



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE)
REDE NORDESTE BIOTECNOLOGIA (RENORBIO)
LABORATÓRIO DE QUÍMICA E INOVAÇÃO TERAPÊUTICA (LQIT)

ANA DAURA TRAVASSOS DE OLIVEIRA MORAES

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-
INFLAMATÓRIA DE INÉDITOS DERIVADOS INDOL-N-ACILHIDRAZÔNICOS**

Recife

2018

ANA DAURA TRAVASSOS DE OLIVEIRA MORAES

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-
INFLAMATÓRIA DE INÉDITOS DERIVADOS INDOL-N-ACILHIDRAZÔNICOS**

Tese submetida ao programa de pós-graduação RENORBIO (Rede Nordeste de Biotecnologia), como requisito para o recebimento do Título de Doutora em Biotecnologia pela UFPE.

Área de Concentração: Biotecnologia em Saúde

Orientadora: Prof^a. Dra. Maria do Carmo Alves de Lima

Coorientador: Dr. Diogo Rodrigo de Magalhães Moreira

Recife,
2018

Catálogo na fonte:

Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia - CRB-4/1788

Moraes, Ana Daura Travassos de Oliveira

Síntese, caracterização e avaliação da atividade anti-inflamatória de inéditos derivados Indol-*N*-Acilhidrazônicos / Ana Daura Travassos de Oliveira Moraes. – 2018.

122 f. : il.

Orientadora: Prof^a. Dra. Maria do Carmo Alves de Lima.

Coorientador: Dr. Diogo Rodrigo de Magalhães Moreira.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação RENORBIO, Recife, 2018. Inclui referências e apêndices.

1. Farmacologia 2. Inflamação 3. N-acilhidrazonas. I. Lima, Maria do Carmo Alves de (Orientadora). II. Moreira, Diogo Rodrigo de Magalhães (Coorientador). III. Título.

615.1

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2018 – 431

ANA DAURA TRAVASSOS DE OLIVEIRA MORAES

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-
INFLAMATÓRIA DE INÉDITOS DERIVADOS INDOL-N-ACILHIDRAZÔNICOS**

Tese apresentada ao programa de pós-graduação em Biotecnologia, Área de Concentração Biotecnologia em Saúde, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do Título de Doutora em Biotecnologia pela UFPE.

Aprovada em: 17/07/2018

BANCA EXAMINADORA

Dra. Maria do Carmo Alves de Lima
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Ricardo Olímpio de Moura
Universidade Estadual da Paraíba

Dr. Tiago Bento de Oliveira
Instituto Federal de Alagoas

Dr. Jamerson Ferreira de Oliveira
Universidade Federal de Pernambuco

Aos meus pais, Inaldo N. O. Filho e Lúcia
Valéria T. de Oliveira, pelo apoio
incondicional e conselhos que me ajudam a
seguir atingindo meus objetivos. Amo vocês!

Ao meu marido, Paulo André T. M. Gomes,
por todo o amor e companheirismo que têm
me transformado, a cada dia, em uma
pessoa melhor. Te amo muito!

À minha filha, Aurora Travassos de Moraes,
que desde sua chegada tem me provado
que a felicidade está nas coisas mais
simples da vida.

Amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus. Essa energia que perpassa e constitui todo o Universo. Que está presente em tudo. Por me guiar pelo melhor caminho ao longo de toda minha jornada.

À minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Maria do Carmo (Nena), pelo apoio, carinho e respeito que dedica a todos os integrantes do LQIT e por ter me acolhido em sua equipe desde 2014, me concedendo diversas oportunidades para evoluir no meio acadêmico.

Ao meu coorientador, Dr. Diogo Moreira, que tem me apoiado desde a época do meu mestrado na elaboração de projetos e artigos, e que contribuiu fortemente para esse projeto na realização da análise cristalográfica e dos testes *in vitro*.

A todos os integrantes do LQIT, por esse período de convivência, repleto de brincadeiras, conselhos e apoio. Em especial a Íris e Mirelly, que colaboraram bastante na realização dos testes *in vivo*. Também a Jamerson que me apoiou no desenrolar da síntese dos compostos e a Cezar que me ajudou na elucidação espectroscópica.

À FACEPE, pela concessão da bolsa de doutorado.

À Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO).

Aos meus amigos do Terapia em Grupo (Arsênio, Lucianna e Miria), que seguem acompanhando minhas dificuldades e conquistas, sempre com conselhos e palavras de apoio.

Aos meus familiares mais próximos, que sempre me apoiaram nas diversas etapas da minha vida e que fizeram e fazem parte da formação do meu caráter. Principalmente aos meus pais (Inaldo e Valéria), por estarem sempre ao meu lado servindo de base para os meus passos e por terem sempre acreditado nos meus sonhos.

Ao meu marido (Paulo André), por ser meu companheiro nos bons e nos maus momentos, inclusive pela sua enorme paciência nos momentos difíceis. Pelo amor e por toda a felicidade que nos permitimos viver. Por todos os momentos de aprendizado e diversão.

Por toda luz e felicidade que a chegada de nossa filha (Aurora) trouxe para nossas vidas.

“Quem observa o faz de um certo ponto de vista, o que não situa o observador em erro. O erro na verdade não é ter um certo ponto de vista, mas absolutizá-lo e desconhecer que, mesmo do acerto de seu ponto de vista é possível que a razão ética nem sempre esteja com ele”.

(Paulo Freire, 1996, p. 09)

RESUMO

A inflamação é uma resposta fisiológica a lesões e agentes infecciosos, que desencadeiam uma série de sinalizações intracelulares. Muitas doenças estão associadas a um processo inflamatório e o uso de anti-inflamatórios é comum nas mais diversas situações em que a inflamação está envolvida, com o objetivo principal de prevenir lesões de tecidos saudáveis. No entanto, muitos efeitos adversos têm sido associados ao uso dos medicamentos disponíveis. Desta forma, o desenvolvimento de novos fármacos se torna necessário. Nesse sentido, as *N*-acilhidrazonas e os indóis destacam-se como estruturas privilegiadas que atuam em vários pontos da cascata da inflamação, reduzindo a exacerbação da resposta inflamatória. Neste trabalho são apresentados a síntese, a caracterização e a avaliação do potencial anti-inflamatório *in vitro*, *in vivo* e *in silico* de novos derivados indol-*N*-acilhidrazônicos. Foram sintetizadas 10 novas estruturas (LQIT-D.T.01-10), com rendimentos de reação satisfatórios, obtidos através da reação de condensação. Estudos *in vitro* revelaram a ausência de citotoxicidade dos compostos contra macrófagos da linhagem J774. No teste de linfoproliferação o LQIT-D.T.01 e LQIT-D.T.02 mostraram inibição da proliferação de linfócitos de 62,7% ($\pm$ 3,5) e 50,7% ($\pm$ 2), respectivamente. Os resultados dos ensaios de inibição da COX mostraram que o composto LQIT-D.T.02 é um inibidor seletivo para a COX-2 em comparação ao LQIT-D.T.01. Os resultados do docking molecular sugerem que os compostos LQIT-D.T.01 e LQIT-D.T.02 interagem com o sítio ativo da COX-1 em diferentes conformações. Os ensaios de inflamação aguda *in vivo* foram adotados para a confirmação da atividade anti-inflamatória. O composto LQIT-D.T.02 apresentou melhores resultados na supressão do edema em todas as concentrações testadas e foi capaz de induzir uma inibição do edema de 100% após 5 horas de injeção de carragenina na dose de 30 mg.kg⁻¹. Além dos resultados experimentais, análises *in silico* sugerem que os compostos LQIT-D.T.01 e LQIT-D.T.02 apresentam um perfil bem equilibrado entre farmacodinâmica e farmacocinética. Assim, nossos resultados preliminares revelaram a potencialidade da LQIT-D.T.02 como um novo derivado seletivo da COX-2 na modulação do processo inflamatório.

Palavras-chave: Inflamação. Indóis. *N*-acilhidrazonas. Linfoproliferação. COX.

ABSTRACT

Inflammation is a physiological response from lesions and infectious agents, which trigger a series of intracellular signalling. Many diseases are associated with an inflammatory process and the use of anti-inflammatories is common for the most diverse situations in which inflammation is involved with the main purpose of prevent healthy tissue lesions. However, many adverse effects have been associated with the use of the available drugs. In this way, the development of new drugs becomes emerging. In this sense, *N*-acylhydrazones and indoles stand out as privileged structures acting at various points in the inflammation cascade, reducing the exacerbation of the inflammatory response. This work shows the synthesis, characterization and evaluation of anti-inflammatory *in vitro*, *in vivo* and *in silico* potential of novel indole-*N*-acylhydrazone derivatives. Ten new structures (LQIT-D.T.01 - 10) were synthesized, with satisfactory reaction yields obtained through the condensation reaction. *In vitro* studies have revealed the absence of cytotoxicity of compounds against macrophages of the J774 line. The lymphoproliferation assay LQIT-D.T.01 and LQIT-D.T.02 showed inhibition of lymphocyte proliferation of 62.7% (± 3.5) and 50.7% (± 2), respectively, when compared to dexamethasone that showed inactivation of 74.6% (± 2.4). The results of the COX inhibition assays showed that compound LQIT-D.T.02 is a selective inhibitor for COX-2 compared to LQIT-D.T.01. The molecular docking results suggest compounds LQIT-D.T.01 and LQIT-D.T.02 interact with the active site of COX-1 in different conformations. *In vivo* acute inflammation assays were adopted for the confirmation of the anti-inflammatory activity. Compound LQIT-D.T.02 showed better results in suppressing edema at all tested concentrations and was able to induce an edema inhibition of 100% after 5 hours of carrageenan injection at the 30 mg kg⁻¹ dosage. In addition to experimental results, *in silico* analysis suggest that compounds LQIT-D.T.01 and LQIT-D.T.02 present a well-balanced profile between pharmacodynamics and pharmacokinetics. Thus, our preliminary results revealed the potentiality of LQIT-D.T.02 as a new COX-2 selective derivative in the modulation of the inflammatory process.

Keywords: Inflammation. Indoles. *N*-acylhydrazones. Lymphoproliferation. COX.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HPETE	5-Hidroperoxieicosatetraenóico;
5-LOX	5-Lipoxigenase;
AA	Ácido araquidônico;
AAS	Ácido acetilsalicílico;
AcOH	Ácido acético;
ADP	Adenosina difosfato;
AINE	Anti-inflamatório não esteroideal;
CCD	Cromatografia em camada delgada;
CD4	Cluster de diferenciação 4;
CD8	Cluster de diferenciação 8;
CO₂	Dióxido de Carbono;
COX	Cicloxigenase;
FcεRI	Receptor de Imunoglobulina E de alta afinidade;
GM-CSF	<i>Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor</i> (Fator estimulante de colônias de granulócitos-macrófagos);
DMEM	Meio <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> ;
DMSO	Dimetilsulfóxido;
DMSO-<i>d</i>⁶	Dimetilsulfóxido deuterado;
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i> (Vírus da Imunodeficiência Humana);
IC₅₀	Concentração inibitória para 50%;
IFN-γ	Interferon gama;
IgE	Imunoglobulina E;
IL	Interleucina;
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i> (União Internacional de Química Pura e Aplicada);
IV	Infravermelho;
LOX	Lipoxigenase;
LT	Leucotrieno;
LTA4	Leucotrieno A4;
LTB4	Leucotrieno B4;

LTC4	Leucotrieno C4;
LTD4	Leucotrieno D4;
LTE4	Leucotrieno E4;
MBL	<i>Mannose-binding lectin</i> (Lectinas ligadoras de manose);
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i> (Complexo de histocompatibilidade principal);
MIP	<i>Macrophage Inflammatory Protein</i> (Proteína inflamatória de macrófago);
MPO	Mieloperoxidase;
NK	<i>Natural Killer</i>
NO	<i>Nitric oxide</i> (Óxido nítrico);
NOS	<i>Nitric oxide synthases</i> (Óxido nítrico sintase);
OCDE	Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico.
PAF	<i>Platelet-activating factor</i> (Fator de agregação plaquetária);
PF	Ponto de fusão;
PG	Prostaglandina;
PGD2	Prostaglandina D2;
PGE2	Prostaglandina E2;
PGF2	Prostaglandina F2;
PGH2	Prostaglandina H2;
PGI2	Prostaciclina;
PLA2	Fosfolipase A2;
PMNs	Polimorfonucleares;
R_f	Fator de retenção;
RMN C¹³	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono;
RMN H¹	Ressonância Magnética Nuclear de Prótons;
RPMI	Meio <i>Roswell Park Memorial Institute</i> ;
TMS	Trimetilsilano;
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i> (Fator de necrose tumoral);
TX	Tromboxano;
TXA2	Tromboxano A2;
TXB2	Tromboxano B2;
UV	Ultravioleta.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01 -	Exemplos de <i>N</i> -acilhidrazonas com diferentes atividades farmacológicas e mecanismos de ação.....	18
Figura 02 -	Representação das atividades biológicas do núcleo indol.....	19
Figura 03 -	Visão geral da inflamação.....	22
Figura 04 -	Cascata simplificada do AA mostrando seus metabólitos ou eicosanoides e suas funções fisiológicas.....	25
Figura 05 -	Inibidores não seletivos da COX com ação predominante sobre a COX-1.....	29
Figura 06 -	Estruturas químicas de alguns inibidores seletivos da COX-2.....	30
Figura 07 -	Estrutura básica da função <i>N</i> -acilhidrazona.....	33
Figura 08 -	Séries A, B e C de acilhidrazonas com atividade antibacteriana...	33
Figura 09 -	Estrutura geral das <i>N</i> -acilhidrazonas com atividade antifúngica...	34
Figura 10 -	Estrutura geral dos derivados <i>N</i> -acilhidrazônicos testados em três linhagens de células tumorais.....	35
Figura 11 -	Variações estruturais dos 20 compostos <i>N</i> -acilhidrazônicos testados frente a diferentes tipos de inflamação.....	36
Figura 12 -	Estrutura geral da série de 15 derivados do radical indol com atividades anticâncer e anti-inflamatória.....	37
Esquema 01 -	Síntese das indol- <i>N</i> -acilhidrazonas LQIT-D.T.(01-10).....	51
Esquema 02 -	Mecanismo reacional da série de compostos indólicos- <i>N</i> -acilhidrazônicos LQIT-D.T.01-10.....	52
Figura 13 -	Espectro de infravermelho da molécula LQIT-D.T.02.....	53
Figura 14 -	Espectro de RMN ¹ H do composto LQIT-D.T.02.....	54
Figura 15 -	Porção ampliada do espectro de RMN ¹ H do composto LQIT-D.T.02.....	55
Figura 16 -	Porção ampliada do espectro de RMN ¹ H do composto LQIT-D.T.02.....	55
Figura 17 -	Porção ampliada do espectro de RMN ¹ H do composto LQIT-D.T.02.....	56

Figura 18 -	Porção ampliada do espectro de RMN ^1H do composto LQIT-D.T.02.....	57
Figura 19 -	Espectro de DEPT do composto LQIT-D.T.02.....	58
Figura 20 -	Espectro de RMN ^{13}C do composto LQIT-D.T.02.....	58
Figura 21 -	Porção ampliada do espectro de RMN ^{13}C do composto LQIT-D.T.02.....	59
Figura 22 -	Porção ampliada do espectro de RMN ^{13}C do composto LQIT-D.T.02.....	60
Figura 23 -	Porção ampliada do espectro de RMN ^{13}C do composto LQIT-D.T.02.....	60
Figura 24 -	(A) Representações dos diastereoisômeros da indol- <i>N</i> -acilhidrazona LQIT-D.T.02. (B) Diagramas do tipo ORTEP-3 apresentando a numeração dos átomos do composto LQIT-D.T.02.....	61
Figure 25 -	Modos de ligação dos compostos ancorados nos sítios ativos de COX-1 e COX-2.....	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 -	Concentração citotóxica para 50% das células J774 dos derivados indólicos- <i>N</i> -acilhidrazônicos (LQIT - D.T.01-10).....	63
Tabela 02 -	Atividade inibitória dos novos derivados indólicos- <i>N</i> -acilhidrazônicos testados em ensaio de linfoproliferação.....	64
Tabela 03 -	Efeito anti-inflamatório do composto LQIT-D.T.01 após a indução pelo agente flogístico carragenina.....	66
Tabela 04 -	Efeito anti-inflamatório do composto LQIT-D.T.02 após a indução pelo agente flogístico carragenina.....	66
Tabela 05 -	Inibição <i>in vitro</i> de COX-1 e COX-2 e IS para COX-2 de novos derivados indol- <i>N</i> -acilhidrazona (LQIT-D.T.01 e LQIT-D.T.02)....	68
Tabela 06 -	Dados farmacocinéticos <i>in silico</i>	71

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
1.1	OBJETIVOS.....	19
1.1.1	Objetivo Geral.....	19
1.1.2	Objetivos Específicos.....	20
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	21
2.1	FISIOLOGIA DA INFLAMAÇÃO.....	21
2.2	MEDIADORES DO PROCESSO INFLAMATÓRIO.....	23
2.2.1	A via do Ácido Araquidônico (AA).....	23
2.3	TRATAMENTOS DISPONÍVEIS NO COMBATE A INFLAMAÇÃO..	27
2.3.1	Inibidores da Via das Cicloxigenases (COXs).....	27
2.3.2	Anti-inflamatórios Hormonais: Glicocorticoides.....	31
2.4	BUSCA POR NOVOS AGENTES ANTI-INFLAMATÓRIOS.....	32
2.4.1	Hidrazonas.....	32
2.4.2	Indóis.....	36
3	SEÇÃO EXPERIMENTAL.....	38
3.1	MATERIAL E MÉTODOS.....	38
3.1.1	Cromatografias.....	38
3.1.2	Pontos de Fusão.....	38
3.1.3	Espectroscopias de IV, RMN ¹H e RMN ¹³C.....	38
3.2	PARTE QUÍMICA.....	39
3.2.1	Síntese.....	39
3.2.1.1	<i>Síntese das indol-N-acilhidrazonas LQIT-D.T.(01 – 10).....</i>	39
3.2.2	Caracterização Estrutural.....	39
3.2.2.1	<i>LQIT-D.T.01.....</i>	39
3.2.2.2	<i>LQIT-D.T.02.....</i>	40
3.2.2.3	<i>LQIT-D.T.03.....</i>	40
3.2.2.4	<i>LQIT-D.T.04.....</i>	41
3.2.2.5	<i>LQIT-D.T.05.....</i>	42
3.2.2.6	<i>LQIT-D.T.06.....</i>	42

3.2.2.7	<i>LQIT-D.T.07.....</i>	43
3.2.2.8	<i>LQIT-D.T.08.....</i>	44
3.2.2.9	<i>LQIT-D.T.09.....</i>	44
3.2.2.10	<i>LQIT-D.T.10.....</i>	45
3.3	PARTE BIOLÓGICA.....	46
3.3.1	Testes <i>in vitro</i>.....	46
3.3.1.1	<i>Citotoxicidade em Macrófagos J774.....</i>	46
3.3.1.2	<i>Teste de inibição da linfoproliferação.....</i>	46
3.3.1.3	<i>Ensaio de inibição de Cicloxigenases 1 e 2.....</i>	47
3.3.2	Testes <i>in vivo</i>.....	47
3.3.2.1	<i>Animais.....</i>	47
3.3.2.2	<i>Toxicidade aguda por via oral.....</i>	48
3.3.2.3	<i>Ensaio de inflamação aguda.....</i>	48
3.3.2.4	<i>Análise de dados.....</i>	49
3.3.3	Estudos <i>in silico</i>.....	49
3.3.3.1	<i>Análise de Docking Molecular e ADME <i>in silico</i>.....</i>	49
3.3.3.2	<i>Docking Molecular.....</i>	49
3.3.3.2.1	<i>Preparação da estrutura do ligante.....</i>	49
3.3.3.2.2	<i>Preparação da estrutura da proteína.....</i>	50
3.3.3.2.3	<i>Procedimento do docking.....</i>	50
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
4.1	PARTE QUÍMICA.....	51
4.1.1	Obtenção da Série Química.....	51
4.1.1.1	<i>Mecanismo Reacional.....</i>	52
4.1.2	Caracterização Estrutural.....	53
4.1.2.1	<i>Infravermelho (Composto LQIT-D.T.02).....</i>	53
4.1.2.2	<i>RMN ¹H (Composto LQIT-D.T. 02).....</i>	54
4.1.2.3	<i>DEPT e RMN ¹³C (Composto LQIT-D.T.02).....</i>	57
4.1.2.4	<i>Cristalografia de Raios-X (Composto LQIT-D.T.02).....</i>	61
4.2	PARTE BIOLÓGICA.....	63
4.2.1	Concentração Citotóxica em Macrófagos J774.....	63

4.2.2	Porcentagens de Inibição da Linfoproliferação.....	64
4.2.3	Toxicidade oral aguda dose única.....	65
4.2.4	Ensaio de Inflamação Aguda.....	65
4.2.5	Ensaio de inibição <i>in vitro</i> das Cicloxigenases 1 e 2.....	67
4.2.6	Estudos <i>in silico</i> das interações das Cicloxigenases 1 e 2.....	68
4.2.7	Predição de ADMET.....	71
5	CONCLUSÃO.....	73
	REFERÊNCIAS.....	74
	APÊNDICE A - PATENTE.....	89
	APÊNDICE B - ARTIGO ACEITO NA REVISTA BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY.....	91

1 INTRODUÇÃO

O processo inflamatório está presente em várias patologias, inclusive doenças autoimunes. Segundo dados do Ministério da Saúde, cerca de 80% dos brasileiros com idade acima de 70 anos são portadores de inflamações crônicas, sendo necessária a utilização de anti-inflamatórios para combater o processo de inflamação (SANTOS, 2013). A inflamação é uma resposta fisiológica à lesão e agentes infecciosos, tais como vírus e bactérias (KRISHNAMOORTHY; HONN, 2006). O papel central da resposta inflamatória é desempenhado pelos mastócitos que são responsáveis para a realização de uma série de sinalizações intracelulares, a ativação do ácido araquidônico (AA) e o seu subsequente metabolismo das prostaglandinas e leucotrienos, por via da cicloxigenase (COX) e lipoxigenase (LOX), respectivamente, desse modo esses processos contribuem para a resposta inflamatória (MEQUANINT; MAKONNEN; URGÁ, 2011).

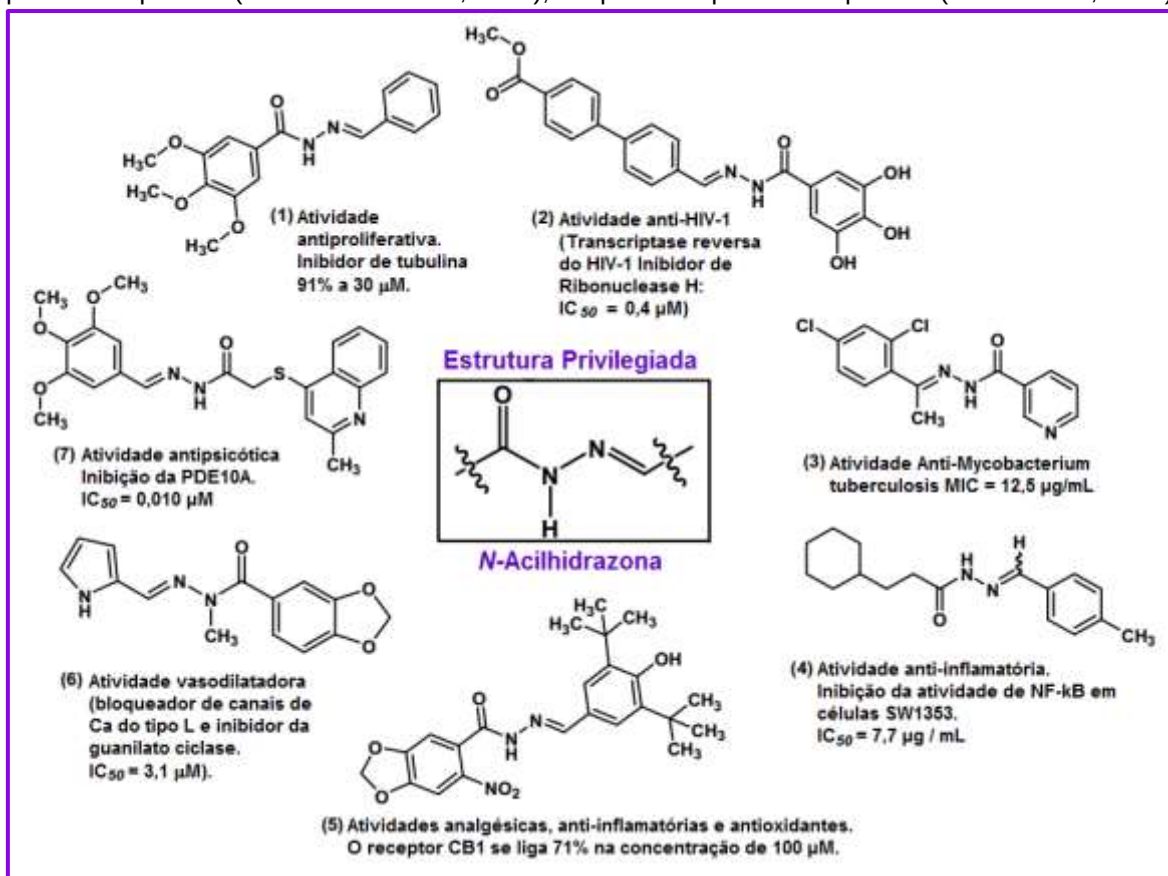
Embora muitos fármacos anti-inflamatórios estejam disponíveis, muitos deles podem causar efeitos secundários após a utilização a longo prazo (VENDRAMINI-COSTA et al., 2015). Assim, os estudos visando a descoberta de novos agentes terapêuticos anti-inflamatórios tem sido o foco de vários projetos científicos.

Neste contexto, os derivados *N*-acilhidrazônicos se mostram como uma importante classe de compostos químicos sintéticos, uma vez que apresentam diversas atividades biológicas descritas na literatura, dentre as quais podemos citar as atividades, antiviral (JIN et al., 2010; TIAN et al., 2011; GONG et al., 2011), antibacteriana (NARANG et al., 2011; GU et al., 2012), antifúngica (MALIK et al., 2012; CACHIBA et al., 2012; MU et al., 2016), analgésica (BARREIRO, et al. 2002; TRIBUTINO et al., 2009; TRIBUTINO et al., 2010), vasodilatadora (KUMMERLE et al., 2009), antipsicótica (GAGE et al., 2011), anticâncer (SALUM, 2011; AMARAL et al., 2014; YU; SHI; KE, 2015), entre outras.

Vários estudos comprovando a ação anti-inflamatória de derivados *N*-acilhidrazônicos foram descritos na literatura (BEZERRA NETTO, 2004; DUARTE, 2006; BISPO JÚNIOR et al., 2011; KAPLANCIKLI et al., 2012). Neste contexto podemos ressaltar a importância da síntese de compostos tendo como base o

fragmento *N*-acilhidrazônico como candidato a protótipo para desenvolvimento de fármacos para o tratamento dos sintomas da inflamação. A **figura 01** mostra as *N*-acilhidrazonas como uma classe de estruturas privilegiadas, uma vez que essa classe apresenta um amplo espectro de atividades biológicas.

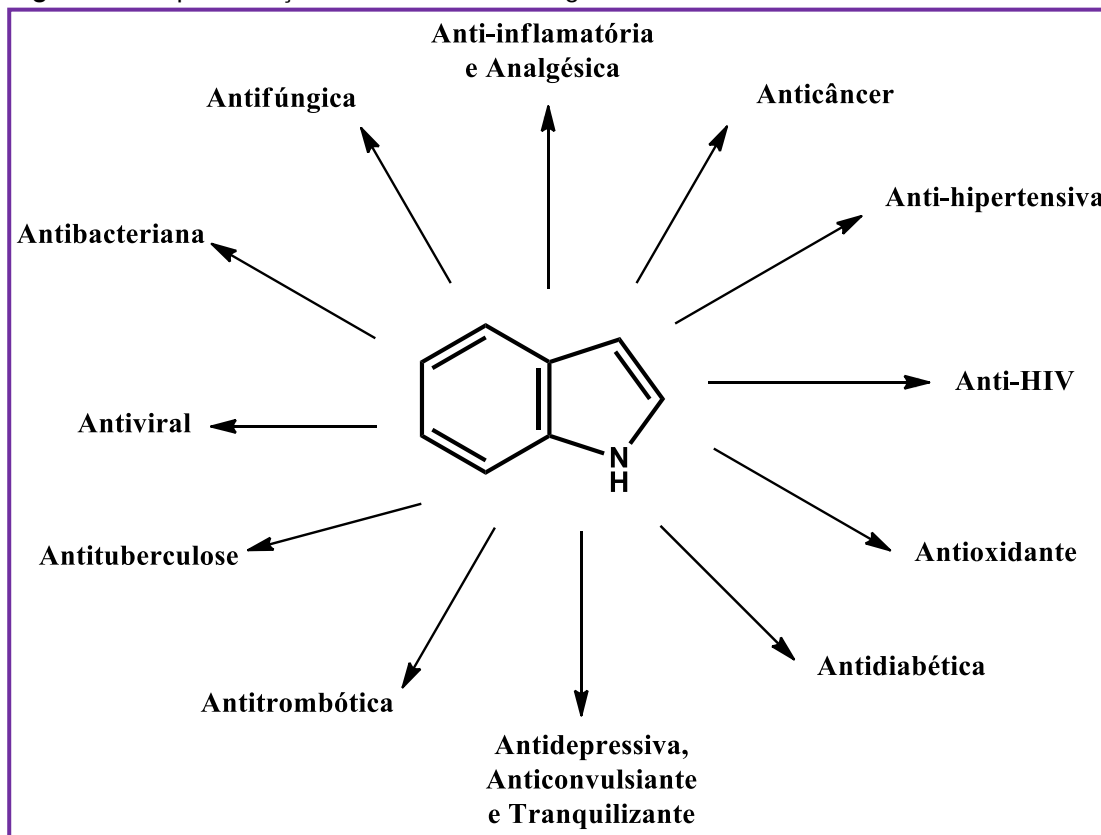
Figura 01: Exemplos de *N*-acilhidrazonas com diferentes atividades farmacológicas e mecanismos de ação. Os compostos apresentados na figura possuem respectivamente as atividades: antitumoral para o composto 1 (AMARAL et al., 2014); antiviral para o composto 2 (GONG et al., 2011); antibacteriana para o composto 3 (NARANG et al., 2011); anti-inflamatória para o composto 4 (KAPLANCIKLI et al., 2012); analgésica para o composto 5 (TRIBUTINO et al., 2009; TRIBUTINO et al., 2010); vasodilatadora para o composto 6 (KUMMERLE et al., 2009); antipsicótica para o composto 7 (GAGE et al., 2011).



Fonte: Adaptado de SILVA et al., *Molecules*, 2015.

Outra classe de estruturas privilegiadas é o núcleo indol, sendo este um importante sistema heterocíclico por estar inserido em proteínas e por ser a base de vários fármacos, como a indometacina. Dessa forma, a incorporação deste núcleo em compostos medicinais, tem dado a esse heterociclo versátil um amplo espectro de atividades biológicas como apresentado na **figura 02** (SHARMA; KUMAR; PATHAK, 2010).

Figura 02: Representação das atividades biológicas do núcleo indol.



Fonte: Adaptado de SHARMA; KUMAR; PATHAK. *Journal of Heterocyclic Chemistry*, **2010**.

Frente a necessidade da síntese de novos compostos que sejam capazes de inibir o processo inflamatório bem como apresentar reduzidas reações adversas, os núcleos *N*-acilhidrazona e indol foram escolhidos como grupos farmacofóricos de base, no intuito de obter novos agentes anti-inflamatórios.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Sintetizar e avaliar a atividade anti-inflamatória de derivados resultantes da condensação entre *N*-acilhidrazonas e indóis, investigando o possível mecanismo de ação do composto mais ativo.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Sintetizar uma série de 10 inéditos compostos indólicos-*N*-acilhidrazônicos (LQIT-D.T. 01-10);
- Elucidar todos os compostos através de técnicas de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ^1H) e Carbono (RMN ^{13}C), DEPT e Infravermelho (IV);
- Analisar os dados cristalográficos para a molécula LQIT-D.T. 02, identificando a natureza do isômero estudado como *Z* ou *E*.
- Avaliar *in vitro*:
 - A concentração citotóxica dos compostos;
 - As porcentagens de inibição de linfoproliferação;
 - Ensaio de inibição da COX-1 e COX-2;
- Avaliar *in vivo*:
 - Toxicidade aguda por via oral;
 - Ensaio de inflamação aguda.
- Avaliar *in silico*:
 - Análise de Docking Molecular
 - Análise de ADME

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 FISIOLOGIA DA INFLAMAÇÃO

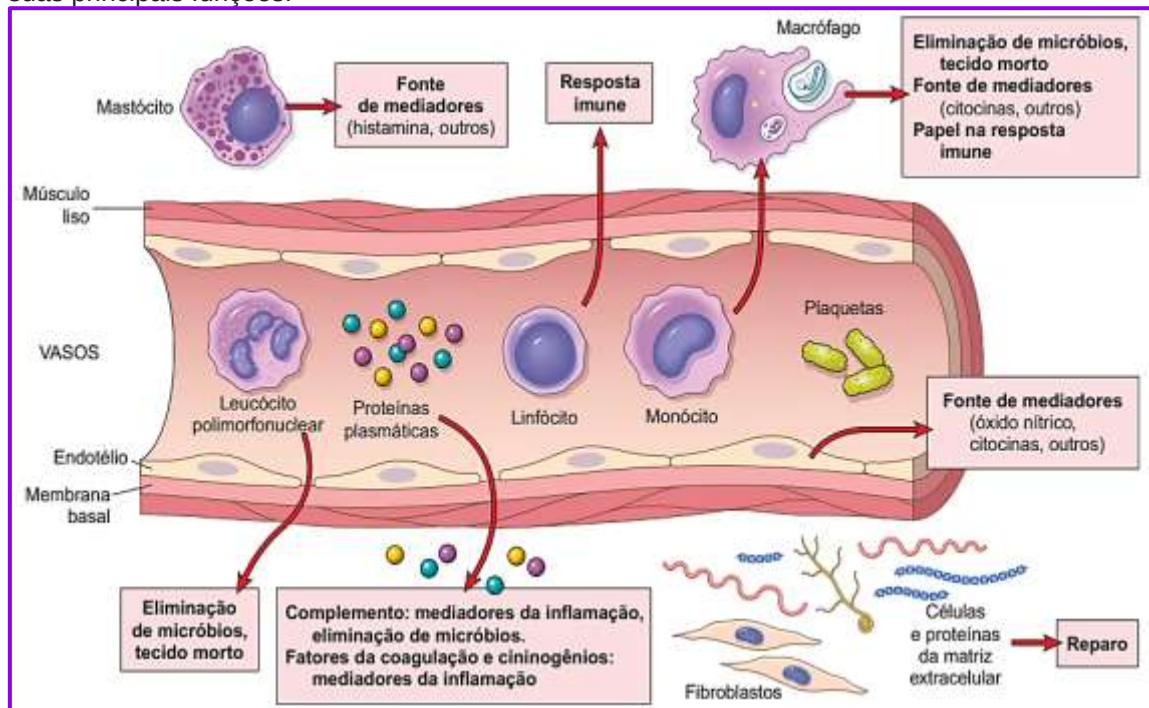
A inflamação é uma resposta protetora do corpo iniciada após infecção ou lesão. Este processo é coordenado por uma sequência de eventos envolvendo modificações moleculares, celulares e fisiológicas. Além disso, há envolvimento de mediadores como citocinas, radicais livres, aminas vasoativas e eicosanoides (principalmente prostaglandinas), produzidos por células como macrófagos, linfócitos, mastócitos e fibroblastos (FULLERTON; GILROY, 2016).

O processo inflamatório desencadeia profundas adaptações fisiológicas na tentativa de limitar os danos teciduais e remover os patógenos responsáveis pelo dano. As características clínicas da inflamação foram descritas inicialmente há cerca de 2000 anos como sinais cardinais de inflamação: rubor (vermelhidão), tumor (inchaço), calor (hipertermia) e dor (LIMA et al., 2011). Tais mecanismos envolvem uma série intrincada de eventos, incluindo dilatação de arteríolas, vênulas e capilares com maior permeabilidade vascular e exsudação de fluidos, sendo as proteínas plasmáticas, os leucócitos circulantes (células brancas sanguíneas), e os fagócitos teciduais as principais defesas do organismo frente aos agentes infecciosos (CUZZOCREA, 2005).

Em resposta à lesão ou infecção, as células especializadas da primeira linha, leucócitos (neutrófilos e eosinófilos polimorfonucleares-PMNs) migram para as regiões danificadas com o objetivo de neutralizar e eliminar esses estímulos nocivos (SERHAN et al., 2007). O mecanismo da inflamação é atribuído, em parte, à liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS) a partir de neutrófilos ativados e macrófagos (CONFORTI et al., 2008). Os ROS propagam a inflamação estimulando a liberação de citocinas, tais como interleucina-1, fator de necrose tumoral- α e interferon- γ , que estimulam o recrutamento de neutrófilos e macrófagos adicionais. Assim, os radicais livres são mediadores importantes que provocam ou sustentam processos inflamatórios e, conseqüentemente, sua neutralização por antioxidantes pode atenuar a inflamação (GERONIKAKI; GAVALAS, 2006).

Uma rede complexa de mediadores, incluindo citocinas e lipídios, produzidos por células endoteliais, células epiteliais e leucócitos infiltrados em tecidos, caracteriza as fases iniciais da inflamação. A ação combinada das moléculas atrai e ativa leucócitos para o sítio reativo, promovendo angiogênese e remodelação tecidual (TINCANI et al., 2007). Se esta sequência de passos é rigorosamente seguida, a inflamação aguda irá se resolver sem causar danos excessivos ao tecido, retornando à homeostase (SERHAN et al., 2007). No entanto, existem várias condições clínicas em que a inflamação se torna crônica com a produção excessiva de mediadores derivados de macrófagos, podendo levar a danos colaterais em células normais. Alguns exemplos de doenças com esse perfil inflamatório são aterosclerose, doença intestinal, artrite reumatoide, glomerulonefrite e choque séptico. Os principais componentes das respostas inflamatórias, aguda e crônica, e suas principais funções estão descritos abaixo na **figura 03** (CHIZZOLINI, 2007).

Figura 03: Visão geral da inflamação: componentes das respostas inflamatórias, aguda e crônica, e suas principais funções.



Fonte: KUMAR; ABBAS; ASTER, 9ª Edição, Rio de Janeiro: Elsevier, 2013.

Dessa forma, o início e a manutenção dos sinais da inflamação envolvem a liberação de diferentes mediadores químicos como cininas, neuropeptídeos e

histamina no local da lesão tecidual, assim como componentes do sistema complemento, citocinas e outros produtos leucocitários e plaquetários (RANG et al., 2016).

2.2 MEDIADORES DO PROCESSO INFLAMATÓRIO

Os fenômenos da inflamação são intermediados por substâncias químicas que podem ser oriundas do plasma, leucócitos, plaquetas, endotélio e tecido conjuntivo, de forma que uma lesão nos tecidos periféricos pode levar à liberação de mediadores químicos tais como: histamina, serotonina, citocinas, bradicininas, radicais livres e eicosanoides. Estes são capazes também de promover e facilitar a transmissão da dor, sendo os responsáveis pelos eventos vasculares, permitindo o aumento da permeabilidade capilar e a vasodilatação, além da migração de leucócitos da circulação para o tecido inflamado e a coordenação das variadas respostas de defesa local (SERHAN; CHIANG, 2004).

Quando a inflamação ultrapassa certos níveis, permite que quantidades suficientes desses mediadores endógenos penetrem na circulação sistêmica, se disseminando pelo sangue e provocando a resposta de fase aguda, definida como uma resposta multifatorial do organismo (ROTH et al., 2006).

2.2.1 A via do Ácido Araquidônico (AA)

O AA é um ácido graxo de 20 carbonos oriundo da ação da fosfolipase A2 (PLA2), que pode ser ativada por diversos estímulos químicos, inflamatórios, traumáticos e mitogênicos. Esse ácido é derivado dos fosfolipídios de membrana e liberado após a célula sofrer estímulos mecânicos, químicos ou físicos (HILÁRIO; TERRERI; LEN, 2006).

Os leucotrienos (LTs) e prostaglandinas (PGs) são mediadores de respostas biológicas como dor, febre e inflamação, que, além de aumentar a permeabilidade vascular, provocam vasodilação levando a formação de edema. Tais mediadores, também chamados de eicosanoides, são sintetizados após ação das lipoxigenases

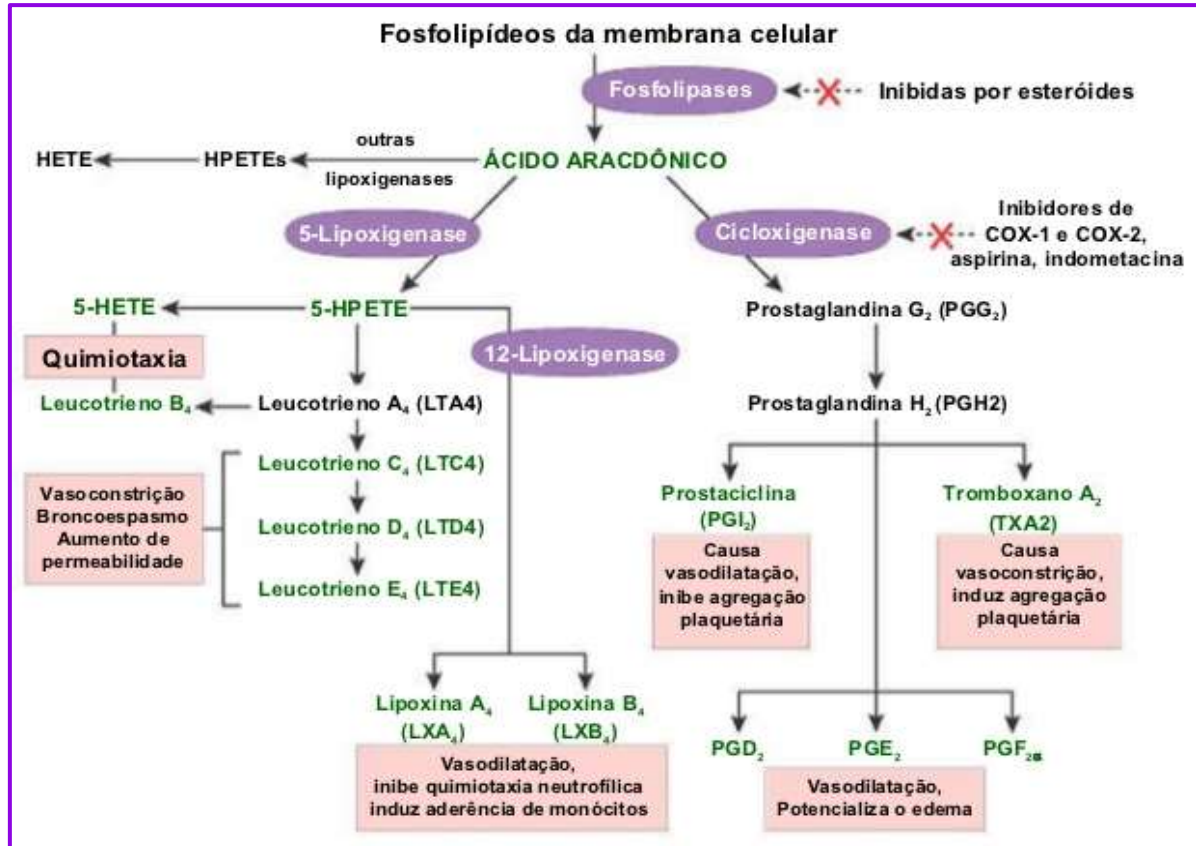
(LOXs) e das cicloxigenases (COXs) sobre o ácido araquidônico (GILROY et al., 2004).

A cascata ilustrada na **figura 04** mostra a formação do AA e a liberação dos metabólitos após ação das fosfolipases (PLs), em especial a PLA2. O AA serve de substrato para quatro grupos de enzimas: cicloxigenase (COX), 5-lipoxigenase (5-LOX), 12-lipoxigenase (12-LOX) e 15-lipoxigenase (15-LOX). Após sofrer ação da 5-LOX, o AA dará origem aos ácidos hidroperoxieicosatetraenóicos (HPETEs) e hidroxieicosatetraenóicos (HETEs) bem como aos LTs, enquanto a ação da 12-LOX dará origem as lipoxinas. Quando metabolizado pela via das cicloxigenases (COXs), dará origem as prostaglandinas (PGs), prostaciclinas (PGI2) e tromboxanos (TXs). Estes metabólitos, por sua vez, são substâncias biologicamente ativas e detém importante papel na fisiopatologia da inflamação (YEDGAR et al., 2007).

A enzima cicloxigenase promove a oxidação do AA em prostaglandina G2 (PGG2), que por sua vez é reduzida ao intermediário instável prostaglandina H2 (PGH2) pela enzima peroxidase (BROOKS; EMERY; EVANS, 1999). As prostaglandinas G2 e H2 são compostos intermediários e quimicamente instáveis sendo convertidas pelas isomerases tissulares específicas em múltiplos prostanoides (PGD2, PGE2, PGF2 α , PGI2, TXA2 e TXB2). Entretanto, a maioria dos tecidos é capaz de converter PGH2 em apenas alguns desses produtos finais, dependendo do tipo de isomerase presente em cada tecido (FILHO; RAHAL, 2008).

Duas das isoformas circulantes de enzima cicloxigenase são a COX-1 e COX-2, que desempenham no organismo diferentes funções fisiológicas. A COX-1 apresenta 17 aminoácidos em sua porção amino-terminal, enquanto a COX-2 apresenta 18 aminoácidos na porção carboxi-terminal. Apesar de serem muito parecidos na estrutura proteica, essas enzimas são codificadas por diferentes genes (HILÁRIO; TERRERI; LEN, 2006; MARNETT, 2009).

Figura 04: Cascata simplificada do AA mostrando seus metabólitos e suas funções fisiológicas.



Fonte: Adaptado de KUMAR et al.; 8ª Edição, Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.

A COX-1 é encontrada no trato gastrointestinal, sendo associada à inibição da secreção gástrica e à produção de muco protetor. Por esse motivo os fármacos que inibem essa isoforma da COX causam diversos distúrbios no trato digestivo. Nas plaquetas, a COX-1 está ligada à síntese do Tromboxano A₂ (TXA₂), substância que auxilia na agregação e na adesão plaquetária. Portanto, a inibição da COX-1 está associada ao risco de sangramento cutâneo e gastrointestinal (FRANCO et al., 2006; HAZEWINDEL et al., 2008).

A COX-2 leva a formação de PGs que participam de eventos inflamatórios, algésicos e térmicos (FRANCO et al., 2006; HAZEWINDEL et al., 2008). A expressão da COX-2 é induzida por citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-2, TNF-α, e outros mediadores nos sítios de inflamação, como fatores de crescimento e endotoxinas. As citocinas anti-inflamatórias como IL-4, IL-10 e a IL-13, assim como os fármacos glicocorticoides são capazes de inibir a expressão de COX-2 (MARNETT, 2009).

Embora seja conhecido que a COX-2 possui propriedades pró-inflamatórias, a resposta inflamatória total é produzida tanto pela COX-2 como pela COX-1 (HILÁRIO; TERRERI; LEN, 2006).

O TXA₂ é um dos eicosanoides produzidos pela via das COXs e é responsável por induzir a síntese de citocinas inflamatórias como a IL-1 β e o TNF- α , enquanto a PGE₂, também sintetizado pela mesma via, é responsável pelo aumento da permeabilidade vascular, vasodilatação e hiperalgesia. A união dos efeitos desses mediadores inflamatórios resulta nos sintomas clínicos comuns presentes em doenças inflamatórias (dor, calor, vermelhidão, inchaço e perda de função) (STAMP; JAMES; CLELAND, 2005).

Na via das lipoxigenases (LOXs), os produtos iniciais são gerados por três tipos de LOXs, que estão presentes em apenas alguns tipos de células (COTRAN; KUMAR; COLLINS, 2006). As LOXs são encontradas principalmente em células de origem mieloides, como por exemplo, leucócitos polimorfonucleares (PMNs), mastócitos, macrófagos e basófilos (GOMES et al., 2009). A 5-LOX é a principal enzima deste grupo, atuando sobre o ácido araquidônico e produzindo o 5-HPETE, um composto quimiotático para leucócitos, que é convertido em leucotrieno A₄ (LTA₄) (GOODMAN et al., 2009). O LTA₄ pode ser convertido em leucotrieno B₄ (LTB₄) ou em uma série de cisteinil-leucotrienos, LTC₄, LTD₄ e LTE₄, como apresentado na **figura 04** (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012; RANG et al., 2016).

Inúmeras evidências experimentais sugerem que os leucotrienos e alguns dos seus metabólitos contribuem para a fisiopatologia da resposta inflamatória através de grande variedade de efeitos (HAEGGSTRÖM, 2000). O LTB₄, por exemplo, é um importante agente responsável pelo aumento da permeabilidade vascular, causa aderência, quimiotaxia e ativação PMNs e monócitos, além de estimular a proliferação de macrófagos e linfócitos e a produção de citocinas por essas células (GOODMAN et al., 2009).

2.3 TRATAMENTOS DISPONÍVEIS NO COMBATE A INFLAMAÇÃO

Depois do isolamento da salicilina e a confirmação dos seus efeitos antipiréticos por Leraux em 1829, um longo caminho de pesquisa foi iniciado (MONTEIRO et al., 2008). O salicilato de sódio, por exemplo, foi utilizado para tratar a febre reumática, como agente antipirético, tendo sido usado também no tratamento da gota em 1875. O enorme sucesso desse fármaco levou à produção do ácido acetilsalicílico (AAS), o qual, após demonstrados os seus efeitos anti-inflamatórios, foi inserido na Medicina em 1899 por Dresser, com o nome de aspirina (BRENOL; XAVIER; MARASCA, 2000).

Após observada a toxicidade do AAS, principalmente a nível gastrointestinal, iniciou-se uma procura por outras substâncias com menos efeitos adversos e, dessa forma, foi desenvolvido o primeiro anti-inflamatório não salicilato, a fenilbutazona, no início de 1950. Porém, esse fármaco foi associado ao aparecimento de casos de agranulocitose, o que induziu, posteriormente ao seu abandono, sendo no contexto atual um medicamento raramente utilizado. Outro derivado não salicilado, a indometacina, foi sintetizada no ano de 1963 e desenvolvida para substituir a fenilbutazona, possuindo intensas ações analgésica e anti-inflamatória (HART; BOARDMAN, 1963; JÚNIOR et al., 2007).

2.3.1 Inibidores da Via das Cicloxigenases (COXs)

Os fármacos mais utilizados nos processos inflamatórios são os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) que constituem um grupo heterogêneo de moléculas que embora, muitas vezes, não estejam relacionadas quimicamente, possuem ações terapêuticas em comum, tais como: atividade analgésica, anti-inflamatória, antitérmica e antitrombótica. Esses efeitos tornam essa classe de fármacos a primeira escolha para o tratamento de doenças degenerativas inflamatórias como, por exemplo, desordens reumáticas (FIORUCCI et al., 2001; SÜLEYMAN; DEMIRCAN; KARAGÖZ, 2007).

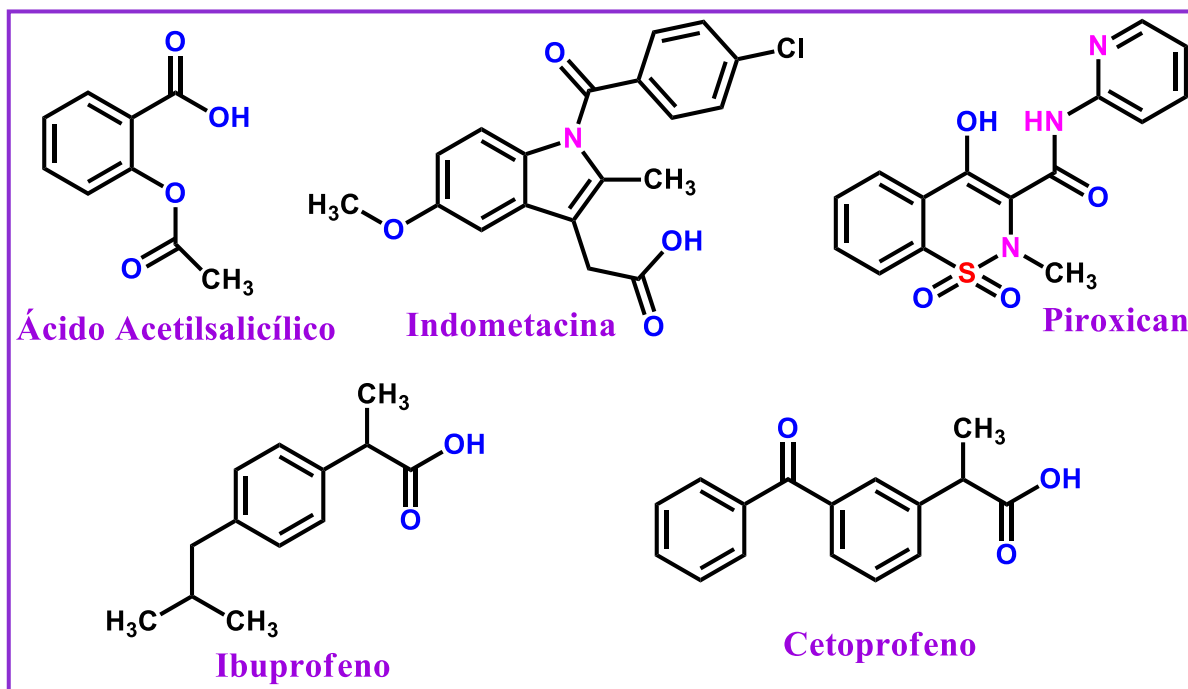
O mecanismo de ação dos AINEs começou a ser elucidado em 1971, quando Sir John Vane, estudando a atividade anti-inflamatória da aspirina, foi capaz de afirmar

que esta ação estaria ligada a capacidade desta substância interferir na biossíntese das prostaglandinas (PGs), através de uma provável competição com o sítio ativo da enzima cicloxigenase (COX), inibindo esta via. Isso também ocasiona uma redução da conversão do ácido araquidônico e desta forma, impede a síntese de eicosanoides e prostanoides (PETRUZZELLI et al., 2007; MONTEIRO et al., 2008).

No entanto, o uso destes medicamentos, principalmente de forma crônica, provoca alguns efeitos indesejáveis, destacando-se a atividade ulcerogênica gastrointestinal e o broncoespasmo. Estes efeitos são a principal limitação na utilização dessa classe de anti-inflamatórios (RAJAKARIAR; YAQOOB; GILROY, 2006). O efeito dos AINEs na produção de prostaglandinas é também a principal causa da sua toxicidade, promovendo a alteração da função renal, risco de doenças cardiovasculares e problemas gastrointestinais (MCGETTIGAN; HENRY, 2011). Desde então, novos fármacos passaram a ser sintetizados, buscando-se encontrar progressivamente mais eficácia e menos efeitos indesejáveis.

Em 1990, foi descoberta a existência de duas isoformas, COX-1 e COX-2, sendo a COX-1 uma enzima presente constitutivamente na maioria das células, o que faz com que a mesma esteja relacionada à homeostase normal e a citoproteção gástrica. Dessa forma os AINEs pertencem a duas grandes classes: Inibidores Não Seletivos da COX e inibidores Seletivos da COX-2. Alguns dos AINEs com ação predominante sobre a COX-1 estão representados na **figura 05**. São eles: o AAS, a indometacina, o piroxicam o ibuprofeno e o cetoprofeno, sendo esses medicamentos comercializados há muitos anos e também os mais utilizados até os dias atuais (RODERJAN, 2004).

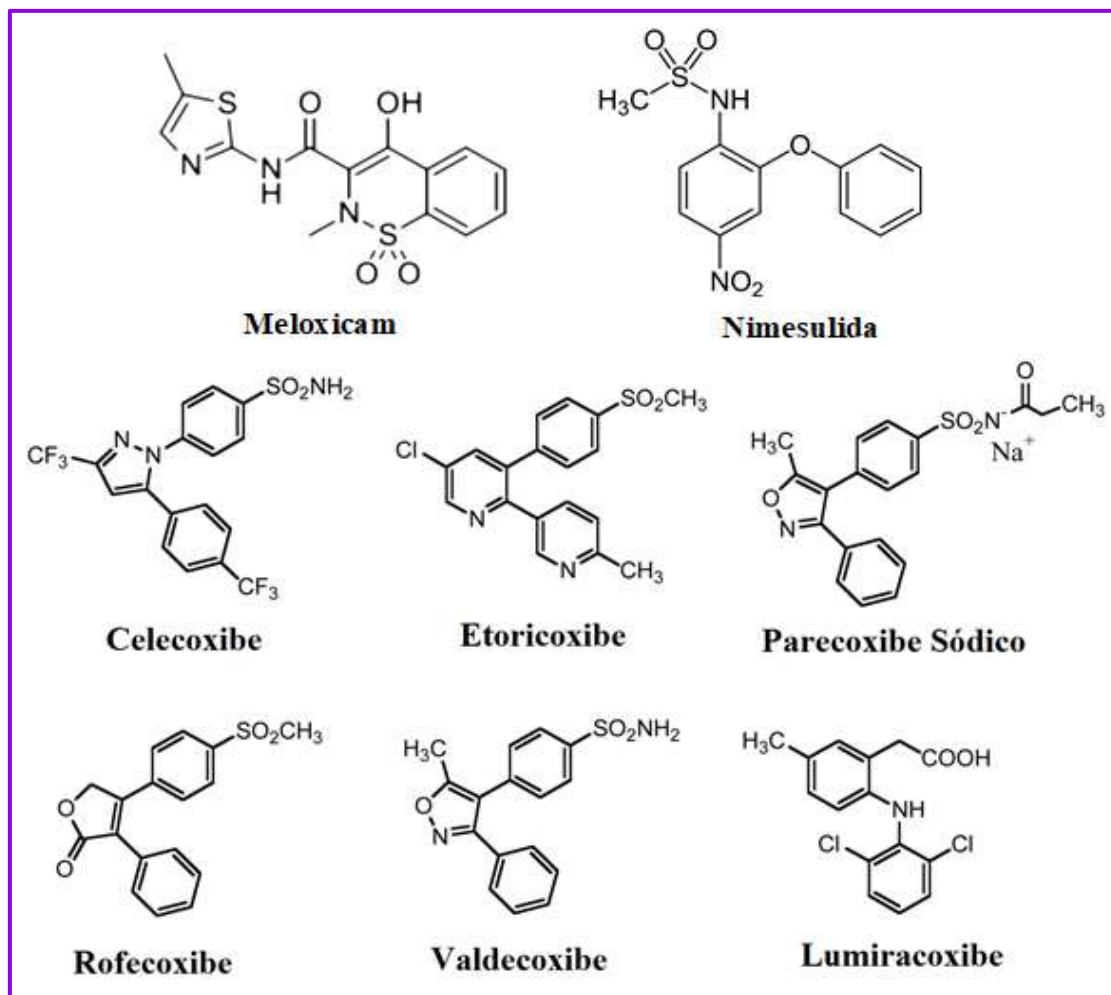
Figura 05: Inibidores não seletivos da COX com ação predominante sobre a COX-1.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2017.

A COX-2 é uma enzima produzida por células inflamatórias em resposta a algum estímulo (CHOU et al., 2006). Os anos posteriores testemunharam o desenvolvimento de inúmeros AINEs inibidores seletivos de COX-2 numa tentativa de reduzir os efeitos gastrintestinais dos inibidores tradicionais. Porém, descobriu-se que essa seletividade acarreta em um desequilíbrio entre os fatores anti- e pró-trombóticos, com predomínio de tromboxano (TXA₂) em detrimento da prostaciclina (PGI₂), o que desencadeia uma série de complicações cardiovasculares (MENDES et al., 2012). O meloxicam e a nimesulida foram os primeiros inibidores seletivos da COX-2 (**figura 06**), surgiram na década de 1980 e posteriormente, surgiram os fármacos popularmente conhecidos como “coxibes”, como o valdecoxibe, o parecoxibe, o celecoxibe, o rofecoxibe, o etoricoxibe, lumiracoxibe, cujas estruturas são também demonstradas na **figura 06** (LUENGO, 2005). Atualmente, no Brasil, apenas o celecoxibe e o etoricoxibe são comercializados, ambos com retenção de receita médica e com clara indicação dos riscos de complicações cardiovasculares (MENDES et al., 2012).

Figura 06: Estruturas químicas de alguns inibidores seletivos da COX-2.



Fonte: Adaptado de PRATICÒ; DOGNÉ, *Circulation*. 112:1073-1079, 2005.

Mesmo tidos como seletivos, estudos realizados por Fitzgerald e Patrono (2001) revelaram que inibidores da COX-2 provocaram efeitos cardiovasculares adversos em voluntários sadios. Estes efeitos foram atribuídos a diminuição do nível de PGI₂ e ao aumento do nível de tromboxano A₂, que levam a um aumento significativo no risco de eventos cardiovasculares, como infarto do miocárdio e acidente vascular cerebral oclusivo, eventos que culminaram na retirada do rofecoxibe e valdecoxibe do mercado farmacêutico (HOEFLER, 2004; CHEN; RAO; KNAUS, 2006).

No início do século XXI, foi descoberta uma variante do gene da COX-1, descrita como COX-3. Essa parece ser expressa em altos níveis no sistema nervoso central e pode ser encontrada também no coração e na aorta. Essa enzima é

seletivamente inibida por drogas analgésicas e antipiréticas, como paracetamol e dipirona, e é potencialmente inibida por alguns AINEs (MOSQUINI; ZAPPA; MONTANHA, 2011).

2.3.2 Anti-inflamatórios Hormonais: Glicocorticoides

Além dos AINEs, os anti-inflamatórios esteroidais, também denominados glicocorticoides, têm sido utilizados para tratar uma grande variedade de distúrbios inflamatórios, atuando em vários tipos celulares e tecidos, desse modo, seus usos terapêuticos estão cada vez mais se ampliando (FLAMMER; ROGATSKY, 2011). Em 2008, mais de 44 milhões de prescrições para glicocorticoide oral, tópico ou inalado foram escritas somente nos Estados Unidos e esse tipo de anti-inflamatório é um padrão em qualquer situação onde a imunossupressão é desejada, como por exemplo após cirurgia de transplante, durante reações alérgicas graves ou crises inflamatórias autoimunes e como suplemento de certas quimioterapias (SCHAPPERT; RECHTSTEINER, 2008).

Muito parecido com as doenças para as quais são administrados, os mecanismos de ação dessas moléculas de esteroides são extremamente variados, podendo envolver interações com receptores intracelulares pertencentes à superfamília dos receptores que controlam a transcrição gênica. Ao serem ativados, esses receptores podem levar à indução (desencadeamento de transcrição) ou à repressão (inibição de transcrição) de genes particulares (CHROUSOS; MARGIORIS, 2001). De fato, os glicocorticoides são imunomoduladores ao invés de imunossupressores indiscriminados e suas funções moleculares são muito mais complexas do que as previamente reconhecidas (SCHAPPERT; RECHTSTEINER, 2008).

Os fármacos anti-inflamatórios esteroidais bloqueiam a liberação de prostaglandinas pela inibição da atividade de fosfolipase A2, que interfere na cascata do ácido araquidônico. Assim, indivíduos que utilizam este tipo de anti-inflamatório por períodos prolongados ficam predispostos a infecções por seus efeitos imunossupressores (MILLER; STANTON; DEVERY, 2001).

2.4 BUSCA POR NOVOS AGENTES ANTI-INFLAMATÓRIOS

Diante do exposto, pode-se observar a importância da busca por novos agentes anti-inflamatórios mais seletivos. Dentre as estratégias que podem conduzir à descoberta de novos fármacos, a identificação e utilização de estruturas privilegiadas ganhou atenção especial quando comparada a outras estratégias (COSTANTINO; BARLOCCO, 2006).

Estruturas privilegiadas são esqueletos moleculares com propriedades versáteis de ligação, de tal modo que um único grupamento é capaz de proporcionar ligantes potentes e seletivos para uma gama de diferentes alvos biológicos, através da modificação de grupos funcionais. O resultado é a produção de ligantes de alta qualidade que fornecem uma base sólida para o desenvolvimento de novos fármacos (DESIMONE et al., 2004).

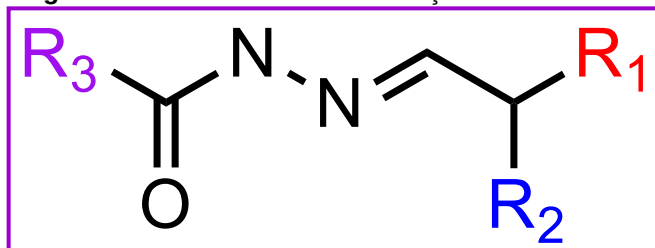
Neste contexto, *N*-acilhidrazonas e indóis podem ser considerados estruturas privilegiadas para o design de compostos bioativos com ação anti-inflamatória (SILVA et al. 2010; OZDEMIR et al. 2015). A literatura descreve a atividade anti-inflamatória de *N*-acilhidrazonas quando conjugado com núcleo heterocíclico, como furanoxil (HERNÁNDEZ et al. 2012), pirazina (SILVA et al. 2010) e 1,3-benzodioxol (TRIBUTINO et al. 2009). Além disso, os indóis são relatados como inibidores de moléculas importantes envolvidas no processo inflamatório, como COX-2 (SINGH et al. 2015), fosfolipase A2 (PEDADA et al. 2016) e citocinas, como IL-1 β e TNF- α (GUERRA et al. 2011).

2.4.1 Hidrazonas

Compostos hidrazônicos têm sido utilizados para diversos fins, que vão desde a agricultura, passando pelo ramo industrial e, principalmente, no setor farmacêutico. Emil Fischer (1883), descobriu as hidrazonas quando estava sintetizando um derivado indólico a partir da reação entre fenil hidrazina com propanona. Desde então, esses compostos passaram a ser sintetizados em larga escala por apresentarem ação contra diferentes tipos de doenças (CAIXEIRO, 2007).

Os derivados acilhidrazônicos se mostram como uma importante classe de compostos químicos sintéticos por suas diversas propriedades farmacológicas. A **figura 07** mostra a estrutura de uma acilhidrazona, precursora de diversos compostos amplamente sintetizados e de interesse farmacêutico.

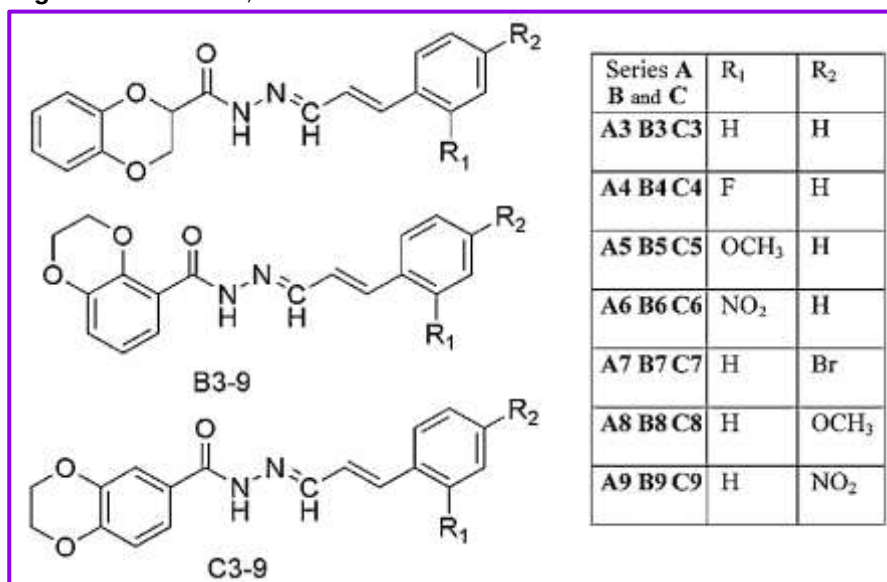
Figura 07: Estrutura básica da função *N*-acilhidrazona.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2017.

A atividade antibacteriana de derivados acilhidrazônicos já foi relatada frente as diferentes espécies e cepas de bactérias. Em 2014, Song et al. avaliaram a atividade antibacteriana de três séries de acilhidrazonas (**figura 08**) frente a *Escherichia coli*, a *Pseudomonas aeruginosa*, ao *Staphylococcus aureus* e ao *Bacillus subtilis*, obtendo resultados promissores. Reis (2007) também constatou significativa atividade antibacteriana de derivados acilhidrazônicos frente a diferentes cepas de *Mycobacterium tuberculosis* e *S. aureus*.

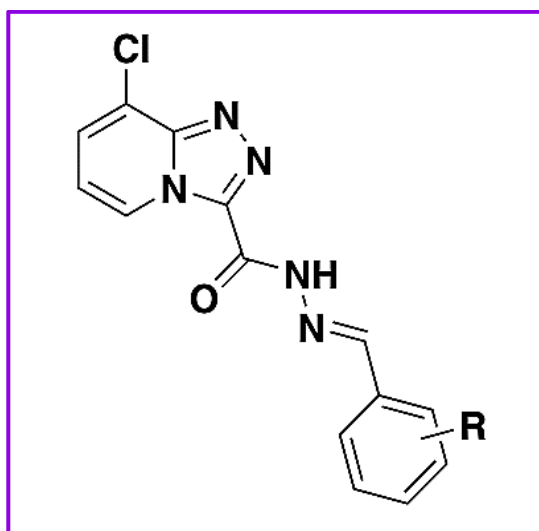
Figura 08: Séries A, B e C de acilhidrazonas com atividade antibacteriana.



Fonte: Adaptado de SONG, et al.; *Chem. Pharm. Bull.* 2014.

A atividade antifúngica também já foi constatada para derivados acilhidrazônicos frente a diferentes espécies do gênero *Candida* sp. (MALIK et al., 2012; CACHIBA et al., 2012). Além disso, um trabalho recente analisou a atividade antifúngica frente as espécies *Stemphylium lycopersici*, *Fusarium oxysporum* e *Botrytis cinerea*, obtendo excelentes resultados frente ao *Stemphylium lycopersici* quando comparados ao fungicida padrão utilizado atualmente (MU et al., 2016). A seguir, na **figura 9** está representada a estrutura geral dos 17 compostos analisados no trabalho em questão.

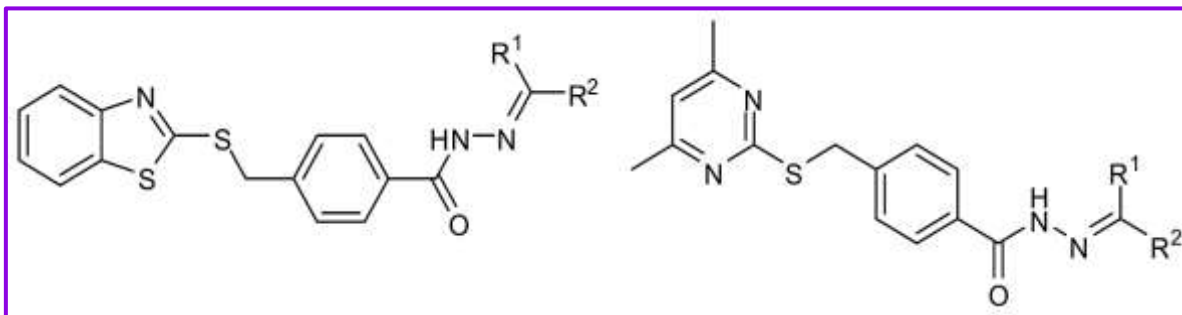
Figura 09: Estrutura geral das *N*-acilhidrazonas com atividade antifúngica.



Fonte: Adaptado de MU et al.; *Chemistry Central Journal* v.: 10, n.: 50, **2016**.

Salum (2011) descreveu as atividades antimetabólica, antiproliferativa, antitubulina e inibitória da migração celular para derivados da acilhidrazona. Inclusive em um trabalho mais atual (YU; SHI; KE, 2015), foi constatada a atividade anticâncer de duas séries de compostos *N*-acilhidrazônicos frente a três diferentes linhagens de células tumorais, tendo sido evidenciado um alto potencial de alguns desses compostos para induzir apoptose em uma das linhagens celulares testadas (**figura 10**).

Figura 10: Estrutura geral dos derivados *N*-acilhidrazônicos testados em três linhagens de células tumorais.



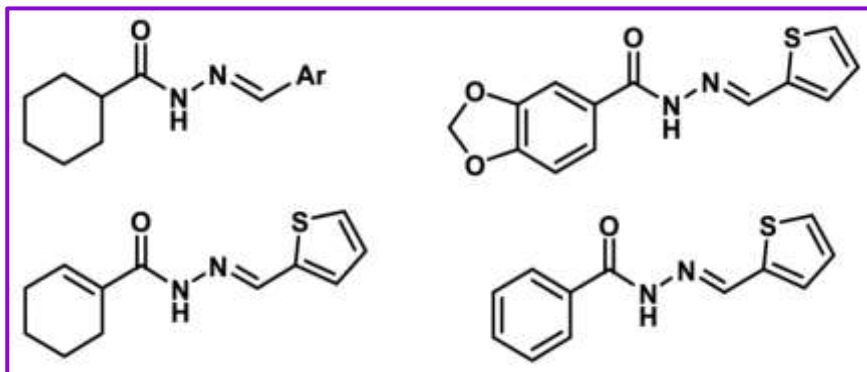
Fonte: Adaptado de YU; SHI; KE, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2015.

Tian et al. (2009) e Jin et al., (2010) sintetizaram e avaliaram novas séries de compostos acilhidrazônicos frente ao vírus HIV, comprovando a atividade antiviral destas substâncias. A atividade desestabilizadora da transcriptase reversa de derivados acilhidrazônicos foi observada por Sluis-Cremer et al. (2002). Derivados acilhidrazônicos também já foram relatados como potenciais agentes antimaláricos frente a cepas de *Plasmodium falciparum* resistentes a cloroquinas (MELNYK et al., 2006; FILHO et al., 2016).

Além das atividades farmacológicas citadas acima, foram observadas também na literatura as atividades tripanocida (CARVALHO et al., 2014), leishmanicida (CHARRET, 2011; HERNÁNDEZ et al., 2013), antimalárica (MELNYK et al, 2006), antimicobacterianos (LANNES, 2010), antinociceptiva (FIGUEIREDO, et al. 2000; SAUZEM, 2004), antiagregante plaquetária (RODRIGUES et al., 2007), analgésica e antitrombótica (BARREIRO, et al. 2002; LIMA, et al. 2008), entre outras.

Com relação a atividade focada nesse trabalho, diversos artigos têm relatado bons resultados de derivados *N*-acilhidrazônicos frentes a variados tipos de processos inflamatórios (DUARTE, 2006; UNSAL-TAN, et al., 2010; BISPO JÚNIOR et al., 2011; SILVA et al., 2014). Os mecanismos de ação destes compostos podem envolver a inibição de enzimas como as cicloxigenases (COX) e a 5-Lipoxigenase (5-LOX) (HIGGS; VANE, 1983). Em 2015, Silva *et al.* descrevem diferentes atividades anti-inflamatórias para uma variedade de 20 compostos *N*-acilhidrazônicos, cujas fórmulas estruturais gerais são representadas na **figura 11**. Trabalhos recentes também relataram a atividade anti-inflamatória de compostos hidrazônicos atuando na inibição da COX-2 (GORANTLA et al, 2017).

Figura 11: Variações estruturais dos 20 compostos *N*-acilhidrazônicos testados frente a diferentes tipos de inflamação.



Fonte: Adaptado de SILVA et al., *Molecules*, 2015.

2.4.2 Indóis

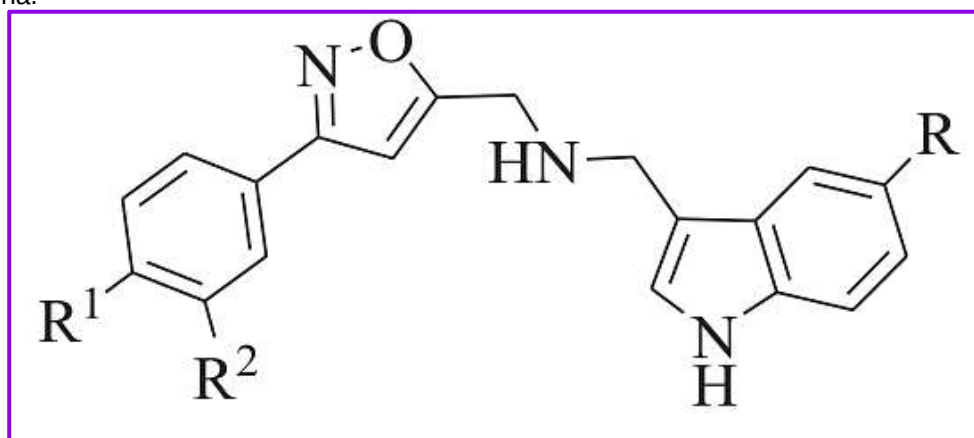
Os indóis são consideradas uma classe de moléculas com amplo espectro de ação descrito na literatura (SHARMA; KUMAR; PATHAK, 2010; BISWAL et al., 2012; KAUSHIK et al., 2013). Entre as atividades biológicas descritas, estão sua ação antimicrobiana (PANWAR et al., 2006), antifúngica, inclusive frente a *Candida albicans* resistente ao fluconazol (ABELE et al., 2003; YOUNGSAYE et al., 2012), anticarcinogênica (QUEIROZ et al., 2008; PATEL et al., 2012; BENNINGHOFF; WILLIAMS, 2013), antiviral (RANI; SRIVASTAVA; KUMAR, 2004), incluindo drogas anti-HIV (SCOTT; PERRY, 2000), anti-hipertensiva (PATKAR et al., 2016), antidiabética (ROSENGREN et al., 2009), analgésica (FREIDONK-MUESCHENBORN; FOX, 2005), antiemética (GENERALI; CADA, 2009), antimalárica (SCHUCK et al., 2014), dentre muitas outras.

A atividade anti-inflamatória dos indóis é demonstrada desde as pesquisas iniciais da classe dos AINES, sendo a indometacina (HART; BOARDMAN, 1963; SMYTH, 1970) seu principal representante (**figura 05**). Em 2011, Shin et al. avaliaram o potencial anti-inflamatório de indóis presentes em frações de raízes de *Brassica rapa* (IBR) (família Brassicaceae) e os mecanismos subjacentes. Seus dados sugerem que as inibições expressivas de iNOS, TNF- α e IL-6 causadas por uma atenuação da ativação de NF-kB são responsáveis pela atividade anti-inflamatória e antinociceptiva da IBR.

Outros estudos mostraram que o heterociclo indol quando conjugado com outros grupos farmacofóricos importantes, como a tiazolidina e a imidazolidina, foram capazes de inibir a linfoproliferação, redução da expressão/produção de COX-2, IL-1 β e TNF- α e também mostraram um bom perfil farmacocinético (GUERRA et al., 2011; BARBOSA et al., 2013; UCHÔA et al., 2009; GARCIA et al., 2015).

Em 2016, PEDADA et al. avaliaram uma série de 15 novos indóis contendo o radical isoxazol (**figura 12**) como inibidores da enzima fosfolipase A2, sendo considerados como potenciais agente anti-inflamatórios e anticâncer. Diversos outros trabalhos têm demonstrado o potencial anti-inflamatório de derivados contendo o núcleo indol (LIU et al., 2016; ABDELLATIF; LAMIE; OMAR, 2016; AHMAD et al., 2017; SINGH et al, 2017.)

Figura 12: Estrutura geral da série de 15 derivados do radical indol com atividades anticâncer e anti-inflamatória.



Fonte: PEDADA et al., *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2016**.

Em 2017, Fatahala e colaboradores evidenciou também uma atividade anti-inflamatória em compostos indólicos através de um ensaio de edema de pata, onde foi possível observar uma diminuição considerável do edema ao comparar os compostos sintetizados aos fármacos utilizados como padrão.

Assim, em vista dessas evidências que comprovam a importância biológica das *N*-acilhidrazonas e dos indóis na química medicinal, este trabalho apresenta a síntese de novas moléculas contendo essas estruturas privilegiadas conjugadas, bem como a avaliação da atividade anti-inflamatória *in vitro* e *in vivo* desses novos compostos.

3 SEÇÃO EXPERIMENTAL

3.1 MATERIAL E MÉTODOS

A maioria dos produtos químicos foram adquiridos pela Sigma-Aldrich (St. Louis, USA), Merck (Berlin, Germany) ou Alfa-Aesar (Massachusetts, USA).

3.1.1 Cromatografias

As cromatografias em camada delgada (CCD) foram realizadas em folhas de alumínio pré-revestidas de Sílica Gel 60 (F254, Merck, Alemanha) de 0,25 mm de espessura. A leitura das mesmas foi realizada através de radiação de ultravioleta (UV) no comprimento de onda (λ) de 254 nm.

3.1.2 Pontos de Fusão

Os pontos de fusão foram medidos em capilares usando um aparelho de Thomas Hoover e os valores não foram posteriormente corrigidos.

3.1.3 Espectroscopias de IV, RMN ^1H e RMN ^{13}C

Os espectros de IV foram obtidos em espectrofotômetro BRUKER IFS-66, em discos de KBr. RMN ^1H e ^{13}C , foram registrados em um espectrofotômetro Bruker AMX-300 MHz, usando DMSO- d_6 como solvente e trimetilsilano (TMS) como padrão interno. Padrões de desdobramento são designados como se segue: s, singleto; d, dubleto; t, tripleto; m, multipeto. Os deslocamentos químicos (δ) foram reportados em ppm.

3.2 PARTE QUÍMICA

3.2.1 Síntese

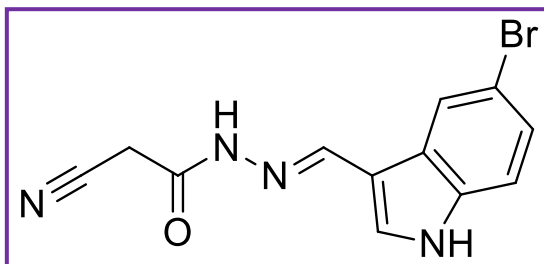
3.2.1.1 Síntese das indol-N-acilhidrazonas LQIT-D.T. (01 – 10).

Em um balão de fundo redondo de 100 ml, foram adicionados 10 mL de álcool etílico e 15 gotas de AcOH. Em seguida, sob agitação magnética, foram adicionados 1 mmol de cianoacetohidrazida e 1 mmol de diferentes 3-indol carboxaldeídos. A reação foi então mantida sob agitação magnética constante e acompanhada a cada hora por meio de cromatografia de camada delgada (CCD) durante 12 horas.

Após este tempo, de acordo com a leitura da CCD, todo o produto de partida havia se esgotado e o precipitado formado foi removido sob filtração e lavado com água destilada para a remoção de possíveis resquícios de AcOH. Por fim, após passar por um processo de secagem com o auxílio de um dessecador, o precipitado resultante foi recristalizado em etanol, tornando possível a obtenção do produto puro na forma de um pó.

3.2.2 Caracterização Estrutural

3.2.2.1 LQIT-D.T.01:



Nome IUPAC: (*E*)-*N'*-((5-bromo-1H-indol-3-il)metileno)-2-cianoacetohidrazida.

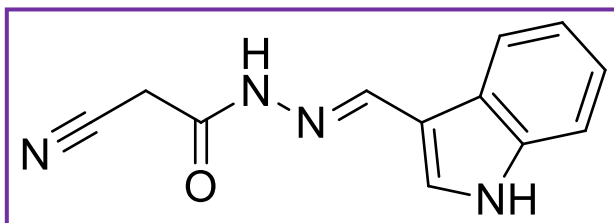
Fórmula Molecular: $C_{12}H_9N_4OBr$. Rendimento: 88,3%. Aspecto: Pó levemente amarelado. PF (°C): 237–239. R_f (6:4 AcOEt/Hexano): 0,45.

IV (KBr, cm^{-1}): 1233.0 (NH, Ar), 1619.6 (C=N), 1673.6 (HN-C=O), 2275.7 (CN), 3286.8 (NH).

RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6): δ 4.21 (s, 2H, CH₂), 7.32 (d, 1H, J 8.7 Hz, ArH), 7.42 (d, 1H, J 8.1 Hz, ArH), 7.88 (s, 1H, ArH), 8.17 (s, 1H, N=CH), 8.23 (s, 1H, ArNCH), 11.5 (s, 1H, ArNH), 11.7 (s, 1H, NH).

RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6): δ 24.75 (CH₂), 111.09 (C, Ar), 113.6 (C-Br, Ar), 114.33 (CH, Ar), 116.62 (CN), 124.25 (CH, Ar), 126 (C, Ar), 132.56 (HC-N), 136.18 (C-N, Ar), 141.86 (HC=N), 164.16 (C=O).

3.2.2.2 LQIT-D.T.02:



Nome IUPAC: (E)-N'-((1H-indol-3-il)metileno)-2-cianoacetohidrazida.

Fórmula Molecular: C₁₂H₁₀N₄O. Rendimento: 86,61%. Aspecto: Pó amarelo claro.

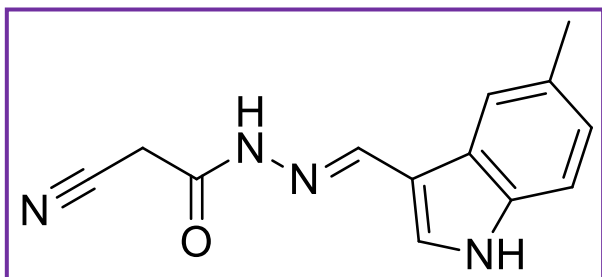
PF (°C): 199–202. R_f (6:4 AcOEt/Hexano): 0,55.

IV (KBr, cm⁻¹): 1246.5 (NH), 1620.2 (C=N), 1670.5 (C=O), 2275.7 (CN), 3300.8 (NH).

RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6): δ 4.22 (s, 2H, CH₂), 7.15 (t, 1H, J 7.35 Hz, ArH), 7.2 (t, 1H, J 7.35 Hz, ArH), 7.44 (d, 1H, J 7.2 Hz, ArH), 7.81 (s, 1H, ArNCH), 8.12 (d, 1H, J 7.5 Hz, ArH), 8.19 (s, 1H, N=CH), 11.46 (s, 1H, NH), 11.58 (s, 1H, ArNH).

RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6): δ 24.44 (CH₂), 111.83 (CH, Ar), 111.13 (C, Ar), 116.32 (CN), 120.64 (CH, Ar), 121.86 (CH, Ar), 122,67 (CH, Ar), 123,94 (C, Ar), 130.93 (HC-N), 137.08 (C-N, Ar), 141.95 (HC=N), 163.78 (C=O).

3.2.2.3 LQIT-D.T.03:



Nome IUPAC: (E)-2-ciano-N'-((5-metil-1H-indol-3-il)metileno)acetohidrazida.

Fórmula Molecular: C₁₃H₁₂N₄O. Rendimento: 61,45%. Aspecto: Pó branco.

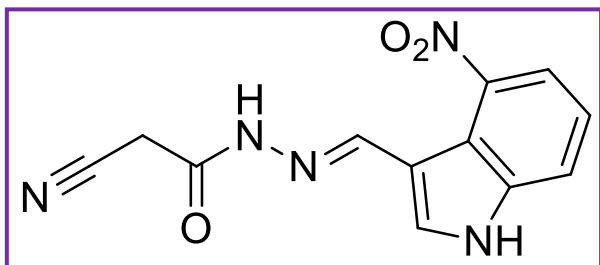
PF (°C): 213–216. Rf (6:4 AcOEt/Hexano): 0,51.

IV (KBr, cm^{-1}): 1245.5 (NH, Ar), 1614.5 (C=N), 1677.1 (HN-C=O), 2269.3 (CN), 3345.7 (NH).

RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6): δ 2.43 (s, 3H, CH_3), 4.21 (s, 2H, CH_2), 7.02 (d, 1H, J 8.4 Hz, ArH), 7.31 (d, 1H, J 8.1 Hz, ArH), 7.75 (s, 1H, ArNCH), 7.9 (s, 1H, ArH), 8.16 (s, 1H, N=CH), 11.43 (s, 1H, ArNH), 11.46 (s, 1H, NH).

RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6): δ 21.37 (CH_3), 24.42 (CH_2), 110.66 (C, Ar), 111.52 (CH, Ar), 116.36 (CN), 121.51 (CH, Ar), 124.16 (CH, Ar), 124.21 (C, Ar), 129.16 (C- CH_3 , Ar), 130.92 (HC-N), 135.4 (C-N, Ar), 142.13 (HC=N), 163.69 (C=O).

3.2.2.4 LQIT-D.T.04:



Nome IUPAC: (E)-2-ciano- N' -((4-nitro-1H-indol-3-il)metileno)acetohidrazida.

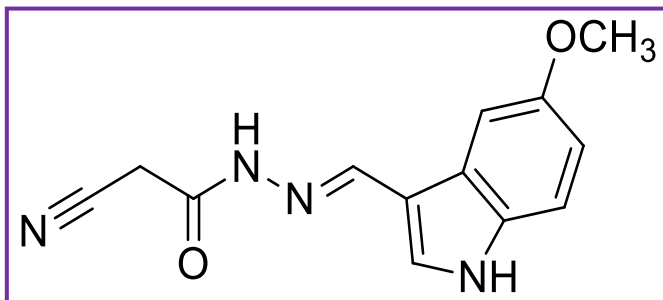
Fórmula Molecular: $\text{C}_{12}\text{H}_9\text{N}_5\text{O}_3$. Rendimento: 77,45%. Aspecto: Pó laranja escuro. PF (°C): 222–225. Rf (6:4 AcOEt/Hexano): 0,42.

IV (KBr, cm^{-1}): 1280.9 (NH, Ar), 1588.9 (C=N), 1675.6 (HN-C=O), 2259.6 (CN), 3268.4 (NH).

RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6): δ 4.1 (s, 2H, CH_2), 7.3 (d, 1H, J 8.4 Hz, ArH), 7.4 (d, 1H, J 7.5 Hz, ArH), 7.87 (t, 1H, J 7.95 Hz, ArH), 8.2 (s, 1H, ArNCH), 8.38 (s, 1H, N=CH), 11.6 (s, 1H, ArNH), 12.48 (s, 1H, NH).

RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6): δ 23.88 (CH_2), 109.79 (C, Ar), 116.18 (CN), 117.12 (C, Ar), 117.77 (CH, Ar), 118.66 (CH, Ar), 121,36 (CH, Ar), 132.23 (HC-N), 139.08 (C-N, Ar), 140.99 (HC=N), 142.1 (C- NO_2 , Ar), 163.92 (C=O).

3.2.2.5 LQIT-D.T.05:



Nome IUPAC: (*E*)-2-ciano-*N'*-((5-metoxi-1H-indol-3-il)metileno)acetohidrazida.

Fórmula Molecular: C₁₃H₁₂N₄O₂. Rendimento: 81,82%. Aspecto: Pó amarelo palha.

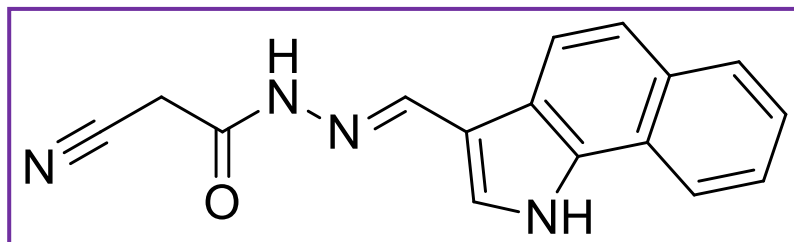
PF (°C): 212–214. R_f (6:4 AcOEt/Hexano): 0,42.

IV (KBr, cm⁻¹): 1254.6 (NH, Ar), 1620.2 (C=N), 1672.9 (HN-C=O), 2269.3 (CN), 3332.5 (NH).

RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 3.82 (s, 3H, CH₃), 4.21 (s, 2H, CH₂), 6.83 (d, 1H, *J* 8.7 Hz, ArH), 7.33 (d, 1H, *J* 8.7 Hz, ArH), 7.61 (s, 1H, ArH), 7.75 (s, 1H, ArNCH), 8.17 (s, 1H, N=CH), 11.46 (s, 2H, ArNH e NH).

RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ 24.78 (CH₂), 55.53 (CH₃), 103.81 (CH, Ar), 111.33 (C, Ar), 113.11 (CH, Ar), 116.76 (CN), 124.91 (C, Ar), 131.63 (HC-N, Ar), 132.31 (C-N, Ar), 142.46 (HC=N), 154.92 (C-OCH₃, Ar), 164.07 (C=O).

3.2.2.6 LQIT-D.T.06:



Nome IUPAC: (*E*)-*N'*-((1H-benzo[g]indol-3-il)metileno)-2-cianoacetohidrazida.

Fórmula Molecular: C₁₆H₁₂N₄O. Rendimento: 97,84%. Aspecto: Pó amarelo claro.

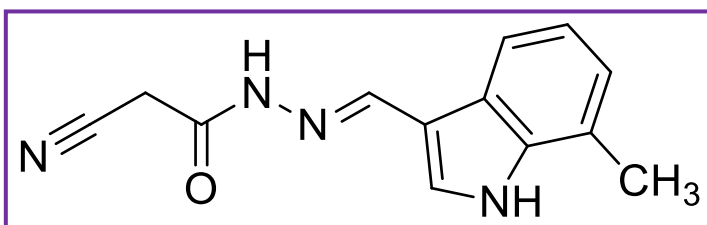
PF (°C): 240–242. R_f (6:4 AcOEt/Hexano): 0,36.

IV (KBr, cm⁻¹): 1221.2 (NH, Ar), 1621.4 (C=N), 1671.5 (HNC=O), 2262.8 (CN), 3316.0 (NH).

RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6): δ 4.28 (s, 2H, CH₂), 7.48 (d, 1H, J 8.1 Hz, ArH), 7.59 (t, 2H, J 8.85 Hz, ArH), 7.91 (s, 1H, ArNCH), 7.97 (d, 1H, J 8.1 Hz, ArH), 8.25 (d, 1H, J 9.0 Hz, ArH), 8.27 (s, 1H, N=CH), 8.40 (d, 1H, J 8.7 Hz, ArH), 11.54 (s, 1H, ArNH), 12.49 (s, 1H, NH).

RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6): δ 24.51 (CH₂), 112.76 (C, Ar), 116.35 (CN), 120.03 (C, Ar), 120.79 (CH, Ar), 121.47 (CH, Ar), 121.73 (C, Ar), 124.30 (CH, Ar), 125.65 (HC-N, Ar), 128.65 (CH, Ar), 128.59 (CH, Ar), 128.39 (CH, Ar), 131.86 (C-N, Ar), 141.96 (HC=N), 163.89 (C=O).

3.2.2.7 LQIT-D.T.07:



Nome IUPAC: (*E*)-2-ciano-*N'*-((7-metil-1H-indol-3-il)metileno)acetohidrazida.

Fórmula Molecular: C₁₃H₁₂N₄O. Rendimento: 69,03%. Aspecto: Pó amarelo palha.

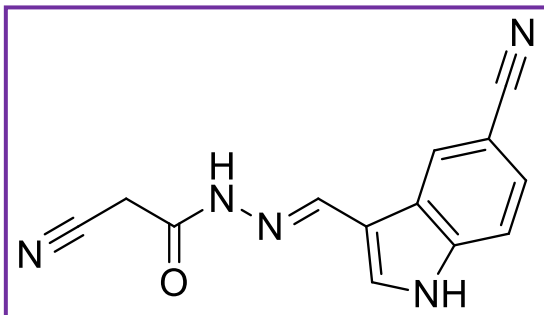
PF (°C): 219–221. R_f (6:4 AcOEt/Hexano): 0,31.

IV (KBr, cm⁻¹): 1236.9 (NH, Ar), 1618.7 (C=N), 1674.0 (HN-C=O), 2275.7 (CN), 3324.3 (NH).

RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6): δ 2.51 (s, 3H, CH₃), 4.23 (s, 2H, CH₂), 7.02 (d, 1H, J 7.2 Hz, ArH), 7.08 (t, 1H, J 7.35 Hz, ArH), 7.83 (s, 1H, ArNCH), 7.98 (d, 1H, J 7.5 Hz, ArH), 8.22 (s, 1H, N=CH), 11.48 (s, 1H, NH), 11.58 (s, 1H, ArNH).

RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6): δ 17.14 (CH₃), 24.84 (CH₂), 111.99 (C, Ar), 116.73 (CN), 119.86 (CH, Ar), 121.27 (CH, Ar), 121.42 (C-CH₃, Ar), 123.66 (CH, Ar), 124.15 (C, Ar), 131.09 (HC-N, Ar), 136.99 (C-N, Ar), 142.48 (HC=N), 164.18 (C=O).

3.2.2.8 LQIT-D.T.08:



Nome IUPAC: (E)-2-ciano-*N'*-((5-ciano-1H-indol-3-yl)metano)acetohidrazida.

Fórmula Molecular: C₁₃H₉N₅O. Rendimento: 98,07%. Aspecto: Pó amarelado.

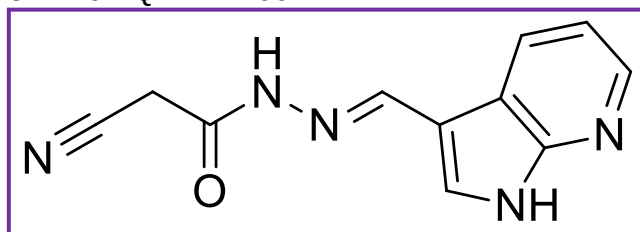
PF (°C): 247–249. R_f (6:4 AcOEt/Hexano): 0,22.

IV (KBr, cm⁻¹): 1247.6 (NH, Ar), 1621.8 (C=N), 1677.3 (HN-C=O), 2223.8 (CN), 3295.8 (NH).

RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 4.30 (s, 2H, CH₂), 7.55 (d, 1H, *J* 8.1 Hz, ArH), 7.61 (d, 1H, *J* 8.1 Hz, ArH), 8.02 (s, 1H, ArNCH), 8.19 (s, 1H, ArH), 8.51 (s, 1H, N=CH), 11.56 (s, 1H, ArNH), 12.08 (s, 1H, NH).

RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ 25,00 (CH₂), 103.28 (C-CN, Ar), 112.26 (C, Ar), 113.68 (CH, Ar), 116.81 (CN), 120.92 (CN), 124.03 (C, Ar), 126.07 (CH, Ar), 127.40 (CH, Ar), 133.45 (HC-N), 139.26 (C-N, Ar), 141.39 (HC=N), 164.49 (C=O).

3.2.2.9 LQIT-D.T.09:



Nome IUPAC: (E)-*N'*-((1H-pirrol[2,3-b]piridina-3-yl)metano)-2-cianoacetohidrazida.

Fórmula Molecular: C₁₁H₉N₅O. Rendimento: 79,1%. Aspecto: Pó branco.

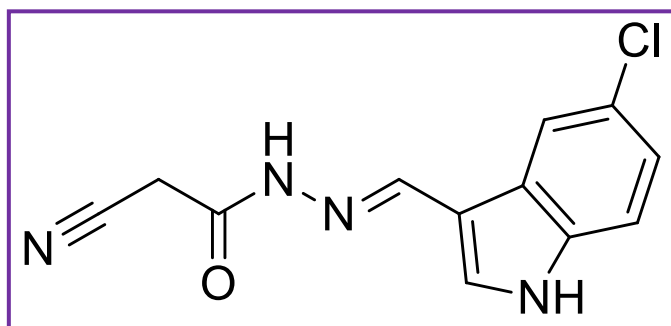
PF (°C): 244–246. R_f (6:4 AcOEt/Hexano): 0,38.

IV (KBr, cm⁻¹): 1260.1 (NH, Ar), 1580.4 (C=N), 1667.5 (HN-C=O), 2259.6 (CN), 3145.3 (NH).

RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6): δ 4.25 (s, 2H, CH₂), 7.21 (t, 1H, J 7.2 Hz, ArH), 7.96 (s, 1H, ArNCH), 8.16 (s, 1H, N=CH), 8.31 (d, 1H, J 6.9 Hz, ArH), 8.47 (d, 1H, J 7.5 Hz, ArH), 11.58 (s, 1H, ArNH), 12.07 (s, 1H, NH).

RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6): δ 24.92 (CH₂), 110.42 (C, Ar), 110.47 (C, Ar), 116.73 (CN), 117.38 (CH, Ar), 129.29 (HC-N, Ar), 131.42 (CH, Ar), 141.83 (CH, Ar), 144.44 (HC=N), 149.74 (C-N, Ar), 164.41 (C=O).

3.2.2.10 LQIT-D.T.10:



Nome IUPAC: (*E*)-2-ciano-*N'*-((5-cloro-1H-indol-3-il)metileno)acetohidrazida.

Fórmula Molecular: C₁₂H₉N₄OCl. Rendimento: 98,23%. Aspecto: Pó amarelo claro.

IV (KBr, cm⁻¹): 1231.8 (NH, Ar), 1618.3 (C=N), 1684.5 (HN-C=O), 2279.1 (CN), 3302.0 (NH).

RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6): δ 4.22 (s, 2H, CH₂), 7.21 (d, 1H, J 8.7 Hz, ArH), 7.46 (d, 1H, J 8.7 Hz, ArH), 7.90 (s, 1H, ArNCH), 8.07 (s, 1H, ArH), 8.16 (s, 1H, N=CH), 11.5 (s, 1H, ArNH), 11.76 (s, 1H, NH).

RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6): δ 24.36 (CH₂), 110.78 (C, Ar), 113.46 (CH, Ar), 116.23 (CN), 120.80 (CH, Ar), 122.68 (CH, Ar), 124.0 (C, Ar), 125.21 (C-Cl, Ar), 132.36 (HC-N, Ar), 135.51 (C-N, Ar), 141.44 (HC=N), 163.76 (C=O).

3.3 PARTE BIOLÓGICA

3.3.1 Testes *in vitro*

3.3.1.1 Citotoxicidade em Macrófagos J774

Macrófagos J774 (1×10^4 células / poço) foram distribuídos em placas de 96 poços em meio DMEM. Cada composto foi solubilizado em 1% de solução mãe de DMSO. Como controle positivo, a violeta de genciana foi testada, enquanto que, como controle negativo, os poços receberam apenas DMSO e meio DMEM. A placa foi então cultivada durante 72 horas, a 37°C e 5% de CO₂. Em seguida, foram adicionados 20 µL de AlamarBlue em cada poço e a placa foi incubada durante mais 4 horas. A placa foi lida no leitor de placas a 570 e 600 nm. Os valores de CC₅₀ foram calculados no GraphPad Prism versão 5.0, San Diego, Califórnia, EUA (PLUTÍN et al., 2017).

3.3.1.2 Teste de inibição da linfoproliferação

Esplenócitos de camundongos BALB/c (5×10^6 células/poço, em 200µL) foram cultivados em meio DMEM e em placa de 96 poços, em triplicatas, na presença ou não de concanavalina A (2 µg/mL) e também em presença ou não das substâncias analisadas. Após 48 horas de incubação em estufa a 37°C e 5% de CO₂, foi adicionado às culturas 1 µCi de [metil- H] timidina dando início a um novo período de 12 horas de incubação em estufa. Após esse período, as células foram coletadas para quantificação da proliferação, através da determinação da incorporação de timidina. O percentual de inibição foi determinado relacionando a incorporação de timidina das culturas tratadas com as substâncias avaliadas e a incorporação das culturas somente estimuladas. A dexametasona foi utilizada como controle positivo.

3.3.1.3 Ensaio de inibição das Cicloxigenases 1 e 2

O teste para atividade inibitória para COX-1 e COX-2 foi realizado de acordo com Ayoub et al. (2010). Resumidamente, todos os compostos e controles positivos (indometacina e celocoxib) foram solubilizados em DMSO e testados em triplicata a uma concentração de 25 μ M. COX-1 ou COX-2 (Sigma-Aldrich) foram adicionadas em 180 μ L do tampão de ensaio contendo 5 mM de hematina (Sigma-Aldrich), 100 mM do tampão Tris-HCl, pH 8,0. Após a adição do composto de teste ou controle positivo (10 μ L), a mistura reacional foi incubada durante 5 min à temperatura ambiente. A reação foi iniciada pela adição de 5 μ L de solução de ácido araquidônico (Sigma-Aldrich) dissolvido em metanol e dihidrocloreto de N,N,N',N'-Tetrametil-p-fenilenodiamina (TMPD). Após a incubação durante 1 hora, a mistura reacional teve a sua absorbância medida a 610 nm. Os compostos que inibiram 50% da atividade COX-1 ou 2 tiveram seus valores de IC₅₀ calculados usando o software ORIGIN 8.0 (OriginLab Corporation).

3.3.2 Testes *in vivo*

3.3.2.1 Animais

Os experimentos foram conduzidos com camundongos machos *Swiss Mus musculus* (20-35g) obtidos a partir do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA/UFPE). Os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Antibióticos/UFPE (Recife, Brasil), em condições controladas (22 $\pm$ 3°C para 12h de ciclo de luz/escuridão, acesso gratuito a alimentos e água). Todos os animais utilizados para a determinação de atividades anti-inflamatórias e antinociceptivas foram submetidos a jejum durante 4h antes da experimentação. O Comitê de Estudos Animais da Universidade Federal de Pernambuco aprovou os protocolos experimentais (número 23076.017928/2010-25). Os animais foram tratados de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da COBEA (Colégio Brasileiro de

Experimentos com Animais) e as normas do Instituto Nacional de Saúde Guia de Cuidados e Uso de Animais de Laboratório.

3.3.2.2 Toxicidade aguda por via oral

Foi adotado um procedimento de dose fixa para avaliar a toxicidade oral aguda dos compostos LQIT-D.T.01 e LQIT-D.T.02 de acordo com as Diretrizes da Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE) para o Teste de Produtos Químicos (OECD, 2002). Grupos de 3 camundongos foram usados em um procedimento por etapas usando a dose fixa de 2000 mg/Kg. Os sinais e condições clínicas associados à dor, ao sofrimento e à morte iminente são descritos em detalhes em um documento de orientação da OCDE separado (OECD, 2000). O teste foi realizado em duplicata.

3.3.2.3 Ensaio de inflamação aguda

O teste de edema de pata induzido por carragenina em camundongos *Swiss Mus musculus* foi utilizado para avaliar a atividade anti-inflamatória de LQIT-D.T.01 e LQIT-D.T.02. Foram utilizados oito grupos de camundongos ($n = 8$). Os animais receberam por via oral LQIT-D.T.01 ou LQIT-D.T.02 nas doses de 15, 30 e 60 mg/kg. O padrão utilizado foi a indometacina na dose de 10 mg/kg. O grupo controle recebeu apenas o veículo (salina + DMSO 5%). Uma hora após o tratamento, a inflamação foi induzida por uma injeção intraplantar de 50 μ L de carragenina (1%) na pata posterior direita (WINTER; RISLEY; NUSS, 1962). O volume da pata foi medido antes da injeção do agente flogístico e durante 5 horas consecutivas após a administração da carragenina. O volume do edema foi registrado em mililitros (mL), através de um pletismômetro (Ugo Basile, Itália). A pata posterior do animal foi submersa até a junção tíbio-tarsal, na câmara de leitura do aparelho. O volume de líquido deslocado foi registrado digitalmente e correspondeu ao volume da pata.

3.3.2.4 *Análise de dados*

Os resultados experimentais foram expressos como a média $\pm$ erro padrão (SE) e pela análise de variância (ANOVA), de sentido único e bidirecional, seguidos pelos testes de Tukey ou Bonferroni. Os valores de P inferiores a 0,05 ($p < 0,05$) foram considerados indicativos de significância e representados por: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. Os cálculos foram realizados usando o software estatístico GraphPad Prism versão 5.0, San Diego, Califórnia, EUA.

3.3.3 *Estudos in silico*

3.3.3.1 *Análise de Docking Molecular e ADME in silico*

Para fortalecer ainda mais os resultados de nossos estudos *in vitro*, também realizamos análises de interação molecular *in silico* nos compostos LQIT-D.T.01 e LQIT-D.T.02 e proteínas COX usando AutoDock4.2.6 (MORRIS et al., 2009) em combinação com o algoritmo genético Lamarckiano (LGA). Os perfis ADME destes compostos também foram investigados com o uso das plataformas web SwissADME (DAINA; MICHIELIN; ZOETE, 2017) e pkCSM (PIRES; BLUNDELL; ASCHER, 2015) e do software Osiris Data Warrior (SANDER et al., 2015).

3.3.3.2 *Docking Molecular*

3.3.3.2.1 *Preparação da estrutura do ligante*

As estruturas dos compostos de teste foram construídas com o software Avogadro 1.2.0 (HANWELL et al., 2012) e totalmente otimizadas com o método semi-empírico PM6 (STEWART, 2007) implementado no MOPAC2016 (STEWART, 2016). Os ligantes otimizados foram salvos como arquivos pdb. Com o uso do AutoDockTools-1.5.6, os hidrogênios apolares foram fundidos com os carbonos correspondentes, então a carga parcial de átomos foi calculada usando o

procedimento Gasteiger implementado no pacote AutoDockTools. As ligações rotativas dos ligantes foram definidas, as estruturas foram salvas como pdbqt e usadas para estudos de docking.

3.3.3.2.2 Preparação da estrutura da proteína

As estruturas cristalinas de Celecoxibe co-cristalizado para COX-1 (PDB ID: 3KK6) e COX-2 (PDB ID: 3LN1) foram retiradas do RCSB Protein Data Bank. Com o uso do Dassault Systèmes BIOVIA Discovery Studio Visualizer (v16.1.0.15350) (BIOVIA, 2016), moléculas de água e outros heteroátomos foram removidos. Então, usando AutoDockTools, os hidrogênios não polares foram fundidos e os hidrogênios polares foram adicionados à estrutura das proteínas. As cargas de Kollman foram adicionadas e a estrutura foi salva como pdbqt para os estudos de docking.

3.3.3.2.3 Procedimento do docking

A grade 3D foi criada pelo Algoritmo de Gráfico Automático para gerar o arquivo de parâmetros da grade. O espaçamento da malha foi de 0,0375 nm em cada dimensão, e cada mapa da grade consistiu em um ponto de grade de $70 \times 70 \times 70$. O centro da grade foi ajustado para a posição do ligante co-cristalizado localizado na Corrente A em cada caso.

O algoritmo genético lamarckiano no AutoDock 4.2.2 foi aplicado para buscar a melhor conformação e orientação dos ligantes. A otimização global foi iniciada com uma população de 150 indivíduos posicionados aleatoriamente com um máximo de 2500.000 avaliações de energia e um máximo de 27000 gerações. Durante cada experimento de docking, 100 execuções foram realizadas. As posições de encaixe resultantes foram analisadas usando AutoDockTools e Discovery Studio Visualizer.

Para validar o procedimento de acoplamento, o ligante co-cristalizado celecoxibe foi previamente acoplado a cada proteína. Nesse caso, um mapa de grade de $126 \times 126 \times 126$ foi usado e 250 execuções foram realizadas.

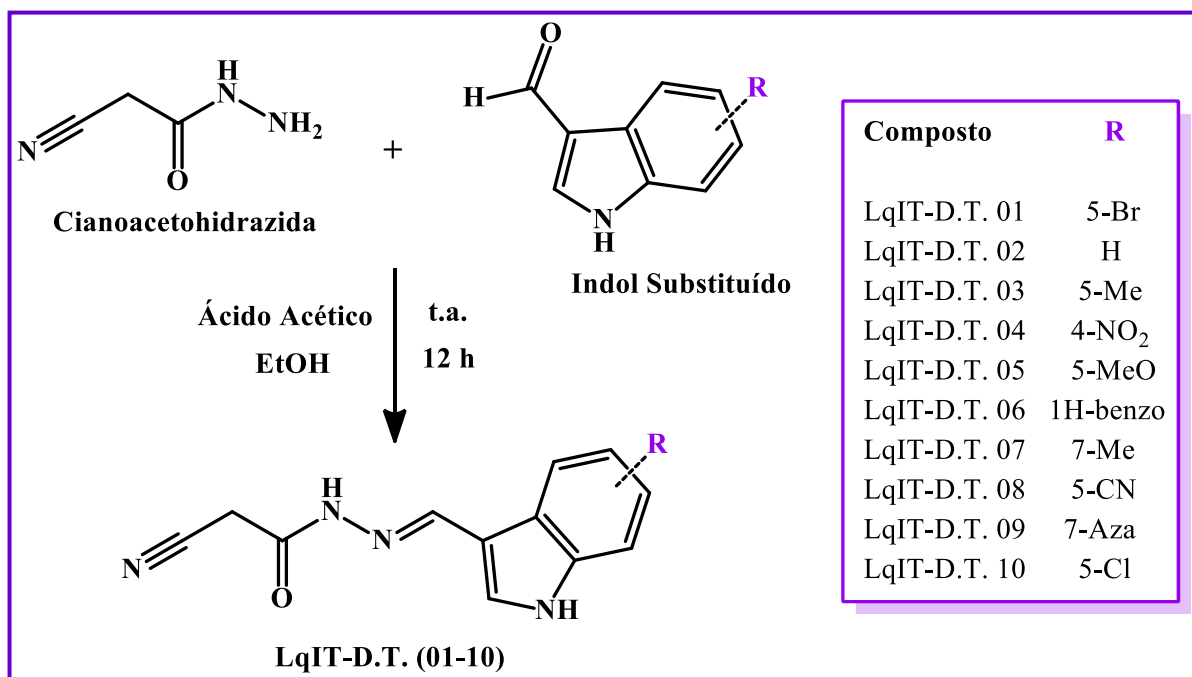
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 PARTE QUÍMICA

4.1.1 Obtenção da Série Química

O **esquema 01** mostra os procedimentos sintéticos utilizados para preparar as indol-*N*-acilhidrazonas LQIT-D.T.(01-10) a partir da reação de adição nucleofílica entre a cianoacetohidrazida e 10 diferentes indóis substituídos. Para que essa reação ocorra da maneira esperada, é necessária a utilização de ácido acético como catalisador e de etanol como solvente. As sínteses foram realizadas em temperatura ambiente, sob agitação magnética e com duração de 12 horas para cada composto obtido.

Esquema 01: Síntese das indol-*N*-acilhidrazonas **LQIT-D.T.(01-10)**. Reagentes: cianoacetohidrazida e 10 indóis substituídos. Catalisador: AcOH. Solvente: etanol. Condições reacionais: temperatura ambiente, agitação constante, 12h, rendimentos entre 61-98%.



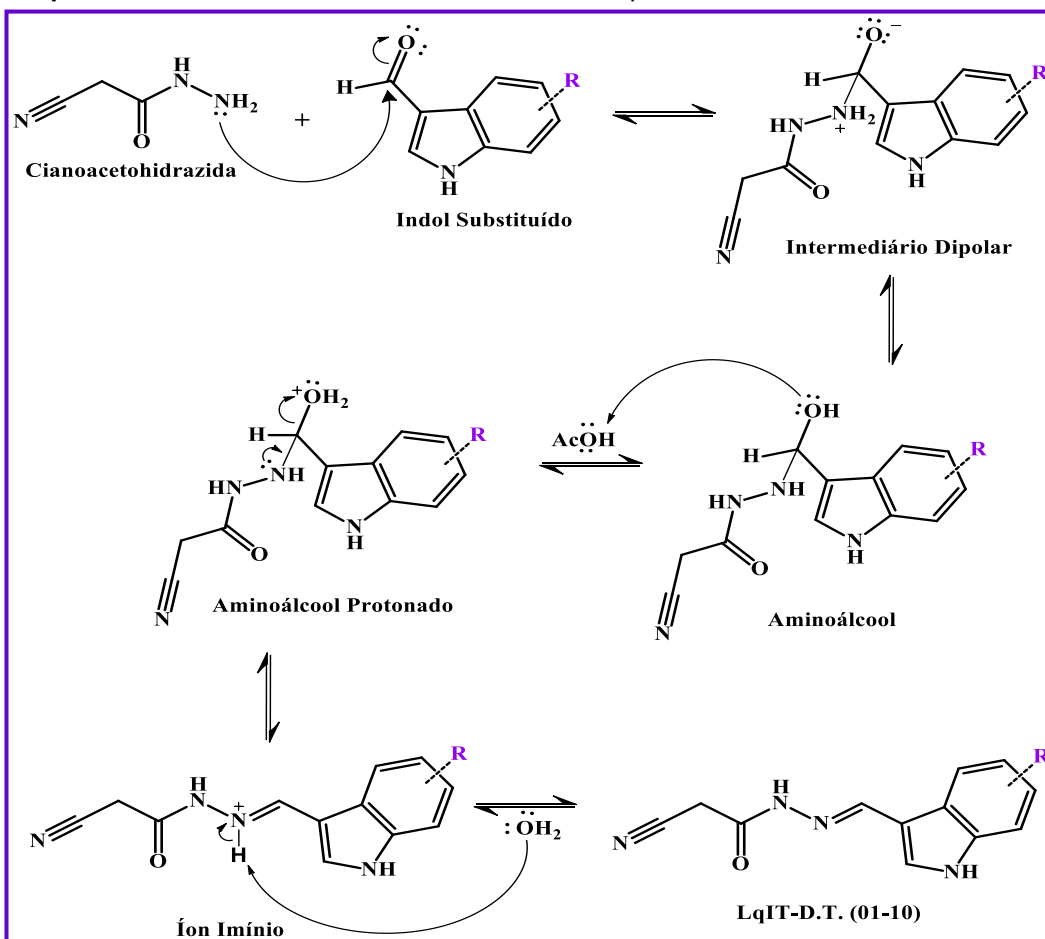
Fonte: Elaborado pelo autor.

4.1.1.1 Mecanismo Reacional

As reações de formação de iminas ocorrem a partir da adição nucleofílica de uma amina primária a um grupo carbonila de um aldeído ou de uma cetona.

Na obtenção da série de compostos indólicos-*N*-acilhidrazônicos (LQIT-D.T.01-10), os reagentes que representaram o grupamento aldeído foram os 10 indóis substituídos e a amina primária foi representada pela cianoacetohidrazida. Para que essa reação ocorra de maneira mais rápida, o pH indicado é entre 4 e 5 e por esse motivo o meio foi levemente acidificado pela adição de ácido acético. O solvente utilizado foi o etanol, que possui polaridade muito semelhante à das moléculas de água eliminadas no decorrer da reação que é representada mecanisticamente no **esquema 02** (SOLOMONS; FRYHLE, 2012).

Esquema 02: Mecanismo reacional da série de compostos indólicos-*N*-acilhidrazônicos.



Fonte: Elaborado pelo autor.

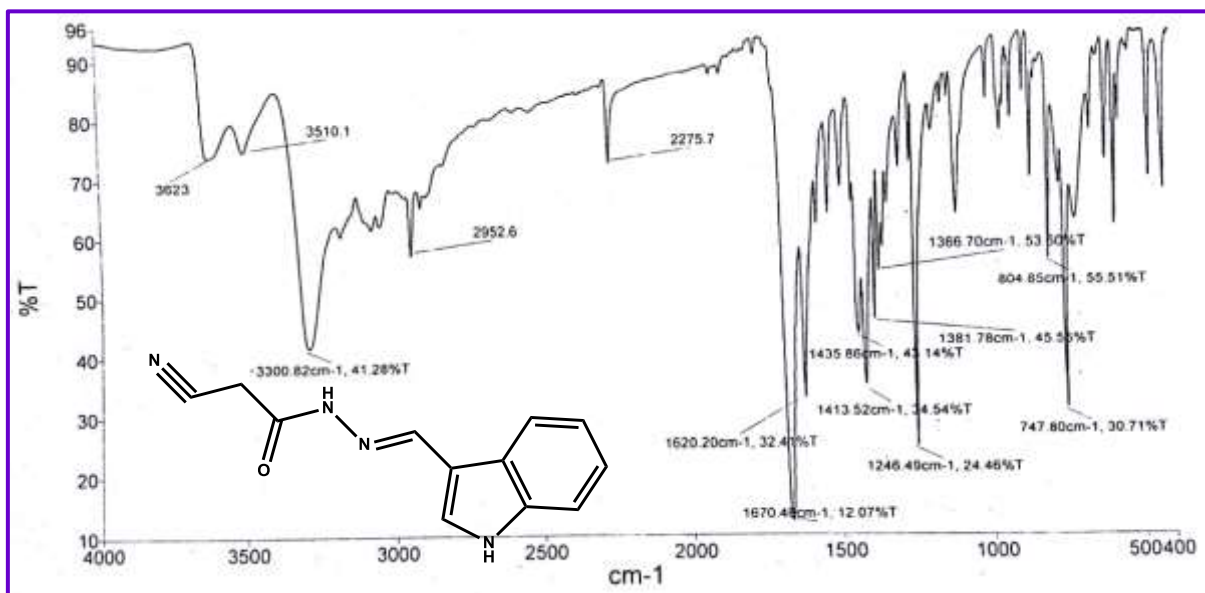
4.1.2 Caracterização Estrutural

A caracterização da série LQIT-D.T.01-10 será exemplificada a partir da caracterização do composto LQIT-D.T.02, onde todos os sinais referentes ao isômero *E* da molécula serão devidamente detalhados.

4.1.2.1 Infravermelho (Composto LQIT-D.T.02)

Através da análise espectroscópica na região do infravermelho foi possível constatar as principais bandas de absorção (**figura 13**). Em 1246.5 cm^{-1} observou-se a banda característica do N-H do aromático e em 1620.2 cm^{-1} a banda sugestiva para o estiramento da função imina ($\text{C}=\text{N}$). A banda presente na frequência de 1670.5 cm^{-1} é característica do grupamento amida ($\text{HN}-\text{C}=\text{O}$). Em 2275.7 cm^{-1} observou-se a banda característica de radical ciano (CN). A banda presente na frequência de 3300.8 cm^{-1} é sugestiva de deformação axial N-H de cadeia alifática.

Figura 13: Espectro de infravermelho da molécula LQIT-D.T.02.

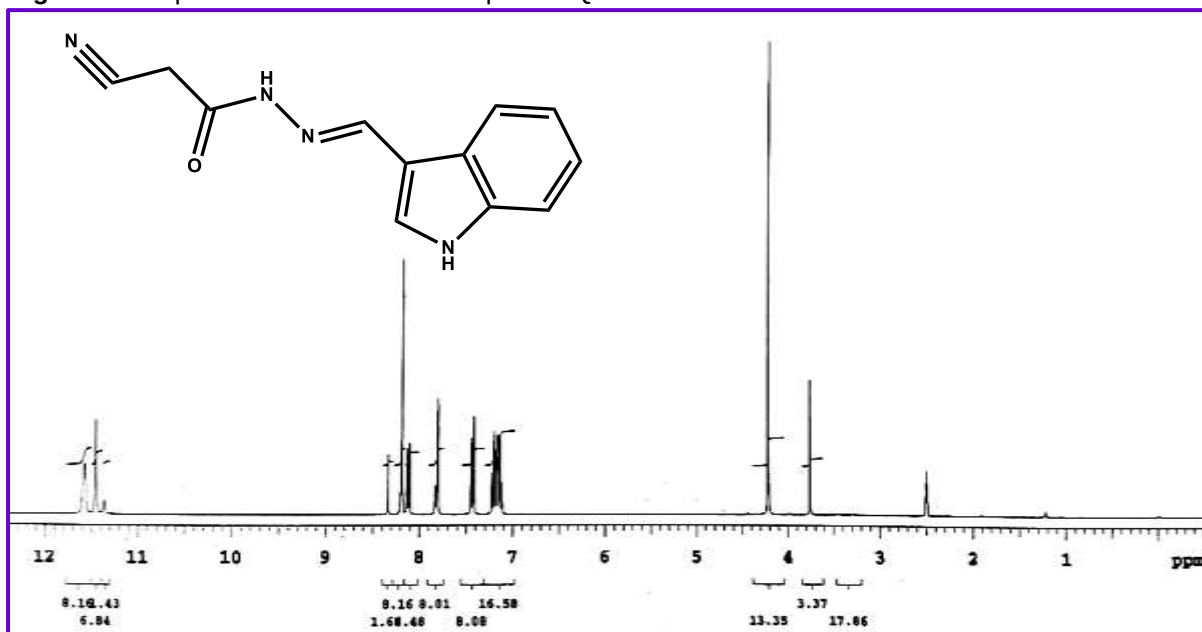


Fonte: Análise realizada pelo Departamento de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

4.1.2.2 RMN ^1H (Composto LQIT-D.T. 02)

A figura 14 apresenta os valores do espectro de RMN ^1H do composto LQIT-D.T. 02, no qual foi confirmado um total de 10 hidrogênios do isômero *E* da molécula, a partir das integrações para cada sinal.

Figura 14: Espectro de RMN ^1H do composto LQIT-D.T.02.



Fonte: Análise realizada pelo Departamento de Química Fundamental da UFPE.

Na **figura 15** é possível observar a presença de um singlete em 4.22, integrando para dois hidrogênios, referente ao radical metileno ligado ao grupo ciano. Os sinais em 3.76 e em 2.50 correspondem respectivamente ao isômero *Z* da molécula e ao DMSO- d^6 .

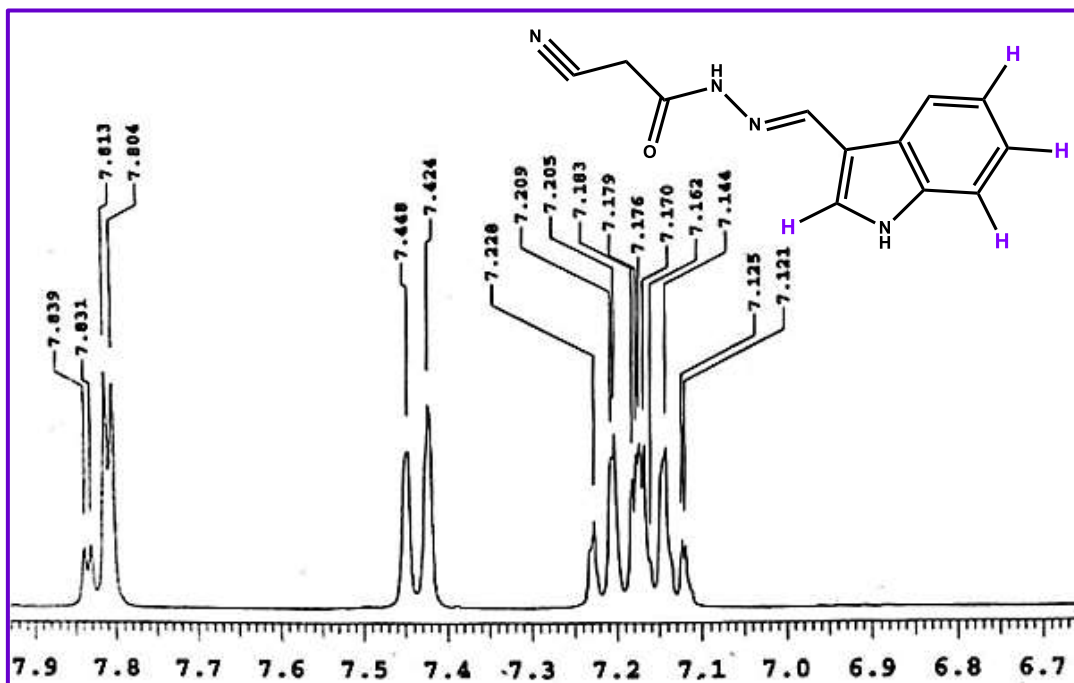
Figura 15: Porção ampliada do espectro de RMN ^1H do composto LQIT-D.T.02.



Fonte: Análise realizada pelo Departamento de Química Fundamental da UFPE.

Na **figura 16**, os tripletos em 7.15 e 7.2, integrando para um hidrogênio cada, representam dois metinos do anel aromático. Em 7.44 encontra-se um dubleto correspondente a outro metino do aromático. O singlete em 7.81 refere-se ao hidrogênio do metino ligado à amina aromática.

Figura 16: Porção ampliada do espectro de RMN ^1H do composto LQIT-D.T.02.

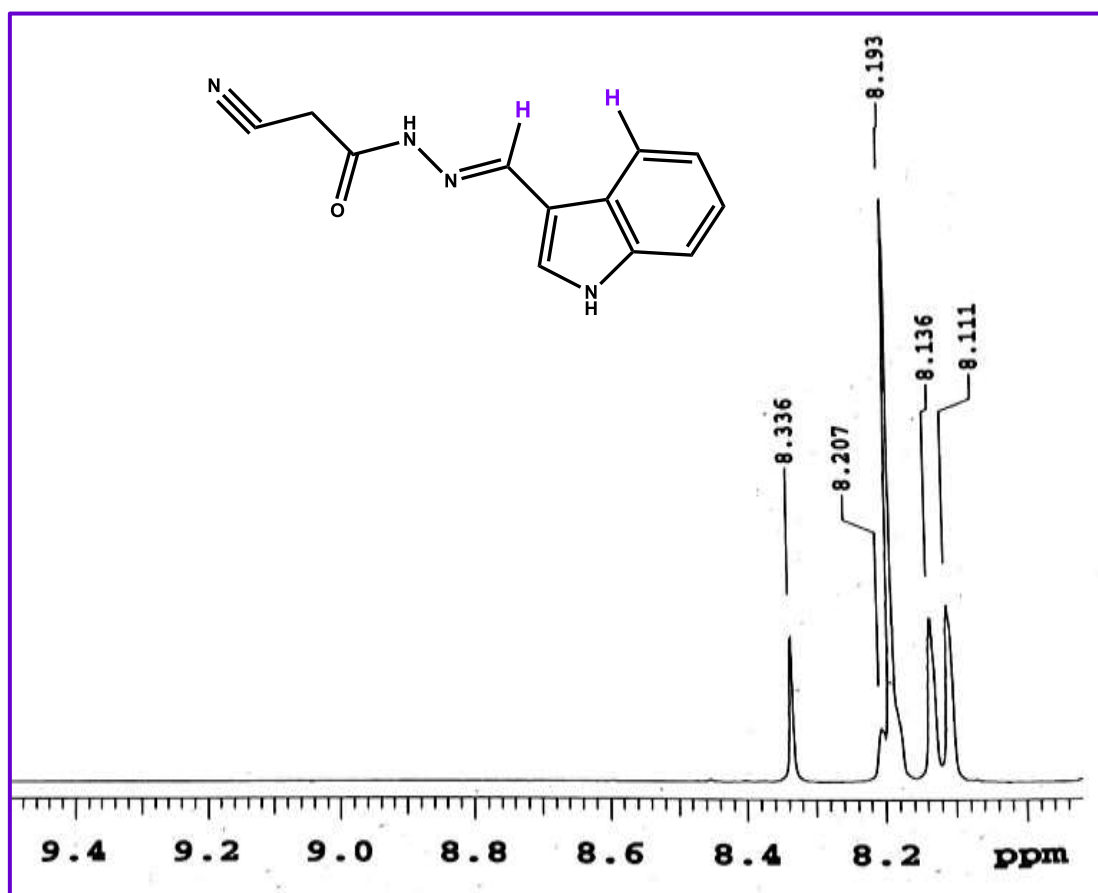


Fonte: Análise realizada pelo Departamento de Química Fundamental da UFPE.

Na **figura 17** pode-se observar um dubleto em 8.12 que corresponde a um dos metinos do aromático, enquanto o singlete em 8.19 é referente ao hidrogênio do carbono da imina. O sinal em 8.34 representa o hidrogênio do carbono da imina do isômero Z.

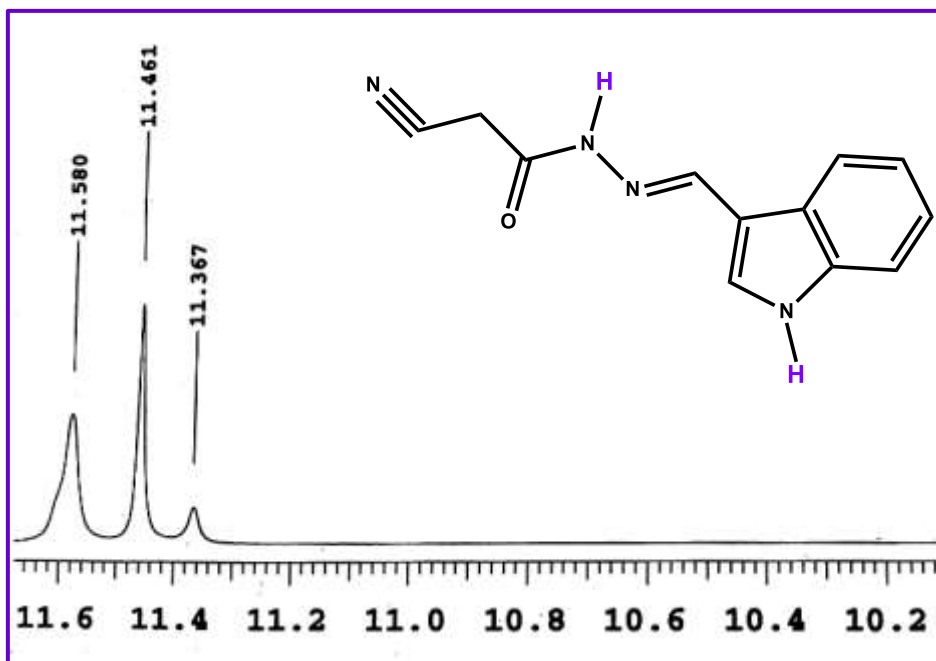
Na **figura 18** os sinais em 11.46 e 11.58 correspondem a dois singletos que representam respectivamente o hidrogênio da amida e o hidrogênio ligado a amina aromática. O sinal em 11.37 representa os hidrogênios ligados aos nitrogênios do isômero Z.

Figura 17: Porção ampliada do espectro de RMN ^1H do composto LQIT-D.T.02.



Fonte: Análise realizada pelo Departamento de Química Fundamental da UFPE.

Figura 18: Porção ampliada do espectro de RMN ^1H do composto LQIT-D.T.02.



Fonte: Análise realizada pelo Departamento de Química Fundamental da UFPE.

4.1.2.3 DEPT e RMN ^{13}C (Composto LQIT-D.T.02)

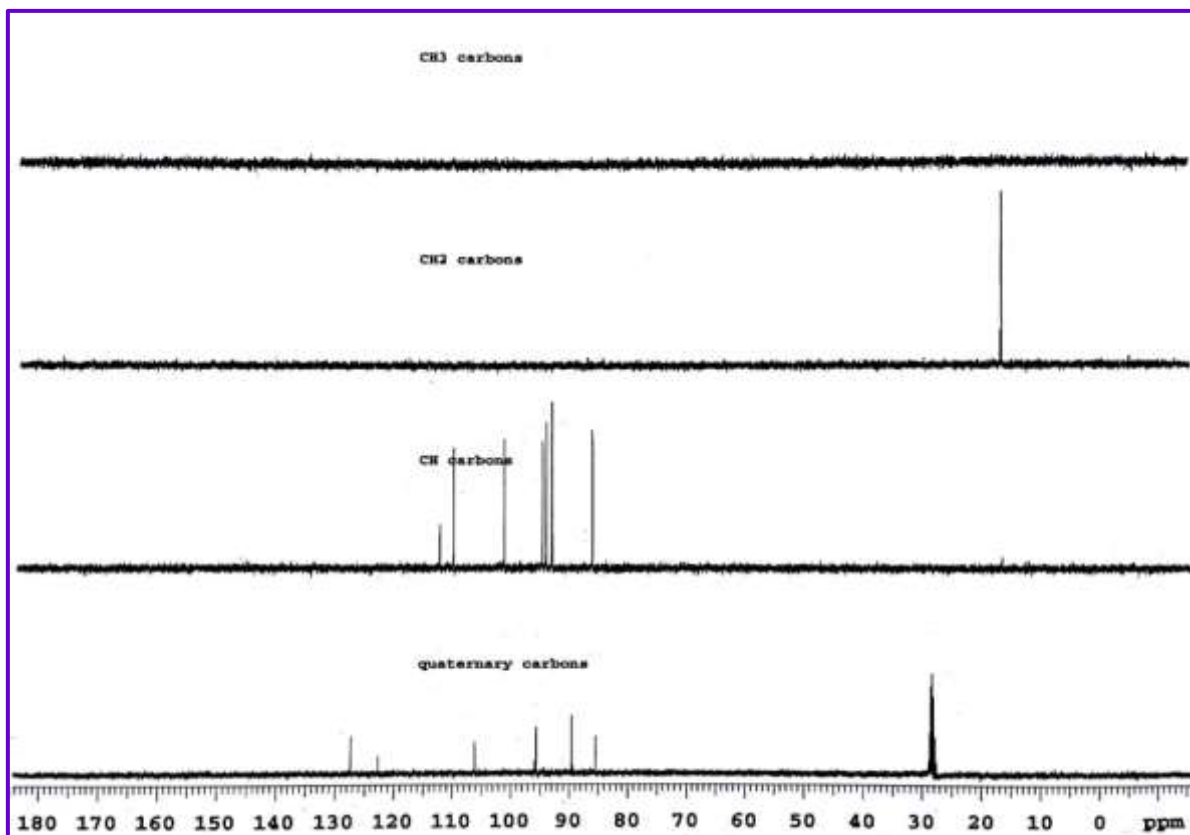
Para confirmação dos carbonos presentes na molécula LQIT-D.T.02, foi realizada a análise de DEPT (**figura 19**) e de Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13 (**figuras 20, 21, 22 e 23**). A seguir serão detalhados todos os picos relativos ao isômero *E* da molécula LQIT-D.T.02.

A análise do DEPT foi muito útil na localização e distinção dos carbonos secundários, terciários e quaternários. Também foi possível confirmar a ausência de carbono primário para a maioria das moléculas da série.

Dessa forma, ao analisar o DEPT da molécula LQIT-D.T.02 na **figura 19**, é possível comprovar a ausência de carbono primário e a presença de um carbono secundário, seis carbonos terciários e cinco carbonos quaternários.

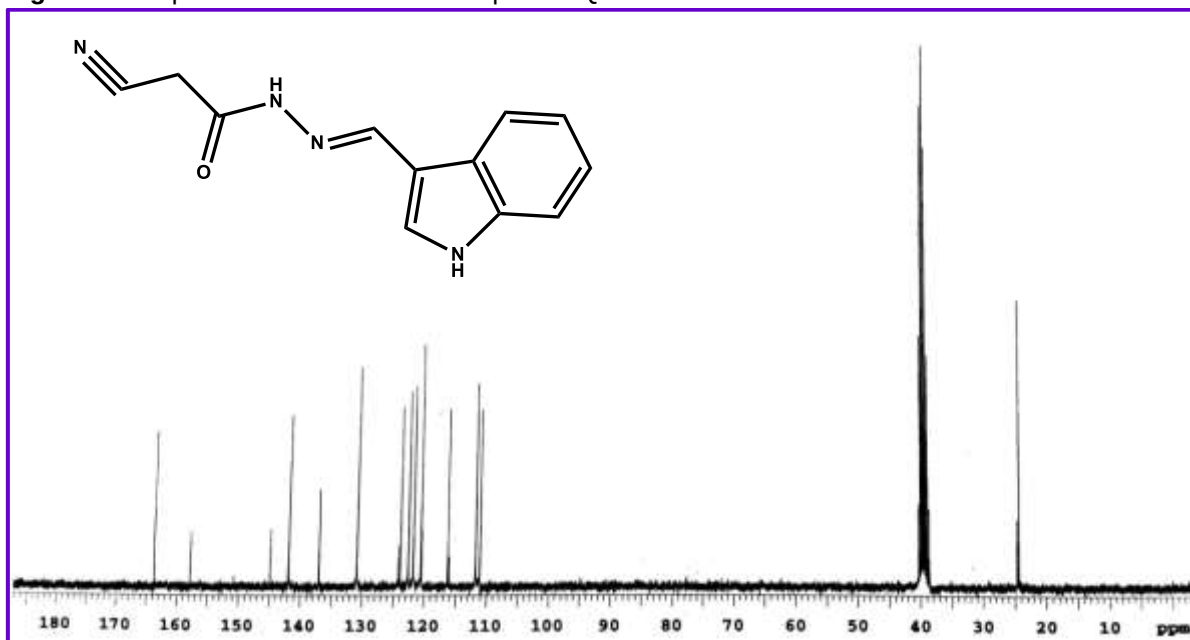
Na **figura 20** pode-se observar todo o espectro de RMN ^{13}C , com todos os dez picos relativos ao isômero *E* da molécula LQIT-D.T.02, enquanto nas **figuras 21, 22 e 23**, são observadas porções ampliadas do espectro onde é possível um melhor detalhamento dos picos.

Figura 19: Espectro de DEPT do composto LQIT-D.T.02.



Fonte: Análise realizada pelo Departamento de Química Fundamental da UFPE.

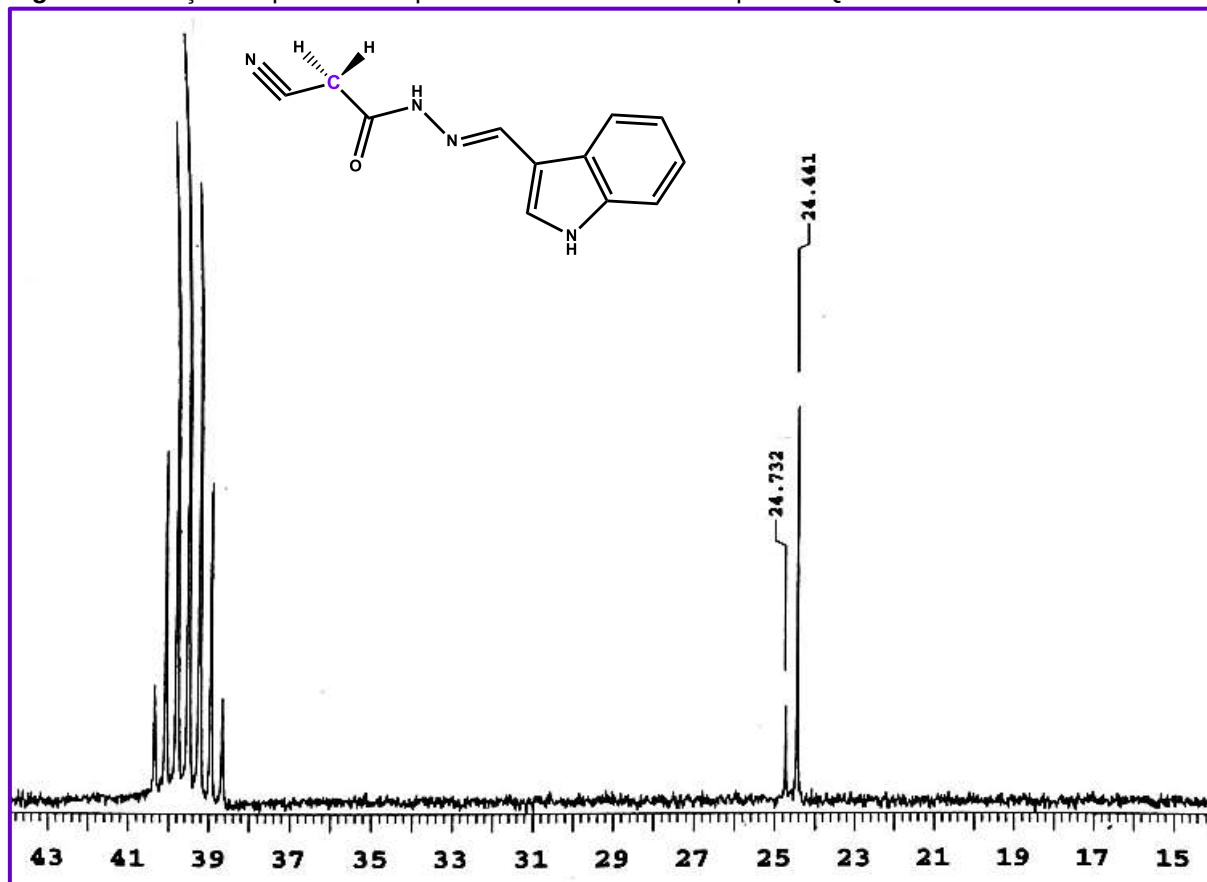
Figura 20: Espectro de RMN ^{13}C do composto LQIT-D.T.02.



Fonte: Análise realizada pelo Departamento de Química Fundamental da UFPE.

Na **figura 21**, pode ser observado um pico em 24.44 ppm, correspondente ao único carbono secundário presente na molécula. Em 24.73 observa-se o pico correspondente ao mesmo carbono no isômero Z.

Figura 21: Porção ampliada do espectro de RMN ^{13}C do composto LQIT-D.T.02.

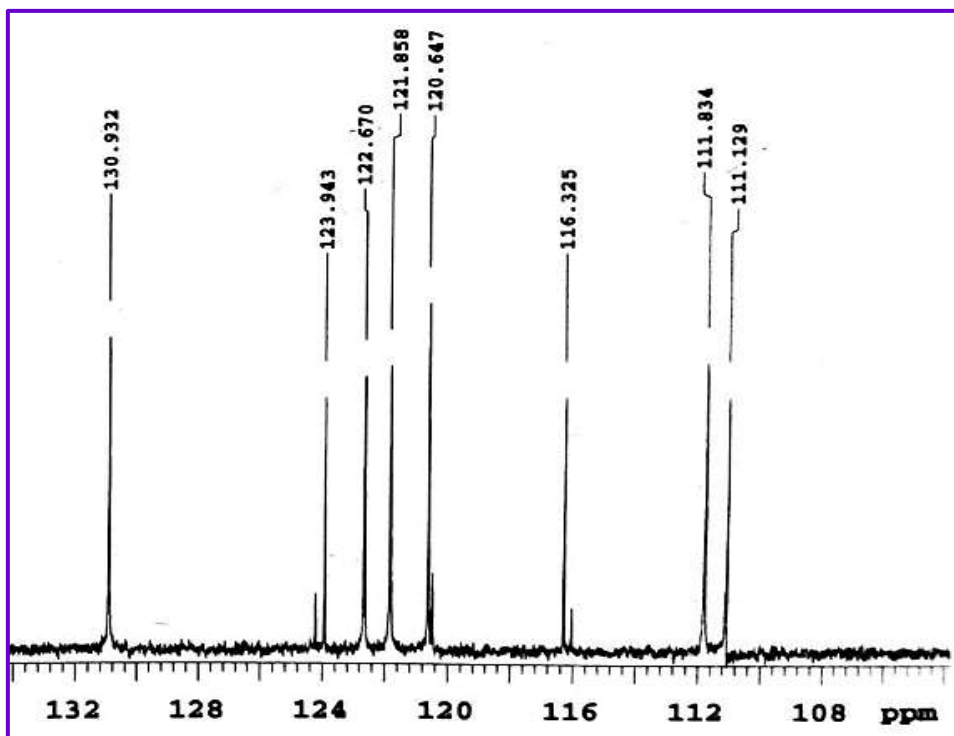


Fonte: Análise realizada pelo Departamento de Química Fundamental da UFPE.

Na **figura 22**, estão concentrados praticamente todos os picos pertencentes a molécula e cada um deles está detalhado na parte experimental.

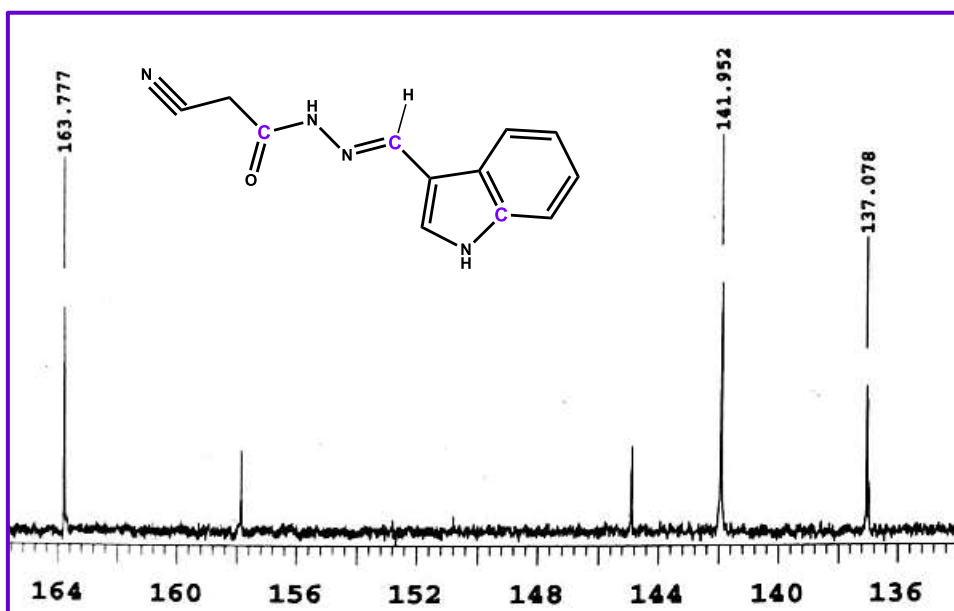
Na **figura 23**, podem ser visualizados picos em 137.08 (correspondente ao carbono quaternário ligado a amina aromática), em 141.95 (relativo ao carbono terciário ligado a amina terciária por uma dupla ligação) e em 163.78 relativo ao radical acila.

Figura 22: Porção ampliada do espectro de RMN ^{13}C do composto LQIT-D.T.02.



Fonte: Análise realizada pelo Departamento de Química Fundamental da UFPE.

Figura 23: Porção ampliada do espectro de RMN ^{13}C do composto LQIT-D.T.02.



Fonte: Análise realizada pelo Departamento de Química Fundamental da UFPE.

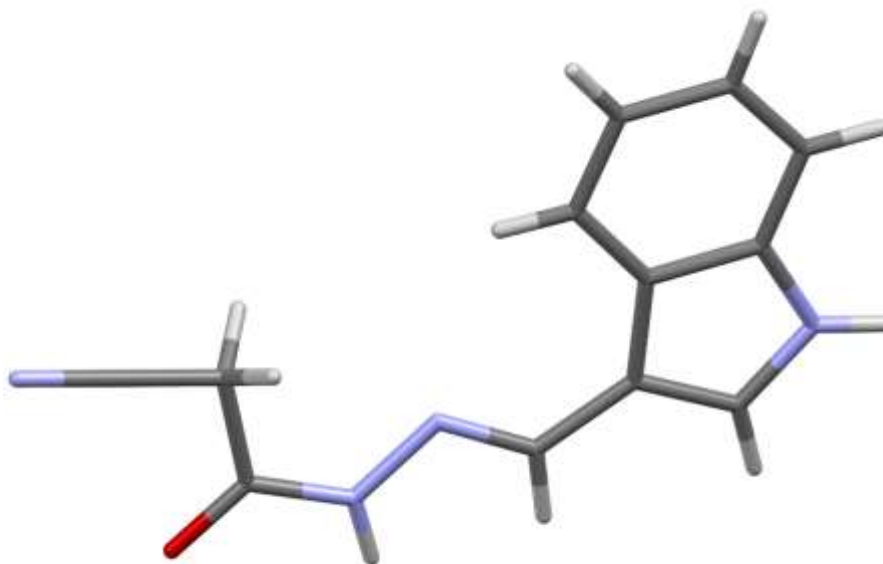
4.1.2.4 Cristalografia de Raios-X (Composto LQIT-D.T.02)

Foi possível observar para toda a série de 10 moléculas a formação dos diastereoisômeros *Z* e *E*. A ocorrência desses dois isômeros em diferentes proporções foi confirmada através da análise dos espectros de RMN ^1H , RMN ^{13}C , COZY e HMBC. O isômero na configuração *E* apresentou-se em maior proporção (3:1) para as moléculas estudadas, provavelmente devido a sua maior estabilidade espacial e a análise por cristalografia de raios-X de um cristal obtido da indol-*N*-acilhidrazona LQIT-D.T.02 confirmou a maior estabilidade desse diastereoisômero.

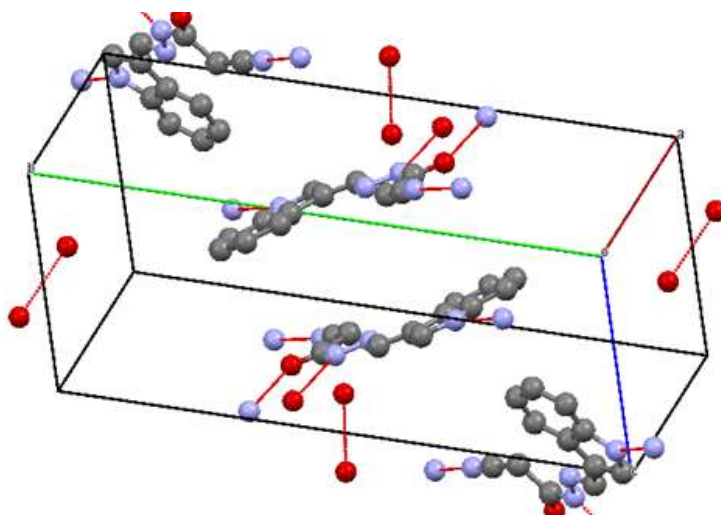
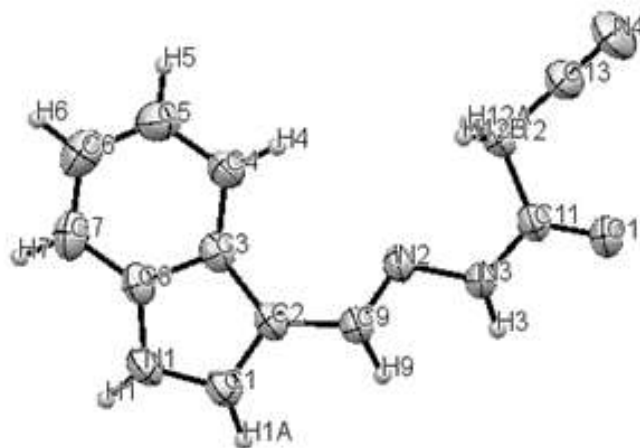
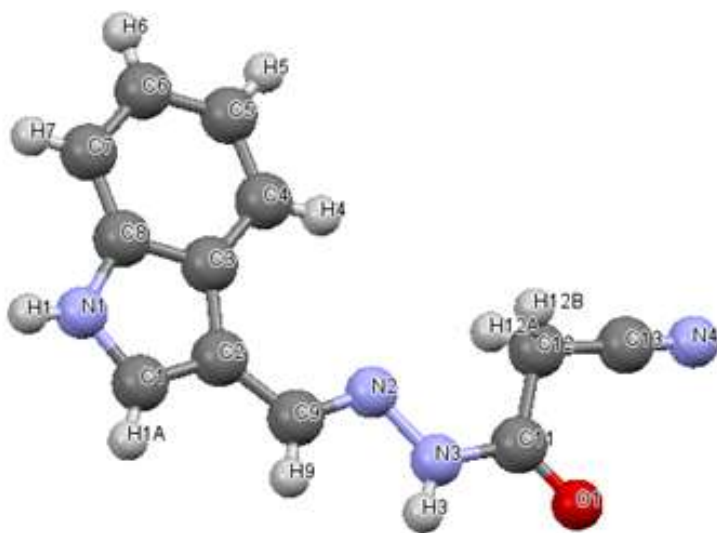
A partir do diagrama B da **figura 24**, é possível visualizar o átomo de C (2) na posição antiperiplanar ao átomo N (3), portanto, a indol-*N*-acilhidrazona LQIT-D.T.02 possui uma geometria *E*. Este resultado corrobora com Moreira et al. (2014), em que uma série de 24 moléculas, também da classe das iminas apresentou a configuração *E* como a mais estável espacialmente.

Figura 24: (A) Imagem de raios-x e (B) Diagramas do tipo ORTEP-3 apresentando a numeração dos átomos do composto LQIT-D.T.02.

(A)



(B)



4.2 PARTE BIOLÓGICA

Após realizada a síntese para a obtenção dos novos derivados indólicos-*N*-acilhidrazônicos, foi realizada uma triagem *in vitro* do potencial anti-inflamatório através do ensaio de linfoproliferação. Além disso também foi realizado um estudo *in vitro* para quantificar a citotoxicidade das moléculas. Também foram feitos testes *in vivo* para investigação da atividade anti-inflamatória dos compostos mais ativos, bem como o teste de toxicidade aguda para estes compostos. Por fim, o teste de inibição de COX-1 e COX-2 foi realizado *in vitro*.

4.2.1 Concentração Citotóxica em Macrófagos J774

Após a síntese dos novos derivados de indol-*N*-acilhidrazona, o perfil citotóxico *in vitro* dos compostos foi avaliado contra macrófagos da linha J774. Verificou-se que a maioria dos derivados possui baixa citotoxicidade contra esta linhagem celular quando comparada à violeta de genciana, o controle utilizado na experiência, que mostrou uma citotoxicidade de $4,2 \pm 0,6 \mu\text{M}$ (**tabela 01**). LQIT-D.T.01, LQIT-D.T.02, LQIT-D.T.03 e LQIT-D.T.07 apresentaram valores CC_{50} de 144 ± 63 , $150,1 \pm 40$, 200 ± 22 e $145,5 \pm 23 \mu\text{M}$, respectivamente. Os derivados de *N*-acilhidrazona são conhecidos por sua notável atividade biológica e baixa citotoxicidade, o que leva a maior seletividade biológica (HERNÁNDEZ et al., 2013; TORRE et al., 2017).

Tabela 01: Concentração citotóxica para 50% das células J774 das derivados indólicos-*N*-acilhidrazônicos (LQIT - D.T.01-10).

Código	Peso Molecular (g /mol)	Concentração citotóxica para 50% Cél. J774 (CC_{50}) $\mu\text{M} \pm \text{E.P.M.}$
LQIT-D.T.01	305	144.7±63
LQIT-D.T.02	226	150.1±40
LQIT-D.T.03	240	200±22
LQIT-D.T.04	271	66±7.0
LQIT-D.T.05	256	101±14
LQIT-D.T.06	276	78.5±11
LQIT-D.T.07	240	145.5±23
LQIT-D.T.08	251	69.4±17
LQIT-D.T.09	227	107±21
LQIT-D.T.10	260	76.9±10
Violeta de Genciana	408	4.2±0.6

4.2.2 Porcentagens de Inibição da Linfoproliferação

Este estudo permite indicar o percentual da inibição da proliferação de linfócitos ativados por concanavalina A, ou seja, quanto maior o percentual de inibição, maior a atividade anti-inflamatória através de uma ação antiproliferativa. A **tabela 02** apresenta os resultados do percentual de inibição da linfoproliferação a 50 μ M. No estudo não foi observada nenhuma relação entre a natureza química dos substituintes indólicos e a atividade antiproliferativa. No entanto, foi possível destacar os compostos LQIT-D.T.01, LqIT-D.T.02 e LQIT-D.T.07 que apresentaram valores de inibição de 62.7% ($\pm$ 3.5), 50.7% ($\pm$ 2) e 52.2% ($\pm$ 1.8) respectivamente, como representantes dos resultados mais significativos quando comparados à dexametasona – controle positivo – que apresentou 74.6% ($\pm$ 2.4) de inibição. A partir destes resultados foram selecionados dois compostos para o prosseguimento dos estudos acerca da atividade anti-inflamatória, o LQIT-D.T.01 e LQIT-D.T.02, pois ambos também apresentaram excelentes rendimentos e altos índices de pureza. Este último composto foi escolhido com o propósito de avaliar *in vivo*, o perfil de substituição presente neste heterociclo (LQIT-D.T.01 – 5-bromoindol; LQIT-D.T.02 – indol sem substituição).

Tabela 02: Atividade inibitória dos novos derivados indólicos-*N*-acilhidrazônicos testados em ensaio de linfoproliferação.

Código	Peso Molecular (g /mol)	% inibição linfoproliferação $\pm$ E.P.M. (50 μ M)
LQIT-D.T.01	305	62.7 ($\pm$ 3.5)
LQIT-D.T.02	226	50.7 ($\pm$ 2)
LQIT-D.T.03	240	15.4 ($\pm$ 0.3)
LQIT-D.T.04	271	31 ($\pm$ 1.8)
LQIT-D.T.05	256	43.7 ($\pm$ 0.8)
LQIT-D.T.06	276	1.2 ($\pm$ 0.2)
LQIT-D.T.07	240	52.2 ($\pm$ 1.8)
LQIT-D.T.08	251	25.7 ($\pm$ 5.4)
LQIT-D.T.09	227	52.4 ($\pm$ 19.1)
LQIT-D.T.10	260	1.8 ($\pm$ 0.2)
Dexametasona	392	74.6 ($\pm$ 2.4)

4.2.3 Toxicidade oral aguda em dose única

A administração oral dos compostos LQIT-D.T.01 e LQIT-D.T.02 não conduziu a efeitos tóxicos significativos na alta concentração testada de 2000 mg.kg⁻¹, conforme recomendado pela OCDE (2002). Após 1 hora de administração dos compostos de teste, observou-se irritabilidade e ptose. No entanto, ao longo do experimento até a conclusão, nenhuma morte ou alteração em parâmetros fisiológicos e parâmetros hematológicos foram observadas como demonstradas em material suplementar.

4.2.4 Ensaio de Inflamação Aguda

Para a avaliação *in vivo* dos compostos selecionados acima, utilizou-se o modelo experimental de edema de pata induzido por carragenina, que é um ensaio amplamente utilizado para avaliar os efeitos anti-inflamatórios de novos compostos (WINTER; RISLEY; NUSS, 1962). As **tabelas 03 e 04** mostram as diferentes porcentagens de inibição na LQIT-D.T.01, LQIT-D.T.02 e na indometacina nas diferentes concentrações e intervalos de tempo nos quais esses compostos foram testados.

O composto LQIT-D.T.01 apresentou uma atividade anti-inflamatória nas doses de 30 e 60 mg/Kg, onde este foi capaz de suprimir o edema em 61,82 e 66,32 %, respectivamente após 6 h de inoculação da carragenina. Adicionalmente, a dose de 15 mg/Kg não causou inibição significativa do edema em nenhum dos tempos avaliados.

Por outro lado, todas as doses testadas para o composto LQIT-D.T.02 apresentaram valores significativos na inibição do edema na pata dos camundongos, destacando as doses de 30 e 60 mg/Kg, onde essas causaram inibição significativa em todos os tempos avaliados. Após 1 h, o LQIT-D.T.02 foi capaz de causar 88,87% de inibição e após 5 h, 100%, na dose de 30 mg/Kg. Já para a dose de 60 mg/Kg, os melhores resultados foram encontrados após 1 h de administração (74,34% de

inibição) e 6 h (92,53% de inibição). A dose de 15 mg/Kg apresentou melhor resultado após 6 h de inoculação do agente flogístico (66,97% de inibição). A indometacina, fármaco padrão utilizado no experimento, também apresentou resultados significativos em todos os tempos avaliados, destacando o tempo 2 h (72,43% de inibição) e 6 h (84,07% de inibição). No entanto, o LQIT-D.T.02 se apresentou com maior atividade quando comparados ao controle positivo.

Tabela 03: Efeito anti-inflamatório do composto LQIT-D.T.01 após a indução pelo agente flogístico carragenina.

Tempo	Controle Negativo	LQIT-D.T.01			Indometacina
	-	15 mg.kg ⁻¹	30 mg.kg ⁻¹	60 mg.kg ⁻¹	10 mg.kg ⁻¹
1 h	59.39±10.6	65.95±12.61	50,00±0,02	48.33±1.66	19.06±3.59
2 h	63.09±7.32	54.38±6.44	50.96±5,91	54.16±5.08	17.39±3.27
3 h	43.53±5.06	43.23±4.49	41.97±4,01	49.33±2.35	17.39±3.27
4 h	48.95±6.59	41.90±3.73	29.12±6.16*	29.38±4.62	24.51±4.87
5 h	52.03±6.53	40.57±4.63	24.83±4.08**	23.19±4.06***	12.57±3.67
6 h	56.13±7.17	35.23±7.61	21.42±2.91***	18.90±3.62***	8.93±2.87

Os dados da **tabela 3** foram expressos como a média ± SE de 6 animais por grupo. Os resultados foram considerados significativos quando *p < 0.05; **p < 0.01 e ***p < 0.001, determinados pela análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste de Bonferroni.

Tabela 04: Efeito anti-inflamatório do composto LQIT-D.T.02 após a indução pelo agente flogístico carragenina.

Tempo	Controle Negativo	LQIT-D.T.02			Indometacina
	-	15 mg.kg ⁻¹	30 mg.kg ⁻¹	60 mg.kg ⁻¹	10 mg.kg ⁻¹
1 h	59.39±10.6	25.00±7.75***	6.60±1.51***	15.23±3.60***	19.06±3.59
2 h	63.09±7.32	31.41±8.52***	8.77±4.05***	22.50±5.35***	17.39±3.27
3 h	43.53±5.06	29.51±15.12	3.63±2.29***	18.17±7.21*	17.39±3.27
4 h	48.95±6.59	41.60±8.48	2.25±1.14***	21.66±6.19***	24.51±4.87
5 h	52.03±6.53	28.96±16.84	0.00±0.00***	8.00±5.33***	12.57±3.67
6 h	56.13±7.17	18.53±7.60***	0.00±0.00***	4.19±2.83***	8.93±2.87

Os dados da **tabela 4** foram expressos como a média ± SE de 6 animais por grupo. Os resultados foram considerados significativos quando *p < 0.05; **p < 0.01 e ***p < 0.001, determinados pela análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste de Bonferroni.

A inflamação induzida por carragenina é um processo bifásico. A fase inicial, até 2 h após a injeção do agente flogístico, é determinada por uma vasodilatação mediada pela liberação de mediadores como serotonina e histamina. A fase tardia, até 6 h após a injeção da carragenina, é mediada primariamente por cininas, óxido nítrico e prostaglandinas derivadas do recrutamento de neutrófilos (ISHOLA et al., 2014; MATSUMOTO et al., 2015). Os resultados indicam uma possível ação do LQIT-D.T.02 tanto na inibição de aminas vasoativas, impedindo a degranulação de mastócitos, quanto na fase celular inibindo a migração leucocitária, fato mais suportado pelos nossos achados visto os resultados encontrados no ensaio de linfoproliferação.

Os compostos avaliados neste estudo possuem dois grupos privilegiados, a fração *N*-acilhidrazona e o heterociclo indol. As *N*-acilhidrazonas são bem descritas na literatura como tendo atividade anti-inflamatória (TRIBUTINO et al., 2009; MOLDOVAN et al., 2011; MELO et al., 2014). Bhookya et al. (2017) declararam em seu trabalho a importância do grupo heteroaromático indol para a resposta anti-inflamatória máxima em ensaio de edema de pata induzido por carragenina. Além disso, a atividade de indol-hidrazonas foi relatada em modelos de inflamação aguda e crônica (MISRA et al., 2016), o que evidencia a importância desses núcleos para o desenvolvimento da atividade anti-inflamatória.

4.2.5 Ensaio de inibição *in vitro* das Cicloxigenases 1 e 2

Para avaliar os perfis de inibição de COX dos compostos deste estudo, testes de inibição *in vitro* de COX-1 e COX-2 foram realizados com os compostos LQIT-D.T.01 e LQIT-D.T.02 (de 1.5-100 μ M) para determinar a concentração produzida de 50% de inibição de enzimas (IC_{50}) e seus índices de seletividade (SI) usando celecoxibe como fármaco de referência. Os resultados mostram que ambos os compostos LQIT-D.T.01 e LQIT-D.T.02 foram capazes de inibir tanto a COX-1 como a COX-2 a baixas concentrações (tabela 05). Em relação ao índice de seletividade (SI), apenas o composto LQIT-D.T.02 apresentou atividade inibitória da COX-2, porém menor que o celecoxibe.

Tabela 05. Inibição *in vitro* de COX-1 e COX-2 e IS para COX-2 de novos derivados indol-*N*-acilhidrazona (LQIT-D.T.01 e LQIT-D.T.02).

Composto	IC ₅₀ (μM)		IS
	COX-1	COX-2	
LQIT-D.T.01	0.18	0.25	0.72
LQIT-D.T.02	1.54	1.02	1.51
Celecoxibe	3.09	0.26	11.88

O teste de interação com enzimas e inibidores potenciais é um passo importante no desenvolvimento de compostos com potente atividade anti-inflamatória. O conhecimento das diferenças estruturais entre os alvos farmacológicos é essencial para a concepção de novas substâncias ativas com maior especificidade. Neste contexto, a principal diferença entre COX-1 e COX-2 é o volume mais elevado do sítio ativo da COX-2 em comparação com a COX-1 (cerca de 20%) (VOET; VOET, 2011). No entanto, isso não parece ser a justificativa principal para a melhor seletividade de LQIT-D.T.02 versus LQIT-D.T.01, uma vez que a diferença estrutural apresentada por estes dois compostos consiste na modificação de um átomo de bromo (LQIT-D.T.01) por um hidrogênio (LQIT-D.T.02) na posição C-5 do anel indol. Por outro lado, por serem pequenas moléculas, ambas podem entrar nos locais ativos das duas isoformas. O átomo de bromo possui uma alta polarização que pode causar maior interação com a COX-1 (através de uma interação íon-dipolo) o que pode justificar a ausência de seletividade apresentada pelo LQIT-D.T.01. Os estudos de Gundogdu-Hizliates et al. (2014) fortalecem a hipótese de um bom índice de seletividade para a classe dos indóis-*N*-acilhidrazonas, uma vez que a molécula *N*-((1H-indol-3-il)metileno)-2-(4-isobutilfenil)propano-hidrazida, um composto do tipo 3-indol-*N*-acilhidrazona, mostrou uma melhor seletividade para COX-2 quando comparada com o ibuprofeno.

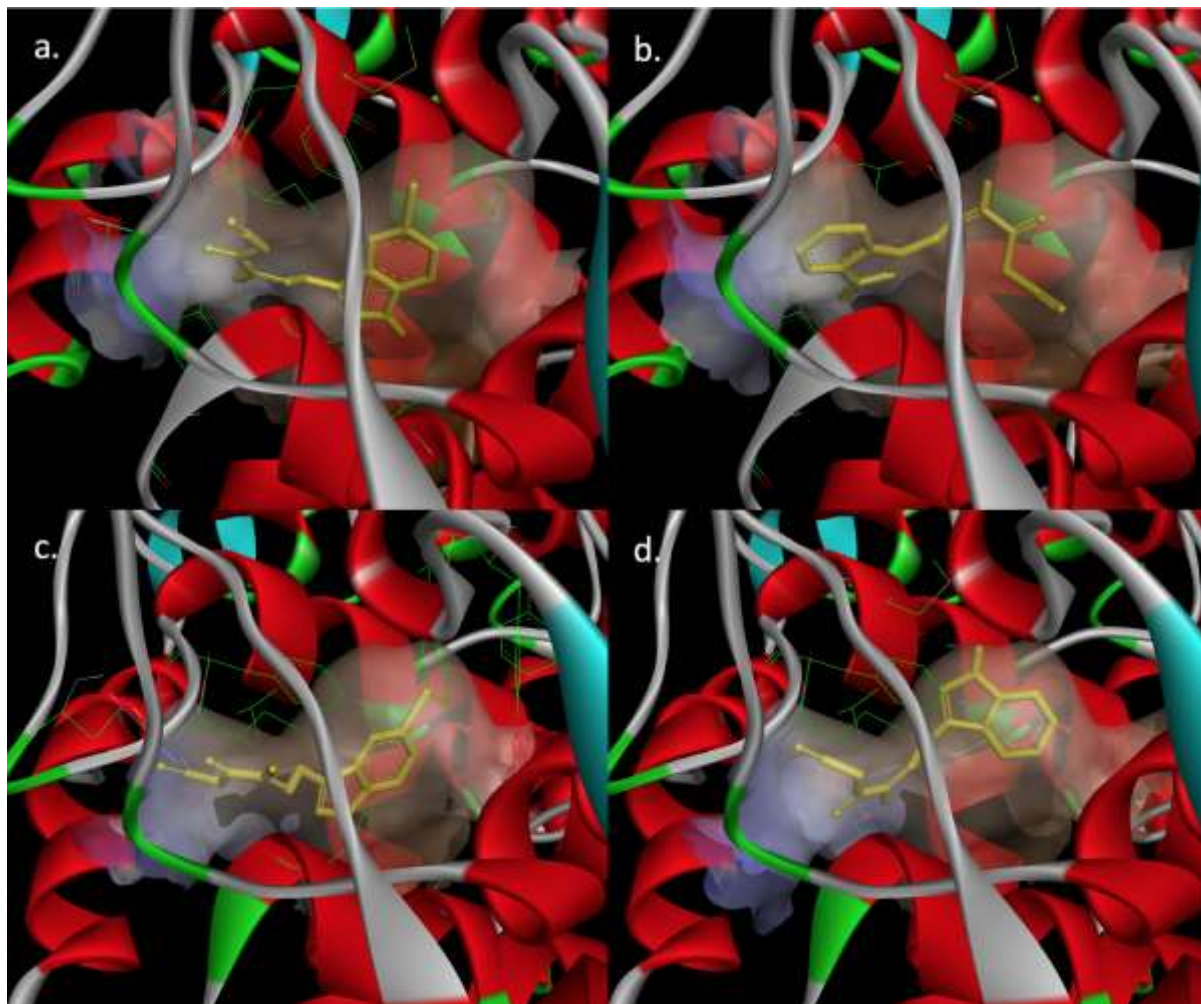
4.2.6 Estudos *in silico* das interações das Cicloxigenases 1 e 2

A fim de entender melhor a seletividade de COX de LQIT-D.T.01 e LQIT-D.T.02, um estudo de docking foi realizado entre esses compostos e ambas as isoenzimas COX. Para este efeito, dois modelos co-cristalizados de celecoxibe para COX-1 e

COX-2 (códigos de PDB: 3KK6 e 3LN1, respectivamente) foram selecionados como alvos uma vez que o celecoxibe é utilizado como composto de referência para os nossos ensaios de inibição de COX *in vitro*. No primeiro passo do procedimento, o celecoxibe foi ligado ao sítio ativo de COX-1 e COX-2 com uma energia livre de ligação de -10,62 e -10,80 kcal mol⁻¹, respectivamente. A ancoragem dos compostos de teste mostrou que eles podem ocupar o mesmo local de ligação que o ligante co-cristalizado. Os compostos LQIT-D.T.01 e LQIT-D.T.02 ligam-se à enzima COX-1 liberando energia livre de -8,28 e -7,84 kcal mol⁻¹, respectivamente, e à COX-2 liberando energia livre de -8,52 e -7,73 kcal mol⁻¹, respectivamente. Posições de ancoragem dos compostos LQIT-D.T.01 e LQIT-D.T.02 nos locais ativos de COX-1 e COX-2 são mostradas na **figura 25**.

A presença do átomo de bromo no composto volumoso LQIT-D.T.01 conduz a diferentes conformações entre estes compostos aos locais ativos da COX. No local ativo COX-2, a principal diferença entre as conformações encaixadas é a posição do anel indol. O composto LQIT-D.T.02, que apresentou seletividade COX-2 *in vitro*, interage com a COX-2 em Ile503 e Phe504 através de ligações de hidrogênio à função nitrila. Os anéis indol interagem com o Met508 via interação com os arranjos Pi-Enxofre e Amida-Pi, e formam arranjos Amida-pi interagindo com Gly512. O anel indol do composto LQIT-D.T.01 assume uma conformação diferente de modo a ajustar-se ao bolso hidrofóbico do sítio ativo da COX-2 e interage com 4 aminoácidos (Leu338, Ala513, Val335, Val509) através de interações Pi-Alquil. O composto LQIT-D.T.01 também interage com COX-2 Ile503 e Phe504 através de ligações de hidrogênio à carbonila e com Arg499 através de uma ligação de hidrogênio à nitrila.

Figura 25. Modos de ligação dos compostos ancorados (em amarelo) nos sítios ativos de COX-1 e COX-2.



a) LQIT-D.T.01 no local ativo da COX-1. b) LQIT-D.T.02 no sítio ativo da COX-1. c) LQIT-D.T.01 no sítio ativo da COX-2. d) LQIT-D.T.02 no sítio ativo da COX-2. As superfícies hidrofóbicas dos sítios ativos são mostradas com a região hidrofóbica em marrom e a região hidrofílica em azul.

As posições de acoplamento obtidas para COX-1 mostram LQIT-D.T.01 e LQIT-D.T.02 em conformações distintas. No sítio ativo menos volumoso da COX-1, LQIT-D.T.02 assume uma conformação onde o anel indol é apontado para o bolso lateral hidrofílico do sítio ativo através de uma ligação carbono-hidrogênio às interações Tyr355 e Pi-Sigma com Ile523. Este composto também faz duas ligações de hidrogênio com o sítio ativo (Ser530 com a nitrila e Met522 com o hidrogênio da amida). O composto LQIT-D.T.01, por outro lado, mantém uma conformação similar quando comparado com o sítio ativo COX-2. O anel de indol substituído por bromo é apontado para o bolso hidrofóbico do sítio ativo e interage com Ala527 e Val349 via

interações Pi-Sigma e Leu352 e através de interações Pi-Alquila. A nitrila faz uma ligação de hidrogênio a Ile517.

A conformação do composto LQIT-D.T.02 no local ativo da COX-1 (comparado com LQIT-D.T.01) pode bloquear as interações ligante-receptor eficazes, o que poderia conduzir a diferentes atividades destes compostos para COX-1 e maior seletividade de COX-2 do LQIT-D.T.02.

4.2.7 Predição de ADMET

As previsões de ADMET *in silico* foram realizadas para avaliar os perfis farmacocinético e de toxicidade dos compostos LQIT-D.T.01 e LQIT-D.T.02. De acordo com as regras de Lipinski (LIPINSKI et al., 2012), o potencial medicamento é ativo por via oral quando atende aos seguintes critérios: a) peso molecular ≤ 500 da; b) $\text{LogP} \leq 5$ (ou $\text{MLogP} \leq 4,15$); c) número de aceptores de ligações de hidrogênio ≤ 10 ; d) número de doadores de pontes de hidrogênio ≤ 5 . As estruturas LQIT-D.T.01 e LQIT-D.T.02 apresentam o $\text{MLogP} < 1$ e um número adequado de doadores e aceitadores de ligações de hidrogênio (baseado no Lipinski's Rules), o que sugere uma boa biodisponibilidade oral (**tabela 06**). Além disso, o valor de LogS mostra que ambos os compostos são solúveis em água (LogS entre -4 e -2), uma característica fundamental para uma biodisponibilidade apropriada.

Tabela 06. Dados farmacocinéticos *in silico* estimados nos webservices SwissADME ou pkCSM.

Composto	Log P^a	Log S^b	TPSA ($\text{\AA}^2$) ^c	Permeab. Caco-2 (log P_{app} ; log cm/s) ^d	Abs. Int. (%) ^e	VDss (log L/kg) ^f	Fr. Não Lig. ^g	Clearance Total (log ml/min/kg) ^h
LQIT-D.T.01	0.93	-3.20	81.04	1.012	90.33	-0.009	0.305	0.188
LQIT-D.T.02	0.25	-2.49	81.04	0.812	91.90	0.018	0.325	0.94

^aSwissADME Moriguchi log do coeficiente de partição octanol-água; ^bSwissADME Ali log de solubilidade aquosa; ^cCálculo do SwissADME da Área de Superfície Polar Topológica (TPSA); ^dpredição de pkCSM da permeabilidade das células Caco-2 como estimativa de absorção na mucosa intestinal humana; ^epredição de pkCSM da proporção de absorção de composto pelo intestino delgado humano; ^fprevisão pkCSM do log do volume de distribuição em estado estacionário (VDss); ^gpredição de pkCSM da fração do composto não ligado no plasma (não ligado às proteínas do soro); ^hpredição de pkCSM do registro do clearance total de droga.

O valor do TPSA indica que essas moléculas podem ter boa absorção intestinal (esperada para moléculas com $TPSA \leq 140 \text{ \AA}^2$) (VEBER et al., 2002). A monocamada de células Caco-2 é amplamente utilizada como um modelo *in vitro* para prever a absorção intestinal de fármacos administrados oralmente, através da medição do logaritmo do coeficiente de permeabilidade aparente ($\log P_{app}$, $\log \text{ cm s}^{-1}$). Uma alta absorção é esperada para valores de $\log P_{app} > 0,90 \text{ cm s}^{-1}$. Apenas o composto LQIT-D.T.01 teve um $\log P_{app} > 0,90$ (LAMBERTUCCI et al., 2018). No entanto, ambos os compostos apresentaram alta probabilidade de absorção no intestino delgado humano, com valores $> 90\%$.

O volume de distribuição (VD_{ss}) indica o volume teórico que uma dose total precisaria ser uniformemente distribuída no plasma na mesma concentração observada no plasma sanguíneo. Valores elevados de VD_{ss} ($\log VD_{ss} > 0,45$) indicam que o fármaco será distribuído no tecido em vez do plasma. O valor de VD_{ss} é considerado baixo quando o $\log VD_{ss}$ é $\leq 0,15$ (LAMBERTUCCI et al., 2018). Os compostos LQIT-D.T.01 e LQIT-D.T.02 apresentaram valores intermediários de VD_{ss} e deveriam ter um perfil de distribuição plasmática adequado, com uma fração do fármaco não ligado de 0,305 e 0,325, respectivamente. Estes valores indicam que o fármaco pode ser bem distribuído e apresentar uma fração significativa não ligada (e prontamente disponível para interagir com o alvo) no plasma.

A depuração de medicamentos ocorre principalmente como uma combinação de depuração renal e hepática e está relacionada à biodisponibilidade da droga. Um fármaco com um elevado valor de depuração total apresentará um processo de excreção rápida. Os compostos LQIT-D.T.01 e LQIT-D.T.02 apresentam valores de clearance total de 0,188 e 0,94, respectivamente.

O algoritmo do preditor de risco de toxicidade usado por Osiris Datawarrior prevê a probabilidade de efeitos tumorigênicos, mutagênicos, reprodutivos ou irritantes que possam ser causados por drogas. Quando as estruturas LQIT-D.T.01 e LQIT-D.T.02 foram avaliadas, verificou-se que nenhum desses efeitos estavam presentes.

5 CONCLUSÃO

Neste estudo foram obtidos novos compostos contendo os grupos *N*-acilhidrazona e indol e suas propriedades anti-inflamatórias foram avaliadas com sucesso. Os testes de inibição da proliferação de linfócitos indicam esses compostos como agentes potenciais para atuar na fase celular do processo de inflamação. Os ensaios *in vivo* corroboraram com os resultados *in vitro*, onde os valores máximos de supressão do edema da pata de rato foram observados na fase tardia (fase celular), além disso, os achados referentes à inibição da COX-1 e COX-2 indicam LQIT-D.T.02 como um inibidor seletivo da COX-2. Os resultados do encaixe molecular sugeriram que os compostos LQIT-D.T.01 e LQIT-D.T.02 interagem com o sítio ativo da COX-2 em conformações relacionadas, mas com arranjos diferentes no sítio ativo da COX-1. Pode-se associar isto com a seletividade de inibição de COX observada do composto LQIT-D.T.02. Assim, os resultados anti-inflamatórios e os valores preditos pelo ADMET dos compostos LQIT-D.T.01 e LQIT-D.T.02 apresentam um perfil bem equilibrado entre a farmacodinâmica e a farmacocinética, o que justifica o uso desses derivados, principalmente LQIT-D.T.02, um inibidor seletivo da COX-2, como compostos líderes no desenvolvimento de drogas anti-inflamatórias.

REFERÊNCIAS

- ABDELLATIF, K. R. A.; LAMIE, P. F.; OMAR, H. A. **3-Methyl-2-phenyl-1-substituted-indole derivatives as indomethacin analogs: design, synthesis and biological evaluation as potential anti-inflammatory and analgesic agents.** *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*; 31(2): 318–324, 2016.
- ABELE, E.; ABELE, R.; DZENITIS, O.; LUKEVICS, E. **Indole and Isatin Oximes: Synthesis, Reactions, and Biological Activity.** *Chemistry of Heterocyclic Compounds*. 39(1), 3-35. 2003.
- AHMAD, T. B.; RUDD, D.; SMITH, J.; KOTIW, M.; MOUATT, P.; SEYMOUR, L. M.; LIU, L.; BENKENDORFF, K. **Anti-Inflammatory Activity and Structure-Activity Relationships of Brominated Indoles from a Marine Mollusc.** *Marine Drugs*, 15, 133, 2017.
- AMARAL, D. N.; CAVALCANTI, B. C.; BEZERRA, D. P.; FERREIRA, P. M. P.; CASTRO, R. P.; SABINO, J. R.; MACHADO, C. M. L.; CHAMMAS, R.; PESSOA, C.; SANT'ANNA, C. M. R.; BARREIRO, E. J.; LIMA, L. M. **Docking, synthesis and antiproliferative activity of N-acylhydrazone derivatives designed as combretastatin A4 analogues.** *PLoS One*, 9, e85380, 2014.
- AYOUB, S. S.; FLOWER, R. J.; SEED, M. **Cyclooxygenases: Methods and Protocols,** *Methods in Molecular Biology*, Humana Press. 2010.
- BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M.; MIRANDA, A. L. P.; RODRIGUES, C. R. **A química medicinal de N-acilidrazonas: novos compostos-protótipos de fármacos analgésicos, anti-inflamatórios e antitrombóticos.** *Química Nova*. v. 25, p. 129-148. 2002.
- BENNINGHOFF, A. D.; WILLIAMS, D. E. **The role of estrogen receptor β in transplacental cancer prevention by indole-3-Carbinol.** *Cancer Prev. Res.* 6, 339–348, 2013.
- BEZERRA NETTO, H. J. C. **Planejamento, síntese e avaliação farmacológica de novos derivados 6-nitro-benzodioxola-N-acilidrazônicos, desenhados como candidatos a protótipos de fármacos analgésicos e anti-inflamatórios, sintetizados a partir do safrol.** *Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)* Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2004.
- BHOOKYA, S.; POCHAMPALLY, J.; VALERU, A.; SUNITHA, V.; BALABADRA, S.; MANGA, V.; KUDLE, K. R. **Synthesis of tert-butyl (substituted benzamido) phenylcarbamate derivatives: anti-inflammatory activity and docking studies.** *J. Chem. Biol.* 10, 105-115, 2017.

BIOVIA, Dassault Systèmes, **Discovery Studio Visualizer**, version 16.1.0.15350, Dassault Systèmes, San Diego, 2016.

BISPO JÚNIOR, W.; ALEXANDRE-MOREIRA, M. S.; ALVES, M. A.; PEREZ REBOLLEDO, A.; PARRILHA, G. L.; CASTELLANO, E. E.; PIRO, O. E.; BARREIRO, E. J.; LIMA, L. M.; BERALDO, H. **Analgesic and Anti-Inflammatory activities of Salicylaldehyde 2-Chlorobenzoyl Hydrazone (H2LASSBio-466), Salicylaldehyde 4-Chlorobenzoyl Hydrazone (H2LASSBio-1064) and Their Zinc (II) Complexes.** *Molecules*. V.16, p. 6902-6915. 2011.

BISWAL, S.; SAHOO, U.; SETHY, S.; KUMAR, H. K. S.; BANERJEE, M. **Indole: The molecule of diverse biological activities.** *Asian J. Pharm. Clin. Res.* V.: 5, n.: 1; 2012.

BRENOL, J. C. T.; XAVIER, R. M.; MARASCA, J. **Anti-inflamatórios não hormonais convencionais.** *Revista Brasileira de Medicina*. p: 57, 2000.

BROOKS, P. M.; EMERY, E.; EVANS, F. **Interpreting the clinical significance of the differential inhibition of cyclooxygenase I and cyclooxygenase II.** *Rheumatology*. v.38, p. 779-788. 1999.

BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. C. **Goodman & Gilman: As Bases Farmacológicas da Terapêutica.** 12ª Edição. Rio de Janeiro: *Grow-Hill*, 2012.

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

CAIXEIRO, J. M. R. **Dialquilfosforidilidrazonas e N,N'-Bis (Diisobutilfosforil)ioamida) diaminas: Síntese, caracterização, modelagem molecular e estudo da atividade biológica.** *Tese de Doutorado em Química orgânica*. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2007.

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

CHARRET, K.S. **Efeitos dos compostos acilhidrazonas pirazólicas sobre as formas evolutivas de Leishmania amazonensis e na infecção experimental em camundongos isogênicos CBA.** *Tese (Doutorado em Biologia Parasitária)* Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 2011.

CHEN, Q. P. N.; RAO, P.; KNAUS, E. E. **Synthesis and biological evaluation of a novel class of rofecoxib analogues as dual inhibitors of cyclooxygenases**

(COXs) and lipoxygenases (LOXs). *Bioorganic e Medicinal Chemistry*. v.14, 7898-909, 2006.

CHIZZOLINI, C. **Update on pathophysiology of scleroderma with special reference to immunoinflammatory events.** *Ann. Med.* 39, 42–53, 2007.

CHOU, R.; HELFAND, M.; PETERSON, K.; DANA, T.; ROBERTS, C. **Drug Class Review on Cyclooxygenase (COX)-2 Inhibitors and Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs (NSAIDs).** Portland: Oregon Health & Science University; 2006.

CHROUSOS, G. P.; MARGIORIS, A. N. **Adrenocorticosteroides e antagonistas córticosuprarrenais.** In: **Katzung, B. G. Farmacologia básica e clínica.** 8 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001.

CONFORTI, F.; SOSA, S.; MARRELLI, M.; MENICHINI, F.; STATTI, G. A.; UZUNOV, D.; TUBARO, A.; MENICHINI, F.; LOGGIA, R. D. ***In vivo* anti-inflammatory and *in vitro* antioxidant activities of Mediterranean dietary plants.** *J. Ethnopharmacol.* 116, 144–151, 2008.

COSTANTINO, L.; BARLOCCO, D. **Privileged Structures as Leads in Medicinal Chemistry.** *Current Medicinal Chemistry*, v. 13, p. 65-85, 2006.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Robbins: Patologia Estrutural e Funcional.** 7ª ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2006.

CUZZOCREA, S. **Shock, inflammation and PARP.** *Pharmacol. Res.* v. 52, 72–82, 2005.

DESIMONE, R. W.; CURRIE, K. S.; MITCHELL, S. A.; DARROW, J. W.; PIPPIN, D. A. **Privileged structures: applications in drug discovery.** *Comb Chem High Throughput Screen.*, v. 7, n. 5, p. 473-494, 2004.

DAINA, A; MICHIELIN, O; ZOETE, V. **SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules.** *Sci. Rep.*, 2017.

DING, A.H.; NATHAN, C.F.; STUEHR, D.J. **Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production.** *Journal Immunol.* 141, 2407-2412, 1988.

DUARTE, C. M. **Novos derivados acilidrazônicos planejados como candidatos a fármacos analgésicos e anti-inflamatórios.** *Tese (Doutorado em Ciências)* Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.

FATAHALA S. S.; KHEDR, M. A.; MOHAMED, M. S. **Synthesis and Structure Activity Relationship of Some Indole Derivatives as Potential Anti-inflammatory Agents.** *Acta Chim. Slov.* 64, 865–876, 2017.

FIGUEIREDO, J. M.; CÂMARA, C. A.; AMARANTE, E. G.; MIRANDA, A. L.; SANTOS, F. M.; RODRIGUES, C. R.; FRAGA, C. A.; BARREIRO, E. J. **Design and synthesis of novel potent antinociceptive agents: methyl-imidazolyl N-acylhydrazone derivatives.** *Bioorganic & Medicinal Chemistry.* v. 8, p. 2243-2248. 2000.

FILHO, J. M. S.; SILVA, D. M. A. Q.; MACEDO, T. S.; TEIXEIRA, H. M. P.; MOREIRA, D. R. M.; CHALLAL, S.; WOLFENDER, J. L.; QUEIROZ, E. F.; SOARES, M. B. P. **Conjugation of N-acylhydrazone and 1,2,4-oxadiazole leads to the identification of active antimalarial agentes.** *Bioorganic & Medicinal Chemistry.* doi: 10.1016/j.bmc.2016.09.013. V.:24 (22) p.: 5693-5701. 2016.

FILHO, M. M. M.; RAHAL, S. C. **O uso de anti-inflamatórios inibidores COX II seletivos na osteoartrite canina.** *Veterinária e Zootecnia.* v.15, n.3. p.407-415. 2008.

FIORUCCI, S.; MELI, R.; BUCCI, M.; CIRINO, G. **Dual inhibitors of cyclooxygenase and 5-lipoxygenase. A new avenue in anti-inflammatory therapy?** *Biochemical Pharmacology,* V. 62 (11): 1433–8, 2001.

FITZGERALD, G. A.; PATRONO, C. **The coxibs, selective inhibitors of cyclooxygenase-2.** *The New England Journal of Medicine;* v.: 345. n.: 6. 433-442, 2001.

FLAMMER, J. R.; ROGATSKY, I. **Minireview: Glucocorticoids in autoimmunity: unexpected targets and mechanisms.** *Molecular Endocrinology.* v. 25, n. 7, p. 1075 – 1086. 2011.

FRANCO, G. C. N.; MORETTI, D.; CAVALCANTE, P. F. C.; LOPES, L. C. **Uma análise crítica sobre viabilidade do uso dos inibidores seletivos de COX II em odontologia.** *Revista de Odontologia da Universidade Cidade de São Paulo.* v.18, n.1, p.75-81. 2006.

FREIDONK-MUESCHENBORN, E.; FOX, A. **Resolution of concentration–response differences in onset of effect between subcutaneous and oral sumatriptan.** *Headache,* 45, 632–637. 2005.

FREIRE, P. **Pedagogia da Autonomia: saberes necessários à prática educativa.** São Paulo: Paz e Terra, p. 09; 1996.

FREITAS, R. H. C. N.; CORDEIRO, N. M.; CARVALHO, P. R.; ALVES, M. A.; GUEDES, I. A.; VALERIO, T. S.; DARDENNE, L. E.; LIMA, L. M.; BARREIRO, E. J.; FERNANDES, P. D.; FRAGA, C. A. M. **Discovery of naphthyl-N-acylhydrazone**

p38 α MAPK inhibitors with *in vivo* anti-inflammatory and anti-TNF- α activity. *Chem Biol Drug Des*, 91, 391-397, 2018.

FULLERTON, J. N.; GILROY, D. W. **Resolution of inflammation: a new therapeutic frontier**, *Nat. Rev. Drug. Discov.* 15, 551-567, 2016.

GAGE, J. L.; ONRUST, R.; JOHNSTON, D.; OSNOWSKI, A.; MACDONALD, W.; MITCHELL, L.; UROGDI, L.; ROHDE, A.; HARBOL, K.; GRAGEROV, S.; DORMÁN, G.; WHEELER, T.; FLORIO, V.; CUTSHALL, N. S. **N-Acylhydrazones as inhibitors of PDE10A**. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 21, 4155–4159, 2011.

GENERALI, J. A.; CADA, D. J. **Off-label drug uses—Ondansetron: Postanesthetic shivering**. *Hospital Pharmacy*, 44, 670–671. 2009.

GERONIKAKI, A. A.; GAVALAS, A. M. **Antioxidants and anti-inflammatory diseases: Synthetic and natural antioxidants with anti-inflammatory activity**. *Comb. Chem. High Throughput Screening*. 9, 425–442, 2006.

GILROY, D. W.; LAWRENCE, T.; PERRETTI, M.; ROSSI, A. G. **Inflammatory resolution: new opportunities for drug discovery**. *Nat. Rev.*, London, v.3, p.104-416, 2004.

GONG, Q.; MENON, L.; ILINA, T.; MILLER, L. G.; AHN, J.; PARNIAK, M. A.; ISHIMA, R. **Interaction of HIV-1 reverse transcriptase ribonuclease H with an acylhydrazone inhibitor**. *Chem. Biol. Drug Des.* 77, 39–47, 2011.

GOODMAN, L.; TORRES, B.; PUNKE, J.; REYNOLDS, L.; SPEAS, A.; ELLIS, A.; BUDSBERG, S. **Effects of firocoxib and tepoxalin on healing in a canine gastric mucosal injury model**. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. v.23, p.56-62, 2009.

GORANTLA, V.; GUNDLA, R.; JADAV, S. S.; ANUGU, S. R.; CHIMAKURTHY, J.; RAO NS, K.; KORUPOLU, R. **New Anti-Inflammatory Hybrid N-Acyl Hydrazone-Linked Isoxazole Derivatives as COX-2 Inhibitors: Rational Design, Synthesis and Biological Evaluation**. *ChemistrySelect*, 2(26), 8091-8100, 2017.

GU, W.; WU, R.; QI, S.; GU, C.; SI, F. **Synthesis and antibacterial evaluation of new N-acylhydrazone derivatives from dehydroabietic acid**. *Molecules*. v. 17, n. 4, p. 4634-4650, 2012.

GUERRA, A. S. H. S.; MALTA, D. J. N.; LARANJEIRA, L. P. M.; MAIA, M. B. S.; COLAÇO, N. C.; LIMA, M. C. A.; GALDINO, S. L.; PITTA, I. R.; SILVA, T. G. **Anti-inflammatory and antinociceptive activities of indole-imidazolidine derivatives**, *Int. Immunopharmacol.* 11, 1816-1822, 2011.

GUNDOGDU-HIZLIATES, C.; ALYURUK, H.; GOCMENTURK, M.; ERGUN, Y.; CAVAS, L. **Synthesis of new ibuprofen derivatives with their *in silico* and *in vitro* cyclooxygenase- 2 inhibitions**. *Bioorg. Chem.* 52, 8-15, 2014.

HAEGGSTROM, J. Z. **Structure, Function, and Regulation of Leukotriene A4 Hydrolase.** *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. v. 161, p. S25–S31. 2000.

HART, F.; BOARDMAN, P. **Indomethacin: A New non-steroid anti-inflammatory agent.** *Br. Med. J.* v. 2, 965–970. 1963.

HAZEWINKEL, H. A. W.; VAN DEN BROM, W. E.; THEYSE, L. F. H.; POLLMEIER, M.; HANSON, P. D. **Comparison of the effects of firocoxib, carprofen and vedaprofen in a sodium urte crystal induced synovitis model of arthritis in dogs.** *Research in Veterinary Science*. v.84, p.74-79. 2008.

HERNÁNDEZ, P.; CABRERA, M.; LAVAGGI, M.L.; CELANO, L.; TISCORNIA, I.; COSTA, T.R.; THOMSON, L.; BOLLATI-FOGOLÍN, M.; MIRANDA, A.L.P.; LIMA, L.M.; BARREIRO, E.J.; GONZÁLEZ, M.; CERECETTO, H. **Discovery of new orally effective analgesic and anti-inflammatory hybrid furoxanyl N-acylhydrazone derivatives,** *Bioorg. Med. Chem.* 20, 2158-2171, 2012.

HERNÁNDEZ, P.; ROJAS, R.; GILMAN, R. H.; SAUVAIN, M.; LIMA, L. M.; BARREIRO, E. J.; GONZÁLEZ, M.; CERECETTO, H. **Hybrid furoxanyl N-acylhydrazone derivatives as hits for the development of neglected diseases drug candidates.** *European Journal of Medicinal Chemistry*. v. 7, n. 59C, p. 64-74. 2013.

HIGGS, G. A.; VANE J. R. **Inhibition of cyclo-oxygenase and lipooxygenase.** *British Medical Bulletin*. v. 39, p. 265-270. 1983.

HILÁRIO, M. O. E.; TERRERI, M. T.; LEN, C. A. **Anti-inflamatórios não-hormonais: inibidores da ciclooxigenase 2.** *Journal of Pediatrics*, v.82, n.5, 2006.

HOEFLE, R. **Inibidores da COX-2 e Riscos Cardiovasculares.** *Farmacoterapêutica – Conselho Federal de Farmácia*, v. 9, n.5, p. 45-8, 2004.

ISHOLA, I. O.; AGBAJE, E. O.; ADEYEMI, O. O.; SHUKLA R. **Analgesic and anti-inflammatory effects of the methanol root extracts of some selected Nigerian medicinal plants.** *Pharm. Biol.* 52, 1208-1216, 2014.

JANEWAY, J. R.; CHARLES, A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M. **Imunobiologia.** 7ª Edição. Porto Alegre: Artmed, 2010.

JIN, Y.; TAN, Z.; HE, M.; TIAN, B.; TANG, S.; HEWLETT, I.; YANG, M. **SAR and molecular mechanism study of novel acylhydrazone compounds targeting HIV-1 CA.** *Bioorganic Medical Chemistry*. v. 18, p. 2135–2140. 2010.

JÚNIOR, J. O. L.; SERRANO S. C.; TEODORO A. L. DANA B. A. **Os anti-inflamatórios não hormonais.** *Prática hospitalar*, 51: 173-8; 2007.

KAPLANCIKLI, Z. A.; ALTINTOP, M. D.; OZDEMIR, A.; TURAN-ZITOUNI, G.; KHAN, S. I.; TABANCA, N. **Synthesis and biological evaluation of some hydrazone derivatives as anti-inflammatory agents.** *Lett. Drug Des. Discov.* 9, 310–315, 2012.

KAUSHIK, N. K.; KAUSHIK, N.; ATTRI, P.; KUMAR, N.; KIM, C. H.; VERMA, A. K.; CHOI, E. H. **Biomedical Importance of Indoles.** *Molecules*, 18, 6620-6662; doi:10.3390/molecules18066620; ISSN 1420-3049; 2013.

KRISHNAMOORTHY, S.; HONN, K. **Inflammation and disease progression.** *Cancer Metastasis Rev.*, 25, 481–491, 2006.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; ASTER, J. C. **Robbins: Patologia Básica.** 9ª Edição, Rio de Janeiro: Elsevier, 928 p. 2013.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N.; ASTER, J. C. **Robbins e Cotran, PATOLOGIA: Bases Patológicas das Doenças.** 8ª Edição, Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.

LAMBERTUCCI, C.; MARUCCI, G.; BEN, D.D.; BUCCIONI, M.; SPINACI, A.; KACHLER, S.; KLOTZ, K.N.; VOLPINI, R. **New potent and selective A 1 adenosine receptor antagonists as potential tools for the treatment of gastrointestinal diseases.** *Eur. J. Med. Chem.* 2018.

LANNES, A. C. **Cepas bacterianas: susceptibilidade a derivados da classe acilhidrazona em amostras do Hospital Universitário Antônio Pedro.** *Dissertação (Mestrado em Patologia).* Universidade Federal Fluminense, Niterói. 2010.

LIMA, G. R. M.; MONTENEGRO, C. A.; ALMEIDA, C. L. F.; ATHAYDE F.; BARBOSA FILHO, J. M.; BATISTA, L. M. **Database Survey of Anti Plants in South America: A Review.** *International Journal of Molecular Sciences.* v.12, p. 2692-2749. 2011.

LIMA, L. M.; FRATTANI, F. S.; DOS SANTOS, J. L.; CASTRO, H. C.; FRAGA, C. A.; ZINGALI, R. B.; BARREIRO, E. J. **Synthesis and anti-platelet activity of novel arylsulfonate-acylhydrazone derivatives, designed as antithrombotic candidates.** *European Journal of Medicinal Chemistry.* V. 43, p. 348-356. 2008.

LIPINSKI, C.A.; LOMBARDO, F.; DOMINY, B.W.; FEENEY, P.J. **Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings.** *Adv. Drug Deliv. Rev.* 64. 4-17. 2012.

LIU, Z.; TANG, L.; ZHU, H.; XU, T.; QIU, C.; ZHENG, S.; GU, Y.; FENG, J. P.; ZHANG, Y.; LIANG, G. **Design, synthesis and structure-activity relationship study of novel indole-2-carboxamide derivatives as anti-inflammatory agents for the treatment of sepsis.** *J. Med. Chem.*, 2016.

MAHADY, G. B.; PENDLAND, S. L.; YUN, G. S.; LU, Z. Z.; STOIA, A. **Ginger (Zingiberoffcinale Roscoe) and the gingerols inhibit the growth of CagA+ strains of Helicobacter pylori.** *Anticancer Research*, v. 23, p. 3699–3702, 2003.

MALIK, M. A.; AL-THABAITI, S. A.; MALIK, M. A. **Syntesis, Structure Optimization and Antifungal Screening of Novel Tetrazole Ring Bearing Acyl-Hidrazones.** *International Journal of Molecular Sciences*. v.13, p. 10880-10898. 2012.

MARNETT, L. J. **The COXIB experience: A look in the rear-view mirror.** *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. V.49, p.265-290. 2009.

MARTIN-FONTECHA, A.; THOMSEN, L. T.; BRETT, S.; GERARD, C.; LIPP, M.; LANZAVECCHIA, A.; SALLUSTO, F. **Induced recruitment of NK cells to lymphnodes provides IFN- γ for TH1 priming.** *Nature Immunology*. V. 5, n. 12, p. 1260-1265. 2004.

MATSUMOTO, K.; OBARA, S.; KURODA, Y.; KIZU, J. **Anti-inflammatory effects of linezolid on carrageenan-induced paw edema in rats.** *J. Infect. Chemother.* 21, 889-891, 2015.

MCGETTIGAN, P.; HENRY, D. **Cardiovascular risk with non-steroidal anti-inflammatory drugs: systematic review of population-based controlled observational studies.** *PLoS Medicine*. V. 8, n9, p. 1-18. 2011.

MEDZHITOV, R.; PRESTON-HURLBURT, P.; JANEWAY Jr., C. A. **A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity.** *Nature*. V. 388, p. 394-397. 1997.

MELNYK, P.; LEROUX, V.; SERGHERAERT, C.; GRELLIER, P. **Design, synthesis and in vitro antimalarial activity of an acylhydrazone library.** *Bioorg Med Chem Lett*. v.16, p.31-35. 2006.

MELO, T. R. F.; CHELUCCI, R. C.; PIRES, M. E. L.; DUTRA, L. A.; BARBIERI, K. P.; BOSQUESI, P. L.; TROSSINI, G. H. G.; CHUNG, M. C.; SANTOS, J. L. **Pharmacological Evaluation and Preparation of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs Containing an N-Acyl Hydrazone Subunit,** *Int. J. Mol. Sci.* 15, 5821-5837, 2014.

MENDES, R. T.; STANCZYK, C. P.; SORDI, R.; OTUKI, M. F.; SANTOS, F. A.; FERNANDES, D. **Inibição seletiva da ciclo-oxigenase-2: riscos e benefícios.** *Revista Brasileira Reumatologia*. v. 52, n. 5, p. 767-782. 2012.

MEQUANINT, W.; MAKONNEN, E.; URGAS, K. **In vivo anti-inflammatory activities of leaf extracts of *Ocimum lamiifolium* in mice model.** *Ethnopharmacol*, 134, 32–36, 2011.

MILLER, A.; STANTON, C.; DEVERY, R. **Modulation of arachidonic acid distribution by conjugated linoleic acid isomers and linoleic acid in MCF-7 and SW480 cancer cells.** *Lipids*. v. 36, n. 10, p. 1161-1168. 2001.

MISRA, C.S.; HONNAPPA, C.G.; JITTA, S. R.; GOURISHETTI, K.; DARAM, P.; SINGH, M. P.; SHRUNGESWARA, A. H.; NAYAK, Y.; UNNIKRIISHNAN, M. K. **Biological activity of a small molecule indole analog, 1-[(1H-indol-3-yl)methylene]-2-phenylhydrazine (HMPH), in chronic Inflammation,** *Chem. Biol. Interact.* 244, 71-83, 2016.

MOLDOVAN, C. M.; ONIGA, O.; PARVU, A.; TIPERCIUC, B.; VERITE, P.; PIRNAU, A.; CRISAN, O.; BOJITA, M.; POP, R. **Synthesis and anti-inflammatory evaluation of some new acylhydrazones bearing 2-aryl-thiazole.** *Eur. J. Med. Chem.* 46, 526-534, 2011.

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

MOREIRA, D. R. M.; OLIVEIRA, A. D. T.; GOMES, P. A. T. M.; SIMONE, C. A.; VILLELA, F. S.; FERREIRA, R. S.; SILVA, A. C.; SANTOS, T. A. R.; CASTRO, M. C. A. B.; PEREIRA, V. R. A.; LEITE, A. C. L. **Conformational restriction of aryl thiosemicarbazones produces potent and selective anti-Trypanosoma cruzi compounds which induce apoptotic parasite death.** *European Journal of Medicinal Chemistry*. 75, 467-478. 2014.

MORRIS, M. G.; HUEY, R.; LINDSTROM, W.; SANNER, M. F.; BELEW, R. K.; GOODSSELL, D. S.; OLSON, A. J. **Autodock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility.** *J. Computational Chemistry*. 16, 2785-2791, 2009.

MOSQUINI, A. F.; ZAPPA, V.; MONTANHA, F. P. **Características Farmacológicas dos Anti-inflamatórios Não Esteroidais – Revisão de Literatura.** *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária*. n. 17, 2011.

MU, J. X.; SHI, Y. X.; WU, H. K.; SUN, Z. H. YANG, M. Y.; LIU, X. H.; LI, B. J. **Microwave assisted synthesis, antifungal activity, DFT and SAR study of 1,2,4-triazolo[4,3-a]pyridine derivatives containing hydrazone moieties.** *Chemistry Central Journal* v.: 10, n.: 50, 2016.

NARANG, R.; NARASIMHAN, B.; SHARMA, S.; SRIRAM, D.; YOGEEESWARI, P.; CLERCQ, E. D.; PANNECOUQUE, C.; BALZARINI, J. **Nicotinic acid benzylidene/phenyl-ethylidene hydrazides: synthesis, antimicrobial evaluation and QSAR studies.** *Lett. Drug Des. Discov.* 8, 733–749, 2011.

OECD. **Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing.** 2002.

OECD. **Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation.** 2000.

OZDEMIR, A.; ALTINTOP, M.D.; TURAN-ZITOUNI, G.; ÇİFTÇİ, G.A.; ERTORUN, I.; ALATAS, O.; KAPLANCIKLI, Z.A. **Synthesis and evaluation of new indole-based chalcones as potential antiinflammatory agentes**, *Eur. J. Med. Chem.* 89, 304-309, 2015.

PANWAR, H.; VERMA, R. S.; SRIVASTAVA, V. K.; KUMAR, A. **Synthesis of Some Substituted Azetidinonyl and Thiazolidinonyl-1,3,4-Thiadiazino[6,5-B]Indoles As Prospective Antimicrobial Agents.** *Indian Journal of Chemistry.* 45B(9), 2099-2104. 2006.

PATEL, H.; DARJI, N.; PILLAI, J.; PATEL, B. **Recent Advance in Anti-Cancer Activity of Indole Derivatives.** *Int. J. Drug Res. Tech.*; Vol. 2 (3), 225-230, 2012.

PATKAR, O. L.; BELMER, A.; HOLGATE, J. Y.; TARREN, J. R.; SHARIFF, M. R.; MORGAN, M.; FOGARTY, M. J.; BELLINGHAM, M. C.; BARTLETT, S. E.; KLENOWSKI, P. M. **The antihypertensive drug pindolol attenuates long-term but not short-term binge-like ethanol consumption in mice.** *Addiction Biology*, 22, 679–691, 2016.

PEDADA, S. R.; YARLA, N. S.; TAMBADE, P. J.; DHANANJAYA, B. L.; BISHAYEE, A.; ARUNASREE, K. M.; PHILIP, G. H.; DHARMAPURI, G.; ALIEV, G.; PUTTA, S.; RANGAIAH, G. **Synthesis of new secretory phospholipase A2-inhibitory indole containing isoxazole derivatives as anti-inflammatory and anticancer agents.** *European Journal of Medicinal Chemistry*, 112, 289-297; 2016.

PETRUZZELLI, M.; VACCA, M.; MOSCHETTA, A.; CINZIA SASSO, R.; PALASCIANO, G.; VAN ERPECUM, K. J.; PORTINCASA, P. **Intestinal mucosal damage caused by non-steroidal anti-inflammatory drugs: Role of bile salts.** *Clinical Biochemistry.* V. 40, 503-10, 2007.

PIRES, D. E. V.; BLUNDELL, T. L.; ASCHER, D. B. **pkCSM: Predicting small-molecule pharmacokinetic and toxicity properties using graph-based signatures**, *J. Med. Chem.* 58, 4066–4072, 2015.

PLUTÍN, A.M.; ALVAREZ, A.; MOCELO, R.; RAMOS, R.; CASTELLANO, E.E.; SILVA, M.M.; VILLARREAL, W.; PAVAN, F.R.; MEIRA, C.S.; FILHO, J.S.R.; MOREIRA, D.R.M.; SOARES, M.B.P.; BATISTA, A.A. **Palladium(II)/N,N-disubstituted-N-acylthioureas complexes as anti-Mycobacterium tuberculosis and anti-Trypanosoma cruzi agents**, *Polyhedron.* 132, 70-77, 2017.

PRATICÒ, D.; DOGNÉ, J. M. **Selective Cyclooxygenase-2 Inhibitors Development in Cardiovascular Medicine.** *Circulation.* 112:1073-1079, 2005.

QUEIROZ, M. R. P.; ABREU, A. S.; CARVALHO, M. S. D.; FERREIRA, P. M. T.; NAZARETH, N.; NASCIMENTO, M. S. **Synthesis of New Heteroaryl and Heteroannulated Indoles from Dehydrophenylalanines: Antitumor Evaluation.** *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 16 (10), 5584, 2008.

RAJAKARIAR, R.; YAQOOB, M. M.; GILROY, D. W. **COX-2 in Inflammation and Resolution.** *Molecular Interventions*. v. 6, n. 4, p. 199-207. 2006.

RANG, H. P.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J.; HENDERSON, G. **Rang & Dale: Farmacologia.** Tradução da 8ª Edição. Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda. 2016.

RANI, P.; SRIVASTAVA, V. K.; KUMAR, A. **Synthesis and Anti-inflammatory Activity of Heterocyclic Indole Derivatives.** *European Journal of Medicinal Chemistry*. 39(5), 449-452. 2004.

REIS, R. C. N. **Síntese de surfactantes Derivados da D-ribolactona.** *Dissertação de Mestrado em Química*. Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2007.

RODERJAN, D. A. **Estudo Clínico Comparativo de Dose Única Pré-Operatória de 50 mg de Rofecoxib ou Diclofenaco Sódico no Controle da Dor Após Tratamento Endodôntico.** *Dissertação de Mestrado*, Universidade Estadual de Ponta Grossa, 2004.

RODRIGUES, A. P. C.; COSTA, L. M. M.; DE MIRANDA, A. L. P. et al. **Síntese e avaliação das propriedades antiagregante plaquetárias de novos compostos acilhidrazônicos bioativos.** In: *Anais do XI Encontro da SBQ-Rio de Janeiro*, Rio de Janeiro, 2007.

ROTH, J.; RUMMEL, C.; BARTH, S.W.; GERSTBERGER, R.; HÜBSCHLE, T. **Molecular aspects of fever and hyperthermia.** *Immunology And Allergy Clinics of North America*. v.29, p.229-245. 2006.

ROSENGREN, A. H.; JOKUBKA, R.; TOJJAR, D.; GRANHALL, C.; HANSSON, O.; LI, D.Q.; NAGARAJ, V.; REINBOTHE, T. M.; TUNCEL, J.; ELIASSON, L.; GROOP, L.; RORSMAN, P.; SALEHI, A.; LYSENKO, V.; LUTHMAN, H.; RENSTRÖM, E. **Overexpression of Alpha2A-Adrenergic receptors contributes to type 2 diabetes.** *Science*. 327, 217–220. 2009.

SALUM, L. B. **Planejamento de ligantes da tubulina com propriedades antitumorais.** *Tese (Doutorado em Ciências)* Universidade de São Paulo, São Carlos. 2011.

SANDER, T.; FREYSS, J.; VON KORFF, M.; RUFENER, C. **DataWarrior: An open-source program for chemistry aware data visualization and analysis.** *J. Chem. Inf. Model*. 55, 460–473, 2015.

SANTOS, S. A. **Novos Agentes Anti-Inflamatórios Tiazolidínicos: Síntese, Elucidação Estrutural e Efeitos Biológicos.** *Dissertação de Mestrado*, 2013.

SAUZEM, P. D. **Derivados pirazolidínicos inéditos causam antinocicepção em camundongos no teste da formalina.** *Dissertação (Mestrado)* – Pós graduação em Bioquímica toxicológica, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2004.

SCHAPPERT, S. M.; RECHTSTEINER, E. A. **Ambulatory medical care utilization estimates for 2006.** *Natl Health Stat Report*:1–29, 2008.

SCHUCK, D. C., JORDÃO A. K., NAKABASHI M., CUNHA A. C., FERREIRA V. F., GARCIA C. R. S. **Synthetic Indole and Melatonin Derivatives Exhibit Antimalarial Activity on The Cell Cycle of The Human Malaria Parasite *Plasmodium falciparum*.** *European Journal of Medicinal Chemistry*. 78, 375-382. 2014.

SCOTT, L. J.; PERRY, C. M. **Delavirdine: A review of its use in HIV infection.** *Drugs*. 60, 1411–1444, 2000.

SERHAN, C. N.; BRAIN, S. D.; BUCKLEY, C. D.; GILROY, D. W.; HASLETT, C.; O'NEALL, L. A. J.; PERRETTI, M.; ROSSI, A. G.; WALLACE, J. L. **Resolution of inflammation: State of the art, definitions and terms.** *FASEB J*. 21, 325–332, 2007.

SERHAN, C. N.; CHIANG, N. **Novel endogenous small molecules as the checkpoint controllers in inflammation and resolution: entrée for resoleomics.** *Rheum Dis Clin North Am*. 30(1), p.: 69-95; 2004.

SHARMA, V.; KUMAR, P.; PATHAK, D. **Biological Importance of the Indole Nucleus in Recent Years: A Comprehensive Review.** *Journal of Heterocyclic Chemistry*. 47(3), 491-502. 2010.

SHIN, J. S.; YUN, C. H.; CHO, Y. W.; BAEK, N. I.; CHOI, M. S.; JEONG, T. S.; CHUNG, H. G.; LEE, K. T. **Indole-containing fractions of *Brassica rapa* inhibit inducible nitric oxide synthase and pro-inflammatory cytokine expression by inactivating nuclear factor- κ B.** *J. Med. Food*. 14, 1527–1537; 2011.

SILVA, Y. K. C.; AUGUSTO, C. V.; BARBOSA, M. L. C.; MELO, G. M. A.; QUEIROZ, A. C.; DIAS, T. L. M. F.; JÚNIOR, W. B.; BARREIRO, E. J.; LIMA, L. M.; ALEXANDRE-MOREIRA, M. S. **Synthesis and pharmacological evaluation of pyrazine N-acylhydrazone derivatives designed as novel analgesic and anti-inflammatory drug candidates,** *Bioorg. Med. Chem*. 18, 5007-5015, 2010.

SILVA, T. F.; BISPO JÚNIOR, W.; ALEXANDRE-MOREIRA, M. S.; COSTA, F. N.; MONTEIRO, C. E. S.; FERREIRA, F. F.; BARROSO, R. C. R.; NOËL, F.; SUDO, R. T.; ZAPATA-SUDO, G.; LIMA, L. M.; BARREIRO, E. J. **Novel Orally Active**

Analgesic and Anti-Inflammatory Cyclohexyl-*N* Acylhydrazone Derivatives. *Molecules*. 20, 3067-3088; 2015.

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

SINGH, P.; KAUR, S.; SHARMA, A.; KAUR, G.; BHATTI, R. **TNF- α and IL-6 inhibitors: Conjugates of N-substituted indole and aminophenylmorpholin-3-one as anti-inflammatory agents.** *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2017.

SINGH, P.; PRASHER, P.; DHILLON, P.; BHATTI, R. **Indole based peptidomimetics as anti-inflammatory and antihyperalgesic agents: Dual inhibition of 5-LOX and COX-2 enzymes,** *Eur. J. Med. Chem.* 97, 104-123, 2015.

SMYTH, C. J. **Indomethacin—Its rightful place in treatment.** *Ann. Intern. Med.* V.: 72, 430–432. 1970.

SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B. **Química Orgânica, Volume 2.** Tradução da 10ª Edição. Rio de Janeiro: LTC, cap.: 16, p.: 168, 2012.

SONG, X.; YANG, Y.; ZHAO, J.; CHEN, Y. **Synthesis and Antibacterial Activity of Cinnamaldehyde Acylhydrazone with a 1,4-Benzodioxan Fragment as a Novel Class of Potent β -Ketoacyl– Acyl Carrier Protein Synthase III (FabH) Inhibitor.** *Chem. Pharm. Bull.* v.: 62 (11), 1110–1118, 2014.

STAMP, L. K.; JAMES, M. J.; CLELAND, L. G. **Diet and Rheumatoid Arthritis: A Review of the Literature.** *Seminars in Arthritis and Rheumatism*. v. 35, n. 2, 77- 94, 2005.

STEWART, J. J. P. **MOPAC2016.** *Stewart Computational Chemistry*, Colorado Springs, CO, USA, [HTTP://OpenMOPAC.net](http://OpenMOPAC.net). 2016.

SÜLEYMAN, H.; DEMIRCAN, B.; KARAGÖZ, Y. **Anti-inflammatory and side effects of cyclooxygenase inhibitors.** *Pharmacological Reports*. v. 59, n. 3, p. 247 – 258. 2007.

TIAN, B.; HE, M.; TAN, Z.; TANG, S.; HEWLETT, I.; CHEN, S.; JIN, Y.; YANG, M. **Synthesis and antiviral evaluation of New N-Acylhydrazones Containing Glycine Residue.** *Chemical biology & drug design*. v.77, p.189- 198. 2011.

TIAN, B.; HE, M.; TANG, S.; HEWLETT, I.; TAN, Z.; LI, J.; JIN, Y.; YANG, M. **Synthesis and antiviral activities of novel acylhydrazone derivatives targeting HIV-1 capsid protein.** *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. v. 19, p. 2162–2167. 2009.

TINCANI, A.; ANDREOLI, L.; BAZZANI, C.; BOSISO, D.; SOZZANI, S. **Inflammatory molecules: A target for treatment of systemic autoimmune diseases.** *Autoimmun. Rev.* 7, 1–7, 2007.

TORRE, S. M. D.; VÁZQUEZ, C.; GONZÁLEZ-CHÁVEZ, Z.; YÉPEZ-MULIA, L.; NIETO-MENESES, R.; JASSO-CHÁVEZ, R.; SAAVEDRA, E.; HERNÁNDEZ-LUIS, F. **Synthesis and biological evaluation of 2-methyl-1H-benzimidazole-5-carbohydrazides derivatives as modifiers of redox homeostasis of *Trypanosoma cruzi*.** *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 27, 3403–3407, 2017.

TRIBUTINO, J. L.; DUARTE, C. D.; CORREA, R. S.; DORIGUETTO, A. C.; ELLENA, J.; ROMEIRO, N. C.; CASTRO, N. G.; MIRANDA, A. L.; BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. **Novel 6-methanesulfonamide-3,4-methylenedioxyphenyl-N-acylhydrazones: Orally effective anti-inflammatory drug candidates.** *Bioorg. Med. Chem.* 17, 1125–1131, 2009.

TRIBUTINO, J. L.; SANTOS, M. L.; MESQUITA, C. M.; LIMA, C. K.; SILVA, L. L.; MAIA, R. C.; DUARTE, C. D.; BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A.; CASTRO, N. G.; MIRANDA, A. L.; GUIMARAES, M. Z. **LASSBio-881: An N-acylhydrazone transiente receptor potential vanilloid subfamily type 1 antagonist orally effective against the hypernociception induced by capsaicin or partial sciatic ligation.** *Br. J. Pharmacol.* 159, 1716–1723, 2010.

UNSAL-TAN, O.; OZDEN, K.; RAUK, A.; BALKAN, A. **Synthesis and cyclooxygenase inhibitory activities of some N-acylhydrazone derivatives of isoxazolo[4,5-d]pyridazin-4(5H)-ones.** *European Journal of Medicinal Chemistry.* V. 45, p. 2345–2352. 2010.

VEBER, D.F.; JOHNSON, S.R.; CHENG, H.Y.; SMITH, B.R.; WARD, K.W.; KOPPLE, K.D. **Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates.** *J. Med. Chem.* 45. 2615–2623. 2002.

VENDRAMINI-COSTA, D. B.; SPINDOLA, H. M.; MELLO, G. C.; ANTUNES, E.; PILLI, R. A.; CARVALHO, J. E. **Anti-inflammatory and antinociceptive effects of racemic goniotalamin, a styryl lactone.** *Life Sci.* v.: 139, p.: 83–90, 2015.

VOET, D.; VOET, J. G. **Biochemistry**, fourth ed., *John Wiley & Sons*, 2011.

WATKINS, L. R.; GOEHLER, L. E.; RELTON, J.; BREWER, M. T.; MAIER, S. F. **Mechanisms of tumor necrosis factor- α (TNF- α) hyperalgesia.** *Brain Research.* v. 692, p. 244–50. 1995.

WINTER, C. A.; RISLEY, E. A.; NUSS, G. W. **Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs.** *Proc Soc Exp Biol Med.* 111: 544–547. 1962.

YEDGAR, S.; KRIMSKY, M.; COHEN, Y.; FLOWER, R. **Treatment of inflammatory diseases by aselective eicosanoid inhibitor: a double-edged sword?**

Pharmacological Sciences. v.28, n.9, p.459-464. 2007.

YOUNGSAYE, W.; DOCKENDORFF, C.; VINCENT, B.; HARTLAND, C. L.; BITTKER, J. A.; DANDAPANI, S.; PALMER, M.; WHITESELL, L.; LINDQUIST, S.; SCHREIBER, S. L.; MUNOZ, B. **Overcoming fluconazole resistance in *Candida albicans* clinical isolates with tetracyclic indoles.** *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 22, 3362–3365; 2012.

YU, X.; SHI, L.; KE, S.; **Acylhydrazone derivatives as potential anticancer agents: Synthesis, bio-evaluation and mechanism of action.** *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* v.: 25, p.: 5772–5776, 2015.

APÊNDICE A - PATENTE



Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2017 013082 7

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 2

Nome ou Razão Social: Universidade Federal de Pernambuco

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 24134488000108

Nacionalidade: Brasileira

Endereço: Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária

Cidade: Recife

Estado: PE

CEP: 50670-901

País: Brasil

Telefone: (81)2126 8959

Fax: (81)2126 8959

Email: patentes_dine.propesq@ufpe.br

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): DERIVADOS INDÓLICOS-N-ACIL-HIDRAZONAS ANTI-INFLAMATÓRIOS E ANALGÉSICOS

Resumo: A presente invenção se refere a moléculas ativas sobre processos inflamatórios. Mais especificamente, as moléculas da presente invenção referem-se a derivados N-((1H-indol-3-il)metileno)-2-cianoacetohidrazonas, os quais através de análise por cristalografia de raios-X podemos confirma a maior estabilidade dos derivados formados que apresentam diastereoisomeria E. Os testes em modelos experimentais inflamatórios in vitro e in vivo permitiram observar que houve uma inibição 1h de administração - 74,34 % de inibição e 6hs - 92,53 % de inibição nas doses testadas nas concentrações 30 e 60 mg/Kg. Esses resultados obtidos em modelos in vitro e in vivo colocam os derivados N-((1H-indol-3-il)metileno)-2-cianoacetohidrazonas e seus sais como candidatos a novos agentes anti-inflamatórios e analgésicos.

Dados do Inventor (72)

Inventor 1 de 6

Nome: MARIA DO CARMO ALVES DE LIMA

CPF: 28081951415

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Rua Beta Nº 55 – Vila Dois Carneiros

Cidade: Jaboatão dos Guararapes

Estado: PE

CEP: 54280-550

País: BRASIL

Telefone: (81) 212 68347

Fax:

Email: nenalima.mariadocarmo@gmail.com

Inventor 4 de 6

Nome: ANA DAURA TRAVASSOS DE OLIVEIRA MORAES

CPF: 01469818477

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Estudante de Pós Graduação

Endereço: Rua do Bom Pastor. nº 1505. Apto. 301, Bloco A. Iputinga

Cidade: Recife

Estado: PE

CEP: 50670-260

País: BRASIL

Telefone: (81) 996 525212

Fax:

Email: daura.travassos@yahoo.com.br

APÊNDICE B -

ARTIGO ACEITO NA REVISTA BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY

Accepted Manuscript

Synthesis, *in vitro* and *in vivo* biological evaluation, COX-1/2 inhibition and molecular docking study of indole-*N*-acylhydrazone derivatives

Ana Daura Travassos de Oliveira Moraes, Mirelly Dianne Santos de Miranda, Íris Trindade Tenório Jacob, Cézar Augusto da Cruz Amorim, Ricardo Olímpio de Moura, Simone Ângela Soares da Silva, Milena Botelho Pereira Soares, Sinara Mônica Vitalino de Almeida, Túlio Ricardo Couto de Lima Souza, Jamerson Ferreira de Oliveira, Teresinha Gonçalves da Silva, Cristiane Moutinho Lagos de Melo, Diogo Rodrigo Magalhães Moreira, Maria do Carmo Alves de Lima



PII: S0968-0896(18)31032-0
 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2018.07.024>
 Reference: BMC 14461
 To appear in: *Bioorganic & Medicinal Chemistry*

Received Date: 31 May 2018
 Revised Date: 3 July 2018
 Accepted Date: 14 July 2018

Please cite this article as: Moraes, A.D.T., Miranda, M.D.S., Jacob, I.T.T., Amorim, C.A.d., Moura, R.O.d., Silva, S.A.S., Soares, M.B.P., Almeida, S.M.V., Souza, T.R.C., Oliveira, J.F.d., Silva, T.G.d., Melo, C.M.L., Moreira, D.R.M., Lima, M.d.C., Synthesis, *in vitro* and *in vivo* biological evaluation, COX-1/2 inhibition and molecular docking study of indole-*N*-acylhydrazone derivatives, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* (2018), doi: <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2018.07.024>

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

Synthesis, *in vitro* and *in vivo* biological evaluation, COX-1/2 inhibition and molecular docking study of indole-*N*-acylhydrazone derivatives

Ana Daura Travassos de Oliveira Moraes^a; Mirelly Dianne Santos de Miranda^a; Íris Trindade Tenório Jacob^a; Cézar Augusto da Cruz Amorim^a; Ricardo Olímpio de Moura^b; Simone Ângela Soares da Silva^b; Milena Botelho Pereira Soares^c; Sinara Mônica Vitalino de Almeida^d; Túlio Ricardo Couto de Lima Souza^e; Jamerson Ferreira de Oliveira^a; Teresinha Gonçalves da Silva^a; Cristiane Moutinho Lagos de Melo^a; Diogo Rodrigo Magalhães Moreira^c; Maria do Carmo Alves de Lima^{a*}.

^a*Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Departamento de Antibióticos (DANTI), 50670-901, Recife, PE (Brazil)* ^b*Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), Departamento de Farmácia, 58429-500, Campina Grande, PB (Brazil)* ^c*Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz/Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia. 40296-710, Salvador, BA (Brazil)* ^d*Universidade de Pernambuco (UPE), Faculdade de Ciências, Educação e Tecnologia de Garanhuns (FACETEG), 55290-000, Garanhuns, PE (Brazil)* ^e*Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Unidade Acadêmica de Serra Talhada (UAST), 56909-535, Serra Talhada, PE (Brazil)*

To whom correspondence should be addressed: Maria do Carmo Alves de Lima

*Email: nenalima.mariadocarmo@gmail.com

Phone number: +55 8121268347

Fax: +55 8121268346

Abstract

The objective of this work was to obtain and evaluate anti-inflammatory *in vitro*, *in vivo* and *in silico* potential of novel indole-*N*-acylhydrazone derivatives. In total, 10 new compounds (**3a-j**) were synthesized in satisfactory yields, through a condensation reaction in a single synthesis step. In the lymphoproliferation assay, using mice splenocytes, **3a** and **3b** showed inhibition of lymphocyte proliferation of 62.7% (± 3.5) and 50.7% (± 2), respectively, while dexamethasone presented an inhibition of 74.6% (± 2.4). Moreover, compound **3b** induced higher Th2 cytokines production in mice splenocytes cultures. The results for COX inhibition assays showed that compound **3b** is a selective COX-2 inhibitor, but with less potency when compared to celecoxib, and compound **3a** not presented selectivity towards COX-2. The molecular docking results suggest compounds **3a** and **3b** interact with the active site of COX-2 in similar conformations, but not with the active site of COX-1, and this may be the main reason to the COX-2 selectivity of compound **3b**. *In vivo* carrageenan-induced paw edema assays were adopted for the confirmation of the anti-inflammatory activity. Compound **3b** showed better results in suppressing edema at all tested concentrations and was able to induce an edema inhibition of 100% after 5 hours of carrageenan injection at the 30 mg kg⁻¹ dosage, corroborating with the COX inhibition and lymphoproliferation results. In addition to our experimental results, *in silico* analysis suggest that compounds **3a** and **3b** present a well-balanced profile between pharmacodynamics and pharmacokinetics. Thus, our preliminary results revealed the potentiality of a new COX-2 selective derivative in the modulation of the inflammatory process.

Keywords: Inflammation; *N*-acylhydrazones; indoles; COX; docking.

1. Introduction

Inflammation is a protective response of the body initiated after infection or injury. This process is accomplished by a sequence of events involving molecular, cellular and physiological modifications. In addition, there is an involvement of mediators such as cytokines, free radicals, vasoactive amines and eicosanoids (mainly prostaglandins) produced by cells such as macrophages, lymphocytes, mast cells and fibroblasts¹. In relation to prostaglandins, they stem from the conversion of arachidonic acid by enzymes called cyclooxygenases (COXs)². Two isoforms are well known in cyclooxygenase, COX-1 and COX-2. COX-1 is present in most normal tissues or cells, whereas COX-2 is practically absent, but induced during inflammatory processes and responsible for increased prostaglandin synthesis³. These enzymes are inhibited by non-steroids anti-inflammatory drugs (NSAIDs)⁴. However, inhibition of the constitutive isoform (COX-1) has been associated with side effects of this drug class, mainly gastrointestinal effects⁵. Thus, the development of more specific drugs and with fewer adverse effects has been the object of study in the medicinal chemistry research area.

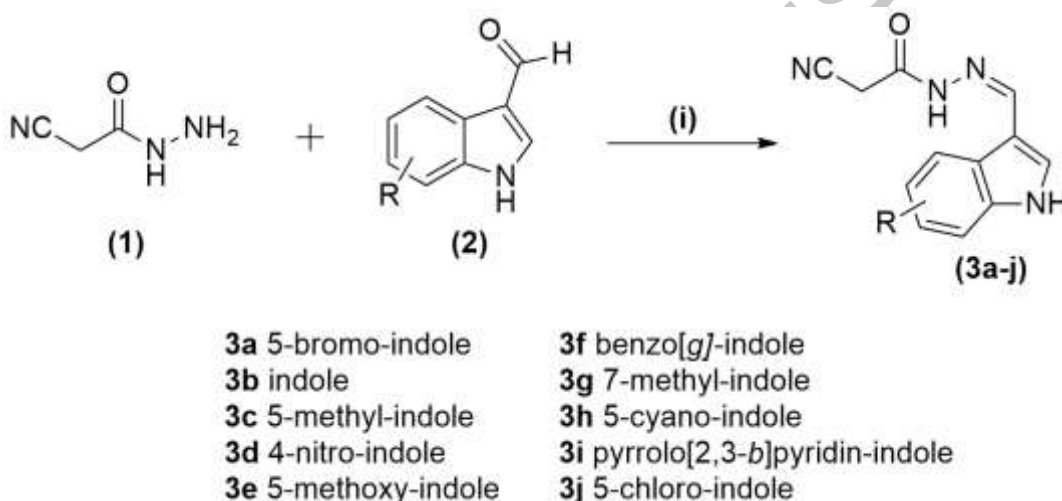
In this context, *N*-acylhydrazones and indoles can be considered privileged structures for the design of bioactive compounds with anti-inflammatory activity^{6,7}. The literature describes the anti-inflammatory activity of *N*-acylhydrazones when conjugated to heterocycle nuclei such as furanoxyl⁸, pyrazine⁷ and 1,3-benzodioxole⁹. Additionally, indoles are reported as inhibitors of important targets involved in the inflammatory process such as COX-2¹⁰, phospholipase A2¹¹ and cytokines such as IL1 β and TNF- α ¹².

In previous studies conducted by our research group, molecules bearing the indole heterocycle conjugated to other important pharmacophores such as thiazolidine and imidazolidine were able to inhibit lymphoproliferation, reduce expression/production of COX-2, IL-1 β and TNF, and showed a good pharmacokinetic profile¹²⁻¹⁵. Thus, in view of these evidences that prove the biological importance of *N*-acylhydrazones and indoles in medicinal chemistry, in this work we aimed to synthesize new molecules containing these conjugated privileged structures, as well as to evaluate the *in vivo* and *in vitro* anti-inflammatory activity and the COX-1/2 inhibition profile of these new compounds.

2. Results and Discussion

2.1 Chemistry

Compounds of interest in this study (**3a-j**) were obtained by employing a condensation reaction between equimolar amounts of the cyanoacetohydrazide and different 3-indole carboxaldehydes moieties. The reaction occurred under acid catalysis, to form the oxonium ion (carboxaldehyde) that later undergo nucleophilic attack of the hydrazide nitrogen. This was followed by the elimination of water with formation of *N*-acylhydrazone¹⁶. The employed route (Scheme 1) was adequate since the reaction yield ranged between 61-98%.



Scheme 1. Synthesis of indole-*N*-acylhydrazones (**3a-j**) derivatives. Reagents and conditions: (i) AcOH (few drops), EtOH, room temperature.

All compounds were characterised by NMR and IR spectroscopy and the spectral data was consistent with the proposed structures. In all IR spectra, absorption peaks in the 1667-1684 cm⁻¹ range, characteristic of the carbonyl group (C=O), were observed. In addition, bands in the region 2223-2279 cm⁻¹ and 3145-3332 cm⁻¹ were assigned to the nitrile (CN) and amine (-NH-) functions, respectively. As a characteristic point in IR spectroscopy, we can highlight the appearance of the absorption band in the range of 1580-1621 cm⁻¹ corresponding to the imine function (C=N). All the absorption bands and characteristic stretches are in agreement with the literature^{17,18}.

In the ¹H-NMR spectra of compounds **3a-j**, singlets relative to the azomethine hydrogen between 8.16-8.51 ppm confirmed the success of the condensation reaction.

The formation of imines from primary amines and carbonyl compounds has been extensively investigated in the field of medicinal chemistry due to their biological importance¹⁷⁻¹⁹. The hydrogens in the CH₂ group were observed as a singlet peak between 4.10 and 4.30 ppm. It was also possible to identify the indole hydrogen (NH) as a singlet in the range of 11.43-11.60 ppm. In addition, the other hydrogens related to this heterocycle were observed in the region between 6.83 and 8.47 ppm as singlets, doublets and triplets. *N*-acylhydrazones can be obtained in two diastereomeric configurations (*Z/E*).

Cordeiro et al. (2016)²⁰ stated in their work that the absence of duplicity in the imine and amide hydrogen signals is an indicative of the presence of a single diastereomer. In this study, the **3b** molecule was chosen to elucidate the diastereomeric configuration of the derivatives in this series. The duplication of the signals at δ 8.20 (imine) and δ 11.45 (amide) (signals of greater intensity) at δ 8.35 (imine) and δ 11.36 (amide) (signals of lower intensity) was observed, showing a ratio of 76:24, confirming that it is a mixture of diastereoisomers.

To assign the configuration of the major diastereomer, a NOESY experiment was performed and a spatial correlation was observed between the hydrogens δ 8.20 (imine) and 11.45 (amide). In addition, a spatial correlation was observed between the hydrogens δ 7.80 (at C2-indole) and 8.20 (imine), which corresponds to the *Z*-isomer as a major in our synthesis. Thus, the ratio of the diastereoisomers formed in this study was 76:24 (*Z/E*). Studies have shown preference for the *E* configuration of *N*-acylhydrazones²¹ even when obtained as a mixture of diastereomers²². However, our study showed the opposite, exhibited a higher preference for the *Z* isomer.

2.2 Anti-inflammatory Activity

2.2.1. Cytotoxicity and lymphoproliferation assays

After the synthesis of the new indole-*N*-acylhydrazone derivatives, the *in vitro* cytotoxic profile of the compounds was evaluated against macrophages of the J774 line. It was verified that the most part of derivatives presented a low cytotoxicity against this cellular line when compared to gentian violet, the control used in the experiment, which showed a cytotoxicity of 4.2 ± 0.6 μ M (Table 1). **3a**, **3b**, **3c** and **3g** presented CC₅₀ values of 144 ± 63 , 150.1 ± 40 , 200 ± 22 and 145.5 ± 23 μ M, respectively. The

Nacylhydrazone derivatives are known for their remarkable biological activity and low cytotoxicity, which leads to greater biological selectivity^{23,24}.

In addition, *in vitro* screening of the anti-inflammatory potential was also performed by a lymphoproliferation assay (Table 1). This study allows to indicate the percentage inhibition of the T lymphocytes proliferation induced by concanavalin A²⁵, where the highest percentage of inhibition reveals an increased anti-inflammatory activity through an immunosuppressive action. Table 1 shows the percentual results of lymphoproliferation inhibition at 50 μ M concentration. It is possible to highlight that compounds **3a**, **3b**, **3g** and **3i** presented values of 62.7% ($\pm$ 3.5), 50.7% ($\pm$ 2), 52.2% ($\pm$ 1.8) and 52.4% ($\pm$ 19.1) inhibition, respectively, while dexamethasone - positive control - presented an inhibition of 74.6% ($\pm$ 2.4). The inhibition of lymphocyte proliferation is indicative of anti-inflammatory action in the early-stage of the process. Based on these results, two compounds were selected for further studies on anti-inflammatory activity, **3a** and **3b**. The latter compound was chosen due to the absence of substitution on the heterocycle ring (**3a**-5-bromoindole; **3b**-indole without substitution) and its low cytotoxicity.

Table 1. Inhibitory activity of the new indole-*N*-acylhydrazone derivatives tested against splenocyte proliferation and cytotoxicity in macrophages J774.

Compound	% lymphoproliferation	Citotoxicity (CC ⁵⁰)
	inhibition $\pm$ SEM (50mM)	μ M $\pm$ SEM
3a	62.7 $\pm$ 3.5	144 $\pm$ 63
3b	50.7 $\pm$ 2	150.1 $\pm$ 40
3c	15.4 $\pm$ 0.3	200 $\pm$ 22
3d	31 $\pm$ 1.8	66 $\pm$ 7
3e	43.7 $\pm$ 0.8	101 $\pm$ 14
3f	1.2 $\pm$ 0.2	78.5 $\pm$ 11
3g	52.2 $\pm$ 1.8	145.5 $\pm$ 23
3h	25.7 $\pm$ 5.4	69.4 $\pm$ 17
3i	52.4 $\pm$ 19.1	107 $\pm$ 21
3j	1.8 $\pm$ 0.2	76.9 $\pm$ 10
Dexamethasone	74.6 $\pm$ 2.4	-

In our study, the structural differences presented by the compounds are evidenced in the indole nucleus. This heterocycle has substitutions by electron

withdrawing groups and donors. However, such effects do not appear to be directly related to the results found in the lymphoproliferation assay. For example, the compounds **3a** and **3j** are replaced by the bromine and chlorine atoms, respectively. However, the results presented by these compounds were opposite where **3a** and **3j** showed percent inhibition of lymphoproliferation of 62.7 and 1.8 %, respectively. The same results could also be observed in the inclusion of electron donor groups (methyl groups - compounds **3c** and **3g**), where the results presented by these compounds were, respectively, 15.4 and 52.2 %.

2.2.2 Th2 cytokines and low Nitric oxide production promoted by compound 3b in mice splenocytes cultures

Compound **3b** induced higher Th2 cytokines production, in mice splenocytes, in 24 hours and 48 hours of incubation. Results are showed in Figure 2 A-F. The high production of IL-4 and IL-10 cytokines besides to low production of IFN- γ are indicators of anti-inflammatory status promoted by compound **3b**. Moreover, the low production of the IFN- γ also induced low release of nitric oxide, a key mediator of inflammatory response (Figure 3). Freitas et al. (2018) ²⁶ found similar results in theirs studies with new naphthyl-*N*-acylhydrazones derivatives. These authors showed high anti-inflammatory profile promoted by compound associated with low TNF- α production. Moreover, Silva et al. (2015) ²⁷ investigating a new class of cycloalkyl analogues, also showed potential anti-inflammatory and analgesic activity in these compounds.

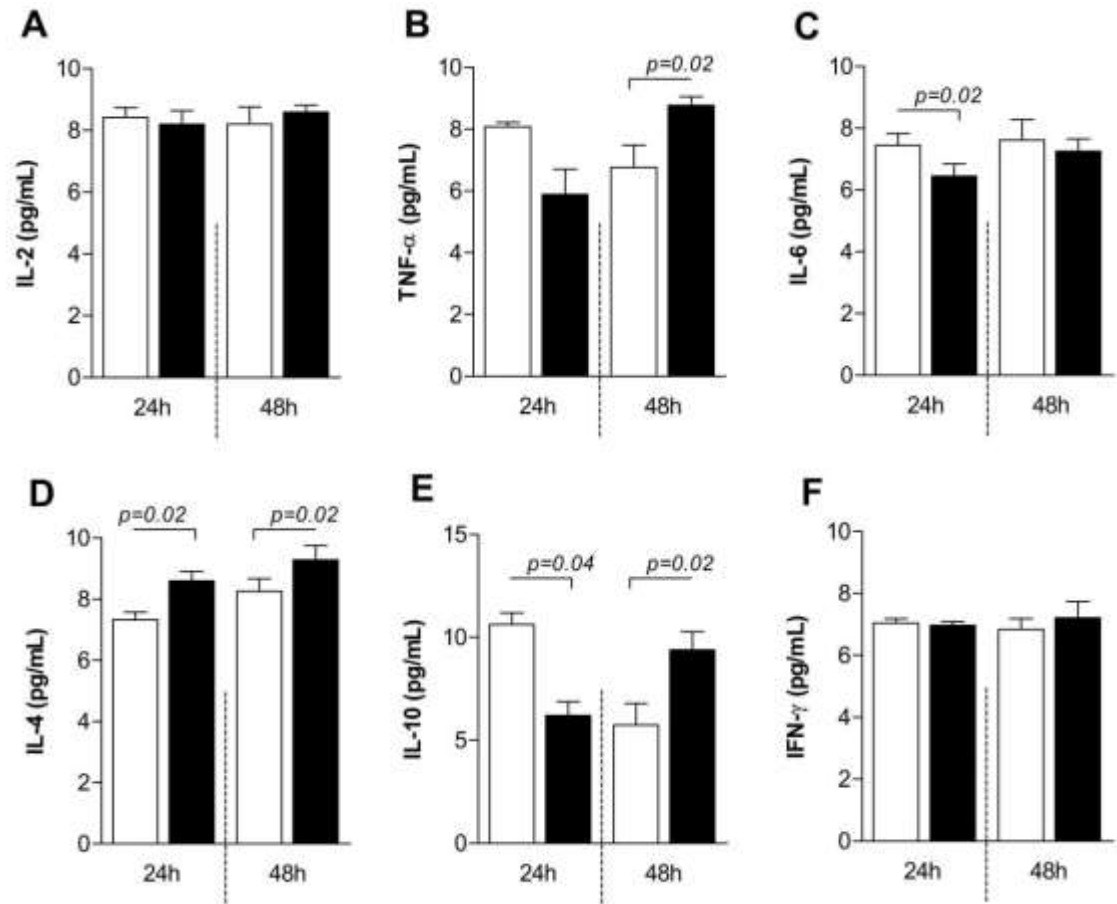


Figure 2. Cytokines production in cultures of mice splenocytes treated with compound **3b** at 11 μ M. A to E: IL -2, TNF - α , IL -6, IL4, IL -10 and IFN - γ cytokines. Compound **3b** was not able to promote significant production of the IL -2 (A) and IFN - γ (F) cytokines. However, in 24 hours of assay, IL -6 was produced in higher values and in 48 hours TNF - α also was produced in higher values by splenocytes. IL -4 (D) and IL -10 (E) cytokines were produced in higher values in both experimental times proving the anti-inflammatory profile of **3b**. With vertical bars represents control samples (cells + cultures medium) and black vertical bars represent cells treated. Two independent experiments were performed in triplicate.

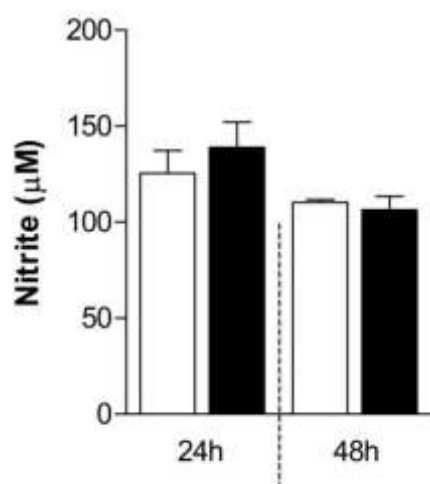


Figure 3. Nitric oxide production by splenocytes treated with 11 μM of compound **3b**. Like control (cells + culture medium) nitric oxide was produced in basal levels in both experimental times. With vertical bars represents control samples (cells + cultures medium) and black vertical bars represent cells treated. Two independent experiments were performed in triplicate.

2.2.3 Acute Oral Toxicity single dose

Oral administration of compounds **3a** and **3b** did not lead to significant toxic effects at the high tested concentration of 2000 mg kg^{-1} , as recommended by OECD (2002) ²⁸. After 1 hour of administration of the test compounds, irritability and ptosis were observed. However, throughout the experiment until completion, no death or change in physiological parameters and hematological parameters were observed as demonstrated in supplementary material. Based on these results, the *in vivo* antiinflammatory assay was conducted at 15, 30, and 60 mg kg^{-1} doses for compounds **3a** and **3b**.

2.2.4 Carrageenan-induced paw edema

For the *in vivo* evaluation of the selected compounds, the experimental model of carrageenan-induced paw edema was used, which is a widely employed assay to evaluate anti-inflammatory effects of new compounds ²⁹. The results of this assay are described in Table 2. Compound **3a** showed moderate anti-inflammatory activity at doses of 30 and 60 mg kg^{-1} , where it caused an edema suppression of 61.82 and 66.32%, respectively, after 6 h of carrageenan inoculation. In addition, the dose of 15 mg kg^{-1} did not cause significant edema inhibition in any of the evaluated times.

On the other hand, all the doses tested for the compound **3b** presented significant values of paw edema inhibition, emphasizing the doses of 30 and 60 mg kg⁻¹, which caused significant inhibition in all evaluated times. After 1 h, **3b** promoted 88.87% inhibition and after 5 h, 100%, at the dose of 30 mg kg⁻¹. At the 60 mg kg⁻¹ dose, the best results were found after 1 h of administration (74.34% inhibition) and 6 h (92.53% inhibition). The dose of 15 mg kg⁻¹ showed better results after 6 h of inoculation of the phlogistic agent (66.97% inhibition). Indomethacin (10 mg kg⁻¹), the standard drug used in the experiment, also showed significant results at all time points, with an inhibition of 72.43% and 84.07% at 2 h and 6 h, respectively.

Table 2. Anti-inflammatory effect of the indole-*N*-acylhydrazone derivatives after carrageenan-induced paw edema assay.

Time (h)	Negative control	Indomethacin	Derivative 3a			Derivative 3b		
		10 mg.kg ⁻¹	15 mg.kg ⁻¹	30 mg.kg ⁻¹	60 mg.kg ⁻¹	15 mg.kg ⁻¹	30 mg.kg ⁻¹	60 mg.kg ⁻¹
1	59.39±10.59	19.06±3.59***	65.95±12.61	50.00±0.02	48.33±1.66	25.00±7.75***	6.60±1.51***	15.23±3.60***
2	63.09±7.32	17.39±3.27***	54.38±6.44	50.96±5.91	54.16±5.08	31.41±8.52** *	8.77±4.05***	22.50±5.35***
3	43.53±5.06	17.39±3.27**	43.23±4.49	41.97±4.01	49.33±2.35	29.51±15.12	3.63±2.29***	18.17±7.21*
4	48.95± 6.59	24.51±4.87**	41.90±3.73	29.12±6.16*	29.38±4.62	41.60±8.48	2.25±1.14***	21.66±6.19***
5	52.03±6.53	12.57±3.67** *	40.57±4.63	24.83±4.08**	23.19±4.06***	28.96±16.84	0.00±0.00***	8.00±5.33***
6	56.13±7.17	8.93±2.87***	35.23±7.61	21.42±2.91***	18.90±3.62***	18.53±7.60***	0.00±0.00***	4.19±2.83***

Data were expressed as the mean ± SE of 6 animals per group. Results were considered significant when *p < 0.05; **p < 0.01 and ***p < 0.001 (in comparison to negative control group), determined by analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni posttests.

Carrageenan-induced inflammation is a biphasic process where the release of mediators such as serotonin, histamine, kinins, nitric oxide, and prostaglandins from neutrophil recruitment initiates. The first phase occurs up to 2 hours after the phlogistic agent injection, while the late phase (cell phase) occurs up to 6 hours after the administration of carrageenan^{30,31}. These results indicate a possible action of **3b** in the inhibition of vasoactive amines, preventing the degranulation of mast cells, and in the cellular phase, inhibiting lymphocyte migration, a fact supported by the results in the lymphoproliferation assay. The fact that the model of paw edema carrageenan-induced consists of a biphasic process may justify our results not being dose-dependent or time-dependent. This evidence is valid since different mediators of the inflammatory process are acting in this murine model.

The compounds evaluated in this study present two privileged groups, the N-acylhydrazone moiety and the indole heterocycle. N-acylhydrazones are well described in the literature as anti-inflammatory agents^{9,32,33} and the indole heteroaromatic group was related to the maximal anti-inflammatory response in a carrageenan-induced paw edema assay, as described by Bhokya et al. (2017)³⁴. In addition, the pharmacologic potential of hydrazone-indole compounds has been reported in models of acute and chronic inflammation³⁵, which highlights the importance of these nuclei for the development of anti-inflammatory activity.

2.2.5 Cyclooxygenase (1 and 2) *in vitro* inhibition assay

In order to evaluate the COX inhibition profiles of the compounds in this study, *in vitro* COX-1 and COX-2 inhibition tests were carried out with compounds **3a** and **3b** (from 1.5-100 μ M) to determine the concentration produced 50% inhibition of enzymes (IC_{50}) and their selectivity indices (SI) using celecoxib as reference drug. The results show that both compounds **3a** and **3b** were able to inhibit both COX-1 and COX-2 at low concentrations (Table 3). In relation of selectivity index (SI), only compound **3b** displayed COX-2 inhibitory activity (SI: 1.51), but with less potency when compared to celecoxib (SI: 11.88).

Table 3. *In vitro* COX-1 and COX-¹ inhibition and COX-2 SI of new indole-Nacylhydrazone derivatives (**3a** and **3b**).

Compound	IC ₅₀ (μM) ^a		SI ^b
	COX-1	COX-2	
3a	0.18	0.25	0.72
3b	1.54	1.02	1.51
Celecoxib	3.09	0.26	11.88

^a IC₅₀ value is the compound concentration required to produce 50% inhibition of COX-1 or COX-2 for means of three determinations.

^b SI: ratio (IC₅₀ COX-1/ IC₅₀ COX-2).

The interaction test with enzymes and potential inhibitors is an important step in the development of potential anti-inflammatory drugs. Knowledge of the structural differences between pharmacological targets is essential for the design of new active substances with greater specificity. In this context, the main difference between COX-1 and COX-2 is the higher COX-2 active site volume compared to COX-1 (about 20%)³⁶.

2.2.6 *In silico* studies of COX-1 and COX-2 interactions

In order to better understand the COX selectivity of **3a** and **3b**, a docking study was performed between these compounds and both COX isoenzymes. For this purpose, two celecoxib co-crystallized models for COX-1 and COX-2 (PDB codes: 3KK6 and 3LN1, respectively) were selected as targets since celecoxib is used as a reference compound for our *in vitro* COX inhibition assays. In the first step of the procedure, celecoxib was redocked into the active site of COX-1 and COX-2 with a binding free energy of -10.62 and -10.80 kcal mol⁻¹, respectively. Docking of test compounds showed that they can occupy the same binding site as the co-crystallized ligand. Compounds **3a** and **3b** bind to COX-1 enzyme by releasing free energy of -8.28 and 7.84 kcal mol⁻¹, respectively, and to COX-2 releasing free energy of -8.52 and -7.73 kcal mol⁻¹, respectively. Docking poses of compounds **3a** and **3b** at COX-1 and COX-2 active sites are shown in Figure 4.

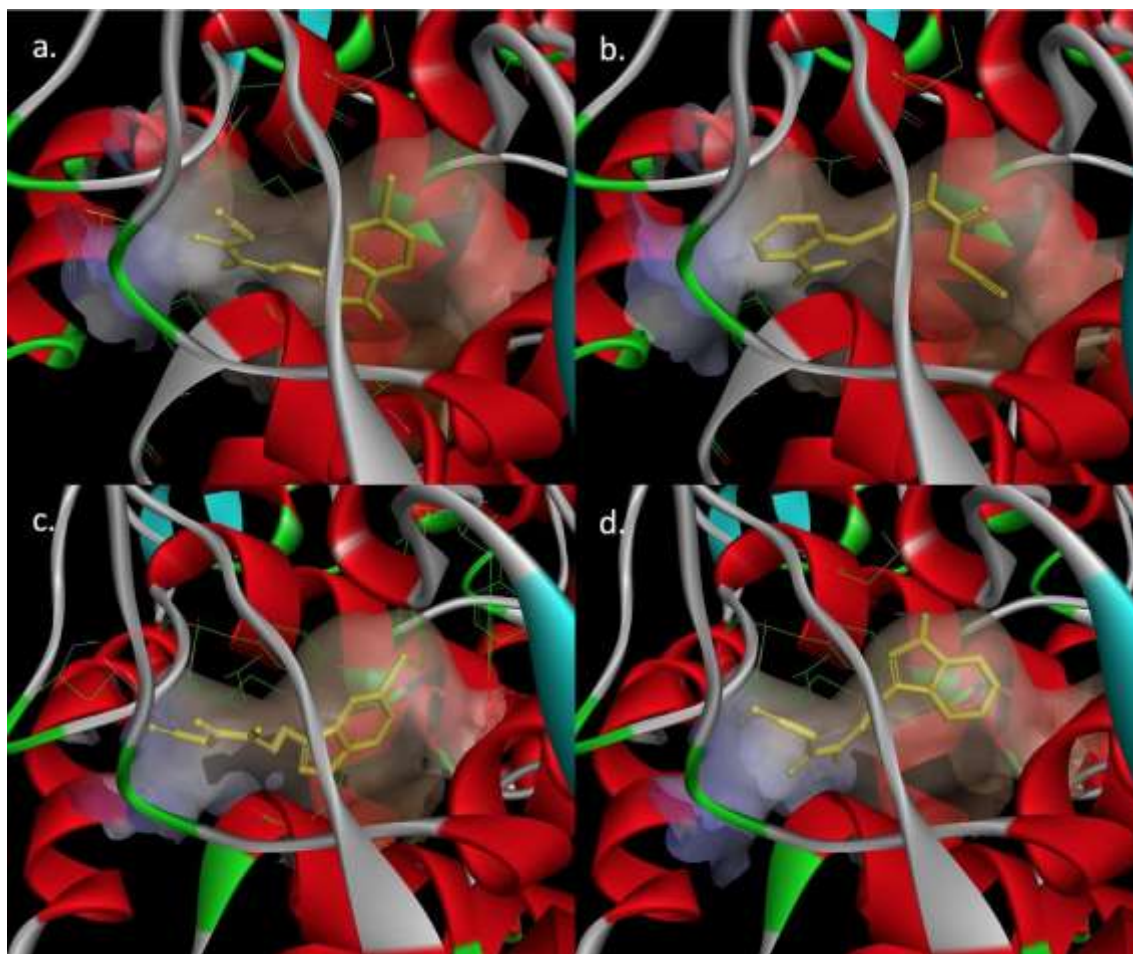


Figure 4. Binding modes of the docked compounds (in yellow) at COX-1 and COX-2 active sites. a) **3a** at the active site of COX-1. b) **3b** at the active site of COX-1. c) **3a** at the active site of COX-2. d) **3b** at the active site of COX-2. The active sites hydrophobic surfaces are shown with the hydrophobic region in brown and the hydrophilic region in blue.

The presence of the volumous bromine atom in compound **3a** leads to different conformations between these compounds at the COX active sites. At the COX-2 active site, the main difference between the docked conformations is the indole ring position. Compound **3b**, which presented *in vitro* COX-2 selectivity, interacts with COX-2 at Ile503 and Phe504 via hydrogen bonds to the nitrile function. The indole rings interact with Met508 via Pi-Sulfur and Amide-Pi stacking interactions, and forms amide-pi

stacking interactions with Gly512. The indole ring of compound **3a** assumes a different conformation in order to fit the hydrophobic pocket of the COX-2 active site, and interacts with 4 aminoacids (Leu338, Ala513, Val335, Val509) via Pi-Alkyl interactions. Compound **3a** also interacts with COX-2 Ile503 and Phe504 via hydrogen bonds to the carbonyl, and with Arg499 via one hydrogen bond to the nitrile.

The obtained docking poses for COX-1 show **3a** and **3b** at distinct conformations. At the less voluminous active site of COX-1, **3b** assumes a conformation where the indole ring is pointed to the hydrophilic side-pocket of the active site via a carbon-hydrogen bond to Tyr355 and Pi-Sigma interactions with Ile523. This compound also makes two hydrogen bonds with the active site (Ser530 with the nitrile and Met522 with the amide hydrogen). Compound **3a**, on the other hand, maintains a similar conformation when compared to the COX-2 active site. The bromine substituted indole ring is pointed to the hydrophobic pocket of the active site and interacts with Ala527 and Val349 via Pi-Sigma interactions and Leu352 via Pi-Alkyl interactions. The nitrile makes one hydrogen bond to Ile517.

The conformation of compound **3b** at the COX-1 active site (compared to **3a**) may avoid the effective ligand-receptor interactions, which could lead to the different activities of these compounds towards COX-1 and the COX-2 selectivity of **3b**.

2.2.7 ADMET prediction

In silico ADMET predictions were performed to evaluate the pharmacokinetic and toxicity profiles of compounds **3a** and **3b**. Accordingly to Lipinski's rules³⁷, the potential drug is orally active when meets the following criteria: a) molecular weight $\leq$ 500 da; b) $\text{LogP} \leq 5$ (or $\text{MLogP} \leq 4.15$); c) number of hydrogen bond acceptors ≤ 10 ; d) number of hydrogen bond donors ≤ 5 . Structures **3a** and **3b** present $\text{MLogP} < 1$ and an adequate (based on Lipinski's Rules) number of hydrogen bond donors and acceptors, which suggests a good oral bioavailability (Table 4). In addition, the LogS value shows that both compounds are water soluble (LogS between -4 and -2), a key feature to an appropriate bioavailability.

Table 4. *In-Silico* Pharmacokinetic data estimated at SwissADME or pkCSM webservices.

Compound	Log P^a	Log S^b	TPSA (Å ²) ^c	Caco-2 permeability (log Papp; log cm/s) ^d	Int. Abs. (%) ^e	VDss (log L/kg) ^f	Fract. Unb. ^g	Total Clearance (log ml/min/kg) ^h
3a	0.93	-3.20	81.04	1.012	90.33	-0.009	0.305	0.188
3b	0.25	-2.49	81.04	0.812	91.90	0.018	0.325	0.94

^aSwissADME Moriguchi log of octanol-water partition coefficient; ^bSwissADME Ali log of aqueous solubility; SwissADME calculation of Topological Polar Surface Area (TPSA); ^cpkCSM prediction of Caco-2 cell permeability as estimation of absorption at human intestinal mucosa; ^dpkCSM prediction of the proportion of compound absorption through the human small intestine; ^epkCSM prediction of the log of steady state volume of distribution (VDss); ^fpkCSM prediction of compound fraction unbound in plasma (not bound to serum proteins); ^gpkCSM prediction of the log of total drug clearance.

The TPSA value indicates that these molecules may have good intestinal absorption (expected for molecules with $TPSA \leq 140 \text{ \AA}^2$)³⁸. The Caco-2 monolayer of cells is widely used as an *in vitro* model to predict intestinal absorption of orally administered drugs, by measuring the logarithm of the apparent permeability coefficient ($\log P_{app}$, $\log \text{ cm s}^{-1}$). A high absorption is expected for values of $\log P_{app} > 0.90$. Only compound **3a** had a $\log P_{app} > 0.90$ ³⁹. However, both compounds presented a high probability of absorption at the small human intestine, with values $> 90\%$.

The volume of distribution (VD_{ss}) indicates the theoretical volume that a total dose would need to be uniformly distributed in the plasma at the same concentration observed in blood plasma. High values of VD_{ss} ($\log VD_{ss} > 0.45$) indicate the drug will be distributed in tissue rather than plasma. VD_{ss} value is considered low when $\log VD_{ss} < -0.15$ ³⁹. Compounds **3a** and **3b** showed intermediate values of VD_{ss} , and should have an adequate plasma distribution profile, with a fraction of the unbound drug of 0.305 and 0.325, respectively. These values indicate that the drug can be well distributed and present a significative unbound (and readily available to interact with the target) fraction at the plasma.

Drug clearance occurs primarily as a combination of renal and hepatic clearance and is related to the drug bioavailability. A drug with a high total clearance value will present a fast excretion process. Compounds **3a** and **3b** present total clearance values of 0.188 and 0.94, respectively.

The toxicity risk predictor algorithm used by the Osiris Datawarrior predicts the probability of tumorigenic, mutagenic, reproductive or irritant effects that may be caused by drugs. When structures **3a** and **3b** were evaluated, it was found that none of these effects were present.

3. Conclusions

In this study, novel compounds containing *N*-acylhydrazone and indole moieties were obtained and their anti-inflammatory activity were succesfully evaluated. The lymphocyte proliferation inhibition tests indicate these compounds as potential agents to act in the cellular phase of inflammation proccess. *In vivo* assays corroborated the *in vitro* results, where the maximum suppression values of mouse paw edema were observed in the late phase (cellular phase). Additionally, findings regarding the inhibition of COX-1 and COX-2 indicate **3b** as a selective COX-2 inhibitor, but less

potent when compared to celecoxib. Moreover, immunological assays reinforce and indicated the higher anti-inflammatory profile promoted by compound **3b**. The molecular docking results suggested compounds **3a** and **3b** interacting with the active site of COX-2 in related conformations but with different arrangements at the active site of COX-1. One may associate this with the observed COX inhibition selectivity of compound **3b**. Thus, the anti-inflammatory results and ADMET predicted values of compound **3a** and **3b** present a well-balanced profile between pharmacodynamics and pharmacokinetics, which justifies the use of these derivatives - mainly **3b**, a selective COX-2 inhibitor - as lead compounds in the development of anti-inflammatory drugs.

4. Experimental Section

4.1 Chemistry Section

All reagents used in this study were commercially available (Sigma-Aldrich, Acros Organics, Vetec). The melting points were determined on Fisatom 431D (Fisatom, Brazil) apparatus and were uncorrected. IR spectra were measured on Bruker IFS-66 IR spectrophotometer (Bruker, Germany) using KBr pellets. NMR spectra were recorded on Bruker AMX-300 MHz (300 MHz for ^1H and 75 MHz for ^{13}C) instruments by using tetramethylsilane as an internal standard. DMSO- d_6 was purchased from Sigma-Aldrich. The chemical shifts were reported in δ units and coupling constants (J) were reported in Hertz (Hz). The multiplicities were given as s (singlet), d (doublet), t (triplet), m (multiplet), dd (double doublet). TLC development was conducted on 0.25 mm silica gel plates (Merck, silica gel 60 F₂₅₄ in aluminium foil).

4.1.1 General procedure for obtaining the compounds

Cyanoacetohydrazide (**1**) (1 mmol) was added to a solution of substituted indole3-carboxaldehyde (**2**) (1 mmol) and 3-5 drops of acetic acid in ethanol (10 mL)¹⁹. The reaction was processed under magnetic stirring for 12 h at room temperature. The formed precipitate was removed under filtration and washed with distilled water then dried in desiccator under vacuum. After drying, the products (**3a-j**) were recrystallized from ethanol. Yields, melting points and spectroscopic data are listed below for each new compound.

1 2-cyano-N'-((5-bromo-1H-indol-3-yl)methylene)acetohydrazide (3a)

3a was obtained as yellow powder (88.3%). M.p. (°C): 237-239. AcOEt/*n*-hexane): 0.45. IR (KBr): 1233.0 (NH, Ar), 1619.6 (C=N), 1673.6 (HN 2275.7 (CN), 3286.8 (NH) cm⁻¹. NMR ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 4.21 (s, 2H, CH₂), 7.32 (d, 1H, *J* 8.7 Hz, ArH), 7.42 (d, 1H, *J* 8.1 Hz, ArH), 7.88 (s, 1H, ArH), 8.17 (s, 1H, N=CH), 8.23 (s, 1H, ArNCH), 11.5 (s, 1H, ArNH), 11.7 (s, 1H, NH). NMR ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ 24.75 (CH₂), 111.09 (C, Ar), 113.6 (C-Br, Ar), 114.33 (CH, Ar), 116.62 (CN), 124.25 (CH, Ar), 126.15 (C, Ar), 132.56 (HC-N), 136.18 (C-N, Ar), 141.86 (HC=N), 164.16 (C=O). HRMS *m/z* [*M* + *H*]⁺ calcd for C₁₂H₉BrN₄O: 303.9960; found: 303.9887.

4.1.1.2 2-cyano-N'-((1H-indol-3-yl)methylene)acetohydrazide (3b)

Compound **3b** was obtained as yellow powder (69.03%). M.p. (°C): 199-202. R_f (6:4 AcOEt/*n*-hexane): 0.55. IR (KBr): 1246.5 (NH, Ar), 1620.2 (C=N), 1670.5 (HN-C=O), 2275.7 (CN), 3300.8 (NH) cm⁻¹. NMR ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 4.22 (s, 2H, CH₂), 7.15 (t, 1H, *J* 7.35 Hz, ArH), 7.2 (t, 1H, *J* 7.35 Hz, ArH), 7.44 (d, 1H, *J* 7.2 Hz, ArH), 7.81 (s, 1H, ArNCH), 8.12 (d, 1H, *J* 7.5 Hz, ArH), 8.19 (s, 1H, N=CH), 11.46 (s, 1H, NH), 11.58 (s, 1H, ArNH). NMR ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ 24.44 (CH₂), 111.83 (CH, Ar), 111.13 (C, Ar), 116.32 (CN), 120.64 (CH, Ar), 121.86 (CH, Ar), 122.67 (CH, Ar), 123.94 (C, Ar), 130.93 (HC-N), 137.08 (C-N, Ar), 141.95 (HC=N), 163.78 (C=O). HRMS *m/z* [*M* + *H*]⁺ calcd for C₁₂H₁₀N₄O: 226.0855; found: 226.0943.

4.1.1.3 2-cyano-N'-((5-methyl-1H-indol-3-yl)methylene)acetohydrazide (3c)

Compound **3c** was obtained as white powder (61.45%). M.p. (°C): 213-216. R_f (6:4 AcOEt/*n*-hexane): 0.51. IR (KBr): 1245.5 (NH, Ar), 1614.5 (C=N), 1677.1 (HN-C=O), 2269.3 (CN), 3345.7 (NH) cm⁻¹. NMR ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 2.43 (s, 3H, CH₃), 4.21 (s, 2H, CH₂), 7.02 (d, 1H, *J* 8.4 Hz, ArH), 7.31 (d, 1H, *J* 8.1 Hz, ArH), 7.75 (s, 1H, ArNCH), 7.9 (s, 1H, ArH), 8.16 (s, 1H, N=CH), 11.43 (s, 1H, ArNH), 11.46 (s, 1H, NH). NMR ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ 21.37 (CH₃), 24.42 (CH₂), 110.66 (C, Ar), 111.52 (CH, Ar), 116.36 (CN), 121.51 (CH, Ar), 124.16 (CH, Ar), 124.21 (C, Ar), 129.16 (C-CH₃, Ar), 130.92 (HC-N), 135.4 (C-N, Ar), 142.13 (HC=N), 163.69 (C=O). HRMS *m/z* [*M* + *H*]⁺ calcd for C₁₃H₁₂N₄O: 240.1011; found: 240.1096.

4 2-cyano-N'-((4-nitro-1H-indol-3-yl)methylene)acetohydrazide (3d)

3d was obtained as orange powder (88.3%). M.p. (°C): 222-225. AcOEt/*n*-hexane): 0.42. IR (KBr): 1280.9 (NH, Ar), 1588.9 (C=N), 1675.6 (HN 2259.6 (CN), 3268.4 (NH) cm⁻¹. NMR ¹H (300 MHz, DMSO-*d*6): δ 4.10 (s, 2H, CH₂), 7.3 (d, 1H, *J* 8.4 Hz, ArH), 7.4 (d, 1H, *J* 7.5 Hz, ArH), 7.87 (t, 1H, *J* 7.95 Hz, ArH), 8.2 (s, 1H, ArNCH), 8.38 (s, 1H, N=CH), 11.6 (s, 1H, ArNH), 12.48 (s, 1H, NH). NMR ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*6): δ 23.88 (CH₂), 109.79 (C, Ar), 116.18 (CN), 117.12 (C, Ar), 117.77 (CH, Ar), 118.66 (CH, Ar), 121.36 (CH, Ar), 132.23 (HC-N), 139.08 (C – N, Ar), 140.99 (HC=N), 142.1 (C-NO₂, Ar), 163.92 (C=O). HRMS *m/z* [*M* + *H*]⁺ calcd for C₁₂H₉N₅O₃: 271.0705; found: 271.0966.

4.1.1.5 2-cyano-N'-((5-methoxy-1H-indol-3-yl)methylene)acetohydrazide (3e)

Compound **3e** was obtained as yellow powder (81.8%). M.p. (°C): 212-214. R_f (6:4 AcOEt/*n*-hexane): 0.42. IR (KBr): 1254.6 (NH, Ar), 1620.2 (C=N), 1672.9 (HN-C=O), 2269.3 (CN), 3332.5 (NH) cm⁻¹. NMR ¹H (300 MHz, DMSO-*d*6): δ (s, 3H, CH₃), 4.21 (s, 2H, CH₂), 6.83 (d, 1H, *J* 8.7 Hz, ArH), 7.33 (d, 1H, *J* 8.7 Hz, ArH), 7.61 (s, 1H, ArH), 7.75 (s, 1H, ArNCH), 8.17 (s, 1H, N=CH), 11.46 (s, 2H, ArNH e NH). NMR ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*6): δ 24.78 (CH₂), 55.53 (CH₃), 103.81 (CH, Ar), 111.33 (C, Ar), 113.11 (CH, Ar), 116.76 (CN), 124.91 (C, Ar), 131.63 (HC-N, Ar), 132.31 (C–N, Ar), 142.46 (HC=N), 154.92 (C-OCH₃, Ar), 164.07 (C=O). HRMS *m/z* [*M* + *H*]⁺ calcd for C₁₃H₁₂N₄O₂: 256.0960; found: 256.0876.

4.1.1.6 2-cyano-N'-((1H-benzo[*g*]indol-3-yl)methylene)acetohydrazide (3f)

Compound **3f** was obtained as yellow powder (97.8%). M.p. (°C): 240-242. R_f (6:4 AcOEt/*n*-hexane): 0.36. IR (KBr): 1221.2 (NH, Ar), 1621.4 (C=N), 1671.5 (HN-C=O), 2262.8 (CN), 3316.0 (NH) cm⁻¹. NMR ¹H (300 MHz, DMSO-*d*6): δ 4.28 (s, 2H, CH₂), 7.48 (d, 1H, *J* 8.1 Hz, ArH), 7.59 (t, 2H, *J* 8.85 Hz, ArH), 7.91 (s, 1H, ArNCH), 7.97 (d, 1H, *J* 8.1 Hz, ArH), 8.25 (d, 1H, *J* 9.0 Hz, ArH), 8.27 (s, 1H, N=CH), 8.40 (d, 1H, *J* 8.7 Hz, ArH), 11.54 (s, 1H, ArNH), 12.49 (s, 1H, NH). NMR ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*6): δ 24.51 (CH₂), 112.76 (C, Ar), 116.35 (CN), 120.03 (C, Ar), 120.79 (CH, Ar), 121.47 (CH, Ar), 121.73 (C, Ar), 124.30 (CH, Ar), 125.65 (HC-N, Ar), 128.65 (CH, Ar), 128.59 (CH, Ar), 128.39 (CH, Ar), 131.86 (C–N, Ar), 141.96 (HC=N), 163.89 (C=O). HRMS *m/z* [*M* + *H*]⁺ calcd for C₁₆H₁₂N₄O: 276.1011; found: 276.1239.

4.1.1.7 2-cyano-N'-((7-methyl-1H-indol-3-yl)methylene)acetohydrazide (3g)

3g was obtained as yellow powder (86.6%). M.p. (°C): 219–221. AcOEt/*n*-hexane): 0.31. IR (KBr): 1236.9 (NH, Ar), 1618.7 (C=N), 1674.0 (HN 2275.7 (CN), 3324.3 (NH) cm⁻¹. NMR ¹H (300 MHz, DMSO-*d*6): δ 4.28 (s, 3H, CH₃), 4.23 (s, 2H, CH₂), 7.02 (d, 1H, *J* 7.2 Hz, ArH), 7.08 (t, 1H, *J* 7.35 Hz, ArH), 7.83 (s, 1H, ArNCH), 7.98 (d, 1H, *J* 7.5 Hz, ArH), 8.22 (s, 1H, N=CH), 11.48 (s, 1H, ArNH), 11.58 (s, 1H, NH). NMR ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*6): δ 24.51 (CH₃), 24.84 (CH₂), 111.99 (C, Ar), 116.73 (CN), 119.86 (CH, Ar), 121.27 (CH, Ar), 121.42 (C-CH₃, Ar), 123.66 (CH, Ar), 124.15 (C, Ar), 131.09 (HC-N, Ar), 136.99 (C-N, Ar), 142.48 (HC=N), 164.18 (C=O). HRMS *m/z* [*M* + *H*]⁺ calcd for C₁₃H₁₂N₄O: 240.1011; found: 240.0987.

4.1.1.8 2-cyano-N'-((5-cyano-1H-indol-3-yl)methylene)acetohydrazide (3h)

Compound **3h** was obtained as yellow powder (98%). M.p. (°C): 247–249. R_f (6:4 AcOEt/*n*-hexane): 0.22. IR (KBr): 1247.6 (NH, Ar), 1621.8 (C=N), 1677.3 (HN-C=O), 2223.8 (CN), 3295.8 (NH) cm⁻¹. NMR ¹H (300 MHz, DMSO-*d*6): δ 4.30 (s, 2H, CH₂), 7.55 (d, 1H, *J* 8.1 Hz, ArH), 7.61 (d, 1H, *J* 8.1 Hz, ArH), 8.02 (s, 1H, ArNCH), 8.19 (s, 1H, ArH), 8.51 (s, 1H, N=CH), 11.56 (s, 1H, ArNH), 12.08 (s, 1H, NH). NMR ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*6): δ 25.00 (CH₂), 103.28 (C-C≡N, Ar), 112.26 (C, Ar), 113.68 (CH, Ar), 116.81 (CN), 120.92 (CN), 124.03 (C, Ar), 126.07 (CH, Ar), 127.40 (CH, Ar), 133.45 (HC-N), 139.26 (C-N, Ar), 141.39 (HC=N), 164.49 (C=O). HRMS *m/z* [*M* + *H*]⁺ calcd for C₁₃H₉N₅O: 251.0807; found: 251.0780.

4.1.1.9 2-cyano-N'-((1H-pyrrolo[2,3-*b*]pyridin-3-yl)methylene)acetohydrazide (3i)

Compound **3i** was obtained as white powder (79.1%). M.p. (°C): 244–246. R_f (6:4 AcOEt/*n*-hexane): 0.38. IR (KBr): 1260.1 (NH, Ar), 1580.4 (C=N), 1667.5 (HN-C=O), 2259.6 (CN), 3145.3 (NH) cm⁻¹. NMR ¹H (300 MHz, DMSO-*d*6): δ 4.25 (s, 2H, CH₂), 7.21 (t, 1H, *J* 7.2 Hz, ArH), 7.96 (s, 1H, ArNCH), 8.16 (s, 1H, N=CH), 8.31 (d, 1H, *J* 6.9 Hz, ArH), 8.47 (d, 1H, *J* 7.5 Hz, ArH), 11.58 (s, 1H, ArNH), 12.07 (s, 1H, NH). NMR ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*6): δ 24.92 (CH₂), 110.42 (C, Ar), 110.47 (C, Ar), 116.73 (CN), 117.38 (CH, Ar), 129.29 (HC-N, Ar), 131.42 (CH, Ar), 141.83 (CH, Ar), 144.44 (HC=N), 149.74 (C-N, Ar), 164.41 (C=O). HRMS *m/z* [*M* + *H*]⁺ calcd for C₁₁H₉N₅O: 227.0807; found: 227.0836.

4.1.1.10 2-cyano-N'-((5-chloro-1H-indol-3-yl)methylene)acetohydrazide (3j)

3j was obtained as yellow powder (98.2%). M.p. (°C): 241-243. AcOEt/*n*-hexane): 0.40. IR (KBr): 1231.8 (NH, Ar), 1618.3 (C=N), 1684.5 (HN 2279.1 (CN), 3302.0 (NH) cm⁻¹. NMR ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 4.22 (s, 2H, CH₂), 7.21 (d, 1H, *J* 8.7 Hz, ArH), 7.46 (d, 1H, *J* 8.7 Hz, ArH), 7.90 (s, 1H, ArNCH), 8.07 (s, 1H, ArH), 8.16 (s, 1H, N=CH), 11.50 (s, 1H, ArNH), 11.76 (s, 1H, NH). NMR ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ 24.36 (CH₂), 110.78 (C, Ar), 113.46 (CH, Ar), 116.23 (C≡N), 120.80 (CH, Ar), 122.68 (CH, Ar), 124.0 (C, Ar), 125.21 (C-Cl, Ar), 132.36 (HC -N, Ar), 135.51 (C-N, Ar), 141.44 (HC=N), 163.76 (C=O). HRMS *m/z* [*M* + H]⁺ calcd for C₁₂H₉ClN₄O: 260.0465; found: 260.0295.

4.2 Biological Section

4.2.1. *In vitro* studies

4.2.1.1 J774 macrophages cytotoxicity

J774 macrophages (1x10⁴ cells/well) were distributed in 96-well plate in DMEM medium. Each compound was solubilized in 1% DMSO. As a positive control, gentian violet was tested, whereas as a negative control, the wells received only DMEM and DMSO medium. The plate was then cultured for 72 hours, at 37 ° C and 5% CO₂. Then 20 µL of AlamarBlue was added in each well and the plate incubated for an additional 4 hours. The plate was read on the plate reader at 570 and 600 nm. The CC₅₀ values were calculated on the GraphPad Prism version 5.0, San Diego California, USA ⁴⁰.

4.2.1.2 Lymphoproliferation assay

Splenocytes of BALB/c mice (5 x 10⁶ cells/well, 200 µL) were cultured in DMEM medium and 96-well plates in triplicates, in the presence or not of concanavalin A (2 µg mL⁻¹) and also in the presence or absence of the analyzed compounds. After 48 hours of incubation, at 37 ° C and 5% CO₂, 1 µCi of [methyl-³H] thymidine was added to the cultures, starting a new 12-hour incubation period. After this period, the cells were collected for quantification of proliferation by thymidine uptake determination. The percent inhibition was determined by relating the thymidine incorporation by the cultures treated with the evaluated compounds and the thymidine incorporation by the control cultures. Dexamethasone was used as a positive control

4.2.1.3. COX-1 and COX-2 inhibition assay

The screen for COX-1 and COX-2 inhibitory activity was performed according to Ayaoub et al. (2010) ⁴². Briefly, all positive compounds and controls (indomethacin and celocoxib) were solubilized in DMSO and assayed in triplicate at 25 μ M concentration. COX-1 or COX-2 (Sigma-Aldrich) were added in 180 μ L of the assay buffer containing 5 mM hematin (Sigma-Aldrich), 100 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0. After addition of the test compound or positive control (10 μ L), the reaction mixture was incubated for 5 min at room temperature. The reaction was started by the addition of 5 μ L of arachidonic acid solution (Sigma-Aldrich) dissolved in methanol and N,N,N',N'-Tetramethyl-*p*-phenylenediamine dihydrochloride (TMPD). After incubation for 1 hour, the reaction mixture had its absorbance measured at 610 nm. Compounds which inhibited 50% of COX-1 or 2 activity had its IC₅₀ values calculated by using ORIGIN 8.0 software (OriginLab Corporation).

4.2.1.4. In vitro immunological studies

4.2.1.4.1 Cultures with mice splenocytes

Animals used in immunological assays were mice female BALB/c (6-8 weeks old; 5 animals) raised and maintained at the animal facilities of the Keizo Asami Immunopathology Laboratory - LIKA located in Federal University of Pernambuco, Brazil. Mice were kept under standard laboratory conditions (20-22 °C and 12 h day and night cycle) with free access to standard diet (Labina/Purina, Campinas, Brazil) and water. All experimental procedures were performed according to the Ethics Committee of Animal Use (CEUA) of Federal University of Pernambuco (protocol number: 0048/2016). After the inoculation of 1 mg of anesthetic, and euthanasia of the animals by displacement of vertebra, and spleen of each mouse was removed aseptically and placed in a Falcon tube containing RPMI 1640 with fetal calf serum (complete medium). In a vertical flow, each spleen was transferred to a petri dish where they were soaked. The cell suspensions obtained from each spleen were transferred to Falcon tubes containing approximately 10 ml of incomplete medium. Spleen homogenates were overlaid onto Ficoll-Paque™ PLUS layer, with the density adjusted to 1.076 g/mL, and centrifuged at 1000 g at room temperature for 25 min. The interface cell layer containing immune cells was recovered by Pasteur pipette, washed twice in phosphatebuffered saline (PBS) and centrifuged twice at 500g for 10 min. Cells were counted in a Neubauer chamber, and cell viability was determined by the trypan blue

exclusion method. Cells were only used when viability was > 98%. Cells were cultured in plates (24 wells) with compound **3b** at 11 μ M for 24 and 48 hours.

4.2.1.4.2 Investigation of immunostimulation promoted by compound **3b**

Supernatant by culture of splenocytes stimulated with compound **3b** were used for measure cytokines and nitric oxide release by these immune cells. Cultures were treated with 11 μ M of the compound and after 24 and 48 hours supernatants were collected to perform the assays. Cytokine assessment was carried out using human Th1/Th2 cytokine kit II (BD Bioscience, San Jose, CA, USA) for simultaneous detection of six cytokines IL-2, -IL-4, IL-6, IL-10, tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), and interferon-gamma (IFN- γ) in culture supernatants samples. All data were acquired on FACSCalibur platform. The cytokine measurement was based on the principle of cytometric bead array (CBA) technology. Nitrite Oxide analysis was performed through colorimetric Griess method ⁴³. NO concentration was estimated by the standard curve (3.12–100 μ mol/mL). The reading was carried out in a microplate spectrophotometer (Thermo Scientific Multiskan FC, Waltham-USA) at 595nm.

4.2.2. In vivo studies

4.2.2.1. Animals

Experiments were conducted with Swiss *Mus musculus* mice (20-35 g) obtained from the Immunopathology Laboratory Keizo Asami (LIKA/UFPE). Animals were maintained at the biotery of the Antibiotics Departament/UFPE (Recife, Brazil), under controlled conditions (22 ± 3 °C for 12 h light/dark cycle, free access to food and water). All animals used for the determination of anti-inflammatory and antinociceptive activities were fasted for 4 h prior to the experimentation. The Animal Studies Committee of the Federal University of Pernambuco approved the experimental protocols (number 23076.017928/2010-25). The animals were treated according to the ethical principles of animal experimentation of COBEA (Brazilian College of Animal Experiments) and the norms of the National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals.

4.2.2.2. Acute oral toxicity

A fixed dose procedure was adopted to evaluate the acute oral toxicity of compounds **3a** and **3b** according to Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) Guidelines for the Testing of Chemicals ²⁸. Groups of 3 mice were dosed in a stepwise procedure using the fixed dose of 2000 mg kg⁻¹. Clinical signs and conditions associated with pain, suffering and impending death are described in detail in a separate OECD Guidance Document ⁴⁴. The test was conducted in duplicate.

4.2.2.3. Carrageenan-induced paw edema test in mice

Carrageenan-induced paw edema test in mice Swiss Mus musculus was used to evaluate the anti-inflammatory activity of **3a** and **3b**. This experiment was performed on male mice as the previous report ²⁹. Eight groups of mice (n= 8) were treated with DMSO % in PBS, **3a** and **3b** (15, 30 and 60 mg kg⁻¹) or indomethacin (10 mg kg⁻¹) orally before 1 h of carrageenan injection. And 1% (v/v) carrageenan (50 µL) was administrated by sub-plantar injection in the right hind paws of mice. After carrageenan injection, the paw volume was measured at 1, 2, 3, 4, 5 and 6 h using the plethysmometer apparatus (7140 Ugo Basile, Italy). The increase of paw volume was measured and the inhibition of edema was calculated as the previous method.

4.3 In silico studies

4.3.1 In silico ADME and Molecular Docking Analysis

To further strengthen the results of our in vitro studies, we also performed in silico molecular interaction analysis on compounds **3a** and **3b** and COX proteins using AutoDock4.2.6 ⁴⁵ in combination with the Lamarckian genetic algorithm (LGA). The ADME profiles of these compounds were also investigated with the use of SwissADME ⁴⁶ and pkCSM ⁴⁷ webplatforms and Osiris Data Warrior software ⁴⁸.

4.3.2 Molecular docking

4.3.2.1 Ligand Structure Preparation

The structures of test compounds were built with Avogadro 1.2.0 ⁴⁹ software and fully optimized with PM6 ⁵⁰ semiempirical method implemented in the MOPAC2016 ⁵¹. The optimized ligands were then saved as pdb files. With the use of AutoDockTools-

1.5.6, the non-polar hydrogens were merged with the corresponding carbons, then partial charge of atoms were calculated using the Gasteiger procedure implemented in the AutoDockTools package. The rotatable bonds of the ligands were defined, the structures were saved as pdbqt and used for docking studies.

4.3.2.2 Protein Structure Preparation

The crystal structures of Celecoxib co-crystallized to COX-1 (PDB ID: 3KK6) and COX-2 (PDB ID: 3LN1) were retrieved from RCSB Protein Data Bank. With the use of Dassault Systèmes BIOVIA Discovery Studio Visualizer (v16.1.0.15350)⁵²,

water

molecules and other heteroatoms were removed. Then, using AutoDockTools, non-polar hydrogens were merged, and polar hydrogens added to the structure of the proteins. Kollman charges were added and the structure was saved as pdbqt for the docking studies.

4.3.2.3 Docking procedure

The 3D grid was created by the Autogrid Algorithm to generate the grid parameter file. The grid spacing was 0.0375 nm in each dimension, and each grid map consisted of a 70 × 70 × 70 grid point. the center of the grid was set to the position of the co-crystallized ligand located at the Chain A in each case.

The Lamarckian genetic algorithm in AutoDock4.2.6 was applied to search the best conformation and orientation of the ligands. The global optimization was started with a population of 150 randomly positioned individuals with a maximum of 2500000 energy evaluations and a maximum of 27000 generations. During each docking experiment, 100 runs were carried out. The resulting docking poses were analyzed using AutoDockTools and Discovery Studio Visualizer.

To validate the docking procedure, the co-crystallized ligand celecoxib was previously docked to each protein. In this case, a 126 x 126 x 126 grid map was used, and 250 runs were carried out.

4.3. Statistical analysis

The experimental results were expressed as the mean ± standard error (SE) and by analysis of variance (ANOVA), one-way and two-way, followed by Tukey or Bonferroni tests. P values lower than 0.05 ($p < 0.05$) were considered as indicative of

significance and represented by: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$. The calculations were performed using the statistical software GraphPad Prism version 5.0, San Diego California, USA.

Acknowledgements

This study was supported by Brazilian agencies Fundação de Amparo Pesquisa do Estado de Pernambuco (FACEPE, Brazil) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Conflict of interest

The authors declare that there were no competing interests.

References

1. Fullerton, J. N.; Gilroy, D.W. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2016**, 15, 551-567.
2. Botting, J. *Drug. News. Perspect.* **2000**, 13, 560-566.
3. Tavolari, S.; Bonafe, M.; Marini, M.; Ferreri, C.; Bartolini, G.; Brighenti, E.; Manara, S.; Tomasi, V.; Laufer, S.; Guarnieri, T. *Carcinogenesis* **2008**, 29, 371-380.
4. Cingolani, G.; Panella, A.; Perrone, M. G.; Vitale, P.; Di-Mauro, G.; Fortuna, C.G.; Armen, R. S.; Ferorelli, S.; Smith, W. L.; Scilimati, A. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, 138, 661-668.
5. Wallace, J.L. *Best. Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* **2001**, 15,691-703.
6. Silva, Y. K. C.; Augusto, C. V.; Barbosa, M. L. C.; Melo, G. M. A.; Queiroz, A. C.; Dias, T. L. M. F.; Júnior, W. B.; Barreiro, E. J.; Lima, L. M.; Alexandre-Moreira, M. S. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, 18, 5007-5015.
7. Ozdemir, A.; Altintop, M. D.; Turan-Zitouni, G.; Çiftçi, G. A.; Ertorun, I.; Alatas, O.; Kaplancikli, Z. A. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, 89, 304-309.
8. Hernández, P.; Cabrera, M.; Lavaggi, M. L.; Celano, L.; Tiscornia, I.; Costa, T. R.; Thomson, L.; Bollati-Fogolín, M.; Miranda, A. L. P.; Lima, L. M.; Barreiro, E. J.; González, M.; Cerecetto, H. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, 20, 2158-2171.
9. Tributino, J. L. M.; Duarte, C. D.; Corrêa, R. S.; Doriguetto, A. C.; Ellena, J.; Romeiro, N. C.; Castro, N. G.; Miranda, A. L. P.; Barreiro, E. J.; Fraga, C. A. M. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, 17, 1125-1131.
10. Singh, P.; Prasher, P.; Dhillon, P.; Bhatti, R. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, 97, 104-123.

11. Pedada, S. R.; Yarla, N. S.; Tambade, P. J.; Dhananjaya, B. L.; Bishayee, A.; Arunasree, K. M.; Philip, G. H.; Dharmapuri, G.; Aliev, G.; Putta, S.; Rangaiah, G.; *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, 112, 289-297.
12. Guerra, A. S. H. S.; Malta, D. J. N.; Laranjeira, L. P. M.; Maia, M. B. S.; Colaço, N. C.; Lima, M. C. A.; Galdino, S. L.; Pitta, I. R.; Silva, T. G. *Int. Immunopharmacol.* **2011**, 11, 1816-1822.
13. Barbosa, K. P.; Santos, L. A.; Ribeiro, E. L.; Fragoso, I. T.; Rocha, S. W.; Nunes, A. K.; França, M. E.; Silva, B. S.; Silva, A. K.; Donato, M. A.; Gomes, F. O.; Silva, T. G.; Pitta, I. R.; Pitta, M. R.; Lima, M. C. A.; Uchôa, F. T.; Galdino, S. L.; Peixoto, C. A. *Eur. J. Pharmacol.* **2013**, 15, 197-205.
14. Uchôa, F. T.; Silva, T. G.; Lima, M. C. A.; Galdino, S. L.; Pitta, I. R.; Dalla-Costa, T. J. *Pharm. Pharmacol.* 2009, 61, 339-345.
15. Garcia, G. M.; Oliveira, L. T.; Pitta, I. R.; Lima, M. C. A.; Vilela, J. M.; Andrade, M. S.; Abdalla, D. S.; Mosqueira, V. C. *J. Control. Release.* **2015**, 10, 207-218.
16. Saggiomo, V.; Luning, U. *Tetrahedron Lett.* **2009**, 50, 4663-4665.
17. Nasr, T.; Bondock, S.; Youns, M. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, 76, 539-548.
18. Al-Said, M. S.; Bashandy, M. S.; Al-Gasoumi, S. I.; Ghorab, M. M. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, 46, 137-141.
19. Oliveira, J. F.; Lima, T. S.; Vendramini-Costa, D. B.; Pedrosa, S. C. B. L.; Lafayette, E. A.; Silva, R. M. F.; Almeida, S. M. V.; Moura, R. O.; Ruiz, A. L. T. G.; Carvalho, J. E.; Lima, M. C. A. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, 136, 305-314.
20. Cordeiro, N. M.; Freitas, R. H. C. N.; Fraga, C. A. M.; Fernandes, P. D. *PLoS. One.* **2016**, 11, 1-17.
21. Santos-Filho, J. M.; Silva, D. M. Q.; Macedo, T. S.; Teixeira, H. M.; Moreira, D. R.; Challal, S.; Wolfender, J. L.; Queiroz, E. F.; Soares, M. B. *Bioorg. Med. Chem.* **2016**, 24, 5693-5701.
22. Santos-Filho, J. M.; Leite, A. C.; Oliveira, B. G.; Moreira, D. R.; Lima, M. S.; Soares, M. B.; Leite, L. F. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, 17, 6682-6691.
23. de la Torre, S. M. D.; Vázquez, C.; González-Chávez, Z.; Yépez-Mulía, L.; NietoMeneses, R.; Jasso-Chávez, R.; Saavedra, E.; Hernández-Luis, F. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2017**, 27, 3403-3407.
24. Hernández, P.; Rojas, R.; Gilman, R. H.; Sauvain, M.; Lima, L. M.; Barreiro, E. J.; González, M.; Cerecetto, H. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, 59, 64-74.
25. Gao, J.; Lauer, F. T.; Dunaway, S.; Burchiel, S. W. *Toxicol. Sci.* **2005**, 86, 68-74.

26. Freitas, R. H. C. N.; Cordeiro, N. M.; Carvalho, P. R.; Alves, M. A.; Guedes, I. A.; Valerio, T. S.; Dardenne, L. E.; Lima, L. M.; Barreiro, E. J.; Fernandes, P. D.; Fraga, C. A. M. *Chem Biol Drug Des*, **2018**, 91, 391-397.
27. Silva, T. F.; Bispo-Júnior, W.; Alexandre-Moreira, M. S.; Costa, F. N.; Monteiro, C. E.; Ferreira, F. F.; Barroso, R. C.; Noel, F.; Sudo, R. T.; Zapata-Sudo, G.; Lima, L. M.; Barreiro, E. J. *Molecules*, **2015**, 20, 3067-3088.
28. OECD Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing, **2002**.
29. Winter, C. A.; Risley, E. A.; Nuss, G. W. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **1962**, 111, 544-547.
30. Matsumoto, K.; Obara, S.; Kuroda, Y.; Kizu, J. *J. Infect. Chemother.* **2015**, 21, 889-891.
31. Ishola, I. O.; Agbaje, E. O.; Adeyemi, O. O.; Shukla, R. *Pharm. Biol.* **2014**, 52, 1208-1216.
32. Moldovan, C. M.; Oniga, O.; Parvu, A.; Tiperciuc, B.; Verite, P.; Pirnau, A.; Crisan, O.; Bojita, M.; Pop, R. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, 46, 526-534.
33. Melo, T. R. F.; Chelucci, R. C.; Pires, M. E. L.; Dutra, L. A.; Barbieri, K. P.; Bosquesi, P. L.; Trossini, G. H. G.; Chung, M. C.; Santos, J. L. *Int. J. Mol. Sci.* **2014**, 15, 5821-5837.
34. Bhookya, S.; Pochampally, J.; Valeru, A.; Sunitha, V.; Balabadra, S.; Manga, V.; Kudle, K. R. *J. Chem. Biol.* **2017**, 10, 105-115.
35. Misra, C. S.; Honnappa, C. G.; Jitta, S. R.; Gourishetti, K.; Daram, P.; Singh, M. P.; Shrungheswara, A. H.; Nayak, Y.; Unnikrishnan, M. K. *Chem. Biol. Interact.* **2016**, 244, 71-83.
36. Voet, D.; Voet, J. G. *Biochemistry*, fourth ed., John Wiley & Sons, **2011**.
37. Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2012**, 64, 4-17.
38. Veber, D. F.; Johnson, S. R.; Cheng, H. Y.; Smith, B. R.; Ward, K. W.; Kopple, K. D. *J. Med. Chem.* **2002**, 45, 2615-2623.
39. Lambertucci, C.; Marucci, G.; Ben, D. D.; Buccioni, M.; Spinaci, A.; Kachler, S.; Klotz, K. N.; Volpini, R. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**. doi:10.1016/j.ejmech.2018.03.067.
40. Plutín, A. M.; Alvarez, A.; Mocelo, R.; Ramos, R.; Castellano, E. E.; Silva, M. M.; Villarreal, W.; Pavan, F. R.; Meira, C. S.; Filho, J. S. R.; Moreira, D. R. M.; Soares, M. B. P.; Batista, A. A. *Polyhedron*. **2017**, 132, 70-77.

41. Silva, D. N.; Souza, B. S. F.; Azevedo, C. M.; Vasconcelos, J. F.; Carvalho, R. H.; Soares, M. B. P.; Santos, R. R. *Stem Cell Res. Ther.* **2014**, 5, 1-10.
42. Ayoub, S.S.; Flower, R.J.; Seed, M. *Methods in Molecular Biology*, Humana Press. 2010.
43. Ding, A. H.; Nathan, C. F.; Stuehr, D. J. *J. Immunol.* **1988**, 141, 2407-2412.
44. OECD Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, **2000**.
45. Morris, M. G.; Huey, R.; Lindstrom, W.; Sanner, M. F.; Belew, R. K.; Goodsell, D. S.; Olson, A. J. *J. Computational Chemistry.* **2009**, 16, 2785-2791.
46. Daina, A.; Michielin, O.; Zoete, V. *Sci. Rep.* **2017**, 7, 42717.
47. Pires, D. E. V.; Blundell, T. L.; Ascher, D. B. *J. Med. Chem.* **2015**, 58, 4066-4072.
48. Sander, T.; Freyss, J.; Von Korff, M.; Rufener, C. *J. Chem. Inf. Model.* **2015**, 55, 460-473.
49. Hanwell, M. D.; Curtis, D. E.; Lonie, D. C.; Vandermeersch, T.; Zurek, E.; Hutchison, G. R. *J. Cheminform.* **2012**, 4, 17.
50. Stewart, J. J. P. *J. Mol. Model.* **2007**, 13, 1173-1213.
51. MOPAC2016, James J. P. Stewart, Stewart Computational Chemistry, Colorado Springs, CO, USA, [HTTP://OpenMOPAC.net](http://OpenMOPAC.net) (**2016**).
52. Dassault Systèmes BIOVIA (**2016**) Discovery Studio Visualizer, version 16.1.0.15350, Dassault Systèmes, San Diego.

Graphical abstract

