



**RENORBIO**

**Programa de Pós-graduação em Biotecnologia**

**ESTUDO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA DE  
PROTÓTIPOS DE FÁRMACOS**

Walfrido Bispo Junior

Maceió – AL

2013



**Universidade Federal de Alagoas – Ponto Focal**  
**Instituto de Química e Biotecnologia – IQB**  
**Rede Nordeste de Biotecnologia - Renorbio**  
**Programa de Pós-graduação em Biotecnologia**

Walfrido Bispo Junior

**ESTUDO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA DE  
PROTÓTIPOS DE FÁRMACOS**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia –  
PPG-B

**Área de Concentração:** Biotecnologia em Saúde

**Linha de Pesquisa:** Desenvolvimento de agentes profiláticos, terapêuticos e testes  
de diagnósticos.

**Prof. Orientadora:** Dra. Magna Suzana Alexandre Moreira

**Prof. Co-orientador (a):** Dra. Lidia Moreira Lima

Dr. Eliezer J. Barreiro

Maceió- AL

2013

**Catlogação na fonte**  
**Universidade Federal de Alagoas**  
**Biblioteca Central**  
**Divisão de Tratamento Técnico**

**Bibliotecária Responsável: Fabiana Camargo dos Santos**

B622e Bispo Júnior, Walfrido.  
Estudo da atividade antinociceptiva e anti-inflamatória de protótipos de fármacos / Walfrido Bispo Júnior. – 2013.  
125 f. : il.

Orientadora: Magna Suzana Alexandre Moreira.  
Co-orientadores: Lidia Moreira Lima, Eliezer Jesus Barreiro.  
Tese (doutorado na Rede Nordeste de Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. RENORBIO. Maceió, 2013.

Bibliografia: f. 71  
Artigos derivados da tese publicados: f. 91.

1. N-acilidrazonas. 2. Anti-inflamatórios – Avaliação farmacológica.  
3. Estrutura privilegiada. 4. Piroxicam. 5. Complexos de zinco (II).  
I. Título.

CDU: 54:615.276

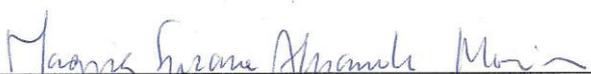
WALFRIDO BISPO JÚNIOR

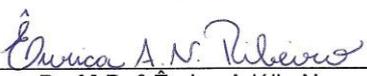
**ESTUDO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA DE  
PROTÓTIPOS DE FÁRMACOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO, Ponto Focal Alagoas, Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia, Área de Concentração: Biotecnologia em Saúde.

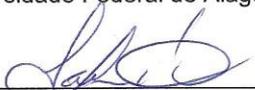
Aprovada em: 06/03/2013.

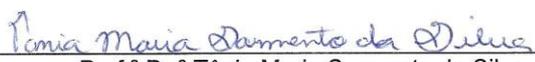
BANCA EXAMINADORA

  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Magna Suzana Alexandre Moreira (Orientadora)  
Universidade Federal de Alagoas – UFAL

  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Éurica Adélia Nogueira Ribeiro  
Universidade Federal de Alagoas – UFAL

  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Fabiane Caxico de Abreu Galdino  
Universidade Federal de Alagoas – UFAL

  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Salete Smariotto  
Universidade Federal de Alagoas – UFAL

  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Tânia Maria Sarmento da Silva  
Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE



Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia  
Universidade Federal de Alagoas  
BR 104 Km 14, Campus A. C. Simões – Tabuleiro dos Martins  
57072-970, Maceió- AL - Telefone: (82) 3214-1384 – Homepage: www.renorbio.org.br

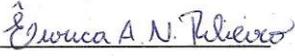
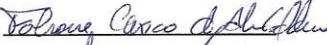
## FOLHA DE APROVAÇÃO – DEFESA DE TESE

ALUNO: Walfrido Bispo Júnior

TÍTULO DO PROJETO: "Estudo da atividade antinociceptiva e anti-inflamatória de protótipos de fármacos"

PROFESSORA ORIENTADORA: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Magna Suzana Alexandre Moreira

### BANCA EXAMINADORA:

	CONCEITO	ASSINATURA
Prof. <sup>a</sup> Dr. <sup>a</sup> Magna Suzana A. Moreira - UFAL (Orientadora/Presidente)	<u>A</u>	
Prof. <sup>a</sup> Dr. <sup>a</sup> Êurica Adélia Nogueira Ribeiro – UFAL (Examinadora)	<u>A</u>	
Prof. <sup>a</sup> Dr. <sup>a</sup> Fabiane Caxico de Abreu Galdino – UFAL (Examinadora)	<u>A</u>	
Prof. <sup>a</sup> Dr. <sup>a</sup> Salete Smaniotto - UFAL (Examinadora)	<u>A</u>	
Prof. <sup>a</sup> Dr. <sup>a</sup> Tânia Maria Sarmento da Silva - UFRPE (Examinadora)	<u>A</u>	

### DATA DA APROVAÇÃO:

HORÁRIO:

LOCAL: Sala 102 do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde – ICBS, da Universidade Federal de Alagoas.

*Aos meus pais, Cleide e Walfrido, que são muito importantes na minha vida e que não mediram esforços para que conseguisse alcançar meus objetivos. As minhas irmãs (Clébia e Cledja) e aos meus sobrinhos (Dayan, Dário, Djaci e Stéphanie) pelo carinho, atenção e amizade. Obrigado por tudo!*

## AGRADECIMENTOS

*A Deus, mestre dos mestres, meu agradecimento pela força que me deu nesta caminhada, pelos momentos de vitória e sucesso, pedindo serenidade e coragem para enfrentar o que vem pela frente;*

*Aos meus pais Walfrido Bispo e Cleide Lins, pelo amor, carinho e compreensão, por acreditar em meus sonhos;*

*A Profa. Dra Magna Suzana Alexandre Moreira, pela orientação, paciência, amizade, dedicação e ensinamentos transmitidos os quais jamais serão esquecidos;*

*A toda equipe do LASSBio<sup>®</sup>, especialmente aos meus co-orientadores Profa Dra. Lidia Moreira Lima e Prof. Dr. Eliezer J. Barreiro pelas orientações dadas durante a realização deste trabalho;*

*A Amanda Silva de Miranda e Gabrieli L. Parrilha, pelo planejamento e síntese dos compostos-teste utilizados para realização da tese;*

*Aos meus colegas do Serviço de Farmácia do Hospital Universitário Prof. Alberto Antunes, pelo afastamento, em especial, Aislane Carlos que assumiu minhas atividades no CACON;*

*Aos atuais e ex-membros do LaFI, pelo auxílio e paciência: Aline Queiroz, Everton Tenório, Carol Brito, Thays Matos, Anne Priscila, Mariana, Yolanda Karla, Morgana, Débora, Angélica, Diogo, Diego, Anansa, Luiz Henrique, Ariane Priscila, Amanda, Carol, Maria Alice e Priscila;*

*Aos meus amigos Antônio Lucena e Tássio Paiva pela amizade e paciência;*

*A FAPEAL/CNPQ/CAPES/INCT pelo apoio financeiro.*

*Compreender as coisas que nos rodeiam é a  
melhor preparação para compreender que há  
mais além.*

*Hipátia de Alexandria*

## RESUMO

Neste trabalho foi realizada a avaliação da atividade antinociceptiva e anti-inflamatória de duas séries de derivados *N*-acilidrazonas (NAH) racionalmente planejadas e sintetizados pelo LASSBio<sup>®</sup> da UFRJ. A primeira série é formada de 4 compostos, sendo 2 complexos metálicos gerados a partir da coordenação dos protótipos LASSBio-466 e LASSBio-1064 e 2 protótipos LASSBio-466 e LASSBio-1064. A segunda série formada por 8 derivados, desenhados como análogos estruturais do piroxicam. Foram realizados modelos funcionais de nocicepção química (contorção abdominal induzida por ácido acético 0,1N, ensaio de formalina), nocicepção térmica (ensaio da placa quente), ensaio de migração celular (peritonite induzido por zymosan A e/ou induzido por carragenina) ensaio de avaliação de inibição da COX-1/COX-2. Todos os compostos e padrões foram administrados 40 min antes do início ensaio (vo) na dose de 100 µmol/kg. Na primeira série, a constrição animal induzida por ácido acético foi inibida por todos os compostos estudados, destacando-se o [Zn(LASSBio-466)H<sub>2</sub>O]<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>LASSBio-1064 que inibiram (p<0,01) em 82,7% (p<0,01) e 81,3% (p<0,01) o número de contorções, enquanto o fármaco-padrão (dipirona) inibiu em 77,7% (p<0,01). Na primeira fase do ensaio de formalina o H<sub>2</sub>LASSBio-1064 e H<sub>2</sub>LASSBio-466 reduziram o tempo de latência de lambida em 53,1% (p<0,05) e 46,5% p<0,01), respectivamente. Já na segunda fase do ensaio os compostos H<sub>2</sub>LASSBio-1064 e [Zn(LASSBio-466) H<sub>2</sub>O]<sub>2</sub> reduziram o tempo de latência de lambida em em 48,5% (p<0,05) e 37,3% (p<0,05), respectivamente. Todos os compostos mostraram níveis de inibição da peritonite induzida por zymosan comparáveis ou superiores à indometacina (fármaco padrão). Na segunda série, os compostos mostraram-se ativas no ensaio de contorções abdominais induzida por ácido acético destacando-se o LASSBio-1638, LASSBio-1639 e LASSBio-1604 que inibiram as contorções abdominais em 84,0% (p<0,01), 82,7% (p<0,01) e 90,4% (p<0,01), respectivamente, ao passo que o piroxicam (fármaco padrão) inibiu em 95,4% (p<0,01). No teste de formalina, apenas LASSBio-1617 inibiu significativamente a atividade nociceptiva na primeira fase em 58,2% (p <0,01). Na segunda fase o LASSBio-1637, LASSBio-1638 inibiram a atividade nociceptiva em 60,0% (p <0,05), e 54,2% (p <0,05), respectivamente, e o piroxicam inibiu em 53,9% (p <0,01). Em modelos de inflamação aguda, os compostos apresentaram atividade inibitória sobre a migração celular semelhante ou maior que o piroxicam. No ensaio de peritonite aguda induzida por carragenina os compostos LASSBio-1604, LASSBio-1637, LASSBio-1638 e LASSBio-1639 inibiram a migração celular em 74,2% (p<0,01), 73,2% (p<0,01), 77,6% (p<0,01) e 81,8% (p<0,01), respectivamente, ao passo que o piroxicam inibiu 25,5% (p<0,01). Os compostos LASSBio-1637, LASSBio-1638 e LASSBio-1639 destacaram-se no ensaio de peritonite aguda induzida por zymosan A, inibindo a migração celular em 78,6% (p<0,01), 81,2% (p<0,01) e 82,7% (p<0,01), mostrando-se, nesse ensaio, mais ativos que o piroxicam (57,3%). LASSBio-1604 e LASSBio-1617 inibiram a enzima COX *in vitro*, apresentando, respectivamente, valores de CI50 de 0,22 M e 0,28 M para inibição de COX-1 e 0,24 M e 0,26 M para inibição de COX-2. Os resultados da avaliação farmacológica sugerem que, na primeira série, a coordenação do zinco (II) é uma boa estratégia para melhorar a atividade antinociceptiva do composto H<sub>2</sub>LASSBio-466 associada a dor inflamatória, e na segunda série, que todos compostos apresentam atividades antinociceptiva e anti-inflamatória semelhantes ou superiores ao piroxicam.

**Palavras-Chaves:** *N*-acilidrazonas. Anti-inflamatório. Estrutura privilegiada. Avaliação Farmacológica. Piroxicam. Complexos de Zinco (II).

## ABSTRACT

This work was conducted to evaluate the activity anti-inflammatory and antinociceptive two series of derivatives of N-acilidrazonas (NAH) rationally designed and synthesized by LASSBio® UFRJ. The first series consists of four compounds, being two metal complexes generated from the coordination of prototypes LASSBio-1064 and LASSBio-466 and second prototype LASSBio-1064 and LASSBio-466. The second series comprised eight derivatives, designed as structural analogues of piroxicam. Were performed nociception models of functional chemical (writhing induced by acetic acid 0.1 N, formalin test), thermal nociception (hot plate test), cell migration assay (peritonitis induced by zymosan A and / or induced by carrageenin) assay evaluation of inhibition of COX-1/COX-2. All compounds and standards were administered 40 min before starting the test (p.o) at a dose of 100 mmol / kg. In the first series, Animal constriction induced by acetic acid was inhibited by all the compounds studied, highlighting the  $[Zn(LASSBio-466)H_2O]_2$  and H2LASSBio-1064 that inhibited ( $p < 0.01$ ) at 82.7 % ( $p < 0.01$ ) and 81.3% ( $p < 0.01$ ) the number of writhes, as the standard drug (dipyrone) inhibited 77.7% ( $p < 0.01$ ). In the first phase of the formalin test H2LASSBio-466 and H2LASSBio-1064 reduced the latency time to lick 53.1% ( $p < 0.05$ ) and 46.5% ( $p < 0.01$ ), respectively. In the second phase of the test compounds H2LASSBio-1064 and  $[Zn(LASSBio-466)H_2O]_2$  reduced the latency time to lick at 48.5% ( $p < 0.05$ ) and 37.3% ( $p < 0.05$ ), respectively. All compounds showed levels of inhibition of peritonitis induced by zymosan comparable or superior to indomethacin (drug standard). In the second series, the compounds were active in the assay of writhing induced by acetic acid highlighting the LASSBio-1638, LASSBio-1604 and LASSBio-1639 inhibited the contortions that abdominalis in 84.0% ( $p < 0.01$ ), 82.7% ( $p < 0.01$ ) and 90.4% ( $p < 0.01$ ), respectively, whereas piroxicam (drug standard), inhibited by 95.4% ( $p < 0.01$ ). In the formalin test, only LASSBio-1617 significantly inhibited the nociceptive activity in the first stage by 58.2% ( $p < 0.01$ ). In the second phase the LASSBio-1637, LASSBio-1638 inhibited the nociceptive activity in 60.0% ( $p < 0.05$ ) and 54.2% ( $p < 0.05$ ), respectively, and piroxicam inhibited 53.9 % ( $p < 0.01$ ). In models of acute inflammation, the compounds showed inhibitory activity against cell migration similar to or greater than the piroxicam. In the trial of carrageenan-induced acute peritonitis compounds LASSBio-1604LASSBio-1637, LASSBio-1638 and LASSBio-1639 inhibited cell migration by 74.2% ( $p < 0.01$ ), 73.2% ( $p < 0.01$ ), 77.6% ( $p < 0.01$ ) and 81.8% ( $p < 0.01$ ), respectively, where as piroxicam inhibited by 25.5% ( $p < 0.01$ ). The compounds LASSBio-1637, LASSBio-1638-1639 and LASSBio highlighted in the testing of acute peritonitis induced by zymosan A, inhibiting cell migration in 78.6% ( $p < 0.01$ ), 81.2% ( $p < 0.01$ ) and 82.7% ( $p < 0.01$ ), showing that, in this essay, more active than piroxicam (57.3%). LASSBio-1604 and LASSBio-1617 inhibited the enzyme COX in vitro, presenting, respectively, IC50 values of 0.22 M and 0.28 M for inhibition of COX-1 and 0.24 M and 0.26 M for inhibition of COX-2. Pharmacological Evaluation results suggest that in the first series, the coordination of zinc (II) is a good strategy to improve the antinociceptive activity of the compound H2LASSBio-466 associated with inflammatory pain, and in the second series, all compounds exhibit antinociceptive and anti-inflammatory similar or superior to piroxicam.

**Keywords:** N-acylhydrazones. Privileged structure. Anti-inflammatory. Piroxicam. Pharmacological Evaluation. Complexes of Zinc (II).

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1- As fibras aferentes primárias (C e A $\delta$ ) que inervam as regiões periféricas transmitem o impulso nociceptivo até as lâminas do corno dorsal da medula. Tratos aferentes que partem do corno dorsal e conduzem a informação aos centros de processamento cerebrais (Fonte: MACHADO, 1988)..... 20
- Figura 2- Ativação dos neurônios nociceptivos. (Fonte: Adaptado de JULIUS; BASBAUM, 2001)..... 22
- Figura 3- Ilustração grega dos cinco sinais da inflamação: calor, rubor, tumor, dor e perda de função. Fonte: Ilustração médica da faculdade de medicina de St Bartholomeu..... 23
- Figura 4- Sequência de eventos no recrutamento leucocitário. Sinais liberados por macrófagos teciduais induzem o endotélio expressar moléculas de adesão e a secretar mediadores inflamatórios, levando a captura de leucócitos circulantes, rolamento, ativação, adesão extensão, diapedese transendotelial e migração. Fonte:WALZOG & GAEHTGENS, 2000..... 25
- Figura 5- *N*-acilidrazonas e suas variadas atividades farmacológicas. Fonte: DIAZ et al., 2009; TRIBUTINO et al., 2009; BORKOW et al., 1997; DUARTE; BARREIRO; FRAGA, 2007; IFA et al., 2000; STEFFEN; ELDON; EVANS, 1986..... 34
- Figura 6- Planejamento estrutural da série dos regioisômeros LASSBio-466 e LASSBio-1064 e seus complexos de zinco..... 35
- Figura 7- Planejamento estrutural da série de derivados *N*-acilidrazônicos análogos ao piroxicam..... 37
- Figura 8- Momento de uma contorção abdominal induzida por ácido acético 0,6%. Fonte: LaFI-ICBS-UFAL, 2012..... 41

Figura 9- Camundongo lambendo a pata durante o ensaio de nocicepção induzida por formalina. Fonte: LaFI-ICBS-UFAL, 2012.....	42
Figura 10- Foto do ensaio de placa quente. Fonte: LaFI-ICBS-UFAL, 2012.....	43
Figura 11- Coleta do lavado peritoneal do camundongo durante o ensaio de peritonite induzida por carragenina ou Zymosan A. Fonte: LaFI-ICBS-UFAL, 2012....	45
Figura 12- Ensaio <i>in vitro</i> de inibição da enzima COX. a) Incubação das amostras com as enzimas COX-1 ou COX-2 e seu substrato. b) Esquema representativo do ensaio imunoenzimático para quantificação de PGH2.....	47

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1- Efeito dos H<sub>2</sub>LASSBio-466, H<sub>2</sub>LASSBio-1064, seus complexos de zinco (II) e dipirona (100 µmol/Kg, v.o.) no ensaio de contorção abdominal induzida por ácido acético. Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição e média ± E.P.M (erro padrão da média) do número de contorções abdominais nos camundongos..... 50
- Tabela 2- Efeito dos derivados *N*-acilidrazônicos e piroxicam (100 µmol/Kg, v.o.) no ensaio de contorção abdominal induzida por ácido acético. Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição e média ± erro padrão da média (E.P.M) do número de contorções abdominais nos camundongos..... 51
- Tabela 3- Potência e eficácia de alguns derivados *N*-acilidrazônicos no modelo de contorção abdominal induzida por ácido acético. Valores obtidos a partir da curva dose utilizando-se dose 1, 3, 30, 100 e 300 µmol/Kg por via oral..... 52
- Tabela 4- Efeito do H<sub>2</sub>LASSBio-466, H<sub>2</sub>LASSBio-1064, seus complexos de zinco (II) (100 µmol/Kg, v.o.) e morfina (15 µmol/Kg, ip.) no ensaio de placa quente. Os resultados foram expressos como média ± E.P.M do tempo em segundos que o animal permaneceu sobre a placa aquecida à 54 ± 1 °C..... 54
- Tabela 5- Efeito dos derivados *N*-acilidrazônicos, piroxicam (100 µmol/Kg, v.o.) e morfina (15 µmol/Kg, ip.) no ensaio de placa quente. Os resultados foram expressos como média ± E.P.M. do tempo em segundos que o animal permaneceu sobre a placa aquecida à 54 ± 1 °C..... 55
- Tabela 6- Efeito dos H<sub>2</sub>LASSBio-466, H<sub>2</sub>LASSBio-1064, seus complexos de zinco (II) e indometacina (100 µmol/Kg, v.o.) no ensaio de nocicepção induzida por formalina. Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição e média ± E.P.M do tempo de lambida (em segundos) da pata dos camundongos..... 57
- Tabela 7. Efeito dos derivados *N*-acilidrazônicos e piroxicam (100 µmol/Kg, v.o.) no ensaio de contorção abdominal induzida por ácido acético. Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição e média ± E.P.M do tempo de lambida (em

segundos) da pata de camundongos..... 57

Tabela 8- Efeito dos H<sub>2</sub>LASSBio-466, H<sub>2</sub>LASSBio-1064, seus complexos de zinco (II) e indometacina (100 µmol/Kg, v.o.) no ensaio de peritonite induzida por Zymosan A. Os resultados foram expressos em porcentagem Porcentagem de inibição e média ± E.P.M do número de leucócitos totais recrutados em camundongos..... 60

Tabela 9- Efeito dos derivados *N*-acilidrazônicos e piroxicam (100 µmol/Kg, v.o.) no ensaio de peritonite induzida por Zymosan A. Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição e média ± E.P.M do número de leucócitos totais recrutados em camundongos..... 61

Tabela 10- Efeito antinociceptivo e anti-inflamatório dos H<sub>2</sub>LASSBio-466, H<sub>2</sub>LASSBio-1064, seus complexos de zinco (II) em ensaios de nocicepção induzida por ácido acético, formalina e peritonite aguda induzida por zymosan A. Valores são expressos em porcentagem de inibição da resposta. Os compostos testados foram administrados por via oral na dose de 100 µmol/kg..... 63

Tabela 11- Efeito dos derivados *N*-acilidrazônicos e piroxicam (100 µmol/Kg, v.o.) no ensaio de peritonite induzida por carragenina. Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição e média ± E.P.M do número de leucócitos totais recrutados em camundongos..... 64

Tabela 12- Efeito antinociceptivo e anti-inflamatório dos derivados *N*-acilidrazônicos em ensaios de nocicepção induzida por ácido acético, formalina e peritonite aguda induzida por zymosan A e carragenina. Valores são expressos em porcentagem de inibição da resposta. Os compostos testados foram administrados por via oral na dose de 100 µmol/kg..... 66

Tabela 13- Concentração inibitória de 50% (CI<sub>50</sub>) das enzimas COX-1/COX-2 ovinas por derivados *N*-acildrazônicos análogos do piroxicam, piroxicam e indometacina (concentrações 0,1 µM, 0,3 µM e 1 µM)..... 67

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

5-HEPETE – ácido 5-hidroperoxieicosatetraenóico

AA – Ácido Araquidônico

ADP – Difosfato de Adenosina

AINEs – Anti-inflamatório não-esteroidais

ASICs – Canais Iônicos Sensíveis ao Ácido

CB – Receptor Canabinóide

CGRP – Peptídeo Relacionado ao Gen da Calcitonina

COX – Cicloxigenase

DI50 – Dose para inibir 50%

E.P.M. – Erro Padrão da Média

eNOS – Óxido Nítrico Sintase Endotelial

i.p – intraperitoneal

IASP – International Association for Study of Pain

IFN – Inteferon

IL – Interleucina

iNOS - Óxido Nítrico Sintase induzível

LaFI –Laboratório de Farmacologia e Imunidade

LASSBio<sup>®</sup> - Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas

LOX – Lipoxigenase

LT –Leucotrieno

LTB4 – Leucotrieno B4

NAH – *N*-acilidrazona

NF-κB – Fator Nuclear de Transcrição Kappa B

nNOS - Óxido Nítrico Sintase Neuronal

NO – Óxido Nitríco

PAF – Fator Ativador Plaquetário

PDE – Fosfodiesterase

PG – Prostaglandina

PLA2 – Fosfolipase A2

ROS – Espécies Reativas de Oxigênio

SC – Sistema Complemento

SNA – Sistema Nervoso Autônomo

SNC – Sistema Nervoso Central

SOSA – *Selective Optimization of Side Activities*

SP – Substância P

s.pl – Sub-plantar

TNF – Fator de Necrose Tumoral

TRP – Receptor de Potencial Transitório

TRPV1 – Receptor de Potencial Transitório Vanilóide 1

TX – Tramboxano

v.o – via oral

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>18</b>
<b>1.1 Dor.....</b>	<b>18</b>
<b>1.2 Processo Inflamatório.....</b>	<b>22</b>
<b>1.3 Terapia farmacológica da dor e inflamação.....</b>	<b>30</b>
<b>1.4 Uso da função <i>N</i>-acilidrazonas no planejamento e síntese de novos fármacos.....</b>	<b>32</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>38</b>
<b>2.1 Objetivo Geral.....</b>	<b>38</b>
<b>2.2 Objetivos Específicos.....</b>	<b>38</b>
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>39</b>
<b>3.1 Reagentes, soluções e fármacos utilizados.....</b>	<b>39</b>
<b>3.2 Ensaios farmacológicos.....</b>	<b>39</b>
3.2.1. Animais.....	40
3.2.2. Obtenção dos compostos-teste.....	40
3.2.3. Ensaios <i>in vivo</i> .....	41
3.2.3.1 Ensaios de contorções abdominais induzidas por ácido acético.....	41
3.2.3.2. Ensaio de nocicepção induzida por formalina.....	42
3.2.3.3. Ensaio da placa quente (Hot plate).....	43
3.2.3.4. Ensaio de peritonite induzida por carragenina.....	44
3.2.3.5. Ensaio de peritonite induzida por zymosan A.....	44
3.2.4. Ensaio <i>in vitro</i> .....	46
3.2.4.1. Ensaio de avaliação da inibição da COX-1/COX-2.....	46
3.2.5. Análise Estatística.....	48
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>49</b>
<b>4.1 Avaliação antinociceptiva e anti-inflamatória <i>in vivo</i>.....</b>	<b>49</b>
<b>4.2 Avaliação anti-inflamatória <i>in vitro</i>.....</b>	<b>66</b>

<b>5 CONCLUSÃO.....</b>	<b>70</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>71</b>
<b>ARTIGOS PUBLICADOS DERIVADOS DA TESE.....</b>	<b>91</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Dor

A dor é uma sensação necessária à vida. Ela nos ensina a evitar situações danosas, desencadeando reflexos para que ocorra a retirada do corpo ou parte dele para longe do estímulo nocivo, além de induzir a manter em repouso regiões lesionadas (JULIUS; BASBAUM, 2001). Reforçando a importância da sensação dolorosa, sabe-se que pacientes insensíveis à dor apresentam baixa expectativa de vida, bem como, vivem em constante perigo de autodestruição (BEAR; PARADISO, 2006). Sendo a dor uma sensação fundamental para a sobrevivência, quando persistente provoca sofrimento e reações emocionais negativas, reduzindo a qualidade de vida do indivíduo (CHAPMAN; GAVRIN, 1999; JULIUS; BASBAUM, 2001).

A dor constitui um importante sistema de alarme do organismo para sinalizar a ocorrência de um dano tecidual, sendo inclusive um dos cinco sinais cardinais da resposta inflamatória. A Associação Internacional para o Estudo da Dor (*International Association for the Study of Pain*, IASP) definiu dor como sendo “uma experiência sensorial e/ou emocional desagradável, associada ou não ao dano potencial dos tecidos” (TRACEY; MANTYH, 2007). Segundo Hunt e Mantyh (2001) a dor é uma sensação necessária à sobrevivência e a manutenção da integridade do organismo, mas a dor persistente ou crônica pode resultar em sintomas secundários tais como ansiedade, depressão e principalmente a diminuição da qualidade de vida (HUNT; MANTYH, 2001).

A dor possui dois componentes principais: o componente sensorial e o componente afetivo/emocional. O componente sensorial que corresponde ao mecanismo neurofisiológico permite por meio da ativação de receptores, a transmissão e interpretação do estímulo nocivo, que em geral, é forte o suficiente para produzir lesão tecidual. O componente emocional corresponde à percepção do estímulo doloroso pelo indivíduo, que é seguido pela tomada de consciência e pela reação à dor. É uma resposta afetiva à percepção do estímulo doloroso (RAMADABRAN; BANSINATH, 1996).

Existem vários critérios utilizados na classificação da dor, sendo a duração da sensação dolorosa aquele mais utilizado. Dessa forma, a dor pode ser classificada como aguda ou transitória (passageira) ou crônica. A dor transitória é caracterizada por ativação de nociceptores da pele e de outros tecidos. A dor ocorre na ausência de qualquer dano tecidual, ela tem curta duração e dissipa-se em poucos segundos ou minutos sem a necessidade de terapia farmacológica. Provavelmente sua função é proteger o indivíduo de um possível dano tecidual. A dor aguda está relacionada a algum estímulo nocivo com substancial lesão tecidual (traumas, intervenções cirúrgicas e algumas doenças), estando associadas à estimulação direta de nociceptores, conexões nervosas no sistema nervoso central (SNC) e sistema nervoso autônomo (SNA). Esta pode persistir por dias ou poucas semanas e desaparece quando ocorre recuperação da lesão, tendo como função biológica de preservação, da integridade e da defesa corporal, pois denota uma lesão ou iminência de lesão tecidual (LOESER; MELZACK, 1999; MILLAN, 1999; CARR; GOUDAS, 1999). A dor crônica pode ser gerada por processos inflamatórios crônicos ou ocorrer sem estímulo precipitante. Esse tipo de dor difere substancialmente da dor aguda em relação a sua persistência (manter-se após a recuperação tecidual), alterações adaptativas, tais como a neuroplasticidade em vários níveis do sistema nervoso, o que a torna de difícil tratamento perante a utilização de fármacos (BARROS et al., 2006; BESSON, 1999).

Quanto à sua origem, a dor pode ser classificada em: nociceptiva, neurogênica, neuropática, psicogênica e inflamatória. A dor nociceptiva deve-se à estimulação excessiva dos nociceptores localizados na pele, vísceras e outros tecidos. A dor neurogênica reflete dano de tecido neuronal na periferia ou no SNC. Quando ocorre disfunção ou dano de um nervo ou grupo de nervos, resultando em quadro algico, denomina-se dor neuropática. No entanto, quando a dor não é proveniente de fonte somática identificável e pode refletir fatores psicológicos, diz-se dor psicogênica (MILLAN, 1999). Por fim, na dor inflamatória, ocorre significativo dano tecidual, com dor geralmente mais persistente e acompanhada de inflamação. Nestas circunstâncias, geralmente ocorre quadro de hipersensibilidade causado pela ativação e sensibilização dos nociceptores periféricos por mediadores químicos, produzidos pela lesão tecidual e pela inflamação (DRAY, 1997; GUGINSKI, 2008).

Os receptores específicos para a dor estão localizados nas terminações de fibras nervosas A $\delta$  e C, que quando ativados, sofrem alterações na sua membrana, permitindo a deflagração de potenciais de ação. As terminações nervosas das fibras nociceptivas A $\delta$  e C (nociceptores) são capazes de traduzir um estímulo agressivo em estímulo elétrico, que será

transmitido até o sistema nervoso central e interpretado no córtex cerebral como dor. As fibras A $\delta$  são mielinizadas e as fibras C não são mielinizadas e possuem a capacidade de transmitir estímulos dolorosos em diferentes velocidades. As fibras A $\delta$ , em função da presença da bainha de mielina, transmitem o estímulo doloroso de forma rápida e bem localizada, ou sinais de dor aguda pulsátil, designada dor primária, enquanto as fibras C são responsáveis pela transmissão lenta da dor, também chamada de queimação persistente ou dor secundária (ROCHA et al., 2007; BASBAUM et al., 2009). Estas fibras fazem sinapse em um neurônio de segunda ordem no corno dorsal da medula espinhal (**Figura 1**). O neurônio de segunda ordem cruza a medula espinhal até a porção contralateral e ascende pelo trato espinotalâmico até alcançar o tálamo. No tálamo, neurônios de terceira ordem são ativados, levando a informação do estímulo doloroso até o córtex somatossensorial, onde ocorre a percepção da dor (**Figura 1**) (VANDERAH, 2007).

**Figura 1-** As fibras aferentes primárias (C e A $\delta$ ) que inervam as regiões periféricas transmitem o impulso nociceptivo até as lâminas do corno dorsal da medula. Tratos aferentes que partem do corno dorsal e conduzem a informação aos centros de processamento cerebrais



Fonte: MACHADO, 1988.

Foram descritas várias moléculas de transdução da nocicepção, como por exemplo, a família dos receptores de potencial transitório (TRP), que participa na geração de sensações dolorosas evocadas por estímulos químicos, térmicos e mecânicos.

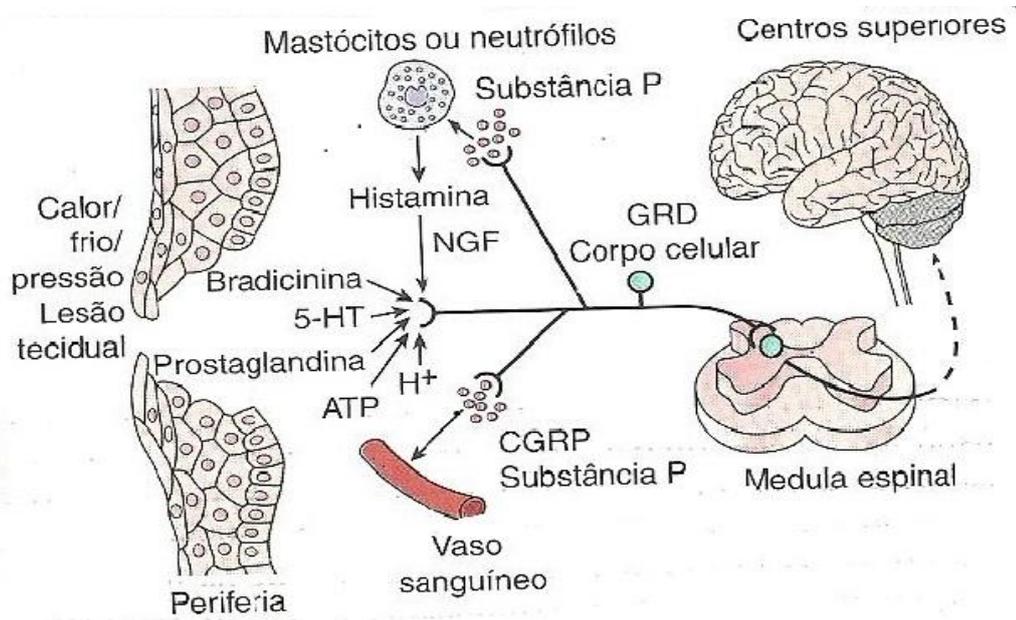
O receptor de potencial transitório vanilóide 1 (TRPV1) foi o primeiro descrito como receptor polimodal ativado por três estímulos dolorosos: compostos vanilóides (capsaicina, resiniferatoxina), calor nocivo ( $\geq 43$  °C) e pH baixo ( $< 5,9$ ). Também foi reportado que o TRPV1 é ativado pela cânfora, alicina, óxido nítrico (NO), toxinas de aranha e mediadores lipídicos como endocanabinóides (anandamida) e produtos da lipoxigenase (leucotrieno B<sub>4</sub>, LTB<sub>4</sub>); potencializado pelo etanol, nicotina e citocinas pró-inflamatórias e modulado por cátions extracelulares (CHENG; JI, 2008; PATAPOUTIAN; TATE; WOOLF, 2009; LEVINE; ALESSANDRI-HABER, 2007; CATERNIE et al., 1997; TOMINAGA et al., 1998).

Outra família que participa da transdução da nocicepção é a dos canais iônicos sensíveis ao ácido (ASICs), que são canais de cátions insensíveis à voltagem (PETROFF et al., 2008). Os ASICs são ativados por prótons extracelulares e modulados pela PKC (KRISHTAL; PIDOPLICHKO, 1980; BARON et al., 2002). Alguns estudos demonstraram que a expressão de ASICs é aumentada por mediadores pró-inflamatórios, como fator de crescimento neural (NGF), serotonina, interleucina 1 (IL-1) e bradicinina (VOILLEY et al., 2001; MAMET et al., 2002).

Em muitas condições patológicas, a lesão tecidual (causa imediata da dor), leva a liberação local de diversos mediadores químicos, como substância P (SP), histamina, serotonina, bradicinina e prostaglandinas (PGs), que vão atuar sobre os nociceptores nas fibras nervosas tipos A $\delta$  e C, ativando-os diretamente ou aumentando a sua sensibilidade a outras formas de estímulos (RIBEIRO; SCHIMIDT; SCHMIDT, 2002; KRAYCHETE; CALASANS; VALENTE, 2006). Isto gera potenciais que levam a liberação de neurotransmissores como SP, glutamato, ácido gama aminobutírico e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), no corno dorsal da medula espinhal (MARCON, 2009).

Esses neurotransmissores ativam neurônios de segunda ordem e o sinal nociceptivo ascende para regiões do sistema límbico principalmente para o tálamo. Em resposta a estimulação nociceptiva ascendente, ocorre ativação de algumas vias descendentes de controle da nocicepção, culminando na liberação de noradrenalina e encefalinas na região do corno dorsal medular, modulando o sinal nociceptivo (BASBAUM et al., 2009).

**Figura 2- Ativação dos neurônios nociceptivos.**



Fonte: Adaptado de JULIUS; BASBAUM, 2001.

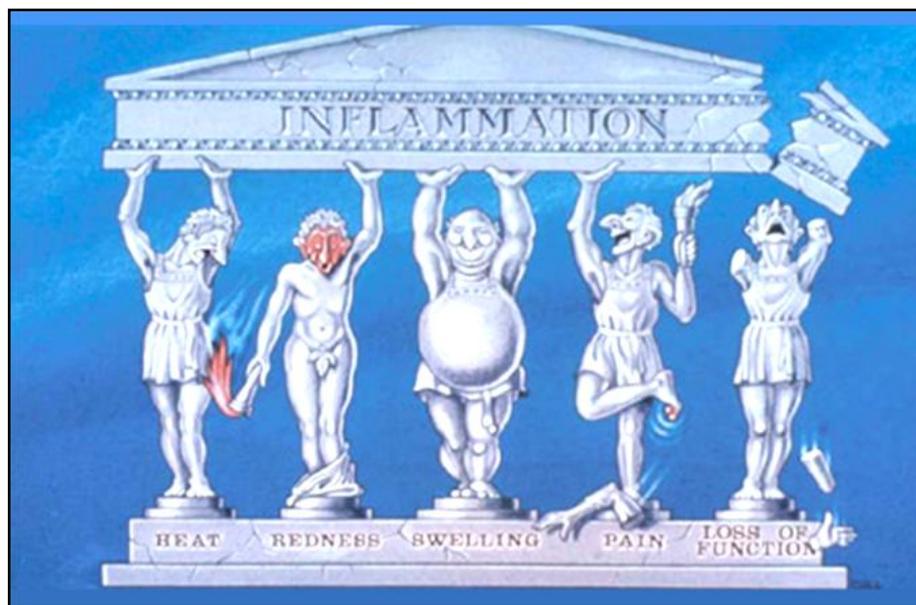
## 1.2 Processo inflamatório

A inflamação é um processo fisiológico que consiste na resposta orgânica diante de lesão tissular ou infecção, envolvendo uma ação coordenada entre o sistema imunológico e o tecido no qual ocorreu a lesão (COTRAN; KUMAR; COLINS, 2006). Este processo pode ser encarado como um mecanismo de defesa do organismo, promovendo os processos de reparação, com a cicatrização e a regeneração do tecido afetado (TIZZARD, 2002). Entretanto, apesar de extremamente necessário, esse processo pode em determinadas situações, se exacerbar, levando a efeitos deletérios (BRUNTON et al., 2012).

Clinicamente o processo inflamatório é caracterizado por cinco sinais clássicos: sensação de dor, calor, rubor, edema e consequentemente perda da função do tecido (**Figura 3**). A inflamação pode ser referida como uma cascata que envolve uma sequência de eventos, como dilatação de vênulas e arteríolas, aumento na permeabilidade e no fluxo sanguíneo,

infiltração de leucócitos para o local da lesão, extravasamento de proteínas plasmáticas, prejuízo tecidual por atividade de proteases e espécies reativas de oxigênio, necrose e apoptose, além da liberação de inúmeros mediadores pró-inflamatórios (HUERRE; GOUNON, 1996; VIVIER; MALISSEN, 2005).

**Figura 3- Ilustração grega dos cinco sinais da inflamação: calor, rubor, tumor, dor e perda de função.**



Fonte: Ilustração médica da faculdade de medicina de St Bartholomeu.

As inflamações podem ter curso agudo ou crônico. A inflamação aguda é uma resposta rápida a um agente nocivo encarregado de levar mediadores da defesa do hospedeiro (leucócitos e proteínas plasmáticas) ao local da lesão. Esta possui três componentes principais: (1) alterações no calibre vascular, que levam a um aumento no fluxo sanguíneo; (2) alterações estruturais na microcirculação, que permitem que proteínas plasmáticas e leucócitos deixem a circulação; (3) imigração dos leucócitos da microcirculação, seu acúmulo no foco de lesão e sua ativação para eliminar o agente nocivo (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005).

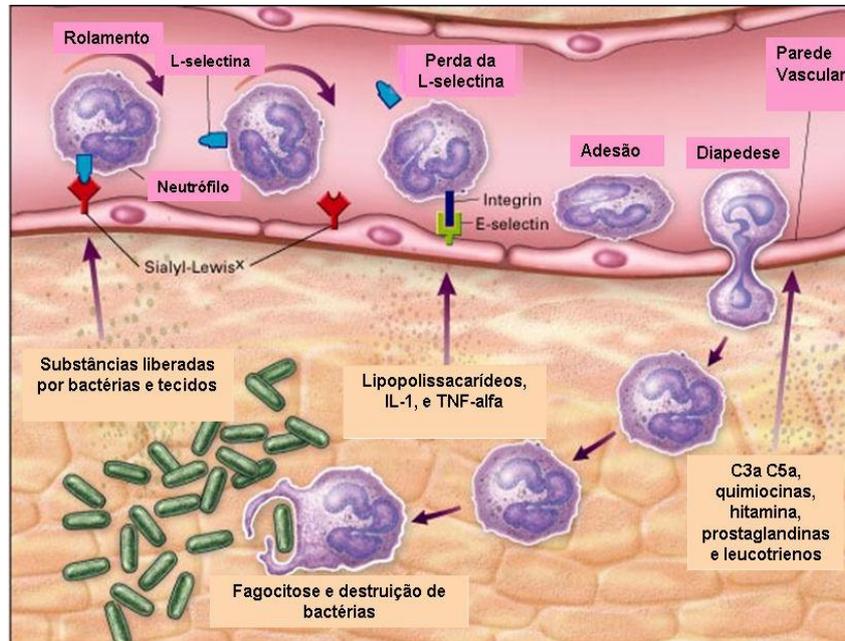
A inflamação crônica é aquela na qual, devido à persistência do agente inflamatório (microrganismo), exposição prolongada a agentes tóxicos (p.ex. tabagismo) ou aparecimento

de fenômenos autoimunitários, o processo se mantém por tempo maior. Embora não existam critérios rígidos, considera-se crônico o processo inflamatório que dura mais de 6 meses. Neste, os sinais típicos de inflamação (eritema e edema) podem não ser aparentes. Microscopicamente caracteriza-se pela presença de exsudato celular de mononucleares (macrófagos e linfócitos) e fenômenos alternativos ao lado de áreas de regeneração e/ou de reparação. Por exemplo, em uma hepatite viral crônica, esse conjunto de achados é bem evidente: regiões de necrose, com exsudato de linfócitos e macrófagos, e áreas de fibrose, de extensão variável (PEREIRA, 2011a).

O principal fenômeno celular do processo inflamatório consiste na migração de leucócitos para o sítio da lesão. A passagem dos leucócitos do compartimento vascular para o tecido extravascular é guiada por interações adesivas específicas entre os leucócitos e as células endoteliais. A sequência de eventos neste processo envolve marginação e captura dos leucócitos livres circulantes do lúmen vascular; rolamento, ativação, adesão firme e extensão na superfície do endotélio; passagem através da barreira das células endoteliais ou diapedese e transmigração (**Figura 4**). Ao alcançarem o foco, estas células tornam-se ativadas e tentam eliminar o patógeno liberando o conteúdo tóxico de seus grânulos, os quais incluem espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ROS), proteinases, catepsinas, elastases, mieloperoxidase, entre outros (MEDZHITOV, 2008; PEREIRA, 2011a).

O recrutamento leucocitário é induzido pela ativação da monocamada de células endoteliais por sinais teciduais, que levam a expressão de moléculas de adesão e a secreção de mediadores inflamatórios pelo endotélio. Os principais grupos de moléculas de adesão são as selectinas (E, P e L-selectinas) que medeiam à adesão fraca, acompanhada de rolamento e, em seguida, a adesão firme dos leucócitos, fenômeno mediado por imunoglobulinas e  $\beta$ -2-integrinas presentes na superfície dos leucócitos. Posteriormente a adesão firme, segue-se a ligação estável mediada por imunoglobulinas, principalmente molécula de adesão intercelular-1, moléculas de adesão intercelular-2 e molécula de adesão de célula endotelial e plaquetas que estão presentes no endotélio, denominadas de  $\beta$ -2-integrinas (WAGNER; ROTHE, 2000; COTRAN; KUMAR; COLLINS, 2006)

**Figura 4- Sequência de eventos no recrutamento leucocitário. Sinais liberados por macrófagos teciduais induzem o endotélio expressar moléculas de adesão e a secretar mediadores inflamatórios, levando a captura de leucócitos circulantes, rolamento, ativação, adesão extensiva, diapedese transendotelial e migração.**



Fonte: WALZOG & GAEHTGENS, 2000.

O recrutamento das células inflamatórias para os locais da lesão envolvem, além das moléculas de adesão, as interações combinadas de vários tipos de mediadores solúveis (originados do plasma, das células ou dos tecidos lesionados) que atuam sinergicamente para sinalizar danos locais ou sistêmicos, além de desempenharem funções específicas pró- ou anti-inflamatórias (PEREIRA, 2011a)

Os mediadores inflamatórios podem ser classificados de acordo com suas características bioquímicas em: aminas vasoativas (histamina e serotonina); peptídeos vasoativos, fragmentos de componentes do complemento, mediadores lipídicos, óxido nítrico (NO), citocinas, quimiocinas e enzimas proteolíticas (MEDZHITOV, 2008).

A histamina encontra-se distribuída por todos os tecidos, sendo a principal fonte os mastócitos que estão normalmente presentes no tecido conjuntivo e próximos aos vasos sanguíneos. Também pode ser encontrada nos basófilos e plaquetas do sangue. No processo inflamatório a histamina é liberada pela desgranulação dos mastócitos promovida por diversos estímulos, incluindo: lesão física (trauma, frio ou calor); reações imunológicas envolvendo a

ligação de anticorpos aos mastócitos; pelos fragmentos de anafilatoxinas (C3a e C5a); proteínas leucocitárias que liberam a histamina; neuropeptídios (substância P); citocinas (IL-1, IL-18) e fator de crescimento nervoso (NGF). Além disso, desempenha um papel central na hipersensibilidade imediata e nas respostas alérgicas (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005).

Uma vez liberada, a histamina age na microcirculação em receptores H1 e H2, produzindo vasodilatação em arteríolas e vênulas, aumento da permeabilidade vascular, com conseqüente extravasamento de líquido e proteínas para os tecidos perivasculares e formação de edema, componentes essenciais na formação e cronificação do processo inflamatório (CARVALHO; LEMÔNICA, 1998).

A serotonina é o segundo mediador vasoativo pré-formado, possuindo ações semelhantes às da histamina. Está presente nas plaquetas e nas células enterocromafins e, em roedores, também nos mastócitos. Sua liberação é estimulada quando as plaquetas se agregam após contato com colágeno, trombina, difosfato de adenosina (ADP) e complexo antígeno-anticorpo. Também são estimuladas pelo fator ativador plaquetário (PAF), proveniente dos mastócitos durante reações mediadas por IgE, resultando em aumento da permeabilidade durante reações imunológicas (COTRAN; KUMAR; COLINS, 2006; RANG et al., 2011).

O sistema complemento (SC) é o principal mediador humoral do processo inflamatório junto aos anticorpos (CLIMENI et al., 2009; BARRINGTON et al., 2001). A ativação do complemento libera as anafilatoxinas C3a e C5a envolvidas nos processos inflamatórios agudos causando atração e ativação de células (neutrófilos, monócitos, eosinófilos e basófilos). Estes peptídeos se ligam a receptores específicos presentes na superfície de vários tipos celulares, desencadeando respostas como a estimulação da liberação de histamina pelos mastócitos, aumentando, assim, a permeabilidade vascular e causando a vasodilatação, migração celular (C5a) e ativação e atração de leucócitos do sangue para tecidos alvos (C5a). O C5a também ativa a via das lipoxigenases do metabolismo do ácido araquidônico nos neutrófilos e monócitos, causando liberação de mais mediadores (DAMERON, 1987; LANDI-LIBRANDI; ASSIS-PANDOCHI, 2008).

As cininas são potentes peptídeos vasoativos e espasmogênicos que influenciam vários processos fisiológicos e patológicos. Elas ativam células endoteliais, levando à vasodilatação, aumentando a permeabilidade vascular e estão envolvidas na ativação do ativador tecidual de plasminogênio (t-PA), liberação de óxido nítrico (NO) e mobilização do ácido araquidônico. Assim, participam da regulação da pressão sanguínea, das funções renais e cardíacas e de

processos patológicos, como o processo inflamatório (MOREAU et al., 2005). Elas têm meia vida no plasma de 15 segundos apenas, e aproximadamente de 80 a 90% das cininas podem ser destruídas em uma única passagem pelo leito vascular pulmonar. É difícil mensurar as concentrações plasmáticas de bradicinina porque a inibição inadequada das cininases sanguíneas pode levar a formação de artefatos ou à degradação da bradicinina durante a coleta do sangue (NOGUEIRA, 2011).

Outro mediador importante no processo inflamatório é o óxido nítrico, que é um gás solúvel derivado do metabolismo da L-arginina por da ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS), que pode ser encontrada em três isoformas, endotelial (eNOS) e neuronal (nNOS), que são constitutivamente expressas, e a forma induzida (iNOS), que é produzida após a ativação de leucócitos em condições inflamatórias (VALLANCE; CHAN, 2001). São inúmeras as funções do NO, dentre as quais: vasodilatação dependente do endotélio, citotoxicidade mediada por macrófagos, regulação da pressão sanguínea, transmissão sináptica e muitas outras. Entretanto sua principal função é o controle da adesão dos elementos sanguíneos ao endotélio, diminuindo a permeabilidade vascular. Apesar de tantos benefícios o NO não deve estar em excesso no organismo, pois uma elevação dos níveis normais causa prejuízo às células saudáveis, estando este mecanismo presente na maioria dos processos inflamatório e doenças auto-imunes (CERQUEIRA; YOSHIDA, 2002; BARRETO et al., 2005).

As citocinas são polipeptídeos ou glicoproteínas extracelulares, hidrossolúveis, sintetizados e liberados por vários tipos de células (principalmente linfócitos e macrófagos, mas também células do endotélio, epitélio e tecido conjuntivo) durante o processo inflamatório (OLIVEIRA et al., 2011). A maioria das citocinas se liga a receptores específicos, ativando mensageiros intracelulares que regulam a transcrição gênica. Dessa forma, as citocinas influenciam na resposta imunológica celular, assim como regulam a produção e a atividade de outras citocinas, que podem aumentar (pro-inflamatórias) ou atenuar (anti-inflamatórias) a resposta inflamatória (OLIVEIRA et al., 2011).

O TNF e a IL-1 são as duas principais citocinas que participam do processo inflamatório. A IL-1 é produzida por macrófagos e monócitos, assim como por células não imunológicas, tais como fibroblastos e células endoteliais ativadas durante lesão celular, infecção, invasão e inflamação (ZHANG; AN, 2007; WOLF et al., 2008). Estímulos físicos, químicos e imunológicos, diversos tipos de células como monócitos e macrófagos, são

capazes de produzir e secretar o TNF- $\alpha$ . O TNF- $\alpha$  participa de vários eventos inflamatórios, como a ativação de neutrófilos e consequente desgranulação, produção de intermediários reativos de oxigênio, aumento da citotoxicidade para certos patógenos e aumento da atividade fagocítica, quimiotaxia dessas células e de monócitos, bem como o aumento da expressão de moléculas de adesão P selectina, E-selectina e ICAM-1. Além disso, o TNF- $\alpha$  estimula a produção de PGE<sub>2</sub>, de citocinas como a IL-1 e IL-6 (por células endoteliais e macrófagos) e de IFN $\gamma$  por linfócitos T (FERNANDES, 2008).

As quimiocinas são definidas como citocinas quimioatraentes que controlam a migração de leucócitos, funcionando como coordenadores de tráfego celular durante reações imunológicas e inflamatórias. As quimiocinas são induzidas por citocinas (TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ) espécies reativas de oxigênio, pela ativação de NF- $\kappa$ B e pela via de sinalização dos receptores Toll (AKCAY; NGUEYN; EDELSTEIN, 2009). De modo geral, as quimiocinas atuam por meio de receptores acoplados a proteína G, cuja expressão alterada tem implicações nas escleroses múltiplas, no câncer e em algumas doenças cardiovasculares (RANG et al., 2011).

O ácido araquidônico (AA), também chamado de eicosanoides, um ácido graxo poliinsaturado derivado da dieta ou da conversão do ácido graxo essencial ácido linoleico, é clivado dos fosfolipídios de membrana pela ação da fosfolipase A2 (PLA2). Duas classes principais de enzimas são responsáveis pela síntese dos metabolitos do AA: as ciclooxigenases (COXs), que sintetizam as prostanoídes (PGE<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>, PGF<sub>2</sub> $\alpha$ , PGI<sub>2</sub> e TXA<sub>4</sub>) e as lipoxigenases (LOX-5, LOX-12 e LOX-15) que produzem os leucotrienos (LTA<sub>4</sub>, LTB<sub>4</sub>, LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub>) e as lipoxinas (CARVALHO, 2011).

Atualmente são conhecidas três isoformas da enzima ciclooxigenase sendo estas a COX-1, COX-2 e COX-3. A COX-1 é expressa constitutivamente na maioria das células, é considerada a fonte predominante, mas não exclusiva dos prostanoídes necessários a funções rotineiras, como a citoproteção do epitélio gástrico, agregação plaquetária, homeostase vascular e manutenção do fluxo sanguíneo renal. Essa isoforma está associada à produção de muco protetor e inibição da secreção ácida gástrica, sendo que nas plaquetas está associada à síntese do tromboxano A<sub>2</sub>, um mediador que favorece a agregação e a adesão plaquetária. Assim, fármacos que inibem essa isoforma causam diversos distúrbios no trato digestivo e podem estar associadas ao risco de sangramento cutâneo e gastrointestinal como efeito

adverso (BRUNTON et al., 2012; KUMMER; COELHO, 2002; BRICKS; SILVA, 2005; STEAGALL et al., 2009).

A COX-2 é hiperregulada pelas citocinas, pelo estresse de cisalhamento e pelos fatores de crescimento e é a principal fonte dos prostanoídes produzidos quando há inflamação e câncer. Embora seja normalmente induzida por estímulos pró-inflamatórios, tem sido reportada a expressão de COX-2 constitutiva em alguns tecidos como cérebro, rins, pulmão endotélio vascular e órgão do sistema reprodutor (BRUNTON et al., 2012; RAJAKARIAR et al., 2006). Por sua vez, a isoforma COX-3 é uma variante do gene da COX-1, através da ocorrência de um *splicing* alternativo. Sabe-se que esta isoforma é mais abundante no coração e no córtex cerebral, porém esforços vêm sendo realizados a fim de se obter maiores informações a respeito de sua função e modulação (BAZAN; FLOWER, 2002).

Os produtos originados pela cisão do AA através da COX-2 levam a formação de PGs que participam de eventos inflamatórios, algésicos e térmicos. A PGE2 e PGI2 são mediadores da dor, febre e inflamação. A PGE2, a PGI2 e a PGD2 são poderosos vasodilatadores intrínsecos e atuam de modo sinérgico com outros vasodilatadores inflamatórios, como histamina e bradicinina. O TXA2, predominante das plaquetas, causa vasoconstrição, broncoconstrição e agregação plaquetária, sendo esta última seu principal efeito (BALLOU et al., 2000; KIDD; URBAN, 2010).

Os leucotrienos são sintetizados a partir do ácido araquidônico em vias catalisadas pela lipoxigenase. A via da LOX-5 resulta na síntese dos LTs, que desempenham uma importância no desenvolvimento e na persistência da resposta inflamatória. Esta enzima atua sobre o ácido araquidônico e produz o ácido 5-hidroperoxieicosatetraenóico (5-HPETE), um composto quimiotático para leucócitos, que é convertido em leucotrieno A4 (LTA4). O LTA4 pode ser convertido em leucotrieno B4 (LTB4) ou em uma série de cisteinil-leucotrienos, LTC4, LTD4, e LTE4. Os cisteinil-leucotrienos são produzidos principalmente por eosinófilos, mastócitos, basófilos e macrófagos, enquanto que o LTB4 é produzido principalmente por neutrófilos e macrófagos (RANG et al., 2011; BRUNTON et al., 2012).

O LTB4 é um potente agente quimiotático e ativador das respostas dos neutrófilos, tais como agregação e adesão dos leucócitos ao endotélio venular, geração de radicais livres do oxigênio e liberação de lisossomos. Os cisteinil-leucotrienos, (LTC4, LTD4 e LTE4) causam intensa vasoconstrição, broncoespasmo e aumento da permeabilidade vascular (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005).

### 1.3 Terapia farmacológica da dor e inflamação

Atualmente, vários medicamentos encontram-se disponíveis para o uso clínico como analgésicos e/ou anti-inflamatórios, como os corticosteróides, os opióides e os AINEs. Os corticosteroides ou esteroidais possuem uma ação antiinflamatória maior que os anti-inflamatórios não-esteroidais (AINES), esses atuam por vários mecanismos no processo anti-inflamatório, entre eles: estabilização de membranas, diminuindo a fagocitose e exocitose dos fagócitos; redução da permeabilidade vascular e ativação de células endoteliais, bloqueando parcialmente a expressão de moléculas de adesão (VISCELLI, 2012; PEREIRA, 2011a), os AINES, por sua vez, agem bloqueando a via das cicloxigenases (COX), produzindo efeitos no metabolismo do ácido araquidônico e ocasionando a inibição da síntese de PGs, além de possuírem ação analgésica e antipirética (RANG et al., 2011).

Em todo mundo, os AINEs encontram-se entre os medicamentos mais prescritos, devido a sua eficácia em suprimir a dor e a inflamação. Apresentam um amplo espectro de indicações terapêuticas, como: analgesia, anti-inflamatória, antipirética, profilaxia contra doenças cardiovasculares. Os AINEs são medicamentos sintomáticos, inespecíficos, não interferindo na historia natural das doenças inflamatórias (BATLOUNI, 2010; ONG et al., 2007).

Os AINEs incluem uma diversidade de agentes que pertencem a diferentes classes químicas, porém possuem os efeitos terapêuticos e colaterais semelhantes. Os AINEs também podem agir como sequestradores de radicais de oxigênio (ex. sulindaco) produzidos por neutrófilos e macrófagos, os quais estão envolvidos na lesão tecidual em algumas afecções, e juntamente com a inibição da COX podem diminuir a lesão tecidual. As aspirinas também inibem a expressão do fator de transcrição denominado fator nuclear (NF, *nuclear factor*)  $\kappa$ B, que está envolvido na transcrição dos genes de mediadores inflamatórios (RANG et al., 2011).

Desde a descoberta da aspirina, foram desenvolvidos vários anti-inflamatórios não esteroidais, com estruturas químicas diversas, mas que apresentam propriedades terapêuticas semelhantes, pois atuam de forma não seletiva sobre a COX-1 e COX-2. A partir de 1980 surgiram os fármacos seletivos para COX-2 (meloxicam, nimesulida) e posteriormente desenvolveu-se o grupo dos coxibes, fármacos com alta seletividade para COX-2, que

apresentam a vantagem em ser eficazes no alívio da dor e inflamação associadas a doenças artríticas (BRUM-JUNIOR, 2006).

A maioria dos AINEs “tradicionais” inibe tanto a COX-1 e COX-2, embora variem no grau em que inibem cada isoforma. Acredita-se que a ação anti-inflamatória dos AINEs esteja relacionada à inibição da COX-2, enquanto seus efeitos indesejáveis, principalmente os que afetam o trato gastrointestinal, resultem predominante da inibição da COX-1 (RANG et al., 2011). Para tentar diminuir os efeitos gastrointestinais não desejados ocasionados pelos AINEs tradicionais, foram desenvolvidos os inibidores seletivos da COX-2, como o celecoxibe, lumiracoxibe, entre outros. Porém, apesar de estes fármacos apresentarem menos efeitos adversos gastrointestinais, não prática clínica, não está sendo bem tolerados. Em parte, isso ocorre devido aos pacientes que estão em uso deste tipo de medicamento, já terem sido expostos a inibidores menos seletivos e já terem sofrido certo comprometimento gastrointestinal. Também existe a preocupação sobre os efeitos cardiovasculares de todos os AINEs quando são utilizados por longos períodos, como por exemplo, o rofecoxibe que foi retirado do mercado devido aos seus efeitos cardiovasculares decorrentes, em parte, da inibição da isoforma COX-2 presente no endotélio vascular, levando a um desequilíbrio homeostático entre a produção de prostaciclina no endotélio vascular e TXA<sub>2</sub> nas plaquetas (RANG et al., 2011; GROSSER; FRIES; FITZGERALD, 2006; SANTOS et al., 2007).

Entre os AINEs mais utilizados encontra-se o piroxicam que é um potente anti-inflamatório, superior à indometacina, à fenilbutazona e ao naproxeno e possui também atividade analgésica e antipirética (SILVA, 2010). Na clínica, o piroxicam é eficaz no tratamento de doenças inflamatórias crônicas, como artrite reumatoide (LIGHTFOOT, 1997), osteoartrite (DEQUEKER et al., 1998), espondilite anquilosante (TANNENBAUM; DECOTEAU; ESDAILE, 1984) e artrite reumatoide juvenil (RICHY et al., 2009). E também no tratamento de dores crônicas (LEE et al., 1990), dores musculoesqueléticas agudas (WISEMAN et al., 1987) e pós-operatórias (BREIVIK, 1994).

O perfil de toxicidade desse fármaco é semelhante ao de outros AINEs e inclui toxicidade gastrointestinal e também efeitos adversos nos rins, fígado e pele. Os efeitos colaterais gastrointestinais são os que ocorrem com mais frequência, atingindo em média 16% dos pacientes tratados, e compreendem desde sintomas leves, como dispepsia, a sintomas graves, como úlceras pépticas e hemorragias e perfurações no sistema gastrointestinal potencialmente fatais (SILVA, 2010; SCARPIGNATO; HUNT, 2010). Uma recente revisão

de estudos clínicos observacionais sugere que o piroxicam apresenta um elevado risco relativo de ocorrência de sangramento e perfuração do trato gastrintestinal se comparado aos coxibes e a AINES tradicionais, como indometacina, naproxeno e diclofenaco, entre outros. Foi sugerido que o maior risco apresentado pelo piroxicam em relação aos demais AINEs pode estar, em parte, relacionado à sua longa meia-vida plasmática, uma vez que esta propriedade implica em maior exposição do paciente ao fármaco (GONZÁLEZ et al., 2010).

Embora existam diversos produtos, de origem natural ou sintética, utilizados para o tratamento desses processos, até o momento, não foi identificado ainda o anti-inflamatório ou analgésico ideal, quer seja pela limitação de sua eficácia, quer seja pela amplitude dos seus efeitos adversos (GRIS et al., 2010). Neste aspecto, é importante destacar que muitos anti-inflamatórios disponíveis atualmente são capazes de induzir lesões gástricas por inibirem a síntese de PGs, o que representa uma importante limitação ao uso desses produtos. O estudo dos mecanismos e dos mediadores envolvidos nos processos dolorosos e inflamatórios vem sendo objeto de estudos ao longo dos últimos anos (KANAZAWA, 2012; BASBAUM et al., 2009; HUA; CABOT, 2010; CAFFREY; FITZGERALD, 2012). A procura por substâncias que apresentem potente atividade anti-inflamatória e efeitos adversos limitados continua sendo bastante estimulada na comunidade científica. Assim, diversos modelos *in vivo* têm sido utilizados na pesquisa de compostos com atividade anti-inflamatória/antinociceptiva (VERGNOLLE, 2008).

#### **1.4 Uso da função *N*-acilidrazonas no planejamento e síntese de novos fármacos**

Na busca por novas substâncias com propriedades anti-inflamatórias, analgésicas e anti-agregantes plaquetária, pesquisadores do LASSBio® planejaram uma série de compostos hidrazônicos pirazólicos através da hibridização molecular dos inibidores duais de COX e 5-lipooxigenase (5-LOX) BW-755c e CBS-1108 (SINCHOLLE; BERTEZ, LEGRAND, 1985).

A avaliação farmacológica *in vivo* desses derivados permitiu a identificação de alguns compostos com atividade anti-inflamatória, antinociceptiva e antiagregante plaquetária (FRAGA; BARREIRO, 2006). Estudos posteriores evidenciaram a relevante contribuição

farmacofórica da subunidade arilidrazona, contida nestes derivados (FRAGA; BARREIRO, 2006). A etapa seguinte de otimização, através da substituição do grupo nitro, potencialmente toxicofórico (BARREIRO; SILVA; FRAGA, 1996), pela função carbonila - que mimetiza a insaturação N=O - diretamente ligada ao farmacóforo arilidrazona, deu origem a uma série de *N*-acilidrazonas (NAH) pirazólicas (FRAGA; BARREIRO, 2006). Os compostos da série de NAH pirazólicas mostraram relevante atividade antinociceptiva e antiagregante plaquetária, mostrando-se mais promissores do que aqueles da série original, isto é, das arilidrazonas. A eliminação do grupamento azavínico (N=C) das NAH estudadas levou a construção de compostos amídicos, que se mostraram inativos, evidenciando o caráter farmacofórico da função NAH (FRAGA; BARREIRO, 2006).

A partir dos resultados promissores com a série de NAH pirazólicas, diversas séries de compostos contendo a subunidade privilegiada NAH foram planejadas, aplicando-se estratégias como hibridação molecular, simplificação molecular, bioisosterismo e restrição conformacional.

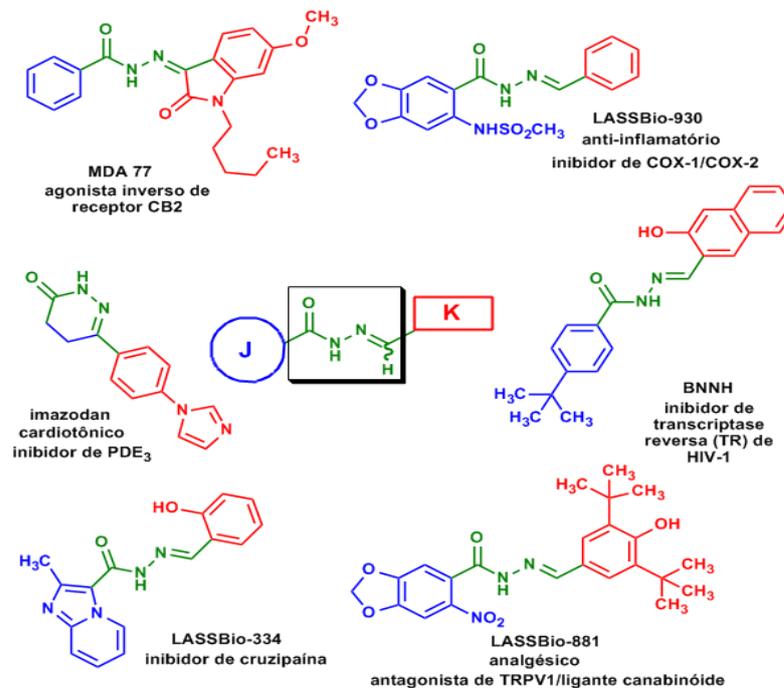
Desde a descoberta das primeiras NAH pirazólicas pelo LASSBio®, centenas de derivados *N*-acilidrazônicos foram sintetizados e submetidos a avaliação farmacológica, permitindo a identificação de vários protótipos com propriedades anti-inflamatórias (LIMA et al., 2007), analgésicas (BEZERRA-NETO et al., 2006), antitrombóticas (SILVA et al., 2004) e cardioativas (SUDO; ZAPATA-SUDO; BARREIRO, 2001), entre outras. A coleção de dados acumulados a partir destes estudos contribuiu para a compreensão das relações entre a estrutura química e atividade biológica, permitindo a identificação dos farmacóforos principais envolvidos nas diferentes atividades farmacológicas observadas (FRAGA; BARREIRO, 2006).

Em linhas gerais, pôde-se identificar que a função *N*-acilidrazonas possui diferentes perfis de atividade farmacológica conforme os grupos ligados a subunidade imina e/ou acila. Considerando que a subunidade NAH é capaz de contribuir para o reconhecimento molecular por um grande número de biorreceptores e que modificações racionais dos grupos ligados a essa subunidade dão origem a compostos mais seletivos para determinados alvos, a NAH tem sido recentemente descrita como uma estrutura privilegiada (DUARTE; BARREIRO; FRAGA, 2007).

De fato, a classe das *N*-acilidrazonas engloba compostos capazes de modular diferentes alvos, apresentando diversas atividades que incluem: agonismo inverso de receptor

canabinóide 2 (CB2) (DIAZ et al., 2009), inibição da enzima COX (TRIBUTINO et al., 2009), inibição da transcriptase reversa do vírus HIV-1 (BORKOW et al., 1997; SLUIS-CREMER; ARION; PARNIAK, 2002), antagonismo de receptor vaniloide do tipo 1 (TRPV-1) (DUARTE; BARREIRO; FRAGA, 2007; TRIBUTINO et al., 2010), inibição da enzima cruzipaína (IFA et al., 2000) e de fosfodiesterase 3 (PDE3) (STEFFEN; ELDON; EVANS, 1986), entre outras (**Figura 5**).

**Figura 5-** *N*-acilidrazonas e suas variadas atividades farmacológicas.

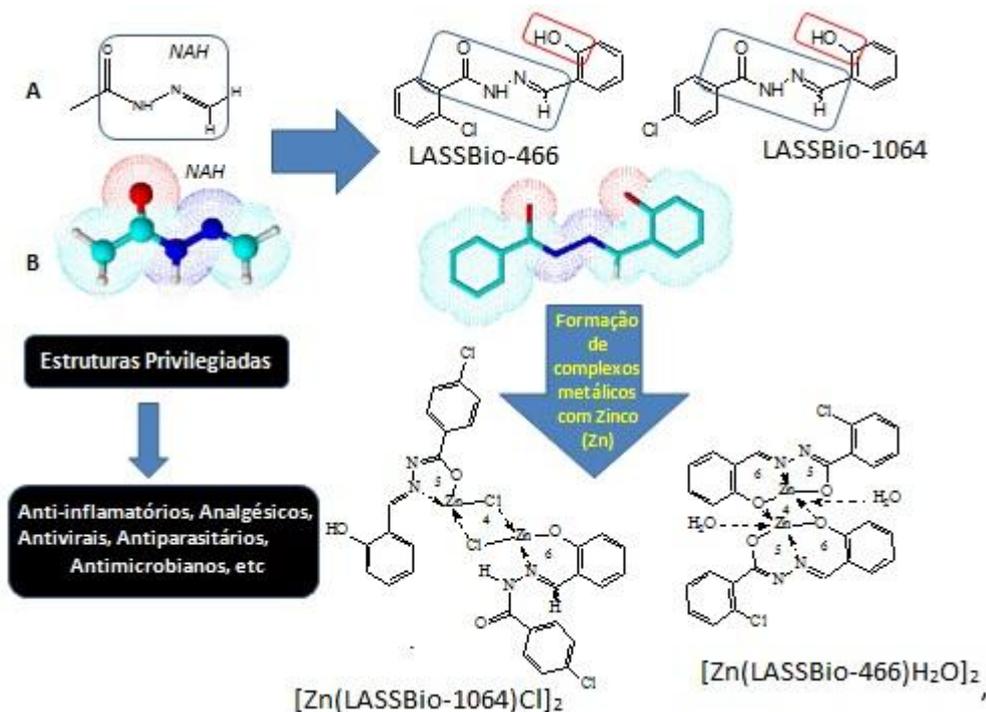


Fonte: DIAZ et al., 2009; TRIBUTINO et al., 2009; BORKOW et al., 1997; DUARTE; BARREIRO; FRAGA, 2007; IFA et al., 2000; STEFFEN; ELDON; EVANS, 1986.

Neste cenário e em continuidade aos projetos realizados pelo LASSBio®, os quais buscam protótipos de fármacos com atividade antinociceptiva e anti-inflamatória, foram realizados o planejamento e a síntese de duas séries contendo a função *N*-acilidrazona. A primeira série composta pelos regioisômeros LASSBio-466 e LASSBio-1064 foi planejada para obtenção de novos compostos-*N*-acilidrazônicos (NAH) bioativos, contendo a unidade 2-hidroxifenila como substituinte da função imina, a fim de explorar sua complexação com metais divalentes, obtendo-se seus respectivos complexos de coordenação com o zinco (Zn<sup>+2</sup>).

Posteriormente foi planejada a determinação da atividade antiinflamatória e analgésica comparativa dos ligantes livres (LASSBio-466 e LASSBio-1064) e de seus complexos de Zn (**Figura 6**). A escolha do metal foi decorrente de sua baixa toxicidade e do seu caráter essencial para uma variedade de reações enzimáticas. Estas reações são responsáveis por mediar uma ampla faixa de processos fisiológicos, dentre os quais a modulação de funções imunorregulatórias e de células inflamatórias (ZALEWISKI et al., 2005). Desta forma, o zinco pode ser considerado um importante agente imunorregulatório com atividade anti-inflamatória.

**Figura 6- Planejamento estrutural da série dos regioisômeros LASSBio-466 e LASSBio-1064 e seus complexos de zinco.**



O planejamento dos compostos da segunda série se fundamentou na aplicação dos princípios de *SOSA* (WERMUTH, 2004) e no caráter de estrutura privilegiada atribuído à subunidade estrutural *N*-acilidrazona (DUARTE; BARREIRO; FRAGA, 2007). A estratégia *SOSA* é baseada na premissa de que a maioria dos fármacos, além de sua atividade principal, possui uma ou mais atividades secundárias, as quais poderão ser otimizadas em detrimento da principal através de modificações na estrutura do fármaco. Desta forma, a partir de

modificações moleculares no piroxicam, um fármaco anti-inflamatório cuja eficácia, segurança e biodisponibilidade oral são bem estabelecidas, planejou-se uma série de derivados aza-vinílogos que diferem entre si pela subunidade aromática ligada à região imínica. Esses novos derivados possuem em sua estrutura, além do padrão estrutural comum aos oxicams, o bióforo *N*-acilidrazona, uma estrutura privilegiada (**Figura 7**). Através da inclusão da subunidade estrutural NAH objetivou-se obter compostos anti-inflamatórios com um perfil farmacológico superior ao do piroxicam, capazes de modular, além da enzima COX, outros alvos relacionados à inflamação, possivelmente como resultado da otimização de atividades secundárias do piroxicam.

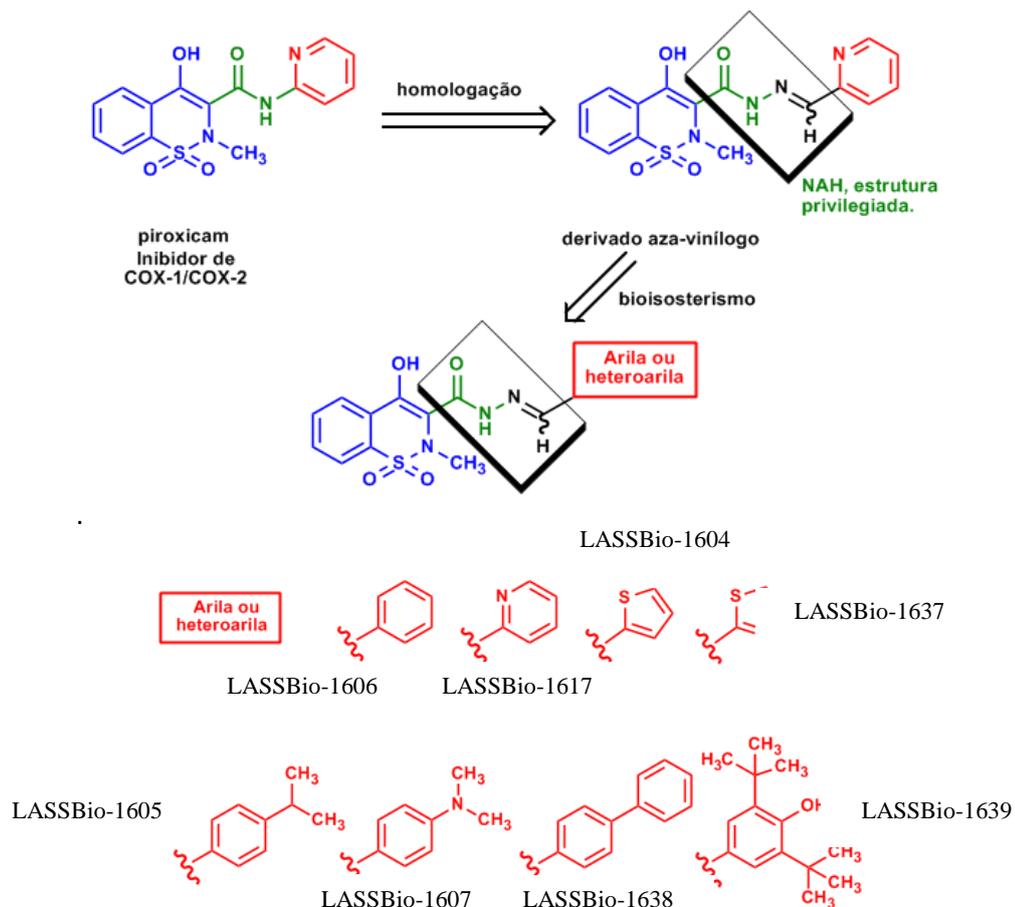
Os grupos aromáticos ou heteroaromáticos ligados à região imínica foram escolhidos de forma a permitir uma adequada variabilidade estrutural à série e também de acordo com características estruturais ou propriedades identificadas em alguns protótipos descritos na literatura.

O grupo 2-piridinila foi escolhido, naturalmente, por dar origem ao composto LASSBio-1617, o derivado que apresenta maior similaridade estrutural com o piroxicam, fármaco que inspirou a série. A escolha do grupo fenila permitiu a obtenção de um isómero de LASSBio-1617, que, contudo, não apresenta um átomo de nitrogênio na posição *orto* do anel aromático, uma característica estrutural que durante o desenvolvimento do piroxicam parecia ser relevante para a atividade farmacológica.

Modificações visando alterar as características estereoeletrônicas dos substituintes ligados a imina deram origem aos compostos LASSBio-1605 e LASSBio-1607. LASSBio-1605 é mais volumoso que os derivados supracitados e LASSBio-1607, além de mais volumoso, possui o substituinte *N,N*-dimetilamino, doador de elétrons, que confere maior densidade eletrônica ao anel aromático ligado à subunidade imínica, e é também um potencial aceptor de ligação de hidrogênio, característica que pode favorecer a interação com um biorreceptor. A introdução dos grupos 4-bifenila e 3,5-di-*terc*-butil-4-hidroxifenila originou os derivados LASSBio-1638 e LASSBio-1639, que guardam um menor grau de similaridade com os demais compostos da série. Um critério semelhante orientou a eleição do grupo 2-tiazolila e de seu isómero 2-tiofenila, originando, respectivamente, os compostos LASSBio-1637 e LASSBio-1604. O grupo 2-tiazolila está presente no sudoxicam (LOMBARDINO; WISEMAN, 1972), um bioisómero do piroxicam que possui atividade anti-inflamatória mais potente que este fármaco em modelo de edema de pata induzido por carragenina em ratos,

mas cujo desenvolvimento clínico foi interrompido em virtude de seu complexo perfil farmacocinético. A introdução do grupo 4-isopropilfenila e de seu isómero 4-*N,N*-dimetilaminofenila permitiu maior variabilidade na lipofilicidade e nas propriedades. O planejamento de LASSBio-1638 se baseou em uma série de derivados oxicans bifenílicos, cuja atividade inibitória sobre a enzima mPGEs foi recentemente descrita (WANG et al., 2010). LASSBio-1639, por sua vez, foi inspirado em LASSBio-881 (DUARTE; BARREIRO; FRAGA, 2007), um protótipo analgésico, antagonista de TRPV1 e ligante canabinóide, que possui também propriedades redox em virtude da presença do grupo 3,5-di-*terc*-butil-4-hidroxifenila (TRIBUTINO et al., 2010).

**Figura 7- Planejamento estrutural da série de derivados N-acilidrazônicos análogos ao piroxicam**



## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Investigar o potencial antinociceptivo e anti-inflamatório de duas novas séries de derivados *N*-acildrazônicos (NAH) racionalmente planejados e sintetizados pelo Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas (LASSBio<sup>®</sup>) como candidatos a protótipos de fármacos analgésicos e anti-inflamatórios.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a atividade antinociceptiva em modelos animais de nocicepção;
- Investigar uma possível ação central no modelo de placa quente;
- Pesquisar a atividade anti-inflamatória em modelos animais de inflamação aguda;
- Verificar a atividade inibitória sobre COX-1/COX-2 *in vitro* dos derivados *N*-acildrazônicos análogos do piroxicam.

### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Reagentes, soluções e fármacos utilizados**

Foram utilizados nos diferentes ensaios os seguintes reagentes e soluções: Ácido acético glacial P.A. (Vetec); Azul de Tripán 10% (Sigma); Formaldeído P.A. (Vetec); Cloreto de Sódio – NaCl (Sigma-Aldrich); Carboximetilcelulose – GOMA ARÁBICA (Sigma); Carragenina (Sigma); Zymosan A (Sigma-Aldrich), Panótico rápido (Laborclin); Tween 80<sup>®</sup> (Sigma-Aldrich), kit de ELISA de avaliação da inibição de COX-1/COX-2 (Cayman Chemical).

Foram utilizados como fármacos-padrão de referência, a Dipirona (Sigma-Aldrich), Piroxicam (Merck), Indometacina (Merck) e Morfina (Cristália, BR). Os fármacos-padrão e compostos-teste foram diluídos em 20 µL de Tween 80<sup>®</sup> e goma arábica 5% e administrados na dose de 100 µmol/Kg e administrado por via oral (v.o), com exceção da morfina, administrada por via intraperitoneal (i.p) na dose 15 µmol/Kg em solução salina estéril.

#### **3.2 Ensaios Farmacológicos**

Os ensaios farmacológicos foram realizados no Laboratório de Farmacologia e Imunidade (LaFI) no Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde (ICBS) da Universidade Federal de Alagoas (UFAL).

### 3.2.1 Animais

Neste trabalho foram utilizados camundongos da linhagem Swiss de ambos os sexos, pesando entre 20 - 30 g, com 6 a 8 semanas de idade, cedidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Alagoas - UFAL. Após o período de desmame, os animais foram transferidos para o Biotério do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde - ICBS, onde foram mantidos em gaiolas plásticas em ambiente com temperatura e luminosidade controladas, obedecendo a um ciclo de 12 horas claro e 12 horas escuro, com livre acesso a água e ração especial para roedores. Os animais foram mantidos no laboratório pelo menos 1 hora antes da realização dos experimentos para aclimatação, os quais foram sempre realizados entre 8-17 horas. Foram utilizados 6 animais por grupo, que foram deixados em jejum por 8 horas antes do início dos experimentos com livre acesso a água. Logo após os experimentos os animais foram sacrificados por deslocamento cervical. Todos os animais utilizados neste trabalho foram manipulados de acordo com as normas estabelecidas pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Alagoas (Nº 026681/2009-23), para manuseio de animais em modelos de dor e inflamação.

### 3.2.2 Obtenção dos compostos teste

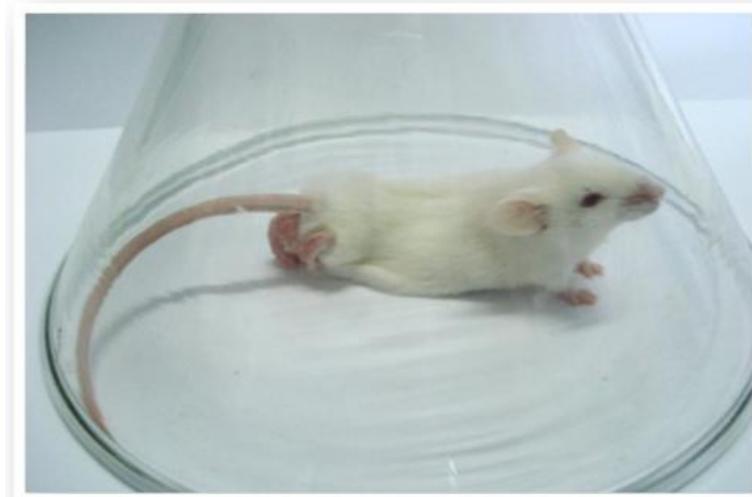
Os compostos-teste foram cedidos pelo Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Estas foram divididos em 2 séries, sendo: a primeira composta por H<sub>2</sub>LASSBio-466, H<sub>2</sub>LASSBio-1064 e seus complexos de zinco - [Zn(LASSBio-466) H<sub>2</sub>O]<sub>2</sub> e [Zn(LASSBio-1064)Cl]<sub>2</sub> e a segunda série composta por derivados *N*-acilidrazônicos análogos ao piroxicam (LASSBio-1604, LASSBio-1605, LASSBio-1606, LASSBio-1607, LASSBio-1617, LASSBio-1637, LASSBio-1638, LASSBio-1639).

### 3.2.3 Ensaio *in vivo*

#### 3.2.3.1 Ensaio de contorções abdominais induzidas por ácido acético

O protocolo experimental utilizado nesse ensaio foi semelhante ao proposto originalmente por Collier et al. (1968), com pequenas modificações. Nesse método, a nocicepção foi induzida pelo ácido acético 0,6%, que atua como um estímulo nocivo quando injetado na cavidade peritoneal do camundongo. A resposta do animal ao estímulo é representada por uma sequência de contrações da musculatura abdominal juntamente com a extensão dos membros inferiores (**Figura 8**). Quarenta minutos antes da injeção do ácido acético i.p, os animais foram tratados com os compostos-teste e os fármacos-padrão (dipirona e piroxicam). O grupo controle recebeu o veículo (Tween 80<sup>®</sup> /goma arábica 5%) utilizado para suspender os compostos. Cinco minutos após a administração do agente álgico foi registrado o número de contorções abdominais produzidas pelo animal durante 20 min.

**Figura 8- Momento de uma contorção abdominal induzida por ácido acético 0,6%.**



### 3.2.3.2 Ensaio de nociceção induzida por formalina

O procedimento utilizado para realização desse ensaio foi similar ao descrito por Hunskaar e Hole (1987). Esse ensaio é caracterizado por duas fases distintas: uma fase neurogênica (1ª fase) e outra inflamatória (2ª fase). Para isso, os camundongos receberam uma injeção s.pl. de 20 µL de formalina - formaldeído diluído em solução salina (2,5%) - na face dorsal da pata traseira, quarenta minutos após o tratamento com os compostos-teste e os fármacos-padrão (indometacina e piroxicam). Foram feitos controles com o veículo (Tween 80<sup>®</sup>/goma arábica 5%). Após a injeção os animais foram imediatamente colocados, individualmente, em um béquer e cronometrou-se o tempo que o animal permaneceu lambendo, mordendo ou batendo a pata, sendo esse tempo considerado como indicativo de nociceção (**Figura 9**). Os primeiros 5 minutos cronometrados representam a fase neurogênica do teste, os últimos 15 minutos representam a fase inflamatória, totalizando 30 minutos. A porcentagem de inibição da resposta foi calculada pela comparação com o grupo controle.

**Figura 9-** Camundongo lambendo a pata durante o ensaio de nociceção induzida por formalina.



### 3.2.3.3 Ensaio da placa quente (Hot plate)

A atividade antinociceptiva central dos derivados foi avaliada utilizando o modelo da placa quente descrito por Kuraishi et al. (1983). Os camundongos foram colocados em uma placa aquecida a  $54 \pm 1,0$  °C (**Figura 10**) e suas respostas ao estímulo térmico, tempo em segundos que o animal gastou para lamber, levantar ou morder uma de suas patas dianteiras ou traseiras (tempo de latência) foram cronometradas. Foram feitas duas medidas controle em intervalos de 30 minutos, estabelecendo-se o tempo de corte (máximo de permanência do animal na placa) de 15 segundos. Posteriormente, os animais foram tratados com os compostos teste, fármacos-padrão (morfina e piroxicam). Foram feitos controles do veículo (Tween 80<sup>®</sup>/goma arábica 5%). Então, foi registrado o tempo em segundos que o animal permaneceu sobre a placa (tempo de latência do animal). Após um intervalo de 30 minutos, novas medidas do tempo de latência foram registradas em intervalos de 30 minutos durante 2 horas.

**Figura 10-** Foto do ensaio de placa quente.



Fonte: LaFI-ICBS-UFAL, 2012.

### 3.2.3.4 Ensaio de peritonite induzida por carragenina

Seguindo a metodologia descrita por Ferrándiz e Alcaraz (1991) os camundongos foram tratados com os compostos teste e o fármaco padrão (piroxicam) e após 40 minutos foram submetidos ao ensaio de peritonite, por administração i.p. de 250 µL/cavidade de uma solução de carragenina 1% dissolvida em salina estéril. Foram feitos também controles do veículo (Tween 80<sup>®</sup>/goma arábica 5%). Após 4 h da injeção de carragenina, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, e a cavidade peritoneal foi lavada com de 3 mL tampão fosfato salina pH 7,4 (PBS). Após a massagem do abdômem, o fluido peritoneal foi coletado (cerca de 2 mL) e a contagem total das células foi realizada (**Figura 11**). Para a contagem do número total de células, 10 µL do fluido peritoneal foi coletado de cada animal, diluídos e homogeneizados em 190 µL de azul de Tripán, obtendo uma diluição de 1:20. Dessa solução, 10 µL foram transferidos para a câmara de Neubauer onde foi realizada a contagem (2 quadrantes) com auxílio de microscópio óptico e objetiva de 40x. O número de células recrutadas foi obtido utilizando o cálculo abaixo:

$$\text{n}^{\circ} \text{ de células/mL} = \frac{\text{n}^{\circ} \text{ total de células}}{\text{n}^{\circ} \text{ de quadrantes contados}} \times \text{fator de diluição} \times 10.000$$

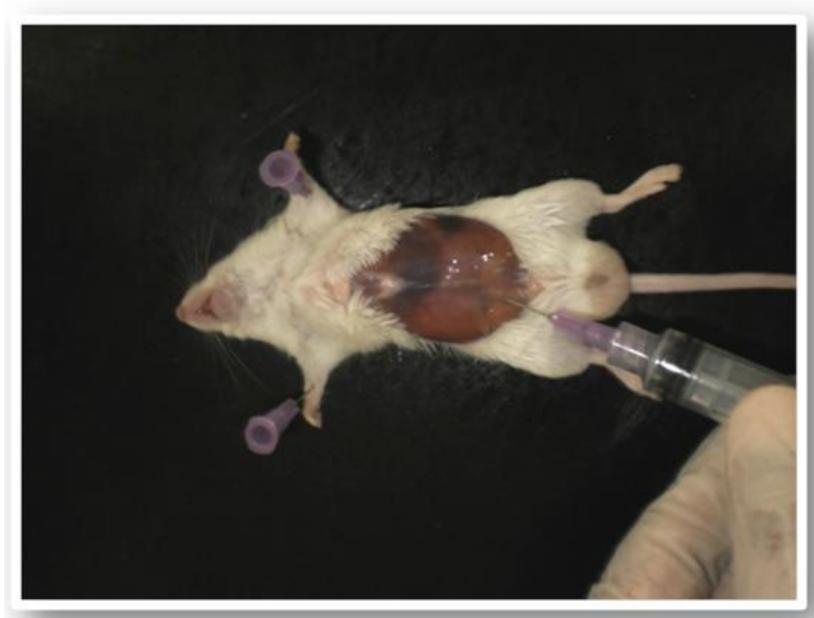
### 3.2.3.5 Ensaio de peritonite induzida por Zymosan A

Seguindo a metodologia descrita por Leite et al. (2007) os camundongos foram tratados com os compostos teste e os fármacos-padrão (indometacina e piroxicam), após 40 minutos foram submetidos ao ensaio de peritonite por administração intraperitoneal de 0,5 mL de uma solução de Zymosan A (Sigma) (2 mg/mL). Foram feitos também controles com o veículo (Tween 80<sup>®</sup>/goma arábica 5%). Após 6 horas da injeção de Zymosan A, a cavidade peritoneal foi lavada com 2 mL de uma solução de tampão fosfato (PBS). Após a massagem do abdômem, o fluido peritoneal foi coletado (cerca de 2 mL) e a contagem total das células foi realizada (**Figura 11**). Para a contagem do número total de células, 10 µl do fluido

peritoneal foi coletado de cada animal, diluídos e homogeneizados em 190 µl de azul de Tripán, obtendo uma diluição de 1:20. Dessa solução, 10 µl foram transferidos para a câmara de Neubauer onde foi realizada a contagem (2 quadrantes) com auxílio de microscópio óptico e objetiva de 40x. O número de células recrutadas foi obtido utilizando o cálculo abaixo:

$$\text{n}^\circ \text{ de células/mL} = \frac{\text{n}^\circ \text{ total de células}}{\text{n}^\circ \text{ de quadrantes contados}} \times \text{fator de diluição} \times 10.000$$

**Figura 11- Coleta do lavado peritoneal do camundongo durante o ensaio de peritonite induzida por carragenina ou Zymosan A.**



Fonte: LaFI-ICBS-UFAL, 2012.

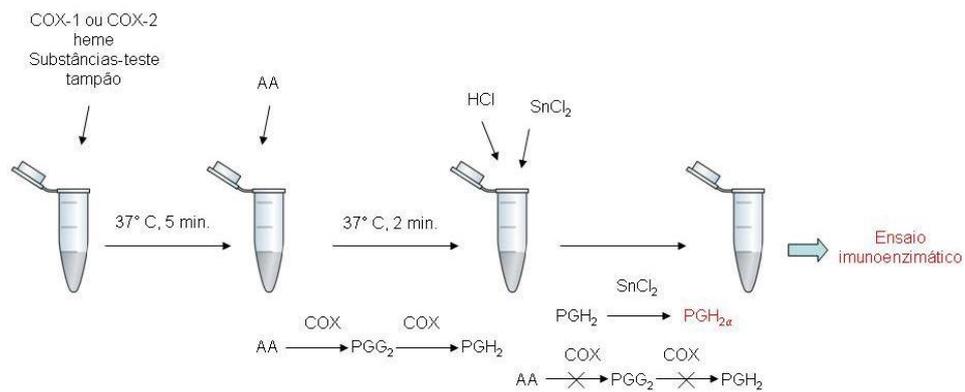
### 3.2.4 Ensaio *in vitro*

#### 3.2.4.1 Ensaio de avaliação da inibição de COX-1/COX-2

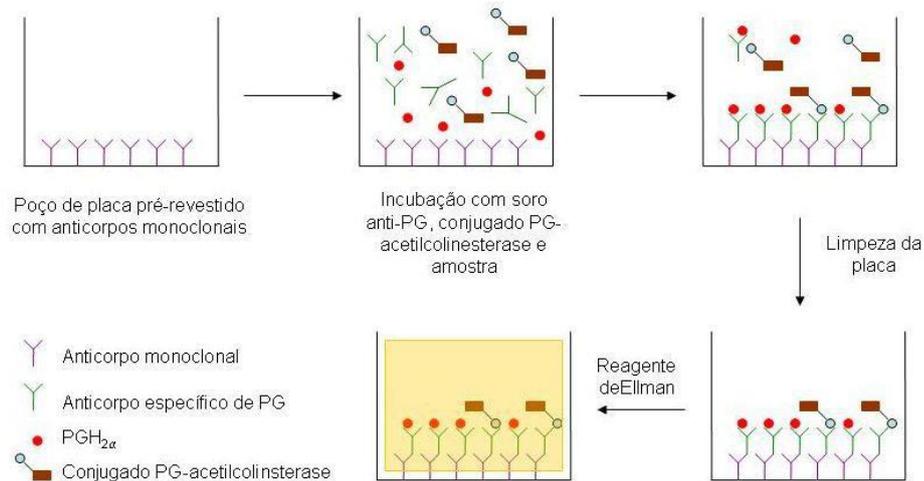
Os análogos LASSBio-1604, LASSBio-1617, LASSBio-1637, LASSBio-1638, LASSBio-1639, piroxicam e indometacina foram avaliados ainda quanto à sua capacidade de inibir COX de acordo com o método descrito por UDDIN et al. (2004), utilizando, para tanto, o kit de determinação da inibição de COX-1/COX-2 ovina (Cayman Chemicals, MI, USA), de acordo com as instruções do fabricante. COX catalisa a primeira etapa da biossíntese do ácido araquidônico para PGH<sub>2</sub>. PGF<sub>2α</sub> produzida a partir de PGH<sub>2</sub> por redução com cloreto de estanho, é medido por ensaio imunoenzimático. As soluções de compostos-teste foram preparadas utilizando como solvente DMSO e tampão de reação (fornecido no kit) a uma concentração de 0,1 μM, 0,3 μM e 1 μM. Resumidamente, uma série de soluções tampão de reação fornecida (0,1 M Tris-HCl PH 8,0 contendo 5 mM EDTA e 2 mM fenol) foi aliquotada em tubos eppendorf, onde foram adicionadas as enzimas COX-1 ou COX-2 (10 μL) na presença de heme (10 μL). Posteriormente, foram adicionados 10 μL de soluções de LASSBio-1604, LASSBio-1617, LASSBio-1637, LASSBio-1638, LASSBio-1639, piroxicam e indometacina (0,1 μM, 0,3 μM e 1 μM em um volume final de 100 μL). Estas soluções foram incubadas por um período de 5 min a 37 ° C. Posteriormente, 10 μL de uma solução de ácido araquidônico (100 μM) foi adicionada e a reação de COX foi interrompida pela adição de 50 μL de HCl (1M) após 2 min do início da reação. PGF<sub>2α</sub>, produzido de PGH<sub>2</sub> por redução com cloreto de estanho foi medido por ensaio imunoenzimático. Este ensaio baseia-se na concorrência entre PGs e o conjugado PG-acetilcolinesterase para uma quantidade limitada de anti-soro de PG. A quantidade de PG capaz de se ligar ao anti-soro PG é inversamente proporcional a inibição da COX, pois a concentração do conjugado PG-acetilcolinesterase é mantida constante, enquanto que a concentração de PGs varia. Este complexo anticorpo-PG se liga a um anti-anticorpo monoclonal previamente colocado nos poços da placa. A placa é lavada para remover os reagentes e, em seguida é adicionado o reagente de Ellman, que contém o substrato da acetilcolinaesterase. O produto desta reação enzimática produz uma cor amarela, que absorve em 412 nm. A intensidade desta cor é determinada por espectrofotometria, e é proporcional à quantidade de conjugado PG-acetilcolinesterase que se

ligou ao anti-soro PG, o que é inversamente proporcional à quantidade de PGs presentes no poço durante o período de incubação (Figura 12).

**Figura 12- Ensaio *in vitro* de inibição da enzima COX. a) Incubação das amostras com as enzimas COX-1 ou COX-2 e seu substrato. b) Esquema representativo do ensaio imunoenzimático para quantificação de PGH<sub>2</sub>.**



(a)



(b)

### 3.2.5 Análise Estatística

Os níveis de significância entre os grupos experimentais e o controle foram feitos utilizando-se o teste t student seguido de Mann-Whitney ou ANOVA seguido de Dunnet do tutorial Prisma®. Os valores foram considerados significativos quando  $p < 0,05$ . Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média, conforme indicado nas legendas das figuras e tabela. Os valores de  $DI_{50}$  foram obtidos por meio do método de regressão não-linear utilizando-se o software Graph Pad Prism® (2005, San Diego, CA).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Diversos modelos de nocicepção e inflamação em animais de laboratórios podem ser utilizados para verificar a atividade analgésica e anti-inflamatória de protótipos de fármacos. Embora os animais submetidos a um estímulo nociceptivo não tenham capacidade de se comunicar verbalmente quando da ocorrência da dor, são capazes de exibir respostas comportamentais, motoras e fisiológicas semelhantes às observadas em humanos. Essas respostas comportamentais são estudadas e comparadas na presença de fármacos reconhecidamente analgésicos que interferem no processo fisiológico da dor, o que nos permite inferir que um animal está experimentando uma resposta álgica (LAPA; LONGHINI; MELLO, 2003; PERAZA et al., 2007).

Os modelos de nocicepção baseiam-se na observação da resposta do animal frente à utilização de estímulos mecânicos, térmicos ou químicos. Neste trabalho, para avaliação da atividade antinociceptiva foram utilizados estímulos químicos nos ensaios de contorção abdominal induzida por ácido acético e nocicepção induzida por formalina, bem como estímulo térmico no modelo de placa quente. Para avaliação da atividade anti-inflamatória foram utilizados os modelos de migração celular, peritonite induzida por carragenina e peritonite induzida por Zymosan A. Foram utilizados como fármacos-padrão dipirona, morfina e indometacina para série 1 e piroxicam, e morfina para série 2.

### 4.1 Avaliação Antinociceptiva e Anti-inflamatória *in vivo*

Os compostos testados (séries 1 e 2) pertencem a classe das *N*-acilidrazonas, que engloba compostos capazes de modular diferentes alvos, apresentando diversas atividades que incluem: agonismo inverso de receptor canabinóide 2 (CB2) (DIAZ et al., 2009), inibição da enzima COX (TRIBUTINO et al., 2009), inibição da transcriptase reversa do vírus HIV-1 (BORKOW et al., 1997), antagonismo de receptor vaniloide do tipo 1 (TRPV-1) (DUARTE; BARREIRO;FRAGA, 2007; TRIBUTINO et al., 2010) e de fosfodiesterase 3 (PDE3) (STEFFEN; ELDON; EVANS, 1986), entre outras.

Todos os derivados NAH testados mostraram-se ativos por v.o no ensaio de contorção abdominal induzida por ácido acético (**Tabelas 1 e 2**) na dose de 100  $\mu\text{mol/Kg}$ . O tratamento por v.o e seu conseqüente efeito indicam que os derivados são absorvidos pelo trato gastrintestinal. Todos os compostos da série 1 induziram uma redução do número de contorções abdominais, estatisticamente significativa, quando comparados com controle (**Tabela 1**). Nestes dados, vale destacar o efeito dos compostos  $\text{H}_2\text{LASSBio-1064}$  e  $[\text{Zn}(\text{LASSBio-466})\text{H}_2\text{O}]_2$  que apresentaram porcentagem de inibição do números de contorções em 81,3% e 82,7%, respectivamente. O  $\text{H}_2\text{LASSBio-466}$ , e  $\text{Zn}(\text{LASSBio-1064})\text{Cl}_2$  induziram uma redução de 60,4%, 70,9%, respectivamente. O fármaco padrão (dipirona) apresentou uma porcentagem de inibição de 77,7%.

**Tabela 1- Efeito dos  $\text{H}_2\text{LASSBio-466}$ ,  $\text{H}_2\text{LASSBio-1064}$ , seus complexos de zinco (II) e dipirona (100  $\mu\text{mol/Kg}$ , v.o.) no ensaio de contorção abdominal induzida por ácido acético. Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição e média  $\pm$  E.P.M (erro padrão da média) do número de contorções abdominais nos camundongos.**

Composto	Nº de Contorções Média $\pm$ E.P.M	% de Inibição
Controle	37,5 $\pm$ 1,4	-
Dipirona	8,3 $\pm$ 2,7**	77,7 %
$\text{H}_2\text{LASSBio-466}$	14,8 $\pm$ 2,2**	60,4%
$\text{H}_2\text{LASSBio-1064}$	7,0 $\pm$ 1,1**	81,3%
$[\text{Zn}(\text{LASSBio-466})\text{H}_2\text{O}]_2$	6,6 $\pm$ 1,4**	82,7%
$\text{Zn}(\text{LASSBio-1064})\text{Cl}_2$	10,8 $\pm$ 2,3**	70,9%

\*\*p < 0,01 (ANOVA One Way seguido Dunnett).

Como podemos observar na Tabela 1 a atividade antinociceptiva foi favorecida pela complexação no caso de  $[\text{Zn}(\text{LASSBio-466})\text{H}_2\text{O}]_2$ , o qual apresentou uma atividade maior que a acilidrazona livre  $\text{H}_2\text{LASSBio-466}$ . Por outro lado, a coordenação de  $\text{H}_2\text{LASSBio-1064}$  ao zinco (II) não promoveu melhora na atividade antinociceptiva dos compostos. Trabalhos na literatura citam o incremento da atividade farmacológica de compostos quando estes são complexados com zinco. Dillon et al. (2003), ao analisarem a ação da indometacina e seu complexo de zinco  $[\text{Zn}_2(\text{Indo})_4(\text{DMA})_2]$ , por v.o, no ensaio de edema de pata induzida por carragenina, observaram que a atividade anti-inflamatória da indometacina foi favorecida pela complexação. Apesar da adição do zinco possivelmente não ter alterado o mecanismo de ação da indometacina, ela diminuiu sua toxicidade gastrointestinal aumentando o índice

terapêutico do composto (DILLON et al., 2003). Singla e Wadhwa (1994) observaram que a complexação da indometacina com zinco aumentou em 2,29 vezes sua potência como agente anti-inflamatório em relação à indometacina. Eles sugerem que o aumento da potência está relacionado à maior absorção da forma complexada da indometacina, devido ao aumento da solubilidade e da taxa de dissolução do complexo de zinco.

Em relação à 2ª série, todos os compostos induziram uma redução do número de contorções abdominais, estatisticamente significativa, quando comparados com o controle tratado apenas com o veículo (**Tabela 2**). Os compostos LASSBio-1604, LASSBio-1638 e LASSBio-1639, os quais apresentam como subunidade imínica heteroaromática os grupos 2-tiofenila, 4-bifenila e 3,5-di-terc-butil-4hidroxifenila, apresentaram atividade comparável a do piroxicam, sendo capazes de reduzir o número de contorções de 90,4%, 84,0% e 82,7%, respectivamente. O LASSBio-1605, LASSBio-1606, LASBio-1607, LASSBio-1617 e LASSBio-1637 induziram uma redução estatisticamente significativa de 75,1%, 76,1%, 57,9%, 58,6% e 62,4% respectivamente. O piroxicam apresentou inibição de 95,4%. Logo esses resultados são bastante satisfatórios quando comparados à inibição resultante do tratamento com o fármaco padrão (**Tabela 2**).

**Tabela 2-** Efeito dos derivados *N*-acilidrazônicos e piroxicam (100 µmol/Kg, v.o.) no ensaio de contorção abdominal induzida por ácido acético. Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição e média ± erro padrão da média (E.P.M) do número de contorções abdominais nos camundongos.

Composto	Nº de Contorções Média±E.P.M	% de Inibição
Controle	39,4±4,9	-
Piroxicam	1,8±0,6**	95,4%
LASSBio-1604	3,8±1,7**	90,4%
LASSBio-1605	9,8±5,1*	75,1%
LASSBio-1606	9,4±1,6*	76,1%
LASSBio-1607	16,6±2,9**	57,9%
LASSBio-1617	16,3±2,5*	58,6%
LASSBio-1637	14,7±2,6**	62,7%
LASSBio-1638	6,3±1,5**	84,0%
LASSBio-1639	6,8±2,3**	82,7%

\*p < 0,05, \*\*p < 0,01 (ANOVA One Way seguido Dunnett).

A partir dos resultados da série 2, decidiu-se realizar uma curva-dose resposta de LASSBio-1617 e LASSBio-1637, em virtude de sua grande semelhança estrutural com o piroxicam e seu bioisómero (LIMA; BARREIRO, 2005) sudoxicam, e dos compostos mais ativos nesse modelo, a saber: LASSBio-1604, LASSBio-1638 e LASSBio-1639. Os valores de  $DI_{50}$  e a eficácia máxima desses derivados estão listados na **Tabela 3**.

Nenhum dos compostos de NAH mostrou-se ser mais potentes que o piroxicam ( $DI_{50}$ = 0,40  $\mu\text{mol/Kg}$ ), no ensaio de contorção abdominal induzida por ácido acético, uma vez que o composto mais potente nesta série foi o LASSBio-1639 ( $DI_{50}$ = 2,87  $\mu\text{mol/Kg}$ ). No entanto, todos os compostos mostraram uma eficácia máxima entre 80-90%, valores estes próximos ao piroxicam (95,4%) (**Tabela 3**).

**Tabela 3- Potência e eficácia de alguns derivados *N*-acilidrazônicos no modelo de contorção abdominal induzida por ácido acético. Valores obtidos a partir da curva dose utilizando-se dose 1, 3, 30, 100 e 300  $\mu\text{mol/Kg}$  por via oral.**

Composto	Potência ( $DI_{50}$ $\mu\text{mol/Kg}$ )	Eficácia Máxima
Piroxicam	0,40 (0,0013-115,6)	95,4%
LASSBio-1604	28,57 (6,29-49,61)	90,3%
LASSBio-1617	115,60 (0,17-808,30)	86,0%
LASSBio-1637	17,19 (0,189-156,1)	84,7%
LASSBio-1638	14,07 (1,06-187,3)	80,2%
LASSBio-1639	2,87 (0,06-130,5)	88,8%

O ensaio de contorção abdominal induzida por ácido acético é um modelo de dor visceral, frequentemente utilizado em *screening* farmacológicos de compostos sintéticos e/ou naturais, para detecção de novos compostos com atividade antinociceptiva (central e/ou periférica) e anti-inflamatória, pois esse ensaio farmacológico possui sensibilidade aos anti-inflamatórios não-esteroidais, e aos opióides (DU et al., 2007; FISCHER et al., 2008). Apesar de este modelo ser sensível e útil para desenvolvimento de substâncias com efeito analgésico, ele não é seletivo para dor, podendo ocorrer falso-positivos com bloqueadores adrenérgicos, anti-histamínicos, relaxantes musculares, inibidores de monoaminoxidases e neurolépticos (LE BARS et al., 2001; ELISABETSKY et al., 1995).

A administração intraperitoneal do ácido acético induz contorções abdominais em decorrência a uma reação inflamatória aguda relacionada com aumento dos níveis

prostanóides, em geral, por exemplo, aumento de PGE<sub>2</sub> e PGF<sub>2</sub>α, em fluídos peritoneais, bem como de produtos da lipoxigenase (DERART et al., 1980; VERMA et al., 2005). Porém, a administração intraperitoneal deste agente irritante não só induz a liberação de prostaglandinas, mas também mediadores do sistema nervoso simpático - histamina, serotonina e bradicinina (DUARTE et al., 1988). Macrófagos e basófilos, existentes na cavidade abdominal, sob ação do ácido acético, podem liberar citocinas, como IL-8, IL-1β e TNF-α (RIBEIRO et al., 2000). Além disso, a nocicepção causada pelo ácido acético pode ser mediada em parte pela dissociação dos prótons presentes no ácido acético, que estimulam diretamente canais de cátions não seletivos, como ASICs e TRPV1 localizados em neurônios aferentes primários, promovendo assim o início da dor visceral (IKEDA et al., 2001; COUTAUX et al., 2005). A eficácia dos AINEs, como piroxicam e dipirona (fármacos-padrão utilizados), em reduzir a nocicepção causada pela administração intraperitoneal do ácido acético é resultado da capacidade destes, pelo menos em parte, de inibir as COX-1 e COX-2, enzimas importantes na síntese de prostaglandinas que contribuem para a sensibilização do nociceptor (ESCRIBANO et al., 2003). Porém, possivelmente devem existir outros mecanismos que gerem o efeito antinociceptivo observado nesses fármacos. Além disso, outros agentes como bloqueadores neuromusculares e sedativos também podem atuar nesse modelo, o que poderia resultar em uma interpretação equivocada dos resultados (MIRANDA et al., 2008).

Encontram-se na literatura trabalhos que descrevem derivados *N*-acilidrazônicos, com atividade antinociceptiva e anti-inflamatória, que atuam na inibição da ciclooxigenases e no antagonismo do receptor vanilóide do tipo 1 (TRPV-1). Tributino et al. (2009) ao avaliarem o perfil anti-inflamatório do LASSBio-930 observou que o composto inibiu de forma não seletiva as COXs no ensaio de sangue total humano. Outro trabalho relata que a atividade antinociceptiva, em modelos de dor neuropática e inflamatória, do LASSBio-881 esta relacionado a ação antagonista do composto em receptores TRPV-1 (DUARTE; BARREIRO; FRAGA, 2007; TRIBUTINO et al., 2010).

Considerando isso e os resultados obtidos nesse trabalho, é possível sugerir que ao reduzir as contorções abdominais, os análogos testados, possivelmente, estarão exercendo ação periférica e/ou central pela inibição dos mediadores endógenos. Estes dados sugerem que todos os análogos possuem atividade antinociceptiva.

Em estudos de *screening* farmacológico de compostos com propriedades analgésicas, a investigação do sistema opióide é uma constante. Um dos principais motivos para essa busca é o objetivo de se chegar a um fármaco com propriedades terapêuticas semelhantes as da morfina, mas desprovido de efeitos adversos indesejáveis que limitam seu uso na terapêutica, principalmente no que diz respeito à tolerância e a dependência. Para avaliar um possível efeito central, os derivados foram submetidos ao ensaio de placa quente. É um modelo animal que avalia a atividade antinociceptiva de fármacos opióides, mas outros fármacos com atividade central tais como sedativas e hipnóticas, mostraram atividade no ensaio de placa quente (HIRUMA-LIMA et al., 2000).

Após o estudo neste ensaio, nenhum derivado NAH aumentou de forma significativa o tempo de permanência dos animais na placa quente durante o período de observação (**Tabelas 4 e 5**). Estes resultados sugerem que o efeito antinociceptivo observados nos compostos não envolve mecanismos centrais relacionados a modelos que dependem de reflexos espinhais. Sabe-se que este teste é bem eficiente em revelar a atividade de analgésicos opióides (LE BARS; GOZARIU; CADDEN, 2001) e essa observação foi confirmada pelo fato da morfina (agonista dos receptores opióides) aumentar o tempo de latência neste modelo. Além disso, é possível também eliminar a possibilidade de estes derivados agirem como sedativos, anestésicos ou relaxantes musculares, os quais também poderiam exercer ação no modelo de contorção (HIRUMA-LIMA et al., 2000).

**Tabela 4- Efeito do H<sub>2</sub>LASSBio-466, H<sub>2</sub>LASSBio-1064, seus complexos de zinco (II) (100 µmol/Kg, v.o.) e morfina (15 µmol/Kg, ip.) no ensaio de placa quente. Os resultados foram expressos como média ± E.P.M do tempo em segundos que o animal permaneceu sobre a placa aquecida à 54 ± 1 °C.**

Composto	Pre-tratamento	Pos-tratamento			
		1°	2°	3°	4°
Controle	2,8±0,2	2,9±0,3	1,6±0,2	2,3±0,4	1,7±0,1
Morfina	1,8±0,5	9,0±1,6*	7,4±0,8*	5,3±0,8*	25±02
H <sub>2</sub> LASSBio-466	2,1±0,2	2,3±0,4	2,1±0,2	2,2±0,2	2,6±0,1
H <sub>2</sub> LASSBio-1064	1,7±0,1	2,6±0,2	2,1±0,2	2,5±0,3	3,5±0,3
[Zn(LASSBio-466) H <sub>2</sub> O] <sub>2</sub>	2,1±0,2	4,2±0,8	2,4±0,6	3,6±0,6	5,4±1,2
Zn(LASSBio-1064)Cl <sub>2</sub>	1,5±0,1	2,0±0,5	2,3±0,5	2,9±1,0	1,9±0,2

\*p < 0,05 (ANOVA One Way seguido Dunnett).

**Tabela 5-** Efeito dos derivados *N*-acilidrazônicos, piroxicam (100 µmol/Kg, v.o.) e morfina (15 µmol/Kg, ip.) no ensaio de placa quente. Os resultados foram expressos como média ± E.P.M. do tempo em segundos que o animal permaneceu sobre a placa aquecida à 54 ± 1 °C.

Composto	Pre-tratamento	Pos-tratamento			
		1°	2°	3°	4°
Controle	2,08±0,45	1,63±0,41	2,26±0,65	1,99±0,24	2,14±0,48
Morfina	1,89±0,55	9,03±1,64*	7,40±0,89*	5,39±0,84*	2,58±0,23
Piroxicam	2,85±0,13	3,45±0,25	2,77±0,29	2,21±0,34	2,05±0,29
LASSBio-1604	2,55±0,17	3,33±0,59	3,03±0,24	1,90±0,38	3,0±0,44
LASSBio-1605	3,31±0,29	3,76±0,55	1,96±0,18	2,02±0,19	2,28 ±0,47
LASSBio-1606	2,30±0,23	3,93±0,55	2,63±0,34	2,47±0,30	2,98±0,68
LASSBio-1607	2,00±0,15	3,06±0,31	2,08±0,33	1,97±0,38	2,27±0,32
LASSBio-1617	2,38±0,49	3,46±0,78	2,39±0,45	3,06±0,50	2,00 ± 0,28
LASSBio-1637	1,85±0,36	1,88±0,20	1,73±0,21	2,24±0,35	1,85±0,36
LASSBio-1638	1,52±0,24	1,97±0,21	1,54±0,18	2,59±0,39	1,52±0,24
LASSBio-1639	2,99±0,51	4,33±0,51	4,02± 0,47	5,54±0,44	4,38±0,39

\*p<0,05 (t student seguido de Mann-Whitney).

Estes dados (**Tabela 4 e 5**) confirmam a atividade antinociceptiva periférica dos derivados, provavelmente, semelhante ao piroxicam e indometacina uma vez que os AINEs, de modo geral, não demonstram efeitos inibitórios significativos na nocicepção térmica. No entanto, alguns estudos mostram que a dipirona e o paracetamol são capazes de reduzir a dor por um mecanismo central de inibição da COX-3, uma isoforma que parece ser expressa em altos níveis no sistema nervoso central (SCWAB et al., 2003; BOTTING; AYOUB, 2005). Confirmando essa hipótese, Bisson (1991) mostrou a eficácia do paracetamol (105 e 315 mg/kg) no ensaio de placa quente, que aumentou o tempo de latência dos animais na placa de forma dose dependente.

Nossos dados no ensaio estão de acordo com os descritos por DA SILVA et al. (2010), que ao avaliar a atividade antinociceptiva de derivados *N*-acilidrazônicos pirazínicos no ensaio de placa de quente observaram que estes não foram capaz de aumentar o tempo de latência dos animais.

Para melhor avaliar o perfil antinociceptivo das duas séries de derivados *N*-acilidrazônicos, estes foram submetidos ao ensaio de nocicepção induzida por formalina. Ao realizar este ensaio com os compostos da série 1, como pode se observar na **Tabela 6**, na 1ª fase do modelo, o tempo que o animal passou lambendo a pata, em resposta à formalina

(s.pl.), no grupo controle foi de  $54,8 \pm 2,3$  s, sendo esse tempo reduzido após o tratamento com os compostos  $H_2LASSBio-1064$  e  $H_2LASSBio-466$ , que apresentaram uma redução estatisticamente significativa de 53,1% e 46,5%, respectivamente, do tempo de latência de lambida quando comparado com o controle tratado com o veículo. Já na segunda fase do teste o grupo tratado apenas com o veículo gastou  $227,6 \pm 22,7$  s lambendo a pata em resposta à formalina, enquanto que o tratamento com os compostos teste reduziu esse tempo de forma estatisticamente significativa. Nesta fase vale destacar os compostos  $H_2LASSBio-1064$  e  $[Zn(LASSBio-466) H_2O]_2$  que induziram significativamente a redução do tempo de lambida em 48,5% e 37,3%, respectivamente. A indometacina (fármaco padrão) apresentou porcentagem de redução de 49,1%.

No ensaio realizado nos compostos da série 2, como se pode observar na **Tabela 7**, na primeira fase desse ensaio, o tempo que o animal passou lambendo a pata, em resposta à formalina (s.pl.), no grupo controle foi de  $50,4 \pm 3,0$  s, sendo esse tempo reduzido após o tratamento com a substância  $LASSBio-1617$ , que apresentou uma redução estatisticamente significativa de 58,2% do tempo de latência de lambida quando comparado com o controle tratado com o veículo.

Já na segunda fase do teste o grupo tratado apenas com o veículo gastou  $198,6 \pm 19,4$  s lambendo a pata em resposta à formalina, enquanto que o tratamento com os derivados reduziu esse tempo de forma estatisticamente significativa. Nesta fase vale destacar os análogos  $LASSBio-1637$  e  $LASSBio-1638$  que induziram a redução do tempo de lambida em 60,0% e 54,2%, respectivamente. Sendo estas superiores a porcentagem de redução do piroxicam, que foi de 53,9%. Os análogos  $LASSBio-1604$ ,  $LASSBio-1617$ ,  $LASSBio-1639$  apresentaram uma redução do tempo de lambida, com uma porcentagem de redução de 32,5%, 38,4% e 27,5% respectivamente (**Tabela 7**).

**Tabela 6- Efeito dos H<sub>2</sub>LASSBio-466, H<sub>2</sub>LASSBio-1064, seus complexos de zinco (II) e indometacina (100 µmol/Kg, v.o.) no ensaio de nociceção induzida por formalina. Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição e média ± E.P.M do tempo de lambida (em segundos) da pata dos camundongos.**

Composto	Fase 1 Média±E.P.M.	Fase 2 Média±E.P.M.	% de Inibição	
			Fase 1	Fase 2
Controle	54,8±2,3	227,6±22,7	-	-
Indometacina	57,1±8,5	115,9±3,3*	-	49,1%
H <sub>2</sub> LASSBio-466	29,3±8,3**	182,4±17,4	46,5%	19,8%
H <sub>2</sub> LASSBio-1064	25,7±4,9*	117,0±19,1*	53,1%	48,5%
[Zn(LASSBio-466)H <sub>2</sub> O] <sub>2</sub>	40,6±12,7	142,8±23,1*	25,9%	37,3%
Zn(LASSBio-1064)Cl <sub>2</sub>	39,6±7,8	161,3±36,0	27,7%	29,2%

\*p < 0,05, \*\*p < 0,01 (ANOVA One Way seguido Dunnett).

**Tabela 7- Efeito dos derivados N-acilidrazônicos e piroxicam (100 µmol/Kg, v.o.) no ensaio de contorção abdominal induzida por ácido acético. Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição e média ± E.P.M do tempo de lambida (em segundos) da pata de camundongos.**

Composto	Fase 1 Média ± E.P.M.	Fase 2 Média ± E.P.M.	% de Inibição	
			Fase 1	Fase 2
Controle	50,9±5,8	194,0±10,5		-
Piroxicam	50,0±5,8	89,3±22,8**	NA	53,9%
LASSBio-1604	49,6±10,7	131,0±13,1**	NA	32,5%
LASSBio-1605	36,1±6,2	176,3±21,9	29,1%	9,1%
LASSBio-1606	49,6 ±11,2	172,5±25,9	NA	11,1%
LASSBio-1607	38,8±8,8	161,4±27,9	23,8%	16,8%
LASSBio-1617	21,3 ±5,2*	119,6±23,9*	58,2%	38,4%
LASSBio-1637	50,3±10,6	77,5±16,7*	NA	60,0%
LASSBio-1638	56,6±10,5	88,8±18,5**	NA	54,2%
LASSBio-1639	54,8±5,7	140,7±13,9*	NA	27,5%

\*p<0,05, \*\*p<0,01(teste t student seguido de Mann-Whitney). NA- não ativo

O ensaio de nociceção induzida por formalina é um modelo químico de nociceção que fornece uma resposta mais específica quando comparado ao modelo de contorção abdominal induzida por ácido acético (SHIBATA et al., 1989). A vantagem de utilizar o modelo de formalina é que se pode discriminar entre componentes de dor central e periférica (TJØLSEN et al., 1992). Este ensaio é constituído por duas fases: fase neurogênica (1<sup>a</sup> Fase) e fase inflamatória (2<sup>a</sup> Fase) (HUNSKAAR et al., 1985). A primeira fase ou fase neurogênica

inicia-se logo após a injeção de formalina, dura cerca de 5 min e, provavelmente, resulta do efeito irritante direto sobre os nociceptores ativando as fibras aferentes primárias (C e A $\delta$ ), acarretando na liberação de neuropeptídeos como SP e CGRP em terminais centrais e mediadores periféricos como a bradicinina em terminações periféricas (GONÇALVES et al., 2008; MURMO, 2009). A fase tardia ou fase inflamatória não é uma consequência da primeira fase, ela é mais duradoura e persistente, causada por inflamação local devido à formação e/ou liberação de mediadores como citocinas, eicosanóides, cininas, glutamato e óxido nítrico (CHICHORO; LORENZETTI; ZAMPRONIO, 2004).

Além disso, foi demonstrado por McNamara et al. (2007), que a formalina pode ativar receptores TRPV1, sendo capaz de degranular mastócitos, causando a liberação de histamina e serotonina (PARADA et al., 2003; MCNAMARA et al., 2007), que ativam os nociceptores, promovendo também a liberação de neuropeptídeos como substância P, neurocinina A, neurocinina B e CGRP, nos terminais periféricos aferentes primários (SANTOS; CALIXTO, 1997), assim como os aminoácidos excitatórios, glutamato e aspartato (OMETE; KAWAMATA, NAMIKI, 1998). Desta forma, acredita-se que estes mediadores químicos parecem ser os responsáveis pela nocicepção transitória observada nos primeiros cinco minutos após a injeção de formalina (MILANO et al., 2008).

Na literatura encontram-se relatos da participação de receptores canabinoides na modulação na hipersensibilização inflamatória causada por agentes irritante, como por exemplo a formalina. Segundo Hohmann e Herkenham (1999) os receptores canabinoides do tipo CB1 podem ser encontrados nas terminações nervosas periféricas e pode mediar a redução na hipersensibilidade inflamatória, por inibição da atividade de fibras C, e hiperalgesia periférica (HOHMANN; HERKENHAM, 1999). Calignano et al., 1998 e Jagger et al., 1998 demonstraram que a anandamida atenua a fase precoce ou tardia, respectivamente, no ensaio de formalina (CALIGNANO; LA RANA; GIUFFRIDA, 1998; JAGGER et al., 1998). Este efeito possivelmente é produzido por interação com receptores CB1 (ou CB1-like), localizados nas terminações periféricas dos neurónios sensoriais envolvidos na transmissão da dor (SANUDO-PENA et al., 1999).

Segundo Clayton et al. (2002) receptores CB2 são encontrados em células do sistema imunitário, tais como células B, células T e macrófagos (GALIEGUE, et al., 1995) e os mastócitos. Sacerdote et al. (2000), observaram que o agonista canabinóide sintético não-seletivos, CP55940, inibiu a quimiotaxia em macrófagos peritoneais de ratos, e este efeito foi

revertido pelo antagonista CB2, mas não pelo antagonista CB1. Assim, atividade anti-inflamatória de um agonista de CB2 *in vivo* pode ser atribuído aos efeitos sobre a função dos macrófagos (SACERDOTE et al., 2000). O efeito analgésico do tetrahydrocannabinol (THC) em um rato *knockout* CB1, está relacionado a um receptor CB2 ou CB2-like (ZIMMER et al., 1999 ). Há também relatos sobre a presença de receptores CB2-like em terminais nervosos periféricos (GRIFFIN et al., 1997; PERTWEE, 1999). Segundo Clayton et. al, (2002) a ativação apenas do receptor CB2 é suficiente para produzir um efeito substancial anti-inflamatório e analgésico no modelo de hipersensibilização induzida por carragenina. Além disso, o antagonista CB2 exacerbou a hipersensibilidade e inflamação induzida por carragenina, sugerindo um tom canabinóide endógeno. Ativação do receptor CB1 é susceptível de produzir efeitos colaterais no SNC uma vez que estes receptores têm uma larga distribuição no cérebro e estão associados com a dependência psicoativa e sedação. Receptores CB2 estão expressos exclusivamente em tecidos periféricos e não estão associados com quaisquer efeitos secundários. Agonistas CB2, por conseguinte, têm o potencial para proporcionar um tratamento seguro e eficaz de doenças inflamatórias crônicas (CLAYTON et al., 2002).

O ensaio de nocicepção induzida por formalina apresenta alta sensibilidade à ação da maioria dos AINEs, como o ácido acetil salicílico, a indometacina e o naproxeno (GONÇALVES et al., 2008). Substâncias analgésicas possuem ações diferentes na primeira e segunda fase do teste da formalina. Os opióides possuem ação central e inibem as duas fases similarmente. Por outro lado, os analgésicos não opióides como a dipirona, um exemplo de derivado pirazólico, possuem ação central e periférica, produzindo efeitos antinociceptivos em ambas as fases, porém, mais caracterizada na segunda, a qual se observa a inibição mediante doses menores quando comparadas à primeira fase (HUNSKAAR;HOLE, 1987; SHIBATA et al., 1989).

Diante disso, é possível sugerir que o efeito dos derivados H<sub>2</sub>LASSBio-1064 e [Zn(LASSBio-466) H<sub>2</sub>O]<sub>2</sub>, LASSBio-1604, LASSBio-1617, LASSBio-1637, LASSBio-1638 e LASSBio-1639 na fase inflamatória do ensaio de nocicepção induzida por formalina pode estar possivelmente relacionada à inibição da biossíntese de prostaglandinas, à semelhança do piroxicam e de AINES de forma geral, ou inibição da produção ou liberação de outros mediadores pró-inflamatórios, como citocinas, serotonina, entre outros mediadores inflamatórios (CHICHORO; LORENZETTI; ZAMPRONIO, 2004).

Enquanto que os derivados H<sub>2</sub>LASSBio-1064, H<sub>2</sub>LASSBio-466 e LASSBio-1617, ao inibirem a primeira fase do ensaio e não serem ativos no ensaio de placa quente, possivelmente podem também estar atuando em receptores canabinoides do tipo CB<sub>2</sub>. Pois compostos que agem nestes receptores podem interferir na modulação da inflamação, sem efeito no sistema nervoso central. Dados estes semelhantes ao descrito por Calignano et. al., (2002), ao avaliarem compostos com ação nos receptores canabinoides, onde observaram que compostos seletivos para receptor CB<sub>2</sub>, foram ativos no ensaio de formalina, mas sem atividade no ensaio de placa quente. Porém é necessário a realização de outros ensaios para confirmação desse possível mecanismo de ação dos compostos LASSBio.

Após os derivados *N*-acilidrazônicos, apresentarem atividade significativa nos modelos de contorção abdominal induzida por ácido acético e na segunda fase (inflamatória) do modelo de nocicepção induzida por formalina, foi investigado também atividade anti-inflamatória utilizando o modelo de peritonite induzida por diferentes agentes pró-inflamatórios, tais como Zymosan A e carragenina, sendo esta apenas realizada com os derivados *N*-acilidrazônicos análogos do piroxicam

Neste ensaio, todos os compostos da serie 1 induziram uma inibição de recrutamento de leucócitos estatisticamente significativa, destacando-se o composto H<sub>2</sub>LASSBio-1064 que inibiu 77,8%. Os compostos H<sub>2</sub>LASSBio-466, [Zn(LASSBio-466)H<sub>2</sub>O]<sub>2</sub>, Zn(LASSBio-1064)Cl<sub>2</sub> e indometacina, inibiram o recrutamento de leucócitos na proporção de 70,0%, 71,8%, 64,7% e 53,4%, respectivamente (**Tabela 8**).

**Tabela 8- Efeito dos H<sub>2</sub>LASSBio-466, H<sub>2</sub>LASSBio-1064, seus complexos de zinco (II) e indometacina (100 µmol/Kg, v.o.) no ensaio de peritonite induzida por Zymosan A. Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição e média ± E.P.M do número de leucócitos totais recrutados em camundongos.**

Composto	Nº de Cels x10 <sup>6</sup> /mL Média ± E.P.M.	% de Inibição
Zymosan A	38,0±1,0	-
Salina	5,0±0,8	-
Indometacina	17,7±1,0**	53,4 %
H <sub>2</sub> LASSBio-466	11,4±1,4**	70,0 %
H <sub>2</sub> LASSBio-1064	8,4±0,9**	77,8%
[Zn(LASSBio-466) H <sub>2</sub> O] <sub>2</sub>	10,7±1,8**	71,8%
Zn(LASSBio-1064)Cl <sub>2</sub>	13,4±1,5**	64,7%

\*\*p < 0,01 (ANOVA One Way seguido Dunnett).

Em relação aos compostos da série 2, todos inibiram significativamente o recrutamento celular, destacando-se os compostos LASSBio-1637, LASSBio-1638 e LASSBio-1639 que apresentaram uma porcentagem de inibição de 78,9%, 81,2% e 82,7%, respectivamente. Os compostos LASSBio-1605, LASSBio-1607 e LASSBio-1617, que apresentam como subunidade imínica heteroaromática os grupos 4-isopropilfenila, 4-*N,N*-dimetilaminofenila e 2-piridinila, também apresentaram atividade similar ou superior a do piroxicam, inibindo, respectivamente, 56,6%, 72,1% e 73,7% do recrutamento celular. O piroxicam apresentou uma porcentagem de inibição de 37,2%. Todos comparados ao grupo controle que recebeu apenas veículo (**Tabela 9**).

**Tabela 9- Efeito dos derivados *N*-acilidrazônicos e piroxicam (100 µmol/Kg, v.o.) no ensaio de peritonite induzida por Zymosan A. Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição e média ± E.P.M do número de leucócitos totais recrutados em camundongos.**

Composto	Nº de Cels x10 <sup>6</sup> /mL	% de Inibição
	Média ± E.P.M.	
Controle	38,0±1,0	-
Piroxicam	16,2±1,1**	57,4%
LASSBio-1604	23,9±1,7**	37,1%
LASSBio-1605	16,5±3,7**	56,6%
LASSBio-1606	21,4±2,4*	43,7%
LASSBio-1607	10,6±0,4**	72,1%
LASSBio-1617	9,9±0,7**	73,9%
LASSBio-1637	8,1±1,8**	78,7%
LASSBio-1638	7,1±0,6**	81,3%
LASSBio-1639	6,6±1,3**	82,6%

\*p < 0,05, \*\*p < 0,01 (ANOVA One Way seguido Dunnett).

A peritonite induzida por Zymosan A é um modelo bem caracterizado e utilizado em ensaios de inflamação (DOHERTY; POUBELLE; BORGEAT, 1985). O Zymosan A é um componente polissacarídeo insolúvel da parede da célula de levedura *Sacharomyces cerevisiae*, sua administração intraperitoneal causa dor e contorções abdominais durante a primeira hora de peritonite (SCISLOWSKA-CZARNECKA et al., 2004). Entre outras ações, zymosan A induz a degranulação de mastócitos e ativa macrófagos. Quando administrado na cavidade peritoneal do rato, zymosan induz um maior extravasamento vascular, um dos sinais primários de inflamação. Este é um passo chave na formação de exsudado inflamatório e é

seguido por um recrutamento dependente do tempo de células migratórias, principalmente neutrófilos (DOHERTY; POUBELLE; BERGEAT, 1985).

Vários mediadores coordenam os eventos iniciais da inflamação aguda, como aminas vasoativas, lipídios derivados eicosanóides, quimiocinas, espécies reativas de oxigênio (ROS), NO e citocinas. O edema é um resultado da extravasão de proteínas plasmática induzida por aminas vasoativas e eicosanóides. A vasodilatação é mediada primariamente pelo NO e prostanoídes vasodilatadores. Citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , ativam as vias de sinalização em células endoteliais, que regulam a expressão de moléculas de adesão para iniciar o recrutamento de leucócitos circulantes e células migratórias parcialmente ativadas (LAWRENCE; WILLOUGHBY; GILROY, 2002; SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004). As células peritoniais residentes, tais como células mesoteliais, linfócitos, mastócitos, macrófagos desempenham um papel promotor na peritonite induzida Zymosan A

Atividade inibitória sobre a migração celular no ensaio de peritonite induzida por zymosan A tem sido relatada para diversos anti-inflamatórios, como glicocorticóides, colchicina (GRIFFITS; WOOD; BLACKHAM, 1991), inibidores de IL-1 $\beta$  (NELSON et al., 2008) e 5-lipooxigenase (5-LOX), indometacina, (RAO et al., 1994), inibidores duais de fosfodiesterase 7A (PDE7A) e fosfodiesterase 4 (PDE4) (YAMAMOTO et al., 2006).

Os resultados obtidos demonstram uma ação anti-inflamatória dos derivados *N*-acilidrazônicos neste modelo. Possivelmente o efeito anti-inflamatório dos compostos, observado no ensaio de peritonite induzida por Zymosan A, seja resultante da inibição da COX, à semelhança dos fármacos-padrão (piroxicam e indometacina). Contudo, a possibilidade da atuação desses compostos em outros alvos, como citocinas e 5-LOX, não deve ser descartada, sobretudo ao comparar o efeito dos derivados neste modelo em relação aos efeitos nos ensaios mencionados anteriormente.

Quando relacionamos os resultados obtidos com os composto da série 1, podemos observar que todos os compostos teste foram ativos no ensaio de peritonite induzida por zymosan A, no ensaio de contorção abdominal induzida por ácido acético, onde a atividade antinociceptiva foi favorecida pela complexação no caso de  $[Zn(LASSBio-466)H_2O]_2$ . Em relação ao ensaio de formalina observamos que o  $H_2LASSBio-466$  inibiu apenas a primeira fase, enquanto que  $[Zn(LASSBio-466)H_2O]_2$ , tal como indometacina, inibiu a segunda fase que indica a sua capacidade para inibir a nocicepção associado a resposta inflamatória. O

H<sub>2</sub>LASSBio-1064 foi capaz de inibir tanto a fase neurogênica quanto a fase inflamatória mostrando-se um perfil o farmacológico diferente. No entanto, este efeito diminui em coordenação de zinco (II) no complexo Zn(LASSBio-1064)Cl<sub>2</sub>. Estes resultados sugerem que a coordenação parece ser uma boa estratégia para melhorar a atividade antinociceptiva do composto H<sub>2</sub>LASSBio-466 associada a dor inflamatória (**Tabela 10**).

**Tabela 10- Efeito antinociceptivo e anti-inflamatório dos H<sub>2</sub>LASSBio-466, H<sub>2</sub>LASSBio-1064, seus complexos de zinco (II) em ensaios de nocicepção induzida por ácido acético, formalina e peritonite aguda induzida por zymosan A. Valores são expressos em porcentagem de inibição da resposta. Os compostos testados foram administrados por via oral na dose de 100 µmol/kg.**

Composto	Nocicepção induzida por ac. acético	Nocicepção induzida por formalina 1 fase	Nocicepção induzida por formalina 2 fase	Peritonite induzida por zymosan A
Dipirona	77,8%	NT	NT	NT
Indometacina	NT	NA	49,1%	53,4 %
H <sub>2</sub> LASSBio-466	60,4 %	46,5%	19,8%	70,8 %
H <sub>2</sub> LASSBio-1064	81,3%	53,1%	48,5%	77,8%
[Zn(LASSBio-466) H <sub>2</sub> O] <sub>2</sub>	82,3%	25,9%	37,3%	71,8%
Zn(LASSBio-1064)Cl <sub>2</sub>	70,9%	27,7%	29,2%	64,7%

NA - não ativo; NT – não testado.

Em relação aos compostos da serie 2, podemos observar que o derivado menos ativo na peritonite induzida por zymosan A foi o LASSBio-1604. No entanto este composto foi o mais ativo no ensaio de contorções abdominais induzidas por ácido acético, e que os derivados LASSBio-1605 e LASSBio-1607, inativos na fase inflamatória do ensaio de nocicepção induzida por formalina, apresentaram atividade similar ou superior à exibida pelo piroxicam no modelo de peritonite aguda induzida por zymosan A (**Tabela 9**) . De acordo com estes resultados podemos sugerir que estes compostos podem ter efeitos em outras vias diferentes da COX, pois embora a atividade das enzimas COX-1 e COX-2 em macrófagos residentes estejam aumentadas durante o desenvolvimento de peritonite (KOLACZKOWSKA et al., 2009), a relevância das prostaglandinas no processo de migração celular parece ser menor se comparada a outros mediadores (BRUNO et al., 2009).

Quando o agente foi a carragenina, todos os derivados da serie 2, apresentaram uma inibição significativa do recrutamento de leucócitos, destacando-se LASSBio-1639 e

LASSBio-1638 que apresentaram porcentagem de inibição de 81,8%, e 77,5%, respectivamente, seguido do LASSBio-1604, LASSBio-1637 e LASSBio-1638 que apresentaram inibição de 74,2%, 73,2% e 77,6%, respectivamente. Já os derivados LASSBio-1605, LASSBio-1606, LASSBio-1607, LASSBio-1617 e o piroxicam apresentaram porcentagem de inibição do recrutamento de leucócitos na proporção de 61,9%, 57,4%, 42,3%, 22,1% e 25,5%, respectivamente (**Tabela 11**).

**Tabela 11- Efeito dos derivados *N*-acilidrazônicos e piroxicam (100 µmol/Kg, v.o.) no ensaio de peritonite induzida por carragenina. Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição e média ± E.P.M do número de leucócitos totais recrutados em camundongos.**

Composto	Nº de Cels x10 <sup>6</sup> /mL Média ± E.P.M.	% de Inibição
Controle	20,9±1,6**	-
Piroxicam	15,5±0,3**	25,8%
LASSBio-1606	8,9±0,5**	57,4%
LASSBio-1617	16,2±0,7**	22,5%
LASSBio-1605	7,9±0,8**	62,2%
LASSBio-1607	12,0±1,5**	42,6%
LASSBio-1604	5,4±0,6**	74,2%
LASSBio-1637	5,6±0,5**	73,2%
LASSBio-1638	4,7±0,7**	77,5%
LASSBio-1639	3,8±0,6**	81,8%

\*\*p < 0,01 (ANOVA One Way seguido Dunnett).

Analisando os resultados dos ensaios de peritonite, podemos observar que os compostos LASSBio-1637, LASSBio-1638 e LASSBio-1639 induziram uma inibição de recrutamento celular semelhantes em ambos os ensaios, além de terem sido também ativos em todos os ensaios realizados, à exceção da placa quente. O composto LASSBio-1617 apresentou um perfil semelhante ao do piroxicam, ambos foram ativos em todos os ensaios cuja resposta envolvia mediadores inflamatórios, porém o LASSBio-1617 foi ativo na primeira fase do ensaio de nocicepção induzida por formalina enquanto o piroxicam não foi ativo, apresentaram menor atividade no ensaio de peritonite induzida por carragenina, em relação à induzida por zymosan A. O inverso foi observado para LASSBio-1604, que foi o composto menos ativo na inflamação induzida por zymosan A e um dos mais ativos quando a carragenina foi utilizada. Vale ressaltar que os compostos LASSBio-1605, LASSBio-1606 e

LASSBio-1607, inativos na segunda fase do ensaio de nocicepção induzida por formalina, apresentaram atividade em ambos os ensaios de peritonite aguda.

A carragenina é uma mistura de polissacarídeos extraída de algas marinhas do gênero *Rhodophyceae* que quando aplicada na cavidade peritoneal induz uma resposta inflamatória caracterizada por intensa exsudação plasmática e migração de células, particularmente de neutrófilos. Essa migração é decorrente da grande estimulação da liberação de mediadores inflamatórios como as prostaglandinas, principalmente, histamina, bradicinina, neuropeptídeos e NO (DI ROSA, 1972). Wallace et al. (1999) demonstraram que a resposta celular inflamatória induzida pela carragenina é mediada principalmente pela COX-1 e COX-2 (WALLACE; CHAPMAN; MCKIGHT, 1999). Outros estudos referem também a participação de citocinas pró-inflamatórias, uma vez que foram detectados altos níveis de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  após a injeção de carragenina (UTSUNOMIYA; NAGAI; OH-ISHI, 1991; CUZZOCREA et al., 1999).

Quando relacionamos os resultados obtidos com a série 2, observamos que os compostos LASSBio-1637, LASSBio-1638 e LASSBio-1639 apresentaram atividade semelhantes nos ensaios de inflamação aguda, também foram ativos em todos os ensaios realizados, à exceção da placa quente e da fase neurogênica do ensaio de formalina. O composto LASSBio-1617 foi ativo em todos os ensaios cuja resposta envolvia mediadores inflamatórios também, foi ativo na 1 fase do ensaio de formalina, mas inativo no ensaio de placa quente, indicando que possivelmente não possui ação central que possui um mecanismo de ação diferenciado em relação aos outros compostos. Os compostos LASSBio-1605, LASSBio-1606 e LASSBio-1607, inativos na fase inflamatória do ensaio de nocicepção induzida por formalina, apresentaram atividade em ambos os ensaios de peritonite aguda (**Tabela 12**).

Esses resultados confirmam as propriedades anti-inflamatórias dos novos derivados *N*-acilidrazônicos derivados do piroxicam em ensaios de nocicepção e inflamação aguda. Também confirmam que esses compostos possuem biodisponibilidade adequada por via oral. Nossos dados sugerem que, na dose de 100  $\mu$ mol/Kg, esses derivados possuem um perfil farmacológico *in vivo* mais amplo que o do piroxicam, e se destacam, sobretudo, por sua atividade inibitória sobre o recrutamento celular em modelos de inflamação aguda.

**Tabela 12-** Efeito antinociceptivo e anti-inflamatório dos derivados *N*-acilidrazônicos em ensaios de nociceção induzida por ácido acético, formalina e peritonite aguda induzida por zymosan A e carragenina. Valores são expressos em porcentagem de inibição da resposta. Os compostos testados foram administrados por via oral na dose de 100 µmol/kg.

Composto	Nociceção induzida por ac. acético	Nociceção induzida por formalina 1 fase	Nociceção induzida por formalina 2 fase	Peritonite induzida por zymosan A	Peritonite induzida por carragenina
Piroxicam	95,4%	NA	53,9%	57.4%	25,8%
LASSBio-1604	90,4%	NA	32,5%	37.1%	57,4%
LASSBio-1605	75,1%	29,1%	9,1%	56.6%	22,5%
LASSBio-1606	76,1%	NA	11,1%	43.7%	62,2%
LASSBio-1607	57,9%	23,8%	16,8%	72.1%	42,6%
LASSBio-1617	58,6%	58,2%	38,4%	73.9%	74,2%
LASSBio-1637	62,7%	NA	60,0%	78.7%	73,2%
LASSBio-1638	84,0%	NA	54,2%	81.3%	77,5%
LASSBio-1639	82,7%	NA	27,5%	82.6%	81,8%

NA - não ativo

#### 4.2 Avaliação Antiinflamatória *in vitro*

A capacidade dos derivados *N*-acilidrazônicos, análogos do piroxicam, modular a atividade das enzimas para inibir COX-1 e COX-2 ovinas foi determinada utilizando um kit imunoenzimático, de acordo com a metodologia descrito por UDDIN e colaboradores (2004), cuja CI<sub>50</sub> pode ser observada na **Tabela 13**.

Como a COX é uma enzima expressa por células envolvidas em processos inflamatórios e foi descrita como sendo a maior responsável pela produção de prostanoídes nos processos inflamatórios e dolorosos, este ensaio *in vitro* de inibição de COX-1/COX-2 vem possibilitar a verificação do mecanismo de ação pelo qual os derivados poderiam estar agindo como um antinociceptivo/antiinflamatório.

**Tabela 13- Concentração inibitória de 50% (CI<sub>50</sub>) das enzimas COX-1/COX-2 ovinas por derivados *N*-acildrazônicos análogos do piroxicam, piroxicam e indometacina (concentrações 0,1 μM, 0,3 μM e 1 μM).**

Composto	COX-1		COX-2	
	Eficácia Máxima (% de inibição)	CI <sub>50</sub> ± E.P.M. (IC 95%)	Eficácia Máxima (% de inibição)	CI <sub>50</sub> ± E.P.M. (IC 95%)
Indometacina	93,0%	0,27 ± 0,01 (0,04 – 0,49)	79,0%	0,79 ± 0,007 (0,70 – 0,89)
Piroxicam	39,6%	NA	71,6%	0,22 ± 0,01 (0,09 – 0,35)
LASSBio-1604	67,7%	0,22 ± 0,005 (0,16 – 1,29)	62,5%	0,24 ± 0,01 (0,11 – 0,37)
LASSBio-1617	79,1%	0,28 ± 0,005 (0,22 – 0,35)	24,4%	0,26 ± 0,01 (0,26 – 0,26)
LASSBio 1637	22,0%	NA	30,2%	NA
LASSBio 1638	45,4%	NA	64,8%	0,81 ± 0,18 (0,00 – 3,17)
LASSBio 1639	0,0%	NA	0,0%	NA

NA: atividade inibitória abaixo de 50% até a concentração de 1 Mm

Para esse ensaio foram selecionados os compostos LASSBio-1617 e LASSBio-1637, devido à semelhança estrutural com o piroxicam e seu bioisómero sudoxicam, e os compostos LASSBio-1604, LASSBio-1638 e LASSBio-1639, em virtude de terem apresentado maior atividade nos ensaios *in vivo*. Verifica-se que LASSBio-1604 (CI<sub>50</sub>COX-1 de 0,22 μM e CI<sub>50</sub>COX-2 de 0,24 μM) e LASSBio-1617 (CI<sub>50</sub>COX-1 de 0,28 μM e CI<sub>50</sub>COX-2 de 0,26 μM) foram capazes de inibir, significativamente, tanto COX-1 como COX-2. Observou-se também que o análogo LASSBio-1638 apresentou CI<sub>50</sub> de 0,81 μM para COX-2, mostrando-se seletivo idade para esta isoforma da COX. Com relação aos fármacos de referência, a indometacina, como esperado, apresentou maior inibição para COX-1; enquanto o piroxicam apresentou maior eficácia e potência para COX-2.

Está bem estabelecido que Prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) é um importante mediador da inflamação em inflamação aguda e crônica e a redução da sua produção pela inibição de COX está associada com a diminuição de edema e dor inflamatória. Existem duas isoformas de cicloxigenase, COX-1 e COX-2. A isoforma COX-1 está presente no trato gastrointestinal, sistema renal, além de ser importante para o processo de coagulação sanguínea (VANE; BOTTING; BAKHELE, 1998). Já a isoforma COX-2 é induzida durante o processo inflamatório (VANE; BOTTING, 1996).

No SNC, além dos estímulos inflamatórios, a COX-2 também pode ser induzida por glutamato em células gliais e neurônios (SALZBERG-BRENHOUSE et al., 2003). Embora seja normalmente induzido por estímulos pró-inflamatórios, tem sido reportada a expressão de COX-2 constitutiva em alguns tecidos, incluindo cérebro, rins, pulmão, endotélio vascular e órgão do sistema reprodutor (RAJAKARIAR; YAQOOB; GILROY, 2006). O aumento resultante na atividade da COX-2 pode contribuir para a neurodegeneração ou para o estresse oxidativo, ou para as ações neurotóxicas de PGs. A expressão aumentada de COX-2 está associada com uma série de doenças neurodegenerativas agudas e crônicas, incluindo convulsões, doença de Alzheimer e doença de Parkinson (SALZBERG-BRENHOUSE et al., 2003).

Sabe-se que, embora a indução da COX-2 por estímulos inflamatórios seja o principal responsável pelos altos níveis prostanoídeos no sítio inflamatório, o papel da COX-1 em modular a resposta inflamatória não deve ser menosprezada (BURIAN; GEISSLINGER, 2005). Atualmente, o clichê de que a expressão constitutiva da isoforma COX-1 está envolvido apenas em funções fisiológicas normais, como a agregação plaquetária, proteção da mucosa gástrica e homeostase eletrolítica renal vêm sendo quebrada. Através do uso baixas doses de aspirina, que assim se comporta como um inibidor preferencial da COX-1 plaquetária, esclareceu-se o papel exercido por esta isoenzima em muitos tipos de células de mamíferos. Achados mais recentes sobre a inibição seletiva da COX-1 demonstram sua relevância para várias condições patológicas humana, como câncer, inflamação, febre e dor, além da neuro-proteção e cardio-proteção.

Os análogos do piroxicam LASSBio-1604 e LASSBio-1617 se mostraram efetivos em inibir de forma não-seletiva tanto COX-1 como COX-2. Gierse et al. (1999) cita que alguns AINEs assim como o naproxeno e alguns oxicams também exibem uma não-seletividade na inibição das isoformas de COX (GIERSE et al., 1999). O análogo LASSBio-1638 exibe possível seletividade para COX-2, de forma similar ao meloxicam. Tem sido postulado que AINEs seletivos para COX-2 apresentam melhores atividade anti-inflamatória, como menor efeito gastrointestinal (LIPSCOMB et al., 1998). LASSBio 1639 não apresentou inibição para COX-1 ou COX-2 em nenhuma das concentrações utilizadas, mostrando que este análogo apresenta mecanismo de ação diferente dos outros análogos.

Ao correlacionar os dados obtidos nos experimentos anteriormente mencionados, podemos observar que o composto LASSBio-1617, aza-vinílogo do piroxicam, apresentou

atividade nos ensaios *in vivo* similar ou inferior ao piroxicam, no entanto no ensaio de peritonite induzida por zymosan A, este foi mais ativo. Este composto inibiu de ambas as isoformas da COX, sendo mais seletivo a COX-1. Todavia, existe a possibilidade de que o efeito antinociceptivo e anti-inflamatório deste composto possa envolver outro alvo, sobretudo considerando-se sua atividade no modelo de peritonite induzida por zymosan A e na primeira fase do ensaio de formalina.

O composto LASSBio-1604 apresentou atividade inibitória sobre ambas as isoformas da COX com potência similar à de LASSBio-1617, revelando-se um bioisómero deste. Porém, o LASSBio-1604 apresentou um perfil inverso ao LASSBio-1617 nos ensaios de inflamação aguda, sendo o LASSBio-1604 mais ativo no modelo de peritonite induzida por carragenina. Com isso podemos sugerir que os compostos podem agir por uma via diferentes da ciclooxigenases, que a inibição das isoformas das COXs pelos compostos LASSBio-1604 e LASSBio-1617 seja concentração dependente. O composto LASSBio-1637, um análogo *N*-heterocíclico de LASSBio-1604, apresentou atividade inibitória sobre a enzima COX inferior a 50% nas concentrações empregadas no ensaio (0,1  $\mu$ M, 0,3  $\mu$ M e 3  $\mu$ M). Porém este derivado nos ensaios *in vivo* foi o mais ativo no ensaio de nocicepção induzida por formalina (2° fase), além de ter sido também um dos mais ativos em ambos os modelos de inflamação aguda. Com isso, podemos sugerir que possivelmente a ação anti-inflamatória do LASSBio-1637, seja independente da vias das ciclooxigenases ou que a inibição das isoformas da COX pelo LASSBio-1637 seja concentração dependente.

O composto LASSBio-1638 inibiu seletivamente a enzima COX-2 *in vitro*, apresentando valor de IC<sub>50</sub> de 0,81 M. Esse composto apresentou atividade semelhante ou superior à do piroxicam em todos os ensaios *in vivo* e foi um dos derivados mais ativos nos modelos de peritonite aguda. O efeito anti-inflamatório e antinociceptivo exibido por LASSBio-1638 provavelmente envolve inibição da enzima COX-2, porém, o pronunciado efeito inibitório desse derivado sobre o recrutamento celular em modelos de inflamação aguda, na dose testada (100 mol/Kg), sugere a possibilidade de atividade em outros alvos.

O composto LASSBio-1639, nas concentrações testadas, não inibiu nenhuma isoforma da COX, porém apresentou uma acentuada atividade nos ensaios de nocicepção e inflamação aguda, o que é um indicio que seu efeito anti-inflamatório envolve modulação de outros alvos, como a via da lipoxigenase, citocinas, como IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$ , entre outros.

## 5 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho permitem concluir que os compostos das duas séries de derivados *N*-acilidrazônicos, administrados na dose de 100 µmol/kg por via oral, apresentaram atividade antinociceptiva periférica observado no modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético sem efeito central, observado no teste de placa quente.

Os compostos da série 1 induziram uma inibição das contorções abdominais semelhante ao da dipirona, sendo esta atividade favorecida com a coordenação com zinco (II) no H<sub>2</sub>LASSBio-466. Observamos também que esses compostos apresentaram um perfil antinociceptivo associado à resposta inflamatória, pois não foram ativos em ensaio de nocicepção central. No modelo de nocicepção induzida por formalina o H<sub>2</sub>LASSBio-466 foi capaz de inibir apenas a primeira fase, enquanto seu complexo [Zn(LASSBio-466) H<sub>2</sub>O]<sub>2</sub>, semelhante a indometacina, foi ativo na segunda fase deste ensaio. Estes resultados sugerem que a coordenação do zinco (II) parece ser uma boa estratégia para melhorar a atividade antinociceptiva do composto H<sub>2</sub>LASSBio-466 associada a dor inflamatória. Além disso, os compostos da série 1 induziram uma inibição de recrutamento celular semelhante ou superior da indometacina, o que indica um perfil anti-inflamatório expressivo.

Os compostos da série 2 apresentaram um perfil farmacológico mais amplo que a do piroxicam (fármaco padrão), apresentando pronunciado efeito inibitório sobre o recrutamento celular em modelos de inflamação aguda. A partir dos dados obtidos neste trabalho, foram identificados os compostos LASSBio-1637 e LASSBio-1639 como novos protótipos com ação antinociceptiva e anti-inflamatória. Esses inibiram o recrutamento celular nos ensaios de peritonites induzidas por carragenina e zymosan A em mais de 70% e 80%, respectivamente. A atividade desses compostos parece ser independente da inibição de COX e a determinação de suas atividades em outros alvos relacionados à inflamação deve ser realizada.

## REFERÊNCIAS

AKCAY, A.; NGUEYEN, Q.; EDELSTEIN, C. L. Mediators of inflammation in acute kidney injury. **Mediators of inflammation**, v. 2009, p. 137072-137084, 2009.

AL-GHANDI, M. S. The anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activity of *Nigella sativa*. **Journal Ethnopharmacology**, v. 76, p. 45-48, 2001.

BALLOU, L. R. et al. Nociception in cyclooxygenase isozyme-deficient mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 18, p. 10272-10276, 2000.

BARON, A. et al. Protein Kinase C stimulates the acid-sensing ion channel ASIC2a via the PDZ domain-containing protein PICK1. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 18, p. 50463-50468.

BARREIRO, E. J.; SILVA, J. M. F.; FRAGA, C. A. M. Noções básicas do metabolismo de fármacos. **Química Nova**, v. 19, n. 6, p. 641-650, 1996.

BARRETO, R. L.; CORREIA, C. R. D.; MUSCARÁ, M. N. Óxido nítrico: propriedades e potenciais usos terapêuticos. **Química Nova**, v. 28, n. 6, p. 1046-1054, 2005.

BARRINGTON, R. et al. The role of complement in inflammation and adaptive immunity. **Immunological Reviews**, v. 180, n. 1, p. 5-15, 2001.

BARROS, I. M. C. et al. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Pluchea quitoc* (DC.) ethanolic extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 106, n. 3, p. 317-320, 2006.

BASBAUM, A. I. et al. Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell**, v. 139, n. 2, p. 267-284, 2009.

BATLOUNI, M. Anti-inflamatórios não-esteroides: Efeitos cardiovasculares, cérebro-vasculares e renais. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 94, n. 4, p. 556-563, 2010.

BAZAN, N. G.; FLOWER, R. J. Medicine: Lipid signals in pain control. **Nature**, v. 420, p. 135-138, 2002.

BEAR, M. F. C., B.W.; PARADISO, M.A. **Neurociências: Desvendando o sistema nervoso**. n.2, p.422. 2006.

BESSON, J. M. The reurobiology of pain. **Lancet**, v. 353, p.1610-1615, 1999.

BEZERRA-NETO, H. J. et al. Design and synthesis of 3,4-methylenedioxy-6-nitrophenoxycetylhydrazone derivatives obtained from natural safrole: New lead-agents with analgesic and antipyretic properties. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 23, p. 7924-7935, 2006.

BISSON, M. P. **Estudo dos efeitos analgésicos do paracetamol em diferentes modelos experimentais**. 1991. Dissertação (Mestrado em Ciências – Farmacologia). Programa de Pós-graduação em Ciências, Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba, SP, 1991.

**BORKOW, G. et al. Inhibition of the ribonuclease H and DNA polymerase activities of HIV-1 reverse transcriptase by N-(4-tert-butylbenzoyl)-2-hydroxy-1-naphthaldehyde hydrazone**. *Biochemistry*, v. 36, n. 11, p. 3179-3185, 1997.

BOTTING, R.; AYOUB, S. S. COX-3 and the mechanism of action of paracetamol/acetaminophen. **Prostaglandin, Leukotriene and Essential Fatty Acids**, v. 72, p. 85-87, 2005.

**BREIVIK, H. Pain management**. *Bailliere's Clinical Anaesthesiology*, v. 8, p. 775-795, 1994.

BRICKS, L. F.; SILVA, C. A. Toxicidade dos anti-inflamatorios não hormonais. **Pediatrics**, v. 27, n. 3, p. 181-193, 2005.

BRUM-JUNIOR, L. **Desenvolvimento e Validação de Metodologias para avaliação de etoricoxibe por cromatografia líquida e espectrometria de massas**. 2006. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2006.

BRUNO, et al. 1-Methyl and 1-(2-hydroxyalkyl)-5-(3-alkyl/cycloalkyl/phenyl/naphthylureido)-1h-pyrazole-4-carboxylic acid ethyl esters as potent human neutrophil chemotaxis inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 17, p. 3379-3387, 2009.

BRUNTON, L. et al. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman**. 12 ed. Porto Alegre, Artmed, 2012.

BURIAN, M.; GEISLINGER, G. Cox-dependent mechanisms involved in the antinociceptive action of NSAIDS at central and peripheral sites. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 107, n. 2, p. 139-154, 2005.

CAFFREY, D. R.; FITZGERALD, K. A. Select Inflammasome Assembly. **Science**, v. 336, n. 6080, p. 420-421, 2012.

CALIGNANO, A.; LA RANA, G.; GIUFFRIDA, A. Control of pain initiation by endogenous cannabinoids. **Nature**, v. 394, n. 6690, p. 277-281, 1998.

CARR, D. B.; GOUDAS, L. C. Acute pain. **Lancet**, v. 353, p. 2051-2058, 1999.

CARVALHO, A. M. **Estudo da atividade antinociceptiva e antiinflamatória da riparina II (O-metil-N-2-hidroxi-benzoil tiramina) em modelos experimentais**. 2011. Dissertação (Mestrado em Farmacologia). Programa de Pós-graduação em Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, CE. 2011.

CARVALHO, W. A.; LEMÔNICA, L. Mecanismos centrais de transmissão e modulação da dor: atualização terapêutica. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 48, p. 221-241, 1998.

CATERINE, M. J. et al. The capsaicin receptor a heat-activated ion channel in pain pathway. **Nature**, v. 389, n. 6653, p. 816-824, 1997.

CERQUEIRA, N. F.; YOSHIDA, W. B. Óxido nítrico: Revisão. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 17, n. 6, p. 417-423, 2002.

CHENG, J. K.; JI, R. R. Intracellular signaling in primary sensory neurons and persistent pain. **Neurochemical Research**, v. 33, n. 10, p.1970-1978, 2008.

CHICHIORO, J. G.; LORENZETTI, B. B.; ZAMPRONIO, A. R. Involvement of bradykinin, cytokines, sympathetic amines and prostaglandins in formalin-induced orofacial nociception in rats. **British Journal of Pharmacology**, v. 141, n. 7, p. 1175-1184, 2004.

CLAYTON, N. et al. CB1 and CB2 cannabinoid receptors are implicated in inflammatory pain. **Pain**, v. 96, n. 3, p. 253-260, 2002.

CLIMENI, B. S. et al. Sistema Complemento – Revisão de Literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, n.12. Disponível em:  
<http://www.revista.inf.br/veterinaria12/revisao/pdf/AnoVII-Edic12-Rev139.pdf>. Acesso em 15/02/2013.

COOLIER, H. O. et al. Abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. **British Journal Pharmacology**, v. 32, n. 2, p. 295-310, 1968.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLINS, T. **Patologia Estrutural e Funcional**. 7 ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, p. 50-88, 2006.

COUFRAX, A. et al. Hyperalgesia and allodynia: peripheral mechanisms. **Joint Bone Spine**, v. 72, n. 5, p. 359-371, 2005.

CUZZOCREA, S. et al. Role of IL-6 in the pleurisy in the pleurisy and lung injury caused by carrageenan. **Journal Immunology**, v. 163, n. 9, p. 5094-5104, 1999.

DA SILVA, Y. K. et al. Synthesis and pharmacological evaluation of pyrazine N-acylhydrazone derivatives designed as novel analgesic and anti-inflammatory drug candidates. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 14, p. 5007-5015, 2010.

DAMERON, B. Biological activities of complement-derived peptides. **Reviews of Physiology, Biochemistry & Pharmacology**, v. 108, p. 151-206, 1987.

DEQUEKER, J. et al. Improvement in gastrointestinal tolerability of the selective cyclooxygenase (COX-2) inhibitor, meloxicam, compared with piroxicam: Results of the safety and efficacy large-scale evaluation of COX-inhibiting therapies (SELECT) trial in osteoarthritis. **British Journal of Rheumatology**, v. 37, n. 9, p. 946-951, 1998.

DERART, R. et al. Release of prostaglandins E and F in an algogenic reaction and its inhibition. **European Journal Pharmacology**, v. 61, n.1, p. 17-24, 1980.

DI ROSA, M. Review. Biological properties of carragenan. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 24, n. 2, p. 89-102, 1972.

DIAZ, P. et al. 6-methoxy-VV-akyl isatin acylhydrazone derivatives as a novel series of potent selective receptor 2 inverse agonist: Design, synthesis and binding mode prediction. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 52, p. 433-444, 2009.

DILLON, C. T. et al. Gastrointestinal toxicity, anti-inflammatory activity, and superoxide dismutase activity of copper and zinc complexes of the anti-inflammatory drug indomethacin. **Chemical Research in Toxicology**, v. 16, p. 28-37, 2003.

DOHERTY, N. S.; POUBELLE, P.; BORGEAT, P. Intraperitoneal injection of zymosan in mice induces pain, inflammation and the synthesis of peptidoleukotrienes and prostaglandin E2. **Prostaglandins**, v. 30, n. 5, p. 769-789, 1985.

DRAY, A. Kinins and their receptors in hyperalgesia. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 75, p. 704-712, 1997.

DU, J. et al. Ligustilide attenuates pain behavior induced by acetic acid or formalin. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 112, p. 211-214, 2007.

DUARTE, C. D.; BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. Privileged Structures: A useful concept for the rational design of new lead drug candidates. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 7, p. 1108-1119, 2007.

DUARTE, I. D.; NAKAMURA, M.; FERREIRA, S. H. Participation of the sympathetic system in acetic acid-induced writhing in mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 21, p. 341-343, 1988.

ELISABETSKY, E. et al. Analgesic activity of *Psychotria colorata* (Wild ex R. & S.) Muell Arg Alkaloides. **Journal Ethnopharmacology**, v. 48, n. 2, p. 77-83, 1995.

ESCRIBANO, E. et al. Assessment of diclofenaco permeation with different formulation: anti-inflammatory study of a selected formula. **European Journal of Pharmaceutical Science**, v. 19, p. 203-210, 2003.

FERNANDES, C. M. **Estudos da inflamação e da dor articulares em ratos e dos mecanismos de produção de TNF $\alpha$  por macrófagos isolados, induzidos pela BaP1, uma metaloproteinase isolada do veneno de serpente *Bothrops asper***. 2008. Tese (Doutorado em Farmacologia). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, SP, 2008.

FERRÁNDIZ, M. L.; ALCARAZ, M. J. Anti-inflammatory activity and inhibition of arachidonic acid metabolism by flavonoids. **Agents and Actions**, v. 32, n. 3-4, p. 283-255, 1991.

FISCHER, L. G. et al. Further antinociceptive properties of extracts and phenolic compounds from *Plinia glomerata* (Myrtaceae) leaves. **Biological & Pharmaceutical**, v. 32, p. 235-239, 2008.

FRAGA, C. A.; BARREIRO, E. J. Medicinal chemistry of N-acylhydrazones: New lead-compounds of analgesic, antiinflammatory and antithrombotic drugs. **Current Medicinal Chemistry**, v. 13, p.167-198, 2006.

GALIEGUES, S. et al. Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations. **European Journal of Biochemistry**, v. 232, p. 54-61, 1995.

CHAPMAN, C. R.; GAVRIN, J. Suffering: the contributions of persistent pain. **Lancet**, v. 353, n. 9171, p.2233-7. 1999.

GIERSE, J. K. et al. Kinect basis for selective inhibition of cyclooxygenases. **Biochemical Journal**, v. 339, p. 607-614, 1999.

GONÇALVES, J. C. et al. Antinociceptive activity of (-) Carvone: Evidence of association decrease peripheral nerve excitability. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 31, p. 1017-1020, 2008.

GONZÁLEZ, E. L. et al. Variabilty among nonsteroidal antiinflammatory drugs in risk of upper gastrointestinal bleeding. **Arthritis and Rheumatism**, v. 62 p. 1592-1601, 2010.

GRIFFIN, G. et al. Evidence for the presence of CB2-like cannabinoids receptors on peripheral nerve terminal. **European Journal of Pharmacology**, v. 339, p. 53-61.

GRIFFITS, R. J.; LI, S. W.; WOOD, B. E.; BLACKHAM, A. A comparison of the anti-inflammatory activity of selective 5-lipoxygenase inhibitors with dexamethasone and colchine in model of zymosan induced inflammation in the rat knee joint and peritoneal cavity. **Agents and Actions**, v. 32, p. 312-320, 1991.

GRIS, P. et al. A novel alternatively spliced isoform of the mu-opioid receptor: functional antagonism. **Molecular Pain**, v. 6, p.33, 2010.

GROSSER, T.; FRIES, S.; FITZGERALD, G. A. Biological basis for the cardiovascular consequences of COX-2 inhibition: therapeutic challenges and opportunities. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 116, p. 4-15, 2006.

GUGINSKI, G. Dor: o que sabemos sobre ela? **Perspectiva Online**, v.2, p.113-121, 2008.

HIRUMA-LIMA, C. A. et al. The juice of fresh leaves of *Boerhaavia diffusa* L. (Nycataginaceae) markedly reduces pain in mice. **Journal Ethnopharmacology**, v. 71, p. 267-274, 2000.

HOHMANN, A. G.; HERKENHAM, M. Cannabinoid receptors undergo axonal flow in sensory nerves. **Neuroscience**, v. 92, p. 1171-1175, 1999.

HUA, S.; CABOT, P. J. Mechanisms of peripheral immunecell-mediated analgesia in inflammation: clinical and therapeutic implications. **Cell**, v. 31, p. 427-433, 2010.

HUERRE, M. R.; GOUNON, P. Inflammation: patterns and new concepts. **Research Immunology**, v. 147, p. 417-434, 1996.

HUNSKAAR, S.; HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain**, v. 30, p. 103-114, 1987.

HUNSKAAR, S.; FASMER, O. B.; HOLE, K. Formalin test in mice a useful technique for evaluating mild analgesia. **Journal Neuroscience Methods**, v. 14, p. 69-76, 1985.

HUNT, S. P.; MANTYH, P. W. The molecular dynamics of pain control. **Neuroscience**, n. 2, p. 83-91, 2001.

IFA, D. et al. A possible molecular mechanism for the inhibition of cysteine proteases by salicylaldehyde N-acylhydrazones and related compounds. **Journal of Molecular Structure: THEOCHEM**, v. 505, p. 11-17, 200.

IKEDA, Y.; UENO, A.; NARABA, H.; OH-ISHI, S. Involvement of vanilloid receptor VR1 and prostanoid in the acid-induced writhing responses of mice. **Life Sciences**, v. 69, p. 2911-2919, 2001.

JAGGER, S. I. et al. The anti-hyperalgesic actions of the cannabinoid anandamide and the putative CB2 receptor agonist palmitoylethanolamide in visceral and somatic inflammatory pain. **Pain**, v. 76, p. 189-199, 1998.

JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v. 423, p. 203-210, 2001.

KANAZAWA, N. Rare hereditary autoinflammatory disorders: Towards an understanding of critical in vivo inflammatory pathways. **Journal of Dermatological Science**, v. 66, p. 183-189, 2012.

KIDD, L.; URBAN, L. A. Mechanisms of inflammatory pain. **British Journal of Anesthesia**, v. 7, p. 20, 2010.

KOLACZKOWSKA, E. et al. Neutrophil elastase activity compensates for a genetic lack of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in leukocyte infiltration in a model of experimental peritonitis. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 85, p. 374-81, 2009.

KRAYCHETE, D. C.; CALASANS, M. T. A.; VALENTE, C. M. L. Citocinas pró-inflamatórias e dor. *Revista Brasileira de Reumatologia*, v. 46, p. 199-206, 2006.

KRISHTAL, O. A.; PIDOPLICHKO, V. I. A receptor for protons in the nerve cell membrane. **Neuroscience**, v. 5, p. 2325-2358, 1980.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. **Robbins & Cotran: Patologia: bases patológicas da doença**. 7 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

KUMMER, C. L.; COELHO, T. C. R. B. Anti-inflamatórios não esteróides inibidores da ciclooxigenase II (COX-2): aspectos atuais. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 5, p. 498 – 512, 2002.

**KURAISHI, Y. et al. Separate involvement of the spinal noradrenergic and serotonergic systems in morphine analgesia: The differences in mechanical and thermal analgesic tests. Brain Research**, v. 273, n. 2, p. 245-252, 1983.

LAFLAMME, N.; LACROIX, S.; RIVEST, S. An essential role of interleukin-1 beta mediating NF-kappaB activity and COX-2 transcription in cells of the blood-brain barrier in response to a systemic and localized inflammation but not during endotoxemia. **The Journal of Neuroscience**, v. 19, p. 10923-10930, 1999.

LANDI-LIBRANDI, I. A. P.; ASSIS-PANDOCHI, A. I. O envolvimento do sistema complemento nos processos de aterogênese. **Revista da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto**, v. 41, p. 312-326, 2008.

LAPA, A. J.; LONGHINI, R. B. M. L.; MELLO, J. C. P. Métodos de avaliação da atividade farmacológica de plantas medicinais. **Sociedade Brasileira de Plantas Mediciniais**, p. 99-17, 2003.

LAWRENCE, T.; WILLOUGHBY, D. A.; GILROY, D. W. Anti-inflammatory lipid mediators and insights in to the resolution of inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, p. 787-795, 2002.

LE BARS, D. M.; GOZARIU, M.; CADDEN, S. W. Animal Models of Nociception. **Pharmacological Reviews**, v. 53, p. 597, 2001.

LEE, H. K. et al. Double-blind evaluation of the safety and efficacy of tenoxicam (Tilcotil®) compared with piroxicam in patients with degenerative arthritis. **Drug Investigation**, v. 2, p. 50-51, 1990.

LEITE, D. F. P. et al. ABCC transporter inhibition reduces zymosan-induced peritonitis. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 82, n. 3, p. 630-637, 2007.

LEVINE, J. D.; ALESSANDRI-HABER, N. TRP channels: targets for the relief of pain. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1772, p. 989-1003, 2007.

LIGHTFOOT, R. Comparison of the efficacy and safety of etodolac and piroxicam in patients with rheumatoid arthritis. **Journal of Rheumatology**, v. 24, p. 10-16, 1997

LIMA, L. M.; BARREIRO, E. J. A useful strategy for molecular modification and drug design. **Current Medical Chemistry**, v. 12, p. 23-49, 2005.

LIMA, L. M. et al., 2007. s.l. Patent No. INPI, PI070551-8.

LIPSCOMB, G. R. et al. Gastrointestinal tolerability of meloxicam and piroxicam. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 46, p. 133-137, 1998.

LOESER, J. D.; MELZACK, R. Pain: an overview. **Lancet**, v. 353, p. 1607-1609, 1999.

LOMBARDINO, J. G.; WISEMAN, E. H. Sudoxicam and Related N-Heterocyclic Carboxamides of 4-Hydroxy-2H-1,2-benzothiazine 1,1-Dioxide. Potent Nonsteroidal Antiinflammatory Agents. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 8, p. 848-849, 1972.

MACHADO, A. B. M., **Neuroanatomia Funcional**. Rio de Janeiro: Atheneu, 1988.

MAMET, J. et al. Proinflammatory mediators, stimulators of sensory neuron excitability via the expression of acid sensing ion channels. **Journal of Neuroscience**, v. 22, p. 10662-10670, 2002.

MARCON, R. **Avaliação do efeito antinociceptivo e antiinflamatório dos triterpenos semi-sintéticos: octanoato de alfa e beta-amirina**. 2009. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Programa de pós-graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 2009.

MARNETT, L. J. Cyclooxygenase inhibition. **Prostaglandins & Other Lipid Mediators**, v. 68-69, p. 153-164, 2002.

MCNAMARA, C. R. et al. TRPA1 mediates formalin-induced pain. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, p. 13525-13530, 2007.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, p. 428-435, 2008.

MILANO, J. et al. Antinociceptive effect of novel trihalomethyl-substituted pyrazoline methylesters in formalin and hot-plate tests in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 581, p. 86-96, 2008.

MILLAN, M. J. The induction of pain: an integrative review. **Progress in Neurobiology**, v. 57, p. 164, 1999.

MIRANDA, H. F. et al. Isobolographic analysis of multimodal analgesia in an animal model of visceral acute pain. **Pharmacology Biochemistry & Behavior**, v. 88, p. 481-486, 2008.

MOREAU, M. E. et al. The kallikrein-kinin system: Current and Future Pharmacological Targets. **Journal of Pharmacological Science**, v. 99, p. 6-38, 2005.

MURMO, G. Pharmacological assessment of the rat formalin test utilizing the clinically used analgesic drugs gabapentin, lamotrigine, morphine, duloxetine, tramadol and ibuprofen: influence of low and high formalin concentrations. **European Journal of Pharmacology**, v. 605, p. 95-102, 2009.

NELSON, D. W. et al. Structure-activity relationship studies on N-aryl carbonylhydrazide P2X7 antagonists. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 51, p. 3030-3034, 2008.

NOGUEIRA, A. A. R. **Estudo dos efeitos da bradicinina sobre a função renal de ratos**. 2011. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Ciências Fisiológicas) Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE, 2011.

OLIVEIRA, C. M. B. et al. Citocinas e Dor. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 61, p. 255-265, 2011.

OMETE, K.; KAWAMATA, T.; NAMIKI, A. Formalin-induced release of excitatory amino acids in the skin of the rat hindpaw. **Brain Research**, v. 787, p. 161- 164, 1998.

ONG, C. K. S.; LIRK, P.; TAN, C. H. An evidence-based update on nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **Clinical Medicine & Research**, v. 5, p. 19-34, 2007.

PARADA, S. A. et al. Activation of presynaptic NMDA receptors coupled to NaV1.8-resistant sodium channel C-fiber causes retrograde mechanical nociceptor sensitization. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, p. 2923-2928, 2003.

PATAPOUTIAN, A.; TATE, S.; WOOLF, C. J. Transient receptor potential channels: targeting pain at the source. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 8, p. 55-68, 2009.

PERAZA, G. G. et al. Uso de modelos animais para avaliar o potencial antinociceptivo dos produtos de origem natural. **VITTALLE**, v. 9, p. 35-44, 2007.

PEREIRA, F. E. L. Inflamações. In: Brasileiro-Filho, G. **Bogliolo Patologia**, 8 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011, p. 183 – 217a.

PEREIRA, L. P. **Atividade anti-inflamatória de polissacarídeos isolados de plantas *Caesalpinia ferrea* e *Azadirachta indica***. 2011. Dissertação (Mestrado Acadêmico de Ciências Fisiológicas). Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE, 2011b.

PERTWEE, R. G. Pharmacology of cannabinoid receptor ligands. **Current Medicinal Chemistry**, v. 6, p. 635 – 664, 1999.

PETROFF, E. Y. et al. Acid-sensing ion channels interact with and inhibit BK K<sup>+</sup> channels. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, p. 3140 - 31404, 2008.

PORTO, C. C. **Exame Clínico: bases para prática médica**. 6<sup>o</sup> ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

RAJAKARIAR, R.; YAQOUB, M. M.; GILROY, D. W. Cox-2 in inflammation and resolution. **Molecular Interventions**, v. 6, p. 199 - 207, 2006.

RAMADABRAN, K.; BANSINATH, M. A critical analyses of the experimental evaluation of nociceptive reactions in animals. **Pharmacological Research**, v. 3, p. 263-269, 1996.

RANG, H. P. et al. **Rang & Dale: Farmacologia**. 7 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.

RAO, T. S. et al. In vivo characterization of zymosan-induced mouse peritoneal inflammation. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 269, p. 917- 925, 1994.

RIBEIRO, R. A. et al. Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 387, p. 111-118, 2000.

RIBEIRO, S.; SCHMIDT, A. P.; SCHMIDT, S. R. G. O uso de opioides no tratamento da dor crônica não oncológica: O papel da metadona. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 52, p-644-651, 2002.

RIBEIRO, S.; SCHMIDT, S. R. G. Uso de opióides no tratamento da dor crônica não oncológica. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 2, p. 644-651, 2002.

RICHY, F. et al. Efficacy and safety of piroxicam revisited. A global meta-analysis of randomized clinical trials. **Pharmacological Research**, v. 60, p. 254 - 263, 2009.

ROCHA, A. P. C. et al. Dor: aspectos atuais da sensibilização periférica e central. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 57, p. 94-105, 2007.

SACERDOTE, P. et al. In vivo and in vitro treatment with the synthetic cannabinoid CP55,940 decreases the in vitro migration of macrophages in the rat: involvement of both CB1 and CB2 receptors. **Journal of Neuroimmunology**, v. 109, p. 155–163, 2000.

SALZBERG-BRENHOUSE, H. C. et al. Inhibitors of Cyclooxygenase-2, but not Cyclooxygenase-1 provide structural and functional protection against quinolinic acid-induced neurodegeneration. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 306, p. 218-228, 2003.

SANTOS, A. R. S.; CALIXTO, J. B. Further evidence for the involvement of tachykinin receptor subtypes in formalin and capsaicin models of pain in mice. **Neuropeptides**, v. 31, p. 381-389, 1997.

SANTOS, J. L. et al. Síntese e modelagem molecular do novo derivado indolinômico como candidato a anti-inflamatório COX-2 seletivo. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, p. 235-240, 2007.

SANUDO-PENA, M. C. et al. CB1 receptor localisation in rat spinal cord and roots, dorsal root ganglion and peripheral nerve. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 20, p. p. 1115 – 1120, 1999.

SCARPIGNATO, C.; HUNT, R. H. Nonsteroidal Antiinflammatory Drug-Related Injury to the Gastrointestinal Tract: Clinical Picture, Pathogenesis, and Prevention. **Gastroenterology Clinics of North America**, v. 39, p. 433-464, 2010.

SCISLOWSKA-CZARNECKA, A. et al. Long-lasting effects of social stress on peritoneal inflammation in some strains of mice. **Folia Biol-Krakow**, v. 52, p. 97-104, 2004.

SCWAB, J. M. et al.. COX-3 the enzyme and teh concept: steps towards highhy specialized pathways and precision therapeutic ?. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids** , v. 69, p. 339-343, 2003.

SHERWOOD, E. R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology**, v. 18, p. 385 - 405, 2004.

SHIBATA, M. et al. Modified formalin test: characteristic biphasic pain response. **Pain**, v. 38, p. 347-352, 1989.

SILVA, G. A. et al. New class of potent antinociceptive and antiplatelet 10H-phenothiazine-1-acylhydrazone derivates. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 12, p. 3149-3158, 2004.

SILVA, P. **Farmacologia**. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

SINCHOLLE, D.; BERTEZ, C.; LEGRAND, A. Anti-inflammatory activity of a dual inhibitor of cyclooxygenase and lipoxygenase pathways, CBS-1108 (2-acetylthiophen-2-thiazolyhydrazone). **Arzneimittel-Forschung/Drug Research**, v. 35, p. 1260-1263, 1985.

SINGLA, A. K.; WADHWA, H. Zinc-indomethacin complex: synthesis, physicochemical and biological evaluation in the rat. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 120, p. 145-155, 1995.

SLUIS-CREMER, N.; ARION, D.; PARNIAK, M. A. 6-Methoxy-N-alkyl Destabilization of the HIV-1 Reverse Transcriptase Dimer upon Interaction with N-Acyl Hydrazone Inhibitors. **Molecular Pharmacology**, v. 62, p. 398-405, 2002.

STEAGALL, P. V. M. et al., Evaluation of the adverse effects of subcutaneous carprofen over six days in healthy cats. **Research in Veterinary Science**, v. 86, p. 115-120, 2009.

STEFFEN, R. P.; ELTON, C. M.; EVANS, D. B. The effect of the cardiogenic imazodan (CI-914) on myocardial and peripheral hemodynamics in the anesthetized dog. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 8, p. 520-526, 1986.

SUDO, R. T.; ZAPATA-SUDO, G.; BARREIRO, E. J. The new compound, LASSBio-294, increases the contractility of intact and saponin-skinned cardiac muscle from wistar rats. **British Journal of Pharmacology**, v. 134, p. 603- 613, 2001.

TANNENBAUM, H.; DECOTEAU, W. E.; ESDAILE, J. M. A double blind multicenter trial comparing piroxicam and indomethacin in ankylosing spondylitis with long-term follow-up. **Current Therapeutic Research - Clinical and Experimental**, v. 36, p. 426-435, 1984.

TIZZARD, I. R. **Imunologia veterinária: uma introdução**. 6 ed. São Paulo: Roca, 2002.

TJØLSEN, A. et al. The formalin test: an evaluation of the method. **Pain**, v. 51, p. 5 - 17, 1992.

TOMINAGA, M. et al. The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. **Neuron**, v. 21, p. 531- 543, 1998.

TRACEY, I.; MANTYH, P. W. The cerebral signature for pain perception and its modulation. **Neuron**, v. 55, p. 377-391, 2007.

TRIBUTINO, J. M. L. et al. Novel 6-methanesulfonamide-3,4-methylenedioxyphenyl-N-acylhydrazones: orally effective anti-inflammatory drug candidates. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 17, p. 1125-1131, 2009.

TRIBUTINO, J. et al. LASSBio-881: An N-acylhydrazone transient receptor potential vanilloid subfamily type 1 antagonist orally effective against the hypernociception induced by

capsaicin or partial sciatic ligation. **British Journal of Pharmacology**, v. 159, p. 1716 -1723, 2010.

UDDIN, M. J.; RAO, P. N. P.; KNAUS, E. E. Design and synthesis of acyclic triaryl (Z)-olefins: A novel class of cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 22, p. 5929-5940, 2004.

UTSUNOMIYA, I.; NAGAI, S.; OH-ISHI, S. Sequential appearance of IL-1 and IL-6 activities in rat carrageenin-induced pleurisy. **Journal Immunology**, v. 147, p. 1803-1809, 1991.

VALLANCE, P.; CHAN, E. N. Endothelial function and nitric oxide: clinical relevance. **Heart**, v.85, n.3, Mar, p.342-50, 2001.

VANDERAH, T. W. Pathophysiology of pain. **Medical Clinics of North America**, v. 91, p. 1 - 12, 2007.

VANE, J. R.; BOTTING, R. M. Mechanism of action of anti-inflammatory drugs. **Journal of Rheumatology**, v. 25, p. 9-25, 1996.

VANE, J. R.; BOTTING, R. M.; BAKHELE, Y. S. Cyclooxygenases 1 and 2. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 38, p. 97-120, 1998.

VERGNOLLE, N. Postinflammatory visceral sensitivity and pain mechanisms. **Neurogastroenterology & Motility**, v. 20, p. 73–80, 2008.

VERMA, P. R. et al. Antinociceptive activity of alcoholic extract of *Hemidesmus indicus* R. Br. in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 102, p. 298-301, 2005.

VISCELLI, B. A. Estudo dos efeitos de um anti-inflamatorio não-esteroidal seletivo para COX-2 na osteogênese e na expressão das proteínas COX-2 e RUNX-2 durante o reparo

**ósseo alveolar em ratos.** 2012. Dissertação (Mestrado em Ciências) Programa de Ciências Odontológicas Aplicadas, Universidade de São Paulo, Bauru, SP, 2012.

VIVIER, E.; MALISSEN, B. Innate and adaptive immunity: specificities and signaling hierarchies revisited. **Nature Immunology**, v. 6, p. 17-21, 2005.

VOILLEY, N. et al. Nonsteroid antiinflammatory drugs inhibit both the activity and the inflammation-induced expression of acid-sensing ion channels in nociceptors. **Journal of Neuroscience**, v. 21, p. 8026-8033, 2001.

WAGNER, J. R.; ROTHE, R. A. Neutrophil migration mechanisms, with an emphasis on the pulmonary vasculature. **Pharmacological Reviews**, v. 52, p. 349-374, 2000.

WALLACE, J. L., CHAPMAN, K.; MCKIGHT, W. Limited anti-inflammatory efficacy of Cyclo-oxygenase-2-inhibition in carrageenan-airpouch inflammation. **British Journal of Pharmacology**, v. 126, p. 1200-1204, 1999.

WALZOG, B.; GAEHTGENS, P. Adhesion Molecules: The path to a new understanding of acute inflammation. **News in Physiological Sciences**, v. 15, p. 107-113, 2000.

WANG et al. Selective inducible microsomal prostaglandin E2 synthase-1 (mPGES-1) inhibitors derived from an oxicam template. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, n. 5, p. 1604-1609, 2010.

WERMUTH, C. G. Selective Optimization of Side Activities: Another Way for Drug Discovery. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 48, p. 1303-1314, 2004.

WISEMAN, E. H. et al. Treatment of acute musculoskeletal disorders with piroxicam: Results of a double-blind multicenter comparison with indomethacin. **Current Therapeutic Research - Clinical and Experimental**, v. 42, p. 517-520, 1987.

WOLF, G. et al. Interleukin-1 signaling is required for induction and maintenance of postoperative incisional pain: genetic and pharmacological studies in mice. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 45, p. 1072-1077, 2008.

YAMAMOTO, S. et al. Pharmacological profile of a novel phosphodiesterase 7A and 4 dual inhibitor, YM-393059, on acute and chronic inflammation models. **European Journal of Pharmacology**, v. 550, p. 166 - 172, 2006.

ZALEWISKI, P. D. et al. Zinc metabolism in airway epithelium and airway inflammation: basic. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 105, p. 127– 149, 2005

ZHANG, J. M.; AN, J. Cytokines, inflammation and pain. **International Anesthesiology Clinics**, v. 45, p. 27-37, 2007.

ZIMMER, A. et al. Increased mortality, hypoactivity and hypoalgesia in cannabinoid CB1 receptor knockout mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, p. 5780-5785, 1999.

**ARTIGOS DERIVADOS DA TESE PUBLICADOS**

Article

## Analgesic and Anti-Inflammatory Activities of Salicylaldehyde 2-Chlorobenzoyl Hydrazone (H<sub>2</sub>LASSBio-466), Salicylaldehyde 4-Chlorobenzoyl Hydrazone (H<sub>2</sub>LASSBio-1064) and Their Zinc(II) Complexes

Walfrido Bispo Júnior <sup>1</sup>, Magna S. Alexandre-Moreira <sup>1</sup>, Marina A. Alves <sup>2</sup>, Anayive Perez-Rebolledo <sup>3</sup>, Gabrieli L. Parrilha <sup>3</sup>, Eduardo E. Castellano <sup>4</sup>, Oscar E. Piro <sup>5</sup>, Eliezer J. Barreiro <sup>2</sup>, Lídia Moreira Lima <sup>2</sup> and Heloisa Beraldo <sup>3,\*</sup>

<sup>1</sup> LaFI Laboratório de Farmacologia e Imunidade, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, AL, Brazil

<sup>2</sup> LASSBio Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas (LASSBio, <http://www.farmacia.ufrj.br/lassbio/>), Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, P. O. Box 68024, 21944-971, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

<sup>3</sup> Departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901, Belo Horizonte, Brazil

<sup>4</sup> Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 13560-970, São Carlos, SP, Brazil

<sup>5</sup> Departamento de Física, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata and Instituto IFLP (CONICET – CCT La Plata), C.C. 67, 1900 La Plata, Argentina

\* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: [hberaldo@ufmg.br](mailto:hberaldo@ufmg.br); Tel.: 55-31-3409-5740; Fax: 55-31-3409-5700.

Received: 27 June 2011; in revised form: 2 August 2011 / Accepted: 11 August 2011 /

Published: 15 August 2011

---

**Abstract:** Salicylaldehyde 2-chlorobenzoyl hydrazone (H<sub>2</sub>LASSBio-466), salicylaldehyde 4-chlorobenzoyl hydrazone (H<sub>2</sub>LASSBio-1064) and their complexes [Zn(LASSBio-466)H<sub>2</sub>O]<sub>2</sub> (**1**) and [Zn(HLASSBio-1064)Cl]<sub>2</sub> (**2**) were evaluated in animal models of peripheral and central nociception, and acute inflammation. All studied compounds significantly inhibited acetic acid-induced writhing response. Upon coordination the anti-nociceptive activity was favored in the complex **1**. H<sub>2</sub>LASSBio-466 inhibited only the first phase of the formalin test, while **1** was active in the second phase, like indomethacin, indicating its ability to inhibit nociception associated with the inflammatory response. Hence coordination to zinc(II) altered the pharmacological profile of H<sub>2</sub>LASSBio-466.

H<sub>2</sub>LASSBio-1064 inhibited both phases but this effect was not improved by coordination. The studied compounds did not increase the latency of response in the hot plate model, indicating their lack of central anti-nociceptive activity. All compounds showed levels of inhibition of zymosan-induced peritonitis comparable or superior to indomethacin, indicating an expressive anti-inflammatory profile.

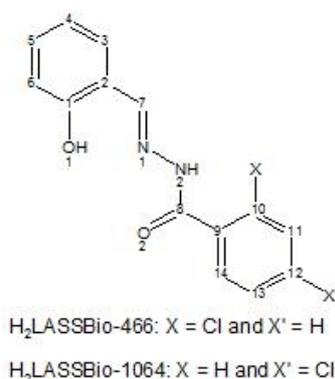
**Keywords:** acylhydrazones; zinc(II) complexes; analgesic activity; anti-inflammatory activity

## 1. Introduction

Inflammation is a response of the immune system to physical and/or chemical and/or biological injury, understanding by injury any process able to cause tissue or cellular damages. The types of inflammation (*i.e.* acute or chronic) differ by cause, mechanism, outcome, and intensity. It is well known that while acute inflammation has a physiological role in normal circumstances, chronic inflammation exerts detrimental effects on the functional status of cells and tissues. As a consequence inflammatory processes take part in a huge number of diseases such as atherosclerosis, Alzheimer disease, Parkinson disease, cancer, asthma, arthritis and so on [1-3].

Zinc is one of the most prevalent trace elements in the human body. It has been shown to be essential to the structure and function of a large number of macromolecules and for a variety of enzymatic reactions, which mediate a wide range of physiological processes [4,5]. These include production of collagen and other extracellular matrix proteins, modulation of immunoregulatory (e.g., T and B lymphocytes, macrophages, and antigen-presenting dendritic cells) and inflammatory (e.g., eosinophils, neutrophils, and mast cells) cells function. As a consequence, zinc may be considered an important immunoregulatory agent with anti-apoptotic and anti-inflammatory activities [6].

**Figure 1.** Generic structure of salicylaldehyde 2-chlorobenzoyl hydrazone (H<sub>2</sub>LASSBio-466) and its regioisomer salicylaldehyde 4-chlorobenzoyl hydrazone (H<sub>2</sub>LASSBio-1064).



In the context of a research program that aims to contribute to the discovery of new anti-inflammatory and analgesic drug candidates, we describe the synthesis of zinc(II) complexes with salicylaldehyde 2-chlorobenzoyl hydrazone (H<sub>2</sub>LASSBio-466) and its regioisomer salicylaldehyde 4-

chlorobenzoyl hydrazone ( $H_2LASSBio-1064$ ) (Figure 1), together with a pharmacological evaluation of all acylhydrazones and zinc(II) complexes in animal models of peripheral and central nociception and acute inflammation.

## 2. Results and Discussion

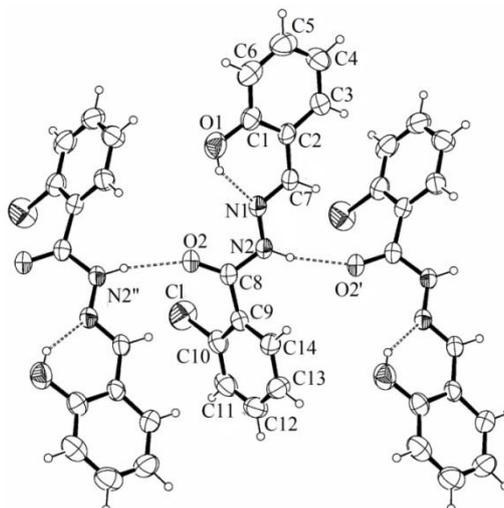
### 2.1. Formation of the Zinc(II) Complexes 1 and 2

Microanalyses and molar conductivity data are compatible with the formation of  $[Zn(LASSBio-466)H_2O]$  and  $[Zn(HLASSBio-1064)Cl]$ . In the first compound a di-anionic acylhydrazone is attached to the metal center upon deprotonation at N(2)-H and O(1)-H. The remaining coordination site is occupied by a water molecule, as indicated by the infrared spectrum of the compound (Section 2.3). In the second, a mono-anionic acylhydrazone is attached to the metal upon deprotonation at O(1)-H, together with a chloride ion.

Upon recrystallization of  $[Zn(HLASSBio-1064)Cl]$  in 1:9 DMSO-acetone, crystals of  $[Zn_2(LASSBio-1064)_2(H_2O)_2] \cdot [Zn_2(LASSBio-1064)_2(DMSO)_4]$  were obtained. The compound consists of two center symmetric binuclear zinc(II) complexes hosted in the same lattice, as previously reported by some of us [7]. We had also obtained  $[Zn(LASSBio-1064)]_2$ , which is a phenoxo-bridged dimer since the monomer would contain zinc(II) with coordination number three, which is very unlikely [7]. Hence  $[Zn(HLASSBio-1064)Cl]$  most probably also exists as a dimer,  $[Zn(HLASSBio-1064)Cl]_2$ .

We now obtained  $[Zn(LASSBio-466)(H_2O)]$ , in which a water molecule occupies the fourth coordination position, like in the first center symmetric unit of  $[Zn_2(LASSBio-1064)_2(H_2O)_2] \cdot [Zn_2(LASSBio-1064)_2(DMSO)_4]$ . Therefore,  $[Zn(LASSBio-466)(H_2O)]$  is also probably a phenoxo-bridged dimer,  $[Zn(LASSBio-466)(H_2O)]_2$ . Considering that dimerization is favored in this class of compounds [7], the zinc(II) complexes are hereafter formulated as  $[Zn(LASSBio-466)(H_2O)]_2$  (**1**) and  $[Zn(HLASSBio-1064)Cl]_2$  (**2**).

**Figure 2.** Molecular plot of LASSBio-466 showing the labeling scheme of the non-H atoms and their displacement ellipsoids at the 50% probability level.



2.2. Crystal Structure of H<sub>2</sub>LASSBio-466

Crystal data and refinement results are summarized in Table 1. Figure 2 is an ORTEP [8] drawing of the molecule and Table 2 shows the corresponding intra-molecular bond distances and angles.

**Table 1.** Crystal data and structure solution methods and refinement results for salicylaldehyde 2-chlorobenzoyl hydrazone (H<sub>2</sub>LASSBio-466).

Compound	H <sub>2</sub> LASSBio-466	
Empirical Formula	C <sub>14</sub> H <sub>11</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	
Formula Weight	274.70	
Temperature, K	294(2)	
Crystal System	Monoclinic	
Space Group	P2 <sub>1</sub> /c	
Unit cell dimensions	a, Å	9.889(1)
	b, Å	13.360(2)
	c, Å	10.079(1)
	α, °	90
	β, °	93.10(1)
	γ, °	90
Volume, Å <sup>3</sup>	1329.7(3)	
Z, Density calc., Mg/m <sup>3</sup>	4, 1.372	
Absorption coefficient, mm <sup>-1</sup>	0.286	
F(000)	568	
Crystal size, mm	0.20 × 0.12 × 0.08	
Crystal color / shape	Colorless / prism	
θ range for data coll.	3.05 to 24.08°	
Index range	−10 ≤ h ≤ 11	
	−15 ≤ k ≤ 15	
	−11 ≤ l ≤ 11	
Completeness, θ = 26.37°	99.6 %	
Max. / min. transmission	0.977 / 0.945	
Goodness-of-fit on F <sup>2</sup>	1.016	
Reflec. collect./unique (R <sub>int</sub> )	5646/2095 (0.032)	
Observed reflections [I > 2σ(I)]	1612	
Weights, w	[σ <sup>2</sup> (F <sub>o</sub> <sup>2</sup> ) + (0.088P) <sup>2</sup> + 0.22P] <sup>-1</sup> P = [Max((F <sub>o</sub> <sup>2</sup> , 0) + 2F <sub>c</sub> <sup>2</sup> )/3]	
Data / restraints / parameters	2095 / 0 / 184	
Final R indexes <sup>a</sup> [I > 2σ(I)]	R <sub>1</sub> = 0.0474, wR <sub>2</sub> = 0.1296	
R indices (all data)	R <sub>1</sub> = 0.0637, wR <sub>2</sub> = 0.1479	
Extinction coefficient	0.07(1)	
Larg. peak & hole, e Å <sup>-3</sup>	0.180 / -0.246	

<sup>a</sup> R indices defined as:  $R_1 = \frac{\sum ||F_o| - |F_c||}{\sum |F_o|}$ ,  $wR_2 = \frac{[\sum w(F_o^2 - F_c^2)^2]}{[\sum w(F_o^2)^2]}^{1/2}$ .

The phenyl rings show a delocalized bonding structure, with C-C distances ranging from 1.370(3) to 1.388(3) Å for the chlorine-containing phenyl, where d(C<sub>ph</sub>-Cl) = 1.724(3) Å, and from 1.359(4) to 1.400(3) Å for the phenol ring, where d(C<sub>ph</sub>-OH) = 1.353(3) Å. We found for the carbonyl C(8)=O(2) and C(7)=N(1) groups distances of 1.226(2) and 1.272(3) Å, respectively, as expected for formal double bonds. The N(1)-N(2) length of 1.376(3) Å agrees with the single bond character of this link. The molecule conformation is stabilized by a strong intra-molecular O-H...N bond [d(O(1)⋯N(1)) =

2.632 Å,  $\angle(\text{O}(1)\text{-H}(1)\cdots\text{N}(1)) = 145.7^\circ$ . As shown in Figure 2 the hydrazone adopts the *E* configuration in the crystal state.

**Table 2.** Bond lengths [Å] and angles [°] for salicylaldehyde 2-chlorobenzoyl hydrazone (H<sub>2</sub>LASSBio-466).

Atoms	Bond lengths (Å)	Atoms	Angles (°)
Cl-C(10)	1.724(3)	O(2)-C(8)-C(9)	123.2(2)
O(1)-C(1)	1.353(3)	N(1)-C(7)-C(2)	121.1(2)
O(2)-C(8)	1.226(3)	N(2)-C(8)-C(9)	114.7(2)
N(1)-N(2)	1.376(3)	N(1)-N(2)-C(8)	118.6(2)
N(1)-C(7)	1.272(3)	N(2)-N(1)-C(7)	117.2(2)
N(2)-C(8)	1.346(3)	C(1)-C(2)-C(3)	118.3(2)
C(1)-C(2)	1.400(3)	C(1)-C(2)-C(7)	122.2(2)
C(1)-C(6)	1.384(4)	C(1)-C(6)-C(5)	120.5(3)
C(2)-C(3)	1.390(3)	C(2)-C(1)-C(6)	119.7(2)
C(2)-C(7)	1.445(3)	C(2)-C(3)-C(4)	121.1(3)
C(3)-C(4)	1.374(4)	C(3)-C(4)-C(5)	119.5(3)
C(4)-C(5)	1.371(5)	C(3)-C(2)-C(7)	119.5(2)
C(5)-C(6)	1.359(4)	C(4)-C(5)-C(6)	120.8(3)
C(8)-C(9)	1.494(3)	C(8)-C(9)-C(10)	122.4(2)
C(9)-C(10)	1.393(3)	C(8)-C(9)-C(14)	119.9(2)
C(9)-C(14)	1.388(3)	C(9)-C(10)-Cl	120.8(2)
C(10)-C(11)	1.381(4)	C(9)-C(10)-C(11)	121.1(3)
C(11)-C(12)	1.376(4)	C(9)-C(14)-C(13)	121.5(3)
C(12)-C(13)	1.371(4)	C(10)-C(9)-C(14)	117.6(2)
C(13)-C(14)	1.370(3)	C(10)-C(11)-C(12)	119.5(3)
		C(11)-C(10)-Cl	118.1(2)
		C(11)-C(12)-C(13)	120.3(3)
		C(12)-C(13)-C(14)	119.9(3)
		O(1)-C(1)-C(2)	122.4(2)
		O(1)-C(1)-C(6)	118.0(2)
		O(2)-C(8)-N(2)	122.1(2)

The solid is further stabilized by a medium-strength inter-molecular N-H $\cdots$ O<sub>carbonyl</sub> bond [ $d(\text{N}(2)\cdots\text{O}(2)) = 2.885$  Å,  $\angle(\text{N}(2)\text{-H}(2)\cdots\text{O}(2')) = 166.2^\circ$ ] between neighboring molecules, symmetry-related to each other through a glide plane, involving the imine group of a molecule as a donor and the carbonyl oxygen of the other as an acceptor. This gives rise to a polymeric structure that extends along the crystal *c*-axis (see Figure 2).

### 2.3. Spectroscopic Characterization

The vibrations at 3450–3436 cm<sup>-1</sup> in the infrared spectra of the free acylhydrazones attributed to  $\nu(\text{O-H})$  disappear in those of the complexes, in accordance with deprotonation of the phenol group [9]. The  $\nu(\text{C=O})$  absorption at 1657 cm<sup>-1</sup> in the spectrum of the H<sub>2</sub>LASSBio-466 was not found in the spectrum of the complex **1**, indicating coordination of an enolate oxygen [10,11]. The  $\nu(\text{C=O})$  absorption at 1676 cm<sup>-1</sup> in the spectrum of the H<sub>2</sub>LASSBio-1064 shifts to 1618 cm<sup>-1</sup> in the spectrum of **2**, indicating coordination through the carbonyl oxygen [10–13]. The vibrations attributed to  $\nu(\text{C=N})$  at 1625 and 1624 cm<sup>-1</sup> in the infrared spectra of the hydrazones shift to 1614 and 1611 cm<sup>-1</sup>, respectively, in the spectra of the complexes, in agreement with coordination of the azomethine

nitrogen [10-13]. A new absorption at  $1604\text{ cm}^{-1}$  in the spectrum of complex **1** was attributed to the  $\nu(\text{OH}_2)$  vibration.

The NMR spectra of the acylhydrazones and their zinc(II) complexes were recorded in  $\text{DMSO-}d_6$ . The  $^1\text{H}$  resonances were assigned on the basis of chemical shifts and multiplicities. The carbon type (C, CH) was determined by using distortionless enhancement by polarization transfer (DEPT 135) experiments. The assignments of the protonated carbons were made by 2D heteronuclear multiple quantum coherence experiments (HMQC).

The signals of all hydrogens and carbons are duplicated in the  $^1\text{H}$ - and  $^{13}\text{C}$ -NMR spectra of  $\text{H}_2\text{LASSBio-466}$ , indicating the presence of the *E* and *Z* configurational isomers in the  $\text{DMSO-}d_6$  solution. In fact, two N(2)-H signals were observed at  $\delta$  11.05 and 9.84 ppm, which were attributed to the *Z* and *E* isomers, respectively. In the first N(2)-H is hydrogen bonded to the phenol oxygen, while in the latter it is hydrogen bonded to the solvent [10-13]. Only one signal was found for each hydrogen and each carbon in the  $^1\text{H}$ - and  $^{13}\text{C}$ -NMR spectra of  $\text{H}_2\text{LASSBio-1064}$ . These signals are compatible with the presence of the *E* configurational isomer.

Only one signal was observed for each hydrogen and each carbon in the spectra of complexes **1-2**. The O(1)-H signals were absent in the spectra of all complexes, in agreement with deprotonation and formation of a phenolate group. In the spectrum of **1** the N(2)-H signal disappears, suggesting deprotonation of the hydrazone upon coordination. Hence in **1** a di-anionic hydrazone ligand is attached to the zinc(II) center. In the spectrum of **2** the N(2)-H signal was observed, according with the presence of a mono-anionic hydrazone ligand. In the  $^1\text{H}$ -NMR spectra of the complexes the signals of all hydrogens undergo significant shifts in relation to their positions in the free hydrazones. Similarly, the signals of C=N, C=O and the phenol carbons undergo significant shifts in complexes **1** and **2**, indicating coordination through the  $\text{O}_{\text{phenol}}\text{-N-O}$  chelating system. Hence in **1-2** the hydrazones adopt the *E* configuration.

#### 2.4. Anti-Nociceptive Activity of $\text{H}_2\text{LASSBio-466}$ , $\text{H}_2\text{LASSBio-1064}$ , $[\text{Zn}(\text{LASSBio-466})\text{H}_2\text{O}]_2$ (**1**) and $[\text{Zn}(\text{HLASSBio-1064})\text{Cl}]_2$ (**2**)

The anti-nociceptive profiles of the free ligands  $\text{H}_2\text{LASSBio-466}$ ,  $\text{H}_2\text{LASSBio-1064}$  and their zinc(II) complexes **1** and **2** were evaluated using three well-accepted pain models, namely acetic acid-induced writhing, formalin-induced nociception and hot plate test. The acetic acid-induced abdominal writhing and hot-plate test have been reported to be useful to investigate peripheral and central activity, respectively, while the formalin-induced nociception is valuable to detect both effects, including inflammatory pain.

All compounds were evaluated at a dose of  $100\text{ }\mu\text{mol/kg}$  (p.o). Indomethacin, a COX-1 selective inhibitor ( $100\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$ , p.o.) and dipyrone, a COX-3 selective inhibitor ( $100\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$ , p.o.) were used as standard drugs in the peripheral nociception models, while morphine ( $15\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$ , i.p.) was used as standard in the hot-plate test. The analgesic activity of  $\text{H}_2\text{LASSBio-466}$ , its regioisomer  $\text{H}_2\text{LASSBio-1064}$ , and their complexes  $[\text{Zn}(\text{LASSBio-466})\text{H}_2\text{O}]_2$  (**1**) and  $[\text{Zn}(\text{HLASSBio-1064})\text{Cl}]_2$  (**2**) was initially evaluated employing the acetic acid-induced abdominal writhing model in mice and compared with those of the standards [14].

As shown in Table 3, all compounds produced marked inhibition of acetic acid-induced writhing response. However, the anti-nociceptive activity appears to have been favored by complex formation in the case of complex **1**, given its increased activity compared to the H<sub>2</sub>LASSBio-466 free ligand.

**Table 3.** Effect of H<sub>2</sub>LASSBio-466, its regioisomer H<sub>2</sub>LASSBio-1064, their zinc(II) complexes, indomethacin and dipyrone (100 μmol·kg<sup>-1</sup>, p.o.) on the 0.6% acetic acid-induced abdominal constrictions in mice, for a period of 25 min.

Substance	n	Writhing number Mean ± S.E.M.	% of inhibition Mean ± S.E.M.
Control	6	37.5 ± 1.4	—
Indomethacin	6	6.0 ± 3.1 **	84.0 ± 8.3 **
Dipyrone	6	8.3 ± 2.7 **	77.8 ± 7.2 **
H <sub>2</sub> LASSBio-466	6	14.8 ± 2.2 **	60.4 ± 6.0 **
H <sub>2</sub> LASSBio-1064	6	7.0 ± 1.1 **	81.3 ± 3.0 **
[Zn(LASSBio-466)H <sub>2</sub> O] <sub>2</sub> ( <b>1</b> )	6	6.6 ± 1.4 **	82.3 ± 3.7 **
[Zn(HLASSBio-1064)Cl] <sub>2</sub> ( <b>2</b> )	6	10.8 ± 2.3 **	70.9 ± 6.2 **

Data are expressed as mean ± S.E.M. Statistical differences between the treated and the control groups were evaluated by ANOVA and Dunnett tests and the asterisks denote the levels of significance in comparison with control groups, \*\* P < 0.01.

The neurogenic and inflammatory pain was evaluated using the formalin test and analyzing the first and the second phases of the nociceptive response, respectively [15]. In this model, H<sub>2</sub>LASSBio-466 was effective in inhibiting only the first phase, while [Zn(LASSBio-466)H<sub>2</sub>O]<sub>2</sub> (**1**), like indomethacin, was active in the second phase, indicating its ability to inhibit nociception associated with inflammatory response (Table 4). H<sub>2</sub>LASSBio-1064 was able to inhibit both neurogenic and inflammatory phases anticipating a distinct pharmacological profile. However this effect decreases on coordination to zinc(II) in complex **2**. These results suggest that coordination seems to be a good strategy to improve the antinociception profile of the prototype H<sub>2</sub>LASSBio-466 associated with an inflammatory pain.

**Table 4.** Effect of prototypes H<sub>2</sub>LASSBio-466, H<sub>2</sub>LASSBio-1064, their zinc(II) complexes and indomethacin (100 μmol·kg<sup>-1</sup>, p.o.) on formalin (2.5%) test in mice.

Substance	n	Phase 1	Phase 2	% of inhibition (Mean ± S.E.M.)	
		Mean ± S.E.M.	Mean ± S.E.M.	Phase 1	Phase 2
Control	5	54.8 ± 2.3	227.6 ± 22.7	—	—
Indomethacin	5	57.1 ± 8.5	115.9 ± 3.3 *	0	49.1 ± 1.4 *
H <sub>2</sub> LASSBio-466	5	29.3 ± 8.3 **	182.4 ± 17.4	46.5 ± 8.3 **	19.8 ± 9.7
H <sub>2</sub> LASSBio-1064	5	25.7 ± 4.9 *	117.0 ± 19.1 *	53.1 ± 8.9 *	48.5 ± 8.4 *
[Zn(LASSBio-466)H <sub>2</sub> O] <sub>2</sub> ( <b>1</b> )	5	40.6 ± 12.7	142.8 ± 23.1 *	25.9 ± 15.7	37.3 ± 10.1 *
[Zn(HLASSBio-1064)Cl] <sub>2</sub> ( <b>2</b> )	5	39.6 ± 7.8	161.3 ± 36.0	27.7 ± 13.1	29.2 ± 13.9

Data are expressed as mean ± S.E.M. Statistical differences between the treated and the control groups were evaluated by test t and Mann-Whitney tests and the asterisks denote the levels of significance in comparison with control groups, \* P < 0.05 and \*\* P < 0.01.

In order to investigate an occasional central anti-nociceptive activity for prototypes H<sub>2</sub>LASSBio-466, H<sub>2</sub>LASSBio-1064 and their zinc(II) complexes, the studied compounds were evaluated in the hot

plate test using morphine ( $15 \mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$ , i.p.) as standard [16]. As shown in Table 5, these compounds did not increase the latency of response significantly, showing that they do not present activity in the supra-spinal analgesia, while morphine induced a marked increase in the latency of the animals at 60 min ( $9.0 \pm 1.6$  s), 90 min ( $7.4 \pm 0.8$  s), 120 min ( $5.3 \pm 0.8$  s) and 150 min ( $2.5 \pm 0.2$  s). These results indicate that the studied compounds do not have any central anti-nociceptive activity.

**Table 5.** Time course effect of prototypes H<sub>2</sub>LASSBio-466, H<sub>2</sub>LASSBio-1064, their zinc(II) complexes ( $100 \mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$ , p.o.) and morphine ( $15 \mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$ , i.p.) on hot-plate test in mice.

Substance	n	Mean $\pm$ S.E.M.				
		0 min	60 min	90 min	120 min	150 min
Control	6	$2.8 \pm 0.2$	$2.9 \pm 0.3$	$1.6 \pm 0.2$	$2.3 \pm 0.40$	$1.7 \pm 0.1$
Morphine	6	$1.8 \pm 0.5$	$9.0 \pm 1.6$ *	$7.4 \pm 0.8$ *	$5.3 \pm 0.8$ *	$2.5 \pm 0.2$
H <sub>2</sub> LASSBio-466	6	$2.1 \pm 0.21$	$2.3 \pm 0.4$	$2.1 \pm 0.2$	$2.2 \pm 0.2$	$2.6 \pm 0.1$
H <sub>2</sub> LASSBio-1064	6	$1.7 \pm 0.18$	$2.6 \pm 0.2$	$2.1 \pm 0.2$	$2.5 \pm 0.3$	$3.5 \pm 0.3$
[Zn(LASSBio-466)H <sub>2</sub> O] <sub>2</sub> (1)	6	$2.1 \pm 0.2$	$4.2 \pm 0.8$	$2.4 \pm 0.6$	$3.6 \pm 0.6$	$5.4 \pm 1.2$
[Zn(HLASSBio-1064)Cl] <sub>2</sub> (2)	6	$1.5 \pm 0.1$	$2.0 \pm 0.5$	$2.3 \pm 0.5$	$2.9 \pm 1.0$	$1.9 \pm 0.2$

Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. Statistical differences between the treated and the control groups were evaluated by ANOVA and Dunnett tests and the asterisks denote the levels of significance in comparison with control groups, \*  $P < 0.05$ .

To better assess the potential anti-inflammatory activity of the free acylhydrazones and their zinc(II) complexes, the zymosan-induced peritonitis assay was performed [17]. As seen in Table 6, all compounds showed some level of inhibition in this cell migration model comparable or superior to indomethacin.

**Table 6.** Effect of prototypes H<sub>2</sub>LASSBio-466, H<sub>2</sub>LASSBio-1064, their zinc(II) complexes and indomethacin ( $100 \mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$ , p.o.) on the zymosan-induced peritonitis in mice.

Substance	n	Cell Number $\times 10^6/\text{mL}$	% of inhibition
		Mean $\pm$ S.E.M.	Mean $\pm$ S.E.M.
Control	7	$38.0 \pm 1.0$	—
Saline	7	$5.0 \pm 0.8$	—
Indomethacin	7	$17.7 \pm 1.0$ **	$53.4 \pm 2.7$ **
H <sub>2</sub> LASSBio-466	7	$11.4 \pm 1.4$ **	$70.0 \pm 3.8$ **
H <sub>2</sub> LASSBio-1064	7	$8.4 \pm 0.9$ **	$77.8 \pm 2.4$ **
[Zn(LASSBio-466)H <sub>2</sub> O] <sub>2</sub> (1)	7	$10.7 \pm 1.8$ **	$71.8 \pm 4.9$ **
[Zn(HLASSBio-1064)Cl] <sub>2</sub> (2)	7	$13.4 \pm 1.5$ **	$64.7 \pm 4.0$ **

Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. Statistical differences between the treated and the control groups were evaluated by ANOVA and Dunnett tests and the asterisks denote the levels of significance in comparison with control groups, \*\*  $P < 0.01$ .

In fact, H<sub>2</sub>LASSBio-466, H<sub>2</sub>LASSBio-1064, [Zn(LASSBio-466)H<sub>2</sub>O]<sub>2</sub> and [Zn(HLASSBio-1064)Cl]<sub>2</sub>, presented 70.0%, 77.8%, 71.8% and 64.7% of inhibition, respectively, while indomethacin inhibited cell-migration by 53.4%.

### 3. Experimental

#### 3.1. General

All common chemicals were purchased from Aldrich and used without further purification. Partial elemental analyses were performed on a Perkin Elmer CHN 2400 analyzer. A YSI model 31 conductivity bridge was employed for molar conductivity measurements ( $1 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>, DMF). Infrared spectra (4000–400 cm<sup>-1</sup>) were recorded on a Perkin Elmer FT-IR Spectrum GX spectrometer using KBr plates. NMR spectra were obtained with a Bruker DPX-200 Avance (200 MHz) spectrometer using DMSO-*d*<sub>6</sub> as the solvent and TMS as internal reference.

#### 3.2. Synthesis of H<sub>2</sub>LASSBio-466 and H<sub>2</sub>LASSBio-1064

The synthesis of H<sub>2</sub>LASSBio-466 and H<sub>2</sub>LASSBio-1064 were performed using a previously described methodology [18]. Briefly, salicylaldehyde (2-hydroxybenzaldehyde) was added to a solution of 2-chlorobenzohydrazide or 4-chlorobenzohydrazide (an equimolar amount) in absolute ethanol containing one drop of 37% hydrochloric acid. The mixture was stirred at room temperature for 2 hours until extensive precipitation was observed. Next, the solvent was partially concentrated at reduced pressure and the resulting mixture was poured into cold water. The precipitate formed was filtered out and dried under vacuum producing the desired (*E,Z*)-salicylaldehyde 2-chlorobenzoyl hydrazone (H<sub>2</sub>LASSBio-466) and (*E*)-salicylaldehyde 4-chlorobenzoyl hydrazone (H<sub>2</sub>LASSBio-1064) in 87% and 91% yield, respectively. The melting point and <sup>1</sup>H-NMR data for both compounds were in agreement with previous reports [19,20].

#### 3.3. Synthesis of Zinc(II) Complexes

##### 3.3.1. Synthesis of [Zn(LASSBio-466)H<sub>2</sub>O]<sub>2</sub> (1) and [Zn(HLASSBio-1064)Cl]<sub>2</sub> (2)

Complexes **1** and **2** were obtained by mixing an ethanol solution of the desired hydrazone with zinc chloride and triethylamine in 1:1:1 ligand-to-metal-to-triethylamine molar ratio. The resulting solids were washed with ethanol followed by diethylether and then dried *in vacuo*.

[Zn(LASSBio-466)H<sub>2</sub>O]<sub>2</sub> (**1**). Yield 68%. Yellow solid. Anal. Calc. for C<sub>28</sub>H<sub>22</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>Cl<sub>2</sub>Zn<sub>2</sub> (712.18): C, 47.26%; H, 2.85%; N, 7.40%. Found: C, 47.22%; H, 3.11%; N, 7.87%. M.P. > 300 °C. Molar conductivity: 8.23 Ω<sup>-1</sup>cm<sup>2</sup> mol<sup>-1</sup>. IR: ν(C=N) 1614, ν(Zn-OH<sub>2</sub>) 1604, ν(phenolic, CO) 1329. <sup>1</sup>H-NMR: δ (ppm) = 7.54 (1H, H7), 7.47–7.59 (1H, H14), 7.52 (1H, H11), 7.51 (1H, H5), 7.44–7.47 (1H, H3), 7.32 (1H, H13), 7.28 (1H, H13), 6.79 (1H, H6), 6.70 (1H, H4). <sup>13</sup>C-NMR: δ (ppm) = 169.73 (C8), 158.02 (C1), 150.59 (C7), 135.87 (C10), 135.09 (C12), 134.37 (C13), 131.38 (C5), 130.35 (C11), 129.81 (C14), 127.48 (C3), 119.69 (C9, C2), 119.35 (C4), 118.37 (C6).

[Zn(HLASSBio-1064)Cl]<sub>2</sub> (**2**). Yield 71%. Yellow solid. Anal. Calc. for C<sub>28</sub>H<sub>20</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>Cl<sub>4</sub>Zn<sub>2</sub> (749.11): C, 44.72%; H, 2.24%; N, 7.10%. Found: C, 44.89%; H, 2.69%; N, 7.48%. M.P. > 300 °C. Molar conductivity: 11.35 Ω<sup>-1</sup>cm<sup>2</sup> mol<sup>-1</sup>. IR: ν(N-H) 3179, ν(C=O) 1618, ν(C=N) 1611, ν(phenolic, CO) 1281. <sup>1</sup>H-NMR: δ (ppm) = 8.99 (1H, H7), 8.01 (2H, H11, H13), 7.59 (2H, H10, H14), 7.38 (1H, H3),

7.24 (1H, H5), 6.73 (1H, H6), 6.89 (1H, H4).  $^{13}\text{C}$ -NMR:  $\delta$  (ppm) = 168.88 (C8), 166.81 (C1), 155.61 (C7), 136.83 (C12), 131.62 (C5), 129.68 (C10,C14), 129.58 (C3), 128.79 (C11, C13), 119.53 (C4), 118.75 (C9, C2), 116.54 (C6).

### 3.4. X-ray Crystallography

The X-ray diffraction measurements were performed on an Enraf-Nonius Kappa-CCD diffractometer with graphite-monochromated  $\text{MoK}\alpha$  ( $\lambda = 0.71073 \text{ \AA}$ ) radiation. Diffraction data were collected ( $\varphi$  and  $\omega$  scans with  $\kappa$ -offsets) with COLLECT [21]. Integration and scaling of the reflections were performed with HKL DENZO-SCALEPACK [22] suite of programs. The unit cell parameters were obtained by least-squares refinement based on the angular settings for all collected reflections using HKL SCALEPACK. The structure was solved by direct methods with SHELXS-97 [23] and the molecular model refined by full-matrix least-squares procedure on  $F^2$  with SHELXL-97 [24]. The hydrogen atoms were included in the molecular model at stereo-chemical positions and refined with the riding model.

### 3.5. Anti-nociceptive and anti-inflammatory activities of $\text{H}_2\text{LASSBio-466}$ , $\text{H}_2\text{LASSBio-1064}$ , $[\text{Zn}(\text{LassBio-466})\text{H}_2\text{O}]_2$ (**1**) and $[\text{Zn}(\text{HLassBio-1064})\text{Cl}]_2$ (**2**)

#### 3.5.1. Animals

Experiments were conducted using Swiss mice obtained from the BIOCEN - UFAL breeding unit, weighing 20–30 g each, males or females, adult, with 6 to 8 weeks of age, distributed in groups of up to 6–8 animals for treatment. The animals were maintained with free access to food and water and kept at 25–28 °C under a controlled 12 h light-dark<sup>-1</sup> cycle. All animals were manipulated according to the norms established by the Ethics Commission - UFAL for handling animals (protocol number: 026681/2009-23).

#### 3.5.2. Writhing Test

This test was performed as described by Collier and coworkers [14]. Acetic acid (0.6%, v/v) was administered i.p. in a volume of  $0.1 \text{ mL}\cdot 10 \text{ g}^{-1}$ . The number of writhes, a response consisting of contraction of an abdominal wall, pelvic rotation followed by hind limb extension, was counted during continuous observation for 20 min. beginning 5 min. after the acetic acid injection. The prototypes  $\text{H}_2\text{LASSBio-466}$ ,  $\text{H}_2\text{LASSBio-1064}$  and their zinc(II) complexes, indomethacin and dipyron were administered at the dose of  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$  (p.o), 40 min. before the acetic acid injection. Control group received  $10 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$  of vehicle (arabic gum, p.o.). Anti-nociceptive activity was expressed as inhibition percentage of the usual number of writhing observed in control animals.

#### 3.5.3. Formalin-Induced Pain in Mice

The formalin test was performed as described by Hunskaar and Hole [15]. Animals received 20  $\mu\text{L}$  of a 2.5% formalin solution (0.92% formaldehyde in saline) in the ventral surface of the right hind paw. They were observed from 0 to 5 min. (neurogenic phase) and from 15 to 30 min. (inflammatory phase) after injection and the time they spent licking the injected paw was recorded and considered as

indicative of nociception. The prototypes H<sub>2</sub>LASSBio-466, H<sub>2</sub>LASSBio-1064, their zinc(II) complexes and indomethacin were administered at the dose of 100 µmol·kg<sup>-1</sup> (p.o), 40 min. before formalin injection. Control group received 10 mL·kg<sup>-1</sup> of vehicle (arabic gum, p.o.).

#### 3.5.4. Hot-Plate Test

Mice were treated according to the method described by Eddy and Leimbach [16]. Each mouse was placed on the hot plate set at 54 ± 1.0 °C and the time of paw licking was recorded before and 30 min. after oral administration of the tested compounds. The prototypes H<sub>2</sub>LASSBio-466, H<sub>2</sub>LASSBio-1064 and their zinc(II) complexes were administered at the dose of 100 µmol·kg<sup>-1</sup> (p.o). Control group received 10 mL·kg<sup>-1</sup> of vehicle (arabic gum, p.o.). Morphine was also used as a drug standard at the dose of 15 µmol·kg<sup>-1</sup> (i.p.). Analgesia was defined as an increase in the latency of paw licking, and the latency times were compared with the values obtained for control. Sixty seconds were taken as the cut-off time to avoid mouse tissue damage.

#### 3.5.5. Zymosan-Induced Peritonitis

Peritoneal inflammation was induced according to the method described by Doherty [17]. A solution of zymosan A (Sigma-Aldrich, 2 mg·mL<sup>-1</sup>) was prepared in saline (0.9% NaCl) and injected into the peritoneal cavity of mice (0.5 mL). Six hours after injection of zymosan A, the animals were sacrificed by cervical dislocation and the peritoneal cavity was washed with cold Hank's solution (3 mL). The prototypes H<sub>2</sub>LASSBio-466, H<sub>2</sub>LASSBio-1064, their zinc(II) complexes and indomethacin were administered at the dose of 100 µmol·kg<sup>-1</sup> (p.o), 40 min. before zymosan A injection. The control group received 10 mL·kg<sup>-1</sup> of vehicle (arabic gum, p.o.). The number of cells was quantified using an optical microscope, and a 100 x lens.

#### 3.5.6. Statistical Analysis

Data obtained from animal experiments are represented by mean ± standard error of the mean (Mean ± S.E.M.). Statistical differences between the treated and the control groups were evaluated by test t of Student or ANOVA in the tutorial Prisma®. Values were considered significant if \* P < 0.05, \*\* P < 0.01 and \*\*\* P < 0.001.

### 4. Conclusions

The studied compounds, evaluated at a dose of 100 µmol/kg (p.o), showed marked inhibition of acetic acid-induced writhing response, with the anti-nociceptive activity being favored by zinc(II) complex formation in the case of complex **1**. The compounds also have antinociception profile associated with inflammatory pain, with no activity in murine analgesic model of central pain. In the formalin model, H<sub>2</sub>LASSBio-466 was effective in inhibiting only the first phase, while its zinc(II) complex **1**, like indomethacin, was active in the second phase, indicating its ability to inhibit nociception associated with inflammatory response. Hence coordination to zinc(II) altered the pharmacological profile of H<sub>2</sub>LASSBio-466. Moreover, the salicyladehyde *N*-acylhydrazone

derivatives and their zinc(II) complexes showed comparable or superior inhibition of cell-migration process to indomethacin, indicating an expressive anti-inflammatory profile.

The different activities of the complexes could be explained by their releasing hydrazone at different rates during the assays. In addition, complex **1** contains a di-anionic hydrazone while **2** contains a mono-anionic hydrazone. Hence different electronic effects could also influence the distinct pharmacological profiles of complexes **1** and **2**. In addition, **1** contains a water molecule in the metal coordination sphere while **2** contains a chloride ion. Finally, coordination could in principle alter the bioavailability of the two hydrazones in different manners. The above-mentioned results suggest that further studies on the anti-inflammatory properties of this class of compounds and their zinc(II) complexes should be carried out in order to investigate their mechanism of action

### Acknowledgements

The authors are grateful to CNPq, INCT-INOVAR (CNPq proc.573.364/2008-6), FAPESP (Brazil) and to CONICET (Argentina) for financial support. O. E. P. is a Research Fellow of CONICET, Argentina.

### Supplementary Material

CCDC 805145 contains the supplementary crystallographic data for salicylaldehyde 2-chlorobenzoyl hydrazone (H<sub>2</sub>Lassbio-466). This data can be obtained free of charge via <http://www.ccdc.cam.ac.uk/conts/retrieving.html>, or from the Cambridge Crystallographic Data Centre, 12 Union Road, Cambridge CB2 1EZ, UK; fax: (+44) 1223-336-033; or e-mail: [deposit@ccdc.cam.ac.uk](mailto:deposit@ccdc.cam.ac.uk).

### References

1. Yong, V.W. Inflammation in neurological disorders: A help or a hindrance? *Neuroscientist* **2010**, *16*, 408-420.
2. Kominsky, D.J.; Campbell, E.L.; Colgan, S.P. Metabolic shifts in immunity and inflammation. *J. Immunol.* **2010**, *184*, 4062-4068.
3. Grivennikov, S.I.; Greten, F.R.; Karin, M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* **2010**, *140*, 883-899.
4. Tapiero, H.; Tew, K.D. Trace elements in human physiology and pathology: Zinc and metallothioneins. *Biomed. Pharmacother.* **2003**, *57*, 399-411.
5. Szewczyk, B.; Kubera, M.; Nowak, G. The role of zinc in neurodegenerative inflammatory pathways in depression. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry* **2011**, *35*, 693-701.
6. Zaleski, P.D.; Truong-Tran, A.Q.; Grosser, D.; Jayaram, L.; Murgia, C.; Ruffin, R.E. Zinc metabolism in airway epithelium and airway inflammation: basic mechanism and clinical targets. A review. *Pharmacol. Ther.* **2005**, *105*, 127-149.
7. Parrilha, G.L.; Vieira, R.P.; Rebolledo, A.P.; Mendes, I.C.; Lima, L.M.; Barreiro, E.J.; Piro, O.E.; Castellano, E.E.; Beraldo, H. Binuclear zinc(II) complexes with the anti-inflammatory

- compounds salicylaldehyde semicarbazone and salicylaldehyde-4-chlorobenzoyl hydrazone. *Polyhedron* **2011**, *30*, 1891-1898 and references therein.
8. Johnson, C.K. *ORTEP; Report ORNL-3794*; Oak Ridge National Laboratory: Tennessee, 1965.
  9. Salavati-Niasari, M.; Amiri, A. Synthesis and characterization of alumina-supported Mn(II), Co(II), Ni(II) and Cu(II) complexes of bis(salicylaldiminato)hydrazone as catalysts for oxidation of cyclohexene with tert-butylhydroperoxide. *Appl. Catal. A Gen.* **2005**, *290*, 46-53.
  10. Despaigne, A.A.R.; Da Silva, J.G.; Do Carmo, A.C.M.; Sives, F.; Piro, O.E.; Castellano, E.E.; Beraldo, H. Copper(II) and zinc(II) complexes with 2-formylpyridine-derived hydrazones. *Polyhedron* **2009**, *28*, 3797-3803.
  11. Despaigne, A.A.R.; Vieira, L.F.; Mendes, I.C.; Da Costa, F.B.; Speziali, N.L.; Beraldo, H. Organotin(IV) complexes with 2-acetylpyridine benzoyl hydrazones: Antimicrobial activity. *J. Braz. Chem. Soc.* **2010**, *21*, 1247-1257.
  12. Despaigne, A.A.R.; Da Silva, J.G.; Do Carmo, A.C.M.; Piro, O.E.; Castellano, E.E.; Beraldo, H. Structural studies on zinc(II) complexes with 2-benzoylpyridine-derived hydrazones. *Inorg. Chim. Acta* **2009**, *362*, 2117-2122.
  13. Despaigne, A.A.R.; Da Silva, J.G.; Do Carmo, A.C.M.; Piro, O.E.; Castellano, E.E.; Beraldo, H. Copper(II) and zinc(II) complexes with 2-benzoylpyridine-methyl hydrazone. *J. Mol. Struct.* **2009**, *920*, 97-102.
  14. Coolier, H.O.J.; Dinneen, L.C.; Johnson, C.A.; Schneider, C. Abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. *Brit. J. Pharmacol.* **1968**, *32*, 295-310.
  15. Hunskar, S.; Hole, K. The formalin test in mice: Dissociation between inflammatory and noninflammatory pain. *Pain* **1987**, *30*, 103-114.
  16. Eddy, N.B.; Leimbach, D. Synthetic analgesics. II. Dithienylbutenylamines and dithienylbutylamines. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1953**, *107*, 385-393.
  17. Doherty, N.S.; Poubelle, P.; Borgeat, P.; Beaver, T.H.; Westrich, G.L.; Schrader, N.L. Intraperitoneal injection of zymosan in mice induces pain, inflammation and the synthesis of peptidoleukotrienes and prostaglandin E<sub>2</sub>. *Prostaglandins* **1985**, *30*, 769-789.
  18. Da Silva, Y.K.C.; Augusto, C.V.; Barbosa, M.L.C.; Melo, G.M.A.; De Queiroz, A.C.; Dias, T.L.M.F.; Bispo, W., Jr.; Barreiro, E.J.; Lima, L.M.; Alexandre-Moreira, M.S. Synthesis and pharmacological evaluation of pyrazine *N*-acylhydrazone derivatives designed as novel analgesic and anti-inflammatory drug candidates. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 5007-5015.
  19. Dutta, M.M.; Goswami, B.N.; Katakya, J.C.S. Studies on biologically-active heterocycles. III. Synthesis and antibacterial activity of some 2-aryl/arakyl-3-substituted-4-thiazolidinones. *J. Indian Chem. Soc.* **1990**, *67*, 332-334.
  20. Ainscough, E.W.; Brodie, A.M.; Denny, W.A.; Finlay, G.J.; Gothe, S.A.; Ranford, J.D. Cytotoxicity of salicylaldehyde benzoylhydrazone analogs and their transition metal complexes: quantitative structure-activity relationships. *J. Inorg. Biochem.* **1999**, *77*, 125-133.
  21. Enraf-Nonius. *COLLECT*; Nonius BV: Delft, The Netherlands, 1997-2000.
  22. Otwinowski, Z.; Minor, W. *Methods in Enzymology*; Carter, C.W., Jr., Sweet, R.M., Eds.; Academic Press: New York, NY, USA, 1997; pp. 307-326.
  23. Sheldrick, G.M. *SHELXS-97. Program for Crystal Structure Resolution*; University of Göttingen: Göttingen, Germany 1997.

24. Sheldrick, G.M. *SHELXL-97. Program for Crystal Structures Analysis*; University of Göttingen: Göttingen, Germany 1997.

*Sample Availability:* Samples of the compounds H<sub>2</sub>LASSBio-466, H<sub>2</sub>LASSBio-1064 and complexes [Zn(LASSBio-466)H<sub>2</sub>O]<sub>2</sub> (**1**) and [Zn(HLASSBio-1064)Cl]<sub>2</sub> (**2**) are available from the authors.

© 2011 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

Article

## Design, Synthesis, Antinociceptive and Anti-Inflammatory Activities of Novel Piroxicam Analogues

Amanda Silva de Miranda <sup>1,2</sup>, Walfrido Bispo Júnior <sup>3,4</sup>, Yolanda Karla Cupertino da Silva <sup>3,4</sup>, Magna Suzana Alexandre-Moreira <sup>3,4</sup>, Rosane de Paula Castro <sup>5</sup>, José Ricardo Sabino <sup>5</sup>, Luciano Morais Lião <sup>6</sup>, Lídia Moreira Lima <sup>1,2</sup> and Eliezer J. Barreiro <sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup> LASSBio® – Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, P.O. Box 68024, 21944-971, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

<sup>2</sup> Pós-graduação em Química, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 21941-909, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

<sup>3</sup> LaFI – Laboratório de Farmacologia e Imunidade, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Alagoas, 57072-970, Maceió, AL, Brazil

<sup>4</sup> RENORBIO, Rede Nordeste de Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas, 57072-970, Maceió, AL, Brazil

<sup>5</sup> Instituto de Física, Universidade Federal de Goiás, 74001-970, Goiânia, GO, Brazil

<sup>6</sup> Instituto de Química, Universidade Federal de Goiás, 74001-970, Goiânia, GO, Brazil

\* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mails: ejbarreiro@ccsdecania.ufrj.br and/or lidia@pharma.ufrj.br; Tel.: +55-2125626478/+55-2125626644.

Received: 6 November 2012; in revised form: 19 November 2012 / Accepted: 20 November 2012 / Published: 28 November 2012

---

**Abstract:** In this paper we report the design, synthesis, antinociceptive and anti-inflammatory activities of a series of benzothiazine *N*-acylhydrazones **14a–h**, planned by structural modification of piroxicam (**1**), a non steroidal anti-inflammatory drug. Among the synthesized analogues, compounds **14f** (LASSBio-1637) and **14g** (LASSBio-1639) were identified as novel antinociceptive and anti-inflammatory prototypes, active by oral administration, acting by a mechanism of action that seems to be different from that of piroxicam, since they were inactive as an inhibitor of cyclooxygenase (COX-1 and COX-2) at concentrations of 10 µM.

**Keywords:** piroxicam; inflammation; pain; acylhydrazone; NSAID; COX

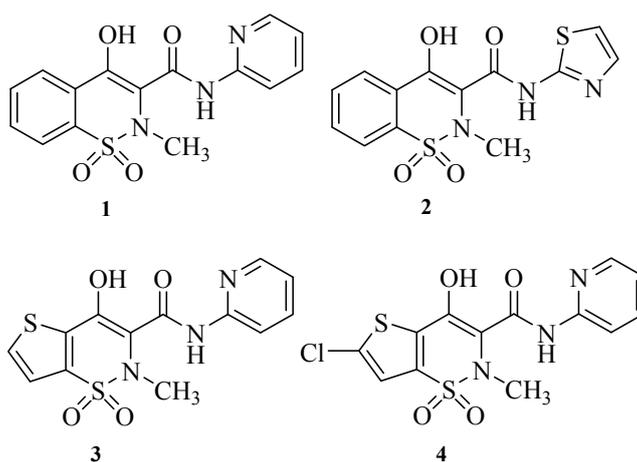
---

## 1. Introduction

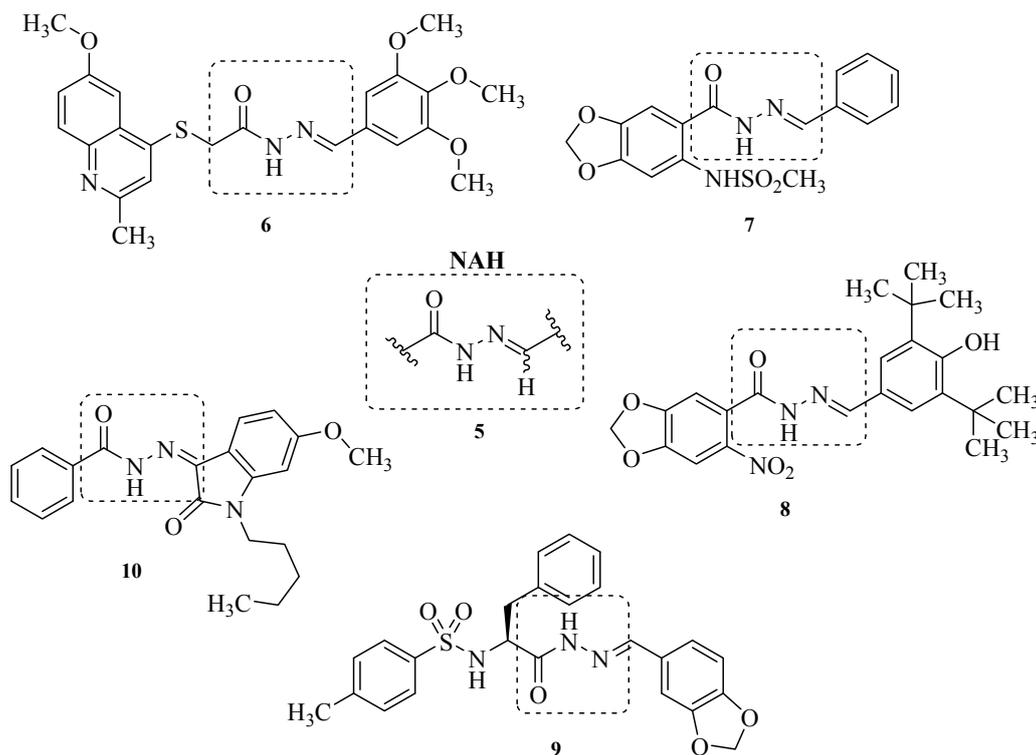
Inflammation is an adaptive response triggered by trauma, tissue injury or infection, characterized by symptoms such as pain, redness, heat and swelling. Acute inflammation is mediated mainly by the release of prostaglandins and other pro-inflammatory mediators, like leukotrienes, bradykinin and histamine, which promote local vascular alterations and leukocyte recruitment and activation. This process is normally self limited and resolution occurs with elimination of the noxious stimuli, removal of inflammatory cells and tissue repair. However, under certain conditions the inflammatory process persists, leading to a chronic inflammatory process, which additionally involves interleukins, tumor necrosis  $\alpha$ , interferons, among other mediators, and underlines a variety of chronic diseases, such as cancer, atherosclerosis and reumathoid arthritis [1–3]. Currently drug management of inflammation includes non steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), glucocorticoids, slow-acting disease-modifying anti-rheumatic drugs (DMARDs), immunosuppressants and biologics that specifically target inflammatory cytokines [3].

Piroxicam (4-hydroxy-2-methyl-2*H*-1,2-benzothiazine-1-(*N*-(2-pyridinyl)carboxamide)-1,1-dioxide), (**1**) [4] is a NSAID discovered in 1972 and introduced in the market by Pfizer in 1982, being the first drug of the “oxicam” class [5], to which meloxicam (**2**) [6], tenoxicam (**3**) [7] and lornoxicam (**4**) [8] (Figure 1) also belong. Piroxicam is a long half-life drug (45 h in humans) [9] which also possess analgesic and antipyretic properties and has been used in the management of chronic inflammatory diseases [10], such as rheumatoid arthritis and osteoarthritis, for almost 30 years. Like other NSAIDs, the therapeutic effects of piroxicam have been attributed to its ability to inhibit cyclooxygenase (COX), [11,12] a key enzyme in the biosynthesis of pro-inflammatory prostanoids, such as prostaglandins.

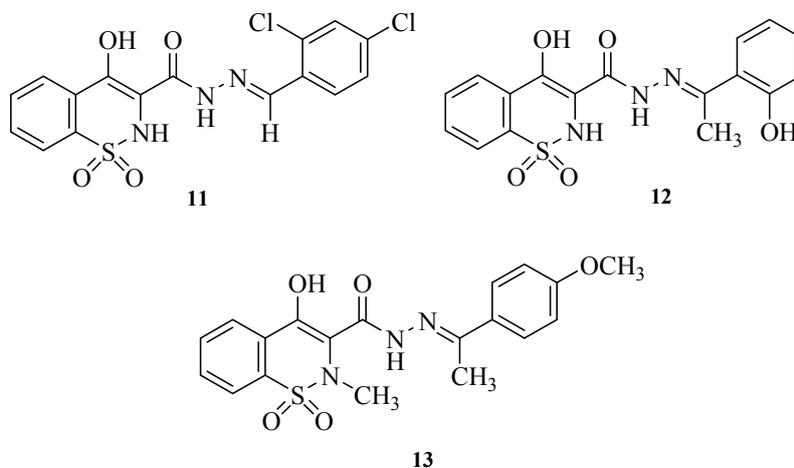
**Figure 1.** Oxicam class drugs.



The *N*-acylhydrazone (NAH; **5**) framework has recently been recognized as a privileged structure [13–15] and several NAH derivatives (Figure 2) have been reported with different pharmacological activities, such as PDE inhibitors **6** [16] COX inhibitors **7** [17], TRPV1 antagonists **8** [18], HIV-1 capsid protein assembly inhibitors **9** [19], and CB2 inverse agonists **10** [20], among others. Moreover, many *N*-acylhydrazones were described by our research group as potent anti-inflammatory and antinociceptive compounds [21], which have been attributed to the NAH framework’s ability to mimic amide group and the bis-allylic moiety of unsaturated fatty acids, such as arachidonic acid [22,23].

**Figure 2.** *N*-acylhydrazones derivatives with different activities.

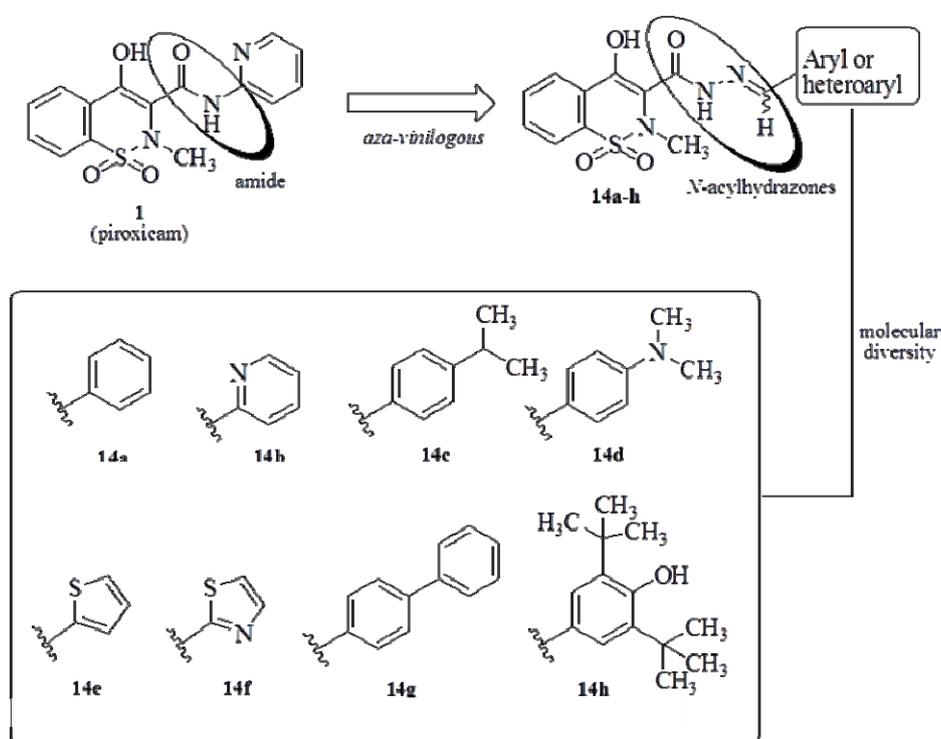
Very recently, some antioxidant and antimicrobial *N*-acylhydrazones bearing a 4-hydroxy-1,2-benzothiazine-1,1-dioxide scaffold were reported [24–26] (Figure 3). Nevertheless, to the best of our knowledge, the antinociceptive and anti-inflammatory potential of this molecular pattern has not been investigated. Besides, some structural features that seems to be related to the oxicams' anti-inflammatory activity, such as heteroaromatic amide subunit [4,27], have not been fully explored in these previous works.

**Figure 3.** Antioxidant and antimicrobial *N*-acylhydrazones bearing a 4-hydroxy-1,2-benzothiazine-1,1-dioxide scaffold.

In this paper, we report the design, synthesis and pharmacological evaluation of a novel series of antinociceptive and anti-inflammatory *N*-acylhydrazones derivatives (all compounds are original, with the exception of **14a**, which was first published by Zia-ur-Rehman *et al.* [24]). Target compounds **14a–h**

were designed (Figure 4) to include a 4-hydroxy-1,2-benzothiazine-1,1-dioxide scaffold, a pharmacophore present in oxicam drugs, such as piroxicam, and the NAH framework, a privileged structure which is also encountered in many anti-inflammatory compounds [21]. The nature of the aryl and heteroaryl groups attached to the imine subunit was varied based on ring isosteric replacement to give **14a–f**. In addition, we have synthesized compound **14g**, which bears a biphenyl group, a pharmacophore found in some recently reported mPGES-1 inhibitors [28] and also considered a privileged structure [13,14]. In order to confer antioxidant and radical scavenging properties we designed compound **14h**, featuring a 3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxyphenyl group, a subunit found in many dual cyclooxygenase/5-lipoxygenase (COX/5-LOX) inhibitors [29].

**Figure 4.** Design of a novel series of analgesic and anti-inflammatory benzothiazine *N*-acylhydrazones.

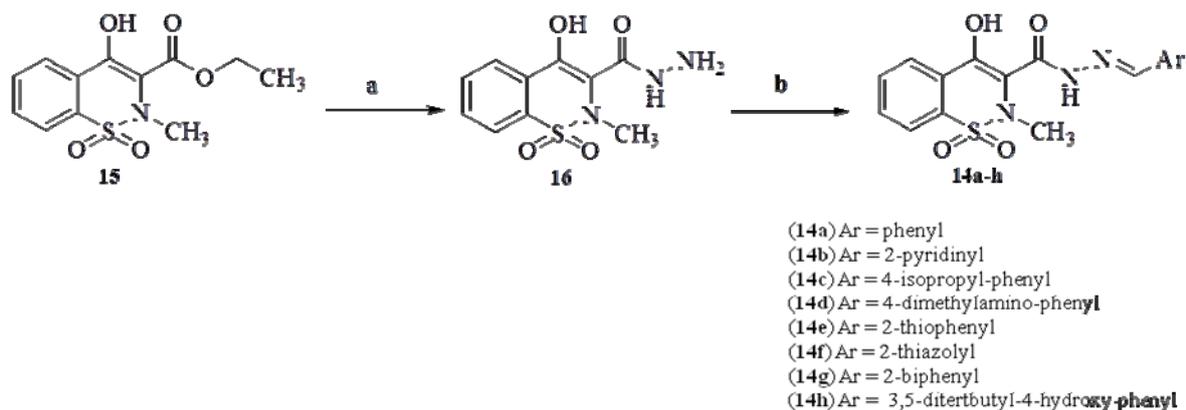


## 2. Results and Discussion

### 2.1. Chemistry

*N*-acylhydrazones **14a–h** were synthesized from commercial available ethyl 4-hydroxy-2*H*-1,2-benzothiazine-3-carboxylate 1,1-dioxide [30] (**15**) in two steps, as depicted in Scheme 1. The key intermediate **16** was obtained in 68% yield by treating an ethanolic solution of **15** with 98% hydrazine monohydrate for 2 h under reflux [31]. Finally, condensation of **15** with appropriate aromatic and heteroaromatic aldehydes at room temperature, under acid catalysis [31], provided the target compounds **14a–h** in 48–63% overall yield.

Scheme 1. Synthesis of compounds 14a–h.



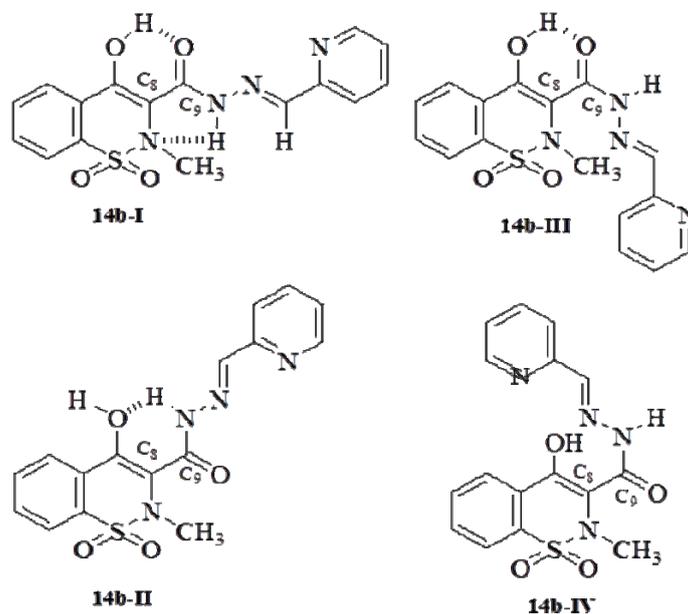
Reagents and conditions: (a)  $\text{NH}_2\text{NH}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  98%, ethanol, reflux, 2h, 68%; (b) ArCHO, ethanol, HCl cat., r.t., 30–50 min, 48–63% (overall yield).

The novel *N*-acylhydrazone derivatives **14a–h** were fully characterized by spectroscopic methods, such as IR,  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$ -NMR, their purities were established by HPLC and determined by elemental analysis (CHN). Their molecular formulae were confirmed by mass spectroscopy (ESI-MS). All compounds were obtained as a single tautomer, which was found to be the enolic form, as indicated by signals at  $\delta$  8.52–8.85 (N=C-H), 11.65–12.23 (CONH) and  $\delta$  13.93–14.42 ppm (O-H) in the  $^1\text{H}$ -NMR spectra in  $\text{DMSO}-d_6$  and by signals at  $\delta$  110.56–111.23 (C=C-OH), 144.70–152.42 (C=N), 157.56–163.76 (C-OH) and 164.51–165.98 ppm (C=O) in the  $^{13}\text{C}$ -NMR spectra recorded in the same solvent. The predominance of enolic tautomer is in agreement with recently published data [24–26]. Besides, the presence of only one peak in HPLC chromatogram and a single imine-hydrogen signal in the  $^1\text{H}$ -NMR spectra suggest that condensation reaction was diastereoselective. Carefully comparison of amide and imine hydrogens chemical shift of compounds **14a–h** with previous published NMR data for *N*-acylhydrazones whose stereochemistry had been established by crystallography [17,32,33] suggested the presence of the *E*-diastereoisomer, which was confirmed by performing a NOE experiment on compound **14b**. Thus, on irradiating at the frequency of the amide hydrogen (CONH) in **14b**, a positive NOE was observed for the signal at  $\delta$  8.71 ppm, assigned to imine hydrogen (C=N-H), and a positive NOE was also observed for the signal at  $\delta$  2.89 ppm ( $\text{CH}_3$ ) on irradiating imine hydrogen (N=C-H), thus indicating the *E*-configuration for C=N double bond. The predominance of the *E* diastereoisomer of *N*-acylhydrazone derivatives is consistent with previous works [17,31–37] and has been ascribed to the greater thermodynamic stability of the *E* in respect to the *Z* diastereoisomer [36,38].

In addition, an intense NOE observed for amide hydrogen on irradiating the methyl hydrogens suggests that a close flat conformation, featuring an *S*-cis conformation for C8-C9 bond and amide hydrogen antiperiplanar to carbonyl oxygen (**14b-I**), predominates over an open or folded conformation, featuring an *S*-trans C8-C9 bond (**14b-II**) or an amide hydrogen antiperiplanar to carbonyl oxygen (**14b-III**) or both (**14b-IV**) (Figure 5). The predominance of conformer **14b-I** is likely to be due to additional stability provided by hydrogen bonds between the enolic and carboxyl groups and amide hydrogen and benzothiazine nitrogen lone electron pair (Figure 5). These results are in agreement with

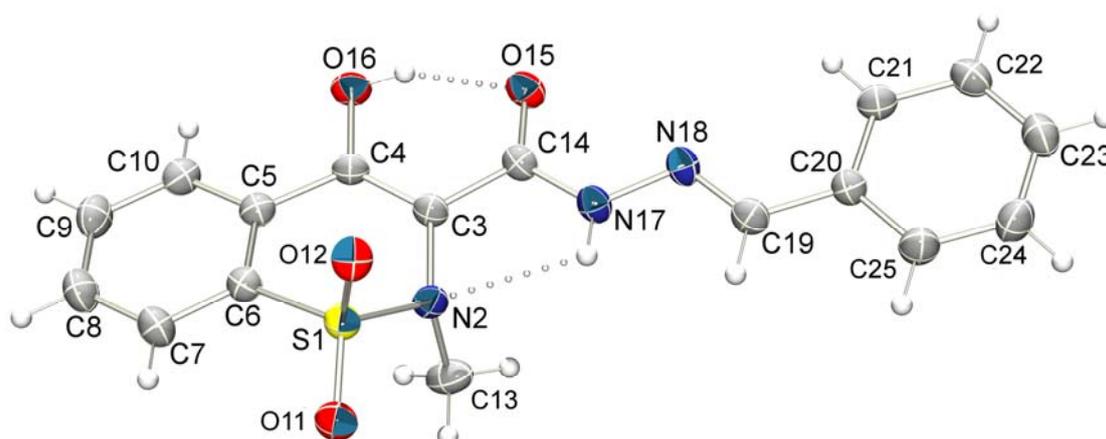
previous works [24,32] and are likely to reflect also the stereochemical and conformational features of the other compounds of the series.

**Figure 5.** Possibles conformations of compound **14b** (LASSBio-1617).



In order to confirm the results mentioned above and to determine unambiguously the relative configuration of compounds **14a–h**, the single crystal of compound **14a** (LASSBio-1606) was obtained for X-ray diffraction. The ORTEP [39] view of compound **14a** is shown in Figure 6. Crystallographic analysis confirmed the *E* configuration and revealed a flat conformation, described by the least squares plane through the atoms N2/C3/C4/O16/O15/C14/N17 with mean deviation from the plane of 0.07 Å, featuring the intra-molecular hydrogen bonds involving N17—H...N2 and O16—H...O15, with donor-acceptor distances 2.723(3) Å and 2.541(3) Å, respectively, corroborating the conclusions suggested by NOE experiment performed with **14b**.

**Figure 6.** ORTEP view of compound **14a** (LASSBio-1606) with atom displacement ellipsoids drawn at 30% probability.



## 2.2. Pharmacology

Compounds **14a–h** were evaluated *in vivo* for their antinociceptive and anti-inflammatory activities at the screening dose of 100  $\mu\text{mol/kg}$ . All compounds were administered orally and piroxicam was used as standard drug, except in the hot plate test, for which morphine was used instead. The antinociceptive activity of compounds **14a–h** was initially evaluated employing the acetic acid-induced abdominal writhing model in mice [40]. As shown in Table 1, all derivatives produced marked inhibition of the acetic acid-induced writhing response. Compound **14e** (LASSBio-1604) (90.4%), which bears a 2-thiophenyl group, the biphenyl analogue **14g** (LASSBio-1638) (84.0%) and **14h**, featuring a 3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxyphenyl group (LASSBio-1639) (82.4%), were found to be the most active compounds and showed an antinociceptive effect similar to that of piroxicam (95.4%) at 100  $\mu\text{mol/kg}$ .

**Table 1.** Effect of compounds **14a–h** and piroxicam (100  $\mu\text{mol/kg}$ , p. o.) on acetic acid-induced writhing test in mice.

Compound	Writhing Number <sup>a</sup>	% of Inhibition
Control	39.4 $\pm$ 4.9	-
Piroxicam	1.8 $\pm$ 0.6 **	95.4%
<b>14a</b> (LASSBio-1606)	9.4 $\pm$ 1.6 *	76.1%
<b>14b</b> (LASSBio-1617)	16.3 $\pm$ 2.5 *	58.6%
<b>14c</b> (LASSBio-1605)	9.8 $\pm$ 5.1 *	75.1%
<b>14d</b> (LASSBio-1607)	16.6 $\pm$ 2.9 **	57.9%
<b>14e</b> (LASSBio-1604)	3.8 $\pm$ 1.7 **	90.4%
<b>14f</b> (LASSBio-1637)	14.7 $\pm$ 2.6 **	62.7%
<b>14g</b> (LASSBio-1638)	6.3 $\pm$ 1.5 **	84.0%
<b>14h</b> (LASSBio-1639)	6.8 $\pm$ 2.3 **	82.7%

<sup>a</sup> The readings represent the mean  $\pm$  S.E.M. The asterisks denote the significance levels in comparison with control groups (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ ).

A dose-response curve was obtained for derivatives **14e**, **14g** and **14h** (Table 2). Considering that compounds **14b** (LASSBio-1617) and **14f** (LASSBio-1637) present the major structural similarity to the standard drug piroxicam, they were also selected for the dose-response study. Compounds **14b** and **14e–h** produced dose-related inhibition of acetic acid-induced abdominal constrictions in mice and their  $\text{ID}_{50}$  and maximum efficacy are summarized in Table 2.

**Table 2.** Maximum efficacy and  $\text{ID}_{50}$  values of compound **14b**, **14e–h** and piroxicam on acetic acid-induced writhing test in mice.

Compound	$\text{ID}_{50}$ ( $\mu\text{mol/kg}$ )	Maximum efficacy
piroxicam	0.40 (0.0013–115.6)	95.4%
<b>14b</b> (LASSBio-1617)	115.6 (0.17–808.30)	86.00%
<b>14e</b> (LASSBio-1604)	28.57 (6.29–49.61)	90.30%
<b>14f</b> (LASSBio-1637)	17.19 (0.189–156.1)	84.77%
<b>14g</b> (LASSBio-1638)	14.07 (1.06–187.3)	80.20%
<b>14h</b> (LASSBio-1639)	2.87 (0.06–130.5)	88.83%

None of the NAH derivatives were found to be more potent than piroxicam ( $ID_{50} = 0.40 \mu\text{mol/kg}$ ) in the acetic acid-induced writhing test, since the most potent antinociceptive in this series was **14h** (LASSBio-1639,  $ID_{50}$  of  $2.87 \mu\text{mol/kg}$ ). Nevertheless, all compounds showed maximum efficacy in the 80–90% range, like the standard drug piroxicam (95.4%). In order to better understand the antinociceptive effect showed by NAH derivatives, the formalin-induced pain test in mice [41] was carried out (Table 3). Formalin is known to produce a biphasic pain behavior. The first transient phase, or neurogenic phase, is ascribed to the direct effect of formalin on sensory C fibers, and the second prolonged phase, also called inflammatory phase, is associated to the development of an inflammatory response and the release of analgesic mediators [41–43]. With the exception of compound **14b** (58%), none of NAH derivatives were shown to be active in the neurogenic phase of the formalin test (data not shown). On the other hand, at  $100 \mu\text{mol/kg}$ , compounds **14b**, **14e–h** were able to inhibit the pain response in the inflammatory phase, with compounds **14f** (LASSBio-1637; 60.1%) and **14g** (LASSBio-1638; 54.2%), which presented similar antinociceptive effect than piroxicam (53.9%) standing out. Their lack of effect in the neurogenic phase and expressive inhibition of the inflammatory phase of the formalin test, comparable with the response of piroxicam and NSAIDs in general, suggest that these new NAH derivatives are likely to produce their antinociceptive effect by acting on the inflammatory process.

**Table 3.** Effect of piroxicam NAH analogues (**14a–h**) and piroxicam ( $100 \mu\text{mol/kg}$ , p.o.) on formalin-induced pain test in mice.

Compound	Phase 1	Phase 2	% of inhibition Phase 2
Control	$50.9 \pm 5.8$	$194.0 \pm 10.5$	-
Piroxicam	$50.0 \pm 5.8$	$89.3 \pm 22.8^{**}$	53.9%
<b>14a</b> (LASSBio-1606)	$49.6 \pm 11.2$	$172.5 \pm 25.9$	11.1%
<b>14b</b> (LASSBio-1617)	$21.3 \pm 5.2^*$	$119.6 \pm 23.9^*$	38.4%
<b>14c</b> (LASSBio-1605)	$36.1 \pm 6.2$	$176.3 \pm 21.9$	9.1%
<b>14d</b> (LASSBio-1607)	$38.8 \pm 8.8$	$161.4 \pm 27.9$	16.8%
<b>14e</b> (LASSBio-1604)	$49.6 \pm 10.7$	$131.0 \pm 13.1^{**}$	32.5%
<b>14f</b> (LASSBio-1637)	$50.3 \pm 10.6$	$77.5 \pm 16.7^*$	60.1%
<b>14g</b> (LASSBio-1638)	$56.6 \pm 10.5$	$88.8 \pm 18.5^{**}$	54.2%
<b>14h</b> (LASSBio-1639)	$54.8 \pm 5.7$	$140.7 \pm 13.9^*$	27.5%

The readings represent the mean  $\pm$  S.E.M. The asterisks denote the significance levels in comparison with control groups (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ ).

In order to determine any eventual central antinociceptive activity for compounds **14a–h**, the hot plate test [31] was carried out in mice. This test is used to evaluate antinociceptive activity mediated by a central mechanism and it is selective for opioid drugs, although sensitive to some sedatives, hypnotics and muscle relaxants [44–47]. None of NAH derivatives were found to be active in this test (data not shown), even **14b** (LASSBio-1617), which produced a weak inhibition of pain response in the neurogenic phase of formaline test. Piroxicam was also inactive, as expected. These results reinforce that compounds **14a–h** do not have any central effect and that their antinociceptive effect is mediated peripherically, thus confirming the results found in the formalin-induced pain test. To

confirm the anti-inflammatory profile of NAH derivatives, as suggested by the results obtained in the formalin test, zymosan A [48,49] and carrageenan-induced peritonitis test in mice [50] were performed. As shown in Table 4, all NAH derivatives significantly inhibited cell recruitment in the zymosan-induced peritonitis test and, with exception of **14e** (37.1%) and **14a** (43.7%), all compounds were found to be similar or more active than piroxicam (57.4%) at the dose of 100  $\mu\text{mol/kg}$ , highlighting compounds **14g** (LASSBio-1638) and **14h** (LASSBio-1639), which inhibited 81.3% and 82.6% of cell migration, respectively.

**Table 4.** Effect of piroxicam NAH analogues and piroxicam (100  $\mu\text{mol/kg}$ , p.o.) on zymosan-induced peritonitis in mice.

Compound	Cell Number X $10^6/\text{mL}$	% of inhibition
Control	$38.0 \pm 1.0$	-
Piroxicam	$16.2 \pm 1.1$ **	57.4%
<b>14a</b> (LASSBio-1606)	$21.4 \pm 2.4$ *	43.7%
<b>14b</b> (LASSBio-1617)	$9.9 \pm 0.7$ **	73.9%
<b>14c</b> (LASSBio-1605)	$16.5 \pm 3.7$ **	56.6%
<b>14d</b> (LASSBio-1607)	$10.6 \pm 0.4$ **	72.1%
<b>14e</b> (LASSBio-1604)	$23.9 \pm 1.7$ **	37.1%
<b>14f</b> (LASSBio-1637)	$8.1 \pm 1.8$ **	78.7%
<b>14g</b> (LASSBio-1638)	$7.1 \pm 0.6$ **	81.3%
<b>14h</b> (LASSBio-1639)	$6.6 \pm 1.3$ **	82.6%

The readings represent the mean  $\pm$  S.E.M. The asterisks denote the significance levels in comparison with control groups (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ ).

In the carrageenan-induced peritonitis test (Table 5) all NAH derivatives were able to inhibit cell migration similarly or more effectively than piroxicam (25.8%), including **14c** (LASSBio-1605; 62.2%), **14a** (LASSBio-1606; 57.4%) and **14d** (LASSBio-1607; 42.3%), which were not active in the second phase of formalin-induced pain test.

**Table 5.** Effect of piroxicam NAH analogues and piroxicam (100  $\mu\text{mol/kg}$ , p.o.; mean  $\pm$  S.E.M.) on carrageenan-induced peritonitis in mice.

Compound	Cell Number X $10^6/\text{mL}$	% of inhibition
Control	$20.9 \pm 1.6$ **	-
Piroxicam	$15.5 \pm 0.3$ **	25.8%
<b>14a</b> (LASSBio-1606)	$8.9 \pm 0.5$ **	57.4%
<b>14b</b> (LASSBio-1617)	$16.2 \pm 0.7$ **	22.5%
<b>14c</b> (LASSBio-1605)	$7.9 \pm 0.8$ **	62.2%
<b>14d</b> (LASSBio-1607)	$12.0 \pm 1.5$ **	42.6%
<b>14e</b> (LASSBio-1604)	$5.4 \pm 0.6$ **	74.2%
<b>14f</b> (LASSBio-1637)	$5.6 \pm 0.5$ **	73.2%
<b>14g</b> (LASSBio-1638)	$4.7 \pm 0.7$ **	77.5%
<b>14h</b> (LASSBio-1639)	$3.8 \pm 0.6$ **	81.8%

The asterisks denote the significance levels in comparison with control groups (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ ).

LASSBio-1639 (**14h**) and LASSBio-1638 (**14g**) were the most active compounds, inhibiting 81.8% and 77.5% of cell migration, respectively, followed by LASSBio-1604 (**14e**), which, despite being the least active compound in zymosan-induced peritonitis test, showed inhibition of 74.2% in carrageenan-induced peritonitis test.

In order to investigate if the anti-inflammatory effect of NAH derivatives were COX inhibition-dependent, like piroxicam, compounds **14b** and **14f** were selected for *in vitro* assay for their ability of inhibiting COX-1 and COX-2 isoforms [51]. Despite their antinociceptive and anti-inflammatory activities, *in vivo*, none of the compounds were able to inhibit COX at concentration of 10  $\mu\text{M}$ , suggesting that they may act in a different way than NSAIDs (data not shown) or would be significantly less potent than the prototype piroxicam.

### 3. Experimental

#### 3.1. General

Reagents and solvents were obtained from commercial sources (Sigma-Aldrich, Alfa Aesar) and used as received. Reaction progress was monitored by thin-layer chromatography (TLC) on commercial silica gel plates (KieselGel 60 F245 on aluminum sheets, Merck) and visualized by UV-light (254 and 365 nm). Column chromatography purifications were carried out using silica gel Merck 230–400 Mesh. Melting points were determined on a Quimis Q240.23 apparatus and are uncorrected.  $^1\text{H}$ - and  $^{13}\text{C}$ - nuclear magnetic resonance spectra were recorded in DMSO- $d_6$  solutions on a Bruker Avance 200 MHz or on a Varian 400 MHz instrument. Chemical shift ( $\delta$ ) are given in parts per million (ppm) down field from tetramethylsilane (TMS) and couple constants ( $J$ ) are given in Hertz (Hz); splitting patterns are reported as follows: s, singlet; d, doublet; dd, doublet of doublets; ddd, doublet of doublets of doublets; t, triplet; q, quartet; m, multiplet; br, broad. Electrospray ionization mass spectra (ESI-MS) were acquired using a Micromass quadrupole-time-of-flight (QTOF) spectrometer operating in a positive mode. Infrared (IR) spectra were performed in bromide potassium (KBr) disks on Nicoletta Magna IR 760 spectrometer. HPLC analysis were performed on a Shimadzu 20A using a C18 column (4,6 mm  $\times$  250 mm, 5  $\mu\text{M}$ ) eluted with MeCN/H $_2$ O (90:10;70:30 or 45:55) over 15 or 20 min at flow rate of 1 mL $\cdot\text{min}^{-1}$ , with UV detection at 254 nm.

*4-Hydroxy-2-methyl-2H-1,2-benzothiazine-3-carbohydrazide 1,1-dioxide* (**16**). A mixture of compound **15** (2.000 g, 7.06 mmol), and hydrazine hydrate 80% (6.8 mL, 137.4 mmol) in ethanol (40,0 mL) was stirred under reflux for 2h, when completion of reaction was indicated by TLC. The mixture was partially concentrated under vacuum, followed by addition of water and HCl 37% until precipitation. The solid was filtered and washed with water and cold ethanol to furnish compound **22** (1.256 g, 68%), which had the following properties: Mp 198–199  $^{\circ}\text{C}$ ;  $R_f$  = 0.40 (CH $_2$ Cl $_2$ /MeOH, 9:1). IR (KBr): 3335, 3282, 1621, 1344, 1041  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$ -NMR (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 2.74 (s, 3H, CH $_3$ ), 7.85–7.91 (m, 3H, ArH), 8.00–7.95 (m, 1H, ArH), 10.15 ppm (br, 1H, CONH).  $^{13}\text{C}$ -NMR (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 110.97, 124.49, 126.44, 128.94, 132.92, 133.85, 134.59, 155.87, 166.44. ESI-HRMS  $m/z$  = 270.04543  $[\text{M}+\text{H}]^+$ . Anal. calcd for C $_{10}$ H $_{11}$ N $_3$ O $_4$ S: C 44.60, H 4.12, N 15.60; found: C 44.62, H 4.11, N 15.44.

General Procedure for Preparation of Compounds **14a–h**

A mixture of compound **16** (0.37 mmol) and the corresponding aromatic or heteroaromatic aldehydes (0.37 mmol) in absolute ethanol (10 mL) containing one drop of 37% hydrochloric acid was stirred at room temperature for ca 30 min, until reaction completion (as indicated by TLC). Then the mixture was poured in cold water and filtered. The residue was washed with water and hot hexane and dried under vacuum to produce the desired *N*-acylhydrazone derivatives **14a–h**. When necessary, further purification was performed by silica gel column chromatography to give compounds **14a–h** with purity of over 98% by HPLC.

*4-Hydroxy-2-methyl-N'-[(E)-phenylmethylidene]-2H-1,2-benzothiazine-3-carbohydrazide 1,1-dioxide (14a)*. The title compound was obtained by condensation of **16** with benzaldehyde as a white powder (116 mg, 88%). Mp 223–224 °C;  $R_f = 0.71$  (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, 9:1). IR (KBr): 3281, 1638, 1618, 1341, 1181, 956 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 2.85 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 7.48–7.49 (m, 3H, ArH), 7.74 (d, *J* = 2 Hz, 2H, ArH), 7.90–7.92 (m, 3H, ArH), 8.02–8.05 (m, 1H, ArH), 8.68 (s, 1H, N=CH), 11.95 (s, 1H, CONH), 14.23 (br, 1H, OH). <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 111.14, 124.75, 126.79, 127.96, 128.32, 129.48, 131.18, 133.62, 134.10, 134.45, 134.76, 151.47, 158.10, 165.63. ESI-HRMS *m/z* = 358.0856 [M+H]<sup>+</sup>. Anal. calcd. For C<sub>17</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>S: C 57.13, H 4.23, N 11.76; found: C 57.25, H 4.24, N 11.44. HPLC (C18, acetonitrile-water, 7:3, 254 nm): ret. time: 5.868 min; peak area = 98,299%.

*4-Hydroxy-2-methyl-N'-[(E)-pyridinyl-2-methylidene]-2H-1,2-benzothiazine-3-carbohydrazide 1,1-dioxide (14b)*. The title compound was obtained by condensation of **16** with 2-pyridinecarboxaldehyde as a light yellow powder (90 mg, 71%). Mp 253–254 °C;  $R_f = 0.33$  (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, 9:1). IR (KBr): 3344, 1666, 1597, 1342, 1177, 962 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 2.85 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 7.44 (m, 1H, ArH), 7.85–7.88 (m, 1H, ArH), 7.89–7.90 (t, *J* = 4, 1H, ArH), 7.90–7.94 (m, 1H, ArH), 7.97 (d, *J* = 8, 1H, ArH), 8.02–8.05 (m, 1H, ArH), 8.64 (ddd, *J* = 8 Hz, *J* = 4 Hz, *J* = 2 Hz, 1H, ArH), 8.69 (s, 1H, N=CH), 12.14 (s, 1H, CONH), 14.09 (br, 1H, OH). <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 111.13, 120.81, 124.78, 125.35, 126.86, 128.23, 133.75, 134.14, 134.78, 137.53, 150.22, 151.40, 153.44, 158.47, 165.98; ESI-HRMS *m/z* = 359.0809 [M+H]<sup>+</sup>. Anal. calcd for C<sub>16</sub>H<sub>14</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>S: C 53.62, H 3.94, N 15.63; found: C 53.48, H 3.92, N 15.59. HPLC (C18, acetonitrile-water, 45:55, 254 nm): ret. time: 3.916 min; peak area = 98,484%.

*4-Hydroxy-2-methyl-N'-{(E)-[4-(2-propanyl)phenyl]phenylmethylidene}-2H-1,2-benzothiazine-3-carbohydrazide 1,1-dioxide (14c)*. The title compound was obtained by condensation of **16** with 4-isopropylbenzaldehyde as a white powder (131 mg, 89%). Mp 228–229 °C;  $R_f = 0.82$  (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, 9:1). IR (KBr): 3283, 1638, 1615, 1348, 1182, 958 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 1.23 (d, *J* = 6 Hz, 6H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2.84 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.96 (h, 1H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 7.36 (d, *J* = 8 Hz, 2H, ArH), 7.67 (d, *J* = 8 Hz, 2H, ArH), 7.91 (m, 3H, ArH), 8.02–8.06 (m, 1H, ArH), 8.64 (s, 1H, N=CH), 11.89 (s, 1H, CONH), 14.24 (br, 1H, OH). <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 24.17, 33.97, 111.14, 124.75, 126.77, 127.47, 128.09, 128.34, 132.14, 133.61, 134.12, 134.74, 151.51, 151.89, 158.01, 165.51. ESI-HRMS *m/z* = 400.1309 [M+H]<sup>+</sup>. Anal. calcd for C<sub>20</sub>H<sub>21</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>S: C 60.13, H 5.30, N 10.52; found: C 60.30, H 5.27, N 10.39. HPLC (C18, acetonitrile-water, 7:3, 254 nm): ret. time: 10.977 min; peak area = 98,127%.

*4-Hydroxy-2-methyl-N'-{(E)-[4-(dimethylamino) phenyl] phenylmethylidene}-2H-1,2-benzothiazine-3-carbohydrazide 1,1-dioxide (14d)*. The title compound was obtained by condensation of **16** with 4-dimethylaminobenzaldehyde as an orange powder (137 mg, 89%). Mp 217–218 °C;  $R_f = 0.70$  ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ , 9:1). IR (KBr): 3287, 1598, 1344, 1181, 956  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta = 2.83$  (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 2.99 (s, 6H,  $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ), 6.78 (d,  $J = 8$  Hz, 2H, ArH), 7.56 (d,  $J = 8$  Hz, 2H, ArH), 7.89–7.93 (m, 3H, ArH), 8.00–8.05 (m, 1H, ArH), 8.52 (s, 1H,  $\text{N}=\text{CH}$ ), 11.65 (s, 1H, CONH), 14.42 (br, 1H, OH);  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta = 111.22, 112.43, 121.67, 124.72, 126.65, 128.47, 129.42, 132.14, 133.42, 134.06, 134.68, 152.27, 152.37, 157.56, 164.90$ . ESI-HRMS  $m/z = 401.1276$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ . Anal. calcd. for  $\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_4\text{S}$ : C 56.99, H 5.03, N 13.99; found: C 56.69, H 5.03, N 13.99. HPLC (C18, acetonitrile-water, 7:3, 254 nm): ret. time: 4.420 min; peak area = 98,349%.

*4-Hydroxy-2-methyl-N'-[(E)-thiophenyl-2-methylidene]-2H-1,2-benzothiazine-3-carbohydrazide 1,1-dioxide (14e)*. The title compound was obtained by condensation of **16** with thiophenecarboxaldehyde as a white powder (124 mg, 92%). Mp 236–237 °C;  $R_f = 0.63$  ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ , 9:1). IR (KBr): 3267, 1636, 1614, 1338, 1181, 957  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta = 2.83$  (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 7.17 (t,  $J = 4$  Hz, 1H, ArH), 7.52 (d,  $J = 2$  Hz, 1H, ArH), 7.73 (d,  $J = 4$ , 1H, ArH), 7.90–7.97 (m, 3H, ArH), 8.01–8.06 (m, 1H, ArH), 8.84 (s, 1H,  $\text{N}=\text{CH}$ ), 11.91 (s, 1H, CONH), 14.16 ppm (br, 1H, OH);  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta = 111.12, 124.74, 126.77, 128.31, 128.59, 130.41, 132.53, 133.61, 134.12, 134.70, 139.11, 146.30, 157.98, 165.31$ ; ESI-HRMS  $m/z = 364.0417$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ . Anal. calcd. for  $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}_2$ : C 49.57, H 3.61, N 11.56; found: C 49.58, H 3.61, N 11.27. HPLC (C18, acetonitrile-water, 7:3, 254 nm): ret. time: 5.378 min; peak area = 98,866%.

*4-Hydroxy-2-methyl-N'-[(E)-1,3-thiazolyl-2-methylidene]-2H-1,2-benzothiazine-3-carbohydrazide 1,1-dioxide (14f)*. The title compound was obtained by condensation of **16** with 2-thiazolecarboxaldehyde (0.04 mL, 0.37 mmol) as a white powder (93 mg, 63%). Mp 224–225 °C;  $R_f = 0.36$  ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ , 9:1). IR (KBr) 3223, 1624, 1355, 1182, 948  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta = 2.85$  (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 7.89 (dd,  $J = 4$  Hz,  $J = 2$  Hz, 1H, ArH), 7.90–1.95 (m, 3H, ArH), 7.99 (d,  $J = 4$ , 1H, ArH), 8.03–8.05 (m, 1H, ArH), 8.85 (s, 1H,  $\text{N}=\text{CH}$ ), 12.23 (s, 1H, CONH), 13.93 (br, 1H, OH).  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta = 110.55, 122.63, 124.25, 125.35, 127.58, 133.28, 133.62, 134.18, 144.28, 144.70, 158.01, 163.76, 165.23$ . ESI-HRMS  $m/z = 365.0378$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ . Anal. calcd. for  $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{O}_4\text{S}_2$ : C 46.14, H 3.32, N 15.38; found C 46.03, H 3.39, N 15.42. HPLC (C18, acetonitrile-water, 45:55, 254 nm): ret. time: 11.831 min; peak area = 99,751%.

*4-Hydroxy-2-methyl-N'-[(E)-4-biphenylphenylmethylidene]-2H-1,2-benzothiazine-3-carbohydrazide 1,1-dioxide (14g)*. The title compound was obtained by condensation of **16** with 4-biphenylcarboxaldehyde as a light green powder (146 mg, 91%). Mp 215–216 °C;  $R_f = 0.72$  ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ , 9:1). IR (KBr): 3271, 1613, 1343, 1182, 959  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta = 2.86$  (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 7.36–7.53 (m, 3H, ArH), 7.74 (d,  $J = 8$  Hz, 2H, ArH), 7.81–7.82 (m, 3H, ArH), 7.87–7.93 (m, 4H, ArH), 8.03–8.06 (m, 1H, ArH), 8.72 (s, 1H,  $\text{N}=\text{CH}$ ), 12.01 (s, 1H, CONH), 14.24 (br, 1H, OH).  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta = 111.15, 124.76, 126.80, 127.28, 128.33, 128.59, 129.60, 133.54, 133.65, 134.13, 134.74, 139.79, 142.66, 150.99, 158.13, 165.62$ ; ESI-HRMS  $m/z = 434.1165$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ . Anal.

calcd. for  $C_{23}H_{19}N_3O_4S$ : C 63.73, H 4.42, N 9.69; found: C 63.87, H 4.39, N 9.65. HPLC (C18, acetonitrile-water, 9:1, 254 nm): ret. time: 4.653 min; peak area = 99,145%.

*4-Hydroxy-2-methyl-N'-{(E)-[3,5-di-tert-butyl-4-hydroxy]phenylmethylidene}-2H-1,2-benzothiazine-3-carbohydrazide 1,1-dioxide (14h)*. The title compound was obtained by condensation of **16** with 3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenylcarboxaldehyde as a light green powder (161 mg, 90%). Mp 249–251 °C;  $R_f = 0.61$  ( $CH_2Cl_2/MeOH$ , 9:1). IR (KBr): 3287, 1645, 1617, 1348, 1183, 954  $cm^{-1}$ .  $^1H$ -NMR ( $DMSO-d_6$ ):  $\delta = 1.42$  (s, 18H,  $C(CH_3)_3$ ), 2.83 (s, 3H,  $CH_3$ ), 7.49 (s, 2H, ArH), 7.53 (s, 1H, OH), 7.91–8.02 (m, 4H, ArH), 8.59 (s, 1H,  $N=CH$ ), 11.71 (s, 1H, CONH), 14.25 (br, 1H, OH);  $^{13}C$ -NMR ( $DMSO-d_6$ ):  $\delta = 30.11, 34.50, 110.64, 124.30, 125.11, 126.16, 134.16, 139.24, 152.42, 156.66, 157.09, 164.51$ . ESI-HRMS  $m/z = 486.2056$   $[M+H]^+$ . Anal. calcd for  $C_{25}H_{31}N_3O_5S$ : C 61.83, H 6.43, N 8.65; found: C 61.93, H 6.39, N 8.61. HPLC (C18, acetonitrile-water, 9:1, 254 nm): ret. time: 5.333 min; peak area = 99,697%.

### 3.2. X-ray Crystallography

A colorless prismatic single crystal of compound **14a** (LASSBio-1606) suitable for x-ray study was obtained by slow evaporation of a solution of dichloromethane-dimethyl sulfoxide (1:15) at room temperature 295(2) K. Data collection was performed using the Enraf-Nonius CAD-4 diffractometer operating with Cu-K $\alpha$  radiation at room temperature. 3718 data points were collected of what 3004 are symmetry independent ( $R_{int} = 0.0267$ ). The molecule crystallizes in the C2/c space group, having  $Z = 8$ . Structure solution was obtained using Direct Methods implemented in SHELXS [52] and the model refinement was performed with full matrix least squares on  $F^2$  using SHELXL [52], with final residuals  $R1 = 0.056$ ,  $wR2 = 0.148$  for 2633 observed data with  $I > 2\sigma(I)$ , and  $R1 = 0.071$ ,  $wR2 = 0.299$  for all data. The crystal packing is mediated by a pair of intermolecular hydrogen short contact of type N17–H17...O12<sup>i</sup> with donor-acceptor distance 3.156(3) Å and DHA angle 149.3°, forming dimmers about an inversion center, and further stabilization is due to weak interactions of types C10–H...O12<sup>ii</sup>, C13–H...O15<sup>iii</sup> and C22–H...O11<sup>iv</sup>. Hydrogen interactions geometry is given in Table 6. The programs ORTEP-3 [39], SHELXS/SHELXL [52] were used within WinGX [53] software package.

**Table 6.** Intramolecular and intermolecular hydrogen bonds and weak interactions.

D—H...A	D—H (Å)	H...A (Å)	D...A (Å)	D—H...A (°)	Symmetry operation
N17-H17...N2	0.86	2.33	2.723(3)	108.1	
O16-H16...O15	0.82	1.81	2.541(3)	147.4	
N17-H17...O12 <sup>i</sup>	0.86	2.39	3.156(3)	149.3	(i) 1/2-x, 1/2-y, -z
C10-H10...O12 <sup>ii</sup>	0.93	2.69	3.268(4)	121.3	(ii) 1-x, -y, -z
C13-H13B...O15 <sup>iii</sup>	0.96	2.55	3.466(4)	158.7	(iii) 1-x, 1-y, -z
C22-H22...O11 <sup>iv</sup>	0.93	2.48	3.373(4)	162.3	(iv) x, 1-y, -1/2+z

### 3.3. Pharmacological Evaluation

#### 3.3.1. Animals

Swiss mice weighing 20–30 g (from the BIOGEN-UFAL) were housed in group cages and maintained on a 12 h light/12 h dark cycle. Animals had free access to food and water at all times. Experiments were carried out according to a protocol approved by the Animal Welfare Committee of Federal University of Alagoas (UFAL) (Number: 026681/2009-23), and in accordance with the ethical guidelines for investigation of experimental pain in conscious animals.

#### 3.3.2. Reagents

Acetic acid (Merck), arabic gum (Sigma Aldrich), morphine sulphate (Dimorf-Cristalia-BR) and piroxicam (Merck) were obtained from commercial sources. A solution of formalin 2.5% was prepared with formaldehyde (Merck) in saline (NaCl 0.9%). Piroxicam and compounds **14a–h** were used as suspension in arabic gum in all the experiments and oral administrations.

#### 3.3.3. Acetic Acid-induced Writhing Test

This test was performed as described by Collier *et al.* [40]. Acetic acid (0.6%, v/v) was administered i.p. in a volume of 0.1 mL/10 g. The number of writhes, a response consisting of contraction of an abdominal wall, pelvic rotation followed by hind limb extension, was counted during continuous observation for 20 min beginning from 5 min after the acetic acid injection. Piroxicam and compounds **14a–h** (all 100 µmol/kg, oral administration) were administered 60 min before the acetic acid injection. Antinociceptive activity was expressed as inhibition percent of the usual number of writhing observed in control animals. Dose–response curves were obtained for piroxicam and LASSBio-1604 (**14e**) (1, 10, 30, 100, 300 µmol/kg), LASSBio-1617 (**14b**) (1, 10, 30, 100, 300 µmol/kg), LASSBio-1637 (**14f**) (1, 10, 30, 100, 300 µmol/kg), LASSBio-1638 (**14g**) (1, 10, 30, 100, 300 µmol/kg), and LASSBio-1639 (**14h**) (1, 10, 30, 100, 300 µmol/kg) using groups of 8 animals. Control animals received the vehicle. The ID<sub>50</sub> values (*i.e.*, dose which reduces response by 50% relative to the control values) of piroxicam, of compounds **14e**, **14a**, **14f**, **14g** and **14h** were determined by linear regression from individual experiments with the linear regression function of the Graph Pad Prisma software.

#### 3.3.4. Formalin-induced Nociception

The procedure used was essentially the same as that described previously [41]. Animals received 20 mL of 2.5% formalin solution (0.92% formaldehyde in saline) in the ventral surface of the right hind paw. Animals were observed from 0 to 5 min (neurogenic phase) and from 15 to 30 min (inflammatory phase) and the time that they spent licking the injected paw was recorded and considered as indicative of nociception. Animals received piroxicam or compounds **14a–h** (100 µmol/kg, oral administration) 40 min beforehand. Control animals received vehicle (arabic gum).

### 3.3.5. Hot-plate Test

Mice were treated according to the method described by Kuraishi *et al.* [46]. Animals (n = 6) were placed on a hot-plate set at  $55 \pm 1$  °C. Reaction time was recorded when the animals licked their fore and hind-paws and jumped at 30, 60, 90 and 120 min after oral administration of 100 µmol/kg of piroxicam or compounds **14a–h** or reference drug (morphine, 15 µmol/kg. i.p.). Baseline was considered as the mean of reaction time obtained at 30 and 60 min before administration of derivatives or piroxicam or morphine and was defined as normal reaction of animal to the temperature.

### 3.3.6. Zymosan-induced Peritonitis

Peritoneal inflammation was induced according to the method described by Leite *et al.* [49]. A solution of Zymosan A (Sigma–Aldrich) (2 mg/mL) was prepared in saline (NaCl 0.9%) and injected into the peritoneal cavity of mice (0.5 mL). Six hours after injection of Zymosan A, the animals were killed by cervical dislocation and the peritoneal cavity was washed with 3 mL of cold Hank's. Compounds **14a–h** or piroxicam were administered at the dose of 100 µmol/kg (p.o.), 40 min before Zymosan A injection. Control group received 10 mL/kg of vehicle (arabic gum, p.o.). The number of cells was quantified by optical microscope, using the 100× lens.

### 3.3.7. Carrageenan-induced Peritonitis

Peritoneal inflammation was induced according to the method described by Ferrandiz and Alcaraz [50]. A solution of carrageenan 1% (Sigma-Aldrich) was prepared in saline (NaCl 0.9%) and injected into the peritoneal cavity of mice (250 µL/animal). Four hours after injection of carrageenan, the animals were killed by cervical dislocation and the peritoneal cavity was washed with 3 mL of cold Hank's. Compounds **14a–h** and piroxicam were administered at the dose of 100 µmol/kg (p.o.), 30 min before carrageenan injection. Control group received 10 mL/kg of vehicle (arabic gum, p.o.). The number of cells was quantified by optical microscope, using 100× lens.

### 3.3.8. Evaluation of Human COX-1/COX-2 Inhibition

Evaluation of piroxicam and compounds **14b,e** for COX-1 and COX-2 inhibition were performed by CEREP Laboratories (Celle L'Evescault, France) using, respectively, assay catalog reference no. 0726 and 0727, and both were carried out as described by Glaser *et al.* [51]. In these assays, the inhibitory effect of compounds, at concentration of 10 µM, on activity of human recombinant COX-1 or COX-2, isolated from Sf-9 cells, was quantified by measuring the formation of PGE<sub>2</sub>, detected by homogeneous time resolved fluorescence (HTRF), from arachidonic acid. The results are expressed as a percent inhibition of the control enzyme activity.

### 3.3.9. Test Evaluation of the Inhibition of LOX

Compounds **14b**, **14e–h** and piroxicam were evaluated for their ability to inhibit LOX, using the kit for determining the inhibition of LOX (Lipoxygenase Inhibitor Screening Assay Kit, Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA) according to manufacturer's instructions. The test

compound solutions were prepared using DMSO as solvent and reaction buffer (supplied in kit) to a concentration of 10  $\mu$ M.

### 3.3.10. Statistical Analysis

Data obtained from animal experiments are represented by mean  $\pm$  standard error of the mean (Mean  $\pm$  S.E.M.). Statistical differences between the treated and the control groups were evaluated by test t of Student or ANOVA in the tutorial Prisma®. Values were considered significant if \*  $p < 0.05$  and \*\*  $p < 0.01$ . The ID<sub>50</sub> values (*i.e.*, the dose of derivatives *N*-acylhydrazone which reduced the pain response by 50% in relation to control group values) were determined by linear regression from individual experiments using the GraphPad software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) and are reported as geometric means accompanied by their respective 95% confidence limits. Maximal inhibition values were calculated at the more effective dose used.

## 4. Conclusions

In general, compounds **14a–h** presented antinociceptive and anti-inflammatory activities *in vivo*, by oral administration, at the screening dose of 100  $\mu$ mol/kg. Pharmacological evaluation suggest that the NAH derivatives reported herein present a better pharmacological profile than standard drug piroxicam, especially for their markedly activity in acute inflammation models. Moreover, we were able to identify LASSBio-1637 (**14f**) and LASSBio-1639 (**14g**) as new antinociceptive and anti-inflammatory prototypes, which are able to inhibit cell recruitment in carrageenan and zymosan-induced peritonitis in more than 70% and 80% (dose = 100  $\mu$ mol/kg, p.o), respectively, through a mechanism of action that seems to be distinct of piroxicam and remains to be elucidated.

## Supplementary Material

The structural results for **14a** were deposited with the Cambridge Crystallographic Data Centre as Supporting Information, CCDC number: 908020. Copies of the data can be obtained free of charge upon application to CCDC, 12 Union Road, Cambridge CB2 1EZ, United Kingdom (Fax: (44) 1223 336-033; E-mail: deposit@ccdc.cam.ac.uk).

Supplementary materials can be accessed at: <http://www.mdpi.com/1420-3049/17/12/14126/s1>.

## Acknowledgements

The authors are grateful to FAPERJ, CNPq, CAPES and INCT-INOVAR for financial support.

## References

1. Medzhitov, R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* **2008**, *454*, 428–435.
2. Henson, P.M. Dampening inflammation. *Nat. Immunol.* **2005**, *6*, 1179–1181.
3. Gaestel, M.; Kotlyarov, A.; Kracht, M. Targeting innate immunity protein kinase signalling in inflammation. *Nat. Rev. Drug Dis.* **2009**, *8*, 480–499.

4. Lombardino, J.G.; Wiseman, E.H.J. Sudoxicam and Related N-Heterocyclic Carboxamides of 4-Hydroxy-2H-1,2- benzothiazine 1,1- Dioxide. Potent Nonsteroidal Antiinflammatory Agents. *J. Med. Chem.* **1972**, *15*, 848–849.
5. Whitehouse, M.W. Drugs to treat inflammation: A historical introduction. *Curr. Med. Chem.* **2005**, *12*, 2931–2942.
6. Engelhardt, G.; Homma, D.; Schlegel, K.; Ultzmann, R.; Schnitzler, C. Anti-inflammatory, analgesic, antipyretic and related properties of meloxicam, A new non-steroidal anti-inflammatory agent with favourable gastrointestinal tolerance. *Inflamm. Res.* **1995**, *44*, 423–433.
7. Bradshaw, D.; Cashin, C.H.; Kennedy, A.D.; Roberts, N.A. Pharmacological and biochemical activities of Tenoxicam (Ro 12–0068), A new non-steroidal anti-inflammatory drug. *Agents Actions* **1984**, *15*, 569–577.
8. Balfour, J.A.; Fitton, L.B. Barradell, Lornoxicam: A review of its pharmacology and therapeutic potential in the management of painful and inflammatory conditions. *Drugs* **1996**, *51*, 639–657.
9. Hobbs, Y.D.C.; Twomey, T.M.J. Piroxicam pharmacokinetics in man: Aspirin and antacid interaction studies. *Clin. Pharmacol.* **1979**, *19*, 270–281.
10. Richey, F.; Scarpignato, C.; Lanas, A.; Reginster, J.-Y. Efficacy and safety of piroxicam revisited. A global meta-analysis of randomized clinical trials. *Pharmacol. Res.* **2009**, *60*, 254–263.
11. Dannhardt, G.; Kiefer, W. Cyclooxygenase inhibitors—Current status and future prospects. *Eur. J. Med. Chem.* **2001**, *36*, 109–126.
12. Brideau, C.; Kargman, S.; Liu, S.; Dallob, A.L. A human whole blood assay for clinical evaluation of biochemical efficacy of cyclooxygenase inhibitors. *Inflamm. Res.* **1996**, *45*, 68–74.
13. Duarte, C.D.; Barreiro, E.J.; Fraga, C.A.M. Privileged Structures: A Useful Concept for the Rational Design of New Lead Drug Candidates. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2007**, *7*, 1108–1119.
14. Evans, B.E.; Rittle, K.E.; Bock, M.G.; Dipardo, R.M.; Freidinger, R.M.; Whitter, W.L.; Lundell, G.F.; Veber, D.F.; Anderson, P.S.; Chang, R.S.L.; *et al.* Methods for drug discovery: Development of potent, selective, orally effective cholecystokinin antagonists. *J. Med. Chem.* **1988**, *31*, 2235–2246.
15. Rollas, S.; Küçükgülzel, S.G. Biological Activities of Hydrazone Derivatives. *Molecules* **2007**, *12*, 1910–1939.
16. Cage, J.L.; Onrust, R.; Johnston, D.; Osnowski, A.; MacDonald, W.; Mitchell, L.; Ürogdi, L.; Rohde, A.; Harbol, K.; Gragerov, S.; *et al.* N-Acylhydrazones as inhibitors of PDE10A. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *21*, 4155–4159.
17. Tributino, J.M.L.; Duarte, C.D.; Corrêa, R.S.; Doriguetto, A.C.; Ellena, J.; Romeiro, N.C.; Castro, N.G.; Miranda, A.L.P.; Barreiro, E.J. Novel 6-methanesulfonamide-3,4-methylenedioxyphenyl-N-acylhydrazones: Orally effective anti-inflammatory drug candidates. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 1125–1131.
18. Duarte, C.D.; Tributino, J.L.M.; Lacerda, D.I.; Martins, M.V.; Alexandre Moreira, M.S.; Dutra, F.; Bechara, E.J.H.; De Paula, F.S.; Goulart, M.O.F.; Ferreira, J.; *et al.* Synthesis, Pharmacological evaluation and electrochemical studies of novel 6-nitro-3,4-methylenedioxyphenyl-N-acylhydrazone derivatives: Discovery of LASSBio-881, A new ligand of cannabinoid receptors. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 2421–2433.

19. Tian, B.; He, M.; Tang, S.; Hewlett, I.; Tan, Z.; Li, J.; Jin, Y.; Yang, M. Synthesis and antiviral activities of novel acylhydrazone derivatives targeting HIV-1 capsid protein. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 2162–2167.
20. Diaz, P.; Phatak, S.S.; Xu, J.; Astruc-Diaz, F.; Cavasotto, C.N.; Naguib, M.J. 6-methoxy-VV-alkyl isatin acylhydrazone derivatives as a novel series of potent selective cannabinoid receptor 2 inverse agonists: Design, Synthesis, and binding mode prediction. *Med. Chem.* **2009**, *52*, 433–444.
21. Fraga, C.A.M.; Barreiro, E.J. Medicinal chemistry of N-acylhydrazones: New lead-compounds of analgesic, Antiinflammatory and antithrombotic drugs. *Curr. Med. Chem.* **2006**, *13*, 167–198.
22. Barreiro, E.J.; Fraga, C.A.M.; Miranda, A.L.P.; Rodrigues, C.R. A química medicinal de N-acilidrazonas: novos compostos protótipos de fármacos analgésicos, antiinflamatórios e anti-trombóticos. *Quim. Nova* **2002**, *25*, 129–148.
23. Mahy, J.P.; Gaspard, S.; Mansuy, D. Phenylhydrazones as new good substrates for the dioxygenase and peroxydase reactions of prostaglandin synthase: Formation of Iron (III)-sigma-phenyl complexes. *Biochemistry* **1993**, *32*, 4014–4021.
24. Zia-ur-Rehman, M.; Choudary, J.A.; Elsegood, M.R.J.; Siddiqui, H.L.; Khan, K.M. A facile synthesis of novel biologically active 4-hydroxy-N'-(benzylidene)-2H-benzo[e][1,2]thiazine-3-carbohydrazide 1,1-dioxides. *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, *44*, 1311–1316.
25. Ahmad, M.; Zia-ur-Rehman, M.; Siddiqui, H.L.; Ullah, M.F.; Parvez, M. Microwave assisted synthesis and structure-activity relationship of 4-hydroxy-N'-[1-phenylethylidene]-2H/2-methyl-1,2-benzothiazine-3-carbohydrazide 1,1-dioxides as anti-microbial agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 2368–2377.
26. Ahmad, M.; Rizvi, S.U.F.; Siddiqui, H.L.; Ahmad, S.; Parvez, M.; Suliman, R. Antioxidant and antimicrobial studies of novel N0-(substituted-2-chloroquinolin-3-yl)methylidene-4-hydroxy-2H-1,2-benzothiazine-3-carbohydrazides 1,1-dioxides. *Med. Chem. Res.* **2012**, *21*, 2340–2348.
27. Lombardino, J.G.; Wiseman, E.H.; Chianini, J. Potent Antiinflammatory N-Heterocyclic 3-Carboxamides of 4-Hydroxi-2-methyl-2H-1,2-benzothiazine 1,1-dioxide. *J. Med. Chem.* **1973**, *16*, 493–496.
28. Wang, J.; Limburg, D.; Carter, J.; Mbalaviele, G.; Gierse, J.; Vazquez, M. Selective inducible microsomal prostaglandin E2 synthase-1 (mPGES-1) inhibitors derived from an oxicam template. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 1604–1609.
29. de Leval, X.; Julémon, F.; Delarge, J.; Pirotte, B.; Dogné, J.-M. New Trends in Dual 5-LOX/COX Inhibition. *Curr. Med. Chem.* **2002**, *9*, 941–962.
30. Lombardino, J.G.; Wiseman, E.H.; McLamore, W.M. Synthesis and Antiinflammatory Activity of some 3-carboxamides of 2-alkyl-4-hydroxy-2H-1,2-benzothiazine-1,1-dioxide. *J. Med. Chem.* **1971**, *14*, 1171–1175.
31. Lima, P.C.; Lima, L.M.; Silva, K.C.P.; Leda, P.H.O.; Miranda, A.L.P.; Fraga, C.A.M.; Barreiro, E.J. Synthesis and analgesic activity of novel N-acylhydrazones and isosters, derived from natural saffrole. *Eur. J. Med. Chem.* **2000**, *35*, 187–203.
32. Kümmerle, A.E.; Raimundo, J.M.; Leal, C.M.; da Silva, G.S.; Balliano, T.L.; Pereira, M.A.; de Simone, C.A.; Sudo, R.T.; Zapata-Sudo, G.; Fraga, C.A.M.; *et al.* Studies towards the identification of putative bioactive conformation of potent vasodilator arylidene N-acylhydrazone derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, *44*, 4004–4009.

33. Cui, Z.; Li, Y.; Ling, Y.; Huang, J.; Cui, J.; Wang, J.R.; Yang, X. New class of potent antitumor acylhydrazone derivatives containing furan. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*, 5576–5584.
34. Cunha, A.C.; Figueiredo, J.M.; Tributino, J.L.; Miranda, A.L.; Castro, H.C.; Zingali, R.B.; Fraga, C.A.; de Souza, M.C.; Ferreira, V.F.; Barreiro, E.J. Antiplatelet properties of novel N-substituted-phenyl-1,2,3-triazole-4-acylhydrazone derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11*, 2051–2059.
35. Silva, G.A.; Costa, L.M.M.; Brito, F.C.F.; Miranda, A.L.P.; Barreiro, E.J.; Fraga, C.A.M. New class of potent antinociceptive and antiplatelet 10H-phenothiazine-1-acylhydrazone derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 3149–3158.
36. Syakaev, V.V.; Podyachev, S.N.; Buzykin, B.I.; Latypov, S.K.; Habicher, W.D.; Konovalov, A.I. NMR study of conformation and isomerization of aryl- and heteroarylaldehyde 4-tert-butylphenoxyacetylhydrazones. *J. Mol. Struct.* **2006**, *788*, 55–62.
37. Silva, Y.K.C.; Augusto, C.V.; Barbosa, M.L.C.; Melo, G.M.A.; Queiroz, A.C.; Dias, T.L.M.F.; Bispo-Júnior, W.; Barreiro, E.J.; Lima, L.M.; Alexandre-Moreira, M.S. Synthesis and pharmacological evaluation of pyrazine N-acylhydrazone derivatives designed as novel analgesic and anti-inflammatory drug candidates. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 5007–5015.
38. Palla, G.; Predieri, G.; Domiano, P.; Vignali, C.; Turner, W. Conformational behaviour and E/Z isomerization of N-acyl and N-aroilylhydrazones. *Tetrahedron* **1986**, *42*, 3649–3654.
39. Farrugia, L.J. Ortep-3 for Windows—A Version of ORTEP-III with a Graphical User. *J. Appl. Cryst.* **1997**, *30*, 565–566.
40. Collier, H.O.; Dinneen, L.C.; Johnson, C.A.; Schneider, C. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. *Br. J. Pharmacol.* **1968**, *32*, 295–310.
41. Hunskaar, S.; Hole, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory pain. *Pain* **1987**, *30*, 103–114.
42. Shibata, M.; Ohkubo, T.; Takahashi, H.; Inoki, R. Modified formalin test; characteristic biphasic pain response. *Pain* **1989**, *38*, 347–352.
43. Tjolsen, A.; Berge, O.G.; Hunskaar, S.; Rosland, J.H.; Hole, K. The formalin test: an evaluation of the method. *Pain* **1992**, *51*, 15–17.
44. Woolfe, G.; MacDonald, A.D. Evaluation of analgesic action of pethidine hydrochloride (Demerol). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1944**, *80*, 300–307.
45. Eddy, N.B.; D. Leimbach, D. Synthetic analgesics. II. Dithienylbutenylamines and dithienylbutylamines. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1953**, *107*, 385–393.
46. Kuraishi, Y.; Harada, Y.; Aratani, S.; Satoh, M.; Takagi, H. Involvement of the spinal noradrenergic and serotonergic systems in morphine analgesia: The differences in mechanical and thermal algesic tests. *Brain Res.* **1983**, *273*, 245–252.
47. Le Bars, D.M.; Gozariu, M.; Cadden, S.W. Animal models of nociception. *Pharmacol. Rev.* **2001**, *53*, 597–652.
48. Doherty, N.S.; Poubelle, P.; Borgeat, P.; Beaver, T.H.; Westrich, G.L.; Schrader, N.L. Intraperitoneal injection of zymosan in mice induces pain, inflammation and the synthesis of peptidoleukotrienes and prostaglandin E2. *Prostaglandins* **1985**, *30*, 769–789.
49. Leite, D.F.P.; Echevarria-Lima, J.; Ferreira, S.C.; Calixto, J.B.; Rumjanek, V.M.J. ABCC transporter inhibition reduces zymosan-induced peritonitis. *Leuk. Biol.* **2007**, *82*, 630–637.

50. Ferrándiz, M.L.; Alcaraz, M.J. Antiinflammatory activity and inhibition of arachidonic acid metabolism by flavonoids. *Inflamm. Res.* **1991**, *32*, 283–288.
51. Glaser, K.; Sung, M.-L.; O’Neill K; Belfast, M.; Hartman, D.; Carlson, R.; Kreft, A.; Kubrak, D.; Hsiao, C.-L.; Weichman, B. Etodolac selectively inhibits human prostaglandin G/H synthase 2 (PGHS-2) versus human PGHS-1. *Eur. J. Pharmacol.* **1995**, *281*, 107–111.
52. Sheldrick, G.M. A short history of SHELX. *Acta Cryst.* **2008**, *64*, 112–122.
53. Farrugia, L.J. WinGX Suite for Single Crystal Small Molecule Crystallography. *J. Appl. Cryst.* **1999**, *32*, 837–838.

*Sample Availability:* Samples of the compounds **14a–h** are available from the authors.

© 2012 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).