



**CENTRO UNIVERSITÁRIO DOUTOR LEÃO SAMPAIO  
CAMPUS SAÚDE  
CURSO BACHARELADO EM BIOMEDICINA**

**DANIELY SAMPAIO ARRUDA TAVARES**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTINOCICEPTIVA DE  
DERIVADO SINTÉTICO TRIAZÓIS CONJUGADO COM FTALIMIDAS EM  
CAMUNDONGOS**

Juazeiro do Norte, CE.  
2019

DANIELY SAMPAIO ARRUDA TAVARES

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTINOCICEPTIVA DE  
DERIVADO SINTÉTICO TRIAZÓIS CONJUGADO COM FTALIMIDAS EM  
CAMUNDONGOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso Bacharelado em Biomedicina do Centro Universitário Dr. Leão Sampaio, Campus Saúde, como requisito para obtenção do Grau Bacharel em Biomedicina, Artigo Científico.

Orientadora: Ma. Ana Luíza de Aguiar Rocha Martin

Co-orientador: Me. Vanderlan Nogueira Holanda

Juazeiro do Norte, CE.  
2019

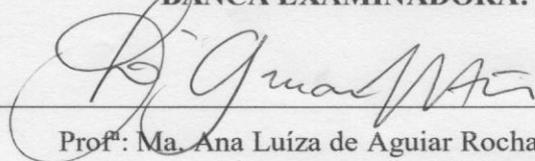
**DANIELY SAMPAIO ARRUDA TAVARES**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTINOCICEPTIVA DE  
DERIVADO SINTÉTICO TRIAZÓIS CONJUGADO COM FTALIMIDAS EM  
CAMUNDONGOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado  
ao Curso Bacharelado em Biomedicina do  
Centro Universitário Dr. Leão Sampaio,  
Campus Saúde, como requisito para obtenção  
do Grau de Bacharel em Biomedicina.

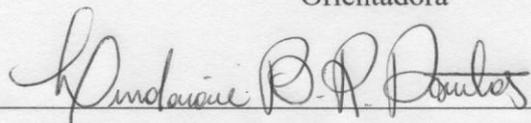
Aprovada em 10 de JUNHO de 2019.

**BANCA EXAMINADORA:**



Prof<sup>ª</sup>: Ma. Ana Luíza de Aguiar Rocha Martin

Orientadora



Prof<sup>ª</sup>: Ma. Lindaiane Bezerra Rodrigues Dantas

Examinadora 1



Prof<sup>ª</sup>: Ma. Raira Justino Oliveira Costa

Examinador 2

Juazeiro do Norte, CE.

2019

## AGRADECIMENTOS

Quero agradecer primeiramente a Deus pela dádiva da vida e outros prodígios que a mim são concedidos. A minha mãe Neuma e meu pai Pedro Neto pela educação e amor que dedicaram mesmo com as dificuldades impostas. A meu esposo Petrônio pelo apoio e força para jamais desistir dos meus objetivos. Meu filho Perseu e minha irmã Maria Ísis que chegou para deixar minha vida mais alegre e feliz. A minha sogra Núbia e meu sogro Pio que me acolheram como filha e me ajudam desde sempre a cuidar de meu filho me proporcionando trabalhar e estudar.

A minha orientadora Ana Luíza pela dedicação, paciência, ensinamentos e a oportunidade da experiência vivida nos testes que foi ótimo para meus conhecimentos sobre a pesquisa. O meu co-orientador Vanderlan que foi a pessoa que antes mesmo do TCC já me proporcionou a oportunidade de pesquisa do composto, me incentivou e ensinou bastante, sempre serei grata por toda confiança, espero que continuemos as pesquisas juntos.

UNILEÃO (Universidade Leão Sampaio) pela oportunidade do curso que sempre sonhei, UFPE (Universidade Federal de Pernambuco) pela sintetização do composto e FMJ (Faculdade de Medicina de Juazeiro do Norte) pela disponibilização dos laboratórios. Aos professores da banca de TCC I, Jaime e Rodrigo que contribuíram para correções necessárias no pré-projeto. E as professoras da banca de TCC II, Lindaiane e Raíra pela aceitação em contribuir para avaliação desse artigo. Aos professores, Ana Ruth (Coordenadora do Curso), Amanda Karine, Bruna Soares, Karol, Raquel, Allan, Sâmia, Fabrina, Vivianne, Fabíola e Wenderson que participaram da trajetória acadêmica, jamais esquecerei todo o aprendizado e conselhos partilhados.

Aos amigos (as) que me alegram e encorajam sempre: Meu irmão Denys; Petrucia minha cunhada; Ana Lúcia desde o ensino médio; Emanuella e Cinthya desde o início da faculdade; Larissa, Roberta, Oslaene, Cleópatra, Maria e Antônia que jamais esquecerei pela contagiante presença; Camilla e Keslivânia pela grande ajuda no final do experimento; Cléber, Letícia e Felipe pela ajuda e disponibilidade desde o início dos experimentos de TCC.

O laboratório Monera que me proporcionou estagiar, aprender muito mais e conhecer pessoas iluminadas como a Dra.Christianne, Acléssia, Dayna, Renata, Isabelle e Jéssica.

E por fim, a todos que direto ou indiretamente contribuíram para essa minha jornada, meu eterno agradecimento

# AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTINOCICEPTIVA DE DERIVADO SINTÉTICO TRIAZÓIS CONJUGADO COM FTALIMIDAS EM CAMUNDONGOS

<sup>1</sup>Daniely Sampaio Arruda TAVARES;

<sup>2</sup>Ana Luíza de Aguiar Rocha MARTIN.

## RESUMO

O objetivo deste presente trabalho foi avaliar a atividade anti-inflamatória e antinociceptiva *in vivo* de dois híbridos moleculares, os derivados de triazóis conjugados com ftalimidas. Trata-se de um estudo experimental com abordagem quantitativa. Foram utilizados camundongos machos *Swiss* com peso em torno de 25-30g para serem submetidos ao pré-tratamento via oral por gavagem, divididos em grupos: Grupo controle negativo os animais receberam solução salina; Grupo controle positivo os animais receberam 10mg/kg de indometacina no teste de edema de pata por carragenina e 10mg/kg de morfina no teste de dor por formalina; Grupo triazol-ftalimida os animais receberam o composto em grupos separados com doses de 10mg/kg e outro com 15mg/kg, em seguida todos os animais que receberam o pré-tratamento foram submetidos à indução do edema de pata por carragenina para avaliação da inflamação e para dor por formalina. O derivado triazol-ftalimida testado nesse estudo demonstrou possível atividade anti-inflamatória na dose de 15mg/kg e antinociceptiva nas doses de 10 e 15mg/kg, principalmente relacionado à dor provocada por mediadores inflamatórios. As buscas por substâncias mais eficazes e menos tóxicas ainda continua, espera-se que os dados desta pesquisa possam contribuir no desenvolvimento de estratégias para o planejamento de novos fármacos com segurança terapêutica.

**Palavras-chave:** Triazóis; Ftalimidas; Inflamação; Dor.

## ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate the anti-inflammatory and antinociceptive activity *in vivo* of two molecular hybrids, the triazoles derivatives conjugated to phthalimides. This is an experimental study with a quantitative approach. Male Swiss mice weighing around 25-30g were used to be submitted to oral pre-treatment by gavage, divided into groups: Negative control group the animals received saline solution; Positive control group animals received 10mg / kg indomethacin in the paw edema test by carrageenan and 10mg / kg morphine in the formalin pain test; Triazol-phthalimide group the animals received the compound in separate groups at doses of 10mg / kg and another at 15mg / kg, then all the animals that received the pretreatment were submitted to the induction of paw edema by carrageenan to evaluate the inflammation and for formalin pain. The triazole phthalimide derivative tested in this study demonstrated possible anti-inflammatory activity at a dose of 15mg / kg and antinociceptive at doses of 10 and 15mg / kg, mainly related to pain caused by inflammatory mediators. The search for more effective and less toxic substances is still ongoing, it is hoped that the data from this research may contribute to the development of strategies for the planning of new drugs with therapeutic safety.

**Key-words:** Triazoles; Phthalimides; Inflammation; Pain.

<sup>1</sup>Discente do curso Bacharelado em Biomedicina do Centro Universitário Dr. Leão Sampaio, [danielysarrudat@gmail.com](mailto:danielysarrudat@gmail.com), Juazeiro do Norte, Ceará, Brasil.

<sup>2</sup>Docente do curso Bacharelado em Biomedicina do Centro Universitário Dr. Leão Sampaio, [analuiza@leaosampaio.edu.br](mailto:analuiza@leaosampaio.edu.br), Juazeiro do Norte, Ceará, Brasil.

## 1 INTRODUÇÃO

A inflamação é a reação de defesa do organismo em virtude de impactos físicos, químicos ou biológicos que induz a ativação do sistema imunológico, desencadeando assim uma série de respostas. Os principais sinais do processo inflamatório são: dor, calor, rubor, edema e perda da função do tecido, que podem ocorrer de forma aguda ou crônica dependendo do agente causador (MONTENEGRO; FRANCO, 2008; PEREIRA, 2013).

O processo inflamatório é considerado uma ação fisiológica essencial na defesa do organismo durante as fases de regeneração, porém, quando existe persistência dos mediadores inflamatórios na execução de defesa podem ocorrer prejuízos ao tecido, comprometendo a integridade na função. Há várias doenças relacionadas com a inflamação, principalmente com a crônica, são exemplos: artrite reumatóide, lúpus eritematoso sistêmico, entre outros (GIBON et al., 2017; SILVA et al., 2013).

Um dos sintomas do processo inflamatório é a dor, descrita como experiência desagradável que tem função de alerta, e relaciona-se aos riscos que comprometem a integridade física ou desordem no sistema orgânico. A dor inflamatória se resulta na interação do tecido danificado com os neurônios sensoriais nociceptivos em associação a liberação de mediadores químicos (FERREIRA et al., 2009; PEREIRA, 2013).

O tratamento para a inflamação tem a finalidade em reduzir os sintomas e preservar a função do tecido lesionado, mas também sendo necessário e importante erradicar o responsável pela agressão tecidual. As classes mais utilizadas na terapêutica são Anti-Inflamatórios Não-Esteroidais (AINES) e os corticóides, entretanto, os medicamentos comercialmente disponíveis pertencentes a esses grupos apresentam alta taxa de toxicidade com ocorrência de efeitos adversos, principalmente no uso em longo prazo (BOZARAN; FURST, 2017).

Durante o uso de AINES pode haver desconfortos como dor estomacal e náuseas, induzindo o paciente a interromper o tratamento, também pode complicar o problema renal dos pacientes idosos com hipertensão e diabetes. Foi relatado em estudo o risco de interações medicamentosas, indicando possibilidade de toxicidade (LIMA et al., 2016). Assim, sendo os principais efeitos adversos que são clássicos dos AINES pelo bloqueio seletivo da enzima ciclooxigenases 2 (COX 2) são irritações gástricas, riscos cardiovasculares, problemas renais, hepatites, neutropenia, entre outros (MONTEIRO et al., 2008).

Os corticosteroides são associados pelo surgimento de efeitos adversos, principalmente quando necessário o uso por longo período de tempo devido resultado da sua ação hormonal. Alguns dos efeitos são dificuldade no processo de cicatrização, alteração no metabolismo de lipídios e carboidratos, alterações no comportamento, úlceras pépticas agudas, pancreatite aguda e supressão da resposta imunológica, esse último tem mais riscos associados quando relacionado às infecções envolvendo microrganismos (GEORGE; CHROUSOS, 2017).

A obtenção de novos fármacos com efeitos anti-inflamatórios que possuam menor efeito adverso é de grande benefício, visto que, esses efeitos são os maiores provocadores de insatisfação pelos usuários. Portanto, as estratégias terapêuticas e pesquisas de candidatos a novos fármacos são vantajosas, contribuindo assim para a evolução na qualidade do tratamento como também o uso de doses menores com maiores intervalos de tempo na posologia (SANGI, 2016; ANDRADE, 2017).

Comumente, quanto maior potência terapêutica do fármaco maior a possibilidade deste provocar efeitos adversos. Em pesquisas para descoberta de novos fármacos é cada vez mais aplicado estratégias de química medicinal, como a hibridização molecular, onde há o planejamento de moléculas bioativas com o intuito de melhoria das moléculas quanto a parâmetros farmacocinéticos e farmacodinâmicos, assim beneficiando a terapêutica do paciente que requer uma eficácia maior e rápida ação no alívio dos sintomas, e visando sempre a segurança (BARREIRO; FRAGA, 2015).

A síntese de compostos orgânicos tem função fundamental na produção de novos fármacos, com multiplicidade estrutural que colabora para métodos sintéticos avançados e reações químicas na complexação de diversas aplicações moleculares, progredindo na evolução e campo da área farmacológica (SANGI, 2016). Entre as técnicas de química orgânica para a síntese de compostos bioativos as reações de *click chemistry* têm se destacado devido às vantagens associadas e benefícios no planejamento racional de moléculas com propriedades biológicas, principalmente voltadas à descoberta de novos fármacos (KOLB; FINN; SHARPLESS, 2001).

No âmbito da busca de novos compostos bioativos, os triazóis e as ftalimidas são compostos sintéticos que demonstram na literatura obter diversas atividades biológicas inclusive o potencial anti-inflamatório com toxicidade reduzida sugerindo assim futuros fármacos para auxílio em tratamentos de doenças (ASSIS et al., 2012).

Estudo realizado por BACH e colaboradores (2017), os análogos sintéticos de ftalimidas inibiram a produção de óxido nítrico em que ocorreu diminuição do número de

átomos de carbono na cadeia *N*-alquila e dos halogenetos na cadeia de alquilo. A inibição da COX como ação anti-inflamatória e analgésica de um grupo de imidas cíclicas em conjugação com vários substituintes justifica o fortalecimento da molécula (ALANAZI et al., 2015; TOTOBENAZARA; BURKE, 2015). Outro estudo demonstrou que análogos de ftalimida revelou que os derivados possuem um grupo esférico alquílico com potente atividade bidirecional de regulação da produção de TNF- $\alpha$  (fator de necrose tumoral) (ABDEL-AZIZ et al., 2011).

Nesse contexto, o objetivo deste presente trabalho foi avaliar a atividade anti-inflamatória e antinociceptiva *in vivo* de dois híbridos moleculares, os derivados de triazóis conjugados com ftalimidas.

## **2 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 Tipos de estudo**

É um estudo experimental com abordagem quantitativa. Neste tipo de pesquisa foram definidas quantidades necessárias para avaliar estatisticamente, comparando com a forma de controle observado e os efeitos sobre condições pré-estabelecidas. Considerado o melhor tipo de pesquisa científica, pois proporciona maior confiabilidade em seus resultados (FONTELLES et al., 2009).

### **2.2 Animais e aspectos éticos**

O projeto foi encaminhado ao Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FMJ e aprovado de acordo com o número do protocolo: 2019.01-03.

Foram utilizados camundongos machos *Swiss* (25-30g) provenientes do Biotério da Faculdade de Medicina de Juazeiro (FMJ). Os animais ficaram alojados em gaiolas armazenadas em ambiente climatizado à temperatura média de  $21\pm 2^{\circ}\text{C}$ , sob condições de ciclo claro/escuro por 12h/12h com livre acesso a água potável e ração padrão.

Os manuseios dos animais procederam de acordo com a legislação vigente e os princípios éticos da experimentação animal estabelecidos pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e normas estabelecidas pela Sociedade Brasileira de Ciências em Animais de Laboratório (SBCAL).

Após os testes os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical. O volume administrado nos camundongos não excedeu 0,1mL/10g de peso corporal.

A padronização experimental que cada grupo contendo 8 animais foram estabelecidos o pré-tratamento via oral por gavagem da seguinte forma:

- I. Grupo controle negativo: Animais submetidos ao pré-tratamento com solução salina seguidos de indução de dor por teste de formalina e outro grupo para indução do edema de pata por teste de carragenina para avaliação da ação inflamatória, assim pode ser comparativo com os outros grupos, já que esse não possui substância ativa e conseqüentemente o efeito da indução esteve exacerbado;
- II. Grupo controle positivo: Animais submetidos ao pré-tratamento com 10mg/kg de morfina no teste de dor por formalina e em outro grupo os animais submetidos ao pré-tratamento com 10mg/kg de indometacina no teste de edema de pata por carragenina;
- III. Grupo triazol-ftalimida: Animais submetidos ao pré-tratamento na dose de 10mg/kg e em outro grupo os animais submetidos ao pré-tratamento na dose de 15 mg/kg.

### 2.3 Obtenções do composto

Os compostos derivados de ftalimidas contendo núcleos 1,2,3-triazólicos foram cedidos pelos professores MSc. Vanderlan Nogueira Holanda e Dra. Vera Lúcia de Menezes Lima, do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE. O derivado de ftalimida contendo núcleo 1,2,3-triazólico foi desenhado e sintetizado de acordo com SILVA et al. (2013). Os espectros de infravermelho foram registrados com um espectrofotômetro IFS66 Bruker usando discos de brometo de potássio (KBr).

Foram obtidos Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  em espectrómetro Varian Unity Plus a 400 MHz utilizando Dimetilsufóxido ( $\text{DMSO-d}_6$ ) como solvente. Os compostos foram purificados utilizando cromatografia em coluna em sílica gel Merck 60 (malha 70-230), com uma razão de sistema hexano: Acetato de etila (EtOAc) (1: 1). A pureza das frações foi monitorada em análise de TLC na placa GF<sub>254</sub>.

Os compostos azida e 1,2,3-triazóis foram preparados de acordo com o procedimento descrito na literatura. O composto ftalimida-triazol 4 (PT4) foi sintetizado em 93% de rendimento e apresentou as seguintes características: sólido incolor; ponto de fusão (pf) 187-189 °C (Lit. 157-158 °C); Rf 0,4 (EtOAc-hexano, 1: 1); Infravermelho (IV) (KBr)  $\nu_{\text{max}}$  3126, 2952, 1774, 1716, 1464, 1432, 1396, 1231, 1078, 765, 720  $\text{cm}^{-1}$ . A RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  estavam de acordo com dados previamente relatados (SIRION et al. 2010).

## 2.4 Reagentes

Os reagentes utilizados provenientes do laboratório EMS Sigma Pharma foram: Álcool iodado, álcool 70%, solução salina 9%, formalina 2%, carragenina a 1%, indometacina 50mg e morfina 10mg.

## 2.5 Teste de indução de edema de pata por carragenina

O teste escolhido para avaliar o processo inflamatório agudo foi o de edema de pata induzido por carragenina em que os animais precisaram ficar em jejum por quatro horas e foram divididos em grupos controle negativo com salina 0,9%, controle positivo pré-tratados com indometacina 10mg/kg e composto derivado 1,2,3-triazol-ftalimida nas doses de 10 e 15 mg/kg, aguardado 60 minutos para indução do edema de pata por 20 $\mu$ L de carragenina intraplantar (WINTER; RISLEY; NUSS, 1962).

Antes da indução do edema de pata foi realizada a medição da pata no tempo zero (administração basal) ou sem edema, posteriormente medição para avaliar a diferença entre o volume deslocado no pletismômetro da pata direita após 1h, 2h, 3h e 4h da indução. O resultado é expresso pela diferença de volume (ml) deslocado entre as patas medidas.

## 2.6 Teste de indução de dor por formalina

É utilizado para avaliação da nocicepção que foi injetado 20 $\mu$ L intraplantar de formalina a 2% em camundongos que determina o aparecimento de respostas motoras bem caracterizadas cuja quantificação permitiu a avaliação da intensidade da resposta antinociceptiva após o tratamento com 10mg/kg e 15mg/kg do derivado 1,2,3-triazol-ftalimida (HUNSKAAR; HOLE, 1987).

As duas fases da resposta a formalina têm mediação química e mecanismos de modulação distintos, apresentando diferenças marcantes quanto a sua sensibilidade às drogas analgésicas. Assim, a 1ª fase atribuída um caráter neurogênico, sendo sensível a analgésicos opióides, enquanto a 2ª fase mais bem caracterizada como dor de origem inflamatória, sensível a analgésicos anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) (ABBOTT; FRANKLIN; WESTBROOK, 1995; TJØLSEN, et al., 1992). O resultado foi expresso através do tempo gasto em segundos na lambadura de pata direita traseira.

## 2.7 Análise estatística dos dados

Os resultados apresentaram-se expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M). Foi utilizado o software Graph Pad prism. 5.0. Para a comparação múltipla dos parâmetros foi utilizado a Análise de Variância (ANOVA). O nível de significância entre os grupos foi determinado pelo teste de Dunnett's como *post hoc*. Em todas as análises foram considerados estatisticamente significantes os valores com  $p < 0,05$ .

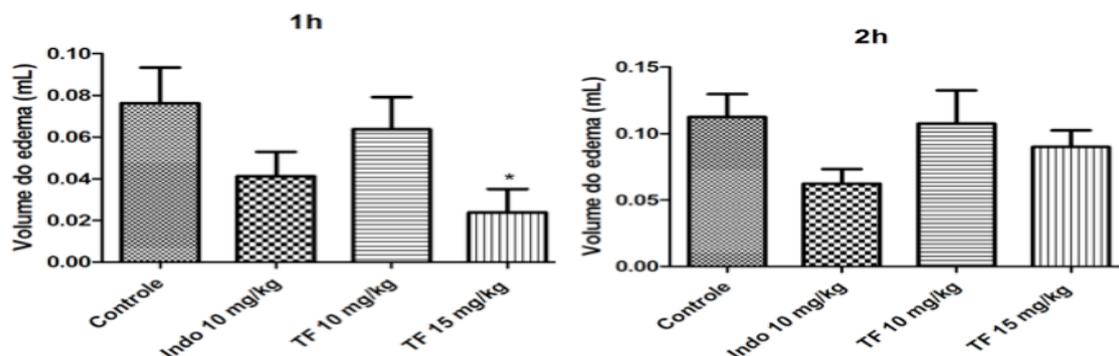
## 3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 3.1 Atividade anti-inflamatória - Teste da carragenina

Os animais divididos em grupos receberam pré-tratamento de acordo com o peso individual de cada um para posterior indução do edema de pata por carragenina a 1%. No controle negativo foi administrado nos animais por via oral água destilada com DMSO (dimetilsulfóxido) que é utilizado como diluente para o composto sintético, controle positivo indometacina que é anti-inflamatório não esteroide (AINE) em dose de 10mg/kg e o composto sintético TF (triazol-ftalimida) nas doses de 10 e 15mg/kg. Os valores foram todos expressos como média da diferença do volume do edema (VE) de pata em ml em relação ao tempo zero (volume sem edema) medidos em pletismômetro.

Na primeira e segunda hora da medição (gráfico 1A e 1B), os resultados mostram redução do volume, no entanto, os valores só foram significativos na dose mais alta (TF 15mg/kg) na primeira hora, não apresentando significância em nenhuma dose na segunda hora.

**Gráfico 1A e 1B:** Efeito da TF no edema de pata induzido por carragenina na primeira e segunda após indução do edema de pata por carragenina



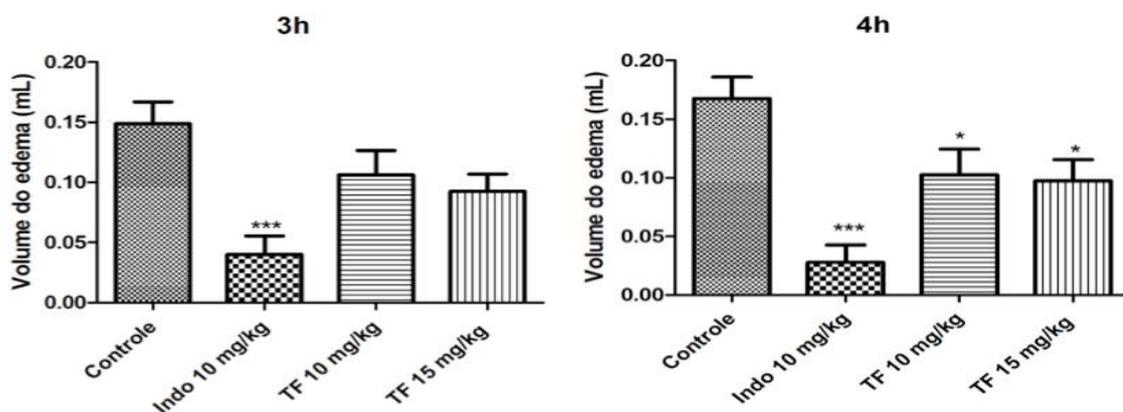
FONTE: Dados da pesquisa (2019). Os resultados foram expressos como média  $\pm$  E.P.M. em mL. \* $p < 0,05$

comparado com o grupo controle (água destilada com DMSO); A análise estatística foi realizada por meio do teste de variância ANOVA seguido pelo teste de Dunnett's.

O gráfico 2 apresenta o terceiro e quarto tempo na medição do volume da pata, o composto TF parece apresentar efeito anti-inflamatório (redução do volume da pata com  $p < 0,05$ ) nas dose de 10 e 15mg/kg, no entanto esse efeito só foi observado na última hora de teste (4h). O teste foi validado devido à redução significativa do edema pelo grupo da indometacina (controle positivo), visto que a terceira e quarta hora de medição são as mais importantes, pois após esse tempo é que se apresenta o pico inflamatório induzido pela carragenina (GODIN et al., 2015).

A carragenina promove ação de processo inflamatório intenso, inicialmente após a injeção intraplantar ocorre permeabilidade vascular mediada por histamina e conseqüentemente à liberação de citocinas como TNF-alfa e interleucinas. A fase que se tem o intenso edema é após a terceira hora da aplicação, caracterizando a ação das prostaglandinas, aumento de óxido nítrico e de neutrófilos para região (MORRIS, 2003; FERREIRA, 2009). Segundo BOZARAN E FURST (2017), o mecanismo de ação da indometacina se dá por inibição não seletiva da COX, inibe as fosfolipase A e C, reduz a migração de neutrófilos e diminui a proliferação das células T e B, conferindo assim ação anti-inflamatória.

**Gráfico 2A e 2B:** Efeito da TF no edema de pata induzido por carragenina na terceira e quarta hora



FONTE: Dados da pesquisa (2019). Os resultados foram expressos como média  $\pm$  E.P.M. em mL. \* $p < 0,05$  comparado com o grupo controle (água destilada); \*\*\*  $p < 0,001$  comparado com o grupo controle (água destilada com DMSO). A análise estatística foi realizada por meio do teste de variância ANOVA seguido pelo teste de Dunnett's.

No estudo de Assis et al (2019) os animais tratados com compostos derivados de triazol e ftalimida obtiveram diminuição da inflamação pelo teste de edema de pata por carragenina nas últimas horas de avaliação, isso sendo observado que quanto maior o tempo do intervalo mais o efeito anti-inflamatório foi evidenciado. Esse resultado corrobora com o observado no gráfico 2B em que no último tempo da medição do volume da pata dos animais, houve redução significativa do edema quando comparado aos resultados dos tempos anteriores medidos, primeira, segunda e terceira hora.

Do mesmo modo, o experimento de Assis et al (2012) com derivados sintéticos de triazóis conjugados com ftalimidas mostraram ter significantes valores anti-inflamatórios por teste de carragenina em camundongos administrando diferentes doses, como: 50, 100 e 200mg/kg. Além da indometacina, foram testados com outros AINES como controle positivo, exemplo o ácido acetilsalicílico (AAS) e o ibuprofeno.

Grande parte dos fármacos inibidores da COX-2 confere ação anti-inflamatória por serem ácidos carboxílicos em que se ligam no local estabelecendo ligações de hidrogênio acetilando os aminoácidos serina (Ser) 530 e tirosina (Tyr) 385 que são presentes na estrutura da COX, impedindo o acesso ao ácido araquidônico. Os efeitos anti-inflamatórios das ftalimidas estão relativamente relacionados ao fato de estabelecerem uma ligação a Ser530, já o triazol faz ligação mais fraca a Tyr385, porém, em algumas doses o triazol pode fazer ligações na Ser530 isso pode ser avaliado através do método de ancoragem molecular, pois possibilita saber a conformação do ligante ao alvo farmacológico (ASSIS et al., 2019).

ALANAZI et al (2015) revelou em sua pesquisa que as atividades das ftalimidas ou imidas cíclicas confere ação inibitória na inflamação pela porção heterocíclica em sua estrutura química, juntamente com os triazóis é importante pela presença do anel aromático no núcleo que obtém ação anti-inflamatória. Também ressaltou que as várias ligações de hidrogênio formadas com os aminoácidos adjacentes na estrutura da COX-2 são usadas para seus modos de ligação e afinidade nos sítios ativos da enzima.

Em outros estudos, as ftalimidas inibiram a produção de óxido nítrico estimulada por edema da pata traseira induzido por carragenina, mostrando assim que os compostos possuíam atividade anti-inflamatória significativa em comparação com o padrão de drogas. Os altos níveis de óxido nítrico são também considerados como biomarcador para distúrbios inflamatórios e alvo útil para a aquisição de agentes anti-inflamatórios. (BACH et al, 2017).

O potencial biológico e características bioquímicas de heterocíclicos tem despertado a atenção da comunidade científica pela possibilidade de realizar ligações a hidrogênio e ter afinidade a alvos farmacológicos. Nessa classe existem os triazóis que são compostos orgânicos de anel aromático com cinco membros, sendo três átomos de nitrogênio e dois átomos de carbono com isômeros triazólicos 1,2,3-triazol e 1,2,4-triazol. O composto 1,2,3-triazol classificado em monocíclicos, benzotriazóis e sais triazólicos (DHEER; SINGH; SHANKAR, 2017; SIDDIQUI et al., 2011; WAHI; SINGH, 2011).

Os heterocíclicos 1,2,3-triazólicos apresentam amplas atividades biológicas relacionadas. Dentre as principais pesquisas com estas moléculas, tem sido comprovado o potencial: antitumoral, antiparasitário, antibacteriano, antifúngico, anti-inflamatório, antinociceptivo e antiviral. Dentre as atividades citadas, a ação anti-inflamatória merece destaque e estudos revelam que moléculas contendo núcleo triazólico promoveram a redução de neutrófilos no tecido subcutâneo inflamado com LPS inibindo a 5-lipoxigenase (FREITAS et al., 2011; SHARMA et al., 2017).

Segundo SHAFI et al (2012), derivados triazólicos conjugados a outras moléculas demonstraram ótimos efeitos anti-inflamatório e antinociceptivo em testes bioquímicos e teste de carragenina comparados com medicamentos usados na clínica. E de acordo com RAJASEKARAN E RAJAGOPAL (2009) constatou que os compostos derivados de triazóis são ativos promissores atividade antinociceptiva.

Já os derivados de ftalimidas, as imidas cíclicas, têm se mostrado compostos promissores no campo da química medicinal. Dentre as atividades já estudadas, tem-se ação antifúngica, bactericida, diurética, antitumoral, antiparasitária e anti-inflamatória *in vivo* e *in vitro* (MISHRA et al., 2018; COSTA et al., 2018; ZAHRAN et al, 2018).

Recentemente tem sido descrito o potencial antioxidante de ftalimidas, após verificação através do método de combate radical livre em ensaio com DPPH (ARIF et al., 2018). A porção heterocíclica das imidas em ligação com o nitrogênio melhora suas atividades anti-inflamatórias deste composto que pode estar associada à sua estabilidade lipofílica (HARGREAVES; PRITCHARD; DAVE, 1970).

DHEER, SINGH E SHANKAR (2017) descreveram que além da capacidade de se ligar com aminoácidos da COX e inibir óxido nítrico, os derivados de triazóis conjugados com ftalimidas exibiram considerável inibição da enzima GSK-3b (glicogênio sintase quinase 3 beta) porque a enzima GSK-3 está envolvida em diversos processos celulares durante a patogênese de doenças incluindo a inflamação.

A GSK-3 está envolvida na atividade de fatores de transcrição de várias moléculas que são importantes para funções imunológicas, regulando a fase pró-inflamatórias e aumentando a produção de citocinas. No experimento de atividade anti-inflamatória *in vivo* em modelo de edema de pata reduziram as citocinas inflamatórias TNF alfa e interleucina do tipo 6 em comparação com a indometacina, o medicamento anti-inflamatório padrão (YUNFEI et al., 2018).

Um estudo que avaliou a toxicidade da ftalimida indicou que a doses acima de 50mg/kg é necessária para a atividade anti-inflamatória e está na faixa terapêutica segura. Este limite de dose dos compostos não resultou em qualquer letalidade ou alterações comportamentais observáveis, tais como contorções, respiração ofegante, palpitações e diminuição da frequência respiratória nos animais tratados (ASSIS et al., 2013). No entanto, em nosso estudo o composto TF apresentou atividade na redução do edema em doses menores, o que não exclui a necessidade de mais estudos com doses intermediárias a essa.

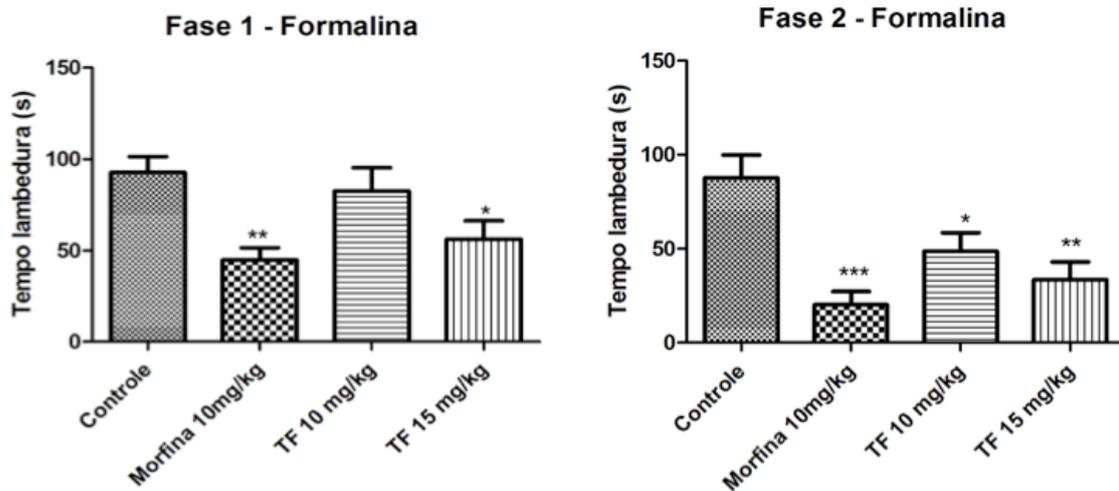
As ftalimidas fazem parte da classe das imidas cíclicas e está sendo pesquisada quanto à capacidade de inibição da COX. Os estudos moleculares podem auxiliar na compreensão das interações envolvidas entre os ligantes e as enzimas, e desta forma, projetar novos inibidores mais potentes no que diz respeito aos requisitos farmacofóricos para a inibição da COX-2 (ALANAZI et al, 2015).

### **3.2 Atividade antinociceptiva - Teste da formalina**

Os animais foram pré-tratados por via oral 1 hora antes da indução de formalina a 2% intraplantar e de acordo com o peso individual foram administrados água destilada com DMSO para o grupo controle, 10mg/kg de morfina no grupo controle positivo e TF nas doses de 10 e 15mgkg nos grupos testes.

A primeira fase da formalina que corresponde aos primeiros 5 minutos de observação e denota a fase neurogênica da dor, aquela que depende, principalmente, da ativação de nociceptores e mediação da substância P. O TF na dose de 10mg/kg não apresentou redução significativa. No entanto, na dose de 15mg/kg, reduziu significativamente ( $p < 0,05$ ) o tempo de lambadura da pata traseira dos animais quando comparado ao controle, redução essa, menos intensa que a provocada pela morfina ( $p < 0,01$ ) como controle positivo de fármaco referência no tratamento de dor. A morfina foi utilizada para comparativo de ação inibitória da dor, pois é um fármaco protótipo dos analgésicos opióides, com capacidade de aliviar a dor intensa com eficácia notável (SCHUMACHER; BASBAUM; NAIDU, 2017).

**Gráfico 3A e 3B:** Efeito de TF na indução da dor por formalina.



FONTE: Dados da pesquisa (2019). Os resultados foram expressos como média  $\pm$  E.P.M. em segundos. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  comparado com o grupo controle (água destilada com DMSO). A análise estatística foi realizada por meio do teste de variância ANOVA seguido pelo teste de Dunnett's.

Na segunda fase do teste, que representa a dor mediada pela liberação e mediadores inflamatórios como prostaglandinas e bradicinina, o derivado TF mostrou maior potencial antinociceptivo, como mostra gráfico 3. Nesta fase, as duas doses (10 e 15mg/kg) se mostraram efetivas significativamente na redução do tempo de lambedura da pata e a maior dose obteve redução de maior significância ( $p < 0,01$ ) quando comparada a primeira fase ( $p < 0,05$ ).

Após a aplicação da formalina na pata direita traseira, os animais foram avaliados quanto ao tempo da lambedura da pata durante 5 minutos que se considera fase I. Esperou-se por 20 minutos e logo retomada a leitura por mais 5 minutos, fase II. A primeira fase iniciou-se imediatamente após a injeção de formalina e se estendeu pelos primeiros 5 minutos (dor neurogênica ou aguda), estando relacionada com a estimulação química direta dos nociceptores das fibras aferentes do tipo C e, em parte, das fibras do tipo  $A\delta$  que está associada à liberação de aminoácidos excitatórios, óxido nítrico e substância P. A segunda fase ocorre entre 15 e 30 minutos após a injeção de formalina e está relacionada com a liberação de vários mediadores pró-inflamatórios, como bradicinina, prostaglandinas, entre outros. O intervalo entre a primeira e a segunda fase é resultado de uma inibição da transmissão nociceptiva através de circuitos supra-espinhais (ABBOTT; FRANKLIN; WESTBROOK, 1995).

A maior eficácia do derivado TF na segunda fase corrobora com o resultado anti-inflamatório encontrado no teste do edema de pata induzido pela carragenina, que na quarta hora mostrou-se como potencial anti-inflamatório devido à redução significativa do edema na dose de 15mg/kg, pois outros estudos demonstram a atuação dos derivados sobre as ciclooxigenases. Para o efeito antinociceptivo, a dose de 10mg/kg também demonstrou efeito significativo, diferentemente do que foi encontrado no teste da carragenina, na qual a dose de 10mg/kg não apresentou efeito significativo em nenhum tempo do percurso do teste. É possível que em doses próximas ou maiores que 50mg/kg, esse efeito seja evidenciado (ASSIS et al, 2012; ASSIS et al., 2019).

O estudo realizado por ASSIS et al (2019) em diversas doses superiores a 200mg/kg não apresentou toxicidade nos testes e nem nos exames histopatológicos, comprovando bons resultados na ação inflamatória com risco reduzido. A elevada atividade antinociceptiva foi demonstrada por diversos métodos e exibiram potente atividade antinociceptiva dos compostos derivados de ftalimidas mesmo com resultados inferiores quando comparados aos medicamentos de referência utilizados, pois foi visto que esse efeito é dependente da dose utilizada, então foi comprovado por várias doses superiores a 70mg/kg que se tem o efeito antinociceptivo (ALANAZI et al, 2015).

Animais submetidos a teste de dor por formalina pré-tratados com derivados de ftalimidas nas doses de 125, 250, 500 e 750mg/kg apresentaram efeito significativo da antinocicepção nas duas fases do teste. Este modelo experimental de dor permite avaliar tanto resposta nociceptiva quanto inflamatória, sendo útil para selecionar candidatos analgésicos, englobando mecanismos centrais da inflamação (GODIN et al., 2015).

#### **4 CONCLUSÃO**

O derivado triazol-ftalimida testado nesse estudo demonstrou possível atividade anti-inflamatória na dose de 15mg/kg e antinociceptiva nas doses de 10 e 15mg/kg, principalmente relacionada à dor provocada pelos mediadores inflamatórios. Estudos sobre dose-resposta são pertinentes para o conhecimento da resposta proporcional a dose administrada.

No entanto, novos estudos com doses maiores e outros ensaios que confirmem ou identifiquem novas possibilidades e/ou mecanismos de ação pelos quais esses derivados exerçam esse potencial. A busca por substâncias mais eficazes e menos tóxicas ainda continua.

O interesse em conhecer esses derivados proporciona a reestruturação da molécula para melhor ação biológica com menos risco de efeitos adversos, sendo assim um ótimo promissor para futuros tratamentos de doenças que envolvam aspectos de inflamação e dor, pois há diversas doenças relacionadas à inflamação aguda ou crônica e os tratamentos existentes ainda causam preocupação quanto ao risco de toxicidade.

Espera-se que com os dados desta pesquisa possam contribuir para desenvolvimento de estratégias para o planejamento de novos fármacos com atividades anti-inflamatórias comprovadas e segurança terapêutica eficaz.

## REFERÊNCIAS

ABBOTT, F.V. FRANKLIN, K.B.J. WESTBROOK, R.F The formalin test: scoring properties of the first and second phases of the pain response in rats. **Pain**, v. 60, n.1. 1995.

ABDEL-AZIZ, A.A.M. et al. Synthesis, anti-inflammatory activity and COX-1/COX-2 inhibition of novel substituted cyclic imides. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.1, n.46. 2011.

ALANAZI, A.M. et al. Structure-based design of phthalimide derivatives as potential cyclooxygenases-2 (COX-2) inhibitors: Anti-inflammatory and analgesic activities. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.92, n.1. 2015.

ANDRADE, F.A. Atividade de compostos naturais e sintéticos na presença de espécies de cãndida. 2017. **Dissertação (Mestrado em Biologia da Relação Parasito Hospedeiro)**, Universidade Federal de Goiás, Goiânia. 2017.

ARIF, R. et al. Synthesis, molecular docking and DNA binding studies of phthalimide-based copper(II) complex: In vitro antibacterial, hemolytic and antioxidant assessment.. **Journal of Molecular Structure**, v. 1160, n.1. 2018.

ASSIS, S.P.O. et al. Synthesis and Anti-Inflammatory Activity of New Alkyl-Substituted Phthalimide 1H-1,2,3-Triazole Derivatives. **Scientific World Journal**, n.1, v.2. 2012.

ASSIS, S.P.O. et al. Synthesis, hypolipidemic, and anti-inflammatory activities of arylphthalimides. *Medicinal chemistry research*, v.1, n1. 2013.

ASSIS, S.P.O. et al. Design and Synthesis of Triazole-Phthalimide Hybrids with Antiinflammatory Activity. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v.67, n.2. 2019.

BACH, D.H. et al. Synthesis and biological activity of new phthalimides as potential anti-inflammatory agentes. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.1, n.25. 2017.

BARREIRO, E.J.; FRAGA, C.A.M. Química medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos, 3ª ed. Porto Alegre: **Artmed**, 2015.

BORAZAN, N.H.; FURST, D.E. Fármacos anti-inflamatórios não esteroides, fármacos antirreumáticos modificadores da doença, analgésicos não opióides e fármacos usados na gota. In KATZUNG, B.G.; TREVOR, A.J. **Farmacologia básica e clínica**, 13ª ed. Porto Alegre: AMGH. 2017.

COSTA, D. et al. Synthesis and evaluation of the cytotoxic activity of Furanaphthoquinones tethered to 1H-1,2,3-triazoles in Caco-2, Calu-3, MDA-MB231 cells. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 156, p. 524-533. 2018.

DHEER, D.; SINGH, V.; SHANKAR, R. Medicinal attributes of 1,2,3-triazoles: Current developments. **Bioorganic chemistry**, v.1, n.71. 2017.

FERREIRA, S.H. et al. Dor inflamatória. In NETO, O.A. Dor: princípios e prática. Porto Alegre: **Artmed**, 2009.

FONTELLES, M.J. et al. Metodologia da pesquisa científica: diretrizes para a elaboração de um protocolo de pesquisa. **Scientific research methodology: guidelines for elaboration of a research protocol**, v.1, n.1, 2009.

FREITAS, L.B.O. et al. A reação “click” na síntese de 1,2,3-triazóis: aspectos químicos e aplicações. **Química nova**, v. 34, n. 10. 2011.

GEORGE, P. CHROUSOS, M.D. Adrenocorticosteroides e antagonistas adrenocorticais. In KATZUNG, B.G.; TREVOR, A.J. **Farmacologia básica e clínica**, 13ª ed. Porto Alegre: AMGH. 2017.

GIBON, E. et al. Inflammation, ageing, and bone regeneration. **Journal of orthopaedic**, v.1, n.1. 2017.

GODIN, A.M. et al. Activities of 2-phthalimidethyl nitrate and 2-phthalimidethanol in the models of nociceptive response and edema induced by formaldehyde in mice and preliminary investigation of the underlying mechanisms. **European Journal of Pharmacology**, v.756, n.1. 2015.

HARGREAVES, M.K; PRITCHARD, J.G; DAVE, H.R. Cyclic carboxylic monoimides. **Chemical Review**, v.70, n.4. 1970.

HUNSKAAR, S.; HOLE, K.; The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain**, v. 30, n. 1. 1987.

KOLB, H.C.; FINN, M.G.; SHARPLESS, K.B. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angew. Chemical International Reviews*, v.1, n.40. 2001.

LIMA, T.A.M. et al. Análise de potenciais interações medicamentosas e reações adversas a anti-inflamatórios não esteroides em idosos. *Revista brasileira de geriatria e gerontologia*, v.19, n.3. 2016.

MISHRA, S. et al. Rational modification of a lead molecule: Improving the antifungal activity of indole e triazole e amino acid conjugates. *Journal of Medicinal Chemistry*. India, v. 155, p. 658-669. 2018.

MONTEIRO, E.C.A. et al. Os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs). *Temas de reumatologia clínica*, v.9, n.2. 2008.

MONTENEGRO, M.R.; FRANCO, M. *Patologia processos gerais*, 4ª Ed. São Paulo: Atheneu, 2008.

MORRIS, C.J. Carrageenam-induced paw edema in the rat and mouse. *Methods in molecular biology*, v.225, n.1. 2003.

PEREIRA, F.E.L. Inflamações. In FILHO, G.B. *Bogliolo Patologia geral*, 5ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2013.

RAJASEKARAN, A.; RAJAGOPAL, K.A. Synthesis of some novel triazole derivatives as anti-nociceptive and anti-inflammatory agentes. *Acta Pharmacology*, v.59, n.1. 2009.

SANGI, D.P. Estratégias de síntese na descoberta de fármacos: o emprego da síntese orientada pela diversidade estrutural. *Química nova*, v.39, n.8. 2016.

SIDDIQUI, N. et al. Triazoles: as potential bioactive agentes. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, v.8, n.29. 2011.

SILVA, G. B. et al. Ultrasound- Assisted Synthesis of 1-N- $\beta$ -D-Glucopyranosyl-1H-1,2,3-triazole Benzoheterocycles and their Anti-Inflammatory Activities. *Journal Braz Chemistry Society*, v.24, n.1. 2013.

SIRION, U. et al. Azide/Alkyne Resins for Quick Preparation of 1,4-Disubstituted 1,2,3-Triazoles. *Bull Korean Chem Society*, v.31, n.1. 2010.

SHARMA, P. et al. Effect of Sulfamic Acid on 1,3-Dipolar Cycloaddition Reaction: Mechanistic Studies and Synthesis of 4-Aryl-NH-1,2,3-triazoles from Nitroolefins. *Journal Brazilian Chemical Society*, v.28, n.4. 2017.

SHAFI, S. et al. Synthesis of novel 2-mercapto benzothiazole and 1,2,3-triazole based bis-heterocycles: Their anti-inflammatory and anti-nociceptive activities. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v.49, n.1. 2012.

SCHUMACHER, M.A. BASBAUM, A.I. NAIDU, R.K. Agonistas e antagonistas opióides. In KATZUNG, B.G.; TREVOR, A.J. *Farmacologia básica e clínica*, 13ª ed. Porto Alegre: AMGH. 2017.

TOTOBENAZARA, J.; BURKE, A.J. New Click-Chemistry Methods for 1,2,3-triazoles Synthesis: Recent Advances and Applications. **Tetrahedron Letters**, v.22, n.1. 2015.

TJØLSEN, A. et al. The formalin test: an evaluation of the method. **National Center for Biotechnology Information**, v. 51, n.1. 1992.

WAHI, A.K. ; SINGH, A. Triazole: Recent Development and Biological Activities. **Asian Journal of Biochemical and Pharmaceutical Research**, v.1, n. 2. 2011.

WINTER, C. A.; RISLEY, E. A.; NUSS, G. W. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 111, n.1. 1962.

YUNFEI, G. et al. Detection of GSK-3 $\beta$  activation index in pediatric chronic tonsillitis is an indicator for chronic recurrent inflammation. **American Journal of Otolaryngology**, v.39, n.3. 2018.

ZAHRAN, M.A.H. et al. Design, synthesis, biological evaluations, molecular docking, and in vivo studies of novel phthalimide analogs. **Archives Pharmacology Chemical Life Science**, v. 5, n. 351. 2018.

## PARECER CEUA - ESTÁCIO/FMJ

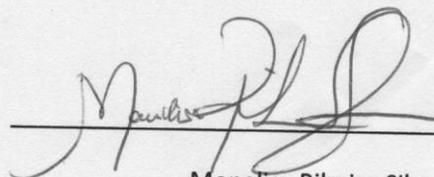
**Protocolo número: 2019.01-03**

**Título do Projeto:** "Avaliação da atividade anti-inflamatória e antinoceptiva de derivados sintéticos triazóis e ftalimidas em camundongos".

**Responsável pelo projeto:** Ana Luíza de Aguiar Rocha Maritn

A comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Estácio de Juazeiro do Norte decidiu pela **APROVAÇÃO** dos procedimentos éticos apresentados neste protocolo.

Juazeiro de Norte/CE, 07 de Junho de 2019



Monalisa Ribeiro Silva

Presidente da CEUA