

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS



**3-INDOL-TIOSSEMICARBAZONAS: SÍNTESE, ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL E
INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL ANTI-INFLAMATÓRIO**

IRIS TRINDADE TENÓRIO JACOB

RECIFE - PE

2018

IRIS TRINDADE TENÓRIO JACOB

**3-INDOL-TIOSSEMICARBAZONAS: SÍNTESE, ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL E
INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL ANTI-INFLAMATÓRIO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas do Centro de Ciências da Saúde
da Universidade Federal de Pernambuco para a
obtenção do título de Mestre em Ciências
Farmacêuticas. Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria do
Carmo Alves de Lima. Co-orientadora: Prof^a.
Dr^a. Sinara Mônica Vitalino de Almeida

RECIFE – 2018

Catálogo na fonte:

bibliotecário: Aécio Oberdam, CRB4:1895

J153 Jacob, Iris Trindade Tenório.

3-Indol-Tiossemicarbazonas: síntese, elucidação estrutural e investigação do potencial anti-inflamatório / Iris Trindade Tenório Jacob. – Recife: o autor, 2018.

91 f.; il; 30 cm.

Orientadora: Maria do Carmo Alves de Lima.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas.

Inclui referências, figuras, tabelas e gráficos.

1. Inflamação. 2. Cicloxigenase. 3. Indol. I. Lima, Maria do Carmo Alves de. (orientadora). II. Título.

615.1 CDD (23.ed.)

UFPE (CCS 2018 - 126)

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: JACOB, IRIS TRINDADE TENÓRIO

Título: **3-INDOL-TIOSSEMICARBAZONAS: SÍNTESE, ELUCIDAÇÃO
ESTRUTURAL E INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL ANTI-INFLAMATÓRIO**

Defesa de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos necessários ao grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, na área de concentração Planejamento e Síntese de Fármacos.

Aprovada em: 08/02/2018

Banca Examinadora

Profa. Dr. Maria do Carmo Alves de Lima

Instituição: Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Assinatura:_____

Profa. Dra. Fabiana Oliveira dos Santos Gomes

Instituição: Faculdade Integrada de Pernambuco - FACIPE

Assinatura:_____

Prof. Dr. Túlio Ricardo Couto de Lima Souza

Instituição: Unidade Acadêmica de Serra Talhada - UFRPE

Assinatura:_____

Aos meus pais Eliane Trindade e Edmond Tenório

As minhas tias Samira e Soraya

E ao meu irmão Edmond Trindade por zelarem sempre por mim.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida, por andar sempre ao meu lado e por todos os amigos que me cercam, pelos professores que colocou em minha vida e ainda, pelas inúmeras oportunidades que já tive até aqui.

A minha Nossa Senhora da Conceição e Aparecida por intercederem por mim a Deus, me cobrir com seu manto protetor de mãe e não deixar que nada de mal me acontecesse.

A minha orientadora Prof.^a Dr.^a Maria do Carmo Alves de Lima, por todo os ensinamentos, broncas, momentos de descontração e carinho. Por tudo Minha Maria, meu muito OBRIGADA.

A Prof.^a. Sinara Mônica Vitalino de Almeida, por ser uma co-orientadora incrível, me auxiliar sempre que possível, ser amiga, e por estar sempre disposta a me ajudar nos momentos de maiores dúvidas e angústias.

A professora Dr.^a Teresinha Gonçalves pela oportunidade concedida na realização dos ensaios biológicos.

Ao professor Dr.^o Diogo Rodrigo Magalhães Moreira pelo auxílio nos ensaios biológicos *in vitro*.

A Vinícius por ser sempre um grande amigo, por me ajudar mesmo estando longe se fazer tão presente nesse trabalho, corrigindo, dando ideias. Pelos bons momentos de babados, confusões e gritarias.

Aos alunos/pesquisadores do Laboratório de Bioensaios para Pesquisa de Fármacos – LBPF, do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco, pelos ensinamentos, experimentos realizados e colaboração mais que positiva. Em especial a Tatiane e Isla, pelo empenho e dedicação. Além da minha tia Jaci por ser sempre um doce.

Ao Departamento de Química Fundamental – DQF, da Universidade Federal de Pernambuco, pela paciência com todos e pelos belos espectros que apresentamos nas dissertações e teses.

Ao Centro de Tecnologia do Nordeste – CETENE e em especial à Júlia Campos por todas as análises de massas realizadas.

As minhas abusadas Mirelly Dianne e Paula Roberta por estarem sempre ao meu lado, nos momentos de alegria e tristeza. Por serem minhas confidentes, amigas, por serem além de tudo minha melhor companhia diária.

A todos os alunos do Laboratório de Química e Inovação Terapêutica - LqIT do Departamento de Antibióticos - CCB da Universidade Federal de Pernambuco, em especial aos meninos da sala fria: Rubinho, Lula, Kelzinha, Amelita, Mi, Paulinha, Peuzinho, Suellen, Hanna, Allana, Diogo, Salatiel Cleitinho, Sarinha, Xico Bento, Cézinha, Jamerson, Charles, Bruno, Rodolfo.

Aos meu familiares e incentivo de todos os dias. Minha mãe, Eliane, que sempre acreditou em mim, por todas as promessas feitas, por seu amor tão sublime e incondicional. Ao meu pai Edmond, por ser meu confidente, amigo, por todos os dias que compartilhou comigo ter que acordar cedo, me levar na parada, preparar meu café, por seu meu um verdadeiro pai.

Ao meu irmão, Edmond Trindade, por todos os momentos vividos, por todos os problemas suportados e pelos dias felizes compartilhados.

As minhas tias e tios por todos os momentos de descontração e alegria, em especial as minhas tias Samira e Soraya que sempre estiveram comigo em todos os momentos me incentivando nos estudos, na cultura e na vida.

Aos meus primos em especial a Isis Trindade por todos os nossos momentos vividos, pelo carinho e paciência.

Aos meus amigos da graduação: **MONETA** (conforme o prometido), Hugo, Letícia, D. Raquel, Clara e tantos outros por todos os momentos vividos, pelos conselhos, pela paciência e por me perdoar por todas as minhas ausências, meu muito obrigada!

Aos meus amigos da vida Camila, Thays, Dayane, Geisa, Jefferson pelas confidências, carinho e por todas as aventuras e loucuras vividas.

Ao meu Bem por todo carinho, paciência, cuidado e compreensão. Por todos os momentos vividos e compartilhados, por todo incentivo e por ser sempre presente em minha vida.

Ao CNPq, CAPES e FACEPE pelo apoio financeiro que possibilitou a execução deste trabalho.

E por fim a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a finalização desse trabalho, meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

A inflamação é um processo complexo e dinâmico que compõe a resposta imunitária e, embora faça parte dos mecanismos defensivos contra grande parte de lesões, em muitos casos ela própria pode também causar danos ao organismo. O processo inflamatório está presente em várias patologias que causam dor e diminuem a qualidade de vida da população, sendo necessário a utilização de anti-inflamatórios para combater a progressão da inflamação. Contudo vários efeitos colaterais principalmente a nível gástrico e cardiovascular tem estimulado a comunidade científica a desenvolver novas abordagens terapêuticas com menor ou nenhum efeito adverso. Neste estudo foi proposto a síntese de 20 novas moléculas 3-indol-tiossemicarbazonas, que foram sintetizadas, caracterizadas e bioavaliadas quanto a sua toxicidade e ao seu potencial anti-inflamatório. A síntese dos derivados foi realizada de maneira simples e rápida favorecendo a formação dos compostos com rendimentos variando de 33 – 90 % e caracterizados por RMN (^{13}C e ^1H), IV e MS. Os derivados foram avaliados *in vitro* quanto a sua citotoxicidade onde os compostos LQIT/LT-76, LQIT/LT-81 e LQIT/LT-87 apresentaram valores de concentração correspondes à 24,5; 21,8; e 18,7 μM , respectivamente. No ensaio de Linfoproliferação os mesmos derivados apresentaram valores de $\text{CC}_{50} < 1$ sendo promissores quanto ao seu potencial de ação anti-inflamatório. A administração oral dos compostos não levou a efeitos tóxicos significativos na dose de 2000 mg/kg nem provocou alterações fisiológicas e hematológicas. No teste do edema de pata induzido por carragenina os compostos LQIT/LT-76, LQIT/LT-81 e LQIT/LT-87 foram avaliados nas doses de 10, 30 e 50 mg/Kg. O composto LQIT/LT-81 destacou-se por inibir o crescimento do edema em 70,20% enquanto a indometacina inibiu em 70,08% ambos na dose de 10 mg/Kg. Desta forma os resultados indicam que os derivados 3-indol-tiossemicarbazonas apresentam atividade anti-inflamatória promissora.

Palavras-chave: inflamação. cicloxigenase. indol.

ABSTRACT

Inflammation is a complex and dynamic process that composes the immune response and, although it is part of the defensive mechanisms against a large part of readings, in many cases it itself can also cause damage to the body. The inflammatory process is present in several pathologies that cause pain and decrease the quality of life of the population, being necessary the use of anti-inflammatories to combat the progression of inflammation. However, several side effects, mainly at the gastric and cardiovascular levels, have stimulated the scientific community to develop new therapeutic approaches with little or no adverse effects. In this study we proposed the synthesis of 20 new molecules 3-indol-thiosemicarbazones, which were synthesized, characterized and bio-evaluated for their toxicity and their anti-inflammatory potential. The synthesis of the derivatives was performed in a simple and rapid manner favoring the formation of the compounds in yields ranging from 33-90% and characterized by NMR (^{13}C and ^1H), IV and MS. Derivatives were evaluated in vitro for their cytotoxicity where compounds LQIT / LT-76, LQIT / LT-81 and LQIT / LT-87 presented concentration values corresponding to 24.5; 21.8; and 18.7 μM , respectively. In the lymphoproliferation assay the same derivatives presented CC50 values <1 being promising for their anti-inflammatory action potential. Oral administration of the compounds did not lead to significant toxic effects at the dose of 2000 mg / kg nor did it cause physiological and hematological changes. In the carrageenan-induced paw edema test, compounds LQIT / LT-76, LQIT / LT-81 and LQIT / LT-87 were evaluated at doses of 10, 30 and 50 mg / kg. The compound LQIT / LT-81 was distinguished by inhibiting edema growth by 70.20% while indomethacin inhibited 70.08% both at a dose of 10 mg / kg. Thus the results indicate that the 3-indol-thiosemicarbazones derivatives have promising anti-inflammatory activity.

Keywords: inflammation. cyclooxygenase. indoles.

LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS

	Pág.
Figura 1. Desenvolvimento do processo Inflamatório Agudo	22
Figura 2. Estrutura química da histamina e serotonina	25
Figura 3. Representação estrutural das COX-1 e 2 evidenciando seus aminoácidos.	29
Figura 4. Inibidores seletivos à COX-2	29
Figura 5. Estruturas químicas da salicilina e do AAS	30
Figura 6. Anti-inflamatórios esteroidais (AIEs)	31
Figura 7. Anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs)	32
Figura 8. Inibidores seletivos da COX-2	33
Figura 9. Estrutura química das tiossemicarbazonas e a numeração dos seus átomos segundo a IUPAC (PANICO, 1993).	34
Figura 10. Derivados tiossemicarbazônicos com diferentes atividades farmacológicas	35
Figura 11. derivados indol-tiossemicarbazona com atividade anti-inflamatória e analgésica	36
Figura 12. (E) -N- (4-bromofenil) -2- (tiofen-2-il-metileno) -tiossemicarbazona	36
Figura 13. Estrutura do 1 <i>H</i> -indol	37
Figura 14. AINES constituídos com o núcleo indol	38
Figura 15. Derivados N-prenilado indol-3- carbazona inibidores da enzima 5-LOX	39
Figura 16. Espectro de RMN ¹ H do composto LT-73	51
Figura 17. Ampliação do espectro de Hidrogênio do composto LT-73	52
Figura 18. Espectro de RMN de ¹³ C do composto LT-73	53
Figura 19. Espectro de infra-vermelho do LT-71	53
Figura 20. Espectrometria de massas do composto LQIT/LT-81	54
Gráfico 1. Dosagem de Nitrito	68
Gráfico 2. Dosagem de Citocinas	69
Gráfico 3. Dosagem de TNF- α	70

LISTA DE ESQUEMAS E TABELAS

	Pág.
Esquema 1. Cascata do ácido araquidônico	27
Esquema 2. Formação núcleo tiazol a partir da tiossemicarbazona	34
Esquema 3. Formação das tiossemicarbazidas a partir de isotiocianatos na presença de hidrazina	35
Esquema 4. Estrutura química dos compostos bioisósteros indol e quinolina	38
Esquema 5. Mecanismo de formação dos compostos intermediários	40
Esquema 6. Mecanismo de formação dos derivados indólicos-tiossemicarbazônicos	41
Esquema 7. Diagrama de Síntese dos Compostos Indólicos-Tiossemicarbazonas	44
Tabela 1. Citotoxicidade em macrófagos J774, inibição da proliferação de linfoblastos	66
Tabela 2. Atividade inibitória do óxido nítrico	67
Tabela 3. Inibição da secreção de TNF-alfa liberados por macrófagos estimulados com LPS e tratados com os derivados indol-tiossemicarbazônicos	69
Tabela 4. Efeito dos compostos indólico-tiossemicarbazônicos sobre os parâmetros hematológicos	71
Tabela 5. Efeito dos compostos indólicos-tiossemicarbazônicos sobre parâmetros fisiológicos e índice de órgãos	72
Tabela 6. Percentual de crescimento do volume da pata (%) do composto LQIT/LT-76 comparado com o controle negativo (média $\pm$ erro padrão).	74
Tabela 7. Percentual de crescimento do volume da pata (%) do composto LQIT/LT-81 comparado com o controle negativo (média $\pm$ erro padrão).	74
Tabela 8. Percentual de crescimento do volume da pata (%) do composto LQIT/LT-81 comparado com o controle negativo (média $\pm$ erro padrão).	74
Tabela 9. Percentual de inibição do processo inflamatório (%).	75

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIações

AA: Ácido araquidônico

AINES: Anti-inflamatórios não esteroidais.

CC₅₀: Concentração citotóxica a 50%

CCD: Cromatografia de camada delgada.

CEUA –UFPE: Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Pernambuco

CHCM: Concentração da hemoglobina corpuscular

COBEA: Colégio Brasileiro para Experimentação Animal

COX: Cicloxigenase

DEXA: Dexametasona

EM: Espectrometria de massas

eNOS: Óxido nítrico endotelial.

GI: gastrointestinal

GV: Violeta de genciana

HCL: ácido clorídrico

HCM: Hemoglobina corpuscular média

HPETE: Hidroperoxieicosatetraenóicos

IC₅₀: Concentração inibitória a 50%.

IFN- γ : Interféron gama

IgE: Imunoglobulina E.

IL-1: Interleucina

INDO: Indometacina

iNOS: Óxido nítrico induzida.

LOX: Lipoxigenase.

LPS: Lipopolissacarídeos

LTA: Leucotrieno A2

LTB: Leucotrieno B2.

nNOS: Óxido nítrico neural.

NO: Óxido nítrico.

NOS: Óxido nítrico sintase.

PG: Prostaglandina

PGG2: Prostaglandina G

PGH2: Prostaglandina H

PGI2: Prostaglandina I

PMN: Células polimorfonucleares.

RMN: ressonância magnética nuclear

TNF- α : Fator de necrose tumoral

TSC: Tiossemicarbazonas.

TXA: Tramboxano A2

TXB: Tramboxano B2

VCM: Volume corpuscular médio.

SUMÁRIO

	Pág.
1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVOS	19
2.1 OBJETIVO GERAL	20
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
3 REVISÃO DA LITERATURA	21
3.1 INFLAMAÇÃO	22
3.2 RESPOSTA IMUNE DA INFLAMAÇÃO	23
3.3 MEDIADORES QUÍMICOS DA INFLAMAÇÃO	24
3.3.1 Aminas Vasoativas	25
3.3.2 Óxido Nítrico (NO)	25
3.3.3 Citocinas	26
3.4 DERIVADOS DO ÁCIDO ARAQUIDÔNICO	26
3.4.1 Ciclooxygenase e suas Isoformas	28
3.5 OS ANTI-INFLAMATÓRIOS	30
3.5.1 Anti-Inflamatórios Esteroidais (Aies)	30
3.5.2 Anti-Inflamatórios não Esteroidais (Aines)	32
3.6 TIOSSEMICARBAZONAS	34
3.6.1 Atividade Anti-Inflamatória das Tiossemicarbazonas	35
3.7 INDOL	37
4 PARTE EXPERIMENTAL	42
4.1 REAGENTES E SOLVENTES	43
4.2 EQUIPAMENTOS	43
4.3 PARTE QUÍMICA	43
4.3.1 Síntese das Tiossemicarbazidas	44
4.3.2 Síntese das Tiossemicarbazonas	44
4.4 ESTUDO BIOLÓGICOS <i>in vitro</i>	45
4.4.1 Ensaio de Citotoxicidade	45
4.4.2 Ensaio de Linfoproliferação e Estimulação com conA	45
4.4.3 Dosagem de Nitrito (Óxido Nítrico)	46
4.4.4 Dosagem de Citocinas	46

4.5 ESTUDOS BIOLÓGICOS <i>in vivo</i>	47
4.5.1 Animais	47
4.5.1.2 Toxicidade Aguda	48
4.5.1.3 Edema de Pata Induzido por Carragenina	48
4.5.1.4 Análise Estatística	49
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
5.1 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL	51
5.1.1 2-((5-ciano-1 <i>H</i> -indol-3-il)metileno)- <i>N</i> -fenilhidrazinacarbotioamida (LQIT/LT-70)	55
5.1.2 2-((4-nitro-1 <i>H</i> -indol-3-il)metileno)- <i>N</i> -fenilhidrazinacarbotioamida (LQIT/LT-71)	55
5.1.3 2-((1 <i>H</i> -benzo[<i>g</i>]-indol-3-il)metileno)- <i>N</i> -fenilhidrazinacarbotioamida (LQIT/LT-72)	56
5.1.4 2-((1 <i>H</i> -pirrol[2,3, <i>b</i>]-piridin-3-il)metileno)- <i>N</i> -fenilhidrazinacarbotioamida (LQIT/LT-73)	56
5.1.5 2-((7-metil-1 <i>H</i> -indol-3-il)metileno)- <i>N</i> -fenilhidrazinacarbotioamida (LQIT/LT-74)	57
5.1.6 <i>N</i> -(4-clorofenil)-2-((5-ciano-1 <i>H</i> -indol-3-il)metileno)- <i>N</i> -fenilhidrazinacarbotioamida (LQIT/LT-75)	57
5.1.7 <i>N</i> -(4-clorofenil)-2-((4-nitro-1 <i>H</i> -indol-3-il)metileno)- <i>N</i> -fenilhidrazinacarbotioamida (LQIT/LT-76)	58
5.1.8 2-((1 <i>H</i> -pirrol[2,3, <i>b</i>]piridina-3-il)metileno)- <i>N</i> -(4-clorofenil)-fenilhidrazinacarbotioamida (LQIT/LT-77)	58
5.1.9 2-((1 <i>H</i> -benzo[<i>g</i>]indol-3-il)metileno)- <i>N</i> -fenilhidrazinacarbotioamida (LQIT/LT-78)	59
5.1.10 <i>N</i> -(4-clorofenil)-2-((7-metil-1 <i>H</i> -indol-3-il)-metileno)- <i>N</i> -fenilhidrazinacarbotioamida (LQIT/LT-79)	59
5.1.11 2-((5-cian-1 <i>H</i> -indol-3-il)metileno)- <i>N</i> -(nafitilen-2-il)hidrazinacarbotioamida (LQIT/LT-80)	60
5.1.12 <i>N</i> -(nafitalen-2-il)-2-((4-nitro-1 <i>H</i> -indol-3-il)metileno)hidrazinecarbotioamida (LQIT/LT-81)	60
5.1.13 2-((1 <i>H</i> -pirrolo[2,3- <i>b</i>]piridin-3-il)metileno)- <i>N</i> -(nafitalen-2-il)hidrazinecarbotioamida (LQIT/LT-82)	61

5.1.14	2-((1 <i>H</i> -benzo[<i>g</i>]indol-3-il)metileno)- <i>N</i> -(naftalen-2-il)hidrazinecarbotioamida (LQIT/LT-83)	61
5.1.15	2-((7-metil-1 <i>H</i> -indol-3-il)metileno)- <i>N</i> -(naftalen-2-il)hidraziencarbotioamida (LQIT/LT-84)	62
5.1.16	<i>N</i> -alil-2-((5-ciano-1 <i>H</i> -indol-3-il)metileno)hidrazinecarbotioamida (LQIT/LT-85)	62
5.1.17	<i>N</i> -alil-2-((4-nitro-1 <i>H</i> -indol-3-il)metileno)hidrazinecarbotioamida (LQIT/LT-86)	63
5.1.18	2-((1 <i>H</i> -benzo[<i>g</i>]indol-3-il)metileno)- <i>N</i> -alilhidrazinecarbotioamida (LQIT/LT-87)	63
5.1.19	2-((1 <i>H</i> -pirrol[2,3, <i>b</i>]piridin-3-il)metileno)- <i>N</i> -alilhidrazinecarbotioamida (LQIT/LT-88)	64
5.1.20	<i>N</i> -alil-2-((7-metil-1 <i>H</i> -indol-3-il)metileno)hidrazinecarbotioamida (LQIT/LT-89)	64
5.2	ESTUDO BIOLÓGICO <i>in vitro</i>	65
5.2.1	Ensaio de Citotoxicidade	65
5.2.2	Ensaio de Linfoproliferação	65
5.2.3	Dosagem de nitrito (óxido nítrico)	67
5.2.4	Dosagem das Citocinas IL-6 e TNF- α	68
5.3	ESTUDOS BIOLÓGICO <i>in vivo</i>	70
5.3.1	Toxicidade Aguda Oral	70
5.3.2	Edema de Pata induzido por carragenina	73
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	76
7	PERSPECTIVAS	78
	REFERÊNCIAS	79

Introdução

1 INTRODUÇÃO

As lesões provocam uma série de eventos celulares e moleculares que auxilia organismo a defender-se contra a invasão de micro-organismos e estimulam processos que restauram a estrutura e função do tecido ou órgão afetado (CHENG, et al., 2017). Os primeiros eventos de liberação de substâncias plasmáticas compreendem a inflamação aguda, uma reação em resposta aos sinais de patógenos e células danificadas ou necróticas que incluem modificações vasculares, recrutamento de leucócitos e ativação localizada de componentes imunes inatos que, em conjunto, ativam células de imunidade adaptativa tanto local como sistêmica (KING, et al., 2017).

Entretanto, em muitos casos essas respostas imunológicas não são o suficiente para levar à resolução dos processos inflamatórios, sendo necessário a utilização de medicamentos anti-inflamatórios, principalmente os não-esteroidais (AINES) que atuam em mecanismos específicos da cascata inflamatória (MARTEL-PELLETIER, et al., 2011). A atividade farmacológica dos AINES está relacionada com a supressão da biossíntese das prostaglandinas (PGs) pelo ácido araquidônico (AA) através da inibição das enzimas ciclooxigenase 1 e 2 (COX-1 e COX-2) (CLARK et al., 2013).

As ciclooxigenases (COXs), existem em três isoformas, COX-1, COX-2 e COX-3. A COX-1 é constitutivamente expressa em uma variedade de tipos de células e está envolvida principalmente na síntese de PG citoprotetoras no trato gastrointestinal (GI), enquanto a COX-2 é indutível e sua expressão é induzida durante condições inflamatórias, provocadas por moléculas pró-inflamatórias tais como interleucina (IL-1), fator de necrose tumoral (TNF- α), e lipopolissacarídeo (LPS) (JACHAK, et al., 2014). Já a COX-3 é expressa constitutivamente no sistema nervoso central, sendo encontrado experimentalmente em cérebros de ratos, principalmente em hipotálamo e hipófise (OKSUZ et al., 2015)

Os fármacos anti-inflamatórios pertencem a três classes de compostos com diferentes mecanismos de ação. Os AINES atuam inibindo a COX-2 e assim conseguem exercer a sua função anti-inflamatória, porém a pouca seletividade faz com que a COX-1 também seja inibida e com isso desencadeiam a formação de ulceração gástrica dentre outros efeitos colaterais devido as propriedades gastroprotetoras dessa enzima no estômago (ZAMPRONIO, et al., 2017). Os COXIBES, anti-inflamatórios seletivos a COX-2, surgiram como alternativa para o tratamento de inflamações sem provocar os desconfortos gástricos já associados aos AINES, porém estudos posteriores revelaram que os COXIBES desencadeiam uma série de problemas cardiovasculares, resultando na retirada do mercado de alguns medicamentos como o rofecoxibe e valdecoxibe (JACHAK, et al., 2014 e SUMIT BANSAL, et al., 2014).

Encontrar fármacos com maior eficácia e baixa toxicidade é um dos desafios na pesquisa da inflamação. As tiossemicarbazonas pertencentes ao grupo das iminas, apresentam atividades farmacológicas significantes, dentre as quais se podem destacar anti-inflamatória (OLIVEIRA, et al., 2016 e HELAL et al., 2013); antibacteriano (BECKFORD et al., 2011) e anticâncer (OLIVEIRA et al., 2015). Sendo assim, este trabalho teve como objetivo investigar o potencial anti-inflamatório de novos derivados indol-tiossemicarbazônicos através de ensaios biológicos *in vitro* e *in vivo* afim de encontrar um novo composto com ação anti-inflamatória sem apresentar os efeitos adversos dos medicamentos já atuantes na clínica.

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Sintetizar e avaliar a atividade anti-inflamatória de 20 novos derivados 2-((1*H*- indol-3-il) metileno)-*N*-substituídas-hidrazina-carbotioamida (LQIT/LT).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar e determinar as características físico-químicas dos novos derivados da série *N*-(2-indol-3-il) metileno-*N*-hidrazina-carbotiamida substituídos.
- Caracterizar estruturalmente os compostos através de Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio (RMN¹H), Ressonância Magnética Nuclear de carbono treze (RMN¹³C), espectroscopia de absorção vibracional na região do infravermelho (IV) e Espectrometria de Massas (EM);
- Realizar ensaio de citotoxicidade em macrófagos J774;
- Realizar ensaio de linfoproliferação;
- Dosear o óxido nítrico e as citocinas TNF- α e IL-6
- Realizar ensaio de toxicidade aguda;
- Avaliar atividade anti-inflamatória do edema de pata induzido por carragenina em camundongos

Revisão da Literatura

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 INFLAMAÇÃO

O processo inflamatório é uma autoproteção do organismo contra estímulos nocivos, e como tal, atua destruindo, diluindo e isolando o agente agressor, além de preparar o local para os processos reparativos, como cicatrização e regeneração do tecido afetado (Figura 1) (CHENG, et al., 2017 e BARREDA, et al., 2017). No entanto, uma inflamação excessiva e descontrolada pode levar a um estado inflamatório crônico que é propício para a instauração de importantes patologias como alergias, aterosclerose, gastroenterite, artrite, choque séptico e doenças autoimunes (MENG, et al., 2016).

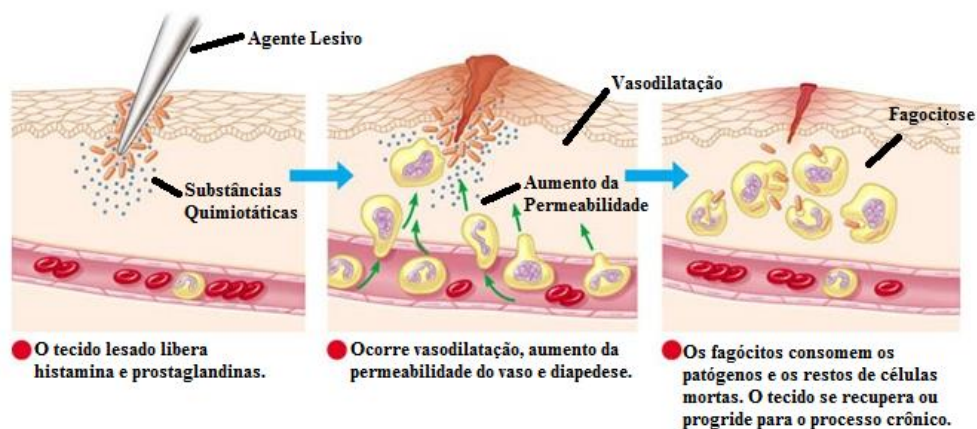


Figura 1: Desenvolvimento do processo Inflamatório Agudo. Fonte: modificada do REY, 2009.

A inflamação é um processo complexo que envolve componentes vasculares, celulares e uma diversidade de substâncias solúveis do plasma (DYKE e FREIRE, 2013 e BARROS et al., 2010). Classicamente, é dividida em aguda e crônica e essa divisão ocorre segundo a duração da evolução do processo. Cinco sinais clássicos podem ser observados no processo inflamatório: calor, rubor, inchaço, dor e perda de função. Sendo este último relacionado à inflamação crônica (GILMAN et al., 2006).

A resposta inflamatória aguda é dividida em duas fases: a fase inicial, que compreende as primeiras horas (0-2 h), e está relacionado com modificações ocorridas no calibre dos vasos, levando ao aumento do fluxo sanguíneo e alterações estruturais na microcirculação que permitem que as proteínas plasmáticas e os leucócitos deixem a circulação e migrem para o local da lesão. Essas modificações são mediadas pela ação das aminas vasoativas, histamina e

serotonina (CRUVINEL et al., 2010), e a fase tardia que ocorre entre a quarta e sexta hora (3-6 h), caracterizada pela exsudação de substâncias dissolvidas no plasma como as citocinas e migração celular. (CHIU et al., 2011 e ZHANG et al.; 2008). Já a inflamação crônica perdura por longos períodos, e pode ocorrer a perda de função do tecido e/ou órgão e fibrose, sendo caracterizada pela presença de linfócitos e macrófagos, além da proliferação de vasos sanguíneos (BARREDA, et al., 2017 e CARVALHO, et al., 2004).

3.2 RESPOSTA IMUNE DA INFLAMAÇÃO

O sistema imune é responsável pelos processos de reparo tecidual como também pela defesa do organismo contra infecções causadas por agentes de natureza diversa (LARBI e XU, 2017). Ele é capaz de fazer uma barreira protetora contra possíveis substâncias ou microrganismos nocivos à saúde, distinguindo os invasores dos tecidos e substâncias naturais do corpo. (MEDZHITOV et al., 2000). Há dois tipos de imunidade, a inata e a adquirida. A imunidade inata representa uma resposta rápida e estereotipada a vários tipos de estímulos. Ela pode funcionar como barreiras físicas, químicas ou biológicas (COTA E MIDWINTER, 2015 e JANEWAY et al., 2010).

Durante a imunidade inata as células atuantes são macrófagos, neutrófilos, células dendríticas e células *Natural Killer* – (NK), que tem por função realizar fagocitose, liberar mediadores inflamatórios, ativar as proteínas do sistema do complemento, além de estimular a síntese de citocinas e quimiocinas (CRUVINEL, et al., 2010). As células mononucleares como os macrófagos entram em ação secretando diversos mediadores, tais como óxido nítrico (NO), interleucinas (IL) – 1, 6, 12, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e quimiocinas como a IL-8, proteína inflamatória de macrófago 1 alfa (MIP-1 α), proteína quimiotática de monócito 1 (MCP-1), entre outros (KONSMAN et al, 2002). Esses mediadores vão ser liberados no início da inflamação aguda e terão ação pró-inflamatória, produzindo assim os eventos de vasodilatação e migração celular (DELVES et al., 2000).

Já a imunidade adquirida depende da ativação dos linfócitos e das substâncias solúveis produzidas por eles. As principais características da resposta adquirida são: especificidade, diversidade de reconhecimento e especialização da resposta (DELVES et al., 2000). Os linfócitos são um tipo de leucócito presente no sangue e são produzidos no timo ou na medula óssea através das células-tronco linfóides que se diferenciam em células pré-búrsicas e pré-timócitos. Os pré-timócitos dão origem aos linfócitos T que por sua vez vão amadurecer nos

órgãos linfóides periféricos (baço, linfonodos e amígdalas); e as células pre-búrsicas dão origem aos linfócitos B (WALKER et al., 1999; MARTINFONTECHA et al., 2004).

Os linfócitos T são os principais responsáveis pela chamada imunidade celular, eles atuam ora de forma a estimular ou atenuar a produção de anticorpos pelos linfócitos B, ora fagocitando as células corporais infectadas. Os linfócitos B dão origem aos plasmócitos e células B de memória que geram os anticorpos. São os principais responsáveis pela chamada imunidade humoral, que se dá via produção e diluição de anticorpos nos fluidos teciduais ou corporais (STANKOVIC et al., 2015 e SASSON et al., 1989). Os linfócitos vão ser responsáveis por provocar a quimiotaxia, ativação dos macrófagos, deposição de fibrina e dor (WATKINS et al., 1995).

A inflamação fornece sinais que são fundamentais para que os linfócitos sejam ativados iniciando a resposta imune específica e formando assim um elo de ligação entre a imunidade inata e adquirida (DYKE e FREIRE, 2013).

3.3 MEDIADORES QUÍMICOS DA INFLAMAÇÃO

Os mediadores químicos da inflamação são substâncias provenientes do plasma, das células do tecido conjuntivo e do endotélio, além dos leucócitos e plaquetas. São moléculas capazes de determinar o início, intensidade e evolução da inflamação, fazendo-se presente em ambas as fases da resposta inflamatória. Podendo ser classificadas de acordo com a ação: pró-inflamatória e anti-inflamatória, ou de acordo com a função desempenhada: mediadores quimiotáticos ou vasoativos (CRUVINEL, et al., 2000).

Os mediadores quimiotáticos são substâncias produzidas por células para recrutar a chegada de outras células imunológicas para o local da inflamação como as proteínas do sistema do complemento, substância P e as quimiocinas (HOFSTRA, et al., 2003). Os mediadores vasoativos também conhecidos como aminas vasoativas, são responsáveis pelo aumento da permeabilidade vascular e o extravasamento de líquidos para o espaço intercelular, originando o edema, a hiperemia e a elevação da temperatura (CALIXTO, et al., 2004). Outras substâncias como os metabólitos da cascata do ácido araquidônico (AA) (prostaglandinas, leucotrienos e lipoxinas), as citocinas (fator de necrose tumoral, interleucina-1) também são encontradas no local da lesão (TSELEPIS, et al., 2002).

3.3.1 Aminas Vasoativas

As aminas vasoativas são importantes substâncias endógenas presentes em várias células, incluindo basófilos, mastócitos, plaquetas e neurônios. Histamina e serotonina são as principais representantes desse grupo (FIGURA 2), elas são as primeiras substâncias a serem liberadas durante a cascata inflamatória, sendo responsáveis por alterações vasculares como: vasodilatação, aumento do fluxo sanguíneo, aumento da permeabilidade vascular e exsudação plasmática. Essas alterações ocorrem durante as primeiras horas após o estímulo inflamatório, caracterizando o início da resposta inflamatória aguda (PARADA et al., 2001).

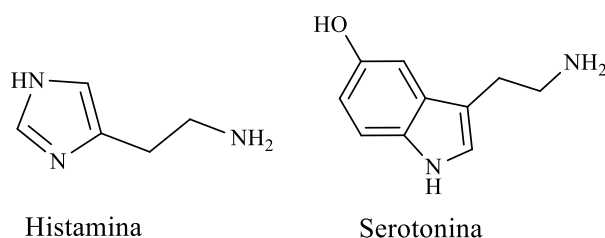


Figura 2: Estrutura química da histamina e serotonina. Fonte: autor, 2018.

Além das aminas citadas anteriormente há a bradicinina que faz parte da família de peptídeos gerados no plasma por ação de enzimas em substratos chamados cininogênios. A bradicinina é responsável por induzir a hiperalgesia térmica, e participar dos processos de nocicepção (dor) em diversas condições inflamatórias, bem como na formação do edema por estímulos das citocinas IL1, IFN- e TNF- α . (KAY, 2001; LAVICH et al, 2003).

3.3.2 Óxido Nítrico (NO)

O óxido nítrico é um gás solúvel e está relacionado com várias funções fisiológicas como imunomodulação (LIU et al., 2016) e citotoxicidade (KAJI et al., 2016). Ele é produzido por vários tipos de células, como os macrófagos e as células endoteliais sendo sintetizado a partir de L-arginina pela enzima óxido nítrico sintase (NOS) ou quando estimulados por processos inflamatórios (ABBAS, et al., 2003). Há pelo menos três isoformas de NOS responsáveis por induzir a produção deste gás no meio biológico, onde duas são constitutivas e uma liberada por estímulos à resposta inflamatória. A isoforma I ou óxido nítrico sintase neural (nNOS) é uma NOS constitutiva presente nos neurônios, células epiteliais, sistema nervoso central (SNC) e sistema nervoso periférico (SNP). A isoforma II ou óxido nítrico endotelial

(eNOS) está presente em condições fisiológicas no coração e nas paredes dos vasos. A isoforma III ou óxido nítrico induzida (iNOS) é uma NOS induzido por citocinas e lipopolissacarídeos (LPS) no endotélio e musculatura lisa vascular (KLEINERT, et al., 2003).

3.3.3 Citocinas

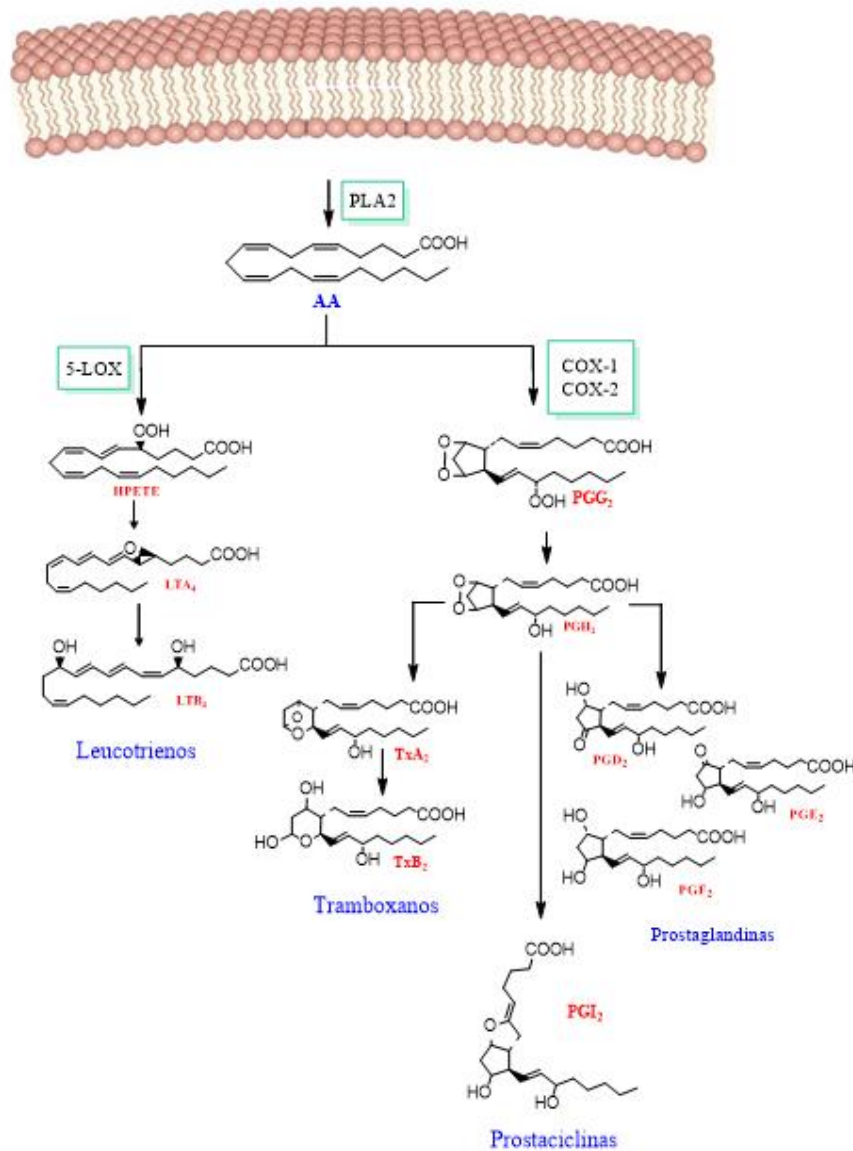
As citocinas são importantes mediadores do processo inflamatórios produzidos por vários tipos celulares, principalmente macrófagos e linfócitos ativados (TORRE-AMIONE, 2005). Estão diretamente relacionadas ao início da cascata inflamatória, induzindo muitas das respostas pró-inflamatórias, como febre, dor e formação do edema (LINO et al., 1998). Esses mediadores têm ampla distribuição e podem atuar em várias células, sendo também chamados de pleiotrópicos, são produzidos durante a fase de ativação e fase efetora da imunidade a fim de regular a resposta inflamatória (VIZONI et al., 2008).

As citocinas são produzidas durante o processo inflamatório e são estimuladoras da produção de proteínas de fase aguda. Elas são divididas em citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , fator de transformação do crescimento beta (TGF- β) e anti-inflamatórias como o antagonista do receptor de interleucina 1 (IL-1Ra), IL-4, IL-10, IL-13. As principais citocinas encontradas no local da lesão são o fator de necrose tumoral 1 alfa (TNF- α) e a interleucina 1- β (IL-1 β) ambas liberadas pelos macrófagos induzem a ativação das células endoteliais e dos leucócitos. A IL-1 aumenta o crescimento de células T e auxilia no crescimento e proliferação de células B, enquanto que o TNF- α provoca a diferenciação dos linfócitos B nas células plasmáticas secretoras de imunoglobulina E (IgE) (PARSLOW et al., 2004; BANERJEE; SAXENA, 2012).

3.4 DERIVADOS DO ÁCIDO ARAQUIDÔNICO

O ácido araquidônico (AA) é um derivado do ácido linoleico que, no organismo humano, se encontra nos fosfolipídios, que são componentes estruturais da membrana celular (DEVLIN, 2002). Os fosfolipídios da membrana sofrem ação da enzima fosfolipase A₂ (PLA₂), que é ativada por estímulos químicos, físicos e mecânicos, para gerar o ácido araquidônico. Uma vez produzido e liberado o AA sofre ação catalítica por ação de dois grupos de enzimas as cicloxigenases (COXs) e as lipoxigenases (LOXs), originando as prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos neste processo (MONTEIRO et al., 2008). Reações mediadas pelas COXs, a partir do AA produzem os endoperóxidos cíclicos como a prostaglandina G (PGG₂),

que sob ação da peroxidase forma PGH₂. Por serem pouco ativas as prostaglandinas G e H são convertidas às prostaglandinas D, E e F₂α, além das prostaciclina (PGI₂) e tromboxanos (TXA₂ e TXB₂) (Esquema 1) (OBREGON, et al., 2012).



Esquema 1: Cascata do Ácido Araquidônico. Fonte: Adaptado de MIRANDA, 2016.

As prostaglandinas têm ação de vasodilatação, estimulação dos centros hipotalâmicos de termorregulação e sensibilização dos nociceptores causado por modificações no sistema nervoso periférico levando a hiperalgisia (ROCHA et al., 2007; KLAUMANN et al., 2008 e LEES et al., 2004). As prostaciclina predominam no endotélio vascular e atuam causando vasodilatação e inibindo da adesão plaquetária. Os tromboxanos por sua vez, causam efeitos contrários como vasoconstrição e agregação plaquetária e são responsáveis também por induzir

a síntese de citocinas inflamatórias como interleucina 1β (IL- 1β) e o fator de necrose tumoral (TNF- α) (STAMP et al., 2005).

Por ação da LOX o AA é convertido em ácidos hidroperoxieicosatetraenóicos (HPETE). As lipoxigenases diferem quanto à sua especificidade pela colocação do grupo hidroperóxi, e os tecidos variam quanto às LOX que as contém. As plaquetas têm apenas a 12-lipoxigenase e sintetizam 12-HPETE, enquanto os leucócitos contêm tanto a 5-lipoxigenase quanto a 12-lipoxigenase e produzem 5-HPETE e 12-HPETE, respectivamente. A 5-LOX é uma das mais importantes lipoxigenases e está associada a inflamação, broncoconstrição, hipersensibilidade, anafilaxia e asma (RÁROVÁ et al., 2016). A 5-LOX leva à síntese dos leucotrienos (LTA₄, LTB₄ e LTC₄) e estes são responsáveis por aumentar a permeabilidade vascular e atrair os leucócitos para o local da lesão (GOODMAN et al., 2009).

3.4.1 Ciclooxygenase e suas isoformas

A COX existe em três isoformas distintas, a COX-1, COX-2 e a COX-3. A principal diferença na estrutura primária destas isoformas é a presença de 17 aminoácidos na porção amino-terminal da COX-1, enquanto a COX-2 apresenta 18 aminoácidos na porção carboxi-terminal. A COX-3 é uma variação do gene da COX-1 e ainda não há muitos estudos sobre ela. Embora sejam muito semelhantes na sua estrutura protéica, essas enzimas são codificadas por genes diferentes (ZHANG et al., 2009).

A COX-1 é expressa de forma constitutiva, e está presente em órgãos como o estômago e rim, tendo por função garantir a gastroproteção, o controle do fluxo sanguíneo renal, homeostasia dentre outras funções (HILÁRIO et al., 2006).

A COX-2 é a forma induzível que está associada a processos patológicos como inflamação e o câncer, embora também seja expressa de maneira constitutiva em alguns tecidos, como na mácula densa e em células intersticiais da medula renal (KUMMER et al., 2002; REIS et al., 2011, KOWALSKI & STEVENSON, 2013). Já a COX-3 está presente no sistema nervoso central e na aorta.

Estudos com as isoformas COX-1 e 2 indicam que ambas possuem afinidade pelo ácido araquidônico. Geneticamente as COXs possuem cerca de 85% de homologia genética e seus genes estão localizados nos cromossomos 9 e 1, respectivamente. A principal diferença na estrutura terciária destas proteínas pode ser observada nos sítios catalíticos. Enquanto a COX-1 apresenta um resíduo de isoleucina na posição 532 (Ile 532) a COX-2 apresenta um resíduo de valina na mesma posição (Val 532). Esta diferença representada apenas pela presença de um

grupamento metila a mais na Ile COX-1 em relação à Val na COX-2, por ser menos volumosa, contribui para a formação de uma cavidade suplementar no sítio catalítico (FIGURA 3) (BARREIRO, et al., 2002).

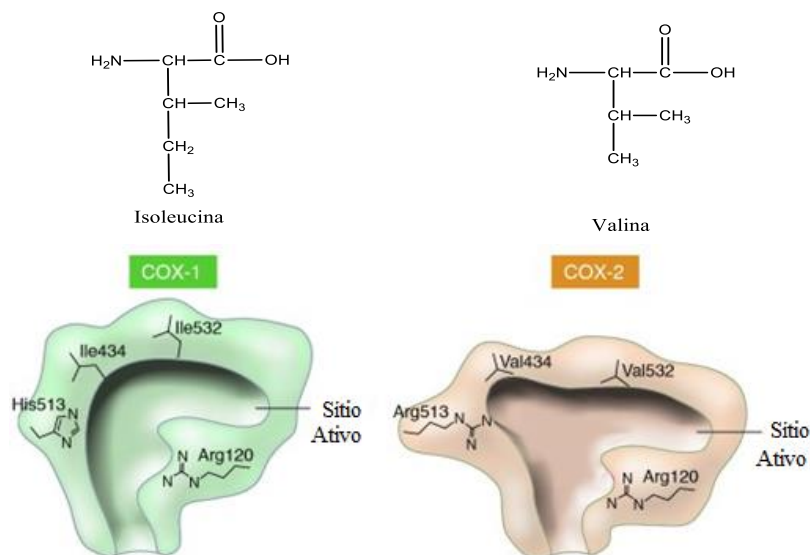


Figura 3. Representação estrutural das COX-1 e 2 evidenciando seus aminoácidos Fonte: Autor, 2018.

As diferenças evidenciadas na estrutura terciária de ambas proteínas podem explicar a seletividade de certos grupos de moléculas, como os inibidores seletivos da COX-2, os coxibes. Geralmente são moléculas mais volumosas de maior volume molecular devido ao sistema terfenílico que possuem (FIGURA 4) (BARREIRO e FRAGA, 2008).

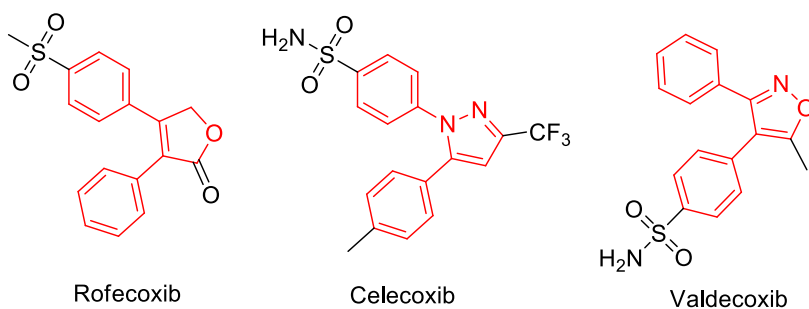


Figura 4. Inibidores seletivos à COX-2. Fonte: Autor, 2018.

3.5 OS ANTI-INFLAMATÓRIOS

O controle da dor e febre, associadas ou não a inflamação, tem sido uma preocupação desde a origem humana. Em 1827 Leroux isolou da casca do salgueiro branco a salicilina, um β -glicosil alcoólico com propriedades anti-inflamatórias. Em 1853, o químico francês Charles Frédéric Gerhardt conseguiu acetilar a salicilina, o que mantinha as propriedades medicinais e diminuiu de maneira significativa os efeitos colaterais do composto ao nível do estômago, dando origem ao primeiro anti-inflamatório comercial, o ácido acetilsalicílico (AAS), que foi introduzido na clínica em 1897 (FIGURA) (CARVALHO, 2010).

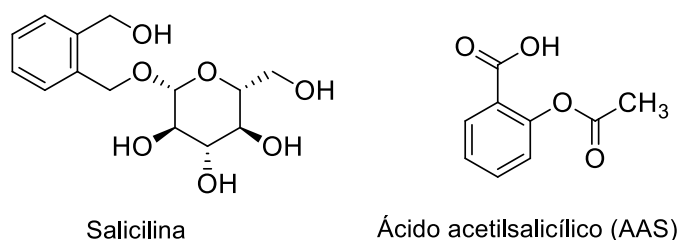


Figura 5: Estruturas químicas da salicilina e do AAS. Fonte: Autor, 2018.

Os vários registros de toxicidade, principalmente gastrintestinal, levaram aos químicos da época sintetizarem substâncias com menos efeitos adversos. Então, em 1950, desenvolveram a fenilbutazona, o primeiro anti-inflamatório não-salicilato, e a partir de 1960, foram desenvolvidos outros derivados acídicos ou não, com ações analgésicas e anti-inflamatórias cada vez mais eficazes e com menos efeitos indesejáveis (JÚNIOR, 2007; KLIPPEL, 2001; MONTEIRO, *et al*, 2008). Em 1971, Vane descobriu o mecanismo pelo qual a aspirina exerce o seu efeito anti-inflamatório, analgésico e antipirético atribuindo seus efeitos a inibição das enzimas cicloxigenases (VANE & BOTTING, 2003; FLOWER, 2003; VANE & BOTTING, 1998).

3.5.1 Anti-inflamatórios Esteroidais (AIEs)

Os glicocorticosteróides (GC) são hormônios produzidos pela zona fasciculada das glândulas supra-renais e estão envolvidos em diversas funções fisiológicas e também na adaptação a situações de estresse. Sua síntese é regulada pelo hormônio adrenocorticotrópico (ACTH), secretado pela hipófise (AYALA, 2002 e ANTI et al., 2008).

Em 1949, Philip Hench descreveu que a cortisona, um corticoesteróide produzido no córtex renal, possuía extrema eficácia no tratamento de pacientes com artrite reumatóide (RUBIN, 2007). A partir da observação de Hench os glicocorticoides passaram a ser isolados e, posteriormente, sintetizados e constituem a classe dos anti-inflamatórios esteroidais (AIEs). Hoje eles estão entre os fármacos mais utilizados no mundo e são eficazes no tratamento de várias doenças inflamatórias e imunológicas (TORRES, et al., 2012) mas também são empregados em outras situações como o tratamento câncer e transplantes de tecidos (BAVARESCO, et al., 2003).

Dentre as doenças inflamatórias, as aplicações mais típicas incluem asma, rinite alérgica, dermatite atópica, artrite reumatóide e doença inflamatória intestinal (DE BOSSCHER et al., 2010). Eles suprimem a inflamação através de vários mecanismos celulares e moleculares. Seus efeitos sobre as células inflamatórias incluem: indução de apoptose, inibição de citocinas e inibição da migração celular (TORRES, et al., 2012).

Os AIEs exercem ações mais amplas que os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) sobre o processo inflamatório e, atualmente, são os fármacos mais potentes utilizadas no tratamento da inflamação (HAEGEMAN, et al., 2010). Alguns exemplos de glicocorticoides utilizados na clínica incluem: dexametasona, prednisona, betametasona, budesonida, beclometasona (FIGURA 6). Porém seu uso prolongado acarreta um amplo espectro de efeitos colaterais sistêmicos que são descritos na literatura, entre eles os principais são osteoporose, fraturas ósseas, fraqueza do músculo esquelético, atrofia muscular principal, miopatia, dislipidemia, hipertensão, resistência periférica à insulina, hiperglicemia, retardo do crescimento em crianças, diminuição da libido, impotência, supressão do eixo HPA, hipocalcemia, irritação gástrica, úlcera péptica, glaucoma, catarata, distúrbios do sono, irritabilidade e depressão (STANBURY; GRAHAM, 1998).

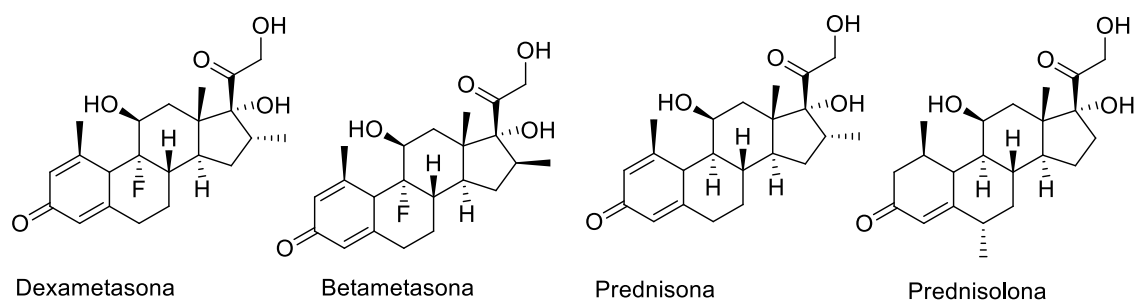


Figura 6: Anti-inflamatórios esteroidais (AIEs). Fonte: Autor, 2018.

3.5.2 Anti-Inflamatórios Não esteroidais (AINEs)

Devido aos diversos efeitos colaterais associados ao uso dos glicocorticosteróides, uma nova classe de anti-inflamatórios foi proposta, os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), nos quais exercem seus efeitos terapêuticos e colaterais inibindo a enzima COX, reduzindo assim a síntese das PGs e diminuindo a intensidade do processo inflamatório (MURI, et al., 2009).

Os AINES apresentam propriedades anti-inflamatória, analgésica e antipirética, e formam um grupo heterogêneo de compostos que são em sua maioria ácidos orgânicos (FIGURA 6), utilizados na clínica de maneira indiscriminada. Esses medicamentos são largamente usados para combater a febre e a dor aguda ou crônica (HILÁRIO et al., 2006). Os AINES são os fármacos de primeira escolha no tratamento de doenças reumáticas e não-reumáticas como, artrite reumatóide, osteoartrite e artrite psoriática, assim como nas sequelas de traumas e contusões e ainda nos pós-operatórios (MURI, et al., 2009).

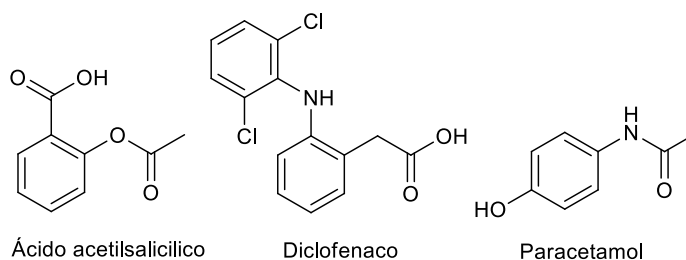


Figura 7. Anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs). Fonte: Autor, 2018.

Em geral os AINES inibem de forma variável as isoformas da COX. Por impedimento estérico eles bloqueiam a entrada do ácido araquidônico no sítio catalítico como seu ligante fisiológico, isto resulta numa produção reduzida de prostaglandinas e tromboxanos, que contribuem como importantes mediadores autócrinos e parácrinos em muitas respostas fisiológicas e fisiopatológicas (AL-HOURANI et al., 2011).

Quando estes suprimem a expressão da COX-1, acabam por impedir a produção de prostaglandinas principalmente a PGI₂ e PGE₂ que servem como agentes citoprotetores da mucosa em órgãos como estômago e rim, resultando em lesões gástricas, nefrotoxicidade e aumento de hemorragias, limitando assim o seu uso para tratamentos mais prolongados (RAJAKARIAR et al., 2006).

Já a inibição da COX-2 resulta na diminuição dos efeitos inflamatórios, por tal observação, postulou-se que AINES inibidores específicos da COX-2 impediriam o processo inflamatório sem causar os efeitos colaterais gástrico, levando assim ao desenvolvimento de fármacos seletivos a COX-2, os coxibes (FIGURA 8) (FELDMAN, et al., 2000).

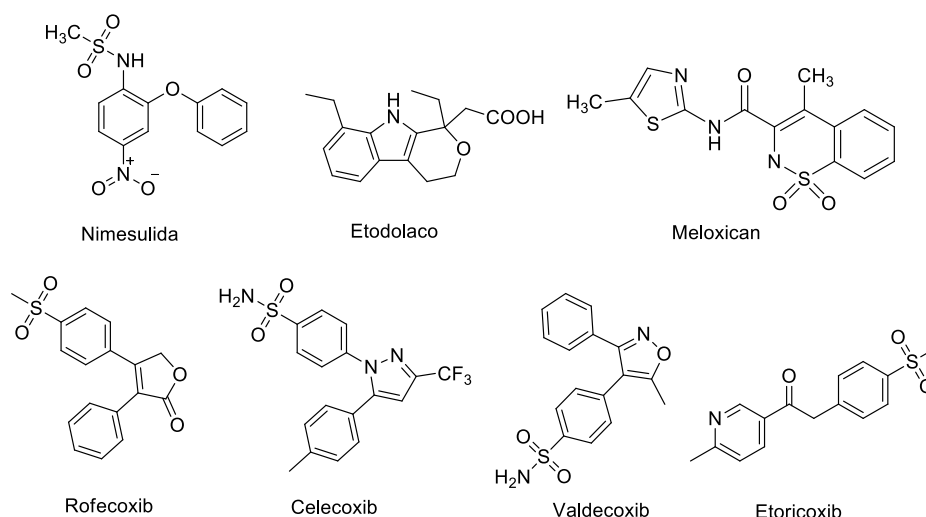


Figura 8: Inibidores seletivos da COX-2. Fonte: Autor, 2018.

Apesar de serem seletivos a COX-2, os coxibes não se ausentaram dos efeitos colaterais. A isoforma tipo 2 é expressa constitutivamente e age regulando a função homeostática tecidual do sistema nervoso central (SNC), coração, rins, vias aéreas, entre outros (SPAGGIARI, et al., 2007), e sua inibição aumenta o risco de eventos cardiovasculares, como infarto do miocárdio e acidente vascular cerebral oclusivo (HOEFLER, 2004; ENGH, 2001; CHEN, RAO e KNAUS, 2006), por causa disso fármacos como o rofecoxibe e valdecoxibe foram retirados do mercado farmacêutico.

Atualmente apenas o celecoxib (Pfizer®) e o etoricoxibe (Merck®) são comercializados no Brasil e com algumas orientações farmacêuticas quanto à sua venda. Recentemente, o celecoxibe foi reconhecido como sendo clinicamente eficaz para reduzir o progresso da doença de Alzheimer, assim como de controlar a evolução de determinados tipos de câncer, indicando que, muito provavelmente, seus efeitos terapêuticos são além da COX-2 o que nos permite considerá-lo como um fármaco multi-alvo (KARPOORMATH, et al., 2014).

Nesse contexto torna-se emergente a necessidade da descoberta de potenciais compostos que atuem no combate à progressão de processos inflamatórios sem a evidência de efeitos colaterais graves como os dos fármacos já apresentados atualmente na clínica.

3.6 TIOSSEMICARBAZONAS

As tiossemicarbazonas (TSC) são moléculas que possuem estrutura básica, $C=N-NH-CS-NH_2$ (FIGURA 9) e são consideradas bases de Schiff por ser uma imina estável designada pela ligação $C=N$ do nitrogênio 1.

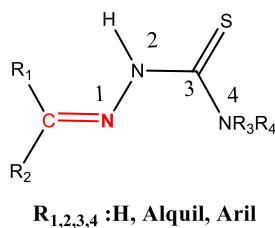
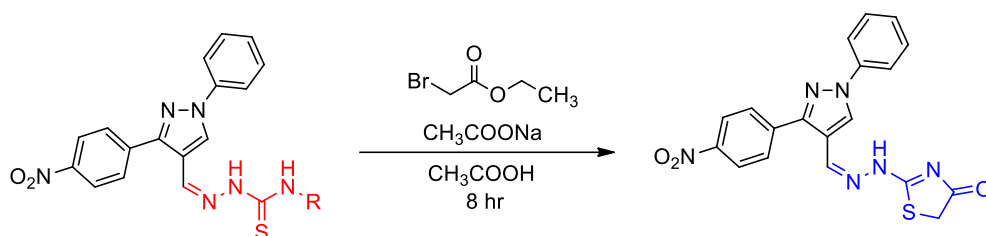


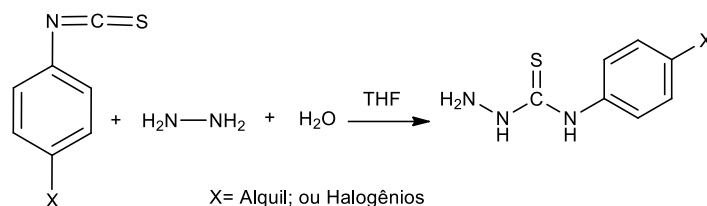
Figura 9: Estrutura química das tiossemicarbazonas e a numeração dos seus átomos segundo a IUPAC (PANICO, 1993). Fonte: Autor, 2018.

Caracterizam-se por serem versáteis quanto a sua obtenção e aplicação biológica, além de servir como intermediário para a obtenção de núcleos importantes como os azóis (Esquema 2) (TENÓRIO et al., 2005 e ALEGAON et al., 2014).



Esquema 2: Formação núcleo tiazol a partir da tiossemicarbazonas. Fonte: Autor, 2018.

As TSC podem ser obtidas sinteticamente por duas principais vias: direta, que ocorre através da reação quimiosseletiva de aldeídos e/ou cetonas, ou indireta, através da preparação prévia das tiossemicarbazidas (TENÓRIO et al., 2005). As tiossemicarbazidas por sua vez, podem ser obtidas comercialmente, ou sinteticamente por reações de condensação entre hidrato de hidrazina e ácido tiocarbamoilgliocólico, ditiocarbamatos, dissulfeto de carbono ou ainda isotiocianatos. A utilização dos isotiocianatos são mais comuns e normalmente as reações são rápidas e apresentam bons rendimentos variando de 70- 90% (Esquema 3) (OLIVEIRA et al., 2013).



Esquema 3: Formação das tiossemicarbazidas a partir de isotiocianatos na presença de hidrazina. Fonte: Autor, 2018.

As bases de Schiff apresentam contribuições importantes em moléculas com atividades biológicas como: antitumoral (SERDA et al., 2012; YU et al., 2012; KALINOWSKI et al., 2007 e ISHIGURA et al., 2015), antibacteriano e anticâncer (BECKFORD et al., 2011 e OLIVEIRA et al., 2015) antimicrobiana (YILDIRIM et al., 2014), antiprotozoária (MOREIRA et al., 2014), anti-*Trypanosoma cruzi* (FINKIELSZTEIN et al., 2011) dentre outras (FIGURA 10).

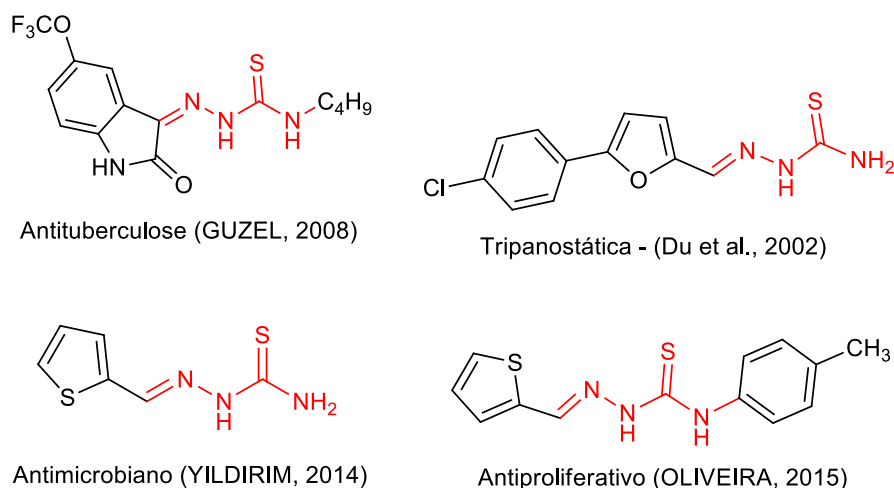


Figura 10: Derivados tiossemicarbazônicos com diferentes atividades farmacológicas. Fonte: Autor, 2018.

3.6.1 Atividade Anti-inflamatória das Tiossemicarbazonas

Afim de avaliar a atividade anti-inflamatória e analgésica de derivados indol-tiossemicarbazona, MUTHUKUMAR et al., 2008, utilizaram o modelo do edema de pata induzido por carragenina e a contorção induzida por ácido acético em ratos para determinar valores expressivos quanto a sua capacidade analgésica e de redução do processo inflamatório agudo. Todos os compostos testados apresentaram uma significativa atividade, tendo destaque para quatro compostos que conseguiram reduzir o volume da pata e não apresentaram

diferenças relevantes no teste de analgesia quando comparados com o fármaco controle, a indometacina (FIGURA 11) (MUTUKUMAR et al., 2008).

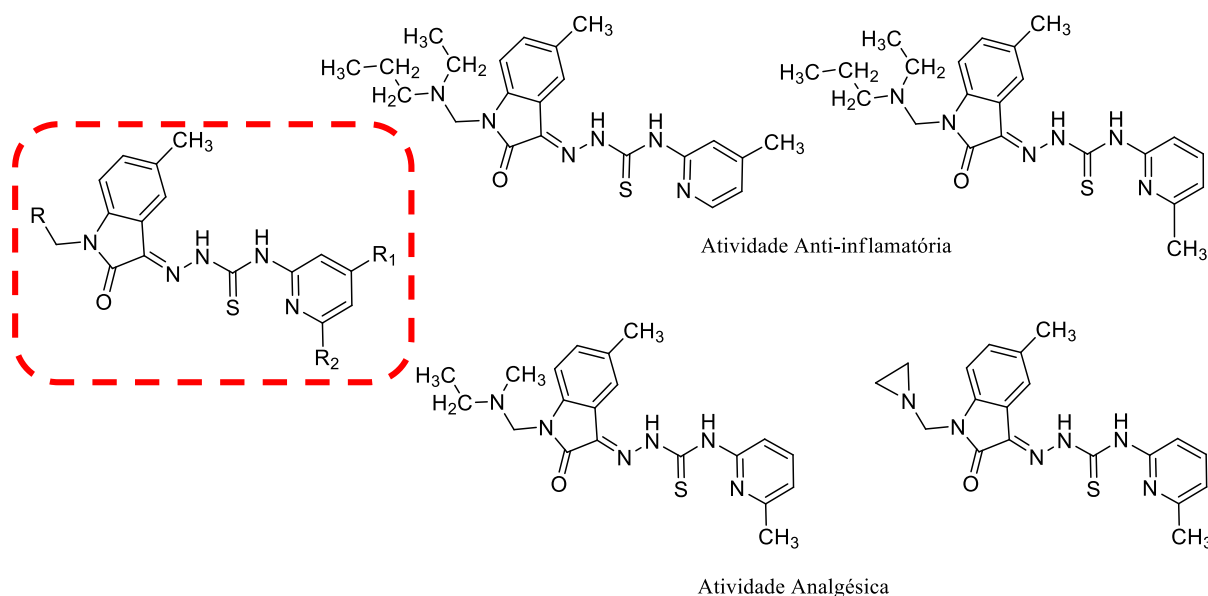


Figura 11: derivados indol-tiossemicarbazona com atividade anti-inflamatória e analgésica. Fonte: Autor, 2018.

Diferentes modelos inflamatórios colaboram para determinar a atividade de um composto. Em geral os testes são realizados não apenas para verificar a ação anti-inflamatória, mas também, para identificar por qual via de inibição (via LOX ou COX) o fármaco-protótipo está atuando (HELAL et al., 2013).

Em estudo recente Oliveira et. al, descreveram a atividade atinociceptiva e anti-inflamatória para o derivado 2- tiofeno-tiossemicarbazona (FIGURA 12).

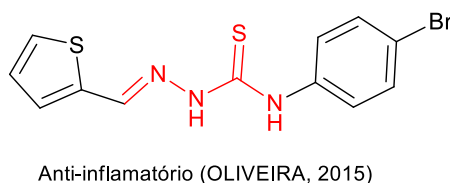


Figura 12: (E) -N- (4-bromofenil) -2- (tiofen-2-il-metileno) –tiossemicarbazona. Fonte: Autor, 2018.

Ao realizarem o teste de edema de orelha induzida por óleo de cróton perceberam que o composto não foi capaz de reduzir significativamente o tumor, porém tal molécula teve um ótimo resultado no teste de edema de pata induzido pelo composto 48/80, onde obteve 56,53%

de inibição após 15 min de inoculação do agente flogístico e 84,21% de redução do tumor após 90 min de experimento. Essa diferença de resultado está relacionada com o fato de que os compostos que possuem esse mecanismo de ação atuam na inibição da enzima ciclooxigenase (COX) ou anti-histamínicos, tendo assim pouco ou nenhum efeito no modelo de avaliação pelo óleo de cróton.

Já a atividade antinociceptiva foi aferida pelo teste da formalina nas doses de 30, 100 e 300mg onde se obteve valores de 62,3; 84,3 e 100% respectivamente, referente a inibição da lambida da pata.

3.7 INDOL

Na química medicinal os heteroaromáticos vem sendo cada vez mais estudados pelo seu amplo espectro de atividades biológicas e por suas particularidades químicas. Dentre eles podemos destacar o indol, um composto facilmente encontrado na natureza estando presente nos alcaloides dos vegetais, ou sendo produzidos por bactérias. A ocorrência natural do indol está relacionada a sua participação na constituição do aminoácido essencial triptofano e estar presente em hormônios como a serotonina e melatonina, podendo ser sintetizado pela condensação de um anel benzênico a um pirrol. (NOREEN et al., 2017) (FIGURA 13).

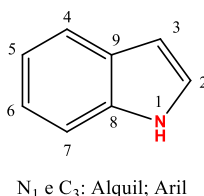
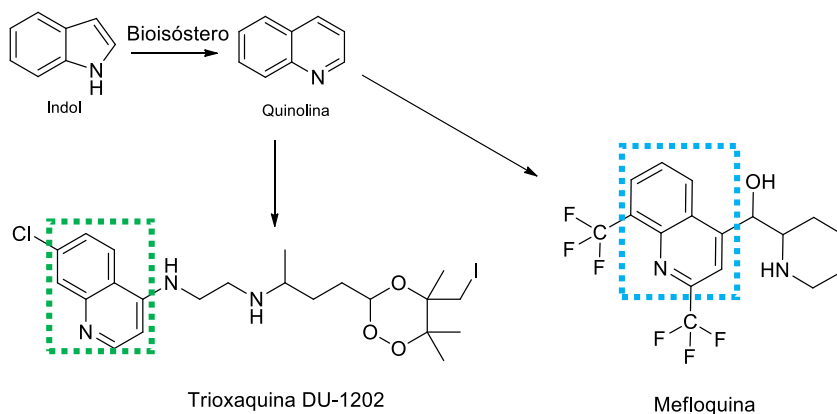


Figura 13: Estrutura do 1H-indol. Fonte: Autor, 2018.

O indol não substituído de fórmula molecular C₈H₇N é uma molécula bicíclica planar contendo 10 elétrons π . É um sólido incolor de odor desagradável, que compõe uma das porções heterocíclica de nitrogênio mais difundida na natureza (CHADHA E SILAKARI, 2017). É um importante farmacóforo estando presente em diversas atividades biológicas como: anticancerígenas (SAHA, et al., 2017), antibacterianas e antimicrobianas (NIKHILA, et al., 2017), anti-inflamatórias (SINGH, et al., 2017) e antimaláricas e citotóxicas (ABDELBASSET, et al., 2018). Quimicamente o indol é um bioisómero da quinolina, um composto aromático com dois anéis hexagonais fundidos com um nitrogênio na posição 1. A quinolina está presente na

estrutura de importantes fármacos anti-maláricos como a mefloquina e trioxaquina DU-1202 (Esquema 4).



Esquema 4: Estrutura química dos compostos bioisómeros indol e quinolina. Fonte: Autor, 2018.

O núcleo indol também é encontrado na estrutura química de importantes anti-inflamatórios utilizados na clínica atual, como a indometacina e o sulindaco (FIGURA 14). Esses medicamentos fazem parte dos chamados Anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), uma classe de fármacos utilizados principalmente no tratamento da inflamação, dor e edema, como também nas osteoartrites, artrite reumatoide e distúrbios músculo-esqueléticos (BATLOUNI, 2009). O tenidap é um inibidor da prostaglandina e interleucina-1, utilizado no tratamento de artrite reumatóide e osteoartrite. Possuindo ação também sobre as enzimas ciclooxigenase e 5-lipoxigenase, que convertem o ácido araquidônico em prostaglandina e leucotrienos. Já a indometacina atua como inibidor não seletivo da ciclooxigenase 1 e 2 que, por sua vez, bloqueia a produção de prostaglandinas.

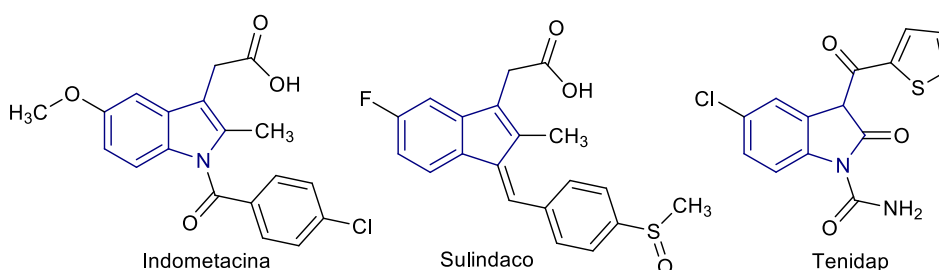


Figura 14: AINEs constituídos com o núcleo indol. Fonte: Autor, 2018.

Farmacologicamente atribui-se as substituições feitas simultaneamente ou não, em N-1 e C-3 do anel indólico como os responsáveis pelas importantes atividades biológicas tais como: anti-inflamatória (HALL et al., 2008; SINGH et al., 2008); anticâncer (MADADI et al., 2014) e antinociceptiva (ADAM et al., 2010; MOIR et al., 2010). Knaus et al., prepararam uma série de derivados indol substituídos nas posições N1 e C3, e avaliaram-nos quanto à sua atividade inibitória da COX-2, e obtiveram excelentes resultados.

Estudos realizados por Khanna et al., 2006 e Bandgar et al., 20011, utilizaram AINEs contendo o anel indol como um alvo para melhorar a sua seletividade frente a COX-2 e reduzir os efeitos ulcerogênico atribuída à COX-1.

Diante desta observação Choppara et al. desenvolveram uma série de *N*-prenilado indol-3- carbazona e avaliaram-nos quanto a sua capacidade de inibição sobre a enzima 5-Lipoxigenase (5-LOX), envolvida em processos inflamatórios das vias respiratórias como a asma e diversas alergias. Os resultados obtidos foram favoráveis para dois compostos com valores de IC₅₀ igual a 36,65 e 33,69 para os derivados indólico tiossemicarbazona e semicarbazona respectivamente (FIGURA 15) (CHOPPARA et al., 2015).

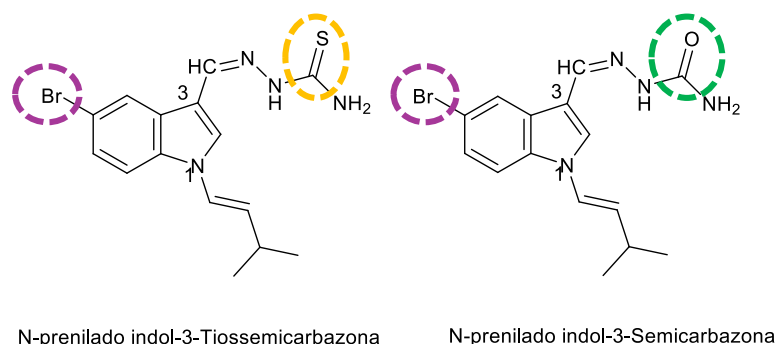
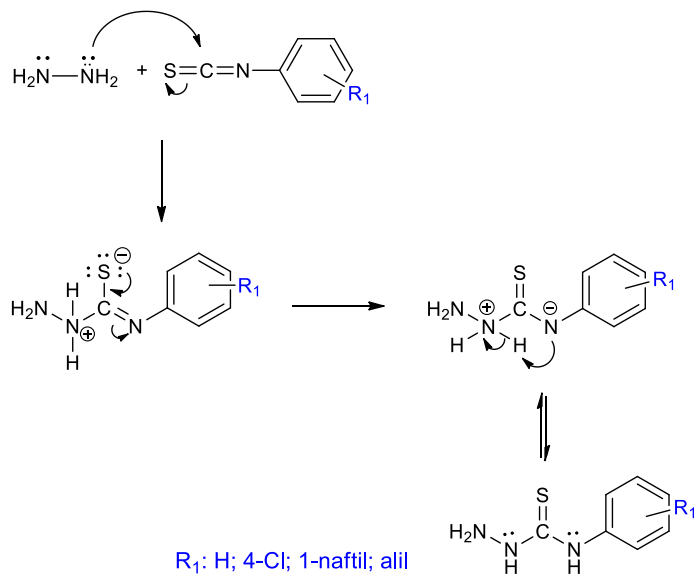


Figura 15: Derivados *N*-prenilado indol-3- carbazona inibidores da enzima 5-LOX. Fonte: Autor, 2018.

Abordagens sintéticas baseadas em AINEs foram tomadas com o objetivo de criar novos compostos com potencial ação anti-inflamatória capaz de inibir a ciclooxigenase e seus efeitos adversos. Desta forma, realizamos a síntese, caracterização e estudo da atividade anti-inflamatórias de 3-indol-tiossemicarbazonas. O mecanismo reacional das tiossemicarbazonas ocorre em duas etapas distintas: a) uma reação de adição nucleofílica; b) uma reação de condensação.

a) Reação de adição nucleofílica e formação das tiossemicarbazonas – 1ª Etapa

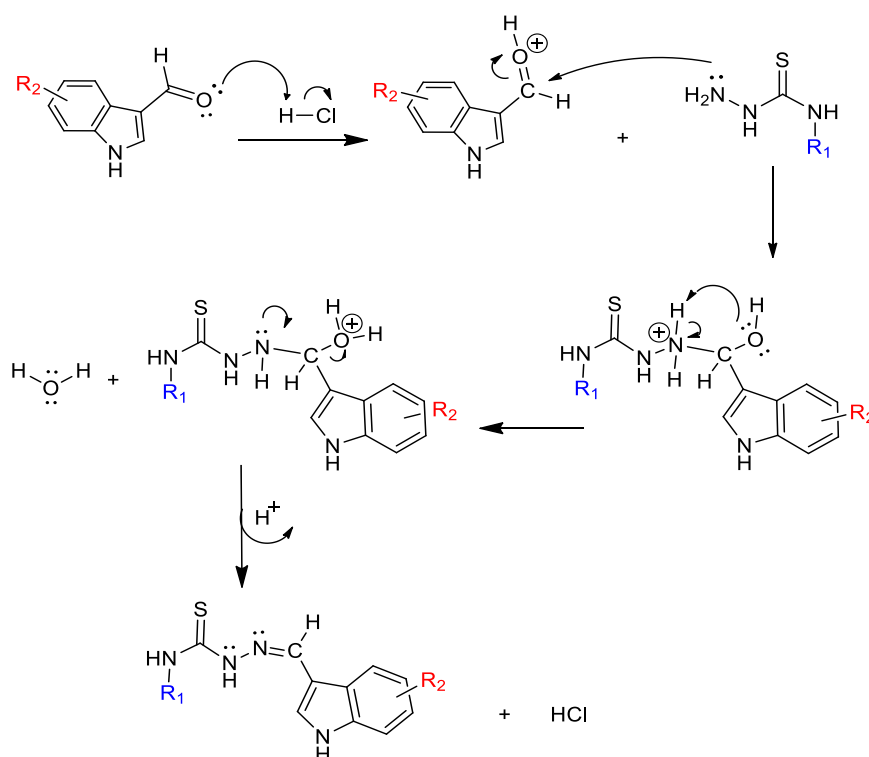
O mecanismo geral a seguir representa a formação dos compostos intermediários, ou seja, das tiossemicarbazidas substituídas. Caracteriza-se por um ataque simultâneo do nitrogênio do hidrato de hidrazina ao carbono da tiocarbonila, e deslocalização dos elétrons π para o nitrogênio vizinho, conduzindo aos derivados tiossemicarbazônicos (Esquema 5) (Tenório et al., 2005).



Esquema 5: Mecanismo de formação dos compostos intermediários

b) Reação de condensação e formação das tiossemicarbazonas – 2ª Etapa

A etapa da síntese para obtenção dos compostos finais caracteriza-se por uma reação de condensação. Ocorre uma ativação, por meio de um ácido, da função aldeído do composto aromático de escolha. O par de elétrons livres, presente no nitrogênio da hidrazina, ataca o carbono positivo. Assim, ocorre a deslocalização dos elétrons com formação e posterior eliminação de água. O nitrogênio que está positivo protona a água e finalmente forma-se o composto final, esquematizado abaixo (Esquema 6) (Aquino, et al., 2008).



R₁: H; 4-Cl; 1-naftil; alil

R₂: 4-NO₂; 5-CN; 7-aza; 7-CH₃; 1-benzo

Esquema 6: Mecanismo de formação dos derivados indólicos-tiossemicarbazônicos.

Parte Experimental

4.1 REAGENTES E SOLVENTES

Os seguintes reagentes e solventes foram utilizados para obtenção dos compostos nitro-indol-3-carboxaldeído, 5-ciano-indol-3-carboxaldeído, 1-H-benzo [g] indol-3-carboxaldeído, 1-naftil-benzaldeído, alil-benzaldeído, 7-metil-indol-3-carboxaldeído, 7-azaindol-3-carboxaldeído, 4-cloro-benzaldeído, benzaldeído, etanol absoluto, ácido acético glacial, metanol, fenilisotiocianato, cianoacetohidrazina, diclorometano, acetato de etila, *n*-hexano. Estes reagentes e solventes utilizados na síntese dos compostos ou para suas análises pertencem às marcas Sigma-Aldrich, Acros, Merck, Vetec ou Quimis e foram utilizados sem purificação.

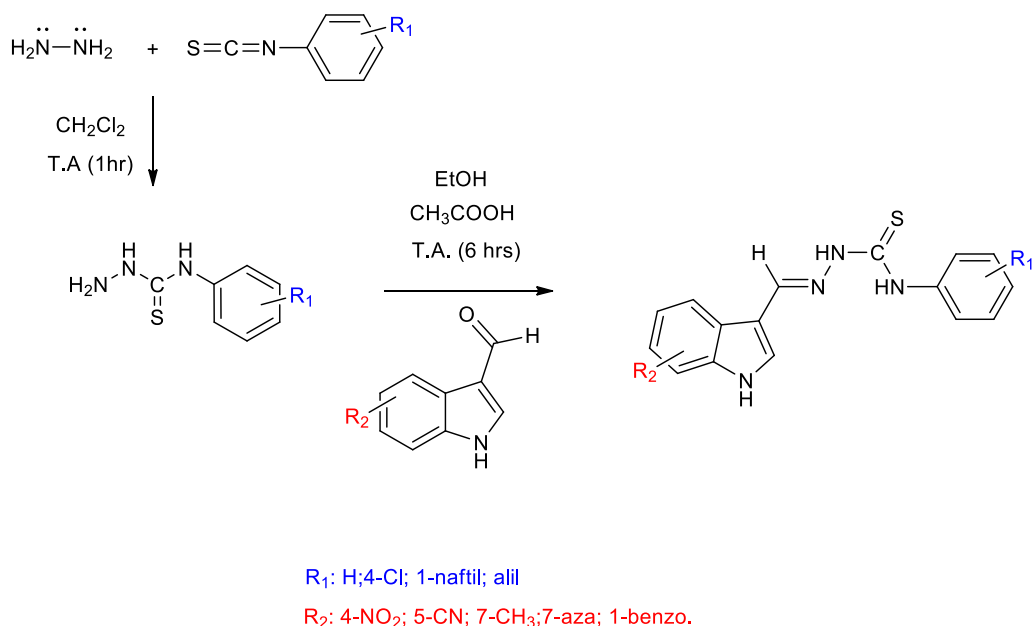
4.2 EQUIPAMENTOS

Para a caracterização físico-química, foi utilizado fusímetro Fisatom modelo 431D (Fisatom, São Paulo, Brasil). Os valores das razões de frente foram calculados com auxílio de cromatografia em camada delgada (CCD) com placas de sílica gel 60 F254 Merck (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha), de 0,25 mm de espessura, tamanho médio, 5x3cm e revelado na câmara UV (254 ou 366 nm) CN-15LC (Vilber Lourmat, Collégien, França).

Para a caracterização estrutural dos compostos sintetizados utilizamos, na espectrofotometria de absorção no infravermelho (IV), espectrofotômetro FTIR Bruker, modelo (Bruker Daltonics, Billerica, EUA), em pastilhas de KBr, com bandas de absorção expressas em cm^{-1} . Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H) e carbono (RMN ^{13}C) foram realizados em espectrofotômetro MHz-Varian, modelo Unity plus-300 (Varian, Palo Alto, EUA), utilizando DMSO- d_6 como solvente. A espectrometria de massas foi realizada em MALDI-TOF Autoflex III (Bruker Daltonics, Billerica, EUA).

4.3 PARTE QUÍMICA

O esquema 7 abaixo descreve a síntese das moléculas indólicos-tiossemicarbazonas através de uma via plena. Partindo-se da reação entre tiossemicarbazonas, inicialmente sintetizadas a partir de isotiocianatos substituídos e hidrazina hidratada, e indolcarboxaldeídos substituídos, foram obtidos os derivados tiossemicarbazônicos.



Esquema 7: Diagrama de Síntese dos Compostos Indólicos-Tiossemicarbazonas

4.3.1 Síntese das Tiossemicarbazidas

Em um balão de fundo redondo foi adicionado 1,0g (4,6 mmol) do isotiocianato correspondente em 30 mL de diclorometano e a mistura deixada sob agitação a temperatura ambiente até solubilização. Em seguida foram adicionados 0,3 mL (9,3 mmol) de hidrato de hidrazina. A mistura foi mantida sob agitação por 1h sendo após o tempo decorrido filtrada e lavada com *n*-hexano.

4.3.2 Síntese das Tiossemicarbazonas (LQIT/LT)

Em um balão de fundo redondo foram adicionados a temperatura ambiente, os aldeídos indólicos substituídos em 20 mL de etanol e 15 gotas de ácido acético glacial. A mistura reacional foi deixada sob agitação magnética até alcançar a solubilização. Em seguida foram adicionados as tiossemicarbazidas correspondentes e a reação mantida sob agitação à temperatura ambiente por 1h. Ao término do referido tempo, a mistura foi filtrada e obtido um sólido amorfo que foi cristalizado em sistema EtOH/H₂O.

4.4 ENSAIOS BIOLÓGICOS *in vitro*

Os testes foram realizados no Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia – LETI sob a responsabilidade do professor Dr. Diogo Rodrigo Magalhaes Moreira do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz da Fiocruz/BA.

4.4.1 Ensaio de Citotoxicidade

Macrófagos murino da linhagem J774 foram incubados em placa de 96 poços (1×10^4 células/poço, em 100 μ L) em meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM; Life Technologies) suplementado com 10% de soro bovino fetal (Life) e 50 μ g/mL de gentamicina (Novafarma, Anápolis, GO, Brasil) e mantidos por 24 h em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Como controle positivo foi utilizado à violeta de genciana (Synth, São Paulo, SP, Brasil). Os compostos foram solubilizados em DMSO (PanReac, Barcelona, Spain) e diluídos em meio DMEM e foram testados em sete concentrações, em triplicatas. Após adição dos compostos, as placas foram incubadas em estufa com 5 % de CO₂ à 37 °C por 72 horas. Em seguida, foi adicionado 20 μ L/poço de AlamarBlue (Invitrogen, Carlsbad, CA) e incubado por 4 h. A leitura no espectrofotômetro foi realizada a 570 e 600 nm. Os valores de CC₅₀ foram calculados utilizando leituras obtidas em três experimentos independentes.

4.4.2 Ensaio de linfoproliferação e Estimulação com conA

Esplenócitos de camundongos BALB/c (1×10^6 células/poço, em 100 μ L) foram cultivados em meio DMEM e em placa de 96 poços, em triplicatas, na presença (C+) ou ausência (C-) da concanavalina A (2.0 μ g/mL, Sigma-Aldrich). Como controle positivo foi utilizado à Dexametasona (Sigma-Aldrich). Os compostos foram solubilizados em DMSO e diluídos em meio DMEM e foram testados em sete concentrações (12 – 0.049 μ M), em triplicatas. Por conta da analogia estrutural com os compostos, a Indometacina foi testada em paralelo. Após 48 horas de incubação em estufa a 37° C e 5% de CO₂, foi adicionado às culturas 1 μ Ci de ³H-timidina (PerkinElmer, Shelton, CT) e 18 horas de incubação em estufa. Após esse período, as células foram congeladas e descongeladas, transferidas para placa contendo filtro de papel. Após adição de 50 μ L do líquido de cintilação (MaxiLight, Hidex, Turku, Finland), a incorporação de timidina foi quantificada no contador de partículas beta (Chameleon, Turku,

Finland). A concentração que inibe em 50 % a proliferação dos linfócitos (CC_{50}) foi efetuada utilizando-se regressão não-linear no programa Graph Pad Prism versão 5.01(Graph Pad Software, San Diego, CA). Três experimentos independentes foram realizados.

4.4.3 Dosagem de nitrito (óxido nítrico)

Macrófagos murino da linhagem J774 foram incubados em placa de 96 poços (1×10^4 células/poço, em 100 μ L) em meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM; Life Technologies) suplementado com 10% de soro bovino fetal (Life) e 50 μ g/mL de gentamicina (Novafarma, Anápolis, GO, Brasil) e mantidos por 24 h em estufa a 37°C e 5% de CO_2 . Como controle positivo foi utilizado à violeta de genciana (Synth, São Paulo, SP, Brasil). Os compostos foram solubilizados em DMSO (PanReac, Barcelona, Spain) e diluídos em meio DMEM e foram testados em quatro concentrações (30, 10, 3.3, 1.1 μ M), em triplicatas. Após adição dos compostos, as placas foram incubadas em estufa com 5 % de CO_2 à 37 °C por 48 horas. Em seguida, o sobrenadante foi coletado e a produção de nitrito no sobrenadante de macrófagos J774 foi determinada através do método de Griess (GREEN *et al.*, 1982). A absorbância foi determinada em leitor de ELISA (Spectramax), com filtro de 570 nm. As análises foram realizadas no Software Softmax 4.3.1. Os resultados foram expressos em μ M de nitrito, tendo por base uma curva padrão de nitrito de sódio com concentração inicial de 400 μ M.

4.4.4 Dosagem de citocinas

As dosagens de IL-6 e TNF- α foram realizadas a partir do sobrenadante das culturas de células coletados 24 e 4 h respectivamente, pela técnica de ELISA sanduíche, utilizando o protocolo, anticorpos e citocinas recombinante do kit DuoSet ELISA Developmet System (R&D Systems, Minneapólis, MN, EUA). Placas de ELISA (NUNC – IMMUNO PLATE MaxisorpSurface) foram sensibilizadas com 50 μ L/poço do anticorpo de captura, na concentração de 2 μ g/ml, diluído em PBS e incubadas por 16 horas à temperatura ambiente. As placas foram lavadas três vezes com PBS a 0,05% de tween e bloqueadas com 100 μ L/poço de PBS contendo, 1% de albumina bovina por 2 horas. Em seguida, foram adicionados 50 μ L/poço das amostras, do branco e da curva padrão dos recombinantes diluídos no tampão Tris-salina (20mM trizma base e 150 mM de NaCl) contendo 0.1% de albumina bovina e 0.05% de tween

20, durante 2 horas, à temperatura ambiente. O padrão foi diluído em concentrações seriadas (1:2), a partir da concentração inicial em pg/ml de cada kit, com sete diluições em duplicata. A placa foi lavada três vezes com PBS/tween 0,05% e incubada com 50 µl do anticorpo de detecção (biotinilado) na concentração de 400 ng/ml por um período de 2 horas. A placa foi lavada três vezes com PBS/tween 0,05% e incubada durante 20 minutos com avidina-peroxidase diluída 1:200. A revelação foi realizada adicionando o substrato TMB dissolvido em 10 mL do tampão citrato-fosfato 0,05 M pH 5.0 e 2 µl de H₂O₂ e interrompida com ácido fosfórico a 0.05 M. A leitura da reação foi determinada utilizando o espectrofotômetro (Spectramax), com filtro de 450 nm. As análises foram realizadas no Software Softmax 4.3.1.

4.5 ENSAIOS BIOLÓGICOS *in vivo*

Os testes foram realizados no Laboratório de Bioensaios para Pesquisa de Fármacos – LBPF, do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco sob a responsabilidade da professora Dr^a. Teresinha Gonçalves da Silva.

4.5.1 Animais

Foram utilizados camundongos machos adultos albinos swiss (*Mus musculus*), pesando entre 30 e 35g provenientes do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e Biotério do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco para a realização do teste de edema de pata e peritonite. Fêmeas adultas pesando entre 30 e 35g albinos swiss (*Mus musculus*) foram utilizadas para teste de toxicidade aguda. Os animais foram acondicionados em gaiolas de polietileno com grades de aço inoxidável e maravalha como cobertura, tendo acesso livre à água e ração balanceada, mantidos num ambiente com temperatura de 22°C ± 2°C e luminosidade controlada, proporcionando um ciclo claro-escuro de 12 horas. Todos os animais foram submetidos a jejum, com a retirada da ração cerca de 4 horas antes do início do experimento.

4.5.1.2 Toxicidade Aguda

A avaliação de toxicidade se deu pela administração da dose única de 2000mg/ kg dos derivados em estudo como preconizado pela Organization for Economic Cooperation and Development (OECD, 2002). Foram utilizados 3 grupos cada um contendo 3 animais (fêmeas), totalizando 9 animais, sendo o experimento realizado em duplicata. Os derivados indólicos-tiossemicarbazônicos foram solubilizados em uma mistura de solução salina e DMSO a 5% e administrados no grupo um e dois e o terceiro grupo recebeu apenas o veículo (controle). Após a administração os animais foram observados continuamente nas primeiras duas horas e depois a cada 24hs durante 14 dias para verificação de qualquer alteração comportamental, nas atividades fisiológicas ou mortalidade. Os parâmetros comportamentais observados foram: agitação, atividade motora, locomoção, resposta ao toque, piloereção, ptose, cianose, movimentos estereotipados, sonolência, frêmito vocal, ataxia, contorções, agressividade, convulsões, micção, defecação, diarreia. Também foi observado o consumo de água e ração. No 15º dia os animais foram anestesiados com tiopental (5 mg/kg) para coleta de sangue por punção cardíaca para avaliação hematológica e em seguida eutanasiados para coleta dos órgãos para avaliação (fígado, rins, baço e estômago) para observação macroscópica de lesões e cálculo do índice dos órgãos.

4.5.1.3 Edema de Pata Induzido por Carragenina

Foram utilizados camundongos albinos swiss machos (n=5) os quais foram tratados via oral com os compostos LT-76, LT-81 e LT-87 (salina + DMSO 10%), nas doses de 10, 30 e 50 mg/kg, indometacina (10 mg/kg) ou veículo (salina + DMSO 10%) 1 h antes da injeção da carragenina. O edema foi induzido pela injeção de 0,05 mL de carragenina a 1% (w/v) na região subplantar da pata posterior direita [12]. O volume da pata foi medido antes e nos intervalos de 1, 2, 3, 4, 5 h após a injeção de carragenina pelo pletismômetro (Ugo Basile). Os resultados foram expressos como a diferença entre o volume final da pata a cada tempo (Vf) e o volume inicial (Vi).

4.5.1.4 Análises estatísticas

Foi utilizada regressão não linear para calcular os valores de CC₅₀ e IC₅₀. O one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de comparações múltiplas de Newman foram usadas para determinar a significância estatística das comparações entre os grupos nos estudos. Valores de p menores que 0,05 ($p < 0,05$) foram considerados como indicativos de significância e representados por * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$. Os dados foram obtidos utilizando o Software GraphPad Prism 7.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL

A análise de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e Carbono (RMN ^1H , ^{13}C), juntamente com os espectros de Infravermelho possibilitou a elucidação estrutural dos compostos tiossemicarbazônicos obtidos.

De maneira geral no RMN ^1H foram observados sinais característicos do hidrogênio presente no *N*4 da tiocarbonila ($\text{NH}-\text{C}=\text{S}$), evidenciado como um singlete na região de 9,6 a 10,1 ppm. Observou-se também a presença de um singlete com deslocamento químico na faixa entre 8,53 – 8,68 ppm característicos do hidrogênio imínico ($\text{HC}=\text{N}-$). Todos os espectros analisados apresentaram sinais de singlete (s), dubleto (d), tripleto (t), na região característica de grupamentos aromáticos (7,1 - 7,9 ppm). Outros sinais também foram evidenciados em forma de singletos na região de 11,6 – 12,5 ppm referente aos hidrogênios do (NH) indólico e benzílico, de acordo com a literatura compostos possuindo uma configuração *E* exibem o sinal entre a faixa descrita acima (SERDA et al., 2013).

Nas figuras 16 e 17 é possível observar de maneira mais detalhada a posição dos diferentes hidrogênios presentes nos derivados tiossemicarbazônicos, em especial os do composto LQIT/LT-73.

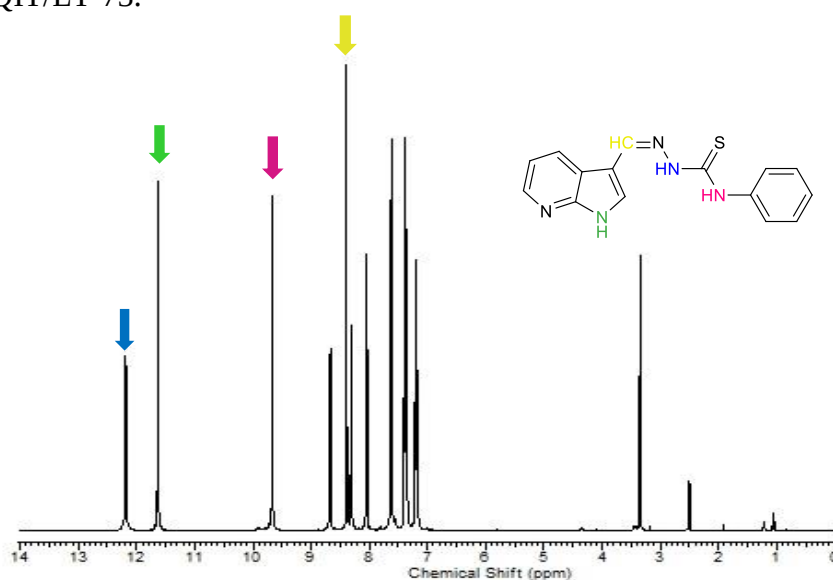


Figura 16: Espectro de RMN de ^1H do composto LT-73.

Os hidrogênios ligados ao anel benzílico aparecem na faixa de deslocamento entre 7,7 - 7,1 ppm com padrões de multiplicidade correspondentes a um dubleto e dois tripletos, os quais podem ser diferenciados por seus valores de constante de acoplamento, $J = 8,0$ referente ao dubleto dos hidrogênios centrais do anel (em azul), $J = 8,0$ da ligação HNC-CH e $J = 7,6$ do hidrogênio localizado em *para* (em verde).

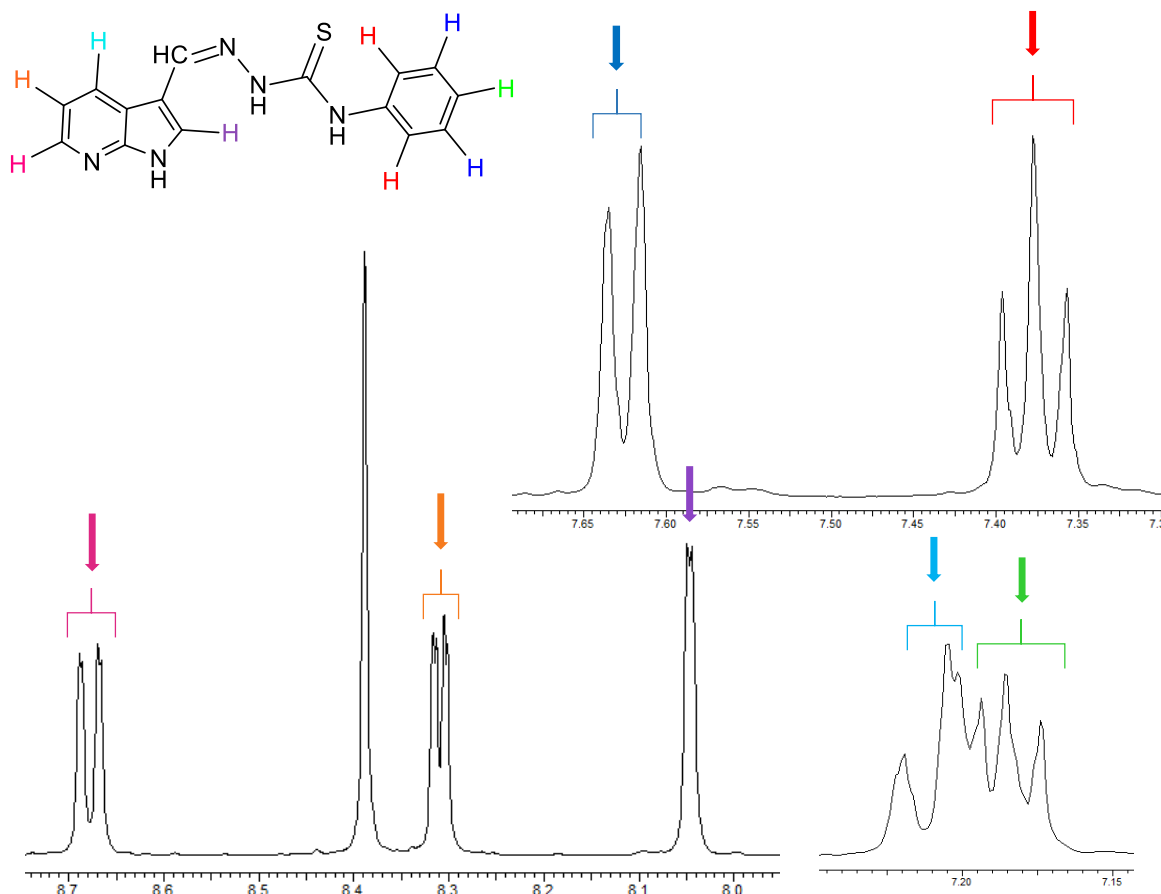


Figura 17: Ampliação do espectro de Hidrogênio do composto LT-73.

O espectro de RMN ^{13}C evidencia as absorções dos átomos de carbono característicos dos derivados tiossemicarbazônicos. Sinais em 149,3 e 174,8 correspondem ao estiramento C=N e C=S, respectivamente. Entre 109 – 128 ppm corresponde aos carbonos aromático do benzil. Em 130,5 – 144,0 ppm apresentam o estiramento referente aos carbonos do indol (FIGURA 17).

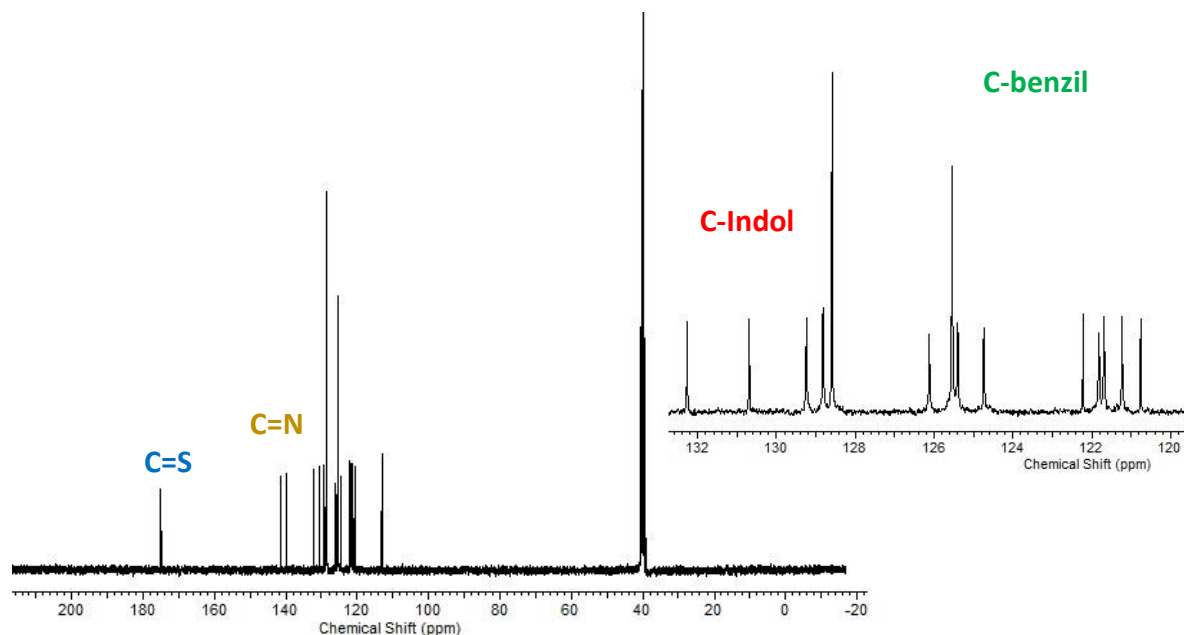


Figura 18: Espectro de RMN d e ^{13}C do composto LT-73.

Os derivados tiossemicarbazônicos apresentam bandas vibracionais características dos grupos funcionais N-H, C=S, C=N e C=C. As bandas referentes aos 3 N-H presente na molécula aparecem entre $3348 - 3312 \text{ cm}^{-1}$. Bandas em 1505 e 1550 cm^{-1} referem-se aos grupamentos C=S e C=N respectivamente (FIGURA 18).

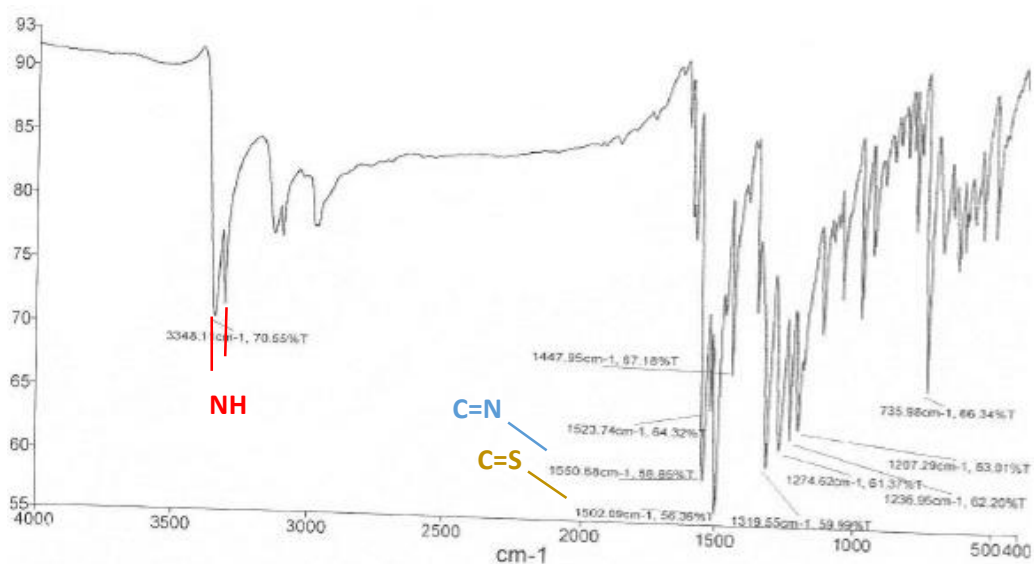


Figura 19: Espectro de Infra-vermelho do LT-71

A espectrometria de massa colaborou com os dados obtidos de RMN e IV para caracterização dos compostos tiosemicarbazônicos sintetizados. Através dessa análise pode-se comparar e comprovar com exatidão a massa molecular obtida através do espectro obtido pela técnica do MALDI-TOF com a esperada calculada pelo ChemBioDraw Ultra 12 (FIGURA 19).

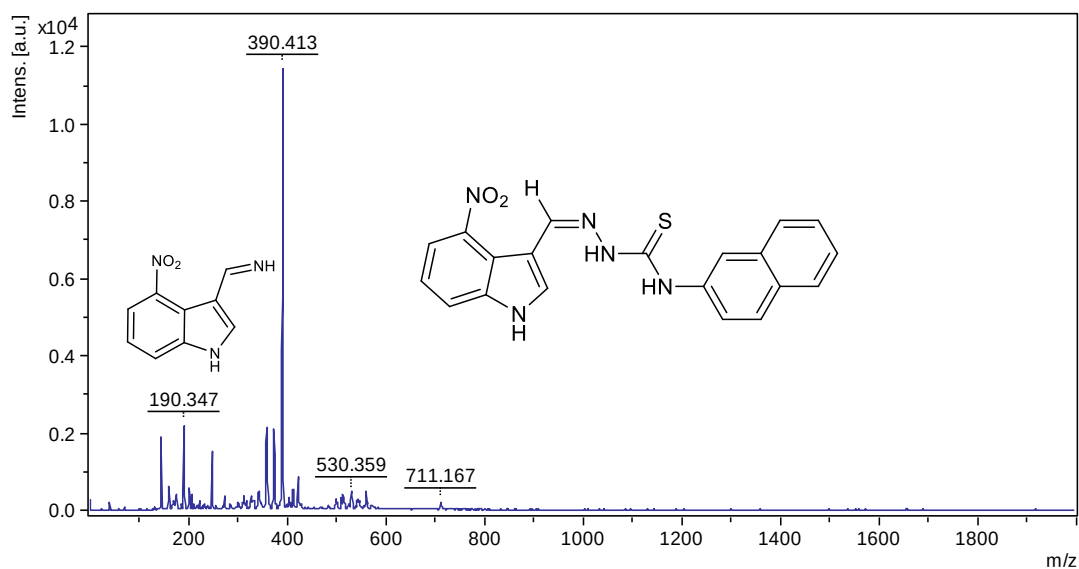
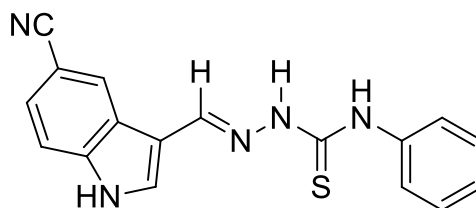
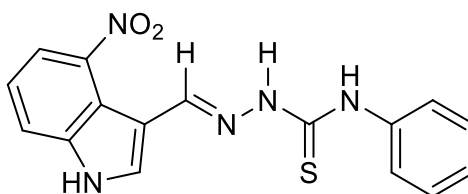


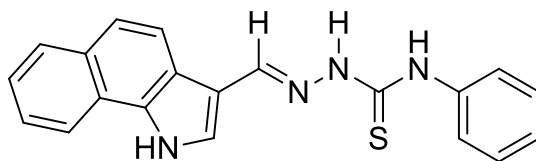
Figura 20: Espectrometria de massas do composto LQIT/LT-81

5.1.1 2-((5-ciano-1*H*-indol-3-il)metileno)-*N*-fenilhidrazinacarbotoamida (LQIT/LT-70)

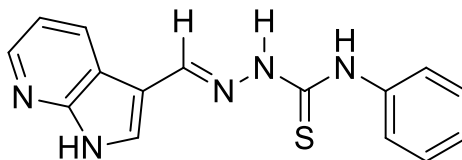
Composto 1 obtido na forma sólida e de cor branca (100 mg, 78,80%): R_f = 0.52 (*n*-Hex/AcOEt 4:6); mp: 230-231°C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ = 7.89 (d, J = 0,8 Hz, 2H), 8.50 (s, 1H, CH), 8.56 (s, 1H, CH), 9.63 (s, 1H, NH), 11,8 (s, 1H, NH), 12,5 (s, 1H, NH) ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6): δ = 103-140 (C=C aromáticos), 142.3 (C=N), 174.9 (C=S) ppm; IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 1533 (C=S), 1553 (C=N), 3358 (N-H) cm^{-1} ; HRMS m/z $[M+H]^+$ calculada por $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{N}_5\text{S}$: 320.3910; obtido: 320.109.

5.1.2 2-((4-nitro-1*H*-indol-3-il)metileno)-*N*-fenilhidrazinacarbotoamida (LQIT/LT-71)

Composto 2, obtido na forma sólida e de cor vermelha (100 mg, 90,44%): R_f = 0.65 (*n*-Hex/AcOEt 4:6); mp: 230-231°C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ = 7.18 (t, 1H, J_1 = 7.6Hz, J_2 = 7.2Hz CH-indol), 7.37 (t, 1H, J_1 = 8Hz, J_2 = 6.8Hz CH-fenil), 7.67 (d, 1H, J = 8Hz, CH-fenil), 7.72 (d, 1H, J = 8Hz, CH-fenil), 7.78 (d, 1H, J = 8Hz, CH-fenil), 7.83 (d, 1H, J = 8 Hz, CH-indol); 7.87 (d, 1H, J = 8 Hz, CH-indol); 8.49(s, 1H, CH-indol), 8.55 (s, 1H, HC=H), 9.5 (s, 1H, NH-C=S), 11.7 (s, 1H, NH-fenil), 12.5 (s, 1H, NH-indol) ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6): δ = 109-139 (C=C aromáticos), 142.4 (C=N), 174.3 (C=S) ppm; IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 1502 (C=S), 1550 (C=N), 3152 (N-H), 3329 (N-H), 3348 (N-H) cm^{-1} ; HRMS m/z $[M+H]^+$ calculada por $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{N}_5\text{O}_2\text{S}$: 339.0790; obtido: 340,0170.

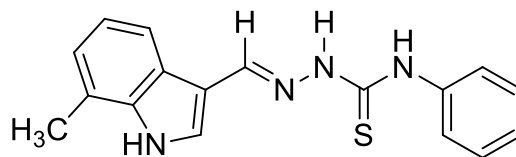
5.1.3 2-((1*H*-benzo[*g*]-indol-3-il)metileno)-*N*-fenilhidrazinacarbotioamida (LQIT/LT-72)

Composto 3 obtido na forma sólida e de cor amarela (100 mg, 35,41%): R_f = 0.59 (*n*-Hex/AcOEt 1:1); mp: 230-231°C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ = 7.63 (m), 7.75 (d, 2H, J = 0.8 Hz Ar), 7.97 (d, 1H, J = 8,0 Hz, Ar); 8.03 (d, 1H, J = 8,0 Hz, Ar); 8.35 (d, 1H, J = 8,4 Hz, Ar); 8.42 (d, 1H, J = 8,4 Hz, Ar); 8.51 (s, 1H, CH); 9.7 (s, 1H, NH); 11.6 (s, 1H, NH); 12.5 (s, 1H, NH) ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6): δ = 112-139 (C=C aromáticos), 141.07 (C=N), 174.6 (C=S) ppm; IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 1505 (C=S), 1550 (C=N), 3000 (N-H), 3158 (N-H), 3307 (N-H) cm^{-1} ; HRMS m/z $[M+H]^+$ calculada por $\text{C}_{20}\text{H}_{16}\text{N}_3\text{S}$: 344.1096; obtido: 345.112.

5.1.4 2-((1*H*-pirrol[2,3,*b*]-piridin-3-il)metileno)-*N*-fenilhidrazinacarbotioamida (LQIT/LT-73)

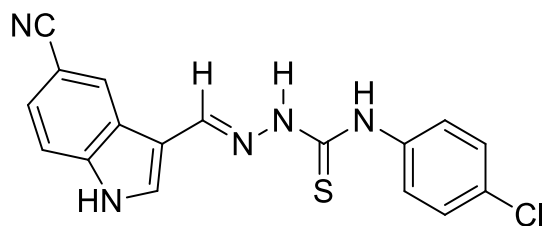
Composto 4 obtido na forma sólida e de cor branca (100 mg, 48,15%): R_f = 0.52 (*n*-Hex/AcOEt 4:6); mp: 289-290°C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ = 7.18(d, 1H, J = 7.6Hz, CH-fenil), 7.21(d, 1H, J = 6Hz, CH-azaindol), 7.37 (t, 2H, J_1 = 7.6Hz, J_2 = 7.3Hz CH-fenil), 7.62 (d, 1H, J = 8Hz, CH-fenil), 8.04 (d, 1H, J = 2Hz, CH-NH-azaindol), 8.3 (d, 1H, J = 6Hz, CH-azaindol), 8.38 (s, 1H, HC=N), 8.67 (d, 1H, J = 8Hz, NH-azaindol), 9.6 (s, 1H, NH-C=S), 11.6 (s, 1H, NH-indol), 12.1(s, 1H, NH-indol) ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6): δ = 109-144 (C=C aromáticos), 149.3 (C=N), 174.8 (C=S) ppm; IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 1529 (C=S), 1553 (C=N), 3019 (N-H), 3134 (N-H), 3328 (N-H) cm^{-1} ; HRMS m/z $[M+H]^+$ calculada por $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{S}$: 295.089; obtido: 296.129.

5.1.5 2-((7-metil-1H-indol-3-il) metileno)- *N*-fenilhidrazinacarbotioamida (LQIT/LT-74)



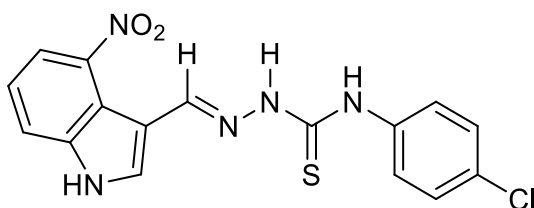
Composto 5, obtido na forma sólida e de cor amarela (100 mg, 36,47%): R_f = 0.47 (*n*-Hex/AcOEt 1:1); mp: 195-196°C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ =9.6 (s, 1H, NH-C=S), 11.6 (s, 1H, NH-indol), 12.1 (s, 1H, NH-indol) ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6): δ = 109-144 (C=C aromáticos), 149.3 (C=N), 174.8 (C=S) ppm; IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 1529 (C=S), 1553 (C=N), 3019 (N-H), 3134 (N-H), 3328 (N-H) cm^{-1} ; HRMS m/z $[M+H]^+$ calculada por $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{S}$: 308,1096; obtido: 309,139.

5.1.6 *N*-(4-clorofenil)-2-((5-ciano-1H-indol-3-il)metileno)-*N*-fenilhidrazinacarbotioamida (LQIT/LT-75)



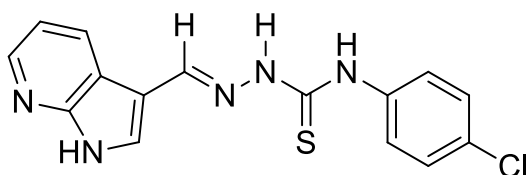
Composto 6 obtido na forma sólida de cor branca (100 mg, 59,53%): R_f = 0.48 (*n*-Hex/AcOEt 4:6); mp: 230-232°C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ =7.43 (d, 1H, J =8.8Hz CH-indol), 7.55 (d, 1H, J =8.4Hz CH-indol), 7.61 (d, 2H, J =8.8Hz, CH-fenil), 7.66 (d, 2H, J =8.8Hz, CH-fenil), 8.1 (s, 1H, CH-indol), 8.4 (s, 1H, CH-NH-indol), 8.7 (s, 1H, CH=N), 9.8 (s, 1H, NH-C=S), 11.7 (s, 1H, NH-indol), 12.0 (s, 1H, NH-indol) ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6): δ = 102-138 (C=C aromáticos), 140.6 (C=N), 175 (C=S) ppm; IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 1498 (C=S), 1552 (C=N), 2953 (N-H), 3153 (N-H), 3335 (N-H) cm^{-1} ; HRMS m/z $[M+H]^+$ calculada por $\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{N}_5\text{SCl}$: 353.0572; obtido: 354.056.

5.1.7 *N*-(4-clorofenil)-2-((4-nitro-1*H*-indol-3-il)metileno)-*N*-fenilhidrazinacarbotioamida (LQIT/LT-76)



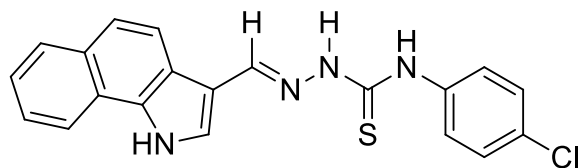
Composto 7 obtido na forma sólida de cor vermelha (100 mg 74,20%): R_f = 0.58 (*n*-Hex/AcOEt 4:6); mp: 235-236°C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ = 7.37(t, 1H, J_1 = 8Hz, J_2 = 7.6Hz CH-indol), 7.43(d, 2H, J = 9.2Hz CH-fenil), 7.76(d, 2H, J = 8.4Hz CH-fenil), 7.84 (d, 1H, J = 7.6Hz CH-fenil), 7.88 (d, 1H, J = 8Hz, CH-Indol), 8.50 (s, 1H, CH Indol), 8.56 (s, 1H, CH=N), 9.63(NH, s, 1H, NH-C=S), 11.8 (NH, s, 1H, Indol), 12.5 (NH, s 1H, =N-NH) ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6): δ = 109-140 (C=C aromáticos), 142.3 (C=N), 174.3 (C=S) ppm; IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 1509 (C=S), 1541 (C=N), 2953 (N-H), 3116 (N-H), 3268 (N-H) cm^{-1} ; HRMS m/z $[M+H]^+$ calculada por $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{N}_5\text{O}_2\text{SCl}$: 373.0400; obtido: 374.055

5.1.8 2-((1*H*-pirrol[2,3,*b*]piridina-3-il)metileno)-*N*-(4-clorofenil) fenil-hidrazina-carbotioamida (LQIT/LT-77)



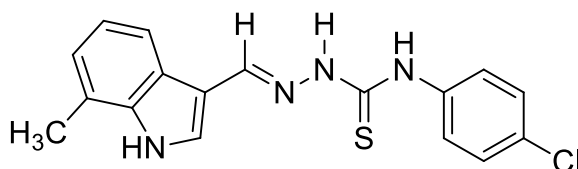
Composto 8 obtido na forma sólida de cor branca (100 mg 56,84%): R_f = 0.44 (*n*-Hex/AcOEt 4:6); mp: 240-241°C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ = 7.18 (dd, 1H, J_1 = 4.8Hz; J_2 = 4.4Hz CH-azaindol), 7.35 (dd, 1H, J_1 = 8.4Hz; J_2 = 8.8Hz CH-azaindol), 7.42 (d, 2H, J = 8.8Hz, CH-fenil), 7.66 (d, 2H, J = 8.8Hz, CH-fenil), 8.04 (s, 1H, CH-NH-azaindol), 8.31 (d, 1H, J = 4.8Hz, CH-NH-azaindol), 8.38 (s, 1H, CH=N), 8.67 (d, 1H, J = 8Hz, NH-C-NH), 9.7 (s, 1H, NH-C=S), 11.7 (s, 1H, NH-indol), 12.1 (s, 1H, NH-indol) ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6): δ = 109-144 (C=C aromáticos), 149.3 (C=N), 174.8 (C=S) ppm; IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 1493 (C=S), 1551 (C=N), 2923 (N-H), 3078 (N-H), 3143 (N-H) cm^{-1} ; HRMS m/z $[M+H]^+$ calculada por $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{N}_5\text{SCl}$: 329.0502; obtido: 330.086.

5.1.9 2-((1*H*-benzo[*g*]indol-3-il)metileno)-*N*-fenilhidrazinacarbotoamida (LQIT/LT-78)



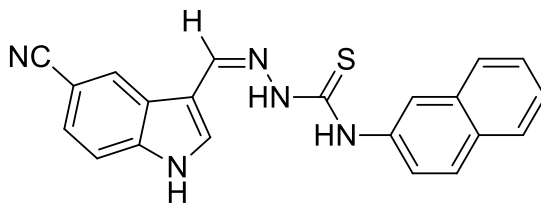
Composto 9 obtido na forma sólida de cor branca (100 mg 33,62%): R_f = 0.66 (*n*-Hex/AcOEt 1:1); mp: 220-222°C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ = 7.6 (m, Ar), 7.7 (d, 2H, J = 1,2 Hz, Ar), 8.0 (s, 1H, CH), 8.3 (d, 2H, J = 1 Hz, Ar), 8.4 (d, 2H, J = 0,9 Hz, Ar), 8.5 (s, 1H, CH), 9.7 (s, 1H, NH), 11.7 (s, 1H, NH), 12.5 (s, 1H, NH) ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6): δ = 112-138 (C=C aromáticos), 141.3 (C=N), 174.6 (C=S) ppm; IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 1493 (C=S), 1544 (C=N), 3289 (N-H), 3384 (N-H), 3404 (N-H) cm^{-1} ; HRMS m/z $[M+H]^+$ calculada por $\text{C}_{20}\text{H}_{15}\text{N}_4\text{S}$: 378.0706; obtido: 379.060.

5.1.10 *N*-(4-clorofenil)-2-((7-metil-1*H*-indol-3-il)metileno)-*N*-fenilhidrazinacarbotoamida (LQIT/LT-79)



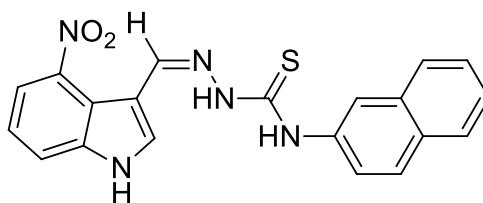
Composto 10 obtido na forma sólida de cor branca (100 mg 51,68%): R_f = 0.63 (*n*-Hex/AcOEt 1:1); mp: 205-206°C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ = 7.05 (m, Ar), 7.4 (d, 2H, J = 1,1 Hz, Ar), 7.68 (d, 2H, J = 1,0 Hz, Ar), 7.9 (s, 1H, CH), 8.0 (d, 2H, J = 0,9 Hz, Ar), 8.4 (s, 1H, CH), 9.6 (s, 1H, NH), 11.6 (s, 1H, NH), 12.4 (s, 1H, NH) ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6): δ = 111-138 (C=C aromáticos), 141.5 (C=N), 174.3 (C=S) ppm; IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 1502 (C=S), 1548 (C=N), 3134 (N-H), 3288 (N-H), 3390 (N-H) cm^{-1} ; HRMS m/z $[M+H]^+$ calculada por $\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{N}_4\text{S}$: 342.0607; obtido: 343.079.

5.1.11 2-((5-cian-1*H*-indol-3-il)metileno)-*N*-(naftilen-2-il)hidrazinacarbotioamida (LQIT/LT-80)



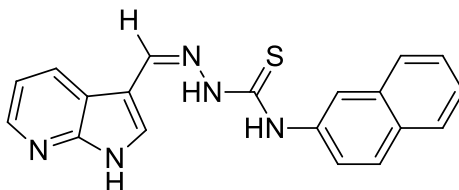
Composto 11 obtido na forma sólida de cor branca (100 mg 51,68%): $R_f = 0.63$ (*n*-Hex/AcOEt 1:1); mp: 205-206°C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 7,55$ (s, 1H, naftil), 7,60 (m, 3H, naftil), 7,65 (m, 3H, naftil), 7,92 (d, 1H, indol), 8,12 (s, 1H, indol), 8,19 (s, 1H, indol), 8,49 (s, 1H, NH indol), 9,86 (s, 1H, CH=N), 10,0 (s, 1H, NH), 11,75 (s, 1H, NH) ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 120-138$ (C=C aromáticos), 149,58 (C=N), 176,64 (C=S) ppm IR (KBr): $\tilde{\nu} = 1557$ (C=N), 1617 (C=S), 2224 (NH), 3395 (NH) cm^{-1} ; HRMS m/z $[M+H]^+$ calculada por $\text{C}_{21}\text{H}_{15}\text{N}_5\text{S}$: 369,1048; obtido: 370,1082.

5.1.12 *N*-(naftalen-2-il)-2-((4-nitro-1*H*-indol-3-il)metileno)hidrazina-carbotioamida (LQIT/LT-81)



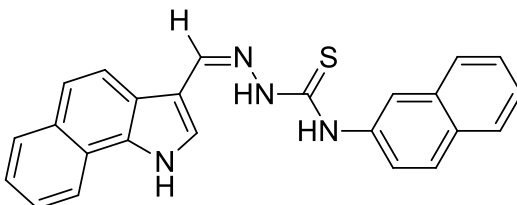
Composto 12 obtido na forma sólida de cor vermelha (100 mg 70,46%): $R_f = 0.63$ (*n*-Hex/AcOEt 4:6); mp: 248-250°C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 7,35$ (s, 1H, naftil), 7,53 (m, 4H, naftil), 7,84-7,99 (m, 2H, naftil), 7,84-7,99 (m, 3H, naftil), 8,59 (s, 1H, naftil), 8,66 (s, 1H, azaindol), 9,90 (s, 1H, NH), 11,89 (s, 1H, NH), 12,55 (s, 1H, NH) ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 176,89$ (C=S), 142,05 (C=N), 109-139 (C=C aromáticos) ppm IR (KBr): $\tilde{\nu} = 1518$ (C=N), 1531 (C=S), 3091 (NH), 3342 (NH) cm^{-1} HRMS m/z $[M+H]^+$ calculada por $\text{C}_{20}\text{H}_{15}\text{N}_5\text{O}_2\text{S}$: 389,0946; obtido: 390.149.

5.1.13 2-((1*H*-pirrolo[2,3-*b*]piridin-3-il)metileno)-*N*-(naftalen-2-il)-hidrazina-carbotioamida (LQIT/LT-82)



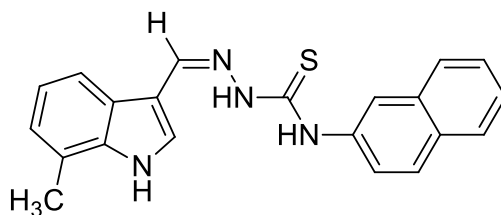
Composto 13 obtido na forma solida de cor amarela (100 mg 51,00%): R_f = 0.54 (*n*-Hex/AcOEt 4:6); mp: 269-270°C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ =7,1 (d, 1H, J =3,6, naftil), 7,53-7,60 (m, 4H, naftil) 7,89-7,99 (m, 3H, azaindol), 8,05 (s, 1H, naftil), 8,29 (d, 1H, J =2,4, naftil), 8,44 (s, 1H, N=CH), 8,81 (d, 1H, CH, azaindol), 9,91 (s, 1H, NH), 11,72 (s, 1H, NH), 12,18 (s, 1H, NH) ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6): δ =176,7 (C=S), 149,3 (C=N), 110-144 (C=C aromáticos) ppm IR (KBr): $\tilde{\nu}$ =1557 (C=N), 1582 (C=S), 3140 (NH), 3313 (NH) cm^{-1} HRMS m/z [$M+H$] $^+$ calculada por $\text{C}_{19}\text{H}_{15}\text{N}_5\text{S}$: 345,1048; obtido:346,1082.

5.1.14 2-((1*H*-benzo[*g*]indol-3-il)metileno)-*N*-(naftalen-2-il)hidrazinecarbotioamida (LQIT/LT-83).



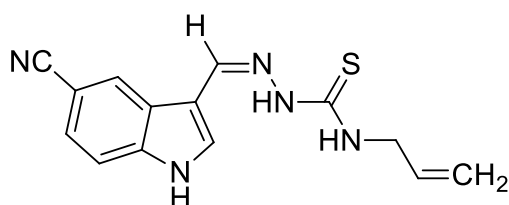
Composto 14 obtido na forma solida de cor amarela (100 mg 85,35%): R_f = 0.71 (*n*-Hex/AcOEt 1:1); mp: 285-286°C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ = 7,45-7,70 (m, 7H, benzo(*g*)), 7,89-8,04 (m, 5H, naftil), 8,40 (d, 1H, J =8,1, naftil), 8,46 (d, 1H, J =9,0, naftil), 8,58 (s, 1H, N=CH), 9,96(s, 1H, NH), 11,75 (s, 1H, NH), 12,59 (s, 1H, NH) ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6): δ =176,4 (C=S), 141,2 (C=N), 112-135 (C=C aromáticos) ppm IR (KBr): $\tilde{\nu}$ =1544 (C=N), 1688 (C=S), 3321 (NH), 3440 (NH) cm^{-1} HRMS m/z [$M+H$] $^+$ calculada por $\text{C}_{24}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{S}$: 394,1252; obtido:395,1286.

5.1.15 2-((7-metil-1H-indol-3-il)metileno)-N-(naftalen-2-il)hidraziencarbotioamida (LQIT/LT-84).

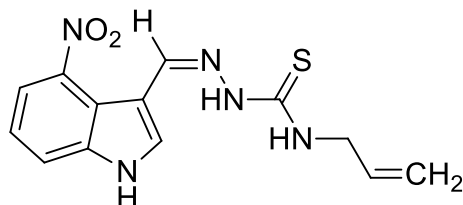


Composto 15 obtido na forma solida de cor amarela (100 mg 52,68%): R_f = 0.63 (*n*-Hex/AcOEt 4:6); mp: 255-256°C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ = 2,48 (s, 3H, CH₃), 6,98 (d, 2H, J =4,5, naftil), 7,52-7,58 (m, 3H, azaindol), 7,66 (d, 1H, J = 7,2, indol), 7,86 (d, 1H, J =8,1, naftil), 7,93-8,17 (m, 5H, naftil), 8,48 (s, 1H, N=CH), 9,84 (s, 1H, NH), 11,68 (s, 2H, NH) ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6): δ =16,69 (CH₃), 111-136 (C=C aromáticos) 141,3 (C=N), 176,17 (C=S) ppm IR (KBr): $\tilde{\nu}$ =1494 (C=N), 1557 (C=S), 3326 (NH), 3413 (NH) cm^{-1} HRMS m/z [$M+H$]⁺ calculada por C₂₁H₁₈N₄S: 358,1252; obtido:359,1286.

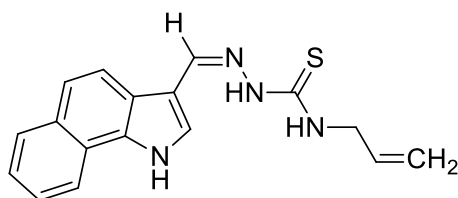
5.1.16 N-alil-2-((5-ciano-1H-indol-3-il)metileno)hidrazinecarbotioamida (LQIT/LT-85)



Composto 16 obtido na forma solida de cor amarela (100 mg 73,85%): R_f = 0.53 (*n*-Hex/AcOEt 6:4); mp: 205-206°C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ = 4,3 (t, 2H, J_1 =8.0 Hz; J_2 =8.0 Hz CH₂ – alil), 5,2 (m, 1H, alil), 5,14 (d, 1H, J =7.8, alil), 6,0 (t, 1H, J_1 =8.0Hz; J_2 =8.0 Hz indol), 7,6 (dd, 2H, J_1 =12.0 Hz; J_2 =12 Hz indol), 8,0 (s, 1H, indol), 8,3 (t, 1H, J_1 =8.0 Hz; J_2 =8.0Hz NH), 8,6 (s, 1H, N=CH), 9,9 (s, 1H, NH), 11,6 (s, 1H, NH) ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6): δ = 49,7 (CH₂), 115,1 (CH₂), 121 -136 (C=C aromáticos), 139,6 (C=N), 140,1 (CN), 176,4 (C=S) ppm IR (KBr): $\tilde{\nu}$ =1539 (C=N), 1617 (C=S), 3145 (NH), 3171 (NH), 3243 (NH) cm^{-1} HRMS m/z [$M+H$]⁺ calculada por C₁₄H₁₃N₅S: 283,0893; obtido:284,0925.

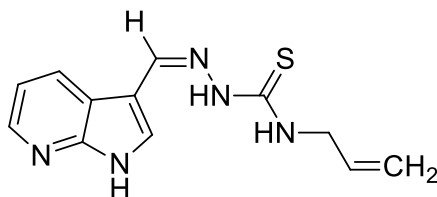
5.1.17 *N*-alil-2-((4-nitro-1*H*-indol-3-il)metileno)hidrazinecarbotioamida (LQIT/LT-86)

Composto 17 obtido na forma solida de cor vermelha (100 mg 81,68%): R_f = 0.65 (*n*-Hex/AcOEt 6:4); mp: 205-206°C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ =4,25 (t, 2H, J_1 =5.6 Hz; J_2 =5.2 Hz CH₂ – alil), 5.92 (m, 1H, alil), 5.12 (d, 1H, J =7.8, alil), 5.12 (d, 1H, J =8.1, alil), 7,3 (t, 1H, J_1 =8.0Hz; J_2 =8.0 Hz indol), 7,8 (dd, 2H, J_1 =8.0 Hz; J_2 =7.6 Hz indol), 8,1 (t, 1H, J_1 =5.6 Hz; J_2 =6.0Hz NH) 8,3 (s, 1H, indol), 8,4 (s, 1H, N=CH), 11,4 (s, 1H, NH), 12,5 (s, 1H, NH) ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6): δ =45,71 (CH₂), 142,1 (C=N), 176,4 (C=S) ppm IR (KBr): $\tilde{\nu}$ =1544 (C=N), 1524 (C=S), 3139 (NH), 3344 (NH) cm^{-1} HRMS m/z [$M+H$]⁺ calculada por C₁₃H₁₃N₅O₂S: 303,0790; obtido:304,0824.

5.1.18 2-((1*H*-benzo[*g*]indol-3-il)metileno)-*N*-alilhidrazinecarbotioamida (LQIT/LT-87).

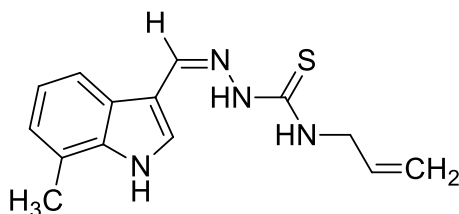
Composto 18 obtido na forma solida de cor branca (100 mg 34,16%): R_f = 0.43 (*n*-Hex/AcOEt 1:1); mp: 205-206°C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ =4.32 (t, 2H, CH₂), 5.12 (dd, 1H, J =10.2 CH₂), 5.19 (dd, 1H, J =17,1, CH₂) , 5.97 (m, 1H, CH), 7.45 (t, 1H, benzo (*g*)), 7.54 (dd, 2H, benzo (*g*)), 7,98 (d, 2H, J =8.4, CH indol), 8.12 (t, 1H, NH indol), 8.3 (d, 2H, J =8.4 benzo (*g*)), 8.42 (d, 1H, N=CH), 11.33 (s, 1H, NH), 12.52 (s, 1H, NH) ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6): δ = 45,68 (CH₂), 115,2 (CH₂=), 112-135 (C=C aromáticos), 140,5 (C=N), 172,2 (C=S). δ = IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 1536 (C=N), 1610 (C=S), 3111 (NH), 3403 (NH) HRMS m/z [$M+H$]⁺ calculada por C₁₇H₁₆N₄S: 308,1096; obtido:309,1129.

5.1.19 2-((1*H*-pirrol[2,3,*b*]piridin-3-il)metileno)-*N*-alilhidrazina-carbotioamida (LQIT/LT-88).



Composto 19 obtido na forma sólida de cor branca (100 mg 41,68%): R_f = 0.55 (*n*-Hex/AcOEt 8:2); mp: 205-206°C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ = 5,1 (t, 2H, alil), 5,19 (d, 1H, CH), 6,0 (m, 3H, CH), 7,1 (t, 1H, CH indol), 7,9 (s, 1H, CH indol), 8,1 (s, 1H, C=N indol), 8,3 (d, 1H, NH), 8,6 (d, 1H, CH=N), 11,2 (s, 1H, NH), 12,1 (s, 1H, NH), ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6): δ = 45,74 (CH₂), 110,0 (CH₂), 115-131 (C=C aromáticos), 135,5 (CH), 140,3 (C-N indol), 144,0 (CH=N), 149,2 (C=N indol), 176,4 (C=S) ppm IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 1529 (C=N), 1550 (C=S), 3080 (NH), 3128 (NH), 3169 (NH) cm^{-1} HRMS m/z $[M+H]^+$ calculada por C₁₂H₁₃N₅S: 259,0892; obtido: 260,0925.

5.1.20 *N*-alil-2-((7-metil-1*H*-indol-3-il)metileno)hidrazinecarbotioamida (LQIT/LT-89)



Composto 20 obtido na forma sólida de cor branca (100 mg 49,31%): R_f = 0.53 (*n*-Hex/AcOEt 4:6); mp: 265 -266°C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ = 5,12(d, 2H, CH₂), 5,17 (t, 1H, CH₃), 5,2 (d, 2H, indol), 5,25(d, 2H, indol), 6,0 (m, 1H, indol), 7,0 (m, 2H, indol), 7,8 (s, 1H, CH), 8,0(d, 2H, CH₂), 8,3(s, 1H, CH=N), 11,2 (s, 1H, NH), 11,6 (s, 1H, NH) ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6): δ = 46,1 (CH₃), 121,0 (CH₂), 115-131 (C=C aromáticos), 135,5 (CH), 140,3 (C-N indol), 144,0 (CH=N), 149,2 (C=N indol), 176,4 (C=S) ppm IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 1544 (C=N), 1606 (C=S), 3129 (NH), 3133 (NH), 3317 (NH) cm^{-1} HRMS m/z $[M+H]^+$ calculada por C₁₄H₁₆N₄S: 272,1096; obtido: 273,1129.

5.2 ESTUDO BIOLÓGICO *in vitro*

5.2.1 Ensaio de Citotoxicidade

Todos os novos compostos sintetizados indol-tiossemicarbazônicos foram avaliados *in vitro* quanto a sua citotoxicidade. O teste realizado em macrófagos J774 revelou que os compostos LQIT/LT-76, LQIT/LT-81 e LQIT/LT-87 apresentaram valores de concentração citotóxica capaz de causar a morte a 50% das células viáveis (CC₅₀) correspondes à 24,5; 21,8; e 18,7 μ M, respectivamente. Os dados mostram que esses derivados apresentam menor citotoxicidade que os controles dexametasona com 91,1 μ M e indometacina com valor >75 μ M. Os resultados de todos os compostos são apresentados na Tabela 1.

5.2.2 Ensaio de Linfoproliferação

O ensaio de linfoproliferação tem como princípio avaliar o potencial anti-inflamatório através da quantificação da inibição da proliferação dos linfoblastos, uma vez que estes são os precursores dos linfócitos, células presentes no sistema imune responsáveis por agir contra a invasão ou proliferação de qualquer agente biológico considerado estranho. Neste sentido os compostos que apresentaram valores de CC₅₀<1 como ocorreu em LT-76, LT-81 e LT-87 para valores de 0,56, 0,9 e 0,5 μ M, respectivamente, foram considerados como compostos promissores quanto ao seu potencial de ação anti-inflamatória. Os resultados de todos os compostos são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Citotoxicidade em macrófagos J774, inibição da proliferação de linfoblastos.

Compostos	Macrófagos J774, CC ₅₀ ± E.P.M. (µM)	Linfoproliferação CC ₅₀ ± E.P.M. (µM)
LQIT/LT-70	64.7±5.1	4.3±0.5
LQIT/LT-71	37.9±0.9	2.0±0.060
LQIT/LT-72	34.9±1.9	N.D.
LQIT/LT-73	79.4±3.0	4.6±0.58
LQIT/LT-74	32.9±2.5	1.9±0.1
LQIT/LT-75	>75	1.0±0.36
LQIT/LT-76	24.5±1.3	0.56±0.036
LQIT/LT-77	>75	9.3±0.9
LQIT/LT78	7.0±0.6	5.3±0.052
LQIT/LT-79	30.0±2.6	3.5±0.07
LQIT/LT-80	>75	1.1±0.042
LQIT/LT-81	21.8±1.8	0.9±0.01
LQIT/LT-82	>75	10.3±1.13
LQIT/LT-83	> 75	4.9±0.58
LQIT/LT-84	38.7±3.9	2.3±0.21
LQIT/LT-85	>75	8.9±1.02
LQIT/LT-86	> 75	> 12
LQIT/LT-87	18.7±5.0	0.5±0.07
LQIT/LT-88	>75	> 12
LQIT/LT-89	60±4.3	> 12
Indometacina	>75	>12
DEXA	91.1±1.9	0.012±0.005
GV	3.8±0.2	-

Valores calculados em triplicatas em experimentos independentes. CC₅₀ = concentração citotóxica a 50 %. IC₅₀ = concentração inibitória a 50 %. E.P.M = erro padrão da média. DEXA = Dexametasona. GV = violeta de genciana.

5.2.3 Dosagem de nitrito (óxido nítrico)

A dosagem de nitrito foi utilizada para medir a ação anti-inflamatória dos derivados indol-tiossemicarbazônicos sintetizados. Na tabela 2 estão os valores da atividade inibitória do óxido nítrico expressos em μM .

Tabela 2: Atividade inibitória do óxido nítrico

Composto	LQIT/LT-76	LQIT/LT-81	LQIT/LT-87	INDO	DEXA
Inibição do óxido nítrico					
CI₅₀	9.0±0.43	8.7±0.21	21.0±1.02	16.7±0.67	6.25±0.14
±E.P.M.					
(μM)					

IC₅₀ = concentração inibitória a 50 %. E.P.M = erro padrão da média. DEXA = Dexametasona. INDO = indometacina.

Os dados apresentados no Gráfico 1 evidenciam que as tiossemicarbazonas LT-76 e LT-81 são eficientes na redução de lipopolissacarídeos (LPS) induzida pela produção de óxido nítrico em níveis não citotóxicos na dose analisada (10 μM). Ambos os compostos apresentaram uma maior redução na concentração de NO quando comparados com a indometacina, e o LT-81 destaca-se por reduzir a expressão do LPS em valores ainda menores que a dexametasona. Já o LT-87 não apresentou significância durante o ensaio. Diante dos dados obtidos nos testes *in vitro* os compostos LT-76, LT-81 e LT-87 foram encaminhados para os ensaios biológicos *in vivo*.

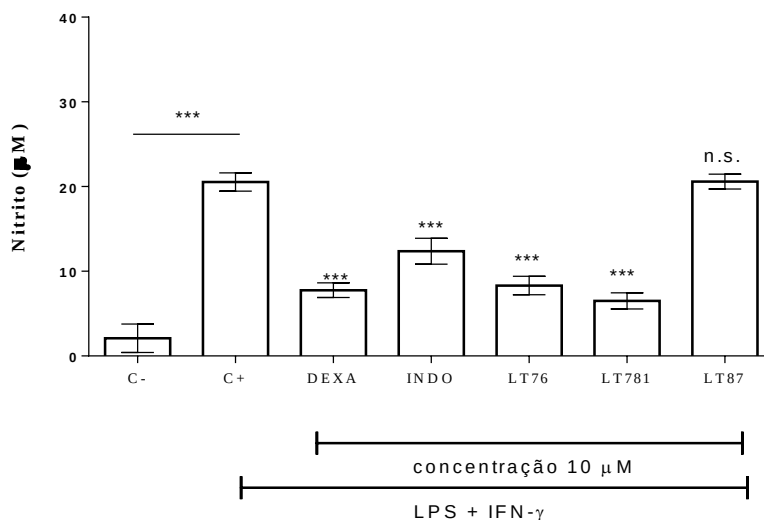
Gráfico 1: Dosagem de Nitrito

Gráfico 1. Produção de óxido nítrico por macrófagos J774 estimulados com LPS e $\text{INF-}\gamma$ e tratados com os compostos LQIT/LT-76, LQIT/LT-81 e Indometacina (INDO). A dexametasona (Dexa) foi utilizada como inibidor de referência. Determinado 24 h após tratamento pelo método de Griess. C- : não-estimuladas. C+: estimuladas e não-tratadas. (ANOVA one-way): *** $P < 0.001$. ** $P < 0.01$; * $P < 0.05$ em comparação com o C+.

5.2.4 Dosagem das Citocinas IL-6 e $\text{TNF-}\alpha$

As citocinas IL-6 e $\text{TNF-}\alpha$ foram dosadas a partir da secreção liberadas pelos macrófagos J774 após serem estimulados com LPS e $\text{INF-}\gamma$ e tratados com os compostos em estudo. Esses mediadores pleiotrópicos são produzidos durante a fase de ativação e fase efetora da imunidade a fim de regular a resposta inflamatória, sendo assim uma baixa concentração dessas citocinas nos macrófagos indicam uma eficiente atividade anti-inflamatória.

Os dados do Gráfico 2 mostram o comportamento do LQIT/LT-76, LQIT/LT-81 e LQIT/LT-87 na redução da concentração da IL-6. O LQIT/LT-81 e LQIT/LT-87 apresentaram uma significativa redução na concentração da IL-6, porém o LT-76 destaca-se por comportar-se de maneira similar ao inibidor de referência dexametasona e melhor do que a indometacina, fármaco semelhante estruturalmente aos compostos avaliados.

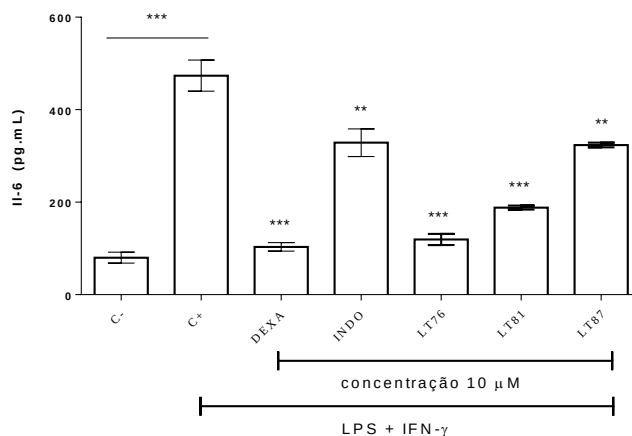
Gráfico 2: Dosagem de Citocinas

Gráfico 2. Secreção da interleucina-6 (IL6) por macrófagos J774 estimulados com LPS e INF- γ e tratados com os compostos LQIT/LT-76, LQIT/LT-81 e Indometacina (INDO). A dexametasona (Dexa) foi utilizada como inibidor de referência. Determinado 24 h após tratamento pelo método do ELISA. C- : não-estimuladas. C+: estimuladas e não-tratadas. (ANOVA one-way): *** $P < 0.001$. ** $P < 0.01$ em comparação com C+. * $P < 0.05$ em comparação com o C+.

Já na dosagem de TNF- α o LQIT/LT-81 foi o que melhor reduziu a concentração dessa citocina com valores expressos em 10 μ M (Tabela 3).

Tabela 3: Inibição da secreção de TNF-alfa liberados por macrófagos estimulados com LPS e tratados com os derivados indol-tiossemicarbazônicos.

Composto	LQIT/LT-76	LQIT/LT-81	LQIT/LT-87	INDO	DEXA
% Inibição					
do TNF- α (10 μ M)	10.1 $\pm$ 1.0	25.3 $\pm$ 1.2	21.4 $\pm$ 0.9	21.4 $\pm$ 3.1	55.8 $\pm$ 0.9

Os valores plotados no gráfico 3 mostram os valores de significância dos compostos ao inibir a secreção do TNF- α . Os macrófagos J774 foram estimulados com LPS e INF- γ e tratados com os compostos LQIT/LT-76, LQIT/LT-81, LQIT/LT-87 e Indometacina (INDO) e a dexametasona (DEXA) foram utilizada como inibidor de referência. Os três derivados indol-tiossemicarbazônicos reduziram a secreção do TNF- α , porém O LQIT/LT-81 e 87 se destacam por possuírem um perfil de inibição semelhante e/ou melhor que o da indometacina.

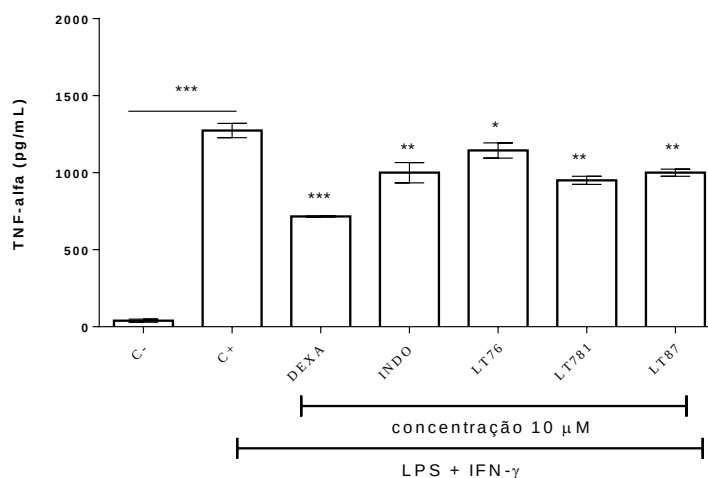
Gráfico 3: Dosagem de TNF- α 

Gráfico 3. Secreção do fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) por macrófagos J774 estimulados com LPS e INF- γ e tratados com os compostos LQIT/LT-76, LQIT/LT-81 e Indometacina (INDO). Análise estatística (ANOVA one-way): *** $P < 0.001$. ** $P < 0.01$ em comparação com C+. * $P < 0.05$ em comparação com o C+.

5.3 ESTUDOS BIOLÓGICO *in vivo*

5.3.1 Toxicidade Aguda Oral

Devido aos resultados promissores obtidos nos testes *in vitro* os compostos LT-76, LT-81 e LT-87 foram avaliados quanto a toxicidade aguda oral para escolher adequadamente as doses para executar os estudos anti-inflamatórios. A administração oral dos compostos não levou a efeitos tóxicos significativos na dose de 2000 mg /kg como preconizado pela OECD 2002. Na primeira hora após a administração dos compostos teste, foi observado irritabilidade e ptose. Durante o experimento não foi observado morte nem mudança nos parâmetros fisiológicos e hematológicos como observados na Tabela 4 e 5.

Tabela 4: Efeito dos compostos indólico-tiossemicarbazônicos sobre os parâmetros hematológicos.

Parâmetros	Controle	LQIT/LT-76	LQIT/LT-81	LQIT/LT-87
Hemácias ($10^6/\text{mm}^3$)	8,46 $\pm$ 0,19	8,6 $\pm$ 0,79	8,91 $\pm$ 0,15	8,72 $\pm$ 0,71
Hemoglobina (g/dL)	12,3 $\pm$ 0,29	12,7 $\pm$ 1,22	11,6 $\pm$ 0,56	12,9 $\pm$ 1,02
Hematócrito (%)	44,4 $\pm$ 0,94	48,3 $\pm$ 3,00	43,7 $\pm$ 1,43	46,1 $\pm$ 3,53
VCM (μg)	52,3 $\pm$ 1,2	53,8 $\pm$ 1,47	49,1 $\pm$ 1,60	52,6 $\pm$ 0,51
HCM (pg)	14,6 $\pm$ 0,35	14,7 $\pm$ 0,65	13,0 $\pm$ 0,60	14,2 $\pm$ 0,54
CHCM (%)	27,8 $\pm$ 0,43	27,1 $\pm$ 1,04	26,56 $\pm$ 0,46	27,0 $\pm$ 0,90
Leucócitos ($10^3/\text{mm}^3$)	4,37 $\pm$ 0,90	3,6 $\pm$ 1,45	3,04 $\pm$ 0,91	3,98 $\pm$ 0,88

Valores expressos em média $\pm$ D.P. (n=6). *p < 0,05; **p < 0,01 vs controle. ANOVA, teste de Bonferroni. HCM - Hemoglobina corpuscular média; CHCM - Concentração da hemoglobina corpuscular; VCM - Volume corpuscular médio.

Tabela 5: Efeito dos compostos indólicos-tiossemicarbazônicos sobre parâmetros fisiológicos e índice de órgãos.

Grupo	Índice (mg/Kg)			Consumo		Peso Corporal (g)	
	Fígado	Baço	Rim	Ração (g)	Água (mL)	Inicial	Final
Controle	52,8 ± 6,76	6,08 ± 1,36	11,08 ± 1,13	30,0 ± 13,6	42,7 ± 15,9	35,0 ± 2,88	38,5 ± 2,80
LQIT/LT-76	57,7 ± 6,87	5,85 ± 1,86	14,06 ± 1,67	18,7 ± 4,35	38,7 ± 15,88	32,7 ± 4,03	34,6 ± 1,33
LQIT/LT-81	58,13 ± 8,87	5,29 ± 1,18	12,3 ± 1,64	32,7 ± 9,31	42,3 ± 8,79	30,08 ± 3,30	29,9 ± 3,43
LQIT/LT-87	51,5 ± 9,38	6,09 ± 1,98	12,8 ± 2,48	19,8 ± 5,65	30,0 ± 9,67	26,2 ± 2,03	31,0 ± 3,43

Valores expressos em média ± DP. (N = 6). *p < 0,05 vs controle. ANOVA, teste de Bonferroni. Índice dos órgãos = peso do órgão (mg) / peso corporal final.

A fim de estabelecer uma relação dose-resposta os compostos foram avaliados pelo modelo do edema de pata induzido por carragenina em camundongos nas doses de 10, 30 e 50 mg/kg.

5.3.2 Edema de Pata induzido por carragenina

A inflamação aguda por injeção subplantar em roedores pode ser realizada por vários agentes flogísticos. O modelo do edema de pata induzido por carragenina é bastante útil para a avaliação de substâncias anti-inflamatórias esteroides e não-esteróides, pois a carragenina é um mucopolissacarídeo capaz de produzir um edema no máximo em 3 horas facilitando o estudo de substâncias (LEME et al., 1973 e BRYANT et al., 1995).

A carragenina é responsável pela ativação da via da cicloxigenase e é sensível aos glicocorticóides e antagonistas de síntese de prostaglandinas. A fase inicial da resposta de carragenina é devida à liberação de serotonina (5-HT) e histamina (DiROSA et al., 1971), além de outros mediadores como: as cininas, $TNF\alpha$, $IL-1\beta$, $IL-2$ e $IFN\gamma$ que ocorre na primeira fase no período de 0 - 2 horas. A liberação dessas substâncias no início da inflamação é importante pois elas são responsáveis por promover alteração do tônus vascular e da permeabilidade, que contribuem para o extravasamento de líquidos (SCOGNAMILLO-SZABÓ, BECHARA; CUNHA, 2005, ROCHA et al., 2007). Já a segunda fase da resposta inflamatória aguda caracteriza-se pela liberação de NO, PGs e LT, produtos da ação da COX, onde ocorre a infiltração de leucócitos polimorfonucleares, ocorrendo entre a 3 - 6 horas.

A medição da variação no volume do edema de pata é uma boa indicação da atividade anti-inflamatória, sendo assim os resultados foram expressos como a diferença entre o volume final da pata a cada tempo (V_f) e o volume inicial (V_i). Todos os grupos tratados com os compostos em estudos apresentaram significância na redução do edema nas doses de 30mg/Kg e 50mg/Kg administradas. Dentre os compostos estudados, o LQIT/LT-81 foi capaz de impedir a progressão do edema de pata em todas as doses ao longo de todo o experimento. Apresentando a melhor ação anti-inflamatória com significância da primeira à sexta hora. As percentagens de inibição do edema de pata dos compostos testados estão dispostas nas Tabelas 6,7 e 8.

Tabela 6: Percentual de crescimento do volume da pata (%) do composto LQIT/LT76 comparado com o controle negativo (média $\pm$ erro padrão).

Horas	Salina 0,9%	Indometacina 10mg/Kg	LQIT/LT-76 10mg/Kg	LQIT/LT-76 30mg/Kg	LQIT/LT-76 50mg/Kg
1	37,6 $\pm$ 7,7	13,6 $\pm$ 4,3	31,16 $\pm$ 2,4	33,4 $\pm$ 1,6	21,1 $\pm$ 6,0
2	41,5 $\pm$ 11,5	12,4 $\pm$ 3,9	28,45 $\pm$ 8,5	54,8 $\pm$ 4,3	24,2 $\pm$ 6,4
3	52,2 $\pm$ 10,2	12,4 $\pm$ 3,9	36,12 $\pm$ 12,4	38,2 $\pm$ 6,0	31,9 $\pm$ 4,7
4	65,5 $\pm$ 6,11	21,0 $\pm$ 4,8	75,5 $\pm$ 2,7	34,4 $\pm$ 5,1**	35,7 $\pm$ 4,6**
5	66,5 $\pm$ 6,70	10,1 $\pm$ 3,1	39,5 $\pm$ 15,1*	28,2 $\pm$ 4,6**	31,0 $\pm$ 6,1***
6	75,9 $\pm$ 8,96	6,3 $\pm$ 2,5	64,8 $\pm$ 6,4	35,2 $\pm$ 5,8***	26,7 $\pm$ 5,9***

Os dados foram expressos como a média $\pm$ EP de 5 animais por grupo. Os resultados foram considerados significativos quando * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001 e p < 0,0001 (em comparação com o grupo de controle negativo), determinado por análise de variância (ANOVA) seguido pelos testes de Bonferroni.

Tabela 7: Percentual de crescimento do volume da pata (%) do composto LQIT/LT-81 comparado com o controle negativo (média $\pm$ erro padrão).

Horas	Salina 0,9%	Indometacina 10mg/Kg	LQIT/LT-81 10mg/Kg	LQIT/LT-81 30mg/Kg	LQIT/LT-81 50mg/Kg
1	37,6 $\pm$ 7,7	13,6 $\pm$ 4,3	15,5 $\pm$ 2,7*	8,1 $\pm$ 3,0**	18,8 $\pm$ 4,1***
2	41,5 $\pm$ 11,5	12,4 $\pm$ 3,9	12,3 $\pm$ 2,6***	9,5 $\pm$ 3,2****	17,6 $\pm$ 5,0**
3	52,2 $\pm$ 10,2	12,4 $\pm$ 3,9	23,5 $\pm$ 6,3***	8,2 $\pm$ 3,0****	25,5 $\pm$ 5,0**
4	65,5 $\pm$ 6,11	21,0 $\pm$ 4,8	24,8 $\pm$ 2,9****	15,6 $\pm$ 3,7****	27,5 $\pm$ 6,2****
5	66,5 $\pm$ 6,70	10,1 $\pm$ 3,1	12,6 $\pm$ 3,4****	8,3 $\pm$ 2,6****	15,4 $\pm$ 5,1****
6	75,9 $\pm$ 8,96	6,3 $\pm$ 2,5	14,0 $\pm$ 3,4****	8,3 $\pm$ 2,6****	15,4 $\pm$ 5,1****

Os dados foram expressos como a média $\pm$ EP de 5 animais por grupo. Os resultados foram considerados significativos quando * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001 e p < 0,0001 (em comparação com o grupo de controle negativo), determinado por análise de variância (ANOVA) seguido pelos testes de Bonferroni.

Tabela 8: Percentual de crescimento do volume da pata (%) do composto LQIT/LT-87 comparado com o controle negativo (média $\pm$ erro padrão).

Horas	Salina 0,9%	Indometacina 10mg/Kg	LQIT/LT-87 10mg/Kg	LQIT/LT-87 30mg/Kg	LQIT/LT-87 50mg/Kg
1	25,59 $\pm$ 7,45	15,8 $\pm$ 4,32	31,68 $\pm$ 4,82	6,28 $\pm$ 1,21***	18,01 $\pm$ 2,39
2	28,78 $\pm$ 4,24	11,9 $\pm$ 3,1	29,51 $\pm$ 4,56	6,23 $\pm$ 1,94***	16,01 $\pm$ 4,88
3	22,50 $\pm$ 4,45	12,1 $\pm$ 3,1	31,02 $\pm$ 2,98	7,57 $\pm$ 2,90*	9,21 $\pm$ 3,89
4	24,17 $\pm$ 4,45	21,3 $\pm$ 3,3	24,30 $\pm$ 5,45	2,55 $\pm$ 1,47***	4,22 $\pm$ 2,59**
5	6,70 $\pm$ 3,09	9,2 $\pm$ 2,3	10,88 $\pm$ 4,47	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
6	3,51 $\pm$ 1,45	6,4 $\pm$ 2,3	7,78 $\pm$ 3,78	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00

Os dados foram expressos como a média $\pm$ EP de 5 animais por grupo. Os resultados foram considerados significativos quando * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001 e p < 0,0001 (em comparação com o grupo de controle negativo), determinado por análise de variância (ANOVA) seguido pelos testes de Bonferroni.

Os derivados indol-tiossemicarbazônicos avaliados para a atividade anti-inflamatória possuem uma similaridade estrutural ao padrão utilizado, indometacina. É comprovado que a porção indólica é essencial para a atividade anti-inflamatória (BARREIRO e FRAGA, 2008).

As modificações no esqueleto da molécula provocaram uma variação nos efeitos eletrônicos e no volume dos substituintes que significativas alterações na atividade biológica.

Em todas as horas os grupos tratados com o composto LQIT/LT-81 na dose de 10mg/Kg e indometacina a 10 mg/ kg promoveram uma redução no volume da pata em relação ao grupo controle negativo. Estatisticamente o LQIT/LT-81 comportou-se de maneira similar ao grupo controle positivo inibindo o crescimento do tumor em até 70,20%, enquanto que a indometacina inibe em 70,08% durante a fase vascular do processo inflamatório (0 - 2,5 horas). Durante a fase celular (3 - 6 horas) o LQIT/LT-81 apresentou valores de percentagem de inibição variando de 54,91 - 81,47% enquanto que a indometacina 76,22 - 91,59%.

Essa similaridade de efeito também foi observada nas doses de 30 e 50mg/kg do composto LQIT/LT-81, tendo seus picos máximos de inibição durante a fase celular com valores de 81,47 e 88,96%, respectivamente (Tabela 9). Esses resultados evidenciam a efetividade do composto LQIT/ LT-81 em controlar a progressão da inflamação tanto pela via das aminas vasoativas, quanto pela via das ciclooxigenase.

Tabela 9: Percentual de inibição do processo inflamatório (%).

Horas	Indometacina	LQIT/LT-81 10mg/Kg	LQIT/LT-81 30mg/Kg	LQIT/LT-81 50mg/Kg
1	63,86%	58,68%	78,30%	49,84%
2	70,08%	70,20%	77,00%	57,49%
3	76,22%	54,91%	84,18%	51,11%
4	67,81%	62,12%	76,10%	58,01%
5	84,70%	80,93%	87,40%	76,77%
6	91,59%	81,47%	88,96%	79,65%

Considerações Finais

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- ✚ Os novos compostos da série 3-indol-tiossemicarbazonas foram sintetizados com êxito através de uma rota sintética que se mostrou adequada para a obtenção dos compostos de maneira rápida e com rendimentos satisfatórios.
- ✚ Nos ensaios *in vitro* de citotoxicidade em macrófagos J774 os compostos LQIT/LT-76, LQIT/LT-81 e LQIT/LT-87 apresentaram valores de citotoxicidade menores que os fármacos padrões dexametasona e indometacina.
- ✚ No ensaio de linfoproliferação os compostos LQIT/LT-76, LQIT/LT-81 e LQIT/LT-87 se destacaram por inibir a proliferação dos linfoblastos no local da lesão, revelando a eficiência desses compostos em sua ação anti-inflamatória.
- ✚ Os compostos LQIT/LT-76, LQIT/LT-81 e LQIT/87 foram capazes de reduzir significativamente a concentração de IL-6 em macrófagos J774. O composto LQIT/LT-76 destacou-se por sua similaridade de inibição frente à dexametasona e sua melhor ação em relação à indometacina.
- ✚ Na dosagem de TNF- α os compostos LQIT/LT-76, LQIT/LT-81 e LQIT/87 foram capazes de reduzir a concentração dessa citocina em macrófagos J774.
- ✚ Os compostos LQIT/LT-76, LQIT/LT-81 e LQIT/87 não apresentam efeitos tóxicos significativos *in vivo*.
- ✚ No ensaio de edema de pata induzido por carragenina, foi possível observar que os compostos LQIT/LT-76, LQIT/LT-81 e LQIT/LT-87 foram capazes de reduzir de maneira similar ao medicamento padrão, indometacina, o volume da pata em todas as horas de avaliação do experimento. Essa efetividade revela a ação desses fármacos sobre os mediadores inflamatórios.

7 PERSPECTIVAS

- ✚ Realizar estudos histológicos sob os edemas de pata marcados com IL-1 β , afim de quantificar tal citocina no tecido inflamado.
- ✚ Realizar Teste *in vitro* com a COX-2 para avaliar a inibição da conversão do ácido araquidônico em PGE2 e assim tentar propor um mecanismo de ação para essa classe de compostos na inflamação.
- ✚ Realizar Teste *in vitro* com a 5-LOX para avaliar a inibição da conversão do ácido araquidônico em LT e assim tentar propor um mecanismo de ação para essa classe de compostos na inflamação.
- ✚ Realizar a síntese de 20 novos compostos a partir das tiosemicarbazonas já sintetizadas, utilizando dietil-acetileno-dicarboxilato a fim de originar 4-tiazolidinonas.
- ✚ Caracterizar através das análises espectroscópicas usuais (RMN 1H, RMN 13C, IV, massas) os novos compostos que serão obtidos;
- ✚ Avaliar a atividade anti-inflamatória dos 20 novos compostos que serão sintetizados utilizando as mesmas metodologias para verificar se a mudança estrutural proposta provocará aumento ou diminuição da atividade biológica.

Referências

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; **Cellular and Molecular Immunology**. 6th ed. Saunders 2003.
- ABDELBASSET, A.; FARAHAT, A.A.; ISMAIL, M.A.; KUMAR, A.; WENZLER, T.; MOHAMED, A.; Indole and Benzimidazole Bichalcophenes: Synthesis, DNA Binding and Antiparasitic Activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v.143, p.1590-1596, 2018.
- ADAM, J.M.; CAIRNS, J.; CAULFIELD, W.; COWLEY, P. Design, synthesis, and structure–activity relationships of indole-3- carboxamides as novel water soluble cannabinoid CB1 receptor agonists. **Med. Chem. Commun.** v.1, p. 54–60, 2010.
- ALEGAON, S.G.; HIRPARA, M.B.; ALAGAWADI, K.R.; HULLATTI, K.K.; KASHNIYAL, K. Synthesis of novel pyrazole–thiadiazole hybrid as potential potente and selective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. v.24, p.5324–5329, 2014.
- AL-HOURANI, B.J.; SHARMA, S.K.; MANE, J.Y.; TUSZYNSKI, J. Synthesis and evaluation of 1,5-diaryl-substituted tetrazoles as novel selective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. v.21, p.1823–1826, 2011.
- ANTI, S.M.A.; GIORGI, R.D.N.; CHAHADE, W.H. Anti-inflamatórios hormonais: glicocorticóides. **Einstein**. v.6, n.1, p.159-165, 2008.
- AQUINO, T.M.; LIESEN, A.P; SILVA, R.E.A.; LIMA, T.V.; CARVALHO, C.S.; FARIA, A.R.; ARAÚJO, J.M.; LIMA, J.G.; ALVES, A.J.; MELO, E.J.T.; GÓES, A.J.S.. Synthesis, anti-Toxoplasma gondii and antimicrobial activities of benzaldehyde 4-phenyl-3-thiosemicarbazones and 2-[(phenylmethylene)hydrazono]-4-oxo-3-phenyl-5 thiazolidineacetic acids. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v.16, p.446–456, 2008.
- AYALA, A.R. Antagonistas do hormônio liberador da corticotrofina: atualização e perspectivas. **Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia**. v.46, n.6, 2002.

AL-HOURANI, B.J.; SHARMA, S.K.; MANE, J.Y.; TUSZYNSKI, J. Synthesis and evaluation of 1,5-diaryl-substituted tetrazoles as novel selective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors.

Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. v.21, p.1823–1826, 2011.

BARREDA, A.; JUAN, A.; MORE, B.; ANBU, K.; KARUPPANNAN, MICHAEL, J.; Application of imaging flow cytometry for characterization of acute inflammation in non-classical animal model systems. **Methods.** v.112, p.167–174, 2017.

BARREIRO, E.J., FRAGA, C.A.M. **Química Medicinal: As Bases Moleculares da Ação dos Fármacos.** Artmed: Porto Alegre, 2008.

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 anti-trombóticos. **Química Nova.** v.25, n.1, p.129-148, 2002.

BARROS, C.D.; AMATO, A.A.; OLIVEIRA, T.B.; IANNINI, K.B.R.; SILVA, A.L.; SILVA, T.G.; LEITE, E.S.; HERNANDES, M.Z.; LIMA, M.C.A.; GALDINO, S.L.; NEVES, F.A.R.; PITTA, I.R. Synthesis and anti-inflammatory activity of new arylidene thiazolidine-2,4- dione as PPAR ligands. **Bioorg. Med. Chem.** v.18, p.3805-3811, 2010.

BAVARESCO, L.; BERNARDI, A.; BATTASTINI, A.M.O. Glicocorticóides: usos clássicos e emprego no tratamento do câncer. **Infarma,** v.17, n.7, 2003.

BECKFORD, F.A.; THESSING, J.; SHALOSKI JR., M.;P. CANISIUS MBARUSHIMANA, C. Synthesis and characterization of mixed-ligand diiminepiperonal thiosemicarbazone complexes of ruthenium(II): Biophysical investigations and biological evaluation as anticancer and antibacterial agentes. **J Mol Struct.** v. 992(1-3): p.39–47, 2011.

BLATOUNI, M. Anti-inflamatórios não esteroides: efeitos cardiovasculares, cerebrovasculares e renais. **Sociedade Brasileira de Cardiologia.** v.94, p.556-563, 2009.

BRYANT, H.U.; COLE, H.W.; BROWN, C.E.; MAGEE, D.E.; MAGEE, C.; ROUDEBUSH, R.E.; Serotonin-induced paw edema in the rat: pharmacological profile. **General Pharmacology.** v.26, n.2, p.431-436, 1995.

CALIXTO, J.B, MEDEIROS R, FERNANDES, E.S.; FERREIRA, J.; CABRINI DA, C.M.M. Kinin B1 receptors: key G-protein-coupled receptors and their role in inflammatory and painful processes. **Br J Pharmacol.** v.18, p.143, 2004.

CARVALHO, W.A. Anti-inflamatórios não esteroides, analgésicos, antipiréticos e drogas utilizadas no tratamento da gota. In: SILVA, Penildo. Farmacologia. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010. Cap. 45, p. 439-466.

CARVALHO, W.A.; CARVALHO, R.D.S.; RIOS-SANTOS, F. Analgésicos inibidores específicos da ciclooxigenase-2: avanços terapêuticos. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v.54, p.448-464, 2004.

CHADA, N.; SILAKARI, O. Indoles as therapeutics of interest in medicinal chemistry: Bird's eye view. **European Journal of Medicinal Chemistry.** v.134, p.159-184, 2017.

CHEN, Q., RAO, P.N.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 & Medicinal Chemistry.** v.14, n.23, p:7898–7909, 2006.

CHOPPARA, P.; PRASAD, Y.V.; RAO, C.V.; HARI KRISHNA, K.; Design, synthesis of novel N prenylated indole-3- carbazones and evaluation of in vitro cytotoxicity and 5-LOX inhibition activities. **Arabian Journal of Chemistry.** p.1878-5352, 2015.

CHIU, Y.; HUANG, T.; CHIU, C.; LU, T.; CHEN, Y.; PENG, W.; CHEN, C. Analgesic and Antiinflammatory Activities of the Aqueous Extract from *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. Both In Vitro and In Vivo. **Evidenc-Based Complementary Alternative Medicine.** p.1-11. 2011.

CHENG, S.; JIANGA, S.; SICHEN, X.; Lianqinjiedu decoction attenuates LPS-induced inflammation and acute lung injury in rats via TLR4/NF- κ B pathway. **Biomedicine & Pharmacotherapy.** v.96, p.148–152, 2017.

CLARK, M.A.; FINKEL, R.; REY, J.A.; WHALEN, K.. Farmacologia Ilustrada. 5ª edição, Porto Alegre. Artmed, 2013.

COTA, A. M.; MIDWINTER, M. J. The immune system. Anaesthesia and intensive care medicine 16:7, **Elsevier Ltd. All rights reserved**, 2015.

CUNHA, T.; VERRI, W.A.; SILVA, J.S.; POOLE, S.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v.102, n.5, p.1755-60, 2005.

DE BOSSCHER, K.; BECK, I. M.; HAEGEMAN, G. Classic glucocorticoids versus non-steroidal glucocorticoid receptor modulators: Survival of the fittest regulator of the immune system? **Brain, Behavior, and Immunity**. v.24, n.7, p.1035-1042, 2010.

DELVES, P. J., ROITT, D. The Immune System – First of two parts. **N Engl J Med**. v.343, p.37-50, 2000.

DEVLIN, T.M. Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations, 7ed. Wiley-Liss, 6ª edição. ISBN 978-0470281734.

DI ROSA, M.; GIROUD, J.P.; WILLOUGHBY, D.A. Studies of the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. **Journal of Pathology**, v.104, p.15–29, 1971.

DU, X.; DOYLE, P.S.; CAFFREY, C.R.; HOLLER, T P.; MCKERROW, J.H.; COHEN, F.E. Synthesis and structure-activity Relationship Study of potent Trypanocidal Thio semicarbazone inhibitors of the Trypanosomal Cysteine protease Cruzain. **J. Med. Chem**. v.45, p.2695–2707, 2002.

DYKE, T.E.V.; FREIRE, M.O.; Natural resolution of inflammation. **Periodontology 2000**. v.63, p.149–164, 2013.

FELDMAN, M.; MCMAHON, A.T.; Do cyclooxygenase-2 inhibitors provide benefits similar to those of traditional nonsteroidal anti-inflammatory drugs, with less gastrointestinal toxicity? **Ann Intern Med**. v.43, 132-134, 2000.

FLOWER, R.J. The development of cox2 inhibitors. **Nature reviews drug discovery**. Londres. v.2, p:179-191. 2003.

GILMAN, A.G.; GOODMAN, L.S.; RALL, T.W.; MURAD, F. Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. 11a ed. Rio de Janeiro: Grow-Hill, 2006.

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.

HAEGEMAN, G; DE BOSSCHER, K.; ELEWAUT, D. Targeting inflammation using selective glucocorticoid receptor. **Current Opinion in Pharmacology**. v.10, n.4, p.497-504, 2010.

HELAL, M.H.M.; SALEM, M.A.; EL-GABY, M.S.A.; ALJAHDAI, M. Synthesis and biological evaluation of some novel thiazole compounds as potential anti-inflammatory agentes. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v.65, p.517-526, 2013.

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

HOFSTRA, C.L; DESAI, P.J; THURMOND, R.L; FUNG-LEUNG, W.P. Histamine H4 receptor mediates chemotaxis and calcium mobilization of mast cells. **J Pharmacol Exp Ther**. v.305, p.1212-21, 2003.

JACHAK, S. M.; SOBHIA, M. E.; BAIRWA, K.; SINGH, V.; Synthesis, biological evaluation, molecular docking and theoretical evaluation of ADMET properties of nepodin and chrysophanol derivatives as potential cyclooxygenase (COX-1, COX-2) inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v.80, p.47-56, 2014.

JACHAK, S. M.; JAGDEEP GROVER, J.; KUMAR, V.; SOBHIA, M.E.; Synthesis, biological evaluation and docking analysis of 3-methyl-1-phenylchromeno[4,3-c]pyrazol-4(1H)-ones as potential cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. v.24, p.4638–464, 2014.

JANEWAY, J. R.; CHARLES, A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M. Immunobiologia. 7. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

JÚNIOR, D. M.; CRUVINEL, W.M.; ARAÚJO, J. A. P.; CATELAN, T. T. T.; SOUZA, A. W. S.; SILVA, N. P.; LUIS, E. C. A. Sistema Imunitário – Parte I Fundamentos da imunidade inata

com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. Artigo de Revisão. **Rev Bras Reumatol.** v.50, p.434, 2010.

KAJI, N.; HORIGUCHI, K.; IINO, S.; NAKAYAMA, S.; OHWADA, T. Nitric oxide-induced oxidative stress impairs pacemaker function of murine interstitial cells of Cajal during inflammation. **Pharmacological Research.** v.111, p.838–848, 2016.

KALINOWSKI, D.S.; YU; SHARPE, P.C.; ISLAM, M.; YI-T.L.; LOVEJOY, D. B.; KUMAR, N.; BERNHARDT, P.V.; R. RICHARDSON, D. R. Design, Synthesis, and Characterization of Novel Iron Chelators: Structure–Activity Relationships of the 2-Benzoylpyridine Thiosemicarbazone Series and Their 3-Nitrobenzoyl Analogues as Potent Antitumor Agents. **J. Med. Chem.** v.50, p.3716–3729, 2007.

KARPOORMATH, R.; RANE, R. A.; SHAIKH, M. S.; VEERAPUR, V. P.; BOREDDY, T. S.; Synthesis, pharmacological screening and in silico studies of new class of Diclofenac analogues as a promising anti-inflammatory agentes. **Bioorganic & Medicinal Chemistry.** v.22, p.2855–2866, 2014.

KAUR, K.; KUMAR, V.; GUPTA, G.K. Trifluoromethylpyrazoles as anti-inflammatory and antibacterial agents: A review; **Journal of Fluorine Chemistry.** v.178, p.306–326, 2015.

KAY, A.B. Allergy and allergic diseases. First of two parts. **The New England Journal of Medicine.** v.344, n.1, p.30-37, 2001.

KILBOURN, R. G.; GRIFFITH, O. W.; Overproduction of nitric oxide in cytokine-mediated and septic shock, *J. Natl. Cancer Inst.* v.84, p.827–831, 1992.

KING, M.W.; MESCHER, A.L.; NEFF, A.W.; Inflammation and immunity in organ regeneration. **Developmental and Comparative Immunology.** v.66, p.98-110, 2017.

KLAUMANN, P. R.; WOUK, A. F. P. F.; SILLAS, T. Patologia da dor. **Archives of Veterinary Science,** v.13, n.1, p.1-12, 2008.

KLEINERT, H.; SCHWARZ, P.M., FORSTERMANN, U. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase, **Biol. Chem.** v.384, p.1343–1364, 2003.

KONSMAN, J. P.; PARNET, P.; DANTZER, R. Cytokine-induced sickness behaviour:

Mechanisms and implications. **Trends in Neurosciences**. v.25, p.154–159, 2002.

KOWALSKI, M.L.; STEVENSON, D.D. Classification of Reactions to Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs. **Immunol Allergy Clinics of North America**. v.33, p.135–145, 2013.

KUMMER, C.L.; COELHO, T.C.R.B. Antiinflamatórios Não Esteróides Inibidores da Ciclooxigenase-2 (COX-2): Aspectos Atuais. **Revista Brasileira de Anestesiologia**. v.52, n.4, p.498–512, 2002.

LARBI, A.; XU, W. Immunity and Inflammation: From Jekyll to Hyde. **Experimental Gerontology**. p.0531-5565, 2017.

LAVICH, T.R.; CORDEIRO, R.S.; CALIXTO, J.B.; SILVA, P.M.; MARTINS, M.A. Combined action of vasoactive amines and bradykinin mediates allergen-evoked thermal hyperalgesia in rats. **European Journal of Pharmacology**. v.462, n.1-3, p.185-192, 2003.

LEES, P.; LANDONI, M.F.; GIRAUDÉL, J.; TOUTAIN, P.L. Pharmacodynamics and pharmacokinetics of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in species of veterinary interest. **J Veterinary of Pharmacology and Therapeutics**. v.27, p.479-490, 2004.

LINO, L.; CARVALHO, W.A. Mecanismos Celulares e Moleculares da Dor Inflamatória. Modulação Periférica e Avanços Terapêuticos. **Rev Bras Anesthesiol**. v.48, n.2, p.137–158, 1998.

LIU, Q., GAO, Z., ZHUD, X., WU, Z., LI, D., HE, H., HUANG, F., FAN, W. Changes in nitric oxide synthase isoforms in the trigeminal ganglion of rat following chronic tooth pulp inflammation. **Neuroscience Letters**. v.633, p.240–245, 2016.

MARTEL-PELLETIER, J.; LAJEUNESSE, D.; REBOUL, P.; PELLETIER, J. P. Therapeutic role of dual inhibitors of 5-lox and COX, selective and non non-selective non-steroidal anti-inflammatory drugs. **Annals of the Rheumatic Diseases**. v.62, p.501–509, 2003.

MEDZHITOV, R., JANEWAY C. Jr. Innate immunity. *N Engl J Med* 2000; 343:338-44.

MENG, X.; MA, Y.; BAO, Y.; WANG, S.; LI, T.; CHANG, X.; YANG, G.; Anti-Inflammation Effects and Potential Mechanism of Saikosaponins by Regulating Nicotinate and Nicotinamide Metabolism and Arachidonic Acid Metabolism. **Inflammation**. v.39, n.4, 2016.

MOIR, E.M.; YOSHIIZUMI, K.; CAIRNS, J.; COWLEY, P. Design, synthesis, and structure–activity relationship study of bicyclic piperazine analogs of indole-3-carboxamides as novel cannabinoid CB1 receptor agonists. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. v.20, p.7327–7330, 2010.

MONTEIRO, E.C.A.; TRINDADE, J.M.F.; DUARTE, A.L.B.P.; CHAHADE, W.H. Os antiinflamatórios não esteroidais (AINEs). **Temas de Reumatologia Clínica**. v.9; n.2, 2008.

MURI, E.M.F.; SPOSITO, M.M.M.; METSAVAHT, L. Antiinflamatórios não-esteroidais e sua farmacologia local Nonsteroidal antiinflammatory drugs and their local pharmacology. **ACTA FISIATR**. v.16, p.186 – 190, 2009.

MUTUKUMAR, V.A.; GEORGE, S.; VAIDHYALINGAM, V. Synthesis and Pharmacological Evaluation of 1-(1-((Substituted)methyl)-5-methyl-2-oxoindolin-3-ylidene)-4-(substitutedindolin-2-yl)thiosemicarbazide. **Biol Pharm. Bull**. v.31, p.1461-1464, 2008.

NIKHILA, G. N.; DALIMBA, U.; KUMSI, M.; Facile synthesis of indole-pyrimidine hybrids and evaluation of their anticancer and antimicrobial activity. **Journal of Saudi Chemical Society**. v.21, p.761–775, 2017.

NOREEN, T.; TAHA, M.; IMRAN, S.; CHIGURUPATI, S. Synthesis of alpha amylase inhibitors based on privileged indole scaffold. **Bioorganic Chemistry**. v.72, p.248–255, 2017.

OBREGON, M. J.; MENA, R. M.; GARCIA, B.; Arachidonic acid stimulates DNA synthesis in brown preadipocytes through the activation of protein kinase C and MAPK. **Biochimica et Biophysica Acta**. v.1821, p.1309–1315, 2012.

OKSUZ, E., ATALAR, F., VERDI, G.T., BILIR, A., SHAHZADI, A., YAZICI, Z.. Therapeutic potential of cyclooxygenase-3 inhibitors in the management of glioblastoma. **Journal of Neurooncology**. New York. n.126, p271–278, 2015.

OLIVEIRA, J.F.; NONATO, F.R.; ZAFRED, R.R.T.; LEITE, N.M.S. Evaluation of anti-inflammatory effect of derivative (E)-N-(4-bromophenyl)-2-(thiophen-2-ylmethylene)-thiosemicarbazone. **Biomedicine & Pharmacotherapy** v.80, p.388–392, 2016.

OLIVEIRA, J.F.; SILVA, A.L.; VENDRAMINI-COSTA, D.B.; AMORIM, C.A.C; CAMPOS, J.F.; RIBEIRO, A.G.; MOURA, R.O.; NEVES, J.L.; RUIZ, A.L.T.G.; CARVALHO, E.; LIMA, M.C.A.. Synthesis of thiophene-thiosemicarbazone derivatives and evaluation of their in vitro and in vivo antitumor activities. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v.104, p.148-156, 2015.

OLIVEIRA, T.B.; Tese de Doutorado. Síntese, determinação estrutural e avaliação biológica de novos derivados hidrazínicos e tiazolidinônicos tiofênicos. Universidade Federal de Pernambuco, 2013.

PANICO, R.; POWELL, W. H.; RICHER, J. C.; IUPAC – Nomenclature of organic compounds; Blackwell: London, 1993.

PARADA, C.A.; TAMBELI, C.H.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. The major role of peripheral release of histamine and 5-hydroxytryptamine in formalininduced nociception. **Neuroscience**. v.102, n.4, p.937-944, 2001.

PARSLOW, T. G. **Imunologia Médica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

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

REIS, S.L.G.B.; ALMEIDA, V.M.; ALMEIDA, G.C.; BOAVIAGEM, J.M.; MENDES, C.C. D.B.; FARIA, A.R.; GÓES, A.J.S.; MAGALHÃES, L.R.; SILVA, ROSA NETO, N.S.; DE CARVALHO, J.F. O uso de provas de atividade inflamatória em reumatologia. **Rev Bras Reumatol**. v.49, n.4, p.413-30, 2009.

ROCHA, A.P.C.; KRAYCHETE, D.C.; LEMONICA, L.; CARVALHO, L.R.; BARROS, G.A.M.; GARCIA, J.B.S. Dor: aspectos atuais da sensibilização periférica e central. **Revista Brasileira de Anestesiologia**. v.57, p.94-105, 2007.

SAHA, S.; RAJ, V.; SINGH, A.K.; Indole-fused azepines and analogues as anticancer lead molecules: Privileged findings and future directions. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v.142, p.244-265, 2017.

SASSON, S.; JUNIOR, C.S. - Biologia 1 Citologia Histologia - 5ª Edição - Atual Editora, São Paulo, 1989 - ISBN 85-7056-045-1.

SCOGNAMILLO-SZABÓ, M. V. R.; BECHARA, G. H.; CUNHA, F. Q. Efeito inibitório da acupuntura sobre a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de ratos. **Ars Veterinária**. v.21, n.1, p.91-95, 2005.

SERDA, M.; MALECKI, J.G.; MROZEK-WILCZKIEWICZ, A.; MUSIOL, R.; POLANSKI, J.. Microwave assisted synthesis, X-ray crystallography and DFT calculations of selected aromatic thiosemicarbazones. **Journal of Molecular Structure**. v.1037, p.63–72, 2013.

SERHAN, C. N.; CHIANG, N. Novel endogenous small molecules as the checkpoint controllers in inflammation and resolution: entrée for resolomics. **Rheumatic Disease Clinics of North America**. v.30, p. 69-95, 2004.

SINGH, A.; SUKHMEET, K.A.; ANURADHA, S.B.; GURCHARAN, K. B.; BHATTI, R.; TNF- α and IL-6 inhibitors: Conjugates of N-substituted indole and aminophenylmorpholin-3-one as anti-inflammatory agents Palwinder. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v.140, p.92-103, 2017.

SPAGGIARI, S.; CORUZZI, G.; VENTURI, N. Gastrointestinal safety of novel nonsteroidal antiinflammatory drugs: selective COX-2 inhibitors and beyond. **Acta Biomedica**. v.78, n.2, p. 96-110, 2007.

SPRENG. Both In Vitro and In Vivo. Evidenc-Based Complementary Alternative Medicine. p.1-11, 2011.

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, p.77- 94, 2005.

STANKOVIC, M.S.; TURUNTAS, V.; DE LUKA, S.R.; Effects of Il-33/St2 pathway on alteration of iron and hematological parameters in acute inflammation. **Experimental and Molecular Pathology**. v.99, p.687–692, 2015.

SUMIT BANSAL, S.; BALA, M.; SHARAD, K. S.; SHIVANI, C.; SHOUMYO, B.; VARUN, B.; JOSEPH, A. Design and synthesis of novel 2-phenyl-5-(1,3-diphenyl-1H-pyrazol-4-yl)-1,3,4-oxadiazoles as selective COX-2 inhibitors with potent antiinflammatory activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v.80, p.167-174, 2014.

SZABÓ, M.V.R.S.; BECHARA, C.H.; CUNHA, F.Q. Efeitos inibitório da acupuntura sobre a migração de leucócitos para a cavidade peritoneal de ratos. **ARS Veterinária**. v.21, n.1, p.91-95, 2005.

TENÓRIO, R.P.; GÓES, A.J.S.; DE LIMA, J.G.; DE FARIA, A.R. Tiossemicarbazonas: métodos de obtenção, aplicações sintéticas e importância biológica. **Química Nova**. v. 28, n.6, p.1030-1037, 2005.

TORRE-AMIONE G. Immune activation in chronic heart failure. **American Journal of Cardiology**. v.95, p. 3C-8C, 2005.

TORRES, R.C.; INSUELA, D.B.R.; CARVALHO, V.F. Mecanismos celulares e moleculares da ação antiinflamatória dos glicocorticoides. **Corpus et Scientia**. v.8, n.2, p.36-51, 2012.

TSELEPIS, A. D., CHAPMAN M. J. Inflammation, bioactive lipids and atherosclerosis: potential roles of a lipoprotein-associated phospholipase A2, platelet activating factor-acetylhydrolase. **Atheroscler Suppl**. v.3, p.57-68, 2002.

VANE, J.R.; BOTTING, R.M. Mechanism of action of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **J Med**. v.104, p. 2-8, 1998.

VANE, J.R.; BOTTING, R.M. The mechanism of action of aspirin. **Thrombosis Research**. v.110, p.255–258, 2003.

VIZONI, S.L.; LIEBER, S.R.; SOUZA, C.A.; SELL, A.M. Papel das citocinas na imunopatogênese da doença do enxerto contra o hospedeiro. **Revista brasileira de hematologia e hemoterapia**. p.142-152, 2008.

WALKER, P.S.; UDEY, M.C.; VOGEL, J.C. Immunostimulatory oligodeoxynucleotides promote protective immunity and provide systemic therapy for leishmaniasis via IL-12- and IFN- γ -dependent mechanisms. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v.96, p. 6970–6975, 1999.

WATKINS, L. R.; GOEHLER, L. E.; RELTON, J.; BREWER, M. T.; MAIER, S. F. ZHANG, C. The role of inflammatory cytokines in endothelial dysfunction. **Basic Research in Cardiology**. v.103, n.5, p.398-406, 2008.

ZAMPRONIO, A. R.; STEFANELLO, M. E. A.; VERDAN, M. H.; LEITE-AVALCA, M. C.G.; A Naphthoquinone from *Sinningia canescens* Inhibits Inflammation and Fever in Mice. **Inflammation**. v.40, n.3, 2017.

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