baço apresentou diferença estatística no peso ($p < 0,05$), porém sem alterações macroscópicas (Tabela 9). Para os achados laboratoriais, foram observados uma redução significativa dos níveis séricos de transaminase glutâmico-oxalacética (AST) e dos triglicerídeos (Tabela 10) e de algumas discrasias hematológicas, como a o aumento de plaquetas (PLT) e dos níveis de células brancas (WBC) (Tabela 11). Baseando-se na ausência de sinais clínicos relevantes no

screening toxicológico, bem como ausência de morte durante o período de observação, o composto ICMD-01 mostra possuir baixa toxicidade nas condições testadas. Pelo método de classe essa substância enquadra-se na classe 5, ou seja, substância com DL_{50} superior a 2000 mg kg^{-1} e menor que 5000 mg kg^{-1} .

Tabela 8. Consumos dos animais submetidos ao teste de toxicidade, tratados pelo composto ICMD-01 (2000 mg kg^{-1}), durante 14 dias.

Consumos	Controle	ICMD-01
Consumo de ração (g)	$20,77 \pm 1,758$	$18,00 \pm 1,472$
Consumo de água (mL)	$16,31 \pm 0,8097$	$17,77 \pm 0,7438$

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

Tabela 9. Peso relativo dos órgãos e evolução ponderal de camundongos fêmeas tratadas com o ICMD-01, na dose de 2000 mg kg^{-1} via oral, após 14 dias.

Órgãos	Controle	ICMD-01
Coração	$0,4000 \pm 0,03947$	$0,4437 \pm 0,01750$
Pulmão	$0,5720 \pm 0,04087$	$0,5242 \pm 0,05810$
Rins	$1,069 \pm 0,009841$	$1,085 \pm 0,03896$
Fígado	$4,944 \pm 0,1774$	$5,517 \pm 0,1541$
Baço	$0,3046 \pm 0,06818$	$0,5117 \pm 0,02060^*$
Evolução ponderal (g)	$5,3333 \pm 0,881900$	$3,6670 \pm 1,333333$

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

Tabela 10. Determinação dos parâmetros bioquímicos no soro de camundongos do grupo controle e tratados com o ICMD-01 na dose de 2000 mg kg^{-1} por via oral após 14 dias.

(Continua)

Dosagens Bioquímicas	Controle	ICMD-01
----------------------	----------	---------

Ureia (mg/dL)	59,00 ± 5,196	61,33 ± 5,364
Creatinina (mg/dL)	0,3567 ± 0,04807	0,4100 ± 0,06110
AST (U/L)	121,0 ± 5,568	86,67 ± 3,528**
ALT (U/L)	86,00 ± 18,93	85,67 ± 18,10
Ácido úrico (mg/dL)	2,033 ± 0,03333	2,067 ± 0,08819
Colesterol total (mg/dL)	88,33 ± 6,839	76,33 ± 5,840
HDL (mg/dL)	42,00 ± 1,528	41,00 ± 0,5774
Triglicerídeos (mg/dL)	206,0 ± 4,583	157,0 ± 11,79*
Glicose (mg/dL)	264,7 ± 10,59	257,7 ± 14,24

Os dados são expressos como média ± SEM; n = 3 determinações por grupo. * Significativamente diferente do grupo controle tratado com salina + Tween 5% (p <0,05).

Tabela 11. Determinação dos parâmetros hematológicos dos camundongos do grupo controle e tratados com o ICMD-01 na dose de 2000 mg kg⁻¹ por via oral após 14 dias.

Dosagens Bioquímicas	Controle	ICMD-01
RBC	7,280 ± 1,135	9,670 ± 0,2765
HGB	11,17 ± 1,507	14,80 ± 0,2646
HCT	33,63 ± 5,341	45,87 ± 0,4631
PLT	508,7 ± 129,8	1201 ± 69,34**
WBC	3,533 ± 1,162	10,03 ± 1,372*

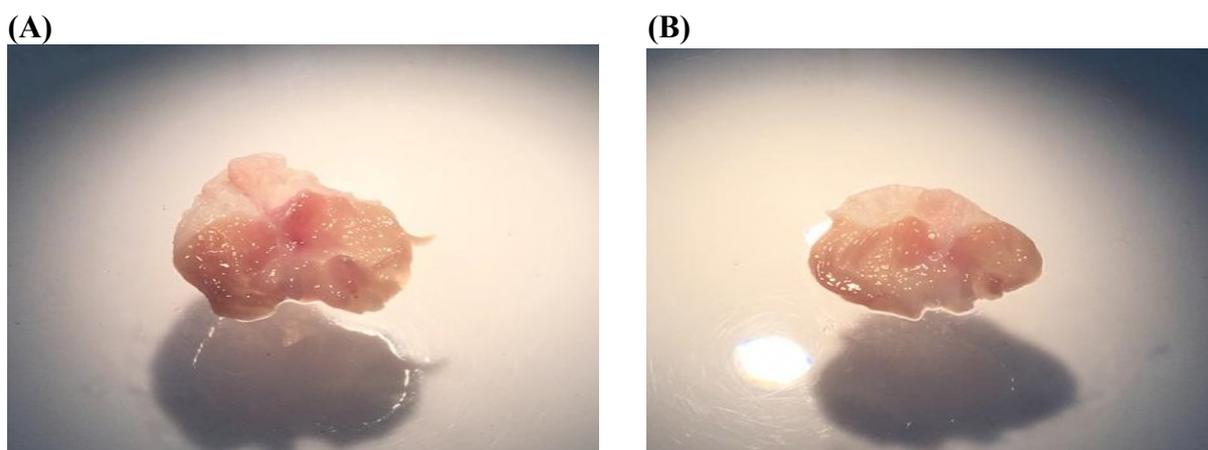
Os dados são expressos como média ± SEM; n = 3 determinações por grupo. * Significativamente diferente do grupo controle tratado com salina + Tween 5% (p <0,05).

5.4.2 Estudo de susceptibilidade ulcerogênica

Em razão da supressão de PGE₂ pelo ICMD-01, foi avaliado a possibilidade do composto apresentar como efeitos secundários a indução de úlceras pépticas. Esses eventos são amplamente induzidos por fármacos anti-inflamatórios não seletivos, que agem suprimindo a

produção de prostaglandinas citoprotetoras da mucosa pela COX-1. Entretanto, não houve diferença estatística entre o grupo tratado com o ICMD-01 ($SEM\ 3,8 \pm 0,7348$) e o grupo controle ($\pm SEM\ 2,6 \pm 0,6000$) para o índice de lesões ulcerativas (ILU) (Figura 35), indicando baixo potencial ulcerogênico quando utilizado por um período correspondente a 7 dias na dose terapêutica de $50\ mg\ kg^{-1}$.

Figura 35. Imagens dos estômagos do grupo controle (A) e tratados com ICMD-01 $50\ mg\ kg^{-1}$ (B).



Fonte: dados da pesquisa (2019)

5.5 Avaliação toxicológica *in vitro*

5.5.1 Atividade hemolítica

A avaliação da atividade hemolítica em eritrócitos é utilizada para determinar a potencialidade dos compostos em causar lesões na membrana plasmática das hemácias pela formação de poros que favorece um desequilíbrio osmótico ou pela sua ruptura total. A interação de substâncias químicas com eritrócitos pode acelerar o envelhecimento ou levar a um processo prematuro de destruição celular (SILVA, 2017).

Para o ensaio foi empregado a concentração de $500\mu g \cdot mL^{-1}$, obtendo um grau de hemólise de 4,7%. Esse achado demonstra que o composto ICMD não apresenta citotoxicidade significativa (poder hemolisante abaixo de 10%). Esse é um ponto positivo na investigação, visto que, as pesquisas realizadas com produtos naturais e/ou sintéticos têm sido concentradas não só na busca de compostos com atividade farmacológica, mas também que garantam segurança de uso.

5.6 Predições farmacocinéticas

Os mecanismos farmacocinéticos de absorção, distribuição, metabolização e excreção (ADME), vem sendo descritos como as principais causas de fracassos no desenvolvimento de moléculas promissoras candidatas a medicamentos. As metodologias modernas de modelagem *in silico* que avaliam as propriedades farmacocinéticas, tornam-se interessantes durante o planejamento, otimizando o processo de pesquisa de novas entidades químicas, identificando os principais problemas de ADME que compromete as fases posteriores do desenvolvimento (HONORIO; MODA; ANDRICOPULO, 2013).

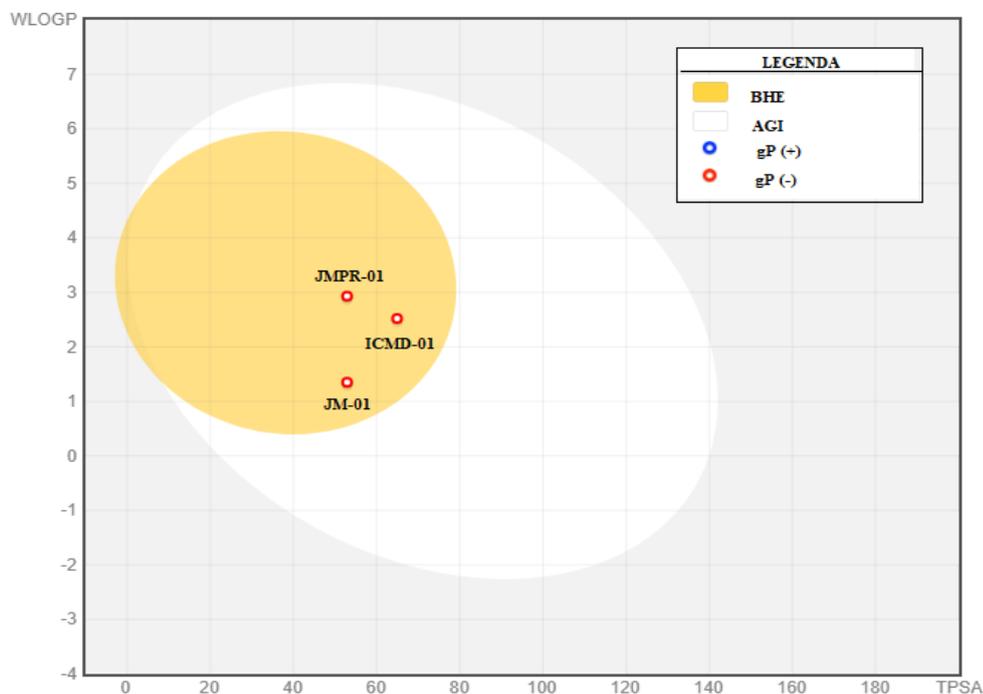
Nesse contexto, dentre as ferramentas computacionais alternativas, tem-se o *SwissADME* que oferece acesso a um pool de modelos preditivos e robustos para propriedades físico-químicas, farmacocinéticas, farmacológicas, química medicinais através de métodos proficientes como: *ilogP*, *boiled-egg* (ovo cozido) e radar de biodisponibilidade (DAINA; MICHELIN; ZOETE, 2017).

De acordo com Daina e Zoete (2016) modelo do *boiled-egg* avalia dois comportamentos farmacocinéticos cruciais no processo de descobertas de drogas: a absorção gastrointestinal e o acesso ao cérebro. Sendo assim, pode-se deduzir o comportamento de estruturas químicas de baixa massa molecular a partir do cálculo da lipofilicidade e de polaridade. Este modelo pode ser aplicado a uma variedade de configurações durante a seleção de compostos de uma quimiotecas nas etapas iniciais do estudo pré-clínico.

Com relação ao comportamento dos derivados JM-01, ICMD-01 e JMPR-01 (Figura 36) observa-se uma alta probabilidade de serem absorvidas pelo trato gastrointestinal e de permearem a barreira hematoencefálica (BHE), podendo ser visualizado graficamente pelos pontos referentes a área físico-química do cérebro (gema). Essa condição nos deu direcionamento de uma possível atividade analgésica central ou indícios de neurotoxicidade. Os ensaios *in vivo* nas doses estabelecidas para os ensaios farmacológicos descartaram esses efeitos, porém, no teste de toxicidade aguda com ICMD-01 foi percebido uma diminuição da resposta ao estímulo de pressão a cauda do animal sem sinais de sedação.

A barreira hematoencefálica (BHE) é um dos mecanismos de proteção mais essenciais no sistema nervoso central (SNC), permitindo seletivamente a passagem de pequenas moléculas lipossolúveis através da membrana endotelial capilar e limitar a passagem de agentes patogênicos e toxinas. Apesar da BHE ser indispensável no mecanismo de defesa, também é um obstáculo durante o estado de doença, uma vez que limita o fornecimento de medicamento a área cerebral (UPADHYAY, 2014; ZHOU et al., 2018).

Figura 36. Perfil de absorção dos compostos derivados fenilacriatoacetamida: JM-01, JM-PR-01 e ICMD-01 pelo modelo *in silico* (Boiled-egg) via *SwissADME*.



*AGI: absorção gastrointestinal; gP (substrato de proteína G + ou -).

Fonte: adaptado de *SwissADME* (2019).

Também pode-se observar que os compostos não são possíveis substratos da glicoproteína P (gp-P) ou proteína de resistência a múltiplas drogas (MDR1). Essa informação é relevante devido a atuação da gp-P como bomba de efluxo, impedindo que a substância atinja a concentração terapêutica no corpo humano, ou permeie a barreira HE. Com relação ao mecanismo de reconhecimento do substrato/não substrato pela gp-P ainda se permanece incerto, entretanto há estudos que sugerem locais específicos na cavidade de ligação principal importantes na ativação da enzima (AZEREDO; UCHÔA; COSTA, 2009; MUKHAMETOV; RAEVSKY, 2017; MONTANARI; ECKER, 2015).

A ferramenta *SwissADME* também permite identificar se as estruturas são inibidoras do sistema enzimático citocromo P450 (CYPs) (Tabela 12). Esse sistema constitui uma importante família de monooxigenases, capaz de biotransformar 90% dos xenobióticos. Dentre as principais isoformas envolvidas no metabolismo, destacam-se CYP1A2, CYP2B6, CYP2C19, CYP2D6 (ZARETZKI; MATLOCK; SWAMIDASS, 2013).

Tabela 12. Inibição potencial *in silico* das isoformas do complexo citocromo P450 pelos compostos JM-01, JM-PR-01 e ICMD-01.

Inibidor (CYP)	JM-01	JMPR-01	ICMD-01
1A2	Sim	Sim	Sim
2C19	Não	Sim	Sim
2C9	Não	Sim	Sim
2D6	Não	Não	Sim
3A4	Não	Não	Sim

Fonte: adaptado de *SwissADME* (2019).

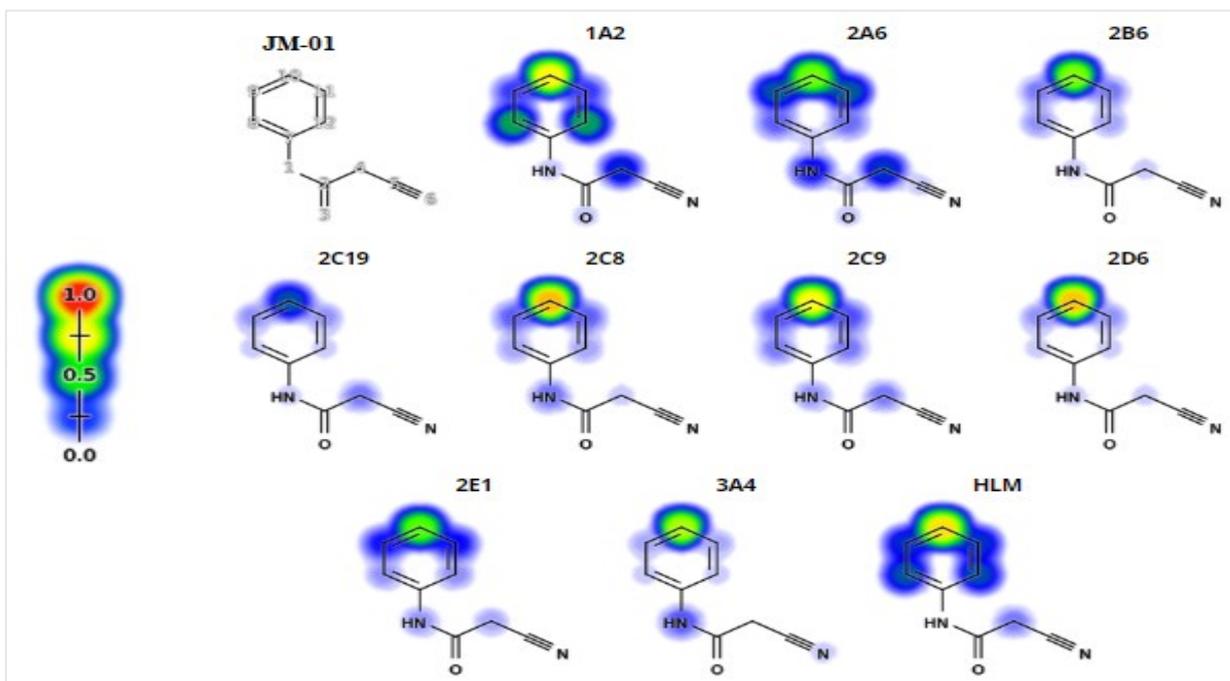
Compostos que exercem atividade sobre a mesma família de enzimas do CYPs, quando administrados concomitantemente, podem alterar o clearance sistêmico de outros fármacos. No caso dos compostos JM-01, JMPR-01 e ICMD-01 há um risco potencial de interações decorrentes da inibição das isoformas específicas, cujo mecanismo pode ser decorrente da competição direta pelo sítio de ligação da enzima. Essas interações podem levar a reações adversas ou redução da efetividade do fármaco coadministrado.

O entendimento acerca de como os fármacos são metabolizados também é importante na determinação do perfil farmacocinético e suas interferências na eficácia e segurança dos compostos em estudos. Dessa forma foi utilizado o servidor da web *Xenosite* para prever quais sítios de metabolização dos derivados são modificados durante o metabolismo mediado pela superfamília de enzimas heme CYP. Esse modelo preditivo permite compreender mecanismos farmacológicos ou identificar possíveis falhas de natureza farmacocinética.

Observando-se as figuras 37 (A, B e C) a previsão *in silico* mostra que todos os compostos são susceptíveis a oxidação no anel aromático com maior reatividade ao ataque nucleofílico na posição para livre. Esses metabólitos formados durante o processo de metabolismo de fase I tornam as moléculas mais polares podendo facilitar o processo de excreção. A isoforma CYP3A4 é majoritariamente a mais importante durante o processo, sendo envolvida na reação metabólica oxidativa da maioria das drogas devido a sua capacidade de acomodar compostos de diferentes tamanhos em seu sítio ativo (PANNEERSELVAM et al., 2015; ZHOU, 2018).

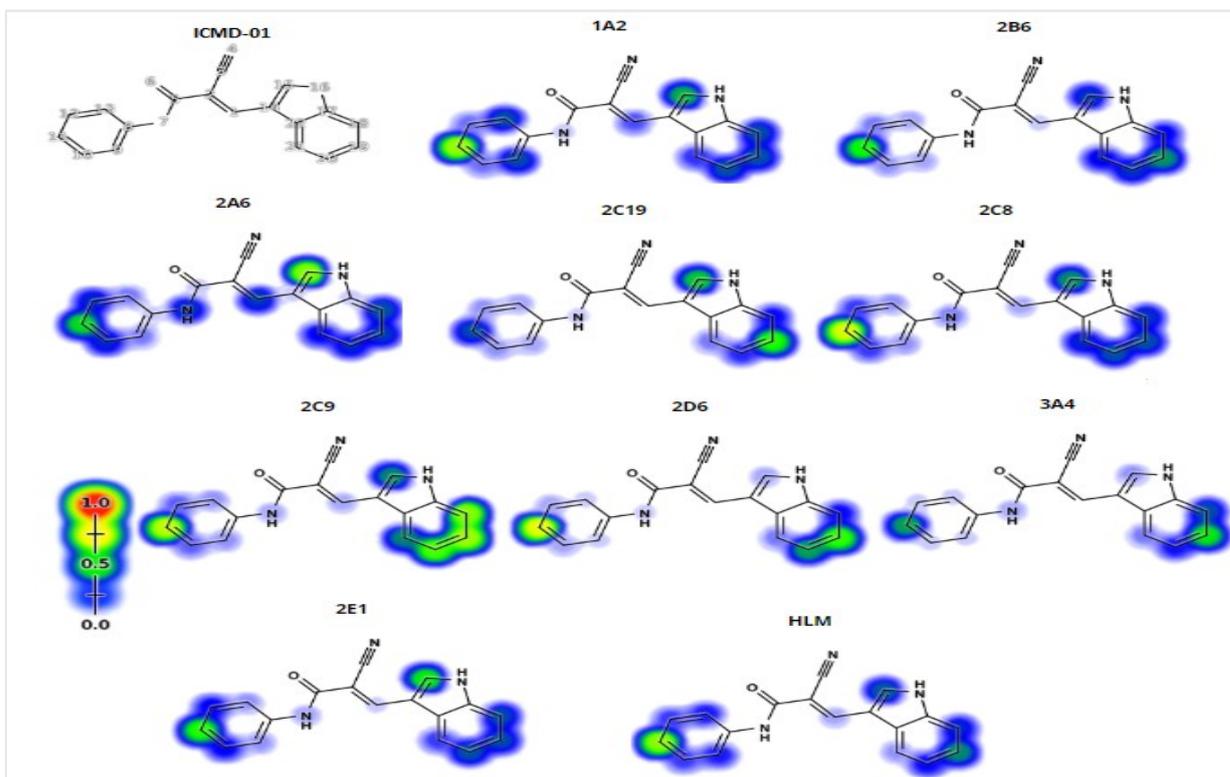
Figura 37. Predição dos sítios de metabolização do JM-01 (A), ICMD-01 (B) e JMPR-01 (C) via *Xenosite*.

(A)



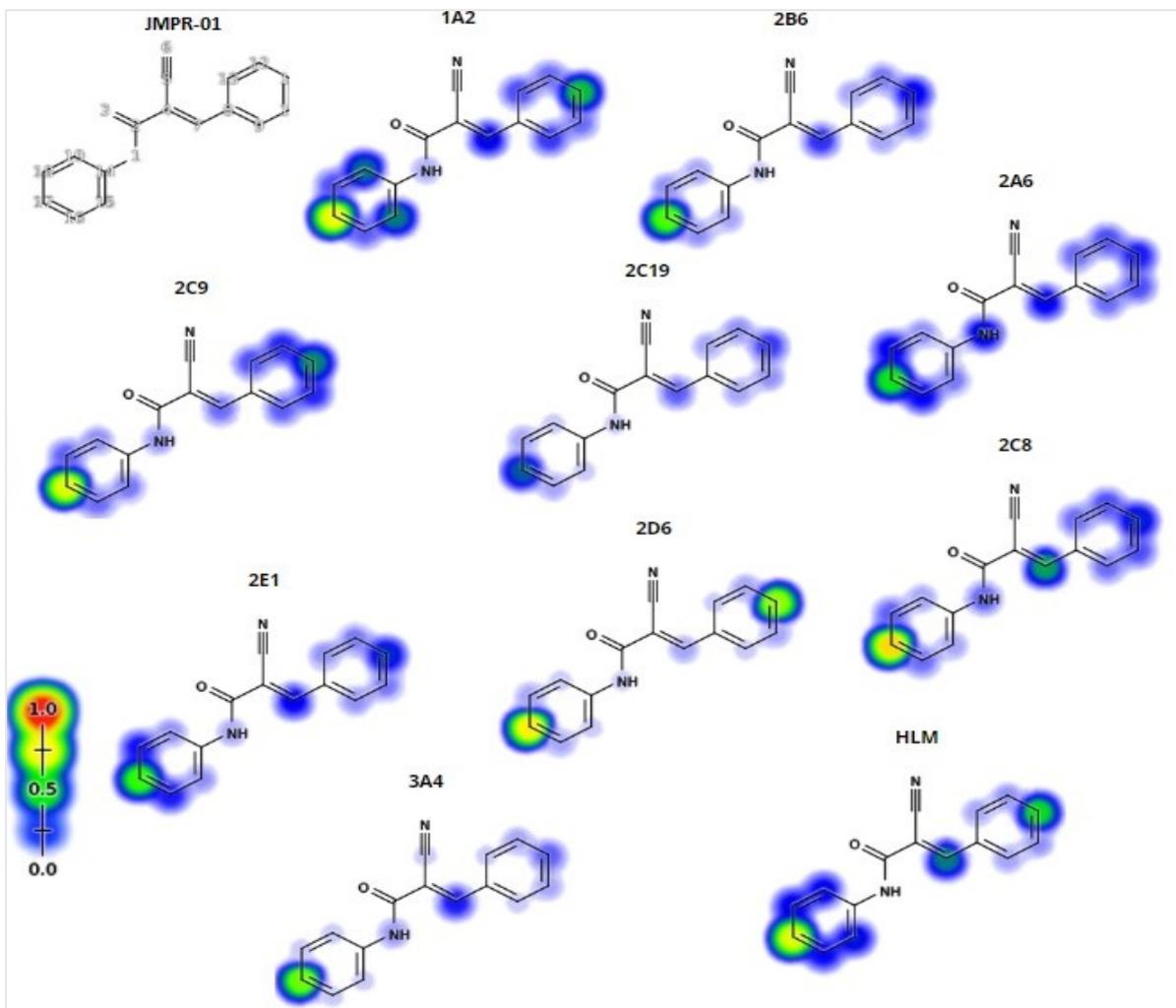
Fonte: adaptado de *XenoSite* (2019).

(B)



Fonte: adaptado de *XenoSite* (2019).

(C)



Fonte: adaptado de *XenoSite* (2019).

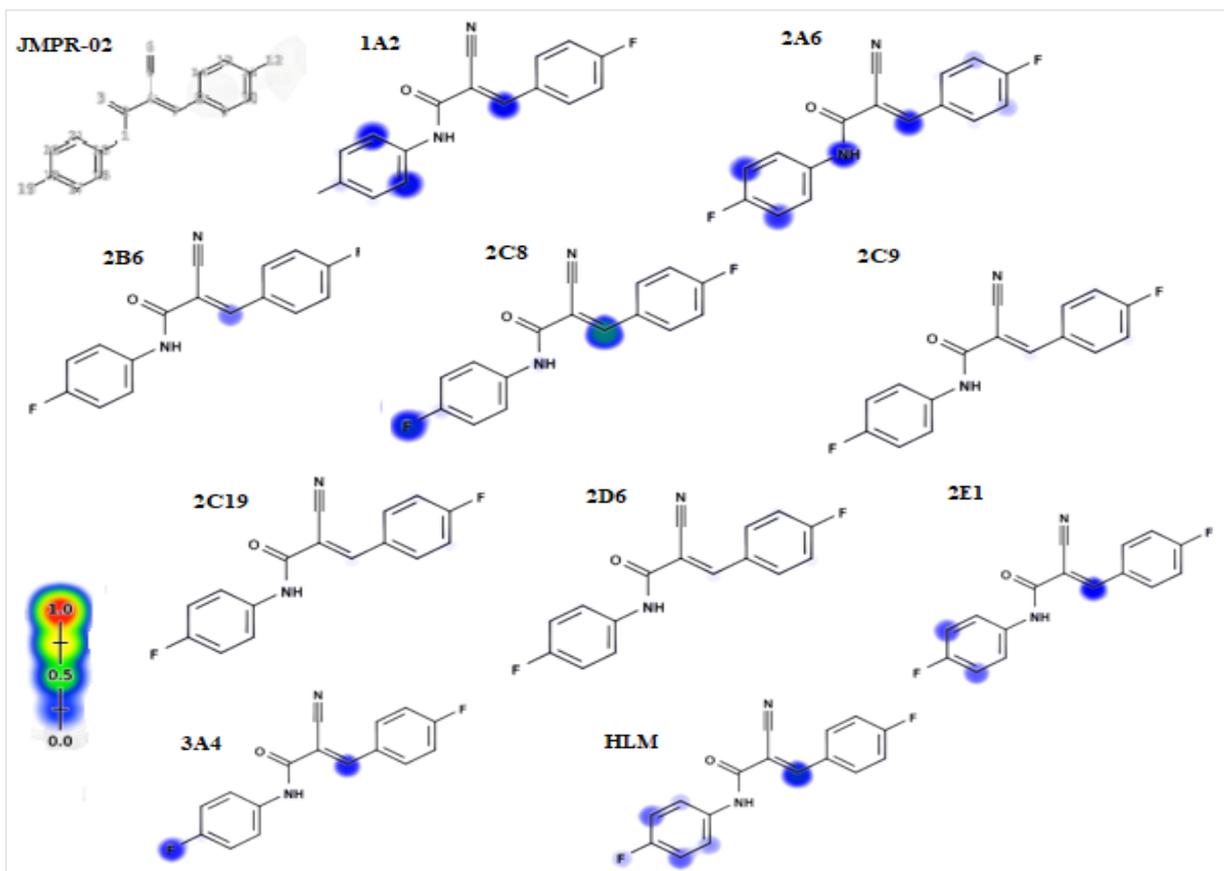
Como ilustrado verifica-se áreas de maior reatividade ao ataque do sistema enzimático, em especial os anéis aromáticos (fenilacetamida e indólico). Essa circunstância poderá influenciar na atividade farmacológica dos compostos, favorecendo o processo de excreção ou formação de metabólitos ativos que asseguram e potencializam a atividade anti-inflamatória. O entendimento desse parâmetro é importante devido que administração oral representa a via preferida de administração de medicamentos e a possibilidade das substâncias sofrerem reações de metabolização pode influenciar na biodisponibilidade oral.

5.6.1 Proposta de bloqueio metabólico

Os derivados ICMD-01 e JMPR-01 mostraram os melhores perfis de atividade nos ensaios *in vitro* e *in vivo*, sendo potencialmente alvos do sistema CYP450, em especial pela isoforma 3A4, que metaboliza cerca de 50% dos fármacos. Com isso, foi pensado no bloqueio metabólico nas regiões susceptíveis a oxidação nos anéis fenílicos e indólicos (Figura 38 A e B). A proposta de inserção e halogênios tem sido extensivamente empregada como estratégias de modificação molecular, para favorecer a atividade biológica ou melhorar a estabilidade química e/ou metabólica. Para esses compostos, foi pensado na adição do flúor devido ao menor comprometimento da lipofilia, já que este átomo apresenta o menor valor das constantes de hidrofobicidade de Hanch ($\pi = 0,14$) dentre os halogênios (HERNANDES et al., 2010; SEDGWICK et al., 2019; SHAH; WESTWELL, 2007).

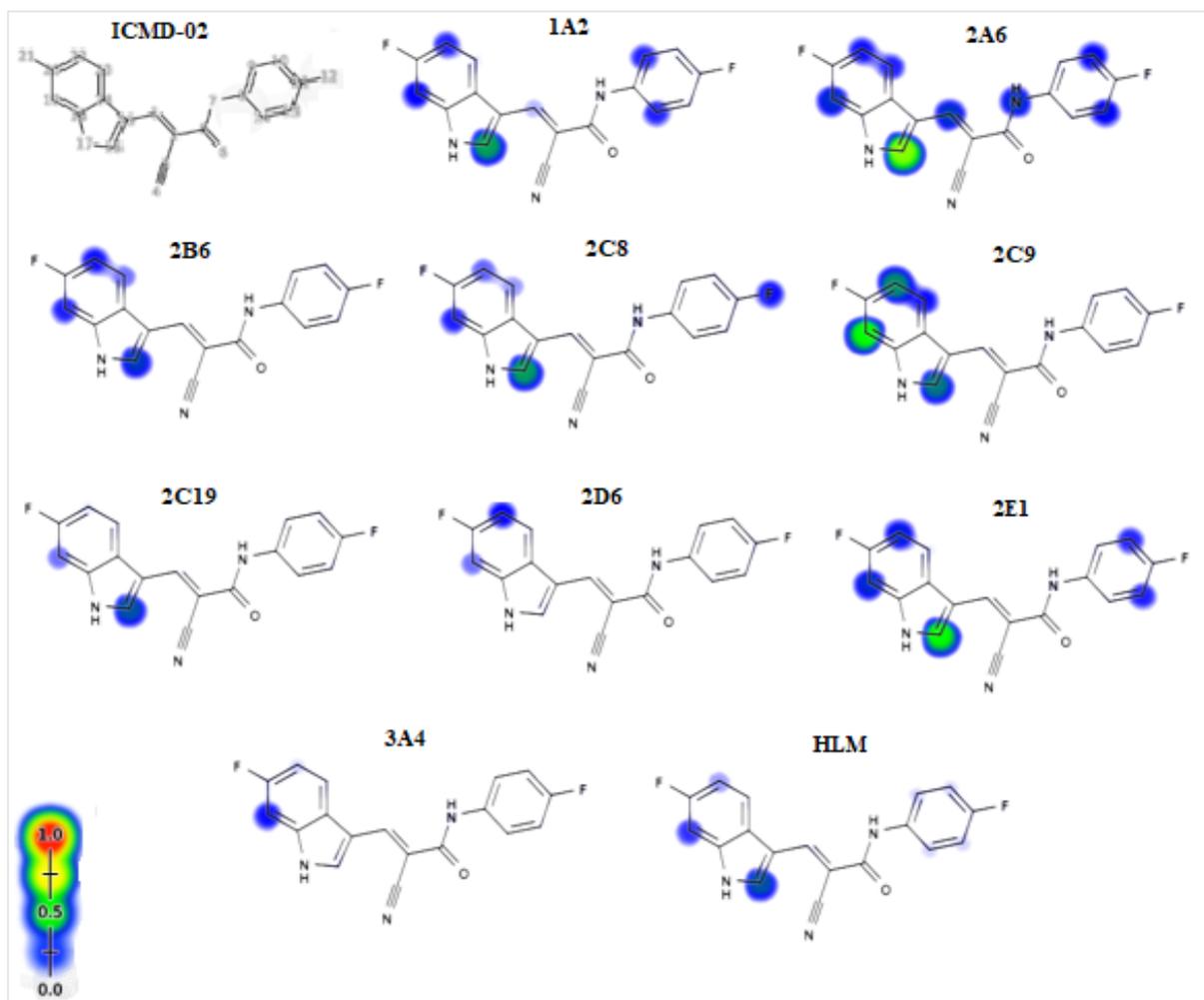
Figura 38. Predição dos sítios de metabolização do JMPR-02 (A) e ICMD-02 (B) protegido pelo átomo de flúor © *via Xenosite*.

(A)



Fonte: adaptado de *XenoSite* (2019).

(B)



Fonte: adaptado de *XenoSite* (2019).

Apesar do maior volume molecular do flúor quando comparado ao hidrogênio, estudos mostram que este pode ser considerado um imitador de hidrogênio razoável, causando influências estéricas não consideráveis quando comparado o modo de ligação do composto a um alvo farmacológico, entretanto, sua eletronegatividade pode influenciar nas propriedades físico-química das estruturas moleculares, podendo haver mudanças no perfil de atividade. Sendo assim é necessário avaliar *in vivo* posteriormente se houve ganho na resposta biológica, ou se há comprometimento na interação com enzimas importantes na modulação da resposta inflamatória (PARK; KITTERINGHAM; O'NEILL; 2001; SHAH; WESTWELL, 2007).

A base química do aumento da estabilidade metabólica e a melhoria na biodisponibilidade poderá ser explicada pelo impedimento ao ataque por enzimas oxidativa em posições mais reativas. Como pode-se observar na figura 32, a ligação C-F é mais resistente ao ataque do que a ligação C-H. Além disso, a substituição nesses locais adjacentes ou distais ao

local do ataque também afeta o metabolismo do fármaco em decorrência dos efeitos eletrônicos (PARK; KITTERINGHAM; O'NEILL; 2001; XING et al., 2019).

Em sistemas saturados devido ao efeito indutivo do flúor poderá haver de fato a diminuição da suscetibilidade de grupos adjacencetes ao ataque metabólico pelas diversas isoformas das enzimas do CYP, entretanto, há indícios que o átomo de flúor colocado orto a um grupo fenólico, poderá aumentar a sua reatividade como nucleófilo em reações de metilação e glicuronidação. Sendo assim necessário expandir a série com outros substituintes afim de que se melhore o perfil farmacocinético e não comprometa aspectos farmacodinâmicos (SWALLOW, 2015).

A importância do flúor na determinação da estabilidade metabólica foi amplamente empregado no desenvolvimento de anti-inflamatórios, a exemplo do inibidor seletivo de COX-2, o celecoxib. De acordo com Shah e Westwell (2007) Os protótipos flourados apresentavam semi-vidas exarcebadamente longas, e a substituição do grupo por um metil reduziu drasticamente a meia vida em ratos de 220h para 3,5h, o que mostra, que a depender da aplicabilidade essa substituição pode ser útil para o desenvolvimento de drogas com maior tempo de ação no organismo.

Os derivados fenilacrilamida (JMPR-01 e ICMD-01) mostram resultados bastante promissores para atividade anti-inflamatória, além de um baixo potencial toxicológico, o que viabiliza as pesquisas clínicas. Os estudos farmacocinéticos *in silico* permite o direcionamento dos possíveis metabólitos formados e as principais intercorrencias que poderão influenciar na atividade farmacológica.

6 CONCLUSÃO

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

- Os derivados 2-ciano *N*-fenilacetamida (JM-01), 2-ciano-3-(1H-indol-3-il)-*N*-fenilacrilamida (ICMD-01) e (E) -2-ciano-*N*,3-difenilacrilamida (JMPR-01), tiveram rota sintética viável, com rendimentos satisfatórios acima de 50%, fácil processo de purificação e respectivos graus de pureza 99,42, 97,47, 99,82 % mol.
- As moléculas sintetizadas tiveram suas estruturas comprovadas por técnicas espectroscópicas de RMN de ¹H e RMN de ¹³C DEPT-Q, e IV e espectrometria de massas, com padrões de deslocamento e absorbância em acordo com a literatura consultada.
- Nos ensaios *in vitro* os compostos JMPR-01 e ICMD-01, em concentrações não citotóxicas mostraram inibições significativa ($p < 0,05$) da produção de nitrito e citocinas (IL-1 β e TNF α).
- No ensaio de peritonite induzida por *zymosan* todos os derivados apresentaram inibição da migração leucocitária substancial ($p < 0,05$) nas doses de (5, 10 e 50 $mg\ kg^{-1}$) comparável a indometacina na dose de 10 $mg\ kg^{-1}$.
- No edema de pata induzida por CFA o composto com melhor perfil nos tempos de 2-6h foi o ICMD-01, estabelecendo a dose de 50 $mg\ kg^{-1}$ como a terapêutica não-clínica, com atividade semelhante ao grupo tratado com dexametasona.
- O ICMD-01 foi capaz de suprimir significativamente ($p < 0,05$) citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β e TNF α) e prostaglandina E₂ *in vivo*. Direcionando em parte a atividade anti-edematogênica em razão da supressão desses mediadores.
- Com relação a atividade antinociceptiva inflamatória e central, avaliados pelos modelos de *von frey* e *tail-flick* os compostos não apresentaram atividade considerável nas condições de dose estabelecidas.
- Na toxicidade aguda o ICMD-01 não provocou morte e nem sinais relevantes no screening hipocrático comportamental, podendo-se estabelecer que a DL₅₀ é superior a 2000 $mg\ kg^{-1}$ e menor que 5000 $mg\ kg^{-1}$.
- Na atividade hemolítica o ICMD-01 não apresentou citotoxicidade (potencial hemolizante abaixo de 10%).
- O ICMD-01 também não induziu a formação de úlceras, apresentando baixo potencial ulcerogênico.

- Nas predições farmacocinéticas puderam-se observar que os compostos JM-01, JMPR-01 e ICMD-01, são potencialmente bem absorvidos pelo TGI e permeáveis a BHE além disso, apresentam pontos susceptíveis a metabolização que podem influenciar no efeito farmacológico.
- Em conclusão este estudo demonstra pela primeira vez as propriedades anti-inflamatórias *in vivo* desses derivados. Com base nos resultados sugere-se que em parte os efeitos farmacológicos poderão estar relacionados a supressão de mediadores como citocinas, óxido nítrico e prostaglandinas.
- Esses estudos iniciais podem tornar o ICMD-01 um forte candidato a medicamento anti-inflamatórios, com respostas farmacológicas potencializadas e menores efeitos indesejáveis relacionados aos danos gastrointestinais associado ao uso prolongado dos fármacos convencionais.

REFERENCIAS

- ADEWUMI, I.; LÓPEZ, C.; DAVIE, J. R. Mitogen and stress- activated protein kinase regulated gene expression in cancer cells. **Advances in Biological Regulation**, 2018. Doi: 10.1016/j.jbior.2018.09.010
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Gerência de Avaliação de Segurança e Eficácia. **Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos**. Versão 2. Brasília, 2013. 48 f.
- 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. C-reactive protein: clinical applications and proposals for a rational use. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 59, n. 1, p. 85-92, 2013.
- AHMED, S. M. U.; LUO, L.; NAMANI, A.; WANG, J.; TANG, X. Nrf2 signaling pathway: Pivotal roles in inflammation. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Molecular Basis of Disease**, v. 1863, n. 2, p. 585-597, 2017.
- ALDERTON, W. K.; COOPER, C. E.; KNOWLES, R. G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. **Biochemistry Journal**, v. 357, n. 3, p. 593-615, 2001.
- ALMEIDA, R. N.; FALCÃO, A. C. G. M.; DINIZ, R. S. T.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; POLARI, R. M.; BARBOSA-FILHO, J. M.; AGRA, M. F.; DUARTE, J. C.; FERREIRA, C. D.; ANTONIOLLI, A. R.; ARAÚJO, C. C. Metodologia para avaliação de plantas com atividade no sistema nervoso central e alguns dados experimentais. **Revista Brasileira de Farmácia**, Rio de Janeiro, v. 80, p. 72-76, 1999.
- ALVARENGA; S. M.; GIORGI, R. D. N.; CHAHADE, W. H. Antiinflamatórios hormonais: Glicocorticóides. **Einstein**, v. 6, S159-S65, 2008.
- APAROY, P.; REDDY, K. K.; REDDANNA, P. Structure and Ligand Based Drug Design Strategies in the Development of Novel 5-LOX Inhibitors. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 22, p. 3763-3778, 2012.
- APPAURI, J. N.; SELVARAJ, M.; HAMID, S. A. A. Synthesis of 3-(2-furylmethylene)-2,4-pentanedione using DL-Alanine functionalized MCM-41 catalyst via Knoevenagel condensation reaction. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 260, p. 260-269, 2018.
- ARANCIBIA, S. A.; BELTRÁN, C. J.; AGUIRRE, I. M.; SILVA, P.; PERALTA, A. L.; MALINARICH, F.; HERMOSO, M. A. Toll-like receptors are key participants in innate immune responses. **Biological Research**, v. 40, n. 2, p. 97-112, 2007.
- AZEREDO, F. J.; UCHÔA, F. T.; COSTA, T. D. Papel da Glicoproteína-P na Farmacocinética e nas Interações Medicamentosas. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 90, n. 4, p. 321-326, 2009.

BAKR, R. B.; GHONEIM, A. A.; AZOUZ, A. A. Selective cyclooxygenase inhibition and ulcerogenic liability of some newly prepared anti-inflammatory agents having thiazolo[4,5-d]pyrimidine scaffold. **Bioorganic Chemistry**, v. 88, 2019.

BARRACHINA, L.; REMACHA, A. R.; SOLER, L.; GARCÍA, N.; ROMERO, A.; VÁZQUEZ, F. J.; VITORIA, A.; ÁLAVA, M. A.; LAMPRAVE, F.; RODELLAR, C. Acute phase protein haptoglobin as inflammatory marker in serum and synovial fluid in an equine model of arthritis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 182, p. 74-78, 2016.

BATLOUNI, M. Anti-inflamatórios Não Esteroides: Efeitos Cardiovasculares, Cérebro Vasculares e Renais. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 94, n. 4, p. 556-563, 2010.

BAUTISTA, L. E.; VERA, L.M.; Antihypertensive Effects of Aspirin: What is the Evidence?. **Current Hypertension Report**, v. 12 n. 4, p. 282-289, 2010.

BROJENI, M. S.; RASHVAND, M.; HAGHPARAST, A. Role of orexin receptors within the dentate gyrus of the hippocampus in antinociception induced by chemical stimulation of the lateral hypothalamus in the tail-flick test as a model of acute pain in rats. **Physiology and Behavior**, v. 209, p. 112595, 2019.

CAMPBELL, I. B.; MACDONALD, S. J. F.; PROCOPIOU, P. A. Medicinal chemistry in drug discovery in big pharma: past, present and future, **Drug Discovery Today**, v. 23, n. 2, p. 219-234, 2018.

CARON, G.; VALLARO, M.; ERMONDI, G. Log P as a tool in intramolecular hydrogen bond considerations. **Drug Discovery Today: Technologies**, v. 27, p. 65-70, 2018.

CASH, J. L.; WHITE, G. E.; GREAVES, D. R. Chapter 17 zymosan-induced peritonitis as a simple experimental system for the study of inflammation. **Methods in Enzymology**, v. 461, p. 379-396, 2009.

CHA, Y. I.; SOLNICA-KREZEL, L.; SUBOIS, R. N. Fishing for prostanoids: deciphering the developmental functions of cyclooxygenase-derived prostaglandins. **Developmental Biology**, v. 289, n. 2, p. 263-272, 2006.

CHANDRASEKAHARAN, N. V.; DAI, H.; ROOS, L. T.; EVANSON, N. K.; TOMSIK, J.; ELTON, T. S.; SIMMONS, D. L. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: Cloning, structure, and expression. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 21, p. 13926-13926-31, 2002.

CHAPLAN, S. R.; BACH, F. W.; POGREL, J. W.; CHUNG, J. M.; YAKSH, T. L. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 53, n. 1, p. 55-63, 1994.

CHAVES, T. F.; PASTORE, H. O.; HAMMER, P.; CARDOSO, D. As-synthesized TEA-BEA zeolite: Effect of Si/Al ratio on the Knoevenagel condensation. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 202, p. 198-207, 2015.

CHEN, G.; NUÑEZ, G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. **Nature Review Immunology**, v.10, n.12, p. 826-837, 2010.

CHEN, L.; DENG, H.; CUI, H.; FANG, J.; DENG, J.; LI, Y.; WANG, X.; ZHAO, L. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. **Oncotarget**, v. 9, n. 6, p. 7204-7218, 2018.

COLMAN, M. D.; LAZZAROTTO, S. R. S.; LAZZAROTTO, M.; HANSEL, F.; A.; COLMAN, T. A. D.; SCHNITZLER, E. Evolved gas analysis (TG-DSC-FTIR) and (Pyr-GC-MS) in the disposal of medicines (aceclofenac). **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 119, p. 158-161, 2016.

CUENDA, A. Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPK) in Cancer. **Reference Module in Biomedical Sciences**, v. 3, p. 472-480, 2019.

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

CUNHA, T. M.; TALBOT, J.; PINTO, L. G.; VIEIRA, S. M.; SOUZA, G. R.; GUERRERO, A. T.; SONEGO, F.; VERRI, W. A.; ZAMBONI, D. S.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F. Q. Caspase-1 is involved in the genesis of inflammatory hypernociception by contributing to peripheral IL-1 β maturation. **Molecular Pain**, v. 6, n. 63, 2010.

CZERKIES, M.; KWIATKOWSKA, K. TToll-Like Receptors and their Contribution to Innate Immunity: Focus on TLR4 Activation by Lipopolysaccharide. **Advances in Cell Biology**, v. 4, n. 1, p. 1-24, 2014.

DAINA, A. ZOETE, V. A BOILED-Egg To Predict Gastrointestinal Absorption and Brain Penetration of Small Molecules. **ChemMedChem**, v. 11, n. 11, p. 1117-1121, 2016.

DAINA, A.; MICHELIN, O.; ZOETE, V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. **Scientific Reports**. v. 7. Doi: 10.1038/srep42717.

DAVID, B. A.; KUBES, P. Exploring the complex role of chemokines and chemoattractants in vivo on leukocyte dynamics. **Immunological Reviews**, v. 289, n. 1, p. 9-30, 2019.

DEJEAN C, RICHARD D. Mechanisms of action of glucocorticoids. **Revue de MédecineInterne**, v. 34, n. 5, p. 264-268, 2013.

DEY, R.; BISHAYI, B. Dexamethasone exhibits its anti-inflammatory effects in *S. aureus* induced microglial inflammation via modulating TLR-2 and glucocorticoid receptor expression. **International Immunopharmacology**, v. 75, p. 105806, 2019.

DHILLON, A. S.; HAGAN, S.; RATH, O.; KOLCH, W. MAP kinase signalling pathways in cancer. **Oncogene**, v. 26, n. 22, p. 32-79-3290, 2007.

DIAMANT, G.; DIKSTEIN, R. Transcriptional Control by NF- κ B: Elongation in Focus. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms**, v. 1829, n. 9, p. 937-945, 2013.

DODINGTON, D. W.; DESAI, H. R.; WOO, M. JAK/STAT – Emerging Players in Metabolism. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 29, n. 1, p. 55-65, 2018.

EDER, J.; SEDRANI, R.; WIESMANN, C. The discovery of first-in-class drugs: origins and evolution. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 13, n. 8, p. 577-587, 2014.

EL-DEEB, W.; GHONEIM, I.; FAYEZ, M.; ELSOHABY, I.; ALHAIDER, A.; EL-GIOUSHY, M. Acute phase proteins, proinflammatory cytokines and oxidative stress biomarkers in sheep, goats and she-camels with *Coxiella burnetii* infection-induced abortion. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Disease**, v. 67, p. 101352, 2019.

EL-GAMMAL, O. A. Synthesis, characterization, molecular modeling and antimicrobial activity of 2-(2-(ethylcarbamothioyl)hydrazinyl)-2-oxo-N-phenylacetamide copper complexes. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 75, n. 2, p. 533-542, 2010.

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.

ESPIRITO SANTO, R. F.; MEIRA, C. S.; COSTA, R. S.; FILHO, O. P. S.; EVANGELISTA, A. F.; TROSSINI, G. H. G.; FERREIRA, G. M.; VELOZO, E. S.; VILLARREAL, C. F.; SOARES, M. B. P. The anti-inflammatory and immunomodulatory potential of braylin: Pharmacological properties and mechanisms by in silico, in vitro and in vivo approaches. **Plos one**, v. 12, n. 6, 201. doi: 10.1371/journal.pone.0179174.

FEHRENBACHER, J. C.; VASKO, M. R.; DUARTE, D. B. Models of inflammation: Carrageenan- or complete Freund's Adjuvant (CFA)-induced edema and hypersensitivity in the rat. **Current protocols in pharmacology**, v. 56, n. 1, 2012. Doi: 10.1002/0471141755.ph0504s56

FRANKLIN, T. C.; XU, C.; DUMAN, R. S. Depression and sterile inflammation: Essential role of danger associated molecular patterns. **Brain, Behavior and Immunity**, v. 72, p. 2-13, 2018.

FRAZÃO, J. B.; ERRANTE, R. P.; CONDINO-NETO, A. Toll-Like Receptors' Pathway Disturbances are Associated with Increased Susceptibility to Infections in Humans. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v. 61, n. 6, p. 427-443, 2013.

GAMA, K. B.; QUINTANS, J. S. S.; ANTONIOLLI, A. R.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; SANTANA, W. A.; BRANCO, A.; SOARES, M. B. P.; VILLARREAL, C. F. Evidence for the Involvement of Descending Pain-Inhibitory Mechanisms in the Antinociceptive Effect of Hecogenin Acetate. **Journal of Natural Products**, v. 76, n. 4, p. 559-563, 2013.

GAO, Y.; JIANG, W.; DONG, C.; LI, C.; FU, X.; MIN, L.; TIAN, J.; JIN, H.; SHEN, J. Anti-inflammatory effects of sophocarpine in LPS-induced RAW 264.7 cells via NF- κ B and MAPKs signaling pathways. **Toxicology in Vitro**, v. 26, n. 1, p. 1-6, 2012

GONZALEZ, F. G.; PORTELA, T. Y.; STIPP, E. J.; DI STASI, L. C. Antiulcerogenic and analgesic effects of *Maytenus aquifolium*, *Sorocea bomplandii* and *Zolernia ilicifolia*, **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 77, n. 1, p. 41-47, 2001.

GRAHAM, T. H.; SHU, M.; VERRAS, A.; CHEN, Q.; GARCIA-CALVO, M.; LI, X.; LISNOCK, J.; TONG, X.; TUNG, E. C.; WILTSIE, J.; HALE, J. J.; PINTO, S. SHEN, D. M. Pyrazoles as non-classical bioisosteres in prolylcarboxypeptidase (PrCP) inhibitors. **Bioorganic and Medicinal Chemistry (Letters)**, v. 24, n. 7, p. 1657-1660, 2014.

GREEN, L. C.; WAGNER, D. A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P. L.; WISHNOK, J. S.; TANNENBAUM, S. R. Analysis of nitrate, nitrite, and [15 N]nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 126, n. 1, p. 131-138, 1982.

GREENHOUGH, A.; SMARTT, H. J. M.; MOORE, A. E.; ROBERTS, H. R.; WILLIAMS, A. C.; PARESKEVA, C. The COX-2/PGE 2 pathway: key roles in the hallmarks of cancer and adaptation to the tumour microenvironment. **Carcinogenesis**, v. 30, n. 3, p. 377-386, 2009.

GRIVENNIKOV, S. I.; GRETEN, F. R.; KARIN, M. Immunity, inflammation, and cancer. **Cell**, Cambridge, v. 140, n. 6, p. 883-899, 2010.

GROSSER, T.; SMYTH, M.; FITZGERALD, G. A. Agentes anti-inflamatórios, antipiréticos e analgésicos; farmacoterapia da gota. In: LAURENCE, L. B.; CHABNER, B. A.; KNOLLMAN, B. C. **As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman & Gilman**. 12. ed. New York: McGraw-Hill; Porto Alegre, Artmed, 2012. cap. 34.

GU, X.; CHEN, J.; ZHANG, Y.; GUAN, M.; LI, X.; ZHOU, Q.; SONG, Q.; QIU, J. Synthesis and assessment of phenylacrylamide derivatives as potential anti-oxidant and anti-inflammatory agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 180, p. 62-71, 2019.

GUDKOV, A. V.; KOMAROVA, E. A. p53 and the Carcinogenicity of Chronic Inflammation. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 6, a:026161, 2016.

GUIDO, R. V. C.; ANDRICOPULO, A. D; OLIVA, G. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. **Estudos avançados**, v. 24, n. 70, 2010.

HAMADA, T.; DUARTE, S.; TSUCHIHASHI, S.; BUSUTTIL, R. W.; COITO, A. J. Inducible Nitric Oxide Synthase Deficiency Impairs Matrix Metalloproteinase-9 Activity and Disrupts Leukocyte Migration in Hepatic Ischemia/Reperfusion Injury. **The American Journal of Pathology**, v. 174, n. 6, p. 2265-2277, 2009.

HARDIANTO, A.; YUSUF, M.; LIU, F.; RANGANATHAN, S. Structure-Based Drug Design Workflow. **Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology**, v. 3, p. 273-282, 2019.

HERNANDES, M. Z.; CAVALCANTI, S. M. T.; MOREIRA, D. R. M.; JUNIOR, W. F. A.; LEITE, A. C. Halogen Atoms in the Modern Medicinal Chemistry: Hints for the Drug Design. **Current Drug Targets**, v. 11, n. 3, 2010. Doi: 10.2174/138945010790711996

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

HONORIO, K. M.; MODA, T. L.; ANDRICOPULO, A. D. Pharmacokinetic properties and *in silico* ADME modeling in drug discovery. **Medicinal Chemistry**, v. 9, n. 2, p. 163-176, 2013.

HUSSEIN, S. Z.; MOHD YUSOFF, K.; MAKPOL, S.; MOHD YUSOF, Y. A. Gelam honey inhibits the production of proinflammatory mediators NO, PGE 2, TNF- α , and IL-6 in carrageenan-induced acute paw edema in rats. **Evidence-based complementary and alternative medicine**, v. 2012, 2012. Doi: <https://doi.org/10.1155/2012/109636>.

JAWORSKA, J.; JANOWSKI, T. Expression of proinflammatory cytokines IL-1 β , IL-6 and TNF α in the retained placenta of mares. **Theriogenology**, v. 126, p. 1-7, 2019.

KAMINSKA, B.; GOZDZ, A.; ZAWADZKA, M.; ELLERT MIKLASZEWSKA, A.; LIPKO, M. MAPK signal transduction underlying brain inflammation and gliosis as therapeutic target. **The anatomical Record**, v. 292, n. 12, p. 1902-1913, 2009.

KAWAKAMI, T.; KOIKE, A.; AMANO, F. Sodium bicarbonate regulates nitric oxide production in mouse macrophage cell lines stimulated with lipopolysaccharide and interferon γ . **Nitric Oxid**, v. 79, p. 45-50, 2018.

KIM, E. K.; CHOI, E. J. Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. **Biochimica et biophysica acta (BBA)- Molecular Basis of Disease**, v. 1802, n. 4, p. 396-405, 2010.

KOBAYASHI, E. H. SUZUKI, T.; FUNAYAMA, R.; NAGASHIMA, T.; HAYASHI, M.; SEKINE, H.; TANAKA, N.; MORIGUCHI, T.; MOTOHASHI, H.; NAKAYAMA, K.; YAMAMOTO, M. Nrf2 suppresses macrophage inflammatory response by blocking proinflammatory cytokine transcription. **Nature Communications**, v. 7, p. 11624, 2016.

KORHONEN, R.; LAHTI, A.; KANKAANRANTA, H.; MOILANEN, E. Nitric Oxide Production and Signaling in Inflammation. **Current Drugs Targets- Inflammation and Allergy**, v. 4, n. 4, p. 471-479, 2005.

KOTAS, M. E.; MEDZHITOV, R. Homeostasis, inflammation, and disease susceptibility. **Cell**, Cambridge, v. 160, n. 5, p. 816-827, 2015.

KUMAR, S.; S.; BEGUM, A. S.; HIRA, K.; NIAZI, S.; KUMAR, B. R. P.; ARAYA, H.; FUJIMOTO, Y. Structure-based design and synthesis of new 4-methylcoumarin-based lignans as pro-inflammatory cytokines (TNF- α , IL-6 and IL-1 β) inhibitors. **Bioorganic Chemistry**, v. 89, 2019.

KUMAR, V.; BHATT, P. C.; RAHMAN, M.; PATEL, D. K.; SETHIM N.; KUMAR, A.; LAMIE, P. F.; AZMEY, A. F. Synthesis and biological evaluation of tetrazole derivatives as

- TNF- α , IL-6 and COX-2 inhibitors with antimicrobial activity: Computational analysis, molecular modeling study and region-specific cyclization using 2D NMR tools. **Bioorganic Chemistry**, v. 92, p. 103301, 2019.
- LANGDON, S. R.; ERTL, P.; BROWN, N. Bioisosteric Replacement and Scaffold Hopping in Lead Generation and Optimization. **Molecular informatics**, v. 29, n. 5, p. 366-385, 2010.
- LAWRENCE, T. The Nuclear Factor NF- κ B Pathway in Inflammation. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 1, n. 6, a001651, 2009.
- LEE, M.; REY, K.; BESLER, K.; WANG, C.; CHOY, J. Immunobiology of nitric oxide and regulation of inducible nitric oxide synthase. **Results and Problems in Cell Differentiation**, Berlin, v. 62, p. 181-207, 2017.
- LEE, S. H.; SOHN, D. H.; JIN, . Y.; KIM, S. W.; CHOI, S. C.; SEO, G. S. 2',4',6'-Tris(methoxymethoxy) chalcone protects against trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis and blocks tumor necrosis factor- α -induced intestinal epithelial inflammation via heme oxygenase 1-dependent and independent pathways. **Biochemical Pharmacology**, v. 74, n. 6, p. 870-880, 2007.
- LEWANDOWSKA-POLAK, A.; BRAUNCAJS, M.; JARZEBSKA, M.; PAWELCZYK, M.; KUROSKI, M.; MAKOWSKA, J.; KOWALSKI, M. L. Parainfluenza virus infection enhances NSAIDs-induced inhibition of PGE2 generation and COX-2 expression in human airway epithelial cells. **Advance in Medical Science**, v. 64, n. 2, p. 339-343, 2019.
- LI, J. P. H.; KENNEDY, E. M.; ADESINA, A. A.; STOCKENHYBER, M. Mechanistic insights into the Knoevenagel condensation reaction over ZnO catalysts: Direct observation of surface intermediates using in situ FTIR. **Journal of Catalysis**, v. 369, p. 157-167, 2019.
- LI, R. J.; ZHOU, Y. ZHENG, Y.; HAI, L.; WU, Y. The synthesis and biological evaluation of unsymmetrical 2,2-di(1H-indol-3-yl)-N-phenylacetamide derivatives. **Tetrahedron Letters**, v. 57, n. 26, p. 2829-2832, 2019.
- LI, X.; LIU, J-L.; YANG, X-L.; ZHAO, T. T.; GONG, H. B.; ZHU, H. L. Synthesis, biological evaluation and molecular docking studies of 3-(1,3-diphenyl-1H-pyrazol-4-yl)-N-phenylacrylamide derivatives as inhibitors of HDAC activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 14, p. 4430-4436, 2012.
- LIANG, Y. J.; YANG, W. X. Kinesins in MAPK cascade: how kinesin motors are involved in the MAPK pathway?. **Gene**, v. 684, p. 1-9, 2019.
- LIMA, J. B. M.; VELOSO, C. C.; VILELA, F. C.; GIUSTI-PAIVA, A. Prostaglandins mediate zymosan-induced sickness behavior in mice. **The Journal of Physiological Sciences**, v. 67, n. 6, p. 673-679, 2017.
- LIMA, L. M.; BARREIRO, E. J. Beyond Bioisosterism: new concepts in Drug discovery. **Comprehensive Medicinal Chemistry III**, p. 186-210, 2017.

LIMA, M. S.; QUITANS-JUNIOR, L. J.; SANTANA, W.; KANETO, C. M.; SOARES, M. B. P.; VILLARREAL, C. F. Anti-inflammatory effects of carvacrol: Evidence for a key role of interleukin-10. **European Journal of Pharmacology**, v. 699, n. 1-3, p. 112-117, 2013.

LIU, B.; QU, L.; YAN, S. Cyclooxygenase-2 promotes tumor growth and suppresses tumor immunity. **Cancer Cell International**, v. 15, 2015. DOI 10.1186/s12935-015-0260-7.
MAHESH, R.; MUNDRA, S.; DEVADOSS, T.; KOTRA, L. Design, synthesis and evaluation of 2-(4-(substituted benzoyl)-1,4-diazepan-1-yl)-N-phenylacetamide derivatives as a new class of falcipain-2 inhibitors. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 12, n 7, p. 1436-1446, 2019.

MARCÉN, B; SOSTRES, C; LANAS, A. AINES y riesgo digestivo. **Atención Primaria**, Barcelona, v. 48, n. 2 p. 73-76, 2016.

MASEDA, D.; RICCIOTTI, E.; CROFFORD, L. J. Prostaglandin regulation of T cell biology. **Pharmacological Research**, v. 149, p. 104456, 2019.

MCMACKIN, M. Z.; LEWIN, M. R.; TABUENA, D.; R.; ARREOLA, F. E.; MOFFATT, C.; FUSE, M. Use of von Frey filaments to assess nociceptive sensitization in the hornworm, *Manduca sexta*. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 257, p. 139-146, 2016.

MEANWELL, N. A. Synopsis of Some Recent Tactical Application of Bioisosteres in Drug Design. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 54, n. 8, p. 2529-2591, 2011.

MERONI, G.; ZAMARIAN, V.; PRUSSIANI, C.; BRONZO, V.; LECCHI, C.; MARTINO, P. A.; CECILIANI, F. The bovine acute phase protein α 1-acid glycoprotein (AGP) can disrupt *Staphylococcus aureus* biofilm. **Veterinary Microbiology**, v. 235, p. 93-100, 2019.

MONTANARI, F.; ECKER, G. F. Prediction of drug-ABC-transporter interaction — Recent advances and future challenges. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 86, p. 17-26, 2015.

MONTEIRO, E. C. A.; TRINDADE, J. M. F.; DUARTE, A. 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.

MOORE, N.; DUONG, M.; GULMEZ, S. E.; BLIN, P.; DROZ, C. Pharmacoepidemiology of non-steroidal anti-inflammatory drugs. **Therapies**, v. 74, n. 2, p. 271-277, 2019.

MOREIRA, V.; GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B.; RAMIREZ VINOLO, M. A.; CURI, R.; LAMBEAU, G.; TEIXEIRA, C. 2-HETE is a regulator of PGE2 production via COX-2 expression induced by a snake venom group IIA phospholipase A2 in isolated peritoneal macrophages. **Chemico-Biological Interactions**, 2019. Doi: <https://doi.org/10.1016/J.CBI.2019.108903>.

MORTAZ, E.; ADCOCK, I. M.; TABARSI, P.; DARAZAM, I. A.; MOVASSAGHI, M.; GARSSEN, J.; JAMAATI, H.; VELAYATI, A. Pattern recognitions receptors in immunodeficiency disorders. **European Journal of Pharmacology**, v. 808, p. 49-56, 2017.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MUKHAMETOV, A.; RAEVSKY, O. A. On the mechanism of substrate/non-substrate recognition by P-glycoprotein. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 71, p. 227-232, 2017.

MURAHARI, M.; MAHAJAN, V.; NEELADRI, S.; KUMAR, M. S.; MAYUR, Y. C. Ligand based design and synthesis of pyrazole based derivatives as selective COX-2 inhibitors. **Bioorganic Chemistry**, v. 86, p. 583-597, 2019.

MURAKAMI, M.; HIRANO, T. The molecular mechanisms of chronic inflammation development. **Frontiers in Immunology**, v. 3, n. 323, 2012. Doi: 10.3389/fimmu.2012.00323.

MURRAY, P. J. The JAK-STAT Signaling Pathway: Input and Output Integration. **The Journal of Immunology**, v. 178, n. 5, p. 2623-2629, 2007.

OCDE GUIDELINE for testing of chemicals: acute oral toxicity: acute toxic class method. [S.l.], 2001. (OECD/OCDE, 423 Adopted: 17th December 2001). Disponível em: <https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-423-acute-oral-toxicity-acute-toxic-class-method_9789264071001-en>. Acesso em: 26 jun. 2019.

OKSUZ, E.; ATALAR, F.; TANIVERDI, G.; BILIR, A.; SHAHZADI, A.; YAZICI, Z. Therapeutic potential of cyclooxygenase-3 inhibitors in the management of glioblastoma. **Journal of Neuro Oncology**, v. 125, n. 2, p. 271-278, 2016.

OPRETZKA, L. C. F.; DO ESPÍRITO-SANTO, R. F.; NASCIMENTO, O. A.; ABREU, L. S.; ALVES, I. M.; DÖRING, E.; SOARES, M. B. P.; VELOZO, E. DA S.; LAUFER, S. A.; VILLARREAL, C. F. Natural chromones as potential anti-inflammatory agents: Pharmacological properties and related mechanisms. **International Immunopharmacology**, v. 72, p. 31-39, 2009.

ORDUÑA-VALLS, J. M.; NEBREDÁ-CLAVO, C. L.; LÓPEZ, P. TORRES-RODRÍGUEZ, D.; QUINTANS-RODRIGUÉZ, M; ÁLVAREZ-ESCUADERO, J. Características de los corticoides particulados y no particulados. Condicionantes para su uso en el tratamiento del dolor crónico. **Revista Española de Anestesiología y Reanimación**, v. 63, n. 6, p. 333-346, 2016.

O'SHEA, J. J.; PLENGE, R. JAK and STAT Signaling Molecules in Immunoregulation and Immune-Mediated Disease. **Immunity**, v. 36, n. 4, p. 542-550, 2012.

OU, Z.; ZHAO, J.; ZHU, L; HUANG, L.; MA, Y.; MA, C.; LUO, C.; ZHU, Z.; YUAN, Z.; WU, J.; LI, R.; YI, J. Anti-inflammatory effect and potential mechanism of betulinic acid on λ -carrageenan-induced paw edema in mice. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 118, 2019. Doi: <https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2019.109347>.

PANNEERSELVAM, S.; YESUDHAS, D.; DURAI, P.; ANWAR, M. A.; GOSU, V.; CHOI, S. A Combined Molecular Docking/Dynamics Approach to Probe the Binding Mode of Cancer Drugs with Cytochrome P450 3A4. **Molecules**, p. 20, n. 8, p. 14914- 14935, 2015.

PAPAIOANNOU, A.; SPATHIS, A.; KOSTIKAS, K.; KARAKITSOS, P.; PAPIRIS, S.; ROSSIOS, C. The role of endosomal toll-like receptors in asthma. **European Journal of Pharmacology**, v. 808, p. 14-21, 2017.

PARK, B. K.; KITTERINGHAM, N. R.; O'NEILL, P. M. Metabolism of Fluorine-Containing Drugs. *Annual Review of pharmacology and toxicology*, v. 41, p. 443-470, 2001.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S. **Introdução a Espectroscopia**. 4ª Edição, CENGAGE, 2010.

PETER LIBBY, M. D. Inflammatory mechanisms: the molecular basis of inflammation and disease. **Nutrition Reviews**, v. 65, n. 12, S140-S146, 2007. Supplement 2.

PIHL, T. H.; ANDERSEN, P. H.; KJELGAARD-HANSEN, M.; MORCK, N. B. Serum amyloid A and haptoglobin concentrations in serum and peritoneal fluid of healthy horses and horses with acute abdominal pain. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 12, n. 2, p. 177-183, 2013.

PLOTNIKOV, A.; ZEHORAI, E.; PROCACCIA, S.; SEGER, R. The MAPK cascades: signaling components, nuclear roles and mechanisms of nuclear translocation. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1813, n. 9, p. 1619-1633, 2011.

PLOWRIGHT, A. T.; OTTMANN, C.; ARKIN, M.; AUBERSON, Y. P. TIMMERMAN, H.; WALDMANN, H. *Joining Forces: The Chemical Biology–Medicinal Chemistry Continuum*. **Cell Chemical Biology**, v. 24, n. 9, p. 1058-1065, 2017.

QUI, F.; LIU, M.; ZHANG, Y.; LIU, W.; XIAO, H.; LUO, B. EBV down-regulates COX-2 expression via TRAF2 and ERK signal pathway in EBV-associated gastric cancer. **Virus Research**, v. 272, p. 197735, 2019.

RAMPERSAD, S. N. Multiple applications of alamar blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. **Sensors**, v. 12, n. 9, p. 12347-12360, 2012.

RODRÍGUEZ, M.; MÁRQUEZ, S.; MONTERO, O.; ALONSO, S.; FRADE, J. G.; CRESPO, M. S.; FERNÁNDEZ, N. Pharmacological inhibition of eicosanoids and platelet-activating factor signaling impairs zymosan-induced release of IL-23 by dendritic cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 102, p. 78-96, 2016.

ROSA, F.; NÉGRIER, P.; CORVIS, Y.; ESPEAU, P. Crystal structure determination and thermal behavior upon melting of p-synephrine. **Thermochimica Acta**, v. 632, p. 18-22, 2016.

RUAN, Z.; WAN, Z.; YANG, L.; LI, W.; WANG, Q. JAK/STAT signalling regulates antimicrobial activities in *Eriocheir sinensis*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 84, p. 451-501, 2019.

RYCKMANS, T.; EDWARDS, M. P.; HORNE, V. A.; CORREIA, A. M.; OWEN, D. R.; THOMPSON, L. R.; TRAN, I.; TUTT, M. F.; YOUNG, T. Rapid assessment of a novel series of selective CB2 agonists using parallel synthesis protocols: A Lipophilic Efficiency (LipE) analysis. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 19, n. 15, p. 4406-4409, 2009.

- SACHAN, N. K.; KAITHWAS, G. Melastoma malabathricum Linn attenuates complete Freund's adjuvant-induced chronic inflammation in Wistar rats via inflammation response. **BMC Complementary e Alternative Medicine**, v. 16, 2016. Doi: 10.1186/s12906-016-1470-9
- SANDILANDS, E. A.; BATEMAN, D. N. Non-steroidal anti-inflammatory drugs. **Medicine**, v. 44, n. 3, p. 185-186, 2016.
- SANTOS, D. S.; MARTA, I. E. R.; CÁRNIO, E. C.; QUADROS, A. U.; CUNHA, T. M.; CARVALHO, E. C. Utilização de um modelo experimental para estudo sobre o toque terapêutico. **Revista Latino Americana de Enfermagem**, v. 21, n. 1, 8 telas, 2013.
- SEDGWICK, D. M.; ROMÁN, R.; BARRIO, P.; TRABANCO, A. A.; FUSTERO, S. Biorelevant fluorine-containing N-heterocycles. **Fluorine in Life Sciences: Pharmaceuticals, Medicinal Diagnostics, and Agrochemicals**, p. 575-606, 2019.
- SERAFIM, R. A. M.; GONÇALVES, J. E.; SOUZA, F. P.; LOUREIRO, A. P. M.; STORPIRTIS, S.; KROGH, R.; ANDRICOPULO, A. D.; DIAS, L. C.; FERREIRA, E. I. Design, synthesis and biological evaluation of hybrid bioisoster derivatives of N-acylhydrazone and furoxan groups with potential and selective anti-Trypanosoma cruzi activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 82, n. 23, p. 418-425, 2014.
- SHAH, P.; WESTWELL, A. D. The role of fluorine in medicinal chemistry. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 22, n. 5, p. 527-540, 2007.
- SILVA, J. M. Planejamento e desenvolvimento de novos derivados acridínicos, quinolínicos, indólicos e piridínicos com potencial atividade antitumoral. 2018. 221f. Dissertação (Mestrado em Química) –Centro de Ciências e Tecnologia, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2016.
- SILVA, P. R. Avaliação da atividade anti-inflamatória e toxicológica de um derivado n-acilhidrazônico. 2017. 45f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2017.
- SILVERMAN, R. B.; HOLLADAY, M. W. Lead Discovery and Lead Modification. **The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action (Third Edition)**, p. 19-122, 2014.
- SOYER, Z.; KILIÇ, F. S.; EROL, K.; PABUÇCUOĞLU, V. Synthesis and anticonvulsant activity of some ω -(1H-imidazol-1-yl)-N-phenylacetamide and propionamide derivatives. **II farmaco**, v. 59, n. 8, p. 595-600, 2004.
- STROPPA, P. H.; ANTINARELLI, L. M. R.; CARMO, A. M. L.; GAMEIRO, J.; COIMBRA, E. S.; SILVA, A. D. Effect of 1,2,3-triazole salts, non-classical bioisosteres of miltefosine, on Leishmania amazonensis. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 25, n. 12, p. 3034-3045, 2017.
- SURESH, A.; REDDY, I. J.; MISHRA, A.; MONDAL, S. Suppression of COX-2 mRNA abundance in in vitro cultured goat (Capra hircus) endometrial cells by RNA interference and effect on PGF2- α and PGE2 concentrations. **Animal reproduction Science**, v. 209, 2019. Doi: <https://doi.org/10.1016/J.ANIREPROSCI.2019.106146>

SWALLOW, S. Fluorine in Medicinal Chemistry. **Progress in Medicinal Chemistry**, v. 54, p. 65-133, 2015.

ŚWIATEK, P.; STRZELECKA, M.; URNIAZ, R.; GEB CZAK, K.; GEBAROWSKI, T.; GASIOROWSKI, K.; MALINKA, W. Synthesis, COX-1/2 inhibition activities and molecular docking study of isothiazolopyridine derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 25, n. 1, p. 316-326, 2017.

TAGHAVI, M.; KHOSRAVI, A.; MORTAZ, E.; NIKAEIN, D.; ATHARI, S. S. Role of pathogen-associated molecular patterns (PAMPS) in immuneresponses to fungal infections. **European Journal of Pharmacology**, v. 880, p. 8-13, 2017.

TAKAHASHI, M.; IZAWA, K.; URAI, M.; YAMANISHI, Y.; MAEHARA, A.; ISOBE, M.; MATSUKAWA, T.; KAITNI, A.; TAKAMORI, A.; UCHIDA, S.; YAMADA, H.; NAGAMINE, M.; ANDO, T.; SHIMIZU, T.; OGAWA, H.; OKUMURA, K.; KINJO, Y.; KITAURA, J. The phytosphingosine-CD300b interaction promotes zymosan-induced, nitric oxide-dependent neutrophil recruitment. **Science Signaling**, v. 12, n. 564, 2019.

TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. **Cell**, v. 140, n.6, p. 805-820, 2010.

TANIGUCHI, K.; KARIN, M. NF- κ B, inflammation, immunity and cancer: coming of age. **Nature Reviews Immunology**, v. 18, p. 309-324, 2018.

TANIYA, T.; KASHIWAGI, I.; TAKAHASHI, R.; YASUKAWA, H.; YOSHIMURA, A. Suppressors of Cytokine Signaling (SOCS) Proteins and JAK/STAT Pathways: Regulation of T-Cell Inflammation by SOCS1 and SOCS3. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 31, n. 5, 2011.

TIWARI, S. K.; SHAIK, A. S.; SHAIK, A. P.; ALYOUSEF, A. A.; BARDIA, A.; HEBEED, A.; KHAN, A. A. Gene expression patterns of COX-1, COX-2 and iNOS in H. Pylori infected histopathological conditions. **Microbial Pathogenesis**, v. 135, p. 103634, 2019.

TRESADERN, G.; ROMBOUTS, F. J. R.; OEHLRICH, D.; MACDONALD, G.; TRABANCO, A. A. Industrial medicinal chemistry insights: neuroscience hit generation at Janssen. **Drugs Discovery Today**, v. 22, n. 10, p. 1478-1488, 2017.

TURNER, M. D.; NEDJAI, B.; HUST, T.; PENNINGTON, D. J. Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1843, n. 11, p. 2563-2582, 2014.

UPADHYAY, R. K. Drug delivery systems, CNS protection, and the blood brain barrier. **Bio-Med Research International**, v. 2014, p. 869269 – 869305, 2014. Doi:10.1155/2014/869269.

VALDENNAIRE, A.; POTHIER, J.; RENNEBERG, D.; RIEDERER, M. A.; PETER, O.; LEROY, X.; GNERRE, C.; FRETZ, H. Evolution of novel tricyclic CRTh2 receptor antagonists from a (E)-2-cyano-3-(1H-indol-3-yl)acrylamide scaffold. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 23, n. 4, p. 944-948, 2013.

VANNINI, F.; KASHFI, K.; NATH, N. The dual role of iNOS in cancer. **Redox Biology**, v. 6, p. 344-343, 2015.

VIEGAS-JUNIOR, C.; DANUELLO, A.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. Molecular Hybridization: A Useful Tool in the Design of New Drug Prototypes. **Current Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 17, p. 1829-1852, 2007.

VIEIRA, L.; SALDANHA, A. A.; MORAES, A. M.; OLIEIRA, F. M.; LOPES, D. O.; BARBOSA, L. A. O.; RIBEIRO, R. I. M. A.; THOME, R. L.; SANTOS, H. B.; VILLAR, J. A. F.; SOARES, A. C. 21-Benzylidene digoxin, a novel digoxin hemi-synthetic derivative, presents an anti-inflammatory activity through inhibition of edema, tumour necrosis factor alpha production, inducible nitric oxide synthase expression and leucocyte migration. **International Immunopharmacology**, v. 65, p. 174-181, 2019.

WACH, A.; DROZDEK, M.; DUDEK, B.; SZNELER, E.; KUSTROWSKI, P. Control of amine functionality distribution in polyvinylamine/SBA-15 hybrid catalysts for Knoevenagel condensation. **Catalysis Communications**, v. 54, p. 52-57, 2015.

WALSH, M. C.; LEE, J. E.; CHOI, Y. Tumor necrosis factor receptor associated factor 6 (TRAF6) regulation of development, function, and homeostasis of the immune system. **Immunological reviews**, v. 266, n.1, p. 72-92, 2016.

WANG, D.; HAILE, A.; JONES, L. C. Dexamethasone-induced lipolysis increases the adverse effect of adipocytes on osteoblasts using cells derived from human mesenchymal stem cells. **Bone**, v. 53, n. 2, p. 520-530.

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

WANG, L.; YU, K.; ZHANG, X.; YU, S. Dual functional roles of the MyD88 signaling in colorectal cancer development. **Biomedicine e Pharmacotherapy**, v. 107, p. 177-184, 2018.

WANG, T.; LUO, S.; QIN, H.; XIA, Y. Hsp90 inhibition renders iNOS aggregation and the clearance of iNOS aggregates by proteasomes requires SPSB2. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 117, p. 90-98, 2018.

WARING, M. Lipophilicity in drug discovery. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 5, n. 3, p. 235-248, 2010.

WERMITH, C. G.; CIAPETTI, P.; GIETHLEN, B.; BAZZINI, P. Bioisosterism. **Comprehensive Medicinal Chemistry II**, v. 2, p. 649-711, 2007.

WU, J-J.; YUAN, X-M.; HUANG, C.; AN, G-Y.; LIAO, Z-L.; LIU, G-A.; CHEN, R-X. Farnesyl thiosalicylic acid prevents iNOS induction triggered by lipopolysaccharide via suppression of iNOS mRNA transcription in murine macrophages. **International Immunopharmacology**, v. 68, p. 218-225, 2019.

XING, L.; HONDA, T.; FITZ, L.; OJIMA, I. Case studies of fluorine in drug discovery. Fluorine in Life Sciences: Pharmaceuticals, Medicinal Diagnostics, and Agrochemicals, p. 181-211, 2019.

YANG, L.; MA, X.; YUAN, C.; HE, Y.; LI, L.; FANG, S.; XIA, W.; HE, T.; QUIAN, S.; XU, Z.; LI, G.; WANG, Z. Discovery of 2-((4,6-dimethylpyrimidin-2-yl)thio)-N-phenylacetamide derivatives as new potent and selective human sirtuin 2 inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 134, p. 230-241, 2017.

YANG, P. M.; WU, Z. Z.; ZHANG, Y. Q.; WUNG, B. S. Lycopene inhibits ICAM-1 expression and NF- κ B activation by Nrf2-regulated cell redox state in human retinal pigment epithelial cells. **Life Sciences**, v. 155, p. 94-101, 2016.

ZANGARO, G. A. C.; CARVALHO, A. C. S.; EKAWA, B.; DO NASCIMENTO, A. L. C. S.; NUNES, W. D. G.; FERNANDES, R. P.; PARKES, G. M. B.; ASHTON, G. P.; LONASHIRO, M.; CAIRES, F. J. Study of the thermal behavior in oxidative and pyrolysis conditions of some transition metals complexes with Lornoxicam as ligand using the techniques: TG-DSC, DSC, HSM and EGA (TG-FTIR and HSM-MS). **Thermochimica Acta**, v. 681, 2019.

ZARETZKI, J.; MATLOCK, M.; SWAMIDASS, S. J. XenoSite: accurately predicting CYP-mediated sites of metabolism with neural networks. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 5, n. 12, p. 3373-3383, 2013.

ZEESHAN, M.; FERGUSON, D. J. P.; ABEL, S.; BURRELL, A.; REA, E.; BRADY, D.; DANIEL, E.; DELVES, M.; VAUGHAN, S.; HOLDER, A.A.; LE ROCH, K. G.; MOORES, C. A.; TEWARI, R. Kinesin-8B controls basal body function and flagellum formation and is key to malaria transmission. **Life Science Alliance**, v. 2, n. 4, p. 1-13, 2019.

ZHANG, S.; ZHANG, J.; GAO, P.; SUN, L.; SONG, Y.; KANG, D.; LIU, X.; ZHAN, P. Efficient drug discovery by rational lead hybridization based on crystallographic overlay. **Drug Discovery Today**, v. 24, n. 3, p. 805-813, 2019.

ZHOU, S. F. Drugs Behave as Substrates, Inhibitors and Inducers of Human Cytochrome P450 3A4. **Current Drug Metabolism**, v. 9, n. 4, 2008.

ZHOU, Y.; HONG, Y.; HUANG, H. Triptolide attenuates inflammatory response in membranous glomerulo nephritis rat via down regulation of NF- κ B signaling pathway. **Kidney e Blood Pressure Research**, v.41, p. 901-910, 2016.

ZHOU, Y.; PENG, Z.; SEVEN, E. S.; LEBLANC, R. M. Crossing the blood-brain barrier with nanoparticles. **Journal of Controlled Release**, v. 270, p. 290-303, 2018.

ZHU, L.; GU, P. Q.; SHEN, H. Gallic acid improved inflammation via NF- κ B pathway in TNBS-induced ulcerative colitis. **International Immunopharmacology**, v. 67, p. 129-137, 2019.

ANEXO A

1. Protocolo utilizado na triagem farmacológica comportamental

Atividade farmacológica	Quantificação dos efeitos (0) sem efeito, (-) efeito diminuído, (+) efeito presente, (++) efeito intenso				
	até 30'	1 h	2 h	3 h	4 h
1 – SNC					
a – Estimulante					
Hiperatividade					
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					
Estereotípiã					
2 - SN AUTÔNOMO					
Diarréia					
Constipação					
Defecação aumentada					
Respiração forçada					
Lacrimejamento					
Micção					
Salivação					
Cianose					
Tono muscular					
Força para agarrar					
3 – MORTE					
Observações complementares:					

Fonte: Almeida et al. (1999).