República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102019014503-0 A2

(22) Data do Depósito: 12/07/2019

(43) Data da Publicação Nacional: 19/01/2021

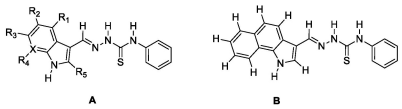
(54) Título: INIBIDORES DA COCLOOCIGENASE: DERIVADOS N-(2-INDOL-3-IL) METILENO-N-HIDRAZINA-CARBOTIAMIDAS ANTI-INFLAMATÓRIOS E ANALGÉSICOS

(51) Int. Cl.: C07D 209/14; C07D 209/60; C07D 401/00; A61K 31/404; A61K 31/4439; (...).

(71) Depositante(es): UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO.

(72) Inventor(es): MARIA DO CARMO ALVES DE LIMA; RICARDO OLÍMPIO DE MOURA; SINARA MÔNICA VITALINO DE ALMEIDA; JAMERSON FERREIRA DE OLIVEIRA; CRISTIANE MOUTINHO LAGOS DE MELO; CEZAR AUGUSTO DA CRUZ AMORIM; IRIS TRINDADE TENÓRIO JACOB; IRANILDO JOSÉ DA CRUZ FILHO.

(57) Resumo: INIBIDORES DA COCLOOCIGENASE: DERIVADOS N-(2-INDOL-3-IL) METILENO-N-HIDRAZINA-CARBOTIAMIDAS ANTI INFLAMATÓRIOS E ANALGÉSICOS. A presente invenção se refere a moléculas ativas sobre processos inflamatórios, analgésicos e inibidoras da ciclooginagenase 2. Mais especificamente, as moléculas da presente invenção referem-se a derivados N-(2-indol-3-il) metileno-N-hidrazinacarbotioamidas úteis no tratamento de processos inflamatórios ou de outras manifestações clínicas que requeiram o uso de anti-inflamatórios e analgésicos. Os resultados sugerem uma resposta anti-inflamtória dos derivados testados, onde o composto LQIT/LT-81 na dose de 10mg/Kg promoveu 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 edema em até 70,20%. Os compostos testados exibiram atividade inibitória da COX-2 (0,14 e 0,049 M, respectivamente) maior que o celecoxib (0,26 mM). Os resultados obtidos com a linhagem de macrófagos J774 tratados in vitro com os compostos mostraram a regulação imunológica para resposta Th2. Parâmetros como a diminuição das citocinas IL-6 e TNF-a, associados à menor liberação de óxido nítrico e à linfoproliferação. As citocinas Th2, como IL-4 e IL-10, foram produzidas em altos valores, e o TNF-a foi produzido em valores mais baixos para (...).



INIBIDORES DA COCLOOCIGENASE: DERIVADOS *N*-(2-INDOL-3-IL) METILENO-*N*-HIDRAZINA-CARBOTIOAMIDAS ANTI-INFLAMATÓRIOS E ANALGÉSICOS

01. A presente invenção se refere a moléculas ativas sobre processos inflamatórios, analgésicos e inibidoras da ciclooginagenase 2. Mais especificamente, as moléculas da presente invenção referem-se a derivados *N*-(2-indol-3-il) metileno-*N*-hidrazina-carbotioamidas úteis no tratamento de processos inflamatórios ou de outras manifestações clínicas que requeiram o uso de anti-inflamatórios e analgésicos.

02. As lesões provocam uma série de eventos celulares e moleculares que auxiliam o 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).

03. 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).

04. 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)

05. 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).

06. 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).

07. Nesse contexto, os indóis podem ser consideradas estruturas privilegiadas para o planejamento de compostos bioativos com atividade anti-inflamatória (RAJAK, KHARYA AND MISHRA, 2007). A literatura descreve a atividade anti-inflamatória de medicamentos como a indometacina e o Tenidap possuem o núcleo indol em sua estrutura e são utilizados na clínica para o tratamento da inflamação. A ação desses fármacos é atribuída ao núcleo indol, uma vez que o mesmo possui várias propriedades biológicas descritas como anti-inflamatória (HALL, et al., 2008; SINGH et al., 2008), anticonvulsivante (ABDEL-AZIZ et al., 2016), doenças cardiovasculares (AL-HOURANI et al., 2011), antibacteriana (RAJAKARIAR, YAQOOB AND GILROY, 2006). Outros estudos apontam também a diversidade de ações farmacológicas das tiossemicarbazonas e seus derivados como anti-inflamatórias (OLIVEIRA et al., 2016),

anti-tuberculose (DEMURTAS et al., 2019), anti-T. cruzi (MUTHUKUMAR; GEORGE AND VAIDHYALINGAM, 2008), antibacteriana e antifúngica (BECKFORD et al., 2011), anti-tumoral (ABDELBASSET et al., 2018). Além disso, os indóis são relatados como inibidores de importantes alvos envolvidos no processo inflamatório, como COX-2 (AL-HOURANI et al., 2011), fosfolipase A2 (RAJAKARIAR, YAQOOB AND GILROY, 2006) e citocinas como IL-1β e TNF-α (REDDYRAJULA, DALIMBA AND KUMAR, 2019).

08. Em estudos prévios conduzidos por nosso grupo de pesquisa, moléculas contendo o heterociclo de indol conjugado com outros importantes farmacóforos como tiazolidina e imidazolidina foram capazes de inibir a linfoproliferação, reduzir a expressão / produção de COX-2, IL-1β e TNF, e mostraram uma boa farmacocinética (OLIVEIRA et al., 2016; (DEMURTAS et al., 2019; BECKFORD et al., 2011; ABDELBASSET et al., 2018). Assim, tendo em vista estas evidências que comprovam a importância biológica dos indóis na química medicinal, neste trabalho objetivou-se sintetizar novas moléculas contendo essas estruturas privilegiadas conjugadas, bem como avaliar os anti- corpos *in vivo* e *in vitro*, atividade inflamatória e o perfil de inibição da COX-1/2 desses novos compostos. A inflamação é conhecida como uma resposta defensiva à um trauma mecânico ou outros estímulos nocivos. Prolongada e persistente, a inflamação pode levar à destruição dos tecidos e doenças crônicas. A busca de novas moléculas que conduzam a novos prótipos de fármacos anti-inflamatórios estimulam a comunidade científica.

09. Segundo Kenyon et al. (1996) as tiossemicarbazonas são extremamente estáveis e mimetizam porções de peptídeos, que são facilmente reconhecidas pelos sistemas biológicos. Fato que confere aos derivados diversas atividades biológicas como tuberculostática (LEITE et al., 2010; SRIRAM, YOGEESWARI AND MADHU,, 2005), antiviral (BADRIA et al., 2011; ISHIMA et al., 2011), analgésico e anti-inflamatório (FRAGA et al., 2009; GUIMARÃES et al., 2010; SAINI et al., 2014, BARREIRO et al., 2015), anticonvulsivante (KULANDASAMY, ADHIKARI AND ADHIKARI, 2009; KULANDASAMY, ADHIKARI AND STABLES, 2009), tripanocida (LEITE et al., 2009; SOARES et al., 2012), antipsicótico (OSNOWSKI et

al., 2012; HOODA et al., 2012) e vasodilatadora (BARREIRO et al., 2009). Logo, esse grupo de moléculas surgem como perspectivas de novos fármacos podendo, assim, contribuir nos estudos para a descoberta de compostos potencialmente bioativos.

10. O processo de obtenção de novos derivados indol-tiossemicarbazonas foram preparados em duas etapas, as tiossemicarbazonas foram obtidas por uma adição nucleofílica entre hidrazinas e isotiocianatos substituídos. A síntese dos derivados indol-tiossemicarbazonas ocorreu através da reação de condensação com quantidades equimolares do núcleo indólico não substituído ou substituídos (onde X pode ser carbono, nitrogênio, oxigênio e/ou enxofre) por cloro, bromo, fluoro, metil, etil, metóxi, nitro, ciano e benzo[g] nas posições R_1, R_2, R_3, R_4, e/ou R_5 e das hidrazinas e isotiocianatos substituídos na presença de um ácido (ácido acético e/ou ácido clorídrico) e solventes tais como metanol, etanol, tetraidrofurano, benzeno, tolueno ou dimetilformamida, em uma temperatura ambiente ou superior ao ponto de fusão dos reagentes. Purificados através de cristalizações sucessivas em metanol, etanol, tolueno, dioxano ou tetraidrofurano (Figura 1). A metodologia utilizada resultou na formação dos produtos com bons rendimentos variando entre (50-90%).

11. Foram realizadas etapas de síntese, purificação e elucidação estrutural de novos compostos indol-tiossemicarbazonas substituídos, acompanhados por ensaios *in vitro* e *in vivo* visando à avaliação de suas potenciais atividades anti-inflamatória.

FIGURA 1

12. Esses compostos, seus sais, complexos de inclusão e/ou formas farmacêuticas (sólidas, semi-sólidas, soluções, emulsões, suspensões e/ou injetáveis) podem ser administrados por qualquer via de administração, incluindo: via oral, intravenosa, intra-arterial, intracraniano, intratorácica, intraperitoneal, parenteral, ocular, retal, cutânea, sub-cutânea, intradérmica, dérmica, inalatória ou intramuscular.

13. Esse procedimento permite obter os compostos reivindicados, através de reações de condensação do grupo tiossecarbazona com os derivados indólicos não substituído ou substituídos. Estes derivados são quimicamente denominados: 2-((5-ciano-1*H*-indol-3-il)metileno)-*N*-fenil-hidrazina-carbotioamida (LQIT/LT-70); 2-((4-nitro-1*H*-indol-3-il)metileno)-*N*-fenil-hidrazina-carbotioamida (LQIT/LT-71);

2-((1*H*-benzo[g]-indol-3-il)metileno)-*N*-fenil-hidrazina-carbotioamida (LQIT/LT-72;); 2-((1H-pirrol[2,3,b]-piridin-3-il)metileno)-*N*-fenil-hidrazina-carbotioamida (LQIT/LT-73); 2-((7-metil-1*H*-indol-3-il) metileno)- *N*-fenil-hidrazina-carbotioamida (LQIT/LT-74); *N*-(4-clorofenil)-2-((5-ciano-1*H*-indol-3-il)metileno)-*N*-fenil-hidrazina-carbotioamida (LQIT/LT-75); *N*-(4-clorofenil)-2-((4-nitro-1*H*-indol-3-il)metileno)-*N*-fenil-hidrazina-carbotioamida (LQIT/LT-76); 2-((1*H*-pirrol[2,3,b]piridina-3-il)metileno)-*N*-(4-clorofenil) fenil-hidrazina-carbotioamida (LQIT/LT-77); 2-((1*H*-benzo[g]indol-3-il)metileno)-*N*-fenil-hidrazina-carbotioamida (LQIT/LT-78), *N*-(4-clorofenil)-2-((7-metil-1*H*-indol-3-il)metileno)-*N*-fenil-hidrazina-carbotioamida (LQIT/LT-79)*;* 2-((5-cian-1*H*-indol-3-il)metileno-N-(nafitilen-2-il)-hidrazina-carbotioamida (LQIT/LT-80); N-(nafitalen-2-il)-2-((4-nitro-1*H*-indol-3-il)metileno)hidrazina-carbotioamida (LQIT/LT-81); 2-((1*H*-pirrolo-[2,3-b]piridin-3-il)-metileno)-*N*-(nafitalen-2-il)-hidrazina-carbotioamida (LQIT/LT-82); 2-((1*H*-benzo[g]indol-3-il)metileno)-*N*-(naftalen-2-il-)hidrazina-carbotioamida (LQIT/LT-83); 2-((7-metil-1*H*-indol-3-il)metileno)-*N*-(naftalen-2-il)hidraziencarbotioamida (LQIT/LT-84); *N*-alil-2-((5-ciano-1*H*-indol-3-il)metileno)-hidrazina-carbotioamida (LQIT/LT-85); *N*-alil-2-((4-nitro-1*H*-indol-3-il)metileno)-hidrazina-carbotioamida (LQIT/LT-86); 2-((1*H*-benzo[g]indol-3-il)metileno)-*N*-alilhidrazinecarbotioamida (LQIT/LT-87); 2-((1*H*-pirrol[2,3,b]piridin-3-il)metileno)-*N*-alil-hidrazina-carbotioamida (LQIT/LT-88); *N*-alil-2-((7-metil-1*H*-indol-3-il)metileno)-hidrazina-carbotioamida (LQIT/LT-89).

14. Alguns exemplos da elucidação estrutural dos novos derivados *N*-(2-indol-3-il) metileno-*N*-hidrazina-carbotioamidas: 2-((5-ciano-1H-indol-3-il)metileno)-*N*-fenilhidrazinacarbotioamida (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; ^{1}H 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 $C_{17}H_{14}N_5S$: 320.3910; obtido: 320.109.

15.2-((4-nitro-1*H*-indol-3-il)metileno)-*N*-fenilhidrazinacarbotioamida (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; ^{1}H 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, J1= 8Hz, J2=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): ν̃= 1502 (C=S), 1550 (C=N), 3152 (N-H), 3329 (N-H), 3348 (N-H) cm^{-1}; HRMS m/z $[M+H]^+$ calculada por $C_{16}H_{12}N_5O_2S$: 339.0790; obtido: 340,0170.

16. 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; ^{1}H 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): ν̃= 1505 (C=S), 1550 (C=N), 3000 (N-H), 3158 (N-H), 3307 (N-H) cm^{-1}; HRMS m/z $[M+H]^+$ calculada por $C_{20}H_{16}N_3S$: 344.1096; obtido: 345.112.

17. 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; ^{1}H 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): ν̃= 1529 (C=S), 1553 (C=N), 3019 (N-H), 3134 (N-H),

3328 (N-H) cm^{-1}; HRMS m/z $[M+H]^+$ calculada por $C_{15}H_{13}N_5S$: 295.089; obtido: 296.129.

18. 2-((7-metil-1*H*-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; ^{1}H 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 $C_{17}H_{16}N_4S$: 308,1096; obtido: 309,139.

19. *N*-(4-clorofenil)-2-((5-ciano-1H-indol-3-il)metileno)-*N*-fenil-hidrazina-carbotio-amida (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; ^{1}H 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 $C_{17}H_{12}N_5SCl$: 353.0572; obtido: 354.056.

20. *N*-(4-clorofenil)-2-((4-nitro-1*H*-indol-3-il)metileno)-*N*-fenil-hidrazina-carbotioamida (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; ^{1}H 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): v˜= 1509 (C=S), 1541 (C=N), 2953 (N-H), 3116 (N-H), 3268 (N-H) cm^{-1}; HRMS m/z $[M+H]^+$ calculada por $C_{16}H_{12}N_5O_2SCl$: 373.0400; obtido: 374.055

21. 2-((1*H*-pirrol[2,3,b]piridina-3-il)metileno)-*N*-(4-clorofenil)-fenil-hidrazina-carbotio-amida (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; ^{1}H 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): v˜= 1493 (C=S), 1551 (C=N), 2923 (N-H), 3078 (N-H), 3143 (N-H) cm^{-1}; HRMS m/z $[M+H]^+$ calculada por $C_{15}H_{12}N_5SCl$: 329.0502; obtido: 330.086.

22. 2-((1*H*-benzo[g]indol-3-il)metileno)-*N*-fenilhidrazinacarbotioamida (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; ^{1}H 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): v˜= 1493 (C=S), 1544 (C=N), 3289 (N-H), 3384 (N-H), 3404 (N-H) cm^{-1}; HRMS m/z $[M+H]^+$ calculada por $C_{20}H_{15}N_4SCl$: 378.0706; obtido: 379.060.

23.*N*-(4-clorofenil)-2-((7-metil-1*H*-indol-3-il)metileno)-*N*-fenil-hidrazina-carbotioamida (LQIT/LT-79). Composto 10 obtido na forma solida de cor branca (100 mg 51,68%): R_f= 0.63 (n-Hex/AcOEt 1:1); mp: 205-206°C; ^{1}H 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): v˜= 1502 (C=S), 1548 (C=N), 3134 (N-H), 3288 (N-H), 3390 (N-H) cm^{-1}; HRMS m/z [M+H]$^+$ calculada por $C_{17}H_{15}N_4SCl$: 342.0607; obtido: 343.079.

24. 2-((5-cian-1*H*-indol-3-il)metileno-*N*-(nafitilen-2-il)hidrazina-carbotioamida (LQIT/LT-80). Composto 11 obtido na forma solida de cor branca (100 mg 51,68%): R_f= 0.63 (n-Hex/AcOEt 1:1); mp: 205-206°C; ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6): δ= 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): δ= 120-138 (C=C aromáticos), 149,58 (C=N), 176,64 (C=S) ppm IR (KBr): v˜= 1557 (C=N), 1617(C=S), 2224 (NH), 3395 (NH) cm^{-1}; HRMS m/z [M+H]$^+$ calculada por $C_{21}H_{15}N_5S$: 369,1048; obtido:370,1082.

25.*N*-(nafitalen-2-il)-2-((4-nitro-1*H*-indol-3-il)metileno)hidrazina-carbotioamida (LQIT/LT-81). Composto 12 obtido na forma solida de cor vermelha (100 mg 70,46%): R_f= 0.63 (n-Hex/AcOEt 4:6); mp: 248-250°C; ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6): δ= 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): δ=176,89 (C=S), 142,05 (C=N), 109-139 (C=C aromáticos) ppm IR (KBr): v˜=1518 (C=N), 1531 (C=S), 3091 (NH), 3342 (NH) cm^{-1} HRMS m/z [M+H]$^+$ calculada por $C_{20}H_{15}N_5O_2S$: 389,0946; obtido: 390.149.

26.2-((1*H*-pirrolo[2,3-b]piridin-3-il)metileno)-*N*-(nafitalen-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; ^{1}H 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): v˜=1557 (C=N), 1582 (C=S), 3140 (NH), 3313 (NH) cm^{-1} HRMS m/z $[M+H]^+$ calculada por $C_{19}H_{15}N_5S$: 345,1048; obtido:346,1082.

27.2-((1*H*-benzo[g]indol-3-il)metileno)-*N*-(naftalen-2-il)hidrazina-carbotioamida (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; ^{1}H 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): v˜=1544 (C=N), 1688 (C=S), 3321 (NH), 3440 (NH) cm^{-1} HRMS m/z $[M+H]^+$ calculada por $C_{24}H_{18}N_4S$: 394,1252; obtido:395,1286.

28. 2-((7-metil-1*H*-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; ^{1}H 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): v˜=1494 (C=N), 1557 (C=S), 3326 (NH), 3413 (NH) cm^{-1} HRMS m/z $[M+H]^+$ calculada por $C_{21}H_{18}N_4S$: 358,1252; obtido:359,1286.

29.*N*-alil-2-((5-ciano-1*H*-indol-3-il)metileno)hidrazina-carbotioamida (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; ^{1}H 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): v˜=1539

(C=N), 1617 (C=S), 3145 (NH), 3171 (NH), 3243 (NH) cm^{-1} HRMS m/z $[M+H]^+$ calculada por $C_{14}H_{13}N_5S$: 283,0893; obtido:284,0925.

30.*N*-alil-2-((4-nitro-1*H*-indol-3-il)metileno)hidrazina-carbotioamida (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; ^{1}H 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 $C_{13}H_{13}N_5O_2S$: 303,0790; obtido:304,0824.

31.2-((1*H*-benzo[g]indol-3-il)metileno)-*N*-alilhidrazina-carbotio-amida(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; ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6): δ=4.32 (t, 2H, CH_2), 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 $C_{17}H_{16}N_4S$: 308,1096; obtido:309,1129.

32. 2-((1*H*-pirrol[2,3,b]piridin-3-il)metileno)-*N*-alilhidrazina-carbotioamida (LQIT/LT-88). Composto 19 obtido na forma solida de cor branca (100 mg 41,68%): R_f= 0.55 (n-Hex/AcOEt 8:2); mp: 205-206°C; ^{1}H 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): v˜=1529 (C=N), 1550 (C=S), 3080 (NH), 3128 (NH), 3169 (NH) cm^{-1} HRMS m/z $[M+H]^+$ calculada por $C_{12}H_{13}N_5S$: 259,0892; obtido:260,0925.

33.*N*-alil-2-((7-metil-1*H*-indol-3-il)metileno)hidrazina-carbotioamida(LQIT/LT-89). Composto 20 obtido na forma solida de cor branca (100 mg 49,31%): R_f= 0.53 (n-Hex/AcOEt 4:6); mp: 265 -266°C; ^{1}H 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): v˜=1544 (C=N), 1606 (C=S), 3129 (NH), 3133 (NH), 3317 (NH) cm^{-1} HRMS m/z $[M+H]^+$ calculada por $C_{14}H_{16}N_4S$: 272,1096; obtido:273,1129.

34. Todos os ensaios *in vivos* realizados estão de acordo com os protocolos apresentados ao comitê de ética da Universidade Federal de Pernambuco (Processo: 23076.019618/2016-31). No ensaio de citotoxicidade foram utilizados macrófagos murino da linhagem J774 que foram incubados em placa de 96 poços ($1x10^4$ células/poço) em meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM; Life Technologies, GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD), suplementado com 10% de soro bovino fetal (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) e 50 µg/mL de gentamicina (Novafarma, Anápolis, GO, Brasil) e mantidos por 24 h em estufa a 37ºC e 5% de CO_2. Os compostos foram testados em séries de sete concentrações, em triplicatas, incubados por 72 horas. Posteriormente, foi adicionado 20 µL/poço de AlamarBlue (Invitrogen, Carlsbad, CA) durante 10 h. A leitura no espectrofotômetro foi realizada a 570 e 600 nm. Os valores de CC_{50} foram calculados utilizando leituras obtidas em três experimentos independentes. Como controle positivo foi utilizado à violeta de genciana (Synth, São Paulo, SP, Brasil).

35. Para os ensaios de linfoproliferação foram utilizados esplenócitos de camundongos BALB/c (1 x 10^6 células/poço, em 200 µL) que foram cultivados em meio DMEM e em placa de 96 poços, em triplicatas, na presença ou não de concanavalina A (2 µg/mL) ou anti-CD3/anti-CD28 e também em presença ou não das substâncias analisadas em diferentes concentrações (12 – 0.049 µM). Após 48 horas de incubação em estufa a 37º C e 5% de CO_2, foi adicionado às culturas 1 µCi de ^{3}H-timidina dando início a um novo período de 18 horas de incubação em estufa. Após esse período, as células foram coletadas para quantificação da proliferação, através da determinação da incorporação de timidina. O percentual de inibição foi determinado relacionando a incorporação de timidina das culturas tratadas com as substâncias avaliadas e a incorporação das culturas controle, não tratadas. As diferentes concentrações dos compostos foram avaliadas com o objetivo de determinar a concentração que inibe em 50% a proliferação dos linfócitos (IC_{50}). O valor da CI_{50} foi determinado com base na porcentagem de inibição da proliferação de linfócitos e seu cálculo foi efetuado, utilizando-se regressão não-linear no programa Graph Pad Prism versão 5.01(Graph Pad Software, San Diego, CA). Como controle positivo do experimento foi utilizado a dexametasona (Medley – Brasil) nas mesmas concentrações dos compostos em teste. Por conta da analogia estrutural com os compostos, a indometacina (Medley – Brasil) foi testada em paralelo.

36. A dosagem de óxido nítrico foi avaliada a partir da produção de óxido nítrico no sobrenadante de macrófagos J774. Este foi determinada através de seu produto oxidativo, o nitrito, pelo 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 µM de nitrito, tendo por base uma curva padrão de nitrito de sódio com concentração inicial de 400 µM.

37. Nos ensaios de toxicidade aguda foram utilizados camundongos machos adultos albinos swiss (*Mus musculus)*, pesando entre 30 e 35g. 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.

38. A avaliação da toxicidade foi realizada segundo o protocolo recomendado pela *Organization for Ecnomic Cooperation and Development* (OECD, 2001). De acordo com a metodologia foram administrados a dose de 2000 mg / kg dos derivados N-(2-indol-3-il) metileno-N-hidrazina-carbotioamidas (LQIT/LT). Foram utilizados 3 grupos cada um contendo 3 animais (fêmeas), totalizando 9 animais, sendo o experimento realizado em triplicata. Os derivados *N*-(2-indol-3-il) metileno-*N*-hidrazina-carbotioamidas (LQIT/LT) foram solubilizados em uma mistura de solução salina e DMSO a 10% 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 24 h 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 foram observados o consumo de água e ração. No 15º dia de observação os animais foram anestesiados com tiopental (5 mg/kg Cristália - SP - Brasil) 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 das lesões e cálculo do índice dos órgãos (TABELA 1 e 2).

Tabela 1: Efeito dos compostos indólico-tiossemicarbazônicos sobre os parâmetros hematológicos

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

Valores expressos em média ± 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 2: Efeito dos compostos indólicos-tiossemicarbazônicos sobre parâmetros fisiológicos e índice de órgãos.

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

39. 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. Foram utilizados camundongos albinos *swiss* machos (n=5) nos testes de edema de pata induzido por carragenina. Os derivados *N*-(2-indol-3-il) metileno-N-hidrazina-carbotioamidas (LQIT/LT) foram diluídos em solução salina com DMSO a 10% e foram administrado via oral nas dose de 15 mg/Kg, 30 mg/Kg e 60 mg/Kg, indometacina na dose de10 mg/kg e veículo 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 (Winter, 1962). O volume da pata foi medido antes e nos intervalos de 1, 2, 3, 4 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). 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 3, 4 e 5.

40. Na análise estatística foi utilizada regressão não linear para calcular os valores de CC_{50} e IC_{50}. 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. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando o valor de $P < 0.05$. Todas as análises foram realizadas utilizando o programa Graph Pad Prism versão 5.01.

Tabela 3: Percentual de crescimento do volume da pata (%) do composto LQIT/LT76 comparado com o controle negativo (média ± 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 ± 7,7	13,6 ± 4,3	31,16 ± 2,4	33,4 ± 1,6	21,1 ± 6,0
2	41,5 ± 11,5	12,4 ± 3,9	28,45 ± 8,5	54,8 ± 4,3	24,2 ± 6,4
3	52,2 ± 10,2	12,4 ± 3,9	36,12 ± 12,4	38,2± 6,0	31,9 ± 4,7
4	65,5 ± 6,11	21,0 ± 4,8	75,5 ± 2,7	34,4 ± 5.1**	35,7 ± 4,6**
5	66,5 ± 6,70	10,1 ± 3,1	39.5 ± 15,1*	28,2± 4,6**	31,0 ± 6,1***
6	75,9 ± 8,96	6,3 ± 2,5	64,8 ± 6,4	35,2 ± 5,8***	26,7 ± 5,9***

Os dados foram expressos como a média ± 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 4: Percentual de crescimento do volume da pata (%) do composto LQIT/LT-81 comparado com o controle negativo (média ± erro padrão).

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

Os dados foram expressos como a média ± 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 5: Percentual de crescimento do volume da pata (%) do composto LQIT/LT-87 comparado com o controle negativo (média ± 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 ± 7,45	15,8 ± 4,32	31,68 ± 4,82	6,28 ± 1,21***	18,01 ± 2,39
2	28, 78 ± 4,24	11,9 ± 3,1	29,51 ± 4,56	6,23 ± 1,94***	16,01 ± 4,88
3	22,50 ± 4,45	12,1 ± 3,1	31,02 ± 2,98	7,57 ± 2,90*	9,21 ± 3,89
4	24,17 ± 4,45	21,3 ± 3,3	24,30 ± 5,45	2,55 ± 1,47***	4,22 ± 2,59**
5	6,70 ± 3.09	9,2 ± 2,3	10,88 ± 4,47	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
6	3,51 ± 1,45	6,4 ± 2,3	7, 78 ± 3,78	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00

Os dados foram expressos como a média ± 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.

41. 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%.

42. 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 6). 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 6: 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%

43. Inicialmente, macrófagos da linhagem J774 foram utilizados para a determinação do CC_{50} (concentração citotóxica de 50 %). Comparado com a violeta de genciana (CC_{50} = 4.2±0.6), uma molécula citotóxica de referência, os compostos testados apresentaram baixa citotoxicidade, com valores de CC_{50} superiores a 25 μM (Tabela 7).

44. Por conseguinte, concentrações acima de 25 μM foram usadas nos experimentos subsequentes.

Tabela 7. 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. CC_{50} = concentração citotóxica a 50 %. IC_{50} = concentração inibitória a 50 %. E.P.M = erro padrão da média. DEXA = Dexametasona. GV = violeta de genciana.

45. O ensaio de linfoproliferação permite indicar o percentual da inibição da proliferação de linfócitos ativados por concanavalina A, ou seja, quanto maior o percentual de inibição, maior a atividade anti-inflamatória através de uma ação imunossupressora. A tabela 8 apresenta os resultados do % de inibição da linfoproliferação menor a 50 µM. 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 8: Atividade inibitória do óxido nítrico

Compostos	LQIT/LT-76	LQIT/LT-81	LQIT/LT-87	INDO	DEXA
Inibição do NO CI50 ±E.P.M. (µM)	9.0±0.43	8.7±0.21	21.0±1.02	16.7±0.67	6.25±0.14

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

46. Os dados apresentados na figura 2 evidenciam que as tiossemicarbazonas LQIT/LT-76 e LQIT/LT-81 são eficientes na redução de lipopolissacarideos (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 LQIT/LT-81 destaca-se por reduzir a expressão do LPS em valores ainda menores que a dexametasona. Já o LQIT/LT-87 não apresentou significância durante o ensaio. Diante dos dados obtidos nos testes *in vitro* os compostos LQIT/LT-76, LQIT/LT-81 e LQIT/LT-87 foram encaminhados para os ensaios biológicos *in vivo*.

FIFURA 2

47. Para a avaliação *in vivo* foram utilizado o modelo experimental de edema de pata induzido por carragenina. Foram utilizados camundongos albinos *swiss* machos (n=5) os quais foram tratados via oral com os compostos LQIT/LT-76, LQIT/LT-81 e

LQIT/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 (REDDYRAJULA, DALIMBA AND KUMAR, 2019). 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).

48. Deteção da expressão da ciclooxigenase 2 (COX-2). A seção ultrafina (5 µm de espessura) de cada grupo foi cortada e fixada em lâminas tratadas com 3-amino-propil-trietoxi-silano [APES (Sigma, EUA)]. Resumidamente, os cortes foram desparafinados com xileno e reidratados em etanol graduado (70-100%). As secções foram aquecidas durante 30 min em solução tampão citrato de sódio (0,01 M, pH 6,0) para aumentar a exposição ao epítopo. As lâminas foram tratadas com H_2O_2 a 0,3% (v / v) em água por 5 min para minimizar a atividade da peroxidase endógena. As secções foram lavadas com 0,01 M PBS (pH 7,2) e depois bloqueadas com 1% de BSA, 0,2% Tween 20 em PBS durante 1 h, à temperatura ambiente. As seções foram então incubadas por 12 horas a 4ºC com o anticorpo COX-2 (ABCAM, CA, EUA). A reação antígeno-anticorpo foi visualizada com avidina-biotina-peroxidase (Kit Dako Universal LSAB®, Peroxidase) usando 3,3-diaminobenzidina como um cromógeno. As lâminas foram contra-coradas em hematoxilina. Coloração positiva. resultou em um produto de reação marrom. Os controles negativos foram tratados como acima, mas com a omissão do primeiro anticorpo.

49. As imagens imuno-histoquímicas de diferentes regiões foram avaliadas separadamente. Para a densidade de pixels 5, as áreas coradas foram medidas usando um programa de software (GIMP 2.10.8, GNU Image Manipulation Program, plataformas UNIX). Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o GraphPad Prism 6 for Windows (La Jolla, EUA, www.graphpad.com). Os dados foram expressos como média ± desvio padrão. As diferenças entre os grupos controle e tratado foram analisadas usando-se ANOVA unidirecional seguido do teste post hoc de Dunnett e / ou Tukey. Valores de probabilidade inferiores a 0,05 foram considerados significativos.

50. A análise histológica das patas dos camundongos, após a injeção intraplantar de carragenina, demonstrou a presença de infiltrado inflamatório na derme além do edema moderado. Para avaliar o efeito dos derivados LQIT/LT-76, LT-81 e LQIT/LT-87 na redução do edema e infiltrado inflamatório, foi utilizado corte histológico (controle negativo) sem estímulo inflamatório induzido pela carragenina.

51. A expressão de COX-2 no grupo controle positivo quando comparado com os grupos submetidos a indometacina e LQIT/LT-76, LQIT/LT-81 e LQIT/LT-86. A marcação da COX-2 no grupo controle positivo (carragenina) foi evidenciada na epiderme e na derme, porém mais expressiva na epiderme (Figura 3A). O derivado LQIT/LT-76 apresentou resultados semelhantes à indometacina. Por outro lado, a expressão dos derivados LQIT/LT-81 e LQIT/LT-86 COX-2 foi significativamente reduzida quando comparada ao grupo carragenina e indometacina (Figura 3F). A diferença média entre as amostras foi estatisticamente significativa com $p < 0,05$ (0,0436). No entanto, quando comparado isoladamente com o grupo controle, o resultado não foi estatisticamente significativo.

FIGURA 3

52. Os estudos imunológicos com camundongos Balb / c esplenócitos, os ensaio imunológico realizado com monócitos e células linfócitos do baço de camundongos BALB / c fêmeas (6-8 semanas de idade; 5 animais) foram realizados para confirmar os resultados obtidos com a linhagem J774. Os animais foram criados e mantidos nas instalações do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami - LIKA, na Universidade Federal de Pernambuco, Brasil. Os camundongos foram mantidos em condições padrão de laboratório (20-22 ° C e 12 h dia e noite) com acesso livre à dieta padrão (Labina / Purina, Campinas, Brasil) e água. Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com o Comitê de Ética em Uso Animal (CEUA) da Universidade Federal de Pernambuco (número do protocolo: 0048/2016). Após a inoculação de 1 mg de anestésico e eutanásia dos animais por deslocamento da vértebra, o baço de cada rato foi removido assepticamente e colocado num tubo Falcon contendo RPMI 1640 com soro fetal de vitelo (meio completo). Em um fluxo vertical, cada baço foi transferido para uma placa de Petri onde eles estavam encharcados. As suspensões celulares obtidas de cada baço foram transferidas para tubos Falcon contendo aproximadamente 10 mL

de meio incompleto. Os homogenatos de baço foram sobrepostos em camada Ficoll-Paque PLUS, com a densidade ajustada a 1,076 g / mL e centrifugados a 1000 x g temperatura ambiente durante 25 min. A camada celular de interface contendo células imunológicas foi recuperada por pipeta Pasteur, lavada duas vezes em solução salina tamponada com fosfato (PBS 1X) e centrifugada duas vezes a 500 x g durante 10 min. As células foram contadas em câmera de Neubauer e a viabilidade celular foi determinada pelo método de exclusão do azul de tripano. As células foram usadas apenas quando a viabilidade era> 98%. As células foram cultivadas em placas (24 poços) com os compostos LQIT/LT-76, LQIT/LT-81 e LQIT/LT-87 a 11 µM durante 24 e 48 horas.

53. O sobrenadante por cultura de esplenócitos estimulados com os compostos LT76, LT81 e LT87 foi utilizado para medir as citocinas e a produção de NO pela células imunológicas. As culturas foram tratadas com 11 µM de cada composto e após 24 e 48 horas os sobrenadantes foram recolhidos para realizar os ensaios. A avaliação de citocinas foi realizada utilizando kit de citocinas Th1 / Th2 de camundongos II (BD Bioscience, San Jose, CA, EUA) para detecção simultânea de sete citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, TNF-α e IFN-γ em amostras de sobrenadantes de cultura. Todos os dados foram adquiridos na plataforma FACSCalibur. A medição de citocinas baseou-se no princípio da tecnologia cytometric bead array (CBA). A análise do óxido de nitrito foi realizada através do método Griess colorimétrico (DING et al., 1988). A concentração de NO foi estimada pela curva padrão (3,12 a 100 µmol⁄mL). A leitura foi realizada em um espectrofotômetro de microplacas (Thermo Scientific Multiskan FC, Waltham-USA) em 595nm.

54. Os resultados obtidos com a linhagem de macrófagos J774 tratados *in vitro* com os compostos LQIT/LT-76, LQIT/LT-81 e LQIT/LT-87 mostraram a regulação imunológica para resposta Th2. Parâmetros como a diminuição das citocinas IL-6 e TNF-α, associados à menor liberação de óxido nítrico e à linfoproliferação reforçam esse achado. Antes de iniciar o ensaio *in vivo*, isolamos esplenócitos de camundongos Balb / c e tratamos essas células, in vitro, apenas com os três compostos por 24 horas. Nossos resultados confirmam o padrão observado na linhagem J744. Os compostos LQIT/LT-71, LQIT/LT-81 e LQIT/LT-87 não foram capazes de induzir a produção de

citocinas relacionadas à proliferação de linfócitos, como IL-2 e IL-6 (Figura 4A e B). Além disso, a IL-17 (Figura 4B) foi produzida em valores basais (semelhante ao controle). As citocinas Th2, como IL-4 e IL-10, foram produzidas em altos valores, mas apenas a LQIT/LT-76 induziu a maior produção de citocina IL-4 (Figura 4D). O TNF-α foi produzido em valores mais baixos para todos os compostos testados (Figura 4F). Reforçando a inibição do perfil Th1, pôde-se observar a menor produção de óxido nítrico nas células tratadas com os compostos LQIT/LT-76, LQIT/LT-81 e LQIT/LT-87 associados à nenhuma estimulação à citocina IFN-(Figura 4A e B).

FIGURA 4

55. Os compostos LTIQ/LT-76, LTIQ/LT-81 e LQIT/LT-87 foram testados para inibição de COX-1 e COX-2 em quatro concentrações (de 1.5-100 μM) para determinar a concentração produzida de 50% de inibição de enzimas (IC50) e sua seletividade índices (SI) utilizando celecoxib e indometacina como medicamento de referência. Como demonstrado na tabela 9, os compostos LQIT/LT-87 e LTIQ/LT-81 exibiram atividade inibitória da COX-2 (0,14 e 0,049 ,M, respectivamente) maior que o celecoxib (0,26 μM), no entanto, o composto LTIQ/LT-76 foi menos ativo que os controles positivos e os outros compostos testados. Em relação ao índice de seletividade (SI), os compostos LTIQ/LT-76 e LQIT/LT-87 não foram seletivos para COX-2, enquanto o LTIQ/LT-81 apresentou valor de SI duas vezes maior que o celecoxibe.

Tabela 9. Estudo *in vitro* COX-1, COX-2 atividades inibitórias de enzimas e índices de seletividade (SI) dos compostos testados

Compostos	IC_{50} (μM)[a] COX-1	IC_{50} (μM) COX-2	SI (COX-1/COX-2)[b]
LQIT/LT-87	0.14 ± 0.12	0.14 ± 0.52	1
LQIT/LT-76	0.22 ± 0.12	0.29 ± 0.1	0.76
LQIT/LT-81	1.13 ± 0.38	0.049 ± 0.06	23.06
Celecoxibe	3.09 ± 0.02	0.26 ± 0.02	11.88
Indomethacina	2.16 ± 0.04	0.84 ± 0.06	2.57

[a] IC_{50} valor é a concentração do composto necessária para produzir 50% de inibição da COX-1 ou COX-2 por meio de três determinações. [b] SI: relação (IC_{50} COX-1/ IC_{50} COX-2).

56. na figura 1 representação esquemática das estruturas químicas dos derivados

N-(2-indol-3-il) metileno-*N*-hidrazina-carbotiamidas

57. Na figura 2. Produção de oxido nítrico 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 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+.

58. Na figura 3. Localização da COX-2 na imuno-histoquímica no modelo de edema da pata induzido por carragenina. Coloração positiva na epiderme e derme foi detetada. (A) carragenina, (B) indometacina e derivados LQIT/LT-76 (C),LQIT/LT-81 (D), LQIT/LT-86 (E). Os dados foram expressos como média ± DP, * (p \ 0,05), barra de escala = 50 μm.

59. Figura 4: Perfil da produção de citocinas em esplenócitos tratados com os compostos LQIT/LT-76, LQIT/LT-81 e LQIT/LT-87 em 24 horas de incubação. Vertical com barras representa amostras de controle (células + meio de cultura) e barras verticais pretas representam células tratadas com diferentes compostos. Dois experimentos independentes foram realizados em triplicata.

60. Figura 5: Produção de IFN-γ e óxido nítrico por esplenócitos tratados com compostos LQIT/LT-76, LQIT/LT-81 e LQIT/LT-87 em 24 horas de incubação. Vertical com barras representa amostras de controle (células + meio de cultura) e barras verticais pretas representam células tratadas com diferentes compostos. Dois experimentos independentes foram realizados em triplicata.

61. Referências:

62. RAJAK, H.; KHARYA, M.D.; MISHRA, P. Synthesis of some oxadiazole and oxadiazoline analogues for their anti-inflammatory activity. Yakugaku Zasshi. v. 127, n. 10, p. 1757-1764. 2007.

63. HALL, A., BILLINTON, A., BROWN, S.H., CHOWDHURY, A., GIBLIN, G.M.P., GOLDSMITH, P., HURST, D.N., NAYLOR, A., PATEL, S., SCOCCITTI, T., THEOBALD, P.J., 2008. Discovery of a novel indole series of EP1 receptor antagonists by scaffold hopping. Bioorg. Med. Chem. Lett. 18, 2684–2690

64. SINGH, P., MITTAL, A., BHARDWAJ, A., KAURB, S., KUMAR, S., 2008. 1-Toluene-sulfonyl-3-[(30-hydroxy-50-substituted)-c-butyrolactone]-indoles: synthesis, COX-2 inhibition and anti-cancer activities. Bioorg. Med. Chem. Lett. 18, 85–89.

65. HALL, A., BILLINTON, A., BROWN, S.H., CHOWDHURY, A., GIBLIN, G.M.P., GOLDSMITH, P., HURST, D.N., NAYLOR, A., PATEL, S., SCOCCITTI, T., THEOBALD, P.J., 2008. Discovery of a novel indole series of EP1 receptor antagonists by scaffold hopping. Bioorg. Med. Chem. Lett. 18, 2684–2690

66. R. L. Xiaowu, C. B. Gong, P. M. Selzer, Z. Li, E. Davidson, G. Kurzban. R. E. Miller, E. O. Nuzum, J. H. McKerrow, R. J. Fletterick, S. A. Gillmor, C. S. Craik, I. D. Kuntz, F. E. Cohen and G. L. Kenyon. Structure-Based Design of Parasitic Protease Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.*, 1996, 4, 1421-1427.

67. F. R. Pavan, P. I. S. Maia, S. R. A. Leite, V. M. Deflon, A. A. Batista, D. N. Sato, S. G. Franzblau and C. Q. F. Leite. Thiosemicarbazones, semicarbazones, dithiocarbazates and hydrazide/hydrazones: Anti–Mycobacterium tuberculosis activity and cytotoxicity *Eur. J. Med. Chem.* 2010, 45, 1898-1905.

68. D. Sriram, P. Yogeeswari and K. Madhu. Synthesis and *in vitro* and *in vivo* antimycobacterial activity of isonicotinoyl hydrazones. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2005, 15, 4502.

69. K. M. Dawood, H. Abdel-Gawad, H. A. Mohamed, F. A. Badria. Synthesis, anti-HSV-1, and cytotoxic activities of some new pyrazole- and isoxazole-based heterocycles. *Med. Chem. Res.,* 2011, 20(7), 912- 919.

70. Q. Gong, L. Menon, T. Ilina, L. G. Miller, J. Ahn, M. A. Parniak and R. Ishima. Interaction of HIV-1 Reverse Transcriptase Ribonuclease H with an Acylhydrazone Inhibitor. *Chem. Biol. Drug. Des.*, 2011, 77, 39.

71. R. C. Maia, L. L. Silva, E. F. Mazzeu, M. M. Fumian, C. M., Rezende, A. C. Doriguetto, R. S. Correa, A. L. P. Miranda, E. J. Barreiro and C. A. M. Fraga. Synthesis and analgesic profile of conformationally constrained *N*-acylhydrazone analogues: Discovery of novel N-arylideneamino quinazolin-4(3H)-one compounds derived from natural safrole. *Bioorg. Med. Chem.,* 2009, 17, 6517-6525.

72. J. L. M. Tributino, M. L. H. Santos, C. M. Mesquita, C. K. F. Lima, L. L. Silva, R. C. Maia, C. D. Duarte, E. J. Barreiro, C. A. M. Fraga, N. G. Castro, A. L. P. Miranda and M.Z. P. Guimarães. LASSBio-881: an *N*-acylhydrazone transient receptor potential vanilloid subfamily type 1 antagonist orally effective against the hypernociception induced by capsaicin or partial sciatic ligationbph. *Br. J. Pharmacol.* 2010, 159, 1716-1723.

73. A. Kajal, S. Bala, N. Sharma, S. Kamboj, and V. Saini. Therapeutic Potential of Hydrazones as Anti-Inflammatory Agents. *International Journal of Medicinal Chemistry*, 2014, 1-11.

74. T. F. Silva, W. Bispo Júnior, M. S. Alexandre-Moreira, F. N. Costa, C. E. S. Monteiro, F. F. Ferreira, R. C. R. Barroso, F. Noël, R. T. Sudo, G. Zapata-Sudo, L. M. Lima, E. J. Barreiro. Novel Orally Active Analgesic and Anti-Inflammatory Cyclohexyl-N-Acylhydrazone Derivatives. *Molecules*, 2015, 20, 3067-3088.

75. R. Kulandasamy, A. V. Adhikari and J. P. Adhikari. Synthesis and anticonvulsant activity of some new bishydrazones derived from 3,4-dipropyloxythiophene. *Eur. J. Med. Chem.* 2009, 44, 3672-3679.

76. R. Kulandasamy, A. V. Adhikari and J. P. Stables. A new class of anticonvulsants possessing 6 Hz activity: 3,4-dialkyloxy thiophene bishydrazones. *Eur. J. Med. Chem.* 2009, 44, 4376-4384.

77. J. M. dos Santos Filho, A. C. L. Leite, B. G. de Oliveira, D. R. M. Moreira, M. S.

Lima, M. B. P. Soares and L. F. C. C. Leite. Design, synthesis and cruzain docking of 3-(4-substituted-aryl)-1,2,4- oxadiazole-N-acylhydrazones as anti-Trypanosoma cruzi agentes. *Bioorg. Med. Chem.*, 2009, 17, 6682 - 6691.

78. J. M. dos Santos Filho, D. R. M. Moreira, C. A. de Simone, R. S. Ferreira, J. H. McKerrow, C. S. Meira, E. T. Guimaraes and M. B. P. Soares. Optimization of anti-Trypanosoma cruzi oxadiazoles leads to identification of compounds with efficacy in infected mice. *Bioorg. Med. Chem.,* 2012, 20, 6423-6433.

79. Md. Rahmat Ali, A. Marella, Md. Tauquir Alam, R. Naz, M. Akhter, Md. Shaquiquzzaman, R. Saha, O. Tanwar, Md. M. Alam, J. Hooda. Review of biological activities of hydrazones. *Indonesian J. Pharm*. 2012, Vol. 23 No. 4: 193 – 202

80. A. E. Kummerle, J. M. Raimundo, C. M. Leal, G. S. da Silva, T. L. Balliano, M. A. Pereira, C. A. de Simone, R. T. Sudo, G. Zapata-Sudo, C. A. M. Fraga and E. J. Barreiro. Studies towards the identification of putative bioactive conformation of potent vasodilator arylidene N-acylhydrazone derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* 2009, 44, 4004-4009.

81. P. Hernandez, M. Cabrera, ML. Lavaggi, L. Celano, I. Tiscornia, T.R. Costa, L. Thomson, M. Bollati-Fogolin, A.L.P. Miranda, L.M. Lima, E.J. Barreirod, M. Gonzalezd and H Cerecettod. Discovery of new orally effective analgesic and anti-inflammatory hybrid furoxanyl N-acylhydrazone derivatives, *Bioorg. Med. Chem.* 2012, 20, 2158-2171.

82. P. Hernández; R. Rojas; R. H. Gilman; M. Sauvain; L. M. Lima; E. J. Barreiro; M. González; H. Cerecetto. Hybrid furoxanyl *N*-acyl-hydrazone derivatives as hits for the development of neglected diseases drug candidates. European Journal of Medicinal Chemistry. v. 7, n. 59C, p. 64-74. 2013

83. G. Rajitha, N. Saideepa, P. Praneetha. Synthesis and evaluation of N-(α-

benzamidocinnamoyl)aryl hydrazone derivative for anti-inflammatory and antioxidant activities, *Ind. J. Chem*., 2011, 50B, 729-733.

84. CM. Moldovan, O. Oniga, A. Parvu, B. Tiperciuc, P. Verite, A. Pirnau, O.C. M. Bojit And R. Pop. Synthesis and antiinflammatory evaluation of some new acyl-hydrazones bearing 2-aryl-thiazole, *Eur. J. Med. Chem.*, . 2011, 46, 526-534.

85. M. A.A. El-Sayed, N. I. Abdel-Aziz, N. A.M. Abdel-Aziz, A. S. El-Azab., Y. A. Asiri and K. E. H. E. Tahir. Design, synthesis, and biological evaluation of substituted hydrazone and pyrazole derivatives as selective COX-2 inhibitors, molecular docking study, *Bioorg. Med. Chem.* 2011,19, 3416-3424.

86. R. F. Green, D. H. Ferguson, J. Liebert, and M. Schmidt. Cataclysmic variable candidates from the palomar green survey. Publications of the Astronomical Society of the Pacific.1982, V. 94, 560-564.

87. C.A. Winter, E.A. Risley, G.W. Nuss, Carrageenin-Induced Edema in Hind Paw of the Rat as an Assay for Antiinflammatory Drugs. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1962, V. 111, 544 - 547.

88. ABDEL-AZIZ, A.A.M.; EL-AZAB, A.S.; ABOU-ZEID, L.A.; ELTAHIR, K.E.H.; ABDEL-AZIZ, N.I.; AYYAD, R.R.; AL-OBAID, A.M. Synthesis, anti-inflammatory, analgesic and COX-1/2 inhibition activities of anilides based on 5,5-diphenylimidazolidine-2,4-dione scaffold: Molecular docking studies. European Journal of Medicinal Chemistry 115 (2016) 121-131.

89. AL-HOURANI, B.J.; SHARMA, S.K.; MANE, J.Y.; TUSZYNSKI, J. Synthesis and evaluation of 1,5-diaryl-substituted tetrazoles a novel selective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. v.21, p.1823–1826, 2011.

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

91. OLIVEIRA, J.F.; NONATO, F.R.; ZAFRED, R.R.T.; LEITE, N.M.S.; RUIZ, A.L.T.G.; CARVALHO, J.E.; SILVA, A.L.; MOURA, R.O.; LIMA, M.C.A. Evaluation of anti-inflammatory effect of derivative (E)-N-(4-bromophenyl)-2-(thiophen-2-ylmethylene)-thiosemicarbazone. Biomedicine & Pharmacotherapy 80 (2016) 388–392.

92. DEMURTAS, M.; BALDISSEROTTO, A.; LAMPRONTIB, L.; MOIUMA, D.; BALBONIUMA, G.; PACIFICO, S.; VERTUANI, S.; MANFREDINI, S.; ONNI. V. Indole derivatives as multifunctional drugs: Synthesis and evaluation of antioxidante, photoprotective and antiproliferative activity of índole hydrazones. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. 85 (2019), 568-576.

93. MUTHUKUMAR, V.A.; GEORGE, S.; VAIDHYALINGAM, V. Synthesi asnd Pharmacological Evaluation of 1-(1-((Substituted)methyl)- 5-methyl-2 oxoindolin-3-ylidene)--4-(subst iptyurtieddin-2- yl)thiosemicarbazide. BivL Phat'm .Butl ,31(7) 1461-1464 (2008).

94. 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.

95. 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.

REIVINDICAÇÕES

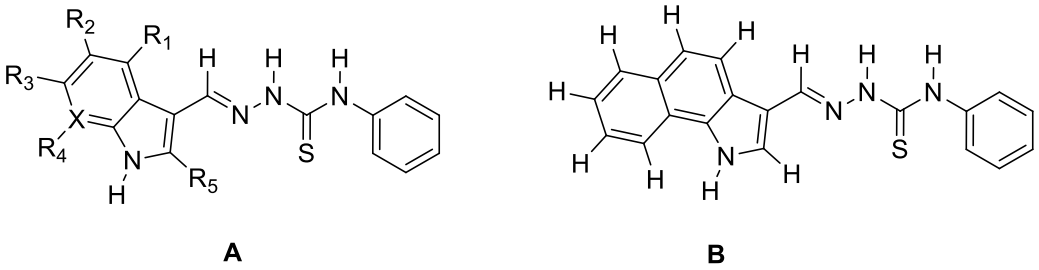
1. INIBIDORES DA COCLOOCIGENASE: DERIVADOS *N*-(2-INDOL-3-IL) METILENO-*N*-HIDRAZINA-CARBOTIAMIDAS ANTI-INFLAMATÓRIOS E ANALGÉSICOS caracterizada pela obtenção dos derivados *N*-(2-indol-3-il) metileno-*N*-hidrazina-carbotioamidas como uma alternativa para o tratamento de processos inflamatórios a serem utilizados na saúde humana e/ou animal com fins de tratamento, profilaxia, paliativa de processos anti-inflamatórios e analgésicos,

2. INIBIDORES DA COCLOOCIGENASE: DERIVADOS *N*-(2-INDOL-3-IL) METILENO-*N*-HIDRAZINA-CARBOTIAMIDAS ANTI-INFLAMATÓRIOS E ANALGÉSICOS de acordo com a reivindicação 1, caracterizada por uma resposta anti-inflamtória dos derivados testados, onde o composto LQIT/LT-81 na dose de 10mg/Kg promoveu 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 edema em até 70,20%; Os compostos testados exibiram atividade inibitória da COX-2 (0,14 e 0,049 M, respectivamente) maior que o celecoxib (0,26 μM); Os resultados obtidos com a linhagem de macrófagos J774 tratados *in vitro* com os compostos mostraram a regulação imunológica para resposta Th2; Parâmetros como a diminuição das citocinas IL-6 e TNF-α, associados à menor liberação de óxido nítrico e à linfoproliferação; As citocinas Th2, como IL-4 e IL-10, foram produzidas em altos valores, e o TNF-α foi produzido em valores mais baixos para todos os compostos testados, reforçando a inibição do perfil Th1;

3. **INIBIDORES DA COCLOOCIGENASE: DERIVADOS *N*-(2-INDOL-3-IL) METILENO-*N*-HIDRAZINA-CARBOTIAMIDAS ANTI-INFLAMATÓRIOS E ANALGÉSICOS**, de acordo com a reivindicações 1 e 2, caracterizada por uma resposta anti-inflamtória dos derivados testados, onde os derivados *N*-(2-indol-3-il) metileno-*N*-hidrazina-carbotioamidas serem utilizados individualmente ou em combinação com outros agentes anti-inflamatórios em profilaxia, paliativa, para produção de preparações

farmacêuticas e/ou veterinárias sob a forma de: pós, grânulos, comprimidos, comprimidos revestidos, cápsulas, soluções orais e/ou injetáveis, pomadas, cremes, elixires, xarope, emulsões, suspensões, loções, emplastos, géis, sistemas de liberação controlada como micro e nanocápsulas, micro e nanoparticulas, complexos de inclusão, micro e nanoemulsões, lipossomas e hidrogéis, juntamente com um ou mais adjuvantes e/ou veículos;

FIGURA 1



A B

FIGURA 2

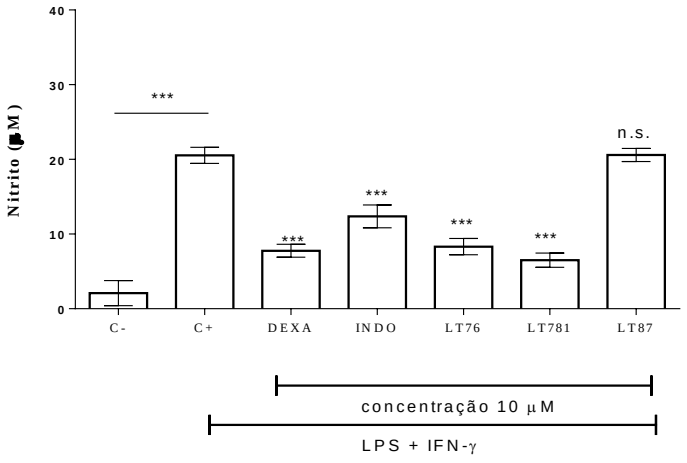


FIGURA 3

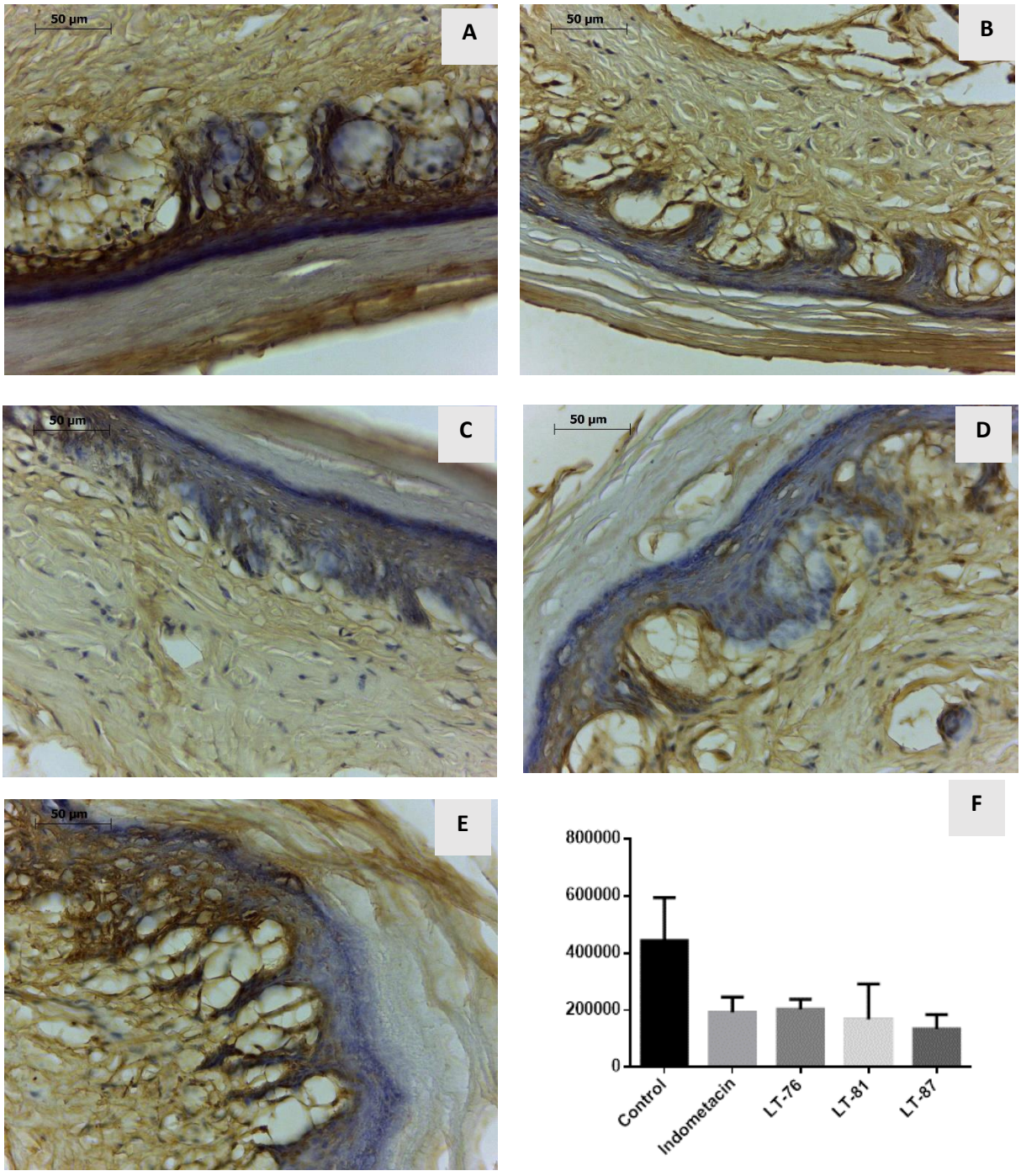

50 µm
A
50 µm
B
50 µm
C
50 µm
D
50 µm
E
F
800000
600000
400000
200000
0
Control
Indometacin
LT-76
LT-81
LT-87

FIGURA 4

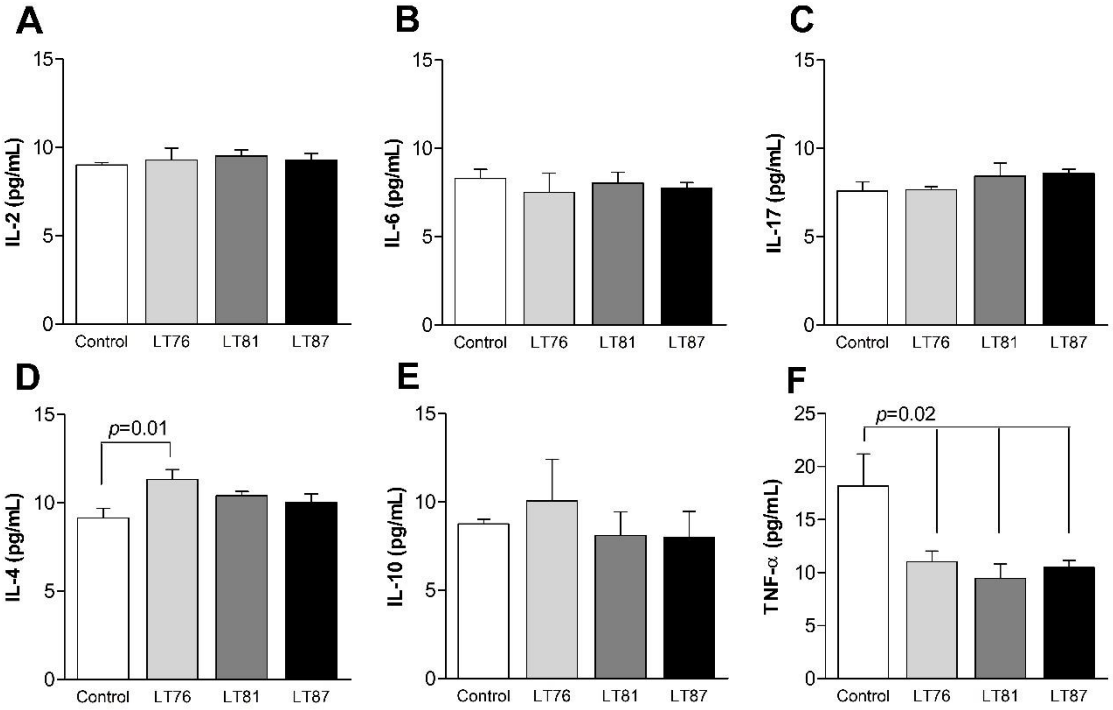
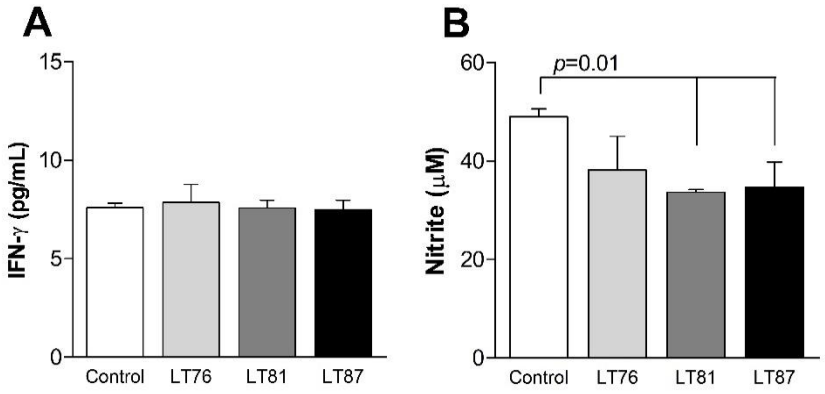


FIGURA 5



INIBIDORES DA COCLOOCIGENASE: DERIVADOS *N*-(2-INDOL-3-IL) METILENO-*N*-HIDRAZINA-CARBOTIAMIDAS ANTI-INFLAMATÓRIOS E ANALGÉSICOS

A presente invenção se refere a moléculas ativas sobre processos inflamatórios, analgésicos e inibidoras da ciclooginagenase 2. Mais especificamente, as moléculas da presente invenção referem-se a derivados *N*-(2-indol-3-il) metileno-*N*-hidrazina-carbotioamidas úteis no tratamento de processos inflamatórios ou de outras manifestações clínicas que requeiram o uso de anti-inflamatórios e analgésicos. Os resultados sugerem uma resposta anti-inflamtória dos derivados testados, onde o composto LQIT/LT-81 na dose de 10mg/Kg promoveu 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 edema em até 70,20%. Os compostos testados exibiram atividade inibitória da COX-2 (0,14 e 0,049 M, respectivamente) maior que o celecoxib (0,26 μM). Os resultados obtidos com a linhagem de macrófagos J774 tratados *in vitro* com os compostos mostraram a regulação imunológica para resposta Th2. Parâmetros como a diminuição das citocinas IL-6 e TNF-α, associados à menor liberação de óxido nítrico e à linfoproliferação. As citocinas Th2, como IL-4 e IL-10, foram produzidas em altos valores, e o TNF-α foi produzido em valores mais baixos para todos os compostos testados, reforçando a inibição do perfil Th1.