



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA – UFPB
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE – CCS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
DESENVOLVIMENTO E INOVAÇÃO TECNOLÓGICA EM
MEDICAMENTOS



KARDILANDIA MENDES DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE E DO EFEITO
ANTIDEPRESSIVO SIMILE DE UM DERIVADO CHALCONA
(GA-4), POR MEIO DE METODOLOGIAS *IN SILICO* E *IN VIVO***

JOÃO PESSOA

2021

Kardilandia Mendes de Oliveira

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE E DO EFEITO ANTIDEPRESSIVO SIMILE DE UM
DERIVADO CHALCONA (GA-4), POR MEIO DE METODOLOGIAS *IN SILICO* E *IN
VIVO***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba, como requisito para a obtenção do título de Doutora em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos.

**Orientadora: Prof^a. Dr^a. Liana Clébia de
Morais Pordeus**

**Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Caliandra Maria
Bezerra Luna Lima**

João Pessoa

2021

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

O48a Oliveira, Kardilândia Mendes de.

Avaliação da toxicidade e do efeito antidepressivo
símile de um derivado chalcona (GA-4) por meio de
metodologias in sílico e in vivo / Kardilândia Mendes
de Oliveira. - João Pessoa, 2021.

109 f. : il.

Orientação: Liana Clébia de Moraes Pordeus.

Coorientação: Caliandra Maria Bezerra Luna Lima.

Tese (Doutorado) - UFPB/CCS.

1. Antidepressivo. 2. Depressão. 3. Toxicologia. 4.
Farmacocinética. I. Pordeus, Liana Clébia de Moraes.
II. Lima, Caliandra Maria Bezerra Luna. III. Título.

UFPB/BC

CDU 615.2(043)

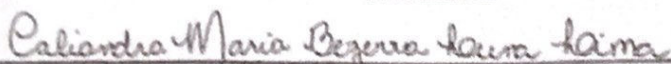
Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de DOUTORA EM DESENVOLVIMENTO E INOVAÇÃO TECNOLÓGICA EM MEDICAMENTOS

Tese aprovada em 26/03/2021.

BANCA EXAMINADORA



Prof^a Dr^a Liana Clébia de Moraes Pordeus
(Universidade Federal da Paraíba)
Orientadora

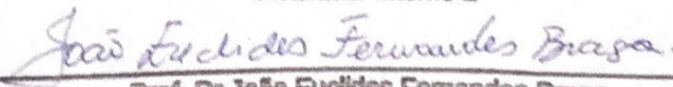


Prof^a Dr^a Callandra Maria Bezerra Luna Lima
(Universidade Federal da Paraíba)
orientadora

gov.br

Documento assinado digitalmente
Bárbara Viviana de Oliveira Santos
Data: 22/03/2021 13:23:42 -0500
CPF: 426.885.419-26

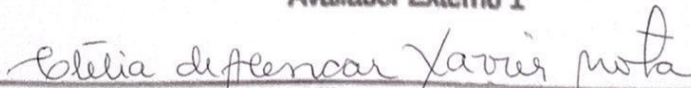
Prof^a Dr^a Bárbara Viviana de Oliveira Santos
Avaliador Interno 1



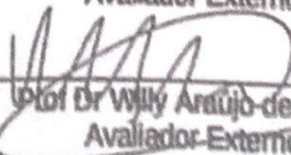
Prof. Dr João Euclides Fernandes Braga
Avaliador Interno 2



Prof^a Dr^a Ana Karina Holanda Leite Maia
Avaliador Externo 1



Prof^a Dr^a Clélia de Alencar Xavier Mota
Avaliador Externo 2



Prof Dr Willy Araújo de Oliveira
Avaliador Externo 3

DEDICATÓRIA

Ao divino mestre Jesus pelo seu infinito e incondicional amor, e também ao melhor ser humano que tive a honra de ser sua filha: Maria Ilma Mendes, um ser de luz e muito amor. A minha eterna gratidão por ter aceitado a missão de ser minha mãe e tê-la orquestrado com maestria, “como é grande o meu amor por ti”.

“Se Jesus nos recomendou amar os inimigos, imaginemos com que imenso amor nos compete amar aqueles que nos oferecem o coração”. Chico Xavier

AGRADECIMENTOS

Em todos os trabalhos desenvolvidos ao longo da nossa vida, a gratidão sempre deve se fazer presente, com esse pensamento que venho mais uma vez expressar minha gratidão a todos que me ajudaram direta ou indiretamente para a concretização desse trabalho. Então, meus agradecimentos aos tantos que me influenciaram e contribuíram com esse momento tão sublime em minha vida, especialmente:

Ao meu mestre Senhor Jesus, que sempre é meu ponto de luz, força e soberania que fez com que minhas ideias fluíssem e não me deixasse abater pela insegurança e desânimo. Sem Ele não teria sido capaz de realizar e escrever com tanta dedicação.

À minha mãe, MARIA ILMA MENDES (*in memoriam*), que, mesmo não estando presente em matéria, será sempre minha referência de ser humano; foi com ela que aprendi a ler, escrever e também a trabalhar com os números. Assim como meu pai, João Mendes Cavalcanti, que compreendeu mais uma vez minha ausência nos momentos que precisei me empenhar nessa pesquisa. Também minha irmã, Dr^a Wilandia Mendes de Oliveira, por sempre me incentivar e apoiar na busca por mais conhecimento e suportar minha impaciência e desabafo, como também pelo silêncio de que necessitava; aos meus sobrinhos: Emilly Erich Mendes, Jurergen Erich Mendes e sobrinho neto Nicolas Mendes pelos ensinamentos constantes ao longo dessa trajetória de tia.

Aos meus chefes do laboratório Analisis, nas pessoas do Dr. Gilson E. Guedes Filho e da Dr^a Maria das Graças Medeiros, por terem permitido a minha ausência e incentivado todo o meu trabalho.

Aos meus colegas farmacêuticos dos laboratórios do Hospital Universitário Lauro Wanderley e do Analisis Laboratório Clínico e Infantil, José de Queiroz Medeiros, Maria Neuza Soares e Silva, Tereza Olívia Freire Santana, Zenaide de Castro Vales e Maria Daluz Tenório, por me ajudarem quando eu estive ausente para realizar as disciplinas do doutorado, como também por estarem sempre em sintonia comigo e vibrarem com meu sucesso.

Às minhas colegas Gianna Gigliolly Vital Sampaio (Farmacêutica) e Jussara Vieira (Biomédica) que tiveram um papel fundamental para que se concretizasse esse trabalho, por minha ausência, leva-lás à exaustão e, por seu companheirismo,

serei eternamente grata pela amizade e parceria. Aos funcionários, Joanny Sisyinhata de Sousa Pereira, Claudia Teixeira e Julio Cesar Nóbrega, parceiros no dia a dia e amigos, muito obrigada.

Aos meus amigos do HULW e do Analisis, por escutarem minhas angústias durante o processo de pesquisa e produção e incentivarem nos momentos de desânimo e cansaço.

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Liana Clébia de Moraes Pordeus, por ter aceitado a jornada de me orientar sabendo de todas as minhas limitações e por ter contribuído para a realização deste trabalho, a minha gratidão eterna por toda credibilidade na minha força.

À minha co-orientadora, Prof^a Dr^a Caliandra Maria Bezerra Luna Lima, por quatro anos me chefiou e possibilitou a realização do meu trabalho, que foi de uma generosidade e paciência, disponibilizando seu tempo e conhecimento para a efetivação deste trabalho.

Aos professores do curso, pelas contribuições com as aulas muito proveitosas, em especial as professoras Dr^a Maria de Fátima Vanderlei de Souza e a Dr^a Rita de Cássia da Silveira e Sá, bem como a Adriana Tiyoko Ura- Secretária pela paciência, cordialidade e compreensão diante dos percalços que enfrentei para concluir o curso.

Aos colegas do curso, pela amizade durante os anos de convivência acadêmica e por tantas vezes em que realizamos trabalho juntos, em especial aos doutorandos Humberto Hugo Nunes de Andrade, Álefe Brito Monteiro, Dr Renan Marinho Braga e e ao Prof. Dr. Cícero Francisco B. Felipe por toda a contribuição para realização dos trabalhos na psicofarmacologia.

Ao Prof. Dr. Luis Cezar Rodrigues e seus alunos: Dr. Flávio Valadares P. Borges e a doutoranda Gabrielly Diniz Duarte, por gentilmente terem cedido à substância, a qual foi analisada no presente estudo. Agradeço pela paciência e por todo trabalho dedicado para que esta pesquisa se tornasse viável, o caminho foi longo.

Ao Prof. Dr. Abrahão Alves de Oliveira Filho pelos estudos *in silico* nos ajudando no início da pesquisa e direcionando a realização dos exames, muito obrigada.

À Prof^a. Dr^a Giciane Carvalho Vieira e a técnica, Nemiuzia Alves de Moura que realizaram todas as análises histopatológicas, enriquecendo e corroborando com os achados laboratoriais, muito obrigada.

À Dr^a. Luciana da Silva Nunes Ramalho e ao Dr. Josué do Amaral Ramalho, pela parceria e ajuda durante todo o curso, sou grata por tudo o que me ajudaste durante a nossa jornada, grandes amigos!

Agradeço à Ms. Cinthia Rodrigues Melo, por sua ajuda sem a qual eu não teria conseguido terminar esse trabalho, à você, minha imensa gratidão e respeito, que Deus te proteja e abençoe sempre.

Agradeço também ao Engenheiro Cívil, Luiz Carlos Gomes, que por muito dividiu seu tempo e me acalentou com as suas conversas, carinho e amor durante todo o curso, o meu muito obrigada, você é um ser maravilhoso.

Aos funcionários da UPA, em especial à veterinária Dr^a Roberta Nunes Parentoni e ao Técnico José Crispim Duarte, que sempre demonstrou afeto e disponibilidade para me ajudar durante todo o experimento toxicológico.

Enfim, agradeço a todos que acompanharam a trajetória da minha pesquisa e contribuíram sempre para o meu crescimento intelectual. Muito obrigada a todos!

RESUMO

As chalconas são uma classe química importante na saúde por mostrar muitas atividades biológicas interessantes, além de uma síntese conveniente. São relatadas diferentes atividades farmacológicas, que as chalconas possuem, como: ações anti-inflamatórias, antimicrobianas, antioxidantes, citotóxicas, antitumorais, entre outras. Portanto, este trabalho teve como objetivo investigar a chalcona 3 (benzo[d] [1,3] dioxol-5-il)-5-(tiofen-2il)-4,5-dihidro-1H-pirazol-1-carbotioamida, também conhecida como GA-4, para avaliar sua farmacocinética e toxicidade *in silico*, docking molecular, assim como sua toxicidade *in vivo*. Portanto, inicialmente foram investigadas as características farmacocinéticas e toxicológicas teóricas da substância GA-4, por meio de ensaios *in silico* com os softwares Molinspiration e AdmetSAR, em seguida foi avaliada a estrutura cristalográfica para observar o comportamento da molécula no sítio de ligação das proteínas alvo como também observar as interações moleculares. Posteriormente foi realizado o estudo toxicológico agudo *in vivo*, seguindo os protocolos experimentais adotados no Laboratório de Ensaios Toxicológicos (LABETOX) baseado no Guia para a Condução de Estudos não Clínicos e na OECD 423 (2001). Assim, foi administrada uma dose de 300 mg/kg da substância teste, em ratas Wistar, e posteriormente não havendo mortes, foi administrada dose de 2000 mg/kg. Após 14 dias, os animais foram eutanasiados por sobredose de anestésico, e seu sangue coletado para avaliação de parâmetros bioquímicos e hematológicos. Também foram realizadas análises anatomohispatológica dos órgãos dos animais. Posteriormente, foram realizados ensaios psicofarmacológicos *in vivo*, utilizando camundongos Swiss: inicialmente, o teste do campo aberto nas doses de 50, 100 e 200 mg/kg, analisando os parâmetros: *Rearing*, *Grooming*, número de cruzamentos, micções e bolos fecais, e mais especificamente, para avaliar o efeito antidepressivo símile, o teste do nado forçado, sendo avaliado o tempo de imobilidade dos animais nas mesmas doses do teste de campo aberto. Quanto à sua farmacocinética, os estudos *in silico* mostram que esta apresenta uma boa absorção oral, com possível capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica, e uma baixa toxicidade aguda de grau III, além disso, foi observado que a GA-04 se ligou no mesmo sítio de ativação da ioimbina, mostrando ser um possível antagonista dos receptores $\alpha 2$ - adrenérgico. Esta foi confirmada com o estudo de toxicidade *in vivo*, na qual a substância GA-4

apresentou uma DL50 maior que 5000 mg/kg, sendo classificada na categoria 5 da GSH, como baixa toxicidade. Foram avaliados 21 parâmetros bioquímicos, sendo constatados alterações significativas comparadas ao controle em 5 dosagens: proteínas totais, creatinina, sódio, cálcio e lipase. Quanto aos parâmetros hematológicos, não houve nenhuma alteração no eritrograma e plaquetograma, sendo detectada uma alteração no número de leucócitos. Entretanto, ao realizar o estudo histológico dos órgãos dos animais, não foi encontrada nenhuma alteração significativa comparando-se com o grupo controle. Portanto, diante de tais resultados, podemos inferir que a substância GA-4, é um potente candidato como futuro medicamento antidepressivo, já que além dos resultados farmacológicos promissores, esta apresenta uma boa absorção oral e baixa toxicidade.

Palavras-Chaves: Depressão. Antidepressivo. Toxicologia. Farmacocinética.

ABSTRACT

Chalconas are an important chemical class in health by showing many interesting biological activities, in addition to a convenient synthesis. Different pharmacological activities are reported, which chalconas have, such as: anti-inflammatory, antimicrobial, antioxidant, cytotoxic, antitumor actions, among others. Therefore, this study aimed to investigate chalcone 3(benzo[d][1,3]dioxol-5-yl)-5-(thiophen-2-yl)-4,5-dihydro-1H-pyrazole-1-carbothiamide, also known as GA-4, to evaluate its pharmacokinetics and in silico toxicity, docking molecular as well as its toxicity in vivo. Subsequently, the acute toxicological study was performed in vivo, following the experimental protocols adopted at the Laboratory of Toxicological Tests (LABETOX) based on the Guide for Conducting Non-Clinical Studies and OECD 423 (2001). The acute in vivo toxicological study was subsequently performed, following the experimental protocols adopted at the Laboratory of Toxicological Trials (LABETOX) and the OECD 423 Guide (2001). Thus, a dose of 300 mg/kg of the test substance was administered in Wistar rats and subsequently no deaths was administered at a dose of 2000 mg/kg. After 14 days, the animals were euthanized for overdose of anesthetic, and his blood collected for evaluation of biochemical and hematological parameters. Histological analysis of the animals' organs was also performed. Mood disorder is a mental disorder, affecting about 300 million people worldwide, which can cause low self-esteem, sense of rejection, low energy, anhedonia, loss of appetite, insomnia, excessive concern, generating suffering and leading the patient to suicide. Subsequently psychopharmacological tests were performed in vivo, using Swiss mice: initially the open field test at doses of 50, 100 and 200 mg/kg, analyzing the parameters: Rearing, Grooming, Number of crosses, urinations and fecal cakes, and more specifically, to evaluate the antidepressant effect of the forced-birth test, the immobility time of the animals in the same doses of the open-field test was evaluated. As for its pharmacokinetics, the in silico studies show that it has a good theoretical oral absorption, with possible ability to cross the blood-brain barrier, and a low grade III acute theoretical toxicity, moreover it was observed that GA-04 bound to the same activation site of yohimbine, showing to be a possible antagonist of α_2 -adrenergic receptors. This was confirmed in the in vivo toxicity study, in which the substance GA-4 had a LD₅₀ greater than 5000 mg/kg and was classified as low toxicity category 5 GSH. Twenty-one biochemical parameters were evaluated, with significant changes compared to control in only five dosages: total proteins,

creatinine, sodium, calcium and lipase. As for the hematological parameters, there was no alteration in the erythrogram and plaquetogram, being detected an alteration only in the leukocytes. However, when performing the histological study of the animals' organs, no significant change was found when compared to the control group. Therefore, faced with such results, we can infer that the GA-4 is a potent candidate as a future antidepressant drug, since in addition to promising pharmacological results, it has a good theoretical oral absorption and low toxicity.

Key words: Depression. Antidepressant. Toxicology. Pharmacokinetics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura da 3-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-5-(tiofen-2-il)-4,5-dihidro-1H-pirazol-1-carbotioamida.....	22
Figura 2 - Procedimento de ensaio de toxicidade aguda com dose inicial de 300 mg/kg.....	29
Figura 3 - Liberação do neurotransmissor na fenda sináptica.	30
Figura 4 - Receptor ionotrópico GABA _A	32
Figura 5 - Receptor NMDA.....	33
Figura 6 - Reação de preparação da substância GA-4. Erro! Indicador não definido.	
Figura 7 - Open Field.	48
Figura 8 - Nado forçado.	49
Figura 9 - Espectro RMN 1H 400 MHz de GA-04.....	51
Figura 10 - Espectro RMN 13C 101 MHz de GA-04.....	52
Figura 11 - Interação da substância GA-04 com o receptor α 2- adrenérgico no mesmo sítio de ativação da ioimbina.	55
Figura 12 - Fotomicrografias representativas de miocárdio dos grupos experimentais controle (C1) e tratados (CT1 e CT2) pela substância GA-4.	64
Figura 13 - Fotomicrografias representativas das valvas cardíacas e septo interventricular dos grupos.	65
Figura 14 - Fotomicrografias representativas de estômago dos grupos experimentais controle (C1) e tratados (CT1 e CT2) pela substância GA-4.	66
Figura 15 - Fotomicrografias representativas de fígado dos grupos experimentais controle (C1) e tratados (CT1 e CT2) pela substância GA-4.	67
Figura 16 - Fotomicrografias representativas dos hepatócitos dos grupos experimentais controle (C1) e tratados (CT1 e CT2) pela substância GA-4.	68
Figura 17 - Fotomicrografias representativas de pulmão dos grupos experimentais controle (C1) e tratados (CT1 e CT2) pela substância GA-4.	69
Figura 18 - Fotomicrografias representativas dos septos interalveolares dos grupos experimentais controle (C1) e tratados (CT1 e CT2) pela substância GA-4.	69
Figura 19 - Fotomicrografias representativas de rim (região cortical) dos grupos experimentais controle (C1) e tratados (CT1 e CT2) pela substância GA-4.	70
Figura 20 - Fotomicrografias representativas de rim (região medular) dos grupos experimentais controle (C1) e tratados (CT1 e CT2) pela substância GA-4.	71

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1- Consumo de ração de ratas Wistar tratadas com a substância GA-4. Os resultados estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média. Análise por ANOVA seguido de Tukey.	56
Gráfico 2 - Dosagem de proteínas totais no soro de ratas Wistar tratadas com a substância GA-4.	59
Gráfico 3 - Dosagem de creatinina no soro de ratas Wistar tratadas com a substância GA-4.	59
Gráfico 4 - Dosagem do íon Na ⁺ no soro de ratas Wistar tratadas com a substância GA-4.	60
Gráfico 5 - Dosagem do íon Ca ²⁺ no soro de ratas Wistar tratadas com a substância GA-4.	60
Gráfico 6 - Dosagem da lipase no soro de ratas Wistar tratadas com a substância GA-4.	61
Gráfico 7 - Contagem de leucócitos do sangue periférico de ratas Wistar tratadas com a substância GA-4.	63
Gráfico 8 - Efeito da substância G4 sobre o número de levantamentos no teste de campo aberto em camundongos.	72
Gráfico 9 - Efeito da substância GA-4 sobre o número de autolimpeza no teste de campo aberto em camundongos.	73
Gráfico 10 - Efeito da substância GA-4 sobre o número de cruzamentos no teste de campo aberto em camundongos.	74
Gráfico 11 - Efeito da substância GA-4 sobre o número de micções no teste de campo aberto em camundongos.	75
Gráfico 12 - Efeito da substância GA-4 sobre o número de bolos fecais no teste de campo aberto em camundongos.	75
Gráfico 13 - Efeito da substância GA-4 sobre o tempo de imobilidade no teste do nado forçado em camundongos.	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Propriedades físico-químicas da substância GA-4 calculadas no software <i>Molinspiration</i>	52
Tabela 2 - Propriedades de classificação ADMET, calculadas no software AdmetSAR, para a substância GA-4.	53
Tabela 3 - Energia de ligação da substância GA-04 com o receptor $\alpha 2$ - adrenérgico em comparação com o padrão ioimbina.....	54
Tabela 4 - Avaliação do consumo de água, ração e evolução ponderal de ratos <i>Wistar</i> , tratadas com a substância GA-4 nas doses de 300 e 2000 mg/kg em dose única.	57
Tabela 5 - Avaliação dos parâmetros bioquímicos do sangue periférico de ratos <i>Wistar</i> , 14 dias após serem tratados com a substância GA-4 nas doses de 300 e 2000 mg/kg em dose única.	58
Tabela 6 - Avaliação dos parâmetros hematológicos do sangue periférico de ratos <i>Wistar</i> , 14 dias após serem tratados com a substância GA-4 nas doses de 300 e 2000 mg/kg em dose única.	62
Tabela 7 - Avaliação do efeito da substância GA-4 nas doses de 50, 100 e 200 mg/kg sobre o Sistema Nervoso no Teste do Campo Aberto.	72
Tabela 8 - Avaliação do efeito da substância GA-4 nas doses de 50, 100 e 200 mg/kg sobre o Sistema Nervoso no Teste do Nado Forçado.	76

LISTA DE ABREVIATURAS

ADME - Absorção, distribuição, metabolização e excreção

ADMET - Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Toxicidade

ADT – Antidepressivos Tricíclicos

ALT - Alanino Aminotransferase

Anvisa - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATP - Trifosfato de adenosina

AST - Aspartato aminotransferase

CCS - Centro de Ciências da Saúde

CEUA - Comitê de Ética em Uso Animal

DL₅₀ - Dose Letal 50%

EDTA - Ácido Etilenodiamino Tetracético

E.P.M - Erro Padrão da Média

FAL - Fosfatase alcalina

GA-4- 3-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-5-(tiofen-2-il)-4,5-dihidro-1H-pirazol-1-carbotioamida

GABA- Ácido Gama-Aminobutírico

GAD - Descarboxilase de L-Glutamato

GGT - Gama Glutamil Transferase

GHS - Globally Harmonized Classification System

GPCR - Receptor acoplado à proteína G

IMAO – Inibidor da Monoaminoxidase

IRS – Inibidor da Recaptação de Serotonina

IP - Intraperitoneal

IPeFarM - Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos

kg- Kilograma

LABETOX - Laboratório de Ensaios Toxicológicos

m – minutos

mg -- Miligramas

MAO – Monoamina Oxidase

NA-- Noradrenalina

NMDA - Glutamato N-metil-D-aspartato

NO- Óxido Nítrico

OECD - Organização para Cooperação Econômica e Desenvolvimento
PPGDITM – Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento e Inovação
Tecnológica em Medicamentos
RMN- Ressonância Magnética Nuclear
SAR - Relação Estrutura Atividade
SN- Sistema Nervoso
SNC – Sistema Nervoso Central
SNP – Sistema Nervoso Periférico
TGI - Trato Gastrointestinal
UFPB - Universidade Federal da Paraíba
U/L- Unidades por litro
VGAT - Vesículas transportadoras de GABA

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	20
2. REFERENCIAL TEÓRICO	22
2.1 SÍNTESE ORGÂNICA	22
2.1.1 Chalconas	23
2.1.2 Síntese e atividade das chalconas	23
2.2 ESTUDO DA FARMACOCINÉTICA E TOXICIDADE <i>IN SILICO</i>	25
2.3 <i>DOCKING</i> MOLECULAR	25
2.4. ESTUDO DE TOXICIDADE <i>IN VIVO</i>	27
2.5. SISTEMA NERVOSO	29
2.5.1 Neurotransmissores do SN	30
2.5.2 Neurotransmissores de Aminoácidos	31
2.5.3 Neurotransmissores de Aminas Biogênicas	33
2.6 DEPRESSÃO	34
2.6.1 Antidepressivos	35
2.7 ESTUDOS PSICOFARMACOLÓGICOS NÃO CLÍNICOS	37
3. OBJETIVOS	39
3.1 OBJETIVO GERAL	39
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	39
4. MATERIAIS E MÉTODOS	40
4.1 LOCAL DE PESQUISA	40
4.2 MATERIAIS	40
4.2.1 Substância Teste	40
4.2.2 Animais	41
4.3 MÉTODOS	41

4.3.1 Caracterização da substância GA-4	41
4.3.2 Ensaios Toxicológicos <i>in silico</i>	42
4.3.3. Estudo da modelagem molecular (<i>docking</i>).....	43
4.3.4. Ensaio Toxicológico <i>In vivo</i>	43
4.3.5. Avaliação Psicofarmacológica	47
5.RESULTADOS.....	50
5.1 CARACTERIZAÇÃO DA GA-04 ATRAVÉS DE RMN.....	50
5.2. FARMACOCINÉTICA E TOXICIDADE <i>IN SILICO</i>	52
5.2.1. Molinspiration	52
5.2.2 AdmetSAR	53
5.3. <i>DOCKING</i> MOLECULAR	54
5.4. ENSAIO TOXICOLÓGICO NÃO-CLÍNICO AGUDO	55
5.4.1. Avaliação Comportamental	56
5.4.2. Avaliação do Consumo de Água, Ração e Evolução ponderal	56
5.4.3. Avaliação Bioquímica	57
5.4.4 Avaliação Hematológica	61
5.4.5 Avaliação Histopatológica	63
5.5 Ensaio Psicofarmacológico	71
5.5.1 Teste do Campo Aberto	71
5.2.2. Teste do Nado Forçado.....	76
6. DISCUSSÃO	78
7. CONCLUSÕES	93
8. REFERÊNCIAS.....	94

1. INTRODUÇÃO

O transtorno de humor consiste em distúrbios do sistema nervoso, no qual provoca alterações emocionais podendo levar desde momentos de euforia excessiva, até tristeza profunda, caracterizada como depressão. Este é um tipo de transtorno que tem acometido cerca de 300 milhões de pessoas no mundo, sendo, portanto, importante a busca por novas drogas que possam agir mais efetivamente e com menos efeitos adversos (MÉNARD, HODES, RUSSO, 2016; WANG^a *et al.*, 2017).

Para a investigação de novos candidatos a antidepressivos, diferentes testes não clínicos podem ser realizados através de ensaios de modelagem molecular, e estudos *in vivo* por meio de testes comportamentais (HAO *et al.*, 2019). Tais testes podem ser: teste do nado forçado (UNAL, CANBEYLI, 2019), suspensão da cauda, campo aberto, preferência por sacarose, dentre outros (HAO *et al.*, 2019; POLESZAK *et al.*, 2019). Além de verificar a eficácia, também é importante que seja analisada a segurança da substância, e por isso, realizam-se estudos de toxicidade (MATOS, 2017).

As chalconas são uma classe química importante na química medicinal por mostrar muitas atividades biológicas interessantes, além de uma síntese conveniente (GOMES *et al.*, 2017; ZHUANG *et al.*, 2017). São relatadas diferentes atividades farmacológicas, que as chalconas possuem, como: ações anti-inflamatórias, antimicrobianas, antioxidantes, citotóxicas, antitumorais entre outras. Além disso, testes mostram que as chalconas são promissoras para o desenvolvimento de novos fármacos com ação no Sistema Nervoso Central (SNC), como para o tratamento da depressão (GUAN, *et al.*, 2014; HIGGS, *et al.*, 2019).

Dentre as classes de compostos que são de grande valia para a química medicinal e síntese orgânica, destacam-se os compostos heterocíclicos, e dentre eles nos detemos mais especificamente sob os derivados amino-tiofênicos (AT). Os AT são *scaffolds* que quimicamente se caracterizam por ser uma espécie aromática heterocíclica pentagonal, onde um dos carbonos metilênicos é substituído por um átomo de enxofre. Devido a sua facilidade de produzir novos derivados, os tiofenos são encontrados em vários produtos farmacêuticos e industriais, rendendo a esses compostos o título de *building blocks* (PEREIRA, 2019).

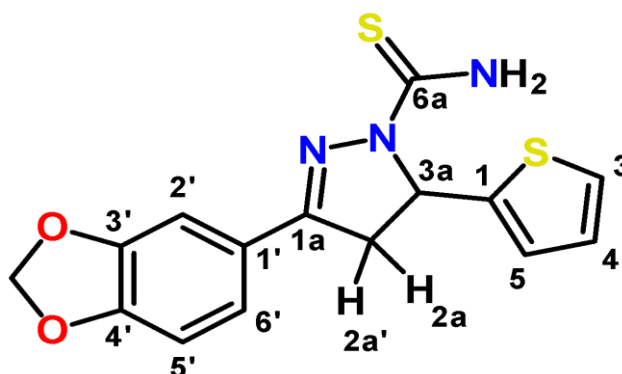
Durante o desenvolvimento de um novo medicamento, é fundamental que seja avaliado sua potencial toxicidade para ter uma maior segurança do seu uso. Por isso, as avaliações toxicológicas não clínicas são de grande importância para evitar falhas futuras nas fases clínicas do desenvolvimento de medicamentos (ISSA *et al.*, 2017).

Através de estudos computacionais (*in silico*), é possível prever a toxicidade de uma substância (RAIES, BAJIC, 2016; KOSTAL, VOUTCHKOVA-KOSTAL, 2020). Avaliando sua toxicidade genética, carcinogenicidade, toxicidade aguda, toxicidade reprodutiva, entre outros parâmetros importantes. A partir dos resultados obtidos, é possível direcionar melhor o estudo, e assim prosseguir para estudos *in vivo* de forma mais segura e racional (MYATT *et al.*, 2018).

Para realização dos estudos toxicológicos não clínicos *in vivo* são seguidos protocolos experimentais nos quais é possível avaliar o grau de toxicidade da substância em estudo. No qual, por meio destes, são observados sinais de toxicidade (alterações fisiológicas, alterações hematológicas, bioquímicas e outros) e presença ou não de mortalidade (ZAKARIA *et al.*, 2016; YADAV *et al.*, 2019). Alguns destes protocolos são determinados pela OECD (*Organization for Economic Co-operation and Development*), que possui diferentes diretrizes de toxicidade não clínica, como, a OECD 423, no qual regulamenta o estudo de toxicidade aguda, e por meio desta é possível estimar a DL₅₀ da substância estudada e sua classificação na GSH (*Globally Harmonised Classification System*). Consequentemente, a partir dos resultados obtidos, é possível avaliar se a substância em estudo é um bom candidato como futuro medicamento (OECD, 2001).

Diante disso, foi sintetizado a substância 3-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-5-(tiofen-2-il)-4,5-dihidro-1H-pirazol-1-carbotioamida (Figura 1), que é uma chalcona tiofênica, também conhecida como GA-4. Tendo em vista ser uma substância nova, sem nenhuma atividade farmacológica estudada, foi investigado se esta apresentava atividade antidepressiva, e se seu uso seria seguro através da realização de estudos toxicológicos *in vivo*.

Figura 1 - Estrutura da 3-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-5-(tiofen-2-il)-4,5-dihidro-1H-pirazol-1-carbotioamida.



Fonte: Dados da pesquisa, 2019.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 SÍNTESE ORGÂNICA

Atualmente, os produtos naturais são os meios mais utilizados como forma de tratamento das diversas doenças. Eles são uma das fontes de pesquisa para novos agentes terapêuticos, sendo eles medicamentos fitoterápicos ou ainda princípios ativos isolados que possam ser usados na produção de novos medicamentos (CASANOVA, *et. al.*, 2017).

Esses princípios bioativos são isolados de maneira lenta e em baixa quantidade, dificultando, assim, a pesquisa de novas drogas. Com isso, as substâncias sintéticas passaram a ter grande importância no planejamento de novos medicamentos. Assim, a síntese orgânica cresceu muito nos últimos anos, sendo responsável, hoje, pela grande quantidade de novos fármacos e vários candidatos (SANGI, 2016).

A atuação da síntese orgânica vem crescendo, juntamente com a química medicinal, na indústria farmacêutica no que diz respeito à produção e pesquisa de novos medicamentos, além de sua segurança e eficácia, isso também favorece na diminuição do tempo da pesquisa, visto que a síntese orgânica demanda um tempo menor para garantir a produção de moléculas (PRAJAPAT, 2017).

A síntese orgânica tem tido grande importância no desenvolvimento de novos fármacos, tornando-os mais seletivos aos alvos e proporcionando um melhor rendimento. Através de modificações moleculares é possível deixar o princípio ativo mais estável, e dessa forma apresentar melhor ação biológica (LEITE *et al*, 2015).

2.1.1 Chalconas

Chalconas são moléculas de grande importância biológica, encontradas em diversas espécies de plantas, caracterizadas pela presença de dois anéis aromáticos unidos por uma cadeia de três carbonos com sistema α , β -insaturado à carbonila. Além disso, participam da via de biossíntese dos flavonoides como intermediários derivados do aminoácido fenilalanina (CHAVAN *et al.*, 2016; ROZMER; PERJÉSI, 2016).

Naturalmente, elas são encontradas, principalmente, como pigmentos de pétalas, sendo também isoladas de casca, cerne, raízes, folhas e frutos de diversas espécies de plantas, como as dos gêneros *Angelica*, *Glycyrrhiza*, *Piper* e *Ruscus*. As plantas contendo chalconas têm sido utilizadas na medicina tradicional por muito tempo, a Kava (*Piper methysticum*) foi utilizada em regiões do Sul do Pacífico como um agente anti-inflamatório, antioxidante e hepatoprotetor (NI; MENG; SIKORSKI, 2004; ROZMER; PERJÉSI, 2016).

Alguns trabalhos anteriores relatam a atividade antibacteriana de chalconas tiofênicas e alguns de seus derivados frente a linhagens, multiresistentes a antibióticos comumente utilizados no combate a infecções bacterianas. Os resultados demonstram atividade moderada frente a estes microrganismos, sendo também, a utilização de chalconas substituídas em sinergia com antibióticos, também relatada como uma opção para uma ação mais eficaz contra cepas multirresistentes de *Staphylococcus aureus* (BOŽIĆ *et al.*, 2014; FANG *et al.*, 2014).

2.1.2 Síntese e atividade das chalconas

O grande interesse pela busca de uma forma mais eficiente de sintetizar as chalconas se deve ao fato destes compostos possuírem uma ampla faixa de atividades biológicas, apesar de sua estrutura ser relativamente simples, são relatadas diversas atividades biológicas como: atividade anti-inflamatória (BANDGAR *et al.*, 2010a, 2010b; SEBTI *et al.*, 2001; VOGEL *et al.*, 2010; WU *et al.*, 2011), antioxidante (SHENVI *et al.*, 2013; WU *et al.*, 2011), anti-malária (KUMAR *et al.*, 2010), antibacteriana (MOREIRA OSÓRIO *et al.*, 2012) anticâncer (VINCENZO *et al.*, 2000; MAI *et al.*, 2014; MOURAD *et al.*, 2012), citotóxica (KUPCEWICZ *et al.*, 2014) e antileishmania (BARBOSA *et al.*, 2011; BOECK *et al.*, 2006; NIELSEN *et al.*, 1998).

Essa vasta gama de atividades é, em grande parte, atribuída às inúmeras possibilidades de substituições nos anéis aromáticos das chalconas, pois a metodologia de síntese das mesmas, baseada na condensação de Claisen-Schmidt, possibilita a obtenção de uma grande quantidade de compostos, uma vez que existem inúmeros benzaldeídos e acetofenonas comerciais que podem ser combinados, fornecendo a variedade estrutural pretendida (DUCKI *et al.*, 1998).

No desenvolvimento de novas chalconas, muito do que se tem feito, é a utilização de uma cetona aromática em diversas reações de condensação com aldeídos aromáticos distintos. Desta forma, é possível obter grupos diferentes que poderão ser testados em condições similares para obtenção de um candidato mais efetivo para o efeito biológico esperado (BERTOLDO *et al.*, 2015).

Chalconas heterocíclicas têm tido as mais diversas atividades relatadas na literatura, sendo a presença de um grupo furânico ou tiofênico relacionada principalmente com a atividade anti-inflamatória destes compostos e a presença de grupos indólicos com atividade antitumoral (MATHEW *et al.*, 2014). Os anéis heterocíclicos são encontrados em mais de 90% dos novos fármacos desenvolvidos, como captopril, diazepam, metronidazol; e também em produtos naturais como codeína e atropina (DUA *et al.*, 2011).

A substância 3-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-5-(tiofen-2-il)-4,5-dihidro-1H-pirazol-1-carbotioamida, também conhecida como GA-4, é uma chalcona tiofênica recém-sintetizada (Figura 1), portanto, ainda não existem artigos publicados de sua síntese, atividade biológica e/ou predições de atividades. Na busca por similaridade de subestrutura na base de dados Scifinder, são encontrados dois artigos de duas moléculas distintas com metilação no anel tiofênico nas posições 3 e 5, respectivamente. A metodologia utilizada para sintetizar estas moléculas consiste na catálise ácida (ácido acético ou amberlyst-15) da chalcona com a tiossemicarbazida ou hidrocloreto de tiossemicarbazida com rendimentos de 72%. Uma das moléculas apresentou atividade antimicrobiana promissora contra *E.coli*, *B. subtilis*, *A. niger* e *A. flavus*, possivelmente por sua capacidade de sequestrar ferro do meio, diminuindo a disponibilidade, deste, para os microrganismos (PRABHUDEVA *et al.*, 2018). Ainda foram feitos testes antitumorais com 60 linhagens celulares, para os quais o composto se mostrou inativo (INSUASTY *et al.*, 2012).

2.2 ESTUDO DA FARMACOCINÉTICA E TOXICIDADE *IN SILICO*

A grande evolução da Química Medicinal tem permitido a descoberta de notáveis inovações terapêuticas, proporcionando sensíveis benefícios em dois componentes principais: saúde física e mental. As novas tecnologias a serviço do processo de descoberta e desenvolvimento de fármacos levaram, de forma inegável, as melhorias significativas na qualidade de vida das diversas populações no mundo (CAPRINO, RUSSO, 2006).

Os métodos em quimio e bioinformática estão integrados ao planejamento de fármacos (RUSSO, 2002). Modelos *in silico* (expressão usada com o significado de "executado em computador") estão sendo empregados nos estágios iniciais de P&D na seleção e otimização de moléculas com maior potencial de desenvolvimento. Estes modelos devem ser integrados aos ensaios *in vitro* e *in vivo* com o propósito de diminuir a quantidade de moléculas avaliadas maximizando as chances de sucesso na identificação de Novas Entidades Químicas (NCEs) qualificadas (MODA, MONTANARI, ANDRICOPULO, 2007).

Através de programas computacionais é possível prever a toxicidade de substâncias candidatas a fármacos. Orientando, assim, os demais testes a serem realizados e minimizando as possíveis falhas no estágio avançado no design de medicamentos (RAIES, BAJIC, 2016).

Cada vez mais, tem-se desenvolvido novas abordagens computacionais com capacidade e aplicabilidade à toxicologia preditiva (PARTHASARATHI, DHAWAN, 2018; PAWAR *et al.*, 2019). Uma ferramenta útil que tem sido bastante utilizada no campo químico e farmacêutico, é o admetSAR, que é um programa gratuito, capaz de prever as características farmacocinéticas e toxicológicas de um candidato a fármaco (YANG *et al.*, 2019). Assim como o programa computacional *molispiration*, que também é um programa on-line, que utilizando a "regra dos cinco" de Lipinski como parâmetro de avaliação no processo de triagem das substâncias, consegue prever as características de absorção e permeabilidade do fármaco (TARIQ *et al.*, 2016).

2.3 DOCKING MOLECULAR

Um dos mais importantes avanços no planejamento e descoberta de novos fármacos tem sido a utilização da modelagem molecular ou *docking* molecular. Ela

tem se firmado como uma ferramenta indispensável não somente no processo de descoberta de novos fármacos, mas também na otimização de um protótipo já existente ou obtido pelo próprio estudo de modelagem molecular.

Desde a concepção do alvo biológico até a descoberta de um novo fármaco, um processo que pode levar em média 11 anos ou mais. A bioinformática, juntamente com a química computacional, vem oferecendo um excelente direcionamento no planejamento racional de fármacos, já com inúmeros casos de sucesso, envolvendo o emprego de simulações computacionais (SILVA, 2007).

O *docking* molecular consiste em prever a melhor posição e orientação de um ligante em comparação a outra molécula, formando um complexo estável. Geralmente, é empregado para proteínas como receptoras e enzimas, mas pode ser utilizado para complexos com ácidos nucleicos ou carboidratos, por exemplo. Ao conhecer a orientação preferida, pode se prever a força da associação ou afinidade de ligação entre duas moléculas, usando funções de pontuação. As abordagens *in silico* atualmente permitem a triagem virtual (ou *virtual screening*) de milhões de compostos em um tempo acessível, reduzindo custos iniciais da identificação de *hits* e aumentando as chances de encontrar moléculas candidatas ao uso terapêutico (OLIVEIRA, A. R.S., 2018).

A democratização do *docking* se deu principalmente para o *screening* de moléculas com potencial de utilização na indústria farmacêutica. O objetivo inicial do *docking* era a investigação da ligação entre moléculas grandes e pequenas, porém, tornou-se amplamente utilizado para auxiliar diferentes tarefas nos programas de descoberta de drogas. Atualmente, estas incluem: identificação e otimização de *hits*, identificação de alvos para ligação com um ligante específico (*docking* reverso), *design* de ligantes multi-alvo e reposicionamento de drogas (novas ações para fármacos já comercializados) (PINZI *et al.*, 2019).

Para a execução de um *docking*, primeiramente, é necessário avaliar o espaço conformacional disponível para o ligante e então obter valores referentes à afinidade de ligação (função de pontuação). É importante levar em conta que os algoritmos diferem no peso dado a interações não covalentes específicas e/ou parâmetros entrópicos, produzindo um conjunto diversificado de resultados para o mesmo banco de dados de ligantes no mesmo alvo. Essa pontuação é calculada comparando a conformação de raios X e a posição do ligante, geralmente pela determinação do RMSD das moléculas. As funções de pontuação reproduzem adequadamente as

conformações associadas se as mínimas globais (ou locais) forem inferiores ao 2Å. Três principais limitações do *docking* incluem incapacidade de modelar com precisão o solvente, a entropia e a flexibilidade do alvo (LOHNING *et al.*, 2017).

De forma geral, é necessário adicionar os hidrogênios polares na molécula, computar as cargas, indicar o sítio ativo do ligante na *Grid Box*, escolher as regiões flexíveis do ligante e então performar o *docking*.

2.4. ESTUDO DE TOXICIDADE *IN VIVO*

Para o desenvolvimento de novos fármacos, um processo deve ser seguido e uma das etapas desse processo é a avaliação, em pesquisa não clínica dessa droga. A avaliação da toxicidade oral aguda tem como objetivo avaliar a toxicidade dessa substância quando ingerida por um organismo, sendo ela administrada em dose única ou mais doses durante um período não superior a 24 horas (MATOS, 2017).

O estudo da toxicidade aguda consiste em uma importante metodologia para investigação dos possíveis danos que uma substância pode causar em um ser vivo. Quando esta é exposta por um curto período de tempo (não superior a 24 horas), seguido de observação dos animais tratados por cerca de duas semanas. Sendo possível ao fim, juntamente com outros dados de toxicidade, estabelecer parâmetros de segurança para viabilizar o uso em humanos (LUCENA *et al.*, 2015; PINTO *et al.*, 2016).

Um dos parâmetros avaliados em um estudo de toxicidade aguda é a Dose Letal (DL₅₀), que consiste na avaliação da dose que é capaz de matar 50% dos animais. Quanto maior o valor da DL₅₀, menor a toxicidade da substância em estudo (GHAN *et al.*, 2016).

Desse modo, a utilização de animais passou a ser de fundamental importância para o prosseguimento das pesquisas científicas, inclusive os estudos de atividade de novos fármacos (MEDEIROS, 2018).

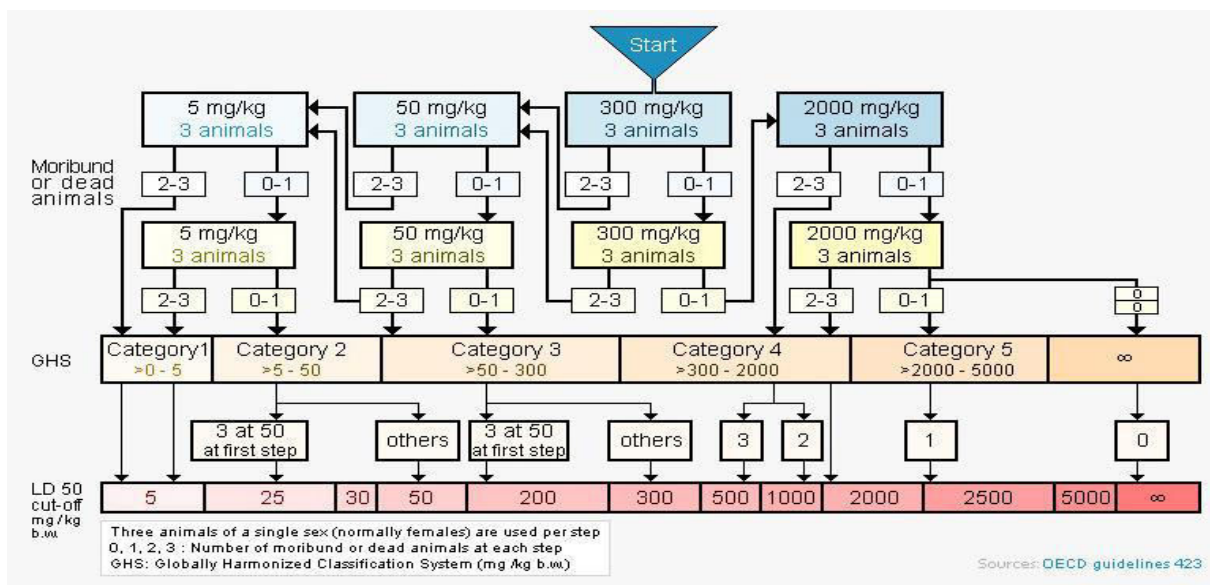
Nos estudos *in vivo*, devido às várias características genéticas e fisiológicas muito parecidas com os seres humanos, usam-se roedores, principalmente, para esses estudos (CARVALHO *et al.*, 2009; LIMA *et al.*, 2014). A fim de garantir uma dose segura de um produto teste que pode ser consumido, é de suma importância a

realização de testes toxicológicos, visto que toda substância é potencialmente tóxica (FENALTI *et al.*, 2016).

No Brasil, o Guia para a Condução de Estudos não Clínicos de Toxicologia e segurança farmacológica necessária ao desenvolvimento de medicamentos orienta a realização de estudos não clínicos, além de sugerir um método para estimar a dose letal de uma substância, utilizando modelos animais, como preconizado pelos guias da OECD (Organization for Economic Cooperation and Development) (BRASIL, 2013). Entre os guias da OECD, citam-se vários estudos, como as OECDs 420, 423 e 425, que se trata de métodos para avaliar a toxicidade aguda oral (OECD, 2001; OECD, 2002; OECD, 2008). Estas diferem nas suas finalidades, número de animais utilizados e doses.

De acordo com protocolo da OECD 423 (2001) é possível estabelecer faixas de exposição à substância, que variam de 5 mg/kg da dose a 2000 mg/kg, nas quais a letalidade é estudada. Além disso, esse protocolo disponibiliza uma tabela para classificação da GHS (Globally Harmonised Classification System) da substância em análise. Este sistema consiste em uma classificação técnica internacional, do grau de toxicidade que as substâncias podem oferecer, permitindo assim, categorização do seu grau de segurança. Para realização de estudos de toxicidade aguda oral, as substâncias podem ser classificadas em categorias de 1 a 5, indicando do maior ao menor grau de toxicidade (UNECE, 2019). E para a realização desse estudo, a OECD 423 (2001) fornece um fluxograma (**Figura 2**), no qual sugere a dose inicial do estudo, quando não se tem informações anteriores a respeito da substância teste, além de classificar a substância na classificação GHS.

Figura 2 - Procedimento de ensaio de toxicidade aguda com dose inicial de 300 mg/kg.



Fonte: OECD 423, (2001).

2.5. SISTEMA NERVOSO

O sistema nervoso pode ser dividido em Sistema Nervoso Periférico (SNP) e Sistema Nervoso Central (SNC). O SNP é composto por neurônios que ligam o SNC aos locais somáticos e viscerais. Este sistema é dividido em sistema nervoso autônomo que é involuntário, e sistema nervoso sensitivo e somático, que é voluntário (GOLAN, 2014).

Já o SNC, é composto pelo encéfalo e a medula espinal, e assim como o SNP, o SNC também é composto por gânglios e neurônios (SILVERTHORN, 2017). Os neurônios são células altamente especializadas (NIKOLETOPOULOU, PAPANDREOU, TAVERNARAKIS, 2015), que transmitem as mensagens de um sistema a outro. O SNC recebe os sinais enviados pelo SNP, processa-os e retransmite a resposta à periferia. É responsável pela percepção, linguagem, consciência, vigília, processamentos sensitivos, visual e auditivo, além da consciência (GOLAN, 2014).

O SNC é protegido por camadas de membranas, chamadas de meninges, além de líquidos como o líquido cefalorraquidiano. A última camada de proteção do encéfalo é a barreira hematoencefálica, que fica entre o líquido intersticial e o sangue. A barreira hematoencefálica isola o encéfalo de substâncias potencialmente

nocivas do sangue e de patógenos circulantes (SILVERTHORN, 2017). Durante muitos anos, pesquisadores têm buscado terapias que sejam efetivas no tratamento de doenças que afetam o sistema nervoso central (STOCKWELL *et al.*, 2014).

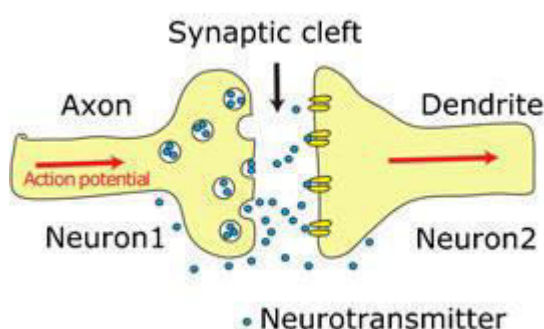
O córtex cerebral consiste em uma importante camada do cérebro, com aproximadamente 16 bilhões de neurônios. Atua como centro integrador de informação sensorial, região de tomada de decisões, pensamentos mais elevados, comunicação verbal e resposta a ações motoras complexas (LEOPOLD *et al.*, 2019). O córtex também é o local de ação de diversos fármacos, como o de barbitúricos e benzodiazepínicos que são hipnóticos e sedativos que atuam potencializando a ação de neurotransmissores inibitórios no córtex (GOLAN, 2014).

2.5.1 Neurotransmissores do SN

O sistema nervoso utiliza substâncias químicas, chamadas de neurotransmissores para trocar informações, principalmente no cérebro. Os neurotransmissores apresentam diferentes estruturas e funções, podendo ser aminoácidos, aminas biogênicas e outros (GOLAN, 2014). Apresentam vital importância para manutenção da homeostase do corpo (MITTAL *et al.*, 2016).

Essas substâncias químicas ficam armazenadas em vesículas nos neurônios. Ao ocorrer um estímulo, é gerado um potencial elétrico, e então ocorre uma cascata complexa de eventos que fazem com que a membrana da vesícula se funda com a membrana do neurônio e ocorra a liberação do neurotransmissor no espaço extracelular, podendo ser a fenda sináptica. Esses neurotransmissores, ligam-se aos seus receptores em uma segunda célula e assim desencadeiam vários processos até exercer sua ação final (**Figura 3**) (PRADHAN *et al.*, 2014; POLO, KRUSS, 2015).

Figura 3 - Liberação do neurotransmissor na fenda sináptica.



Fonte: POLO, KRUSS, (2015).

Os neurotransmissores podem ter ação inibitória ou excitatória. O ácido gama-aminobutírico (GABA) é um neurotransmissor inibitório, assim como a também a glicina (ITO, 2016; DUBEY *et al.*, 2017; GODFREY *et al.*, 2018). O GABA é o principal neurotransmissor inibitório e o glutamato o principal neurotransmissor excitatório do SNC (DUMAN, SANACORA, KRYSTAL, 2019). Os neurotransmissores também podem ser divididos de acordo com sua estrutura. Tendo os aminoácidos como GABA, glicina e glutamato, e os derivados de aminas biogênicas (serotonina, dopamina, noradrenalina e histamina) (BENSON *et al.*, 2015), e outros neurotransmissores como peptídeos (acetilcolina, adenosina e trifosfato de adenosina (ATP)) e neurotransmissores gasosos como o óxido nítrico (NO) (GOLAN, 2014; PRADHAN *et al.*, 2014).

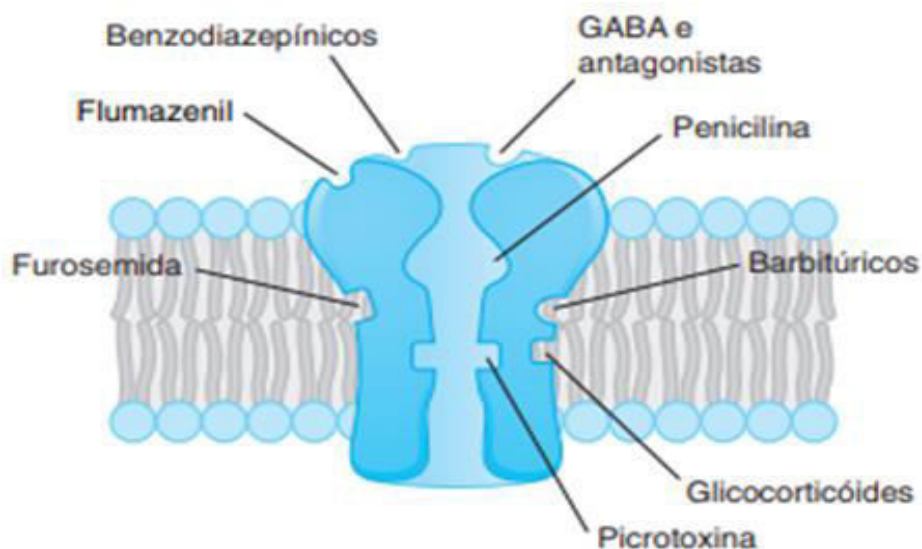
2.5.2 Neurotransmissores de Aminoácidos

O GABA é o principal neurotransmissor inibitório do SNC. É originado a partir da descarboxilação do glutamato, pela enzima Descarboxilase de L-Glutamato (GAD) (WU *et al.*, 2018). Este neurotransmissor é acondicionado em vesículas pré-sinápticas chamadas de vesículas transportadoras de GABA VGAT, até que o neurônio receba um estímulo e ocorra a liberação do GABA para fenda sináptica (ROCHA *et al.*, 2018).

Este neurotransmissor possui 3 tipos de receptores: GABA_A, GABA_B e GABA_C. O receptor GABA_A (**Figura 4**) é ionotrópico, sendo formado por diferentes subunidades na qual se ligam diferentes substâncias como o neurotransmissor GABA, barbitúricos, benzodiazepínicos e outros. A ativação deste receptor abre um canal que permite o influxo do íon cloreto, levando a hiperpolarização da membrana e assim à inibição do potencial de ação (TRITSCH, GRANGER, SABATINI, 2016; ROCHA *et al.*, 2018).

O receptor GABA_A está presente em cerca de 50% das sinapses do cérebro, sendo, portanto, um importante alvo de diversas drogas que atuam em locais distintos, como é o caso de benzodiazepínicos e barbitúricos. A disfunção deste canal leva a transtornos de ansiedade, epilepsia, e distúrbios do desenvolvimento neurológico, incluindo autismo (BRAAT, KOOY, 2015; CHUANG, REDDY, 2018; ZHU *et al.*, 2018).

Figura 4 - Receptor ionotrópico GABA_A.



Fonte: Golan, (2014). Receptor GABA_A e seus sítios de ligação.

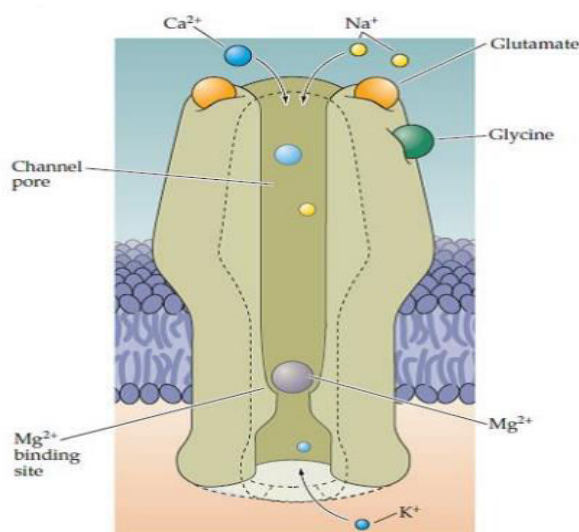
O glutamato é o neurotransmissor mais abundante do SNC. Tendo em vista que a maioria dos neurônios o utiliza, esta substância pode ser sintetizada a partir da glutamina por meio de reação enzimática (PÁL, 2018). Também pode ser formada em vesículas sinápticas isoladas a partir de α -cetoglutarato (não de glutamina) por aspartato aminotransferase. E isso faz com que se tenha um preenchimento mais rápido da vesícula pelo glutamato e se tenha uma transmissão sináptica mais eficiente (TAKEDA, UEDA, 2017).

Após despolarização neuronal, o glutamato é liberado na fenda sináptica, podendo ligar-se a um dos seus canais ionotrópicos: NMDA, ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico (AMPA) ou cainato, que se encontram na membrana pós-sináptica. O glutamato também pode ligar-se a receptores metabotrópicos (mGluRs), normalmente encontrados extrasináptica e pré-sinápticamente (LENER *et al.*, 2016). O glutamato extrasináptico está envolvido em vários fenômenos fisiológicos do sistema nervoso central, como aprendizagem, sono, memória e outros (PÁL, 2018).

O receptor NMDA (**Figura 5**) assim como o GABA, são constituídos de várias subunidades proteicas e apresentam estrutura heteropentamérica, na qual a depender da subunidade, apresenta uma propriedade distinta (ROCHA *et al.*, 2018). Estudos não clínicos e clínicos relatam que o sistema GABAérgico e glutamatérgico

estão envolvidos na etiologia da dor e depressão. Assim como as aminas biogênicas (BENSON *et al.*, 2015).

Figura 5 - Receptor NMDA.



Fonte: Rocha, *et al.*, (2018). O receptor contém locais de ligação para glutamato e glicina co-ativador, bem como um local de ligação de Mg^{2+} no poro do canal. Em potenciais hiperpolarizados, a força motriz elétrica no Mg^{2+} impulsiona íon no poro do receptor e bloqueia-o.

2.5.3 Neurotransmissores de Aminas Biogênicas

As aminas biogênicas são constituídas pela: serotonina, dopamina e noradrenalina. Estas são catabolizadas pela Monoamina Oxidase do tipo A (MAO_A). O aumento da expressão de MAO_A , e a diminuição dos níveis cerebrais de serotonina e noradrenalina, são uma das principais causas dos transtornos depressivos (NAOI, MARUYAMA, SHAMOTO-NAGAI, 2018).

Os neurônios de serotonina são fundamentais na regulação das funções cerebrais. Disfunções do sistema de serotonina, especialmente quanto a sua liberação, estão associadas à esquizofrenia, depressão, ansiedade, e outras disfunções psiquiátricas (LU *et al.*, 2016). Seus receptores são estruturas heterotriméricas, pertencentes à família A, da superfamília do receptor, acoplado à proteína G (GPCR) A, com exceção do 5-HT3 (SHAH *et al.*, 2020).

A dopamina é uma amina biogênica no qual está envolvida quanto ao comportamento motor, emoção e cognição. Logo, distúrbios em seu sistema podem levar a problemas psiquiátricos como esquizofrenia e depressão (GRACE, 2016). A

anedonia é um dos sintomas de uma pessoa depressiva, e está associada à disfunção do sistema dopaminérgico (RINCÓN-CORTÉS, GRACE, 2020).

Outro neurotransmissor é noradrenalina (NA), uma catecolamina sintetizada a partir dos aminoácidos fenilalanina e tirosina. Esta substância medeia respostas fisiológicas do estresse e da ansiedade aguda, como aumento da frequência cardíaca, contração dos vasos sanguíneos, dilatação das pupilas e bronquíolos, entre outros (TERBECK *et al.*, 2016).

2.6 DEPRESSÃO

A depressão é uma desordem mental, sendo classificada como um tipo de transtorno do humor muito comum entre a população mundial, atualmente (SILVERTHORN, 2017). Estima-se que cerca de 300 milhões de pessoas em todo o mundo estão acometidas com essa doença. Ela é uma das principais causadoras de sofrimento e disfunção no trabalho, escola ou meio familiar, e em casos muito graves pode levar o enfermo ao suicídio (OPAS, 2020). Os sintomas mais comuns de um paciente com depressão estão associados à baixa autoestima, senso de rejeição, baixa energia, anedonia, perda de apetite, insônia, sentimento de culpa, preocupação excessiva, pensamentos suicidas (FASIPE, 2018; RINCÓN-CORTÉS, GRACE, 2020).

Pesquisas revelam que a depressão está relacionada às alterações cerebrais, podendo causar atrofia de neurônios nas regiões corticais e límbicas, além de modificações em outras regiões do cérebro, tais alterações podem estar relacionadas com o estresse, em combinação com glicocorticoides adrenais elevados, e citocinas inflamatórias, além de outros fatores ambientais (DUMAN, SANACORA, KRYSTAL, 2019).

Acredita-se que a falta de monoaminas no cérebro é o principal causador do transtorno depressivo, principalmente os neurotransmissores noradrenalina e serotonina (5-HT) (RANG *et al.*, 2016; HAASE, BROWN, 2015), como também, a dopamina (PAN *et al.*, 2018). Logo, tratamentos que aumentem o nível de monoaminas na fenda sináptica causam efeitos antidepressivos (SEKI, YOSHIDA, JAISWAL, 2018). O que evidencia esse fato é a existência de fármacos como: antidepressivos tricíclicos, inibidores da monoamino-oxidase (MAO), inibidores da recaptação de serotonina e noradrenalina, e outros (RANG *et al.*, 2016).

Sabe-se que a neurotransmissão inibitória e o equilíbrio com a transmissão excitatória são críticos para a função cerebral normal. Logo, também foi identificado que a base dessas alterações encontra-se na disfunção neuronal de neurônios excitatórios do glutamato, como também, nos interneurônios inibitórios do GABA. Isto é, a depressão e o estresse crônico causam déficits nos sistemas GABA e glutamato (LENER, *et al.*, 2017; GODFREY *et al.*, 2018; LISSEMORE *et al.*, 2018; DUMAN, SANACORA, KRYSTAL, 2019). As reduções de glutamato podem estar relacionadas com problemas em sua síntese ou metabolismo (LENER, 2016).

Estudos mostram que os benzodiazepínicos tem ação antidepressiva (SHENG *et al.*, 2017), tendo em vista que receptores GABA_A com subunidades $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ ou $\alpha 5$ estão envolvidos na regulação do humor (RUDOLPH, KNOFLACH, 2011).

O antagonismo do receptor do glutamato N-metil-D-aspartato (NMDA) causa ações antidepressivas (GODFREY *et al.*, 2018; WILKINSON, SANACORA, 2019). Já a regulação positiva para o glutamato, bem como para o sistema GABA melhora a integridade da sinalização nessas regiões e revertem os efeitos da exposição crônica ao estresse (DUMAN, SANACORA, KRYSTAL, 2019).

2.6.1 Antidepressivos

A maior parte dos antidepressivos age pelo aumento da disponibilidade funcional das aminas biogênicas serotonina e noradrenalina. Assim como também evidências relatam que mecanismos GABAérgicos e glutamatérgicos também estão envolvidos nas ações destes medicamentos (BENSON *et al.*, 2015). Também, estudos mostram que antagonistas do receptor NMDA, como a cetamina, apresentam efeitos antidepressivos. E que quando administrados em conjunto com outros antidepressivos, há uma redução dos efeitos adversos causados pela cetamina (PODKOWA *et al.*, 2016).

Atualmente, os antidepressivos disponíveis na clínica são classificados em 13 classes diferentes de acordo com seu mecanismo de ação. Os mais clássicos são os antidepressivos tricíclicos (ADTs) e os inibidores da monoamina oxidase (MAOIs), e os mais prescritos são os Inibidores da Recaptação de Serotonina (IRS) (FASIFE, 2018; XU *et al.*, 2018).

2.6.1.1 Antidepressivos Tricíclicos (ADTs)

Os antidepressivos tricíclicos são compostos pelos fármacos imipramina, desipramina, amitriptilina, nortriptilina e clomipramina. Estes agem inibindo a recaptação de Serotonina e Noradrenalina da fenda sináptica através do bloqueio de seus transportadores de recaptação (SHENG *et al.*, 2017).

A depressão está associada ao ciclo circadiano. Muitos indivíduos depressivos são acometidos por distúrbios no seu sistema de sono e vigília (BECHTEL, 2015). Um dos tratamentos para tal efeito é a imipramina, que é um antidepressivo tricíclico, no qual estudos agudos e crônicos demonstram seu efeito mais notável pela manhã, tendo assim uma ação farmacológica dependente do sistema circadiano (KAWAI *et al.*, 2018).

Estudos mostram que os receptores GABA_A podem ter alguma implicação no mecanismo de ação dos antidepressivos tricíclicos, e por isso também a potência desses medicamentos em pacientes com transtornos de ansiedade (KOROLEV *et al.*, 2020).

2.6.1.2 Inibidores da Monoaminoxidase (IMAOs)

Os IMAOs agem inibindo a atividade de uma ou de ambas as enzimas monoamina oxidase, a monoamina oxidase A (MAO-A) e a monoamina oxidase B (MAO-B). Desta forma, impedem a quebra dos neurotransmissores monoaminérgicos, e estes ficam mais tempo disponíveis na fenda sináptica. Polimorfismos, no gene MAO-A, foram associados a uma série de características comportamentais, no qual sua superexpressão pode estar ligada à depressão (FINBERG, RABEY, 2016; FASIPE, 2018). Os IMAOs que apresentam inibição não seletiva e irreversível são: fenelzina, nialamida, isocarboxazida, hidracarbazina e tranilcipromina. Atualmente os IMAOs reversíveis e seletivos MAO-B aprovados pelo FDA são: selegilina, rasagilina e safinamida (FASIPE, 2018).

Foi relatado que os inibidores da MAO não restauram

neurotransmissores comprometidos, mas também, protegem os neurônios da morte celular na depressão através da indução de fatores neurotróficos e antiapoptóticos (Bcl-2) (NAOI, MARUYAMA, SHAMOTO-NAGAI, 2018).

Estudos mostram que o uso de IMAOs no início do tratamento depressivo apresenta melhor resposta do que ADTs (KIM, XU, AMSTERDAM, 2019). E que quando usados em conjunto pode ser relativamente seguro e eficaz em comparação com a terapia combinada entre apenas ADTs (AMSTERDAM, KIM, 2019).

2.6.1.3 Inibidores da Recaptação de Serotonina (IRS)

A serotonina (5-HT) é uma monoamina cuja diminuição da sua concentração na fenda sináptica está associada à etiologia dos transtornos de humor, em especial à depressão. Os transportadores serotoninérgicos são os principais reguladores de serotonina no cérebro, portanto, é um alvo para medicamentos no tratamento da depressão, como é o caso do IRS (HAASE, BROWN, 2015). Além dos inibidores da recaptação de serotonina, têm-se também os inibidores da recaptação de noradrenalina (IRN) (ZHONG *et al.*, 2017). Tanto os IRS como os IRN, são considerados antidepressivos de segunda geração, e atualmente são os mais utilizados na clínica por sua maior segurança (XU *et al.*, 2018).

2.7 ESTUDOS PSICOFARMACOLÓGICOS NÃO CLÍNICOS

Para o desenvolvimento de medicamentos foi realizada inicialmente a pesquisa não clínica em animais, para que possa ser avaliada a ação da substância estudada de forma segura. Usam-se modelos animais que possam imitar os aspectos de uma doença, próximo ou semelhante de como ocorreria nos seres humanos. Para ser representativo da condição humana os modelos animais devem satisfazer os critérios de validação, que são determinados a partir de longos estudos e protocolados pelos pesquisadores. Um desses critérios de validação preconiza que o animal compartilhe um mecanismo patológico comum ao do homem com relação à determinada doença (HENDRIKSEN, GROENINK, 2015; CZÉH *et al.*, 2016).

Para a investigação do mecanismo da depressão e estudo de novos antidepressivos, são utilizados modelos animais (camundongos Swiss) através de testes comportamentais (HAO *et al.*, 2019). São realizados alguns testes para estudo de possíveis drogas antidepressivas, através de metodologias validadas, como o teste de natação forçada, teste de suspensão da cauda, teste de preferência

de sacarose e teste de campo aberto. O teste do nado forçado é bastante utilizado devido à sua alta validade preditiva (HENDRIKSEN, GROENINK, 2015). Ele avalia o comportamento do animal quando colocado em um recipiente com água, no qual é observado se este tenta escapar ou flutua. Quanto maior o tempo de imobilidade significa, assim, um comportamento depressivo (COSTA *et al.*, 2013). Isso porque esse teste fornece uma visão da resposta ao estresse. Este é um fator que contribui para depressão em humanos, e a depressão está relacionada à resposta alterada ao estresse (COMMONS *et al.*, 2017).

O teste do campo aberto avalia a atividade locomotora do animal, de forma que quando reduzida, indica comportamentos semelhantes à ansiedade, associados à depressão. Assim como o teste pela preferência da sacarose, indica que, a diminuição da preferência pela sacarose é sinal de anedonia, um sintoma comum da depressão, definido como a perda da capacidade de sentir prazer (ZHANG *et al.*, 2017; MOORE, BEIDLER, HONG, 2018).

Outro teste é o de suspensão da cauda, na qual se o animal apresentar maior tempo de imobilidade indica um comportamento mais depressivo. Sendo comum a utilização deste teste em camundongos devido ao menor peso, mas também são realizados em ratos. (WANG^b *et al.*, 2017; ARAUCHI *et al.*, 2018).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar a farmacocinética, toxicidade, modelagem molecular e atividade psicofarmacológica *in silico* e *in vivo* do composto GA-4.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterização da substância GA-4 através de Ressonância Magnética Nuclear (Ascend™ 400, Bruker);
- Analisar as características farmacocinéticas e toxicológicas teóricas por meio de ensaios *in silico*;
- Realizar a análise do *Docking* molecular ou acoragem molecular (para observar o comportamento da molécula no sítio de ligação das proteínas alvo como também observar as interações moleculares);
- Realizar estudo toxicológico agudo em ratas *Wistar*, estimar a DL₅₀, e classificação na GSH; com triagem farmacológica, além de mensurar o consumo de água, ração e evolução ponderal;
- Avaliar o efeito da amostra sobre os parâmetros hematológicos e bioquímicos do sangue de ratas;
- Realizar estudo anatomopatológico e histológico dos órgãos dos animais;
- Avaliar através do teste de campo aberto os efeitos da substância GA-4 sobre a atividade locomotora dos camundongos;
- Avaliar o efeito antidepressivo da substância GA-4 através do teste do nado forçado dos camundongos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 LOCAL DE PESQUISA

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Ensaio Toxicológicos (LABETOX), da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), coordenado pela Prof^a Dr^a Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz e pela Prof^a Dr^a Caliandra Maria Bezerra Luna Lima. Também foram realizados experimentos no Laboratório de Pesquisa de Síntese Orgânica - UFPB, sob a orientação do Prof. Dr. Luis Cezar Rodrigues e no Laboratório de Técnicas Histopatológicas Prof^a.Dr^a.Maria Selma Feitosa Ventura, sob a coordenação da Prof^a. Dr^a. Giciane Carvalho Vieira.

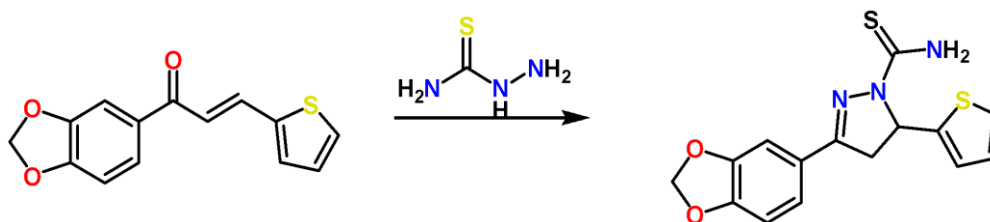
4.2 MATERIAIS

4.2.1 Substância Teste

A substância sintética GA-4 (**Figura 1**) utilizada foi gentilmente fornecida pelos colaboradores do Laboratório de Pesquisa de Síntese Orgânica - UFPB sob a coordenação do Prof. Dr. Luis Cezar Rodrigues.

Em um tubo de reação, foram adicionados a chalcona tiofênica (2 mMol), tiossemicarbazida (1,75 mMol) e hidróxido de sódio (2 mMol) e solubilizados em 25 mL de etanol absoluto. A reação foi mantida sob refluxo por 24 horas, durante este tempo há mudança na coloração da reação que sai de um amarelo para uma cor mais avermelhada e também pode ser observada a precipitação de um sólido branco. Uma vez que não há mais chalcona na reação, o sólido foi filtrado e o sobrenadante concentrado para aumentar a precipitação do produto. O sólido branco obtido foi seco em dessecador e pesado posteriormente (**Figura 6**).

Figura 6 - Reação de preparação da substância GA-4.



Fonte: Dados da pesquisa, (2019).

4.2.2 Animais

Para o teste de toxicidade aguda foram utilizadas ratas *Wistar* (*Ratus norvegicus*), albinas, fêmeas (nulíparas e não grávidas), com idade entre 7-8 semanas, pesando entre 180 e 220 g. Já para os estudos psicofarmacológicos, foram utilizados 40 camundongos *Swiss* (*Mus musculus*) pesando entre 28 e 32g. Fornecidos pela Unidade de Produção Animal (UPA) do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM), UFPB, Brasil. Todos os animais foram agrupados em gaiolas de polietileno medindo 49X34X16cm contendo até 3 animais. Foram mantidos sob condições controladas de temperatura de 22 ± 3 °C, em ciclos de claro e escuro de 12 horas (6h00 as 18h00 claro e de 18h00 as 6h00 escuro) com livre acesso à água e a uma dieta controlada, a base de ração do tipo *pellets* durante todo o período de experimentação, e sem uso de qualquer medicamento. Os procedimentos experimentais foram analisados e aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEUA) da UFPB, protocolo N° 048/2015. A eutanásia dos animais foi realizada por sobredose de solução anestésica contendo 300 mg/kg de Cetamina e 30 mg/kg de Xilasina, sendo administrado por via intraperitoneal (IP).

4.3 MÉTODOS

4.3.1 Caracterização da substância GA-4

A caracterização da substância GA-4, foi feita no Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análises por meio de análise de Ressonância Magnética Nuclear (Ascend™ 400, Bruker) em solvente deuterado adequado (clorofórmio) em concentrações de 100 mg/mL. O ponto de fusão foi medido em equipamento digital modelo PFD III (Marte Científica) utilizando capilares de vidro e termômetro de mercúrio em temperaturas de até 300 °C.

4.3.2 Ensaios Toxicológicos *in silico*

4.3.2.1 Molinspiration

As propriedades moleculares foram calculadas, com base em descritores moleculares utilizando a regra dos cinco de Lipinski, no software *Molinspiration Online Property Calculation Toolkit* (www.molinspiration.com/). A investigação de *Lipinski* e colaboradores deu origem à chamada “regra dos 5”, que traçou um perfil para moléculas de fármacos dentro de limites de massa molar, lipofilia, que é representada pelo coeficiente de partição, log P, e hidrofilia, representada pelo número de doadores e receptores de ligação de hidrogênio. A regra dos cinco estabelece alguns parâmetros estruturais relevantes para a predição teórica do perfil de biodisponibilidade oral. Esta biodisponibilidade está associada à absorção e a permeabilidade de possíveis fármacos e depende de cinco parâmetros: (a) número de grupos aceptores de ligação hidrogênio (nALH) menor ou igual a 10; (b) número de grupos doadores de ligação hidrogênio (nDLH) menor ou igual a 5; (c) massa molecular (MM) menor ou igual a 500 g/mol; (d) coeficiente de partição octanol-água (milog P) menor ou igual a 5; (e) área de superfície polar (PSA) menor ou igual a 140 Å. Moléculas que não atendem mais do que um destes parâmetros podem ter problemas com a biodisponibilidade (SILVA, 2015).

4.3.2.2 AdmetSAR

Os parâmetros farmacocinéticos e toxicológicos teóricos (ADMET – Absorção, Distribuição, Metabolização, Excreção e Toxicidade) foram calculados com o objetivo de analisar se a substância possui as características essenciais para que possa ser considerada como possível fármaco. Alguns parâmetros relacionados à absorção, toxicidade e metabolização foram avaliados pela ferramenta admetSAR (<http://lmmd.ecust.edu.cn:8000/>) (SOUZA, 2015). Esses parâmetros são: permeabilidade na barreira hematoencefálica, permeabilidade Caco-2, absorção no intestino, se são substratos e inibidores das enzimas do complexo citocromo e se são inibidores de transporte renal de cátions. Através desta ferramenta foi avaliada a metabolização utilizando algumas enzimas do complexo citocromo P450, comparando se os compostos são substratos para os citocromos CYP450 2D6, CYP450 3A4, CYP450 2C9, se são inibidores dos citocromos CYP450 1A2, CYP450

2C9, CYP450 2D6, CYP450 2C19, CYP450 3A4 assim como a promiscuidade de inibição dos citocromos.

4.3.3. Estudo da modelagem molecular (*docking*)

No *Protein Data Bank* (PDB) foi obtida a estrutura cristalográfica das proteínas no formato PDB para sua utilização nos programas *AutoDockVina* e *AutoDockTools*. Foi obtido o receptor α 2-adrenérgico e seu antagonista ioimbina (código PDB 6K41). As substâncias-teste utilizadas foram desenhadas no *Chem Draw* (v.18.0), exportadas no formato SDF e posteriormente transformadas no formato PDB utilizando o software *PyMol*. O arquivo da proteína obtido no PDB foi processado no *AutoDockTools* para remoção de ligantes e adição de hidrogênios polares, gerando um arquivo PDBQT, necessário para os cálculos do *AutoGrid*. O mesmo foi feito para os ligantes que foram gravados na extensão PDBQT na opção *Save as PDBQT* do *software*.

Utilizando ainda a ferramenta *AutoDockTools* com a proteína-alvo, no menu *Grid*, foi definido o espaço tridimensional no qual o ligante pode se ligar à proteína. O valor definido nas opções do *Grid Box* para as coordenadas x, y e z foram 76, 126 e 126, respectivamente. Estes valores foram inseridos no arquivo de configurações do *docking* para ser utilizado no *AutoDockVina*. O *docking* foi feito em linha de comando, na pasta, contendo todos os arquivos necessários através do comando "*vina --config conf.txt --log logSO.txt*". O processo foi repetido duas vezes para se obter os resultados dos dois ligantes testados. O arquivo PDBQT gerado foi visualizado no *PyMol* para obtenção das poses.

4.3.4. Ensaio Toxicológico In vivo

4.3.4.1. Toxicidade Aguda

O teste de toxicidade oral aguda foi realizado segundo o Guia para a condução de Estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológicos, necessários ao desenvolvimento de medicamentos (ANVISA, 2013) e segundo a OECD 423 (2001) com modificações. Os animais foram divididos em dois grupos: controle e tratado. O grupo controle recebeu por via oral o veículo de diluição

(Tween 80 a 5%) e água. Já para o grupo tratado, foi administrado a substância GA-4, sendo a dose de partida de 300 mg/kg com posterior repetição da dose. A não ocorrência de morte direcionou o experimento a prosseguir utilizando a dose de 2000 mg/kg, finalizando com uma nova repetição, seguindo assim o fluxograma disponibilizado pela OECD (2001). Para o grupo controle foram utilizados 6 animais e 3 ratas por grupo tratado.

Ao final dos 14 dias de avaliação, os animais foram eutanasiados por sobredose de anestésicos (Cetamina: 300 mg/kg e Xilazina: 30 mg/kg), na intenção de amenizar o sofrimento dos mesmos. Logo após a eutanásia, o sangue dos animais foi coletado para a realização dos exames bioquímicos.

4.3.4.2. Avaliação Comportamental

A triagem farmacológica comportamental é uma metodologia preliminar que avalia o possível efeito de uma droga no SNC e SNA, na qual foram observados parâmetros comportamentais nos animais que possibilitam caracterizar o efeito central da substância (ALMEIDA; OLIVEIRA, 2006). Após a administração da GA-4, foi realizada a observação de parâmetros comportamentais através da triagem farmacológica nos intervalos: 30, 60, 120, 180 e 240 minutos, seguindo protocolo experimental elaborado pelo Setor de Psicofarmacologia do IPeFarM /UFPB.

4.3.4.3. Consumo de Água e Ração

Neste experimento foi avaliado o consumo de água e de ração na forma de *pellets* pelos animais, durante todo experimento. Foram colocadas as mamadeiras graduadas com água e, no dia seguinte, registrou-se o volume de água ingerido pelos animais. Quanto ao consumo de alimentos, a ração foi colocada diariamente, nas gaiolas, no dia posterior, foi contabilizado o peso consumido de ração. Já a pesagem dos animais foi realizada no 1º dia (basal), no 7º e no 14º dia.

4.3.4.4. Avaliação Laboratorial do Sangue

Após jejum de 12 horas, as amostras de sangue foram recolhidas a partir do plexo braquial, sendo coletadas em tubos, contendo ácido etilenodiamino tetracético (EDTA) para determinação dos parâmetros hematológicos, e foram utilizados tubos com gel separador – Tubos para Coleta de Sangue VACUETTE® – posteriormente

centrifugados por 10 minutos a 3500 rpm, para obtenção do soro para a determinação dos parâmetros bioquímicos.

4.3.4.4.1 Avaliação dos Parâmetros Hematológicos

Nas análises hematológicas foram realizados estudos da série vermelha (eritrograma), branca (leucograma) e contagem de plaquetas. No eritrograma realizamos: a contagem de hemácias, determinação do hematócrito, da hemoglobina, do volume corpuscular médio (VCM), da concentração da hemoglobina corpuscular média (CHCM), da hemoglobina corpuscular média (HCM) e a amplitude de distribuição dos eritrócitos (RDW). No leucograma foi realizada a contagem global dos leucócitos e contagem diferencial dos leucócitos. Para a realização do hemograma foi utilizado o Analisador Hematológico URIT 3000 VET PLUS.

4.3.4.4.2. Avaliação dos Parâmetros Bioquímicos

Através das amostras de soro foram realizadas as análises bioquímicas, que consistiram nas dosagens de: glicose, colesterol total, ureia, triglicerídeos, creatinina, transaminases: Aspartato Amino Transferase (AST) e Alanina Amino Transferase (ALT), fosfatase alcalina (FAL), e proteínas totais, sódio, potássio, cálcio, magnésio, cloreto, fósforo, bilirrubina total, HDL, lipase, amilase e CK-MB foram determinadas pelo analisador bioquímico Architect c8000- Abbott.

4.3.4.5. Avaliação Anatomopatológica e Histopatológica

Após a eutanásia dos animais, foi realizada uma análise macroscópica dos seus órgãos e então ressecção do coração, pulmões, rins, estômago e fígado. Os órgãos foram fixados em formalina tamponada em um volume superior, no mínimo a 10x o volume da peça, garantindo a integridade do tecido, evitando a sua degradação por enzimas presentes no interior das células ou por bactérias, além de preservar a estrutura e a composição celular. Após 72 horas, os órgãos foram resseccionados para processamento histopatológico.

4.3.4.5.1. Preparação das lâminas para análise histológica

Inicialmente, cada órgão foi inserido em um cassete devidamente identificado para facilitar o manuseio durante o processo, evitando possíveis trocas. O material coletado em formalina tamponada foi então desidratado por imersões sucessivas de 1 hora numa série crescente de álcool etílico a 70, 80, 90 e 100%. A imersão em álcool absoluto foi realizada duas vezes. A etapa de desidratação evita a retração do tecido e, conseqüentemente, as lesões estruturais da célula de caráter irreversíveis.

Após a desidratação, foi feita a diafanização, na qual o material foi imerso duas vezes em xilol com duração de 1 h cada imersão. O xilol funciona nesta etapa como desalcolizante. Em sequência foi realizada a diafanização, com a impregnação do material realizada em parafina. Na impregnação, as amostras foram submetidas a dois banhos sucessivos em parafina, cada banho com duração de 1 h.

Então, o material histológico foi emblocado em fôrmas de parafina. Quando o material foi totalmente imerso na parafina, cada fôrma foi deixada ao ar livre à temperatura ambiente, para solidificação da parafina. Os blocos formados foram retirados das formas e, em seguida, foram realizados os cortes histológicos no micrótomo.

Os cortes histológicos foram realizados com espessura de 5 µm. Após a microtomia, as fitas de parafina obtidas foram colocadas em banho-maria (38 – 40 ° C). Com auxílio de lâminas, os cortes foram “pescados” do banho-maria e as lâminas foram reservadas para secagem do material.

Como os cortes do material biológico aderido às lâminas se apresentam transparentes e não sendo possível identificar as estruturas que o compõem ao microscópio, foram realizadas colorações. Os protocolos de coloração são executados com banhos sequenciais de vários corantes e reagentes. Com os cortes aderidos às lâminas, foi realizada a coloração hematoxilina & eosina (H&E) para visualização e análise geral do corte histológico e da migração celular. Em seguida, foi realizada a montagem das lâminas com inserção de lamínulas. Como meio de montagem (selante) foi utilizado o bálsamo do Canadá (VIEIRA, 2008).

4.3.4.5.2. Coloração Hematoxilina Eosina (H&E)

As lâminas foram inicialmente desparafinadas por imersão no xilol, em um banho duplicado durante 10 minutos, cada imersão. Em seguida, as lâminas foram

hidratadas em álcool com concentrações decrescentes até o álcool 70°. Posteriormente, as amostras foram lavadas de forma rápida em água destilada. Então, foram imersas na hematoxilina de Harris por 30s, e mergulhadas rapidamente em água destilada até a observação do tom azul nos cortes. Em seguida, as lâminas foram colocadas no corante eosina, por 5 minutos, desidratadas com álcool a 80, 90 e 95% com duração de 2 minutos, cada imersão. Após isso, as lâminas foram colocadas na estufa por 5 minutos para secagem tornando possível sua imersão no xilol durante 10 minutos, duas vezes, a fim de clarificar o material.

Após coloração, foi realizada a selagem das lâminas para torná-las permanentes. O bálsamo do Canadá foi colocado sobre o corte e coberto por uma lamínula. Depois, com auxílio de uma pinça, foram retiradas as bolhas entre lâmina e lamínula e comprimida com firmeza sobre o corte para o espalhamento do selante. Após 24h, foram retirados os excessos do bálsamo para acabamento e finalização do preparo das lâminas (VIEIRA, 2008).

4.3.4.5.3. Fotomicrografias

As fotografias digitais foram capturadas pela câmera Moticam 5.0 MP acoplada ao microscópio óptico, calibradas em definições específicas conforme a objetiva utilizada: 10x (A.T. 100 x) ou 40x (A.T. 400x). A análise histológica foi realizada por um operador capacitado, o qual analisou qualitativamente os parâmetros histológicos como: conservação de células, tecidos, camadas, estruturas e infiltrado celular.

4.3.5. Avaliação Psicofarmacológica

4.3.5.1. Atividade Locomotora e Antidepressiva

4.3.5.1.1. Teste do Campo Aberto

O campo aberto é um instrumento de vidro transparente e piso branco com listras pretas (30 x 30 x 15 cm), como uma arena circular dividida em dezesseis quadrantes iguais. (ARCHER, 1973). Este teste foi desenvolvido por Hall (1934) para investigar o efeito causado sobre a emocionalidade aos ratos, quando expostos a um ambiente novo, podendo assim ser avaliado o potencial ansiolítico de drogas.

Foram utilizados cinco grupos, contendo 8 camundongos *Swiss* cada: sendo 3 grupos tratados com a substância GA-4 nas doses de 50, 100 e 200 mg/kg, v.o; um grupo tratado com Imipramina (30 mg/kg) e um grupo controle que recebeu por via oral o veículo. Após 30 minutos da administração, os animais foram colocados no centro da arena para explorar o ambiente livremente por um período de 5 minutos. Foram observados os seguintes parâmetros: número de vezes que o animal se levantou (*Rearing*), número de vezes de autolimpeza (*Grooming*), ambulação (número de cruzamentos dos segmentos pelo animal, com as quatro patas, número de bolos fecais, e micção) (MONTGOMERY, 1955; LEITE; SIQUEIRA 2006).

Antes de cada animal ser colocado no campo aberto, o aparelho era limpo com álcool a 70% a fim de eliminar possíveis pistas decorrentes de odores deixados pelo animal anterior.

Figura 6 - Open Field.



Fonte: Disponível em:
<https://dyrefaciliteter.au.dk/fileadmin/_migrated/pics/Open_field_SG.png,2021>.

4.3.5.1.2 Teste do Nado Forçado

Para realização deste teste foi utilizado um cilindro de acrílico transparente, medindo 18 cm de altura e 14 cm de diâmetro, com volume total de 2 L, contendo 1,5 L de água a 27 °C.

Os camundongos *Swiss* foram divididos em cinco grupos com 8 animais cada. Sendo: três grupos tratados com a substância G-4 (50, 100 e 200 mg/kg), um grupo recebeu Imipramina na dose de 30 mg/kg, e um grupo controle que recebeu o veículo. Após o intervalo aproximado de 35 minutos da administração (30 minutos após o tratamento + 5 minutos da observação no campo aberto), cada animal foi colocado para nadar individualmente no cilindro por 5 minutos, tempo durante o qual foi observado o tempo de imobilidade (em minutos), sendo assim avaliado o efeito da droga neste teste experimental. O estado de imobilidade comportamental facilmente identificável foi descrito como o estado de "desespero" quando o animal percebeu que a fuga é impossível e desistiu (desespero comportamental) (PORSOLT *et al.*, 1978).

Figura 7 - Nado forçado.



Fonte: Disponível em:

<http://1.bp.blogspot.com/_xv04wb3VYAA/TBEX2sMT8FI/AAAAAAAAAT8/Ag57LD7ixkU/s1600/nadoforcado.jpg, 2021>.

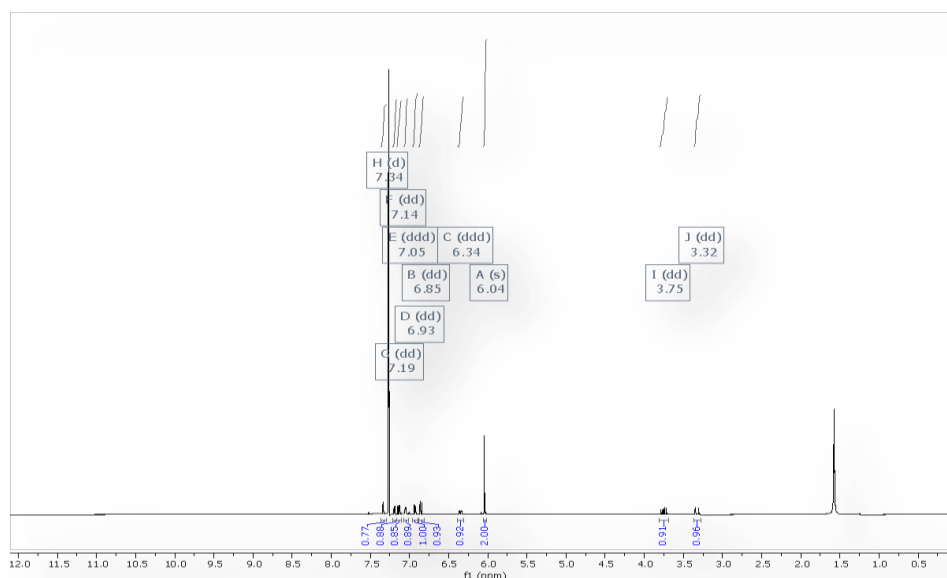
5.RESULTADOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO DA GA-04 ATRAVÉS DE RMN

Sólido branco, PF 160-163 °C; rendimento 59,60%; ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 3,32 (dd, J 17,4; 2,9 Hz, 1H, H2a'), 3,75 (dd, J 17,4; 10,9 Hz, 1H, H2a), 6,04 (s, 2H, $-\text{OCH}_2\text{O}-$), 6,34 (ddd, J 10,9; 3,0; 0,7 Hz, 1H, H3a), 6,85 (dd, J 8,2; 0,4 Hz, 1H, H5'), 6,93 (dd, J 5,1; 3,5 Hz, 1H, H4), 7,05 (ddd, J 3,5; 1,3; 0,7 Hz, 1H, H5), 7,14 (dd, J 8,1; 1,7 Hz, 1H, H6'), 7,19 (dd, J 5,1; 1,2 Hz, 1H, H3), 7,34 (d, J 1,7 Hz, 1H, H2'). ^{13}C RMN (101 MHz, CDCl_3) δ 43,10 (C2a), 59,29 (C3a), 101,90 ($-\text{OCH}_2\text{O}-$), 106,52 (C2'), 108,56 (C5'), 122,64 (C6'), 124,38 (C4), 124,86 (C1), 125,12 (C3), 126,89 (C5), 144,15 (C1'), 148,52 (C3'), 150,47 (C4'), 156,03 (C1a), 176,46 (C6a).

O RMN ^1H do composto GA-04 (**Figura 9**) não mostrou nenhum sinal referente aos hidrogênios da insaturação $\alpha\beta$ presente na chalcona, confirmando a cicloadição entre a chalcona e a tiossemicarbazida para formar o composto desejado. Ainda, o anel pirazólico teve sua estrutura elucidada com a insaturação na posição 1a, uma vez que os hidrogênios na posição 2a apareceram como duplos dubletos a δ 3,32 (J 17,4; 2,9 Hz), 3,75 (J 17,4; 10,9 Hz) ppm, respectivamente; configurando assim, o acoplamento geminal destes hidrogênios a 17,4 Hz. O hidrogênio na posição 3a aparece como um duplo dubleto a δ 6,34 (J 10,9; 3,0; 0,7 Hz) ppm, acoplando a três ligações com os dois hidrogênios na posição 2a, o que é constatado quando se observa as constantes de acoplamento a 10,9 e 3,0 Hz, respectivamente.

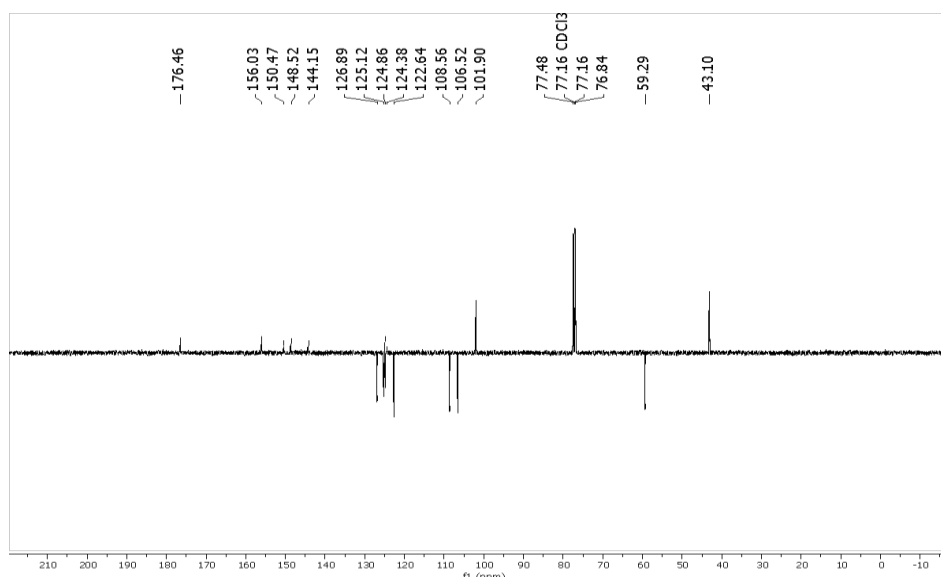
Figura 8 - Espectro RMN 1H 400 MHz de GA-04.



Fonte: Dados da pesquisa, (2019).

O espectro de RMN ^{13}C (**Figura 10**) apresentou sinais em δ 176,46; 156,03 e 101,90 ppm referentes aos carbonos 6a, 1a e $-\text{OCH}_2\text{O}-$, respectivamente; comprovando a adição do grupo tiossemicarbazida à molécula da chalcona inicial. Também é possível observar picos em δ 43,11 e 59,29 ppm dos carbonos do anel pirazólico nas posições 2a e 3a, confirmando a formação do anel pirazólico não aromático. Os sinais dos demais carbonos dos anéis estão na região de carbonos aromáticos, assim como observado na chalcona tiofênica.

Figura 9 - Espectro RMN ¹³C 101 MHz de GA-04.



Fonte: Fonte: Dados da pesquisa, (2019).

5.2. FARMACOCINÉTICA E TOXICIDADE IN SILICO

5.2.1. Molinspiration

A análise da molécula GA-4 a partir do programa computacional *Molinspiration*, mostrou que esta se enquadra na “Regra dos cinco” de Lipinski, como pode ser observado na **tabela 1**. A GA-4 apresenta um coeficiente de partição octanol/água inferior a 5, peso molecular (MM) inferior a 500Da, número de aceitador de ligações de hidrogênio (nALH) inferior a 10 assim como número de doador de ligações de hidrogênio (nDLH) inferior a 5. Além disso, sua área superficial polar topológica (TPSA) igual a 60,09 Å², o número de bandas rotáveis (nrotb) igual a 3 e um volume igual 268,07.

Tabela 1 - Propriedades físico-químicas da substância GA-4 calculadas no software *Molinspiration*.

SUBSTÂNCIA	miLogP	MM	nALH	nDLH	TPSA	nrotb	Volume
GA-4	3,17	331,42	5	2	60,09	3	268,07

Fonte: Dados da pesquisa, (2019). miLogP – coeficiente de partição octanol/água; MM- peso molecular nALH – número de grupos aceptores de ligação de hidrogênio; nDLH – número de grupos doadores de ligação de hidrogênio; TPSA – área superficial polar topológica; nrotb – número de bandas rotáveis.

5.2.2 AdmetSAR

As características farmacocinéticas da substância GA-4 estão representadas na **Tabela 2**, onde pode ser observado que esta molécula provavelmente é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica, sendo também positiva para uma boa absorção intestinal humana. Entretanto, não é permeável em Caco2, e provavelmente não é substrato da glicoproteína P, mas também não age inibindo-a. Assim como não é inibidor do transporte renal de cátions.

O programa indicou a substância GA-4 com uma distribuição subcelular nas mitocôndrias. Seu metabolismo foi avaliado diante da superfamília do citocromo P450. Não sendo substrato das isoenzimas 2C9, 2D6 e 3A4, mas é inibidor desta última, e dos subtipos 1A2 e 2C19, apresentando uma alta promiscuidade inibitória de CYP.

Na **Tabela 2** também é demonstrada a toxicidade teórica da substância GA-4, sendo um inibidor fraco do gene relacionado a éter-a-go-go humano (HERG). Além disso, o programa caracterizou-a como não mutagênica, não carcinogênica, mas possivelmente não é biodegradável. Esta ainda apresentou uma solubilidade aquosa igual a -2,8578 LogS, e uma possível DL_{50} de 2.6305 mol/kg, sendo classificada na categoria III de toxicidade oral aguda.

Tabela 2 - Propriedades de classificação ADMET, calculadas no software admetSAR, para a substância GA-4.

Modelo	Resultado
Absorção	
Barreira Hematoencefálica	<u>BH+</u>
Absorção Intestinal Humana	<u>AIH+</u>
Permeabilidade ao Caco2	CACO2-
Substrato da glicoproteína P	<u>NS</u>
Inibidor da Glicoproteína P	NI
Transporte Renal de Cátions Orgânicos	<u>NI</u>
Distribuição	
Localização Subcelular	Mitocôndria
Metabolismo	
Substrato CYP450 2C9	<u>NS</u>
Substrato CYP450 2D6	<u>NS</u>
Substrato CYP450 3A4	<u>NS</u>
Inibidor CYP450 1A2	I
Inibidor CYP450 2C9	<u>NI</u>
Inibidor CYP450 2D6	<u>NI</u>

Inibidor CYP450 2C19	I
Inibidor CYP450 3A4	I
Promiscuidade Inibitória do CYP	Alta
Excreção e Toxicidade	
HERG	<u>Inibidor fraco</u>
Toxicidade no teste de AMES	<u>NT</u>
Carcinogênico	<u>NC</u>
Biodegradação	NB
Toxicidade Oral Aguda	<u>III</u>
Perfil ADMET previsto-regressão	
Solubilidade Aquosa	-2,8578 LogS
Toxicidade Aguda em Ratos	2.6305 DL ₅₀ , mol/kg

Fonte: Dados da pesquisa, (2019). NI – não inibe; NS – não substrato; S – substrato; I – inibe; NT – não tóxico; NC – não carcinogênico; NB- não biodegradável; HERG- gene relacionado a éter-a-go-go humano.

5.3. DOCKING MOLECULAR

Foram geradas 3 poses de interação de GA-04 com a proteína. No qual todas as poses apresentaram energias de ligação aproximadas, sendo a pose 1 a que teve melhor afinidade com o receptor $\alpha 2$ - adrenérgico, até mesmo quando comparada com a sustância padrão ioimbina (código PDB 6K41) (**Tabela 3**). Além disso, foi observado que a GA-04 se ligou no mesmo sítio de ativação da ioimbina, mostrando ser um possível antagonista dos receptores $\alpha 2$ - adrenérgico (**Figura 11**).

Tabela 3 - Energia de ligação da substância GA-04 com o receptor $\alpha 2$ - adrenérgico em comparação com o padrão ioimbina.

Ligante	Pose 1	Pose 2	Pose 3
Ioimbina	-7.8	-7.3	-7.3
GA-04	-7.9	-7.8	-7.6

Fonte: Dados da pesquisa, (2019).

Figura 10 - Interação da substância GA-04 com o receptor $\alpha 2$ - adrenérgico no mesmo sítio de ativação da ioimbina.



Fonte: Dados da pesquisa, (2019). Legenda: Proteína em cinza, GA-04 em vermelho e ioimbina em Azul.

5.4. ENSAIO TOXICOLÓGICO NÃO-CLÍNICO AGUDO

A avaliação toxicológica é a medida da capacidade de determinado composto de causar quaisquer lesões, seja ela local ou sistêmica. Nenhuma substância está livre de causar efeitos adversos, no entanto, devem ser estabelecidos os níveis de segurança para a sua administração. Sendo assim, durante o desenvolvimento de novos fármacos, os testes de toxicidade são de fundamental importância (OGA, 2014).

Através dos estudos *in silico* observamos parâmetros relacionados à farmacocinética e toxicidade *in vitro*, e os resultados obtidos foram classificados na categoria III de acordo o estudo.

Os testes de toxicidade seguiram os protocolos norteadores da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD, 423), onde não foram observadas mortes nas doses de 300 e 2000 mg/dL que segundo a OECD classifica a toxicidade de baixo grau. Ainda foram observados parâmetros hematológicos e bioquímicos, bem como análise dos órgãos pelo exame anátomohistopatológico, corroborando os achados citados.

5.4.1. Avaliação Comportamental

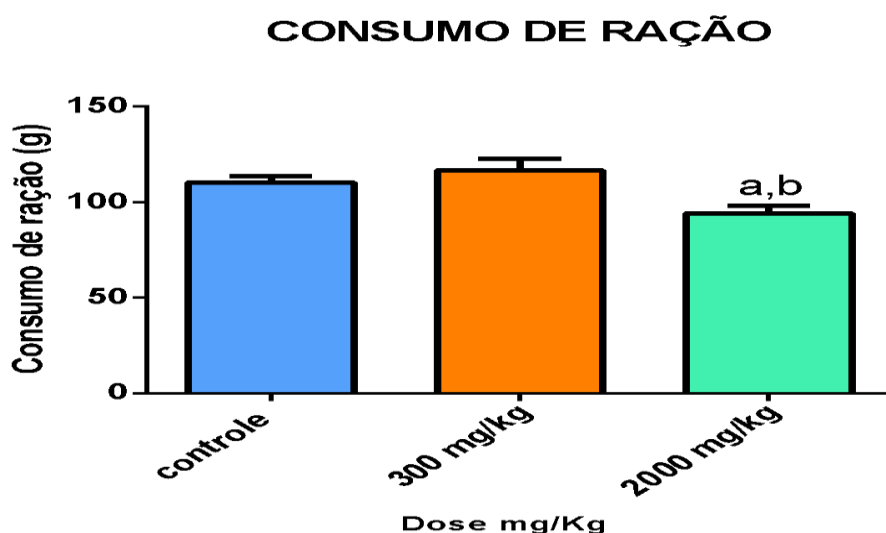
Após a administração da substância GA-4 por via oral na dose de 300 mg/kg, bem como na dose de 2000 mg/kg, foi realizada uma avaliação comportamental dos animais a cada 30, 60, 90, 120, 180 e 240 minutos. Em ambos os grupos não foi observado nenhum tipo de alteração no comportamento dos animais em estudo.

5.4.2. Avaliação do Consumo de Água, Ração e evolução ponderal

Durante o estudo agudo, foi observado o consumo de água e ração dos animais tratados com a substância GA-4 nas doses de 300mg/kg (grupo 1) e 2000 mg/kg (grupo 2). Dos animais avaliados o grupo tratado com 2000 mg/kg de GA-4, apresentou uma diminuição significativa no consumo de ração, comparando-se com o grupo controle, e comparando este com o grupo tratado na dose de 300 mg/kg, como pode ser observado no **Gráfico 1**.

Os animais tratados com GA-4 com doses únicas de 300 mg/kg e 2000 mg/kg, não apresentaram nenhuma alteração no seu peso corporal após a administração da substância, comparando-se com o peso inicial, como pode ser observado na **Tabela 4**.

Gráfico 1- Consumo de ração de ratas *Wistar* tratadas com a substância GA-4.



Fonte: Dados da pesquisa, (2019). Legenda: ^a $p < 0,05$ comparado com grupo controle; ^b $p < 0,05$ comparado com grupo GA-4 -300 (mg/kg). Os resultados estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média. Análise por ANOVA seguido de Tukey.

Tabela 4 - Avaliação do consumo de água, ração e evolução ponderal de ratas *Wistar*, tratadas com a substância GA-4 nas doses de 300 e 2000 mg/kg em dose única.

	Controle	Grupo Tratado 1 (300 mg/kg)	Grupo Tratado 2 (2000 mg/kg)
Consumo de água (mL)	127,5 ± 4,4	127,5 ± 2,8	122,7 ± 5,7
Consumo de ração (g)	110,4 ± 3,4	116,8 ± 6,1	94,4 ± 3,8 ^{a,b}
Peso inicial (g)	178,0 ± 5,4	179,7 ± 2,9	180,4 ± 3,3
Peso final (g)	190,7 ± 4,6	197,3 ± 3,0	197,2 ± 3,9

Fonte: Dados da pesquisa, (2019). Dados estão apresentados como média ± erro padrão da média. Legenda: ^a $p < 0,05$ comparado com grupo controle por ANOVA seguido de Tukey ^b $p < 0,05$ comparado com grupo GA-4 -300 mg/kg por ANOVA seguido de Tukey.

5.4.3. Avaliação Bioquímica

Após 14 dias da administração da substância GA-4 nas doses de 300 mg/kg e 2000 mg/kg nas ratas *Wistar*, o sangue periférico destas foi avaliado e foram demonstradas algumas alterações estatisticamente significativas, como pode ser observado na **Tabela 5**. Foi verificado que nas ratas tratadas com 2000 mg/kg de GA-4, estas apresentaram um aumento significativo das proteínas totais quando comparado ao grupo tratado com dose de 300 mg/kg, mas não mostrou alteração com relação ao grupo controle (**Gráfico 2**), o mesmo sendo observado para a creatinina (**Gráfico 3**). Já o sódio encontrou-se reduzido significativamente ao comparar-se com o grupo tratado 1 (**Gráfico 4**).

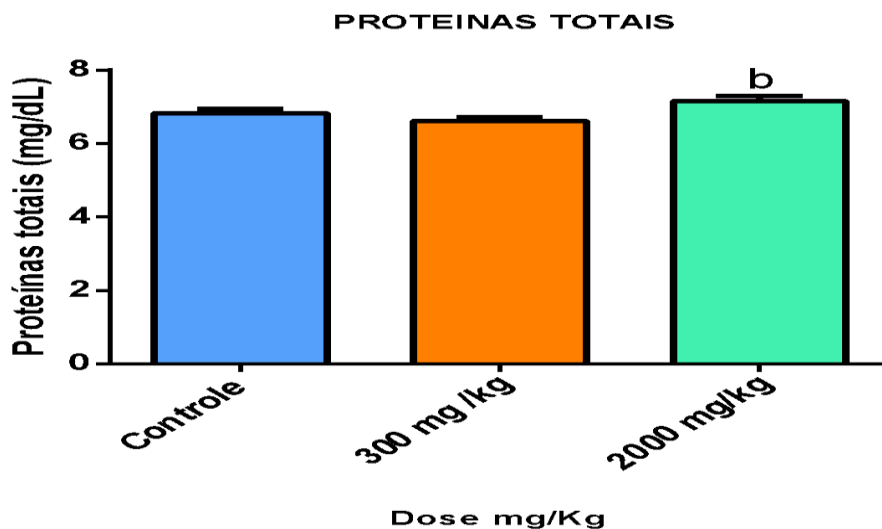
O grupo tratado com 300 mg/kg da substância GA-4, apresentou uma diminuição significativa do íon cálcio com relação ao do grupo controle (**Gráfico 5**). Ainda outra alteração foi identificada, a lipase encontrou-se significativamente reduzida no grupo tratado 1 comparando-se com a do grupo controle, e encontrou-se aumentada no grupo tratado 2 (2000 mg/kg) com relação a dos animais do grupo 1 (300 mg/kg) (**Gráfico 6**).

Tabela 5 - Avaliação dos parâmetros bioquímicos do sangue periférico de ratos *Wistar*, 14 dias após serem tratados com a substância GA-4 nas doses de 300 e 2000 mg/kg em dose única.

	Controle	Grupo Tratado 1 (300 mg/kg)	Grupo Tratado 2 (2000 mg/kg)
Colesterol (mg/dL)	60,8 ± 9,02	59,8 ± 14,34	61,8 ± 7,14
Triglicerídeos (mg/dL)	43,2 ± 15,35	43,2 ± 15,56	28,5 ± 1,73
Ureia (mg/dL)	43,0 ± 8,12	47,7 ± 12,71	44,8 ± 3,19
Glicose (mg/dL)	200,2 ± 27,36	174,5 ± 15,37	181,3 ± 30,06
Proteínas Totais (mg/dL)	6,8 ± 0,32	6,6 ± 0,26	7,2 ± 0,34 ^b
Creatinina (mg/dL)	0,45 ± 0,12	0,40 ± 0,03	0,57 ± 0,05 ^b
Sódio (mmol/L)	140,0 ± 1,41	142,0 ± 1,10	138,5 ± 0,58 ^b
Cálcio (mmol/L)	10,9 ± 0,22	10,3 ± 0,40 ^a	10,8 ± 0,39
Fosfato (mmol/L)	9,0 ± 0,91	8,6 ± 0,75	8,2 ± 0,48
Cloreto (mmol/L)	104,9 ± 1,46	105,8 ± 1,72	104,3 ± 1,26
Magnésio (mg/dL)	3,3 ± 0,64	2,8 ± 0,31	3,4 ± 0,57
Potássio (mmol/L)	6,8 ± 0,89	6,1 ± 0,78	5,9 ± 0,86
Albumina (mg/dL)	3,75 ± 0,16	3,63 ± 0,16	3,80 ± 0,14
AST (U/L)	84,3 ± 14,75	91,7 ± 20,96	76,3 ± 3,5
ALT (U/L)	44,0 ± 14,12	39,2 ± 4,75	49,0 ± 4,08
FAL (U/L)	140,0 ± 45,58	128,7 ± 49,71	152,3 ± 28,92
Bilirrubina Total (mg/dL)	0,12 ± 0,03	0,12 ± 0,04	0,13 ± 0,02
HDL (mg/dL)	22,2 ± 2,93	21,3 ± 4,18	21,0 ± 1,41
Lipase (U/L)	9,9 ± 0,64	8,5 ± 0,53 ^a	10,3 ± 4,17 ^b
Amilase (U/L)	646,4 ± 77,83	592,8 ± 78,14	678,0 ± 42,72
CK-MB (U/L)	547,3 ± 69,8	470,5 ± 71,7	427,3 ± 37,3

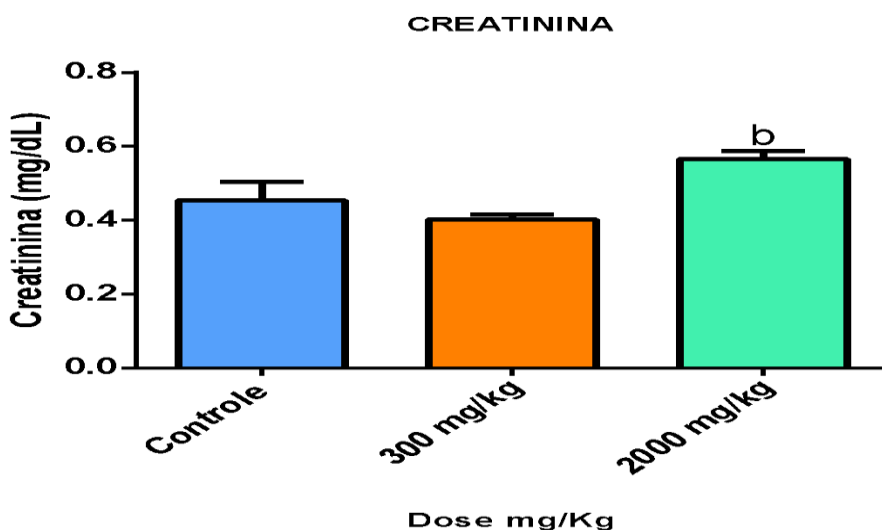
Fonte: Dados da pesquisa, (2019). Legenda: Dados estão apresentados como média ± desvio padrão da média ^a $p < 0,05$ comparado com grupo controle Kruskal-Wallis seguido do pós teste de Dunn's, ^b $p < 0,05$ comparado com grupo GA-4-300 mg/kg Kruskal-Wallis seguido do pós teste de Dunn's.

Gráfico 2 - Dosagem de proteínas totais no soro de ratas *Wistar* tratadas com a substância GA-4.



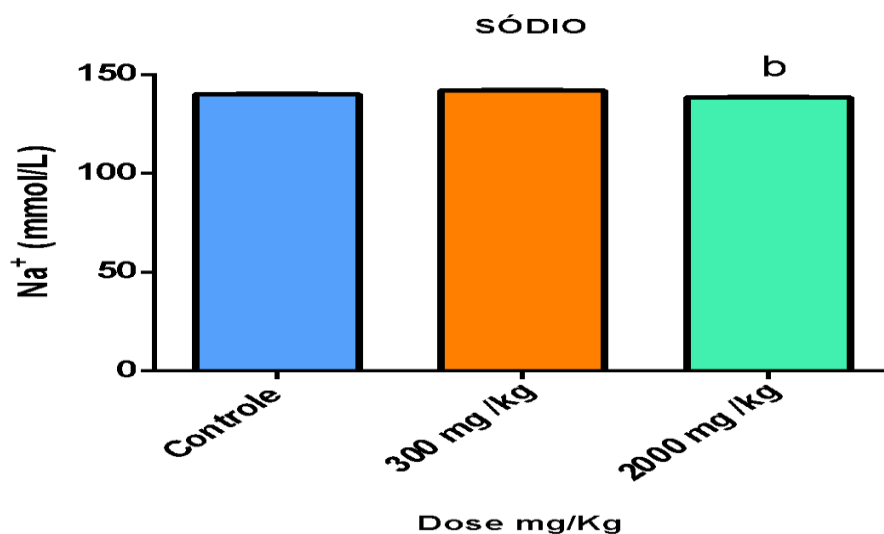
Fonte: Dados da pesquisa, (2019). Os resultados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão da média. Análise Kruskal-Wallis seguido do pós teste de Dunn's. Legenda: ^b $p < 0,05$ comparado com grupo GA-4-300 mg/kg).

Gráfico 3 - Dosagem de creatinina no soro de ratas *Wistar* tratadas com a substância GA-4.



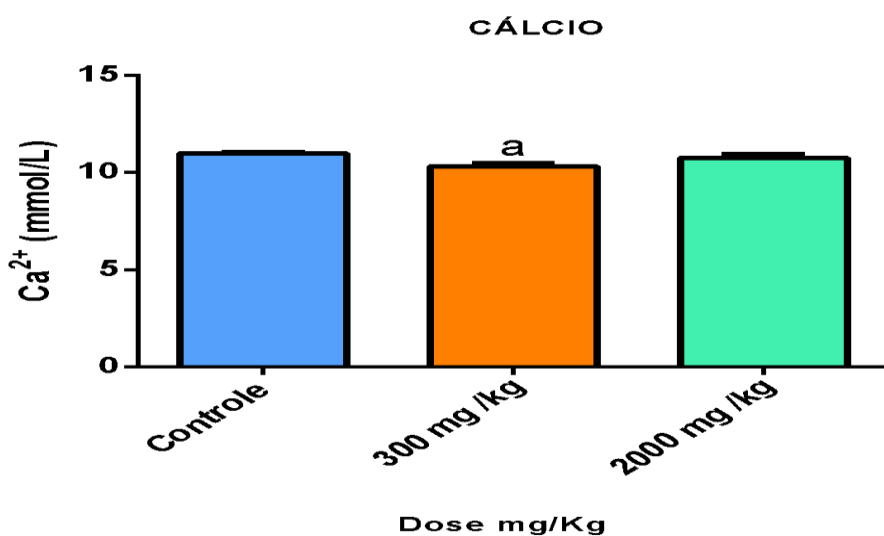
Fonte: Dados da pesquisa, (2019). Os resultados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão da média. Análise Kruskal-Wallis seguido do pós teste de Dunn's. Legenda: ^b $p < 0,05$ comparado com grupo GA-4-300 mg/kg).

Gráfico 4 - Dosagem do íon Na^+ no soro de ratas *Wistar* tratadas com a substância GA-4.



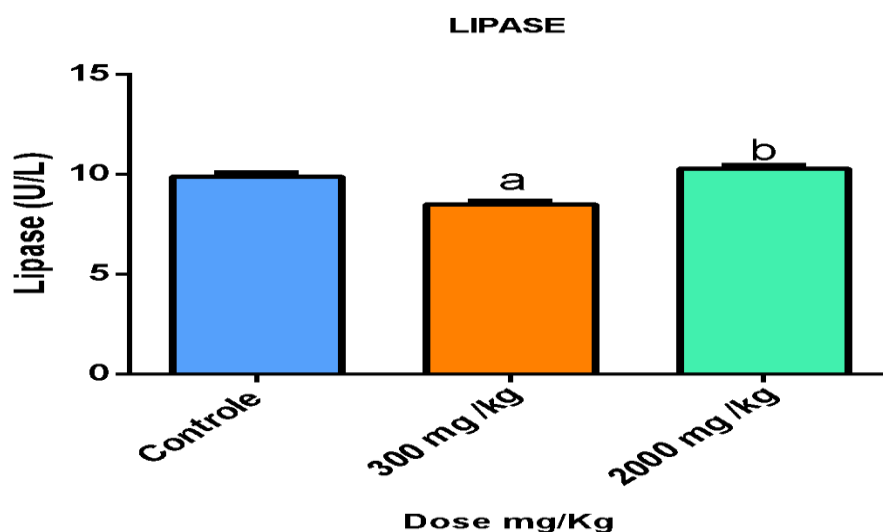
Fonte: Dados da pesquisa, (2019). Os resultados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão da média. Análise Kruskal-Wallis seguido do pós teste de Dunn's. Legenda: ^b $p < 0,05$ comparado com grupo GA-4 -300 mg/kg.

Gráfico 5 - Dosagem do íon Ca^{2+} no soro de ratas *Wistar* tratadas com a substância GA-4.



Fonte: Dados da pesquisa, (2019). Os resultados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão da média. Análise Kruskal-Wallis seguido do pós teste de Dunn's. Legenda: ^a $p < 0,05$ comparado com grupo controle.

Gráfico 6 - Dosagem da lipase no soro de ratas *Wistar* tratadas com a substância GA-4.



Fonte: Dados da pesquisa, (2019). Os resultados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão da média. Análise Kruskal-Wallis seguido do pós teste de Dunn's. Legenda: ^a $p < 0,05$ comparado com grupo controle; ^b $p < 0,05$ comparado com grupo GA-4 -300 mg/kg.

5.4.4 Avaliação Hematológica

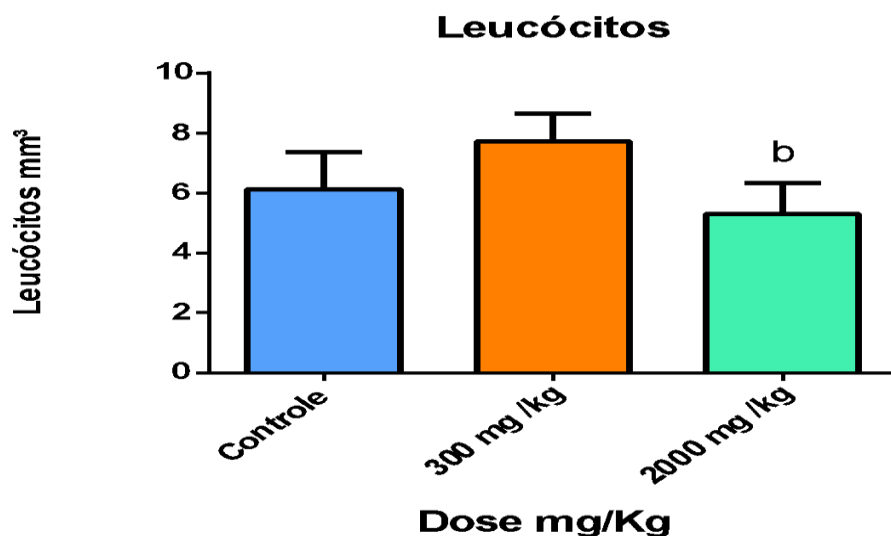
Na análise laboratorial do sangue periférico das ratas *Wistar*, também foram avaliados os parâmetros hematológicos como estão demonstrados na **Tabela 6**. Nenhuma alteração significativa foi identificada na análise do eritrograma, mas foi identificada uma diminuição do número de leucócitos totais do grupo tratado com 2000 mg/kg com relação ao grupo tratado com 300 mg /kg (**Gráfico 7**).

Tabela 6 - Avaliação dos parâmetros hematológicos do sangue periférico de ratos *Wistar*, 14 dias após serem tratados com a substância GA-4 nas doses de 300 e 2000 mg/kg em dose única.

	Controle	Grupo Tratado 1 (300 mg/Kg)	Grupo Tratado 2 (2000 mg/Kg)
Hemácias ($10^6/\text{mm}^3$)	8,6 $\pm$ 0,1	8,5 $\pm$ 0,1	8,4 $\pm$ 0,3
Hemoglobina(g/dL)	14,9 $\pm$ 0,2	15,6 $\pm$ 0,1	14,9 $\pm$ 0,1
Hematócrito (%)	45,5 $\pm$ 0,6	46,1 $\pm$ 0,4	44,2 $\pm$ 0,9
VCM (mm^3)	52,8 $\pm$ 0,6	53,8 $\pm$ 0,4	52,7 $\pm$ 0,9
HCM (pg)	17,4 $\pm$ 0,2	18,2 $\pm$ 0,2	17,8 $\pm$ 0,3
CHCM (%)	32,9 $\pm$ 0,2	33,6 $\pm$ 0,2	33,6 $\pm$ 0,2
RDW	13,2 $\pm$ 0,4	13,2 $\pm$ 0,4	13,2 $\pm$ 0,4
Leucócitos totais (mm^3)	6,13 $\pm$ 0,47	7,73 $\pm$ 0,37	5,30 $\pm$ 0,42 ^b
Linfócitos (%)	65,63 $\pm$ 1,34	64,83 $\pm$ 1,66	64,50 $\pm$ 2,10
Neutrófilos (%)	21,50 $\pm$ 1,03	20,33 $\pm$ 1,36	18,75 $\pm$ 1,10
Monócitos (%)	12,63 $\pm$ 0,89	14,67 $\pm$ 0,84	16,00 $\pm$ 1,52
Eosinófilos (%)	0,25 $\pm$ 0,16	0,17 $\pm$ 0,17	0,25 $\pm$ 0,25
PLA (mm^3)	945,9 $\pm$ 38,5	961,2 $\pm$ 36,4	968,5 $\pm$ 49,8

Fonte: Dados da pesquisa, (2019). Dados estão apresentados como média $\pm$ desvio padrão da média
^a $p < 0,05$ comparado com grupo controle por ^b $p < 0,05$ comparado Kruskal-Wallis seguido do pós teste de Dunn's com grupo GA-4-300 mg/kg.

Gráfico 7 - Contagem de leucócitos do sangue periférico de ratas *Wistar* tratadas com a substância GA-4.



Fonte: Dados da pesquisa, (2019). Os resultados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão da média. Análise por Kruskal-Wallis seguido do pós teste de Dunn's. Legenda: ^b $p < 0,05$ comparado com grupo GA-4-300 mg/kg.

5.4.5 Avaliação Histopatológica

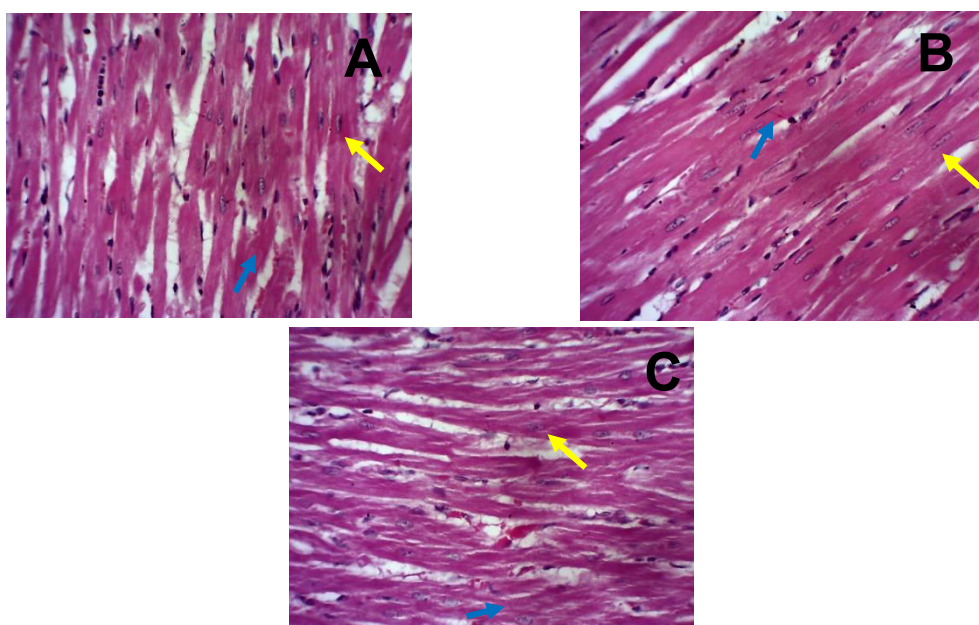
Os cortes histológicos de coração, estômago, fígado, pulmão e rins dos grupos experimentais C1 (controle), CT1 (tratado 300 mg/kg) e CT2 (Tratado 2000 mg/kg) foram analisados pela coloração H&E em microscópio óptico com aumentos de x40, x100 e x400.

5.4.5.1 Coração

O grupo C1 apresentou achados histológicos idênticos ao normal com preservação das três camadas do coração: endocárdio, miocárdio e epicárdio (camada visceral do pericárdio seroso). O endocárdio apresentando endotélio íntegro, presença de tecido conjuntivo frouxo e células de *purkinje* na camada subendocárdica. As células musculares cardíacas apresentaram um ou dois núcleos centrais. O miocárdio na parede ventricular mais espesso do que nos átrios, característica de normalidade, células musculares cardíacas preservadas em

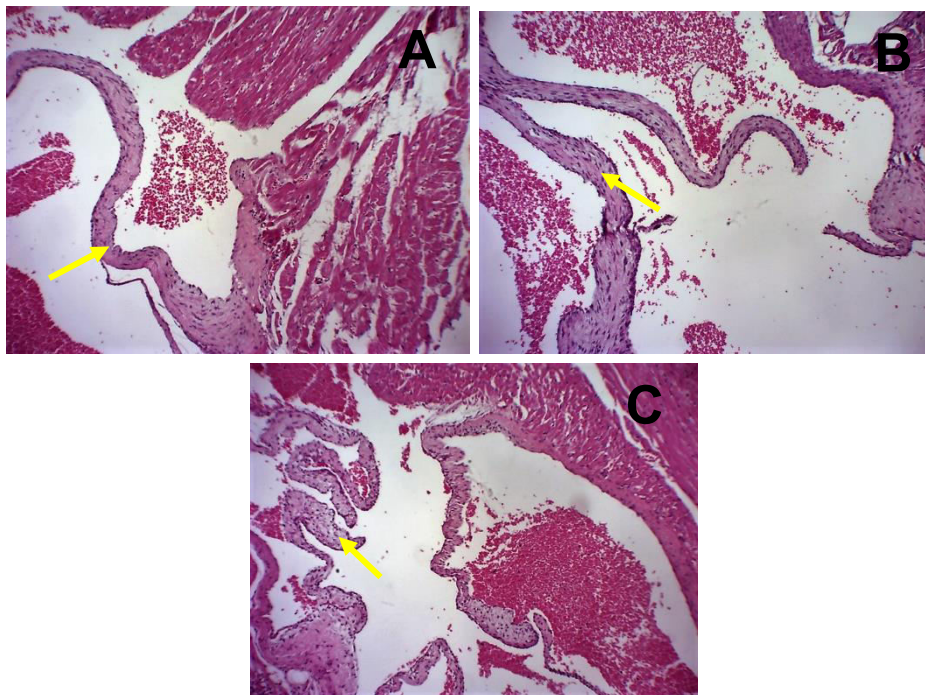
tamanho, forma e número com discos intercalares típicos (**Figura 12A**). Valvas cardíacas (**Figura 13 A**) e septos interventriculares preservados. Epicárdio íntegro e aderido ao miocárdio, com vasos sanguíneos e nervos bem preservados. As características de normalidade do endocárdio, miocárdio e epicárdio foram encontradas nos grupos CT1 (**Figura 12 B e 13 B**), e CT2 (**Figura 12 C**) quando comparados ao grupo C1.

Figura 11 - Fotomicrografias representativas de miocárdio dos grupos experimentais controle (C1) e tratados (CT1 e CT2) pela substância GA-4.



Legenda: **A** (C1 grupo Controle), **B** (CT1 grupo tratado 300 mg/kg), e **C** (CT2 grupo tratado 2000 mg/kg). Célula muscular cardíaca (seta amarela), disco intercalar (seta azul). **A, B, e C** – H&E, objetiva 40x, A.T. x400.

Figura 12 - Fotomicrografias representativas das valvas cardíacas e septo interventricular dos grupos.

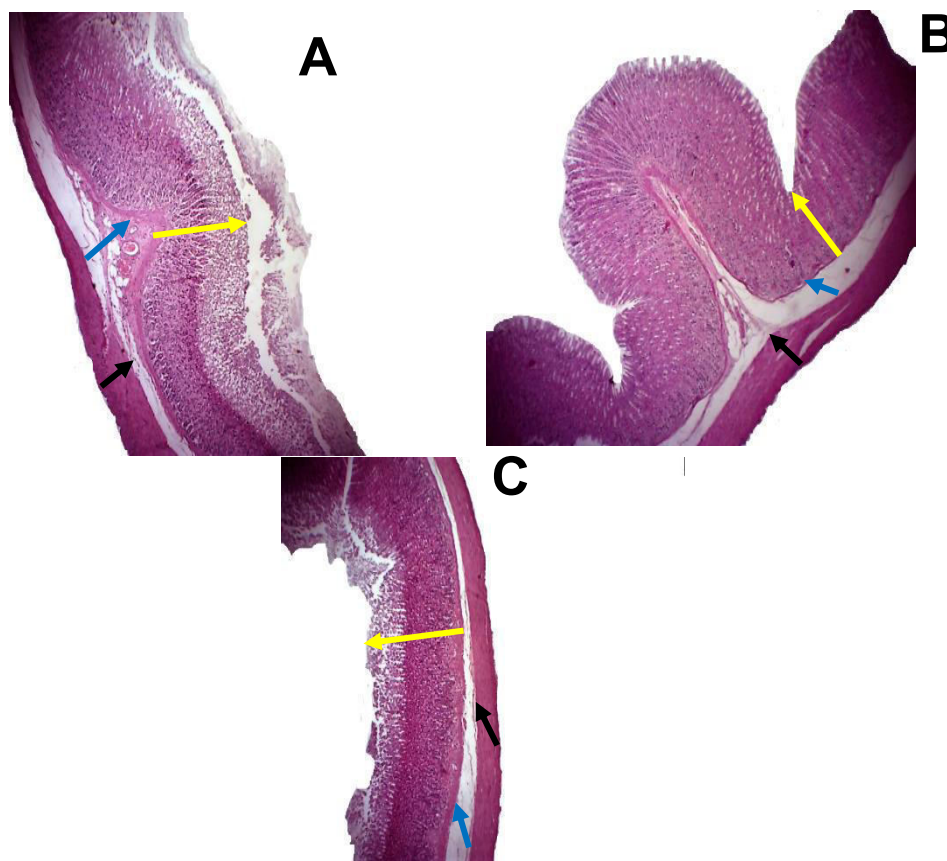


Legenda: A (C1 grupo Controle), B (CT1 grupo tratado 300 mg/kg) e C (CT2 grupo tratado 2000 mg/kg). Valva cardíaca (seta amarela). A, B e C— H&E, objetiva 10x, A.T. x100.

5.4.5.2. Estômago

O grupo C1 apresentou, na camada mucosa, presença de glândulas gástricas, lâmina própria e muscular da mucosa. As glândulas gástricas apresentaram no colo (região superficial das glândulas gástricas voltada para o lúmen) destruição de algumas células gástricas. A camada submucosa bem característica com presença de vasos sanguíneos; a muscular externa com presença das camadas circular interna e longitudinal externa e a camada serosa íntegra. Esse perfil é característico de normalidade (**Figuras 14 A**). O grupo CT1 apresentou constituição e espessura das camadas mucosa, submucosa e muscular externa, semelhantes ao grupo C1 (**Figuras 14 B**). O grupo CT2 apresentou camada mucosa com espessura diminuída devido à diminuição de glândulas gástricas e destruição de células na região do colo das glândulas, camada submucosa e muscular externa, semelhantes ao grupo C1 (**Figuras 14 C**).

Figura 13 - Fotomicrografias representativas de estômago dos grupos experimentais controle (C1) e tratados (CT1 e CT2) pela substância GA-4.



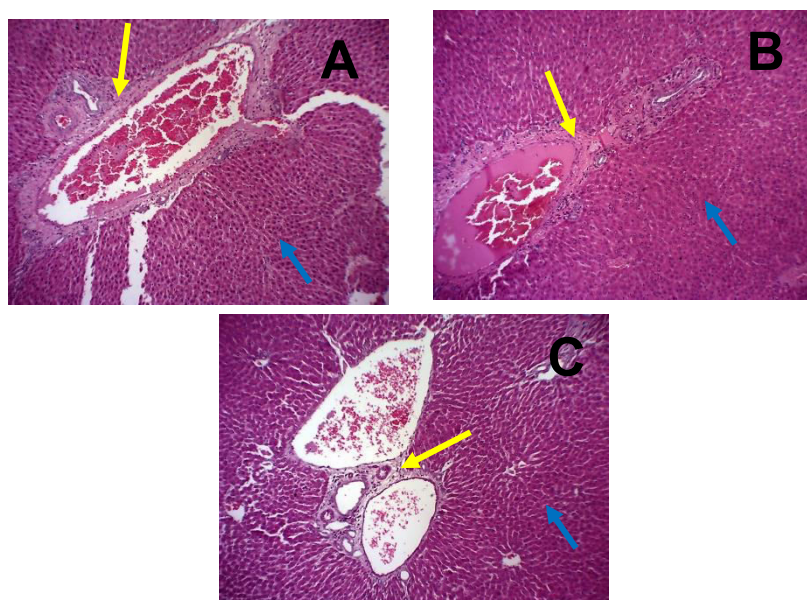
Legenda: **A** (C1 grupo Controle), **B** (CT1 grupo tratado 300 mg/kg), e **C** (CT2 grupo tratado 2000 mg/kg). Camada mucosa (seta amarela), camada submucosa (seta azul) e camada muscular externa (seta preta). **A, B e C** – H&E, objetiva 4x, A.T. x40.

5.4.5.3 Fígado

Os fígados dos animais do grupo C1 (controle) apresentaram ao exame microscópico arquitetura do tipo lobular preservada com congestão venosa portal, veias de paredes finas equidistantes, espaços portais regularmente distribuídos, comportando tríades hepáticas (ducto biliar, ramo da veia porta e ramo da artéria hepática) (**Figura 15 A**). Os hepatócitos apresentaram organização em placas direcionadas para as veias centrolobulares de paredes finas, diferença no tamanho dos núcleos, alteração na afinidade ao corante, promovendo alteração na coloração do citoplasma e do núcleo, caracterizando proliferação celular. As características encontradas são compatíveis com normalidade (**Figuras 15 A**). Os animais do grupo CT1 (grupo 300 mg/kg) demonstraram arquitetura semelhante ao grupo C1,

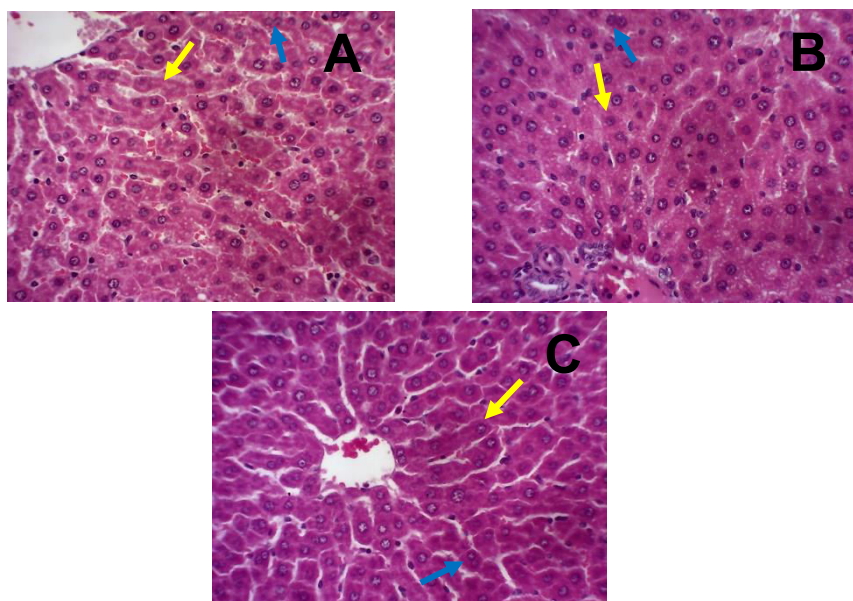
entretanto as placas de hepatócitos apresentaram um menor distanciamento entre si (**Figura 15 B e 16 B**). O grupo CT2 (**Figuras 15 C e 16 C**), quando comparado ao grupo C1, apresentou características semelhantes. O grupo A (**Figura 16 A**) e o grupo C (**Figura 16 B**) apresentaram presença de gotículas de gordura nos hepatócitos.

Figura 14 - Fotomicrografias representativas de fígado dos grupos experimentais controle (C1) e tratados (CT1 e CT2) pela substância GA-4.



Legenda: **A** (C1 grupo Controle), **B** (CT1 grupo tratado 300 mg/kg), e **C** (CT2 grupo tratado 2000 mg/kg). Camada mucosa (seta amarela), camada submucosa (seta azul) e H&E, objetiva 10x, A.T. x100.

Figura 15 - Fotomicrografias representativas dos hepatócitos dos grupos experimentais controle (C1) e tratados (CT1 e CT2) pela substância GA-4.

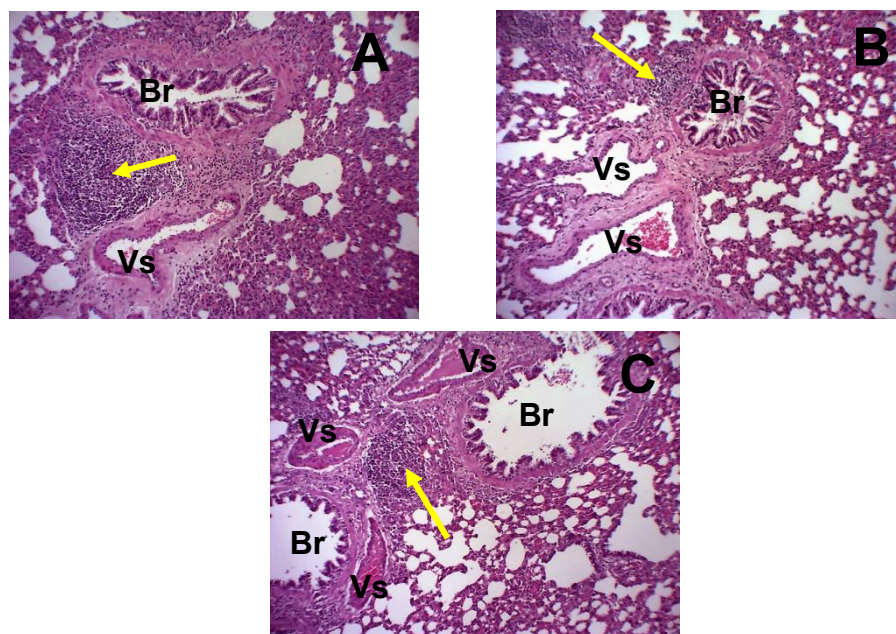


Legenda: **A** (C1 grupo Controle), **B** (CT1 grupo tratado 300 mg/kg), e **C** (CT2 grupo tratado 2000 mg/kg). Placas de hepatócitos (seta amarela), hepatócitos em divisão (seta azul). **A, B e C** – H&E, objetiva 40x, A.T. x400.

5.4.5.4 Pulmões

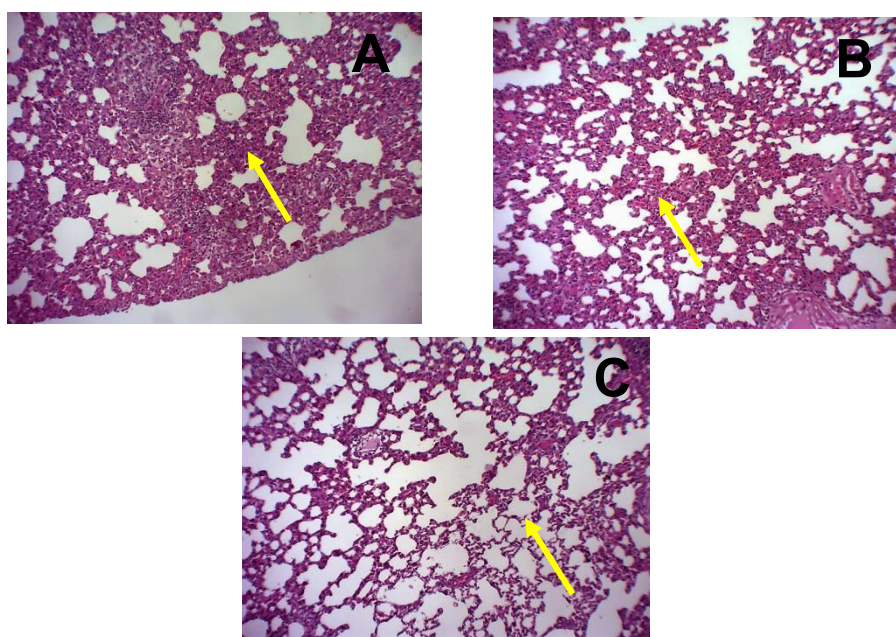
Ao exame microscópico, o pulmão dos animais do grupo C1 apresentaram bronquíolos conservados, revestidos internamente por epitélio variando do pseudoestratificado colunar ciliado com células caliciformes ao simples colunar ciliado, camada relativamente expeça de músculo liso e camada adventícia externa, características de normalidade. No entanto, foi observada presença de infiltrado celular na região peribronquiolar e perivascular (**Figura 17 A**). Os alvéolos pulmonares também apresentaram infiltrados celulares provocando espessamento do septo interalveolar (**Figura 18 A**). No grupo CT1 foram observadas características semelhantes ao grupo C1, porém com diminuição do infiltrado celular na região peribronquiolar, perivascular e alvéolos pulmonares (**Figuras 17 B e 18 B**). O grupo CT2 demonstrou diminuição do infiltrado celular na região peribronquiolar, perivascular e alvéolos quando comparado ao grupo C1 (**Figuras 17 C e 18 C**).

Figura 16 - Fotomicrografias representativas de pulmão dos grupos experimentais controle (C1) e tratados (CT1 e CT2) pela substância GA-4.



Legenda: **A** (C1 grupo Controle), **B** (CT1 grupo tratado 300 mg/kg), e **C** (CT2 grupo tratado 2000 mg/kg). Infiltrado celular peribronquiolar e perivascular (seta amarela), Br (bronquíolo), Vs (vaso sanguíneo). **A, B e C** – H&E, objetiva 10x, A.T. x100.

Figura 17 - Fotomicrografias representativas dos septos interalveolares dos grupos experimentais controle (C1) e tratados (CT1 e CT2) pela substância GA-4.

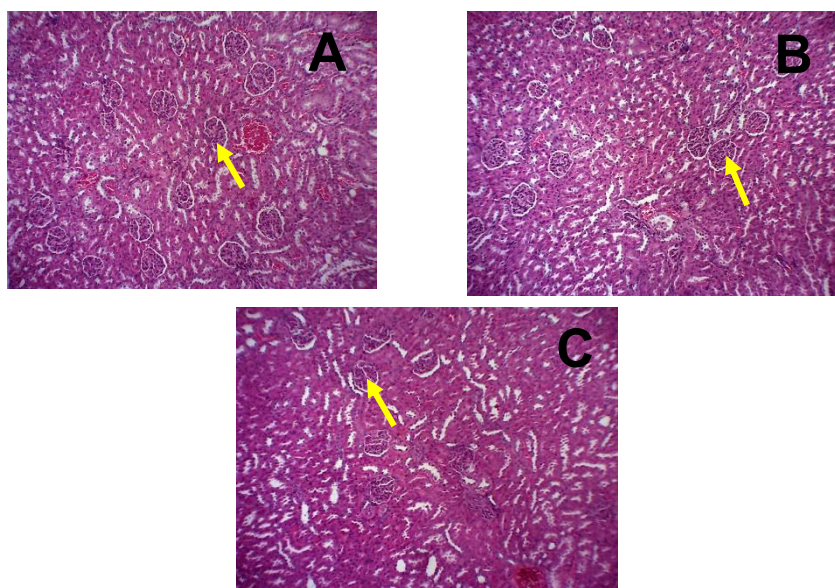


Legenda: **A** (C1 grupo Controle), **B** (CT1 grupo tratado 300 mg/kg), e **C** (CT2 grupo tratado 2000 mg/kg). Septos interalveolares (seta amarela). **A, B e C** – H&E, objetiva 10x, A.T. x100.

5.4.5.5 Rins

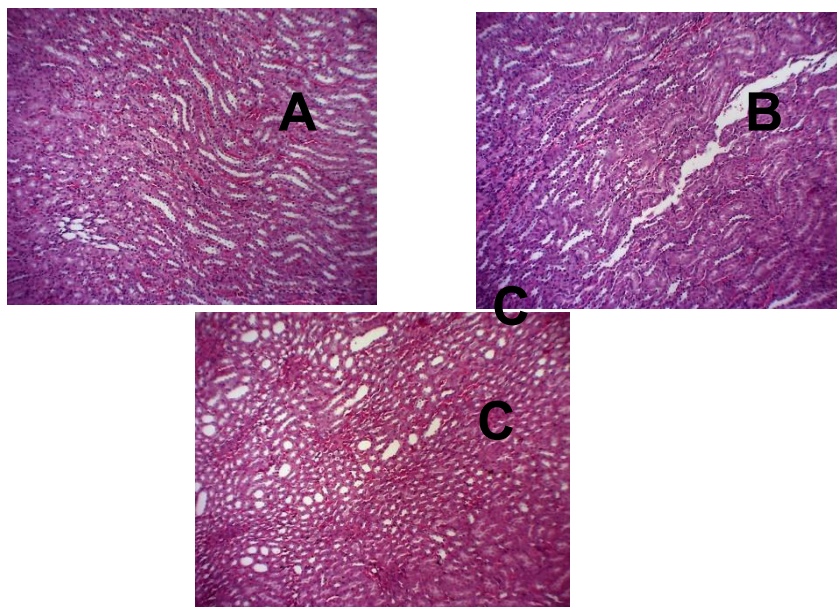
O grupo C1 apresentou, na análise histológica, características de normalidade. Na região cortical, os lóbulos estavam conservados com corpúsculos renais (corpúsculo de Malpighi) preservados, envolvidos por fina cápsula de *Bowmann* (folheto visceral e folheto parietal) e glomérulos. Os túbulos contorcidos proximais e distais, alça de *Henle*, ductos e túbulos coletores estavam revestidos por epitélio com altura variável, de colunar a pavimentoso, típico do tecido renal. Os corpúsculos renais estavam sustentados por delicado mesângio. As artérias e veias intralobulares apresentavam-se regularmente distribuídas (**Figura 19 A**). Na região medular, a estrutura das alças de *Henle*, túbulos coletores, ductos, e vasos retos estavam conservados. As artérias e veias interlobares apresentavam-se regularmente distribuídas (**Figura 20 A**). Os CT1 (**Figuras 19 B e 20 B**), e CT2 (**Figuras 19 C e 20 C**) apresentaram características morfológicas de normalidade semelhantes ao grupo C1.

Figura 18 - Fotomicrografias representativas de rim (região cortical) dos grupos experimentais controle (C1) e tratados (CT1 e CT2) pela substância



Legenda: **A** (C1 grupo Controle), **B** (CT1 grupo tratado 300 mg/kg), e **C** (CT2 grupo tratado 2000 mg/kg). Corpúsculo renal (seta amarela). **A, B e C** – H&E, objetiva 10x, A.T. x100.

Figura 19 - Fotomicrografias representativas de rim (região medular) dos grupos experimentais controle (C1) e tratados (CT1 e CT2) pela substância GA-4.



Legenda: **A**(C1 grupo Controle), **B** (CT1 grupo tratado 300 mg/kg), e **C** (CT2 grupo tratado 2000 mg/kg). **A, B e C** – H&E, objetiva 10x, A.T. x100.

5.5 ENSAIO PSICOFARMACOLÓGICO

5.5.1 Teste do Campo Aberto

Os animais tratados com a substância GA-4 nas doses de 50, 100 e 200 mg/kg, foram submetidos ao teste do Campo Aberto, sendo por meio deste, avaliados cinco parâmetros como mostrado na **Tabela 7**. Os grupos tratados com a substância GA-4, foram comparados com o grupo controle negativo (que recebeu o veículo).

Tabela 7 - Avaliação do efeito da substância GA-4 nas doses de 50, 100 e 200 mg/kg sobre o Sistema Nervoso no Teste do Campo Aberto.

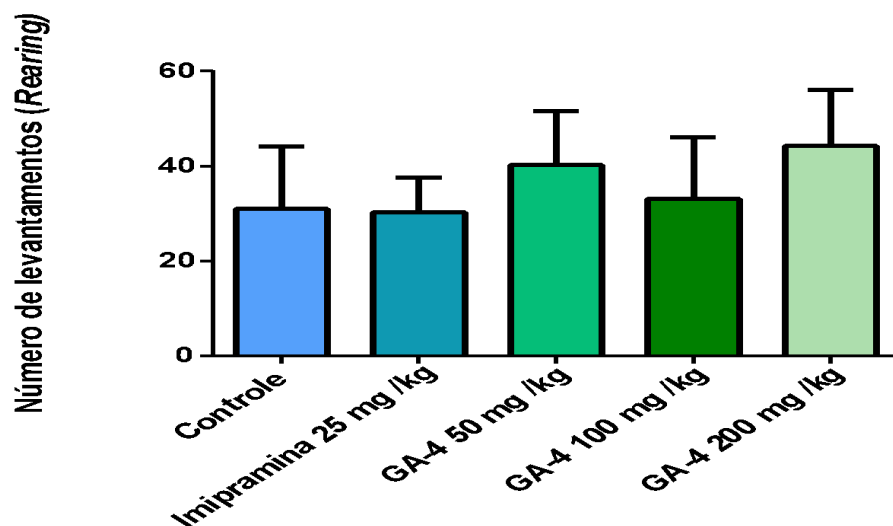
	Controle	Imipramina	GA-4	GA-4	GA-4
		30 mg/kg	50 mg/kg	100 mg/kg	200 mg/kg
Levantar	31 ± 4,64	30,3 ± 2,59	40,3 ± 4,00	33,1 ± 4,60	44,4 ± 4,14
Autolimpeza	2,8 ± 0,93	1,6 ± 0,18	2,0 ± 0,33	2,5 ± 0,38	2,3 ± 0,86
Cruzamentos	97,9±6,46	78,6 ± 2,67	107,3±6,48 ^b	76,7 ± 4,25	114,5± 7,09 ^b
Micções	0,1 ± 0,12	0,3 ± 0,16	0,6 ± 0,18	0,8 ± 0,41	2,3 ± 0,70 ^a
Bolos Fecais	2,0 ± 0,65	0,9 ± 0,40	1,0 ± 0,33	0,8 ± 0,41	2,3 ± 0,70

Fonte: Dados da pesquisa, (2019). Os resultados estão expressos como média ± erro padrão da média. Análise Kruskal-Wallis seguido do pós teste de Dunn's. Legenda: ^a $p < 0,05$ comparado com grupo controle.

No parâmetro exploratório de levantar (*Rearing*) não foi observada nenhuma alteração significativa dos grupos tratados por GA-4 comparados com o grupo controle (**Gráfico 8**). O mesmo resultado foi encontrado com o parâmetro de autolimpeza (*Grooming*) (**Gráfico 9**).

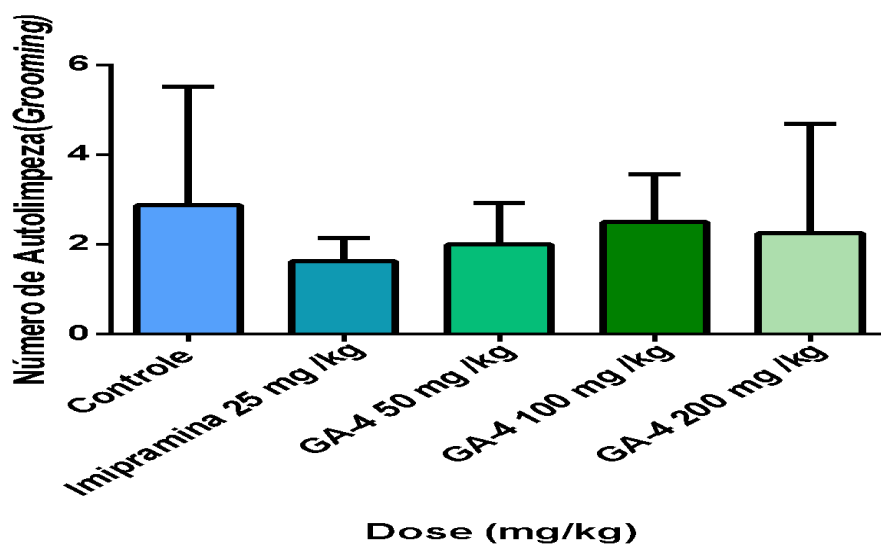
Ao analisarmos o número de cruzamentos dos animais, verificamos que não houve nenhuma alteração estatisticamente significativa quando comparamos com o grupo controle. Já ao comparar com a Imipramina (30 mg/kg), observa-se um aumento da mobilidade dos animais que foram tratados nas doses de 50 e 200 mg/kg (**Tabela 7**) e (**Gráfico 10**). A partir dos resultados obtidos, a substância GA-4 alterou a locomoção dos animais, podendo sugerir uma ação psicoestimulante quando comparado a imipramina.

Gráfico 8 - Efeito da substância G4 sobre o número de levantamentos no teste de campo aberto em camundongos.



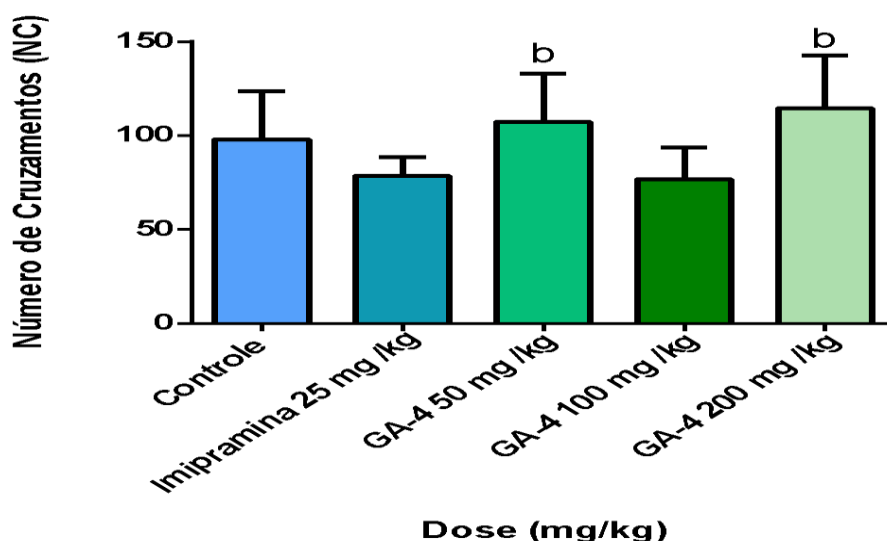
Fonte: Os resultados estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média. Análise Kruskal-Wallis seguido do pós teste de Dunn's.

Gráfico 9 - Efeito da substância GA-4 sobre o número de autolimpeza no teste de campo aberto em camundongos.



Fonte: Os resultados estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média. Análise Kruskal-Wallis seguido do pós teste de Dunn's.

Gráfico 10 - Efeito da substância GA-4 sobre o número de cruzamentos no teste de campo aberto em camundongos.

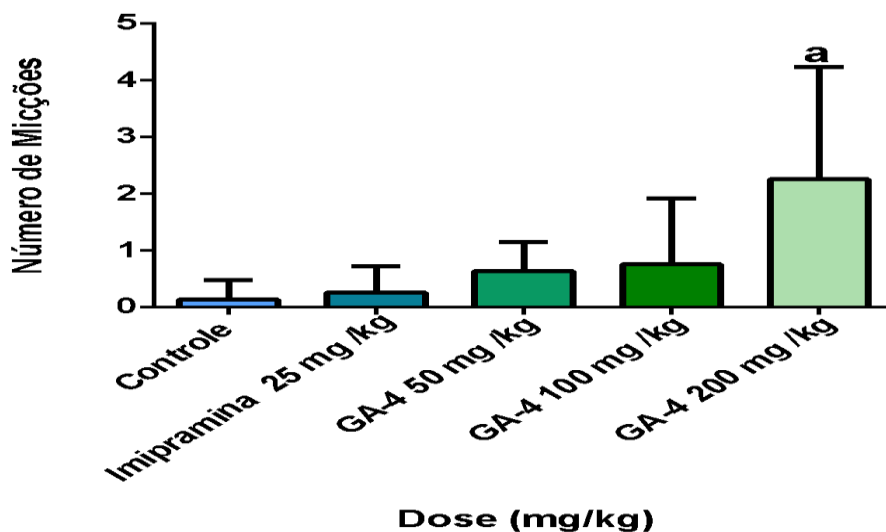


Fonte: Os resultados estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média. Análise por Kruskal-Wallis, seguido também pelo pós teste de Dunn's. Legenda: ^b $p < 0,05$ comparado com grupo imipramina (30 mg/kg).

Também foi avaliada a atividade autonômica dos animais quanto à micção e quantidade de bolos fecais. Os animais tratados com a dose de 200 mg/kg, apresentaram um maior número de micções ao ser comparado com o grupo controle (**Tabela 7**) (**Gráfico 11**). Já quanto ao número de bolos fecais, não houve nenhuma alteração significativa dos grupos tratados por GA-4 em relação ao controle (**Tabela 7**) (**Gráfico 12**). Tais resultados refletem a emocionalidade dos animais, e consequentemente seu estado de ansiedade. Podemos inferir, portanto, que a substância GA-4 não causou um aumento de ansiedade dos animais, já que não ocorreram alterações significativas em relação ao grupo controle.

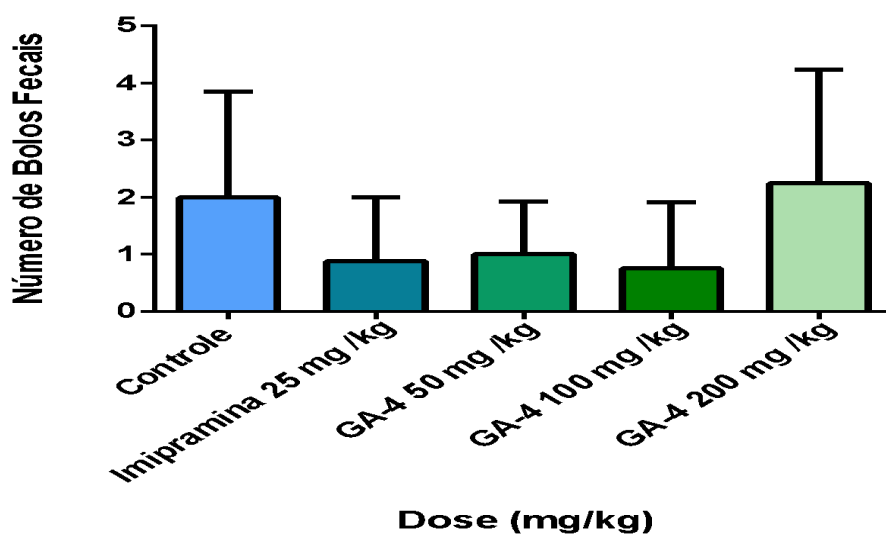
Assim, a partir dos resultados do teste de campo aberto, a substância GA-4, apresenta ser uma substância antidepressiva. Já que mostrou resultados aproximados aos da Imipramina, que é um medicamento antidepressivo amplamente utilizado na clínica. Além do que a substância GA-4 não apresentou ser psicoestimulante, quando comparada ao controle.

Gráfico 11 - Efeito da substância GA-4 sobre o número de micções no teste de campo aberto em camundongos.



Fonte: Os resultados estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média. Análise por Kruskal-Wallis, seguido também pelo pós teste de Dunn's. Legenda: ^a $p < 0,05$ comparado com grupo controle.

Gráfico 12 - Efeito da substância GA-4 sobre o número de bolos fecais no teste de campo aberto em camundongos.



Fonte: Os resultados estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média. Análise por Kruskal-Wallis, seguido também pelo teste pós teste de Dunn's.

5.2.2. Teste do Nado Forçado

Através do teste do nado forçado, foi possível observar que os animais tratados com a substância GA-4 nas doses de 50 e 100 mg/kg, e os que receberam Imipramina (30 mg/kg), tiveram uma diminuição do tempo de imobilidade comparado com o grupo controle. Já o grupo que recebeu a maior dose (200 mg/kg), não apresentou nenhuma alteração significativa comparada com o controle, mas obteve um aumento do tempo de imobilidade comparado com o grupo que recebeu Imipramina (**Tabela 8**) e (**Gráfico13**). Desta forma, sugere-se um possível efeito antidepressivo da substância estudada nas doses de 50 mg/kg e 100 mg/kg.

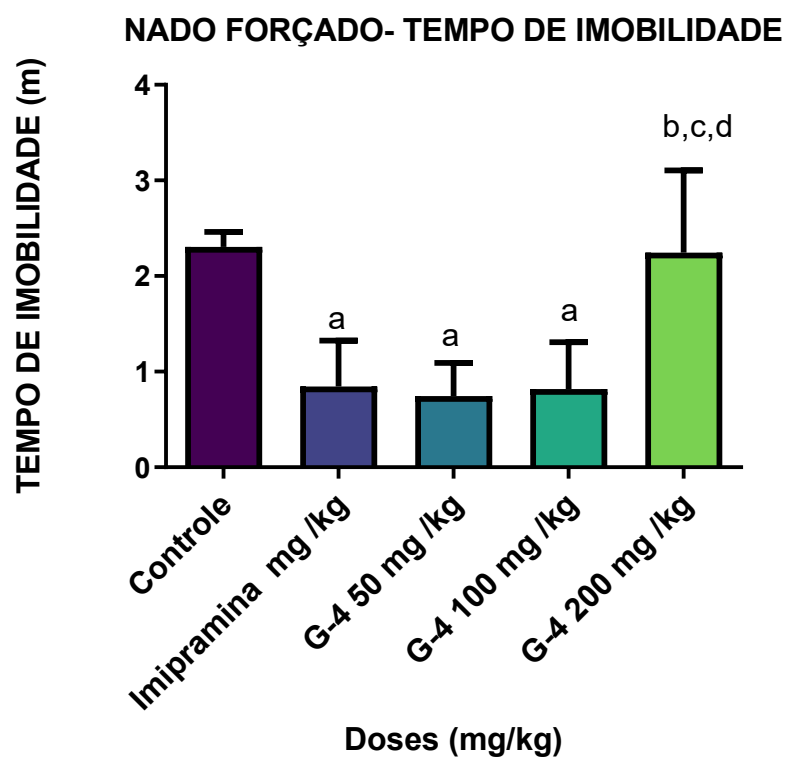
Este resultado corrobora com os resultados do teste de campo aberto. No qual a substância GA-4, por não ocasionar alterações na locomoção dos animais, e diminuir o tempo de imobilidade no teste de nado forçado, mostra ser esta uma substância com característica antidepressora.

Tabela 8 - Avaliação do efeito da substância GA-4 nas doses de 50, 100 e 200 mg/kg sobre o Sistema Nervoso no Teste do Nado Forçado.

	Controle	Imipramina 30mg/kg	GA-4 50 mg/kg	GA-4 100 mg/kg	GA-4 200 mg/kg
Tempo de imobilidade (m)	2,3 ± 0,05	0,8 ± 0,17 ^a	0,7 ± 0,12 ^a	0,8 ± 0,17 ^a	2,2 ± 0,30 ^b

Fonte: Dados da pesquisa, (2019). Os resultados estão expressos como média ± erro padrão da média. Análise por Kruskal-Wallis, seguido também pelo pós teste de Dunn's. Legenda: ^ap<0,05 comparado com grupo controle; ^bp<0,05 comparado com grupo imipramina (30 mg/kg).

Gráfico 13 - Efeito da substância GA-4 sobre o tempo de imobilidade no teste do nado forçado em camundongos.



Fonte: Os resultados estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média. Análise por Kruskal-Wallis, seguido também pelo teste pós teste de Dunn's. Legenda: ^a $p < 0,05$ comparado com grupo controle; ^b $p < 0,05$ comparado com grupo imipramina (30 mg/kg);

6. DISCUSSÃO

Durante o desenvolvimento de um candidato a medicamento, são imprescindíveis que sejam realizados estudos toxicológicos (ISSA *et al.*, 2017). Diante disso, ao avaliar o potencial farmacológico da substância GA-4, foi analisada sua farmacocinética *in silico*, *docking* molecular e toxicidade *in silico* e *in vivo*.

Na perspectiva de se obter conhecimento de forma rápida e eficiente quanto às diferentes propriedades de uma droga, os estudos *in silico* se tornaram ferramentas de grande utilidade. Tendo em vista que através destes métodos computacionais podem ser fornecidas informações preliminares essenciais, como também, quanto às propriedades físico-química, tóxicas e a interação de compostos com seus receptores alvo. Conduzindo assim, a pesquisa adequadamente para o desenvolvimento de novos fármacos (BHATI; KAUSHIK; SINGH 2018; JAMUNA *et al.*, 2018; KHAN *et al.*, 2019; PRADEEPAKIRAN; REDDY 2019).

Desta forma, o método *in silico* foi utilizado no presente estudo como meio norteador na condução da pesquisa sobre a substância GA-4. Avaliando suas características físico-químicas e farmacocinéticas teórica, através de programas computacionais, como *Molinspiration* e *AdmetSAR*.

O estudo das características físico-química da molécula foi realizado pelo programa *Molinspiration*, que avaliou propriedades importantes como: hidrofobicidade, tamanho da molécula, características de ligação de hidrogênio, distribuição eletrônica e flexibilidade. Parâmetros estes que influenciam na ação da molécula no organismo, interferindo na biodisponibilidade, propriedades de transporte, afinidade a proteínas, reatividade, toxicidade, estabilidade metabólica e muitos outros (TARIQ *et al.*, 2016).

De acordo com a “Regra dos Cinco” de Lipinski, uma molécula para ter uma biodisponibilidade oral teórica adequada, deve atender ao menos 3 dos requisitos: ter um peso molecular (MM) inferior ou igual a 500Da, o número de doador de ligações de hidrogênio (nDLH) inferiores ou igual a 5, o número de aceitador de ligações de hidrogênio (nALH) inferiores ou igual a 10 e *miLogP* inferior ou igual a 5 (LIPINSKI *et al.*, 2001; KHAN *et al.*, 2018; MOGHIMI *et al.*, 2018). Como pode ser observado, a substância GA-4, atendeu à “Regra dos Cinco” de Lipinski, inferindo assim que esta provavelmente apresente uma boa biodisponibilidade oral.

Por meio do programa *molinspiration* é possível avaliar o miLogP , que corresponde ao coeficiente octanol/água. Sendo possível a identificação quanto à lipofilicidade da molécula, de forma a determinar sua capacidade de absorção e distribuição, sendo capaz de atravessar membranas quando apresentar um miLogP ≤ 5 (MISHRA *et al.*, 2017; DOLABELA *et al.*, 2018). A substância GA-4 apresentou um miLogP igual a 3,17 tendo assim característica lipofílica, o que facilita sua passagem pela membrana plasmática. Corroborando a este dado, foi visto que a substância GA-4 possui uma massa molar (MM) igual a 331,42 o que facilita sua passagem transmembranar, já que substâncias com peso molecular menor que 500, tem melhor absorção (AHMMED; ALKALI, 2019).

Dos parâmetros físico-químicos, importantes, considerados por Lipinski, também se avaliou o número de grupos aceptores de ligação de hidrogênio (nALH), e o número de grupos doadores de ligação de hidrogênio (nDLH). Quanto maior o número de aceptores, maior é a quantidade de sítios que podem ligar-se com resíduos de aminoácidos, por meio de ligações de hidrogênios (DOLABELA *et al.*, 2018; JAMUNA *et al.*, 2018). Como pode ser visto na **Tabela 4**, a molécula GA-4, apresentou nALH igual a 5 e nDLH igual a 2, estando dentro da regra de Lipinski, indicando assim uma maior interação de ligação e propiciando a ação da substância.

Além dos parâmetros indicados pela “Regra dos Cinco” de Lipinski para análise quanto às características físico-química de uma substância, o estudo de outras especificações é importante. A área de superfície polar total (TPSA) é uma propriedade importante para predição da biodisponibilidade oral de uma droga. Sendo calculada a partir das áreas superficiais ocupadas por átomos de oxigênio e nitrogênio, e por átomos de hidrogênio ligados a eles e/ou átomo de metal. Estando relacionado com a capacidade de ligação do hidrogênio de um composto (TARIQ *et al.*, 2016; MISHRA *et al.*, 2017). Indica-se que TPSA de um composto deve ser inferior a 140 Å² (AHMMED; ALKALI, 2019). A substância GA-4 apresentou uma TPSA igual a 60,09 Å². Reafirmando sua provável biodisponibilidade teórica.

Ainda, a GA-4 apresentou o número de bandas rotáveis (nrotb) igual a 3, indicando uma boa interação com o seu receptor. Essa propriedade está relacionada com a flexibilidade da molécula, consequentemente com a interação ao seu receptor (MISHRA *et al.*, 2017). Já que para considerar uma boa flexibilidade, a molécula dever ter o nrotb < 10 (MOGHIMI *et al.*, 2018).

O estudo farmacocinético *in silico*, permite a avaliação da absorção, distribuição, metabolismo, excreção (ADMET) além da toxicidade de substâncias. Sendo esta uma ferramenta que tem sido bastante utilizada no auxílio de desenvolvimento de novos medicamentos, de forma rápida e com menor custo (WANG *et al.*, 2015).

Para avaliação farmacocinética da substância GA-4, foi utilizado o programa *AdmetSAR*. Quanto à absorção, foi visto que a substância GA-4 é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica, tendo assim possíveis efeitos no sistema nervoso central (SNC), o que corrobora com os efeitos antidepressivos observados nos estudos psicofarmacológicos. A barreira hematoencefálica separa o tecido cerebral da corrente sanguínea, de forma a proteger o SNC. Para que uma molécula seja capaz de atravessar essa barreira física de forma passiva, esta deve ter características lipofílica e solúvel em água (NISHA *et al.*, 2016; GAO *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 2018). Corroborando para os resultados de *miLogP* da substância GA-4, que apresentou *miLogP* inferior a 5.

Também, a avaliação da absorção intestinal humana (AIH) ajuda a prever a possibilidade de a droga ser absorvida em nível de intestino delgado (NISHA *et al.*, 2016). Foi demonstrado que a substância GA-4 foi positiva para AIH, mas negativa para absorção pelas células Caco-2. Estas são linhagens de células intestinais muito utilizadas em estudo *in vitro* para avaliação da permeabilidade de uma droga (WELLING *et al.*, 2015; PHAM-THE *et al.*, 2018). Apesar da substância GA-4 ter sido negativa teoricamente para absorção por estas células, os outros parâmetros analisados quanto à absorção, indicam que esta molécula apresente uma boa absorção intestinal.

Outro fator analisado sobre a capacidade de absorção foi a relação da droga com a glicoproteína de Permeabilidade (P-gp). Esta proteína fica disposta nas membranas biológicas gastrointestinais, renais, hepáticas e cerebrais, e funciona como uma bomba de efluxo que limita a captação celular de substâncias. Estas bombas acabam restringindo a passagem de toxinas, mas também limitam a passagem de fármacos causando falha terapêutica devido a baixa concentração no local de ação, como ocorre com alguns quimioterápicos (SYED *et al.*, 2017; AHMMED; ALKALI, 2019; OHASHI *et al.*, 2019). Conhecendo a função da P-gp, é importante saber se a droga estudada é um substrato ou não desta proteína. Bem como se é um inibidor ou não, estimando assim o efluxo ativo através das

membranas biológicas (MONTANARI; ECKER 2015). A substância GA-4 teoricamente não é um substrato da P-gp, não sofrendo interferência da mesma no seu processo de absorção. Mas a substância GA-4 não é capaz de inibir essa proteína, e eliminar sua função de efluxo.

Transportadores de membrana são determinantes na eficácia terapêutica de uma droga. Desta forma é válido estudar como as drogas interferem nesses transportadores. Os transportadores de cátions orgânicos (TCO), que estão mais expressos no lado basolateral das células tubulares proximais nos rins, secretam cátions orgânicos. Estes transportadores podem auxiliar no acúmulo de medicamentos nos rins, bem como podem ser sensíveis a hormônios, como a corticosterona. (GAI *et al.*, 2016; SPROWL *et al.*, 2016). A substância GA-4 teoricamente não inibe TCO, dessa forma não interfere na passagem de substâncias orgânicas para os rins.

Quanto ao processo de metabolização de fármacos, este tem ação de um conjunto de enzimas muito importantes, o sistema citocromo P450 (CYP450). Esse sistema é o responsável por catalisar o metabolismo da maioria dos fármacos, cerca de 80% (SHUKLA *et al.*, 2018). Além disso, muitos compostos (pró-fármacos) são bioativados por essas enzimas para formar seus compostos ativos (EL-SAYED *et al.*, 2016). Esse sistema enzimático é formado por subtipos de enzimas, como CYP2C9, CYP2C19, e CYP2D6 que metabolizam drogas clinicamente relevantes. Sendo estas responsáveis pelo metabolismo de fase I de cerca de 40% dos medicamentos usados na clínica (SHAH *et al.*, 2016; GOH *et al.*, 2017; SHUKLA; SHUKLA; TRIPATHI 2018). Dentre os subtipos, a CYP 3A4 é a principal enzima envolvida no metabolismo de drogas no fígado. Podendo causar, assim, potenciais interações entre diferentes fármacos (BASHEER; KEREM, 2015; DENISOV *et al.*, 2019)

Muitos fármacos são metabolizados por mais de um tipo de enzima CYP (SHAH *et al.*, 2016). Por isso, ao avaliar a metabolização de uma droga, é importante que esta seja estudada frente a mais de um subtipo de enzima. O programa *AdmetSAR* previu a metabolização da substância GA-4. E mostrou que esta não é substrato e nem inibidor das enzimas CYP2C9, CYP2D6, também não sendo substrato da CYP3A4, mas é capaz de inibi-la. Assim como inibe CYP1A2 e CYP 2C19, e tem alta promiscuidade inibitória de CYP. Ao inibir essas enzimas, pode ocorrer o aumento dos níveis plasmáticos de outra droga quando administrada concomitantemente, prolongando seus efeitos farmacológicos e alcançando

concentrações tóxicas. Assim como ao induzir estas enzimas, ocorre o aumento do metabolismo do outro fármaco administrado em conjunto, diminuindo sua concentração terapêutica plasmática (AHMMED *et al.*, 2016).

Os estudos toxicológicos computacionais são ferramentas viáveis na previsão da segurança de uma droga. Além do que, utilizando estes métodos pode-se racionalizar o uso de animais, ter uma maior efetividade da pesquisa, e menor custo, tendo em vista sua capacidade de estimar a toxicidade da substância antes mesmo de sintetizá-la (RAIES; BAJIC, 2018; MYATT *et al.*, 2018).

Organizações internacionais têm elaborado documentos de incentivo ao uso de ferramentas *in silico* para o estudo de toxicidade. Como a diretriz M7 do ICH (*International Council for Harmonization*), que avalia o controle de impurezas mutagênicas em produtos farmacêuticos (ICH M7, 2017), e a OECD (*Organization for Economic Co-operation and Development*) que aborda a relação estrutura-atividade (Q) SAR e a importância da integração entre bioinformática e quimioinformática (OECD, 2015).

Desta forma, diversos parâmetros toxicológicos de uma molécula podem ser avaliados, até mesmo a nível gênico. Como o estudo da interferência no gene relacionado a éter-a-go-go humano (HERG), que está relacionado com o canal de potássio Kv11.1. Este tem importante papel na repolarização do potencial cardíaco, de forma que quando inibido ou mutado, produz síndrome do QT longo ou arritmia cardíaca (WANG; MACKINNON, 2017; MALY *et al.*, 2019). Portanto, para evitar cardiotoxicidade, é recomendado o estudo não clínico das substâncias, como é preconizado pelas organizações *Food and Drug Administration* dos EUA, e a *European Medicines Agency* (ORVOS *et al.*, 2019). Através do programa *AdmetSAR*, observou-se que a molécula GA-4 é um inibidor fraco de HERG, desta forma provavelmente não causa arritmia cardíaca letal, e nem cardiotoxicidade.

Dentre os modelos *in silico* para avaliação da toxicidade de uma substância, tem-se o teste de Ames, que avalia se a droga é capaz de causar mutações gênicas. Sendo o teste de mutagenicidade mais comumente utilizado e validado (VIAN *et al.*, 2019). Também sua aplicabilidade é inegável, visto que ao realizar o teste *in silico*, sendo o resultado positivo para mutagenicidade, permite estratégias para limitar a exposição àquela droga minimizando o risco de câncer (GUNTHER *et al.*, 2017). De acordo com a avaliação *in silico* da toxicidade da substância GA-4, esta provavelmente não apresenta potencial mutagênico e nem carcinogênico. Ainda,

através do programa *AdmetSAR* indicou que provavelmente a toxicidade aguda em ratos da GA-4, apresente uma DL_{50} de 2.6305 mol/kg, sendo classificada na categoria III de acordo o estudo *in silico*, apresentando assim possivelmente uma baixa toxicidade oral.

Assim, a partir dos resultados *in silico*, infere-se que a substância GA-4 apresenta uma boa biodisponibilidade teórica oral, tendo em vista suas características físico-químicas demonstrados pelo programa *Molinspiration*. E na análise de sua farmacocinética pelo programa *AdmetSAR*, este prediz que a substância estudada tem uma boa absorção, sofre metabolização pelas enzimas CYP e apresenta baixo grau de toxicidade oral teórica.

Através do *docking* é possível sugerir um mecanismo de ação para a molécula estudada. Assim, foi identificado que a substância GA-4 foi capaz de ligar-se ao receptor $\alpha 2$ - adrenérgico, com alta energia de ligação e no mesmo sítio ativo da ioimbina. Esta que é um antagonista deste receptor (YAPICI-ESER H *et al.*, 2018). Portanto, possivelmente o mecanismo de ação da substância GA-4 está envolvido com a antagonização do receptor $\alpha 2$ - adrenérgico, permitindo que ocorra liberação de noradrenalina, minimizando assim os efeitos depressivos.

Os agonistas do receptor $\alpha 2$ inibem a liberação de noradrenalina (NA) dos terminais noradrenérgicos, já os antagonistas do receptor $\alpha 2$ têm um efeito oposto (YAPICI-ESER H, *et al.*, 2018). Evidências apontam que pacientes com transtorno depressivo maior apresentam uma regulação positiva dos receptores $\alpha 2$ centrais, o que leva à diminuição da atividade noradrenérgica (KUEHL LK, *et al.*, 2020).

Ao realizar o estudo de toxicidade não clínica *in vivo*, a substância GA-4 foi classificada como sendo uma substância de baixa toxicidade. Tendo em vista que esta não causou a morte de nenhum dos animais em experimentação, até mesmo dos que receberam a dose de 2000 mg/kg. Ainda, a substância foi classificada na categoria V da GSH, que são para substâncias de baixa toxicidade, isto porque de acordo com a OECD 423 a GA-4 apresentou uma DL_{50} superior a 5.000 mg/kg (Figura 5), o que corrobora com os estudos *in silico*, no qual a DL_{50} foi estimada sendo maior que 2000 mol/kg.

Também, através do estudo de toxicidade aguda não-clínica *in vivo*, foi realizada a avaliação de alterações comportamentais, que é um parâmetro importante na análise de uma possível toxicidade sistêmica (OLIVEIRA *et al.*, 2016). Portanto, os animais tratados com a substância GA-4 nas doses de 300 mg/kg e

2000 mg/kg, após a administração da droga, foram submetidos a uma triagem comportamental descrita por Almeida *et al.*, (1999). Esta metodologia consiste em um *screening*, no qual por meio de alguns testes, avalia-se os possíveis efeitos estimulantes ou depressores que uma substância testada pode causar sobre o Sistema Nervoso Central (SNC) e Sistema Nervoso Autônomo (SNA) do animal. As ratas tratadas do estudo em questão, não apresentaram nenhuma alteração comportamental após a administração da droga em ambas as doses (300 mg/kg e 2000 mg/kg).

Além da avaliação de alterações comportamentais como indicativos de toxicidade sistêmica, também, leva-se em consideração a redução significativa no consumo de água, ração e alterações no desenvolvimento ponderal dos animais experimentais (ROMAN *et al.*, 2014; STEDILE *et al.*, 2015; SILVA *et al.*, 2016). No presente estudo, a substância GA-4 não mostrou nenhuma alteração significativa no consumo de água nos grupos tratados. Quanto ao consumo de ração, o grupo 2000mg/kg teve uma redução do consumo comparando-se ao consumo do grupo controle e do grupo 300. Como o grupo 2000mg/kg é referente aos animais que receberam a substância GA-4 na dose de 2000 mg/kg, esta pode ter causado uma maior saciedade dos animais, e com isso o seu menor consumo da ração. A diminuição do consumo de ração ou água, também pode ser consequência de alterações na palatabilidade dos animais, provocados pela droga administrada (FERREIRA *et al.*, 2016). Mas não podemos inferir que a substância GA-4 causou algum distúrbio gástrico aos animais, tendo em vista que o histopatológico do estômago dos animais tratados pela substância GA-4 não apresentou nenhuma anormalidade comparando-se com o grupo controle.

Descartando assim a possibilidade da substância GA-4 nas doses testadas ser tóxica a este órgão.

Apesar dessa diminuição na ingestão de alimento, os animais do grupo 2 não apresentaram alteração significativa no peso corporal, assim como também os animais do grupo 1. A avaliação do peso corporal dos animais é um parâmetro importante, tendo em vista que sua diminuição ou aumento significativo pode ocasionar anorexia ou toxicidade sistêmica provocada pela substância administrada (FERREIRA *et al.*, 2016). Logo, os dados deste estudo não indicam efeitos tóxicos de ordem física nos animais tratados pela substância GA-4.

A análise dos parâmetros bioquímicos é um meio para diagnóstico de toxicidade induzida por xenobióticos em determinados tecidos (OLIVEIRA *et al.*, 2016). Assim, ao fim dos 14 dias de experimentação, o sangue periférico dos animais foi coletado para avaliação dos parâmetros bioquímicos e hematológicos, e assim ser investigado possíveis efeitos tóxicos ocasionados pela substância GA-4.

Foram avaliados 21 parâmetros bioquímicos, sendo constatados alterações significativas em 5: proteínas totais, creatinina, sódio, cálcio e lipase.

Foi visto que os animais do grupo tratado com a maior dose da substância GA-4 apresentaram um aumento significativo das proteínas totais em relação ao grupo 1, mas não ao grupo controle. Entretanto, aumento ou diminuição de proteínas totais são fatos comuns de acontecer em animais que estão em experimentação (RAMALHO, 2015). Alterações nas proteínas séricas totais, bem como anormalidades no teor de albumina/globulina são indicativos de disfunção hepática (YUAN *et al.*, 2014). Mas, avaliando demais parâmetros bioquímicos que são considerados marcadores da função hepática, como AST, ALT e Albumina, estes não apresentaram nenhuma alteração que fosse significativa nos grupos tratados. Logo, analisando o nível das proteínas totais, não se pode inferir que a substância GA-4 cause alteração na função hepática. Além disso, ao analisar o histopatológico, o fígado dos animais tratados pela substância GA-4, mantiveram-se com sua estrutura dentro da normalidade, ao comparar com o grupo controle, podendo afirmar que a substância GA-4 não é hepatotóxica.

Além do fígado, outros órgãos de suma importância, são os rins, estes exercem uma gama de funções para manutenção da homeostase corporal (MESCHER, 2016). Uma de suas atribuições é a filtração sanguínea, importante mecanismo para eliminação de substâncias indesejáveis, e reabsorção de outras substâncias importantes para o organismo. A disfunção renal pode ser caracterizada pela diminuição da capacidade de filtração, tendo como consequência o aumento de marcadores como a ureia e creatinina (EL-DEMERDASH, NASR 2014). Sendo esta última o principal marcador de dano renal, tendo em vista que esta é livremente filtrada. Logo, uma pequena elevação nos seus níveis séricos, indica uma redução da Taxa de Filtração Glomerular (TFG), portanto uma disfunção renal (MARIZ *et al.*, 2006; CASTILLA *et al.*, 2018; DEDEKE *et al.*, 2018; REECE & ROWE, 2018).

A creatinina é um marcador da função renal (CASTILLA *et al.*, 2018). Sua elevação pode indicar dano renal considerando-se uma maior velocidade de depuração (MARIZ *et al.*, 2006). No presente estudo, foi observada uma elevação significativa da creatinina sérica do grupo tratado 2 em relação a do grupo tratado 1, mas não ao grupo controle. Já a ureia que também é um marcador sensível para avaliação da função renal, não apresentou nenhuma alteração significativa. Além disso, através da avaliação histológica dos rins, estes estiveram com suas características morfológicas dentro da normalidade, tanto suas estruturas da região cortical como da região medular. Diante disso, a substância GA-4 nas doses testadas não é capaz de causar nefrotoxicidade.

No sangue, também foram avaliados os íons que os compõe, logo, o sódio é um importante íon para o controle do balanço hidroeletrolítico. Já que é um dos eletrólitos com maior concentração no fluido extracelular. Desajustes em sua concentração podem causar alterações fisiológicas, levando a doenças (DANIELS, FLUHARTY, 2004; MARIZ *et al.*, 2006). Sua depleção leva a desidratação celular, diminuindo o fluido corporal total, de forma a atingir funções cardiovasculares, que, através de barorreceptores sensíveis ativam mecanismos que levam a maior retenção de sódio e água, e assim reestabelencendo os valores homeostáticos (HURLEY; JOHNSON, 2015).

Houve uma redução significativa da concentração de sódio plasmático do grupo tratado 2, em relação ao grupo tratado 1, mas sem alterações em relação ao grupo controle. A diminuição da concentração de sódio pode ter sido ocasionada pela diminuição da ingesta de ração. Outro fator que também pode ter ocorrido, é a alteração no sistema de filtração renal, no qual o sódio pode ter sido menos reabsorvido pelos rins ou mais filtrado, sendo mais excretado na urina. Mas apesar dessa redução da concentração de sódio plasmático, os animais não se encontraram desidratados, já que não ocorreu alteração significativa na ingestão de água.

O cálcio tem importante papel na função muscular, estando intimamente relacionado com a contração do músculo. Alterações na concentração do cálcio nos miócitos causam disfunção contrátil do músculo cardíaco e arritmia (VIEIRA *et al.*, 2016). Além disso, o cálcio assim como o fósforo são os principais íons que compõem a matriz mineral óssea, conferindo dureza e força (SILVA *et al.*, 2018; SCHNEIDER *et al.*, 2019). O grupo tratado com a dose de 300 mg/kg da substância

GA-4, apresentou uma redução significativa do cálcio sérico, comparado ao do grupo controle. Apesar de ter ocorrida essa alteração da concentração do íon cálcio, não foram observados desajustes na composição óssea das ratas, e nem disfunção do seu miocárdio através da análise anatomopatológica e histotológica, como visto nas (**Figuras 9 A e 10 A**). Além disso, as ratas que receberam a substância GA-4 em uma maior dose, não sofreram nenhuma alteração significativa no íon cálcio.

Outro tipo de avaliação bioquímica, diz-se à concentração de algumas enzimas. A lipase consiste em uma enzima produzida principalmente nas células glandulares do pâncreas. Esta apresenta importantes atividades fisiológicas, como a quebra das gorduras intestinais, e a regulação do suprimento de ácidos graxos para diversos tecidos, seja para seu armazenamento quanto para oxidação (BUCHHOLZ, & MELZIG, 2015; OLVERA-SANDOVAL *et al.*, 2018). A descoberta de substâncias capazes de inibir esta enzima são atrativos para o auxílio no tratamento da obesidade (BUCHHOLZ, & MELZIG, 2015). A substância GA-4 causou redução significativa da lipase nos animais tratados com a dose de 300 mg/kg (grupo 1) em relação ao grupo controle. Entretanto, os animais tratados com GA-4 na dose de 2000 mg/kg apresentaram um aumento significativo da concentração de lipase em relação ao grupo 1, mas nenhuma alteração significativa comparando-se com o grupo controle.

Apesar de terem sido detectadas alterações significativas em alguns elementos bioquímicos, os mesmos não foram severos ao ponto de causar insuficiência de algum órgão ou alguma disfunção fisiológica. Portanto, na avaliação dos parâmetros bioquímicos, a substância GA-4 nas doses administradas não apresentou sinais de toxicidade .

O sistema hematopoiético é bastante sensível à presença de substâncias tóxicas, logo, a avaliação de parâmetros hematológicos é de suma relevância (EL-BOSHY *et al.*, 2015; RODRIGUES 2017). Portanto, ao fim do experimento, também foram estudados os parâmetros hematológicos das ratas *Wistar* tratadas pela substância GA-4.

A análise eritrocitária permite a investigação da oxigenação dos tecidos corporais, tendo em vista que a principal função dos eritrócitos consiste no transporte de oxigênio e nutrientes para as células, assim como na retirada de dióxido de carbono e resíduos provenientes de reações celulares. Para que isso aconteça, as hemácias apresentam uma proteína essencial, a hemoglobina. Esta é

rica em ferro, e além de transportar oxigênio, também é responsável pela coloração avermelhada do sangue (ROMERO, HERNÁNDEZ-CHINEA, 2017).

No presente estudo, a substância GA-4 não causou nenhuma alteração no eritograma e na contagem de plaquetas das ratas em experimentação. Desta forma, não interfere nas funções fisiológicas exercidas pelas hemácias e pelas plaquetas. Quanto à avaliação do leucograma, houve uma diminuição dos leucócitos totais do grupo tratado 2 em relação aos do grupo tratado 1. Mas não houve alteração significativa em relação ao grupo controle.

Os leucócitos são células que atuam na defesa do organismo. Assim, a avaliação leucocitária, é um parâmetro relevante no acompanhamento de como uma substância atinge o sistema imunológico. Por isso, a contagem leucocitária é utilizada no monitoramento de pacientes em tratamento com quimioterápicos, no qual estes são responsáveis por causar mielosupressão e leucopenia (KIM *et al.*, 2017).

Ainda, ao realizar o histológico dos pulmões dos animais em experimentação, foi visto que o grupo controle apresentou infiltrado celular na região peribronquiolar, perivascular e nos alvéolos, indicando, portanto, um processo inflamatório. Ao observar os pulmões dos animais tratados por GA-4, foi vista uma diminuição do processo inflamatório, indicando assim, que possivelmente esta seja uma substância com potencial para tratamento de síndromes respiratórias.

Os testes comportamentais em animais são desenvolvidos para investigar uma suposição de cognição ou emoção, assim como verificar uma psicopatologia. Tais ensaios evoluíram com o decorrer do tempo e hoje existe uma grande variedade de testes. Dentre as espécies animais, os roedores sempre foram os mais utilizados para realização de ensaios comportamentais (BELOVICOVA *et al.*, 2017; OSMON *et al.*, 2018).

Dentre os ensaios existentes, tem-se o teste de campo aberto, que é frequentemente utilizado em roedores para medir a atividade locomotora, exploratória e de ansiedade (SCHULZ, 2018). Além disso, este teste pode ser usado para avaliar a saúde geral e o bem-estar de um animal. Aqueles animais estressados são propensos a mostrar menos atividade em campo aberto e comportamento estereotipado aumentado (KRAEUTER, GUEST, SARNYAI, 2019).

Através do teste de campo aberto é possível analisar alguns parâmetros, como: número de cruzamentos (locomoção), *Rearing* (levantar-se), *Grooming*

(autolimpeza), número de micções e bolos fecais, que representam diferentes formas de comportamento e atividade motora dos camundongos *Swiss*, apresentando diferenças fisiológicas e fisiopatológicas no estereótipo de movimento entre tais parâmetros (KOZLER, MAREŠOVÁ, POKORNÝ, 2017).

Os animais quando expostos a um novo ambiente, podem apresentar sinais de ansiedade. Esse estado comportamental permite que os mesmos se preparem para lidar com uma situação potencialmente perigosa (LECORPS, RÖDEL, FÉRON, 2016). O teste de campo aberto é o melhor teste comportamental para avaliar a atividade locomotora e respostas semelhantes à ansiedade, ao mesmo tempo (SHIEH, YANG 2020).

Um dos parâmetros analisados neste teste é o *Rearing*, que é o ato de levantarem-se com as duas patas traseiras. No qual o animal tem como objetivo familiarizar-se com o ambiente e, geralmente, procurar uma fonte de alimento (KOZLER, MAREŠOVÁ, POKORNÝ, 2017). Este parâmetro permite a avaliação da locomoção (vertical) do animal, de forma que quanto maior o número de *Rearing*, indica uma possível atividade ansiolítica (KUNIISHI *et al.*, 2017; STURMAN, GERMAIN; BOHACEK, 2018).

No presente estudo, ao avaliar o parâmetro *Rearing*, os camundongos tratados pela substância GA-4 não apresentaram um aumento significativo ao comparar com o grupo controle. Assim como não apresentou alterações com relação ao grupo que recebeu Imipramina, indicando, portanto, não se tratar de uma substância com atividade ansiolítica e sim com uma possível atividade antidepressora.

A imipramina é um antidepressivo tricíclico frequentemente utilizado na clínica para o tratamento da depressão (RAMIREZ, SHERIDAN, 2016). Os agentes tricíclicos atuam através da inibição da recaptação da serotonina (5HT) e noradrenalina (NE) na fenda sináptica através do bloqueio dos transportadores de recaptação da 5HT e da NE (GOLAN, 2014). Portanto, a imipramina é bastante utilizada em pesquisas relacionadas à depressão, servindo como controle positivo, para descoberta de novos antidepressivos, ou formas de potencializar seu efeito, assim como, também, para melhor entender o mecanismo da depressão (AHMED *et al.*, 2018; HUANG *et al.*, 2019). Portanto, no presente estudo, todos os parâmetros do teste de campo aberto tiveram a imipramina como controle positivo.

O *Grooming* refere-se ao comportamento de autolimpeza. É um parâmetro no qual permite uma avaliação da ansiedade do animal. Quanto maior a atitude de autolimpeza indica estados de ansiedade (WANG^c *et al.*, 2017; JHA, BHALERAO, DHOLE, 2018).

A autolimpeza é um dos comportamentos mais frequentemente observados em roedores. Está envolvido em processos fisiológicos normais, e é controlado por um circuito neural complexo, com influência de neuromoduladores, neurotransmissores e hormônios. Sendo característica de diversos transtornos neuropsiquiátricos quando a autolimpeza é realizada de forma anormal (KALUEFF *et al.*, 2016; JAMES, OYEWOLE, YETUNDE, 2017). Desta forma, esse parâmetro pode ser usado para entender transtornos neurais dos seres humanos através de testes como o campo aberto.

A substância GA-4 em todas as doses testadas não provocou nenhuma alteração significativa quanto ao *Grooming* realizado pelos camundongos, quando comparado com o grupo controle e com o grupo que recebeu a imipramina. Portanto, ao analisar este parâmetro do teste do campo aberto, a substância GA-4 não apresentou características de provocar ansiedade, assim como no estudo de *Rearing*.

O número de cruzamentos é um parâmetro que está relacionado à locomoção do animal (movimento horizontal). Alterações na locomoção podem indicar um transtorno neurológico, e assim manifestar a função cerebral anormal (KRAEUTER, GUEST, SARNYAI, 2019). Além de refletir a locomoção, o teste de número de cruzamentos também reflete as medidas de exploração e ansiedade (ZIMCIKOVA *et al.*, 2017). A substância GA-4 não provocou nenhuma alteração quanto ao número de cruzamentos dos camundongos quando comparado com o grupo controle. Havendo um aumento da ambulação dos grupos que receberam a dose de 50 mg/kg e 200 mg/kg, quando comparados com o grupo que foi administrada a imipramina. Portanto, diante destes resultados, a substância GA-4 é capaz de alterar a locomoção significativamente, indicando não ser uma substância psicoestimulante.

A ansiedade também está associada à atividade autonômica aumentada, resultando em aumento da defecação e micção (JHA, BHALERAO, DHOLE, 2018). Ao realizar o teste do campo aberto, a quantidade de vezes de defecação e micção do animal também é contabilizada, e estes parâmetros são considerados os indicadores que transparecem a condição emocional dos animais (ZADUBROVSKIY

et al., 2017). Além da ansiedade, o aumento de defecação sinaliza um possível processo depressivo do animal (BEE, MAHESHWARI, 2019).

A substância GA-4 não provocou nenhuma alteração quanto à defecação dos camundongos. Quanto à micção, foi observado um aumento nos animais que receberam a maior dose da substância GA-4. Sendo este o único parâmetro dentre todos os outros analisados do teste do campo aberto, que apresentou alguma alteração, comparada com o grupo controle. Desta forma, não se pode a partir de um único resultado, afirmar que os animais estavam com ansiedade provocada pela substância em estudo.

O teste do campo aberto foi utilizado de forma discriminatória, no qual, a partir deste, desvendamos que a substância em questão não se tratava de um psicoestimulante, tendo uma maior propensão para uma atividade antidepressora. Portanto, posteriormente ao teste de campo aberto, foi realizado o teste do nado forçado, para melhor evidenciar o efeito antidepressivo da substância GA-4.

De acordo com o teste do nado forçado, a substância GA-4 apresentou potencial efeito antidepressivo nas doses de 50 e 100 mg/kg, já que nestas doses houve um menor tempo de imobilização ao comparar com o grupo controle. Já ao observarmos a maior dose testada, esta causou um aumento no tempo de imobilidade dos camundongos comparados com os grupos tratados por Imipramina (30 mg/kg).

A depressão é uma doença complexa na qual provoca sintomas centrais, como desânimo e comportamento desesperado. Estes sintomas podem ser estabelecidos em animais por meio de diferentes protocolos, dentre eles, o teste do nado forçado (MOHSENI *et al.*, 2017). O teste de nado forçado é um ensaio preditivo, bastante utilizado pela comunidade científica como meio para pesquisa de novos antidepressivos (KOKRAS *et al.*, 2017; NAZ *et al.*, 2017; SAKHAEE *et al.*, 2016). Os animais expostos a este teste assumem uma posição imóvel, na qual se acredita demonstrar um estado de desespero comportamental. Assim, quanto maior o tempo de imobilidade, maior é o estado depressivo do animal (NAZARI *et al.*, 2016). Sendo um teste confiável, no qual muitos pesquisadores nem utilizam antidepressivos clássicos como controle positivo ao testar novos medicamentos (KARA, STUKALIN, EINAT, 2018).

Apesar do ensaio do nado forçado ter um poder analítico para avaliar a atividade antidepressiva de uma substância, este apresenta probabilidades de ser

levantado algum falso diagnóstico. Já que é característica de substâncias psicoestimulantes aumentarem a atividade locomotora no teste de campo aberto e diminuir o tempo de imobilidade no teste do nado forçado, o que pode induzir a um falso positivo como uma substância antidepressiva (MOHSENI *et al.*, 2017; OSTADHADI *et al.*, 2018).

Diante disso, é importante a realização do teste de campo aberto para respaldar o teste de nado forçado e evitar resultado falso positivo (KHAN, KHAN 2019), pois, a realização do ensaio do campo aberto permite confirmar que a imobilidade durante o nado forçado não é devido à alteração na atividade locomotora dos animais (NAZARI *et al.*, 2016).

A maioria dos antidepressivos causa a redução do tempo de imobilidade dos animais no teste de natação forçada (JIN *et al.*, 2020). Logo, a substância GA-4 pode ser classificada com uma possível atividade antidepressora, já que diminui o tempo de imobilidade no teste do nado forçado e não causou nenhuma alteração significativa quanto à locomoção nos testes de campo aberto quando comparada ao grupo controle.

A substância GA-4 é classificada como uma chalcona tiofênica, classe esta de grande interesse para o desenvolvimento de novos medicamentos, tendo em vista que diferentes estudos relatam atividade antidepressora de substâncias dessa classe. Alguns estudos descrevem diferentes chalconas que reduziram o tempo de imobilidade, e exibiram um efeito antidepressivo melhor ou semelhante ao da fluoxetina, que é um medicamento consolidado no mercado como antidepressor (JIN *et al.*, 2020; ZHAO *et al.*, 2018). A realização de outros testes comportamentais também aponta as chalconas com potencial atividade antidepressora (HIGGS *et al.*, 2019).

7. CONCLUSÕES

Na avaliação *in silico*, a substância GA-4 apresentou uma boa biodisponibilidade oral teórica, já que atendeu aos requisitos preconizados pela “Regra dos cinco” de Lipinski, que também apresentou uma baixa toxicidade teórica.

Os resultados do estudo de toxicidade aguda *in vivo* corroboraram com os resultados do estudo *in silico*, demonstrando baixa toxicidade da substância GA-4.

Diante dos resultados obtidos, podemos concluir que o derivado de chalcona GA-4, é um potencial candidato a antidepressivo, tendo em vista que reduziu o tempo de imobilidade dos animais no teste do nado forçado. Além do que, não alterou na atividade locomotora dos animais, confirmando, assim, o teste do nado forçado.

Ainda através dos testes psicofarmacológicos, foi visto que a substância GA-4 não apresentou efeitos ansiolíticos e nem psicoestimulante, corroborando, portanto com sua atividade antidepressora.

Sendo assim, esta substância apresenta-se como um candidato promissor a medicamento antidepressivo. Portanto, é interessante que seja dado continuidade do seu estudo, até alcançar testes de fase clínica, e assim ser incluído no arsenal terapêutico do tratamento da depressão.

8. REFERÊNCIAS

ABDOLLAHNEJAD, F. *et al.* Investigation of sedative and hypnotic effects of *Amygdalus communis* L. extract: behavioral assessments and EEG studies on rat. **Journal of natural medicines**, v. 70, n. 2, p. 190-197, 2016.

AHMMED, S.M *et al.* CYP450 mediated inhibition potential of *Swertia chirata*: An herb from Indian traditional medicine. **Journal of ethnopharmacology**, n. 178, p. 34-39, 2016.

AHMED, A.F., *et al.* Roles of β -adrenergic receptors on the mechanism of action of imipramine in chronic mild stress model of depression. **Lebda Medical Journal**, v. 5, n. 1, p. 168-179, 2018.

AHMMED, A; ALKALI, Y. In silico Pharmacokinetics and Molecular Docking Studies of Lead Compounds Derived from *Diospyros Mespiliformis*. **PharmaTutor**, n. 7, p. 31-37, 3 mar. 2019.

ALMEIDA, R.N.; *et al.* Metodologia para avaliação de plantas com atividade no Sistema Nervoso Central e alguns dados experimentais. **Rev. Bras. Farm**, v.80, p.72-76, 1999.

ALMEIDA, R.N.; OLIVEIRA, T.M.L. Triagem farmacológica comportamental. ALMEIDA, RN Psicofarmacologia: fundamentos práticos, 1ª Ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, cap. 11, p. 131-137, 2006.

AMSTERDAM, J.D.; KIM, T.T. Relative Effectiveness of Monoamine Oxidase Inhibitor and Tricyclic Antidepressant Combination Therapy for Treatment-Resistant Depression. **Journal of clinical psychopharmacology**, v. 39, n. 6, p. 649-652, 2019.

ANVISA. Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos Brasília: Gerência de Avaliação de Segurança e Eficácia – GESEF, 2013.

ARAUCHI R.; *et al.* Gunn rats with glial activation in the hippocampus show prolonged immobility time in the forced swimming test and tail suspension test. **Brain Behav.** v.8, n.8, p. 1-9, 2018.

ARCHER, J. Tests for emotionality in rats and mice: a review. **Animal Behaviour**, v. 21, n. 2, p. 205-235, 1973.

BANDGAR^a, B.P.; *et al.* Synthesis and biological evaluation of nitrogencontaining chalcones as possible anti-inflammatory and antioxidant agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, n. 2, p. 730–733, 2010.

BANDGAR^b, B.P.; *et al.* Synthesis and biological evaluation of simple methoxylated chalcones as anticancer, anti-inflammatory and antioxidant agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 3, p. 1364–1370, 2010.

BARBOSA, T. P. *et al.* Design, synthesis and antileishmanial in vitro activity of new series of chalcones-like compounds: A molecular hybridization approach. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 14, p. 4250–4256, 2011.

BASHEER, L; KEREM, Z. Interactions between CYP3A4 and dietary polyphenols. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2015.

BECHTEL, W. Circadian rhythms and mood disorders: are the phenomena and mechanisms causally related?. **Frontiers in psychiatry**, v. 6, p. 118, 2015.

BEE, R.; MAHESHWARI, K. K. Evaluation of antidepressant activity of *acyranthos aspera* by using open field test in rats. v. 8, p. 1183-1195, 2019.

BENSON, C.; *et al.* Biogenic amines and the amino acids GABA and glutamate: relationships with pain and depression. In: **Pain in Psychiatric Disorders**. Karger Publishers, v. 30, p. 67-79, 2015.

BELOVICOVA, K., BOGI, E., CSATLOSOVA, K., DUBOVICKY, M. Animal tests for anxiety-like and depression-like behavior in rats. **Interdisciplinary toxicology**, v. 10, n. 1, p. 40-43, 2017.

BERTOLDO, J. B.; *et al.* Synthetic compounds from an *in house* library as inhibitors of falcipain-2 from *Plasmodium falciparum*. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 30, n. 2, p. 299–307, 2015.

BHATI, S; KAUSHIK, V; SINGH, J. In Silico Identification of Piperazine Linked Thiohydantoin Derivatives as Novel Androgen Antagonist in Prostate Cancer Treatment. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, p. 1-16, 2018.

BOECK, P. *et al.* Synthesis of chalcone analogues with increased antileishmanial activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 5, p. 1538–1545, 2006.

BOŽIĆ, D.D. Antibacterial activity of three newly-synthesized chalcones & synergism with antibiotics against clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **The Indian journal of medical research**, v. 140, n. 1, p. 130–7, 2014.

BRAAT, S.; KOOY, R.F. The GABAA receptor as a therapeutic target for neurodevelopmental disorders. **Neuron**, v.86, n.5, p. 1119-1130, 2015.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Guia para a Condução de Estudos Não Clínicos de Toxicologia e Segurança Farmacológica Necessários ao Desenvolvimento de Medicamentos. Brasília (DF), 2013.

BROHAN, J; GOUDRA, B.G. The role of GABA receptor agonists in anesthesia and sedation. **CNS drugs**, v. 31, n. 10, p. 845-856, 2017.

BUCHHOLZ, T.; MELZIG, M.F. Polyphenolic compounds as pancreatic lipase inhibitors. **Planta medica**, v. 81, n. 10, p. 771-783, 2015.

CAPRINO, L.; RUSSO, P. Developing a paradigm of drug innovation: an evaluation algorithm. **Drug discovery today**, v. 11, n. 21-22, p. 999-1006, 2006.

CARLINI, E. A., *et al.* Pharmacology of lemongrass (*Cymbopogon citratus* Stapf). I. Effects of teas prepared from the leaves on laboratory animals. **Journal of ethnopharmacology**, v. 7, n. 1, p. 37-64, 1986.

CARVALHO, G.D.; *et al.* Clinical evaluation of laboratory rats (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar): sanitary, biological and physiological parameters. *Ceres*, v. 56, n. 1, p. 51-57, 2009.

CASANOVA, L.M; COSTA, S.S. Interações sinérgicas em produtos naturais: potencial terapêutico e desafios. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 2, p. 575-595, 2017.

CASTILLA, R.; *et al.* Environmental pollutant hexachlorobenzene induces hypertension in a rat model. **Chemosphere**, v. 195, p. 576-584, 2018.

CHAVAN, B.B.; *et al.* Synthesis and Medicinal Significance of Chalcones-A Review. **Asian Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences**, v. 6, n. 56, p. 1-7, 2016.

COMMONS K.G.; CHOLANIANS A.B.; BABB J.A.; EHLINGER D.G. The Rodent Forced Swim Test Measures Stress-Coping Strategy, Not Depression-like Behavior. **ACS Chem Neurosci**, v.8, n.5, p.955-960, 2017.

COSTA A.P.; *et al.* A proposal for refining the forced swim test in Swiss mice. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 45, p. 150-155, 2013.

CZÉH, B.; FUCHS, E.; WIBORG, O.; SIMON, M. Animal models of major depression and their clinical implications. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 64, 293-310, 2016.

DANIELS, D.; FLUHARTY, S.J. Salt appetite: a neurohormonal viewpoint. **Physiology & Behavior**, v. 81, p. 319-337, 2004.

DEDEKE, G. A; *et al.* Comparative assessment on mechanism underlying renal toxicity of commercial formulation of roundup herbicide and glyphosate alone in male albino rat. **International journal of toxicology**, v. 37, n.4, p. 285-295, 2018.

DENISOV, Ilia G. *et al.* Allosteric Interactions in Human Cytochrome P450 CYP3A4: The Role of Phenylalanine 213. **Biochemistry**, v.58, p. 1411-1421, 2019.

DOLABELA, M. F; SILVA, A. R. P. D. Estudo in silico das atividades de triterpenos e iridoides isolados de *Himatanthus articulatus* (Vahl) Woodson. **Revista Fitos**, v. 12, n.3, p. 227-242, 2018.

DUA, R.; *et al.* Pharmacological Significance of Synthetic Heterocycles Scaffold: A Review. **Advances in Biological Research**, v. 5, n. 3, p. 120–144, 2011.

DUBEY, T.; *et al.* Role of herbal drugs on neurotransmitters for treating various CNS disorders: A review. **Indian Journal of Traditional Knowledge**, v. 17, n.1, p. 113-121, 2018.

DUCKI, S.; *et al.* Potent antimitotic and cell growth inhibitory properties of substituted chalcones. **Bioorganic & Medicinal Chemical Letters**, v. 8, p. 1051-1056, 1998.

DUMAN, R.S.; SANACORA, G; KRYSTAL, J.H. Altered connectivity in depression: GABA and glutamate neurotransmitter deficits and reversal by novel treatments. **Neuron**, v. 102, n. 1, p. 75-90, 2019.

EL-BOSHY, M. E.; *et al.* Protective effects of selenium against cadmium induced hematological disturbances, immunosuppressive, oxidative stress and hepatorenal damage in rats. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 29, p. 104-110, 2015.

EL-DEMERDASH, F. M.; NASR, H. M. Antioxidant effect of selenium on lipid peroxidation, hyperlipidemia and biochemical parameters in rats exposed to diazinon. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 28, n.1, p. 89-93, 2014.

EL-SAYED, R. *et al.* Single-walled carbon nanotubes inhibit the cytochrome P450 enzyme, CYP3A4. **Scientific reports**, v.6, n. 21316, 2016.

FANG, X.; *et al.* Synthesis and antimicrobial activity of novel chalcone derivatives. **Research on Chemical Intermediates**, v. 40, n. 4, p. 1715–1725, 2014.

FASIPE, O.J. Neuropharmacological classification of antidepressant agents based on their mechanisms of action. **Archives of Medicine and Health Sciences**, v. 6, n. 1, p. 81, 2018.

FENALTI, J.M.; *et al.* Diversity of Brazilian plants with anthelmintic potential. **Health Sciences Journal**, v. 28, n. 1, p.39-48, 2016.

FERREIRA, M.D.S.; *et al.* Avaliação do potencial tóxico reprodutivo do extrato do fruto de Buchenavia sp em ratos machos impúberes da linhagem Wistar. **Archives of Veterinary Science**, v.21, n. 2, p. 79-86 ,2016.

FINBERG, J.P.M; RABEY, J.M. Inhibitors of MAO-A and MAO-B in psychiatry and neurology. **Frontiers in pharmacology**, v. 7, p. 340, 2016.

GAI, Z. *et al.* Organic cation transporter 2 overexpression may confer an increased risk of gentamicin-induced nephrotoxicity. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 60, n. 9, p. 5573-5580, 2016.

GAO, Z. Predict drug permeability to blood–brain-barrier from clinical phenotypes: drug side effects and drug indications. **Bioinformatics**, v. 33 n. 6, p. 901-908, 2016.

GHAN, S. Y.; *et al.* Acute oral toxicity study of Aquilaria crassna and α -tocopherol in mice. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 7, n. 4, p. 1456-1461, 2016.

GODFREY, K.E.M.; *et al.* Differences in excitatory and inhibitory neurotransmitter levels between depressed patients and healthy controls: A systematic review and meta-analysis. **Journal of psychiatric research**, v. 105, p. 33-44, 2018.

GOH, L. L. *et al.* Analysis of genetic variation in CYP450 genes for clinical implementation. **PloS one**, v. 12, n. 1, p. 1-16, 2017.

GOLAN, D. E. *et al.* **Princípios de farmacologia**: a base fisiopatológica da farmacoterapia. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014.

GOMES M.N.; *et al.* Chalcone Derivatives: Promising Starting Points for Drug Design. **Molecules**, v. 22, n. 8, p.1210, 2017.

GRACE, A.A. Dysregulation of the dopamine system in the pathophysiology of schizophrenia and depression. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 17, n. 8, p. 524, 2016.

GUAN, L.P.; *et al.* Evaluation of potential antidepressant-like activity of chalcone-1203 in various murine experimental depressant models. **Neurochemical research**, v. 39, n. 2, p. 313-320, 2014.

GUNTHER, W. C. *et al.* Resolution of contradiction between in silico predictions and Ames test results for four pharmaceutically relevant impurities. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 91, p. 68-76, 2017.

HAASE, J.; BROWN, E. Integrating the monoamine, neurotrophin and cytokine hypotheses of depression—a central role for the serotonin transporter?. **Pharmacology & therapeutics**, v. 147, p. 1-11, 2015.

HALL, C. S. Emotional behavior in the rat. 1. defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. **Journal of Comparative Psychology**, v. 18, p. 382-403, 1934.

HAO, Y.; GE, H.; SUN, M.; GAO, Y. Selecting an Appropriate Animal Model of Depression. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 19, p. 4827, 2019.

HENDRIKSEN, H.; GROENINK, L. Back to the future of psychopharmacology: a perspective on animal models in drug discovery. **European journal of pharmacology**, v. 759, p. 30-41, 2015.

HIGGS, J.; *et al.* Chalcone derivatives: synthesis, in vitro and in vivo evaluation of their anti-anxiety, anti-depression and analgesic effects. **Heliyon**, v. 5, n. 3, p. e01376, 2019.

HURLEY, S.W.; JOHNSON, A.K. The biopsychology of salt hunger and sodium deficiency. **Pflügers Archive**, v. 467, n. 3, p. 445-456, 2015.

HUANG, Y., *et al.* Rapid antidepressant actions of imipramine potentiated by zinc through PKA-dependent regulation of mTOR and CREB signaling. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 518, n. 2, p. 337-343, 2019.

ICH M7, 2017. (R1). Assessment and Control of DNA Reactive (Mutagenic) Impurities in Pharmaceuticals to Limit Potential Carcinogenic Risk. http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Multidisciplinary/M7/M7_R1_Addendum_Step_4_31Mar2017.pdf. Acesso em: 2 Abril 2019.

INSUASTY, B., *et al.* Synthesis of 1-Substituted 3-Aryl-5-aryl (hetaryl)-2-pyrazolines and Study of Their Antitumor Activity. **Archiv der Pharmazie**, v. 345, n. 4, p. 275-286, 2012.

ISSA, N.T *et al.* Drug metabolism in preclinical drug development: a survey of the discovery process, toxicology, and computational tools. **Current drug metabolism**, v. 18, n. 6, p. 556-565, 2017.

ITO, S. GABA and glycine in the developing brain. **The Journal of Physiological Sciences**. n. 66, v.5, p.375-379, 2016.

JAMES, O.O.; OYEWOLE, O.O.; YETUNDE, O.A. Subchronic Amitriptyline Influences Open-field Behaviours and Spontaneous Working-memory in Healthy Mice. **Advances in pharmacol and pharm**2017, v. 5, n. 1, p. 1-11, 2017.

JAMUNA, S. *et al.* In silico approach to study the metabolism and biological activities of oligomeric proanthocyanidin complexes. **Indian journal of pharmacology**, v. 50, v. 5, 242, 2018.

JIN, Q.H *et al.* Synthesis and biological effects of naphthalene-chalcone derivatives. **Medicinal Chemistry Research**, p. 1-10, 2020.

JHA, P.; BHALERAU, S.; DHOLE, M. A comparative analysis of anxiolytic activity of Arnica montana and alprazolam in rats using open field test. **International Journal of Basic & Clinical Pharmacology**, v. 7, n. 4, p. 718, 2018.

KALUEFF, A.V. *et al.* Neurobiology of rodent self-grooming and its value for translational neuroscience. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 17, n. 1, p. 45, 2016.

KARA, N.Z.; STUKALIN, Y.; EINAT, H. Revisiting the validity of the mouse forced swim test: Systematic review and meta-analysis of the effects of prototypic antidepressants. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v, 84: p, 1-11, 2018.

KAWAI, H.; *et al.* Time of administration of acute or chronic doses of imipramine affects its antidepressant action in rats. **Journal of circadian rhythms**, v. 16, 2018.

KHAN, F. A. K. *et al.* Facile one-pot synthesis, antibacterial activity and in silico ADME prediction of 1-substituted-1H-1, 2, 3, 4-tetrazoles. **Chemical Data Collections**, v.15, p. 107-114, 2018.

KHAN, A. W.; KHAN, A. U. Antidepressant effect of solanum surattense burm. F. **JAPS: Journal of Animal & Plant Sciences**, v. 29, n. 4, 2019.

KHAN, T. et al. Computational Drug Designing and Prediction Of Important Parameters Using in silico Methods-A Review. **Current computer-aided drug design**. 2019.

KIM, H. S.; *et al.* Antiemetic and myeloprotective effects of rhus verniciflua stoke in a cisplatin-induced rat model. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2017, 2017.

KIM, T.; XU, C.; AMSTERDAM, J.D. Relative effectiveness of tricyclic antidepressant versus monoamine oxidase inhibitor monotherapy for treatment-resistant depression. **Journal of affective disorders**, v. 250, p. 199-203, 2019.

KOKRAS, N.; POLISSIDIS, A.; ANTONIOU, K.; DALLA, C. Head shaking in the forced swim test: a robust but unexplored sex difference. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v.152, 90-96, 2017.

KOROLEV, A.O. *et al.* Role of GABA A Receptors in the Mechanism of In Vivo Psychotropic Activity of Amitriptyline in Rats. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, p. 1-4, 2020.

KOSTAL, J.; VOUTCHKOVA-KOSTAL, A. Going all in: a strategic investment in in silico toxicology. **Chemical Research in Toxicology**, v. 33, n. 4, p. 880-888, 2020.

KOZLER, P; MAREŠOVÁ, D; POKORNÝ, J. Study of locomotion, rearing and grooming activity after single and/or concomitant lesions of central and peripheral nervous system in rats. **Neuroendocrinology Letters**, v. 38, n. 7, 2017.

KRAEUTER, A.K; GUEST, P.C.; SARNYAI, Z. The open field test for measuring locomotor activity and anxiety-like behavior. In: **Pre-Clinical Models**. Humana Press, New York, NY, p. 99-103, 2019.

KUEHL LK, et al. Enhanced noradrenergic activity by yohimbine and differential fear conditioning in patients with major depression with and without adverse childhood experiences. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, 2020; 96: 109751.

KUMAR, R. *et al.* Reinvestigation of structure–activity relationship of methoxylated chalcones as antimalarials: Synthesis and evaluation of 2,4,5- trimethoxy substituted patterns as lead candidates derived from abundantly available natural β -asarone. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 11, p. 5292–5301, 2010.

KUNIISHI, H., *et al.* Early deprivation increases high-leaning behavior, a novel anxiety-like behavior, in the open field test in rats. **Neuroscience research**, v. 123, p. 27-35, 2017.

KUPCEWICZ, B. *et al.* Cytotoxic activity of substituted chalcones in terms of molecular electronic properties. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 24, n. 17, p. 4260–4265, 2014.

LECORPS, B; RÖDEL, H.G.; FÉRON, C. Assessment of anxiety in open field and elevated plus maze using infrared thermography. **Physiology & behavior**, v. 157, p. 209-216, 2016.

LEITE, J. R.; SIQUEIRA, J. S. Métodos para avaliar drogas ansiolíticas. ALMEIDA, RN **Psicofarmacologia: fundamentos práticos**, 1ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 154-160, 2006.

LEITE, D.I.; *et al.* Tenofovir: Relação Estrutura-Atividade e Métodos de Síntese. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 6 p. 2347-2376, 2015.

LENER, M.S.; *et al.* Glutamate and gamma-aminobutyric acid systems in the pathophysiology of major depression and antidepressant response to ketamine. **Biological psychiatry**, v. 81, n. 10, p. 886-897, 2017.

LEOPOLD, D.A. *et al.* Functional Architecture of the Cerebral Cortex. In: **The Neocortex**. MIT Press, p. 141-164, 2019.

LIMA, C.M.; *et al.* Hematological and biochemical reference values of rats (*Rattus norvegicus* lineage Wistar) from the vivarium of Universidade Tiradentes. **Scientia Plena**, v. 10, n. 3, p. 1-9, 2014.

LIPINSKI, C.A.; *et al.* Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 46, n.1-3, p. 3-26, 2001.

LISSEMORE, J.I.; *et al.* Reduced GABAergic cortical inhibition in aging and depression. **Neuropsychopharmacology**, v. 43, n. 11, p. 2277-2284, 2018.

LOHNING, A. E. *et al.* A Practical Guide to Molecular Docking and Homology Modelling for Medicinal Chemists. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 13, p. 1–18, 2017.

LU, J.; *et al.* Generation of serotonin neurons from human pluripotent stem cells. **Nature biotechnology**, v. 34, n. 1, p. 89-94, 2016.

LUCENA, M. T.; *et al.* Biocompatibility and cutaneous reactivity of cellulosic polysaccharide film in induced skin wounds in rats. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 26, n. 2, p. 82, 2015

MAI, C.W. *et al.* Chalcones with electron-withdrawing and electron-donating substituents: Anticancer activity against TRAIL resistant cancer cells, structure–activity relationship analysis and regulation of apoptotic proteins. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 77, p. 378–387, 2014.

MALY, J. *et al.* Structural Modeling of the HERG Channel in an Inactivated State and its Drug Interactions. **Biophysical Journal**, v. 116, n.3, p. 104a, 2019.

MARIZ, S.R.; *et al.* Estudo toxicológico agudo do extrato etanólico de partes aéreas de *Jatropha gossypifolia* L. em ratos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, n. 3, p. 372-378, 2006.

MATHEW, B. *et al.* Heteroaryl chalcones: Mini review about their therapeutic voyage. **Biomedicine & Preventive Nutrition**, v. 4, n. 3, p. 451–458, 2014.

MATTEI, R., *et al.* Guarana (*Paullinia cupana*): toxic behavioral effects in laboratory animals and antioxidant activity in vitro. **Journal of ethnopharmacology**, v. 60, n. 2, p. 111-116, 1998.

MATOS, L. H. S. **Avaliação toxicológica aguda dos derivados diidropirimidinonas 4p E 4bc**. 2017.

MEDEIROS, M.R.G.; *et al.* Importância do Uso de Animais para Estudos Experimentais. **International Journal of Nutrology**, v. 11, n. S 01, p. Trab456, 2018.

MÉNARD C.; HODES G.E.; RUSSO S.J. Pathogenesis of depression: Insights from human and rodent studies. **Neuroscience**. v. 321, p.138-162, 2016.

MESCHER, A. L. Junqueira's Basic Histology: **Text and Atlas** (14th ed.). New York, USA: McGraw-Hill Education, 2016.

MISHRA, S. S. *et al.* Computational Prediction of Pharmacokinetic, Bioactivity and Toxicity Parameters of Some Selected Anti arrhythmic Agents. **The Pharmaceutical and Chemical Journal**, v. 4, n.5, p. 143-146, 2017.

MITTAL, R.; *et al.* Neurotransmitters: The critical modulators regulating gut–brain axis. **Journal of cellular physiology**, v. 232, n.9, p.2359-2372, 2017.

MODA, T.L.; MONTANARI, C.A.; ANDRICOPULO, A.D. In silico prediction of human plasma protein binding using hologram QSAR. **Letters in drug. Design & Discovery**, v.4, n.7, p. 502-509, 2007.

MOGHIMI, S. *et al.* Synthesis, evaluation, and molecular docking studies of aryl urea-triazole-based derivatives as anti-urease agents. **Archiv der Pharmazie**, v. 351, n. 7, p. 1-8, 2018.

MOHSENI, G.; *et al.* Agmatine enhances the antidepressant-like effect of lithium in mouse forced swimming test through NMDA pathway. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 88, p. 931-938, 2017.

MONTANARI, F; ECKER, G. F. Prediction of drug-ABC-transporter interaction–Recent advances and future challenges; **Adv. Drug Deliv. Rev**; v. 86, p. 17–26, 2015.

MONTGOMERY, K. C. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory drive. **Journal of comparative and physiological psychology**, v. 48, n. 4, p. 254, 1955.

MOORE A.; BEIDLER J.; HONG M.Y. Resveratrol and Depression in Animal Models: A Systematic Review of the Biological Mechanisms. **Molecules**, v. 23, n.9, p. 2197, 2018.

MOREIRA, T.O.; *et al.* Antibacterial activity of chalcones, hydrazones and oxadiazoles against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 22, n. 1, p. 225–230, 2012.

MOURAD, M.A.E. *et al.* Design, synthesis and anticancer activity of nitric oxide donating/chalcone hybrids. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 54, p. 907–913, 2012.

MYATT, G. J. *et al.* In silico toxicology protocols. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v.96, p. 1-17, 2018.

MYATT, G.J.; *et al.* In silico toxicology protocols. **Regulatory toxicology and pharmacology : RTP**, v. 96, p. 1–17, 2018.

NAOI, M; MARUYAMA, W; SHAMOTO-NAGAI, M. Type A monoamine oxidase and serotonin are coordinately involved in depressive disorders: from neurotransmitter imbalance to impaired neurogenesis. **Journal of Neural Transmission**, v. 125, n. 1, p. 53-66, 2018.

NAZ, S.; *et al.* Antidepressant Effect of Two New Benzyl Derivatives from Wild Strawberry *Fragaria vesca* var. *nubicola* Lindl. ex Hook. f. **Frontiers in pharmacology**, v. 8, p. 469, 2017.

NAZARI, S.K.; *et al.* Possible involvement of ATP-sensitive potassium channels in the antidepressant-like effect of baclofen in mouse forced swimming test. **Pharmacological Reports**. v. 68, n. 6, p. 1214-1220, 2016.

NI, L.; MENG, C.Q.; SIKORSKI, J.A. Recent advances in therapeutic chalcones. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v.14, n.12, p.1669-1691, 2004.

NIELSEN, S.F. *et al.* Antileishmanial Chalcones: Statistical Design, Synthesis, and Three-Dimensional Quantitative Structure–Activity Relationship Analysis. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 41, n. 24, p. 4819–4832, 1998.

NIKOLETOPOULOU, V.; PAPANDREOU, M. E.; TAVERNARAKIS, N. Autophagy in the physiology and pathology of the central nervous system. **Cell Death & Differentiation**, v. 22, n. 3, p. 398-407, 2015.

NISHA, C. M. *et al.* Docking and ADMET prediction of few GSK-3 inhibitors divulges 6-bromoindirubin-3-oxime as a potential inhibitor. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 65, p. 100-107. 2016.

OECD. Test No. 423: **Acute Oral toxicity - Acute Toxic Class Method**. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, 2001.

OECD. Test No. 420: Acute Oral Toxicity-Fixed Dose Procedure. OECD Publishing, 2002.

OECD. Test No. 425: **acute oral toxicity: up-and-down procedure**. OECD Publishing, 2008.

OECD. **Fundamental and Guiding Principles for (Q)SAR Analysis of Chemical Carcinogens with Mechanistic Considerations**. Monograph 229 (ENV/JM/MONO (2015)46), Series on Testing and Assessment No. 229, 2015.

OSMON, K.J., *et al.* Battery of behavioral tests assessing general locomotion, muscular strength, and coordination in mice. **JoVE (Journal of Visualized Experiments)**, n. 131, e55491, 2018.

OHASHI, R. *et al.* Development of a Simplified in Vitro P-glycoprotein Substrate Assay and in Silico Prediction Models to Evaluate Transport Potential of P-glycoprotein. **Molecular pharmaceuticals**. p. 1-39, 2019.

OLIVEIRA, A. R. S. **Estudo toxicológico não-clínico de novos protótipos derivados da tiossemicar bazona (LpQM9 e LpQM11) com atividade antichagíssica**. Recife, 2018.

OLIVEIRA, J. M. G.; *et al.* Subacute toxicity of Myracrodruon urundeuva leave ethanolic extract and its effects on the estrous cycle of female *Wistar* rats. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 18, n. 2, p. 539-546, 2016.

OLVERA-SANDOVAL, C., BETANZOS-CABRERA, G., CASILLAS-PEÑUELAS, R., QUINTANAR J.L. Changes in body composition and mRNA expression of ghrelin and lipoprotein lipase in rats treated with leuprolide acetate, a GnRH agonist. **Experimental and therapeutic medicine**, v. 15, n. 1, p. 592-598, 2018.

OPAS. ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE. Folha informativa - **Depressão**. Disponível em: <
https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5635:folha-informativa-depressao&Itemid=1095 >. Acesso em 27 de abril de 2020.

ORVOS, P. *et al.* Evaluation of Possible Proarrhythmic Potency: Comparison of the Effect of Dofetilide, Cisapride, Sotalol, Terfenadine, and Verapamil on hERG and Native IKr Currents and on Cardiac Action Potential. **Toxicological Sciences**. v. 68, n. 2, p. 365-380, 2019.

PÁL, B. Involvement of extrasynaptic glutamate in physiological and pathophysiological changes of neuronal excitability. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 75, n. 16, p. 2917-2949, 2018.

PAN, J.; *et al.* Diagnosis of major depressive disorder based on changes in multiple plasma neurotransmitters: a targeted metabolomics study. **Translational psychiatry**, v. 8, n. 1, p. 1-10, 2018.

PARTHASARATHI, R.; DHAWAN, A. In silico approaches for predictive toxicology. In: **In vitro toxicology**. Academic Press, p. 91-109, 2018.

PEÑA, I.J.I.; *et al.* The psychopharmacological activities of Vietnamese ginseng in mice: characterization of its psychomotor, sedative–hypnotic, antistress, anxiolytic, and cognitive effects. **Journal of ginseng research**, v. 41, n. 2, p. 201-208, 2017.

PEREIRA, A.L.C. **Síntese, elucidação estrutural e estudos *in silico* de novos compostos 2-amino-tiofênicos imídicos candidatos a fármacos antifúngicos, antileishmanicida e antitumorais**. Dissertação do Programa de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Universidade federal da Paraíba, 2019.

PHAM-THE. *et al.* *In silico* Assessment of ADME Properties: Advances in Caco-2 Cell Monolayer Permeability Modeling. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v.18, n. 26, p. 2209-2229, 2018.

PINTO, F.C.M.; *et al.* Acute toxicity, cytotoxicity, genotoxicity and antigenotoxic effects of a cellulosic exopolysaccharide obtained from sugarcane molasses. **Carbohydrate polymers**, v. 137, p. 556-560, 2016.

PINZI, L.; RASTELLI, G. Molecular Docking: Shifting Paradigms in Drug Discovery. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 18, p. 4331, 4 set. 2019.

PODKOWA K.; *et al.* Group II mGlu receptor antagonist LY341495 enhances the antidepressant-like effects of ketamine in the forced swim test in rats. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 233, n. 15-16, p. 2901-2914, 2016.

POLESZAK, E.; *et al.* Antidepressant-Like Activity of Typical Antidepressant Drugs in the Forced Swim Test and Tail Suspension Test in Mice Is Augmented by DMPX, an Adenosine A_{2A} Receptor Antagonist. **Neurotoxicity research**, v. 35, n. 2, p. 344–352, 2019.

POLO, E.; KRUSS, S. Nanosensors for neurotransmitters. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 408, n. 11, p. 2727-2741, 2015.

PORSOLT, R. D.; ANTON, G.; BLAVET, N.; JALFRE, M. Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. **European Journal of Pharmacology**, v. 47, n. 4, p. 379-391, 1978.

PRABHUDEVA, M.G *et al.* Amberlyst-15 catalyzed synthesis of novel thiophene–pyrazoline derivatives: spectral and crystallographic characterization and anti-inflammatory and antimicrobial evaluation. **Research on Chemical Intermediates**, v. 44, n. 11, p. 6453-6468, 2018.

PRADEEPKIRAN, J. A; REDDY, P. H. **Structure Based Design and Molecular Docking Studies for Phosphorylated Tau Inhibitors in Alzheimer's Disease**. *Cells*, v. 8, n. 3, p. 260, 2019.

PRADHAN, T.; *et al.* Chemical sensing of neurotransmitters. **Chemical Society Reviews**, v. 43, n. 13, p. 4684-4713, 2014.

PRAJAPAT, P.; *et al.* Synthetic and Medicinal Chemistry in Drug Discovery: Needs for Today. **Ann Med Chem Res**, v. 3, n.1, p.1021, 2017.

RAIES, A. B; BAJIC, V. B. In silico toxicology: computational methods for the prediction of chemical toxicity. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science**, v. 6, n. 2, p. 147-172, 2016.

RANG, R.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J.; HENDERSON, G. *Rang & Dale Farmacologia*. Elsevier Brasil. 8. ed. 2016.

RAMALHO, J.D.A. **Avaliação da toxicidade aguda e crônica do extrato etanólico bruto da casca da raiz de Dioclea grandiflora Mart.** ex Benth, 2015.

RAMIREZ, K.; SHERIDAN, J.F. Antidepressant imipramine diminishes stress-induced inflammation in the periphery and central nervous system and related anxiety-and depressive-like behaviors. **Brain, behavior, and immunity**, v. 57, p. 293-303, 2016.

REECE, W.O.; ROWE, E. W. Functional anatomy and physiology of domestic animals (5th ed.). West Sussex, UK: **John Wiley & Sons Inc.**, 2018.

RINCÓN-CORTÉS, M.; GRACE, A.A. Antidepressant effects of ketamine on depression-related phenotypes and dopamine dysfunction in rodent models of stress. **Behavioural Brain Research**, v. 379, p. 112367, 2020.

ROCHA, A.J.; *et al.* The Effects of Concomitant Alcohol and Benzodiazepines on the Excitatory and Inhibitory Neurotransmitters and Its Implication in Neuronal Disorders. **Asian Journal of Research in Medical and Pharmaceutical Sciences**, v. 5, n. 4, p. 1-10, 2018.

RODRIGUES, N.E.R. **Avaliação da toxicidade aguda, subaguda e reprodutiva do extrato aquoso das folhas de Chrysobalanus icaco L.**, 2017.

ROMAN, S.; *et al.* Toxicidade materna e reprodutiva de extrato hidroalcoólico de *Sonchus oleraceus* L. em ratos *Wistar*. **Rev Perspect**, v. 38, p. 69-77, 2014.

ROMERO PJ, HERNÁNDEZ-CHINEA C. The Action of Red Cell Calcium Ions on Human Erythrophagocytosis in Vitro. **Frontiers in physiology**, v. 8, p. 1008, 2017.

ROZMER, Z.; PERJÉSI, P. Naturally occurring chalcones and their biological activities. **Phytochemistry Reviews**, v. 15, n. 1, p. 87–120, 2016.

RUDOLPH, U.; KNOFLACH, F. Beyond classical benzodiazepines: novel therapeutic potential of GABA A receptor subtypes. **Nature reviews Drug discovery**, v. 10, n. 9, p. 685-697, 2011.

RUSSO, E. Chemistry plans a structural overhaul. **Nature Jobs**, v.419, n.6903, p. 4-7, 2002.

SAKHAEI, E.; *et al.* The role of NMDA receptor and nitric oxide/cyclic guanosine monophosphate pathway in the antidepressant-like effect of dextromethorphan in mice forced swimming test and tail suspension test. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. v. 85, p. 627-634, 2017.

SANGI, D.P. Estratégias de síntese na descoberta de fármacos: o emprego da síntese orientada pela diversidade estrutural. **Química Nova**, v. 39, n. 8, p. 995-1006, 2016.

SEKI, K; YOSHIDA, S; JAISWAL, M.K. Molecular mechanism of noradrenaline during the stress-induced major depressive disorder. **Neural regeneration research**, v. 13, n. 7, p. 1159, 2018.

SCHNEIDER, A.F.; *et al.* Minerais séricos, características morfométricas ósseas e deposição de minerais ósseos de frangos de corte alimentados com dieta com inclusão de bentonita. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 71, n. 2, p. 594-602, 2019.

SCHULZ, D. Acute food deprivation separates motor-activating from anxiolytic effects of caffeine in a rat open field test model. **Behavioural pharmacology**, v. 29, n. 6, p. 543-546, 2018.

SEBTI, S. *et al.* Calcined sodium nitrate/natural phosphate: an extremely active catalyst for the easy synthesis of chalcones in heterogeneous media. **Tetrahedron Letters**, v. 42, n. 45, p. 7953-7955, 2001.

SHAH, R. R. *et al.* CYP450 genotype and pharmacogenetic association studies: a critical appraisal. **Pharmacogenomics**, v. 17 n. 3, p. 259-275, 2016.

SHAH, U.; PINCAS, H.; SEALFON, S.C.; GONZÁLEZ-MAESO, J. Structure and function of serotonin GPCR heteromers. In **Handbook of Behavioral Neuroscience Elsevier**. v. 31, pp. 217-238, 2020.

SHENG, J.; *et al.* The Link between Depression and Chronic Pain: Neural Mechanisms in the Brain. **Neural Plasticity**, v. 2017, p. 1-10, 2017.

SHENVI, S. *et al.* Synthesis, anticancer and antioxidant activities of 2,4,5- trimethoxy chalcones and analogues from asaronaldehyde: Structure–activity relationship. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 62, p. 435–442, 2013.

SHIEH, K. R., YANG, S. C. Formosan wood mice (*Apodemus semotus*) exhibit more exploratory behaviors and central dopaminergic activities than C57BL/6 mice in the open field test. **Chinese Journal of Physiology**, v. 63, n. 1, p. 27, 2020.

SHUKLA, R. *et al.* Identification of novel natural inhibitors of *Opisthorchis felinus* cytochrome P450 using structure-based screening and molecular dynamic simulation. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 36, n. 13, p. 3541-3556, 2018.

SHUKLA, R; SHUKLA, H; TRIPATHI, T. Structural and energetic understanding of novel natural inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis* malate synthase. **Journal of cellular biochemistry**, v. 120, n. 2, p. 2469-2482, 2019.

SILVA D.A. Screening of natural products with the potential to treat diseases caused by *Helicobacter pylori*: an in vitro and in silico study. [Completion of Course Work]. Campo Mourão: **Federal Technological University of Paraná**. 2015. 108p.

- SILVA, S.L.D.; *et al.* Preclinical acute toxicological evaluation of the methanolic stem bark extract of *Parahancornia amapa* (Apocynaceae). **Acta Amazonica**, v. 46, n. 1, p. 73-80, 2016.
- SILVA, A. I. V.; *et al.* Densidade mineral óssea e níveis de minerais sanguíneos em ratos após ingestão diária de café e refrigerantes à base de cola e guaraná. **Revista Científica**, v. 1, n. 1, 2018.
- SILVERTHORN, D. U. Fisiologia humana: uma abordagem integrada. **Artmed editora**, 7. ed. 2017.
- STOCKWELL, J *et al.* Novel central nervous system drug delivery systems. **Chemical biology & drug design**, v. 83, n. 5, p. 507-520, 2014.
- STURMAN, O.; GERMAIN, P.; BOHACEK, J. Exploratory rearing: a context-and stress-sensitive behavior recorded in the open-field test. **Stress**. v. 21, n.5, p. 443-452, 2018.
- SOUZA J.P.A. **Síntese e estudo de docking molecular e Qsar de derivados do ácido cinâmico como potenciais inibidores de HIV-1 protease**. [Trabalho de Conclusão de Curso]. Campo Mourão: Universidade Tecnológica Federal do Paraná. 2015. 90p.
- SPROWL, J. A. et al. A phosphotyrosine switch regulates organic cation transporters. **Nature communications**, v. 7, p. 10880, 2016.
- STEDILE, R.; *et al.* Toxicidade reprodutiva da associação de itraconazol e beta-glucana em ratas e sua progênie. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 43, p. 1331, 2015.
- SYED, S. B.; *et al.* Targeting P-glycoprotein: Investigation of piperine analogs for overcoming drug resistance in cancer. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 7972, 2017.
- TAKEDA, K; UEDA, T. Effective mechanism for synthesis of neurotransmitter glutamate and its loading into synaptic vesicles. **Neurochemical research**, v. 42, n. 1, p. 64-76, 2017.
- TARIQ, M. et al. Pharmacological investigations and Petra/Osiris/Molinspiration (POM) analyses of newly synthesized potentially bioactive organotin (IV) carboxylates. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 158, p. 174-183, 2016.
- TERBECK, S.; SAVULESCU, J.; CHESTERMAN, L. P.; COWEN, P.J. Noradrenaline effects on social behaviour, intergroup relations, and moral decisions. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 66, 54-60, 2016.
- TRITSCH, N.X.; GRANGER, A.J.; SABATINI, B.L. Mechanisms and functions of GABA co-release. **Nature Reviews Neuroscience**, v.17, n.3, p. 139-145, 2016.

UNAL, G.; CANBEYLI, R. Psychomotor retardation in depression: A critical measure of the forced swim test. **Behavioural brain research**, v. 372, p. 112047, 2019.

UNECE. United Nations Economic Commission for Europe. Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). 4th Rev. New York: **United Nations**, 2011. Disponível em: <http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev04/English/ST-SG-AC10-30-Rev4e.pdf>Rev4e.pdf. Acessado em: 2 abril 2019.

VIAN M. et al. ***In silico* model for mutagenicity (Ames test), taking into account metabolism, *Mutagenesis***, v. 34, p. 41–48, 2019.

VIEIRA, F.F.; *et al.* Functional Effects of Hyperthyroidism on Cardiac Papillary Muscle in Rats. **Arquivos brasileiros de cardiologia**, v. 107, n. 6, p. 542-549, 2016.

VINCENZO, R. *et al.* In vitro evaluation of newly developed chalcone analogues in human cancer cells. **Cancer Chemotherapy And Pharmacology**, v. 46, n. 4, p. 305–312, 2000.

VOGEL, S. *et al.* Synthesis, cytotoxicity, anti-oxidative and anti-inflammatory activity of chalcones and influence of A-ring modifications on the pharmacological effect. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 6, p. 2206–2213, 2010.

WANG, Y. *et al.* In silico ADME/T modelling for rational drug design. **Quarterly reviews of biophysics**, v. 48, n. 4, p. 488-515, 2015.

WANG^a, J.; *et al.* Prevalence of depression and depressive symptoms among outpatients: a systematic review and meta-analysis. **BMJ open**, v.7, n. 8, e017173, 2017.

WANG^b, Q.; TIMBERLAKE II, M.A.; PRALL, K.; DWIVEDI, Y. The recent progress in animal models of depression. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v.77, p.99-109, 2017.

WANG, W; MACKINNON, R. Cryo-EM structure of the open human ether-à-go-go-related K⁺ channel hERG. **Cell**, v. 169, n. 3, p. 422-430, 2017.

WANG^c, B. *et al.* Zfp462 deficiency causes anxiety-like behaviors with excessive self-grooming in mice. **Genes, Brain and Behavior**, v. 16, n. 2, p. 296-307, 2017.

WANG, Z. *et al.* In Silico Prediction of Blood–Brain Barrier Permeability of Compounds by Machine Learning and Resampling Methods. **ChemMedChem**, v. 13, n. 20, p. 2189-2201, 2018.

WELLING, S. H. *et al.* In silico modelling of permeation enhancement potency in Caco-2 monolayers based on molecular descriptors and random forest. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 94, p. 152-159, 2015.

WU, J. *et al.* Evaluation and Discovery of Novel Synthetic Chalcone Derivatives as Anti-Inflammatory Agents. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 54, n. 23, p. 8110–8123, 2011.

WU, J.Y, DENNER L.A, LIN C.T, HWANG B.. Glutamate decarboxylase. In: **Glutamine and Glutamate Mammals: Volume I**. CRC Press, p. 101-122, 2018.

WILKINSON, S.T.; SANACORA, G. A new generation of antidepressants: an update on the pharmaceutical pipeline for novel and rapid-acting therapeutics in mood disorders based on glutamate/GABA neurotransmitter systems. **Drug discovery today**, v. 24, n. 2, p. 606-615, 2019.

XU, X.; *et al.* Pharmacological Characterization of H05, a Novel Serotonin and Noradrenaline Reuptake Inhibitor with Moderate 5-HT_{2A} Antagonist Activity for the Treatment of Depression. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 365, n. 3, p. 624-635, 2018.

YADAV M.K.; *et al.* In Vivo Toxicity Study of Ethanolic Extracts of *Evolvulus alsinoides* & *Centella asiatica* in Swiss Albino Mice. **Open Access Maced J Med Sci**, v. 7, n. 7, p.1071-1076, 2019.

YANG, H.; *et al.* AdmetSAR 2.0: web-service for prediction and optimization of chemical ADMET properties. **Bioinformatics**, v. 35, n. 6, p. 1067-1069, 2019.

YAPICI-ESER H, *et al.* Stress modulates cortical excitability via α -2 adrenergic and glucocorticoid receptors: As assessed by spreading depression. **Experimental neurology**, 2018, 307(1): 45-51.

YOO, J.H.; HA, T.W.; HONG, J.T.; OH, K.W. Sinomenine, an alkaloid derived from *Sinomenium acutum* potentiates pentobarbital-induced sleep behaviors and non-rapid eye movement (NREM) sleep in rodents. **Biomolecules & therapeutics**, v. 25, n. 6, p. 586, 2017.

YUAN, G.; *et al.* Toxicological assessment of combined lead and cadmium: acute and sub-chronic toxicity study in rats. **Food and chemical toxicology**, v. 65, p. 260-268, 2014.

ZADUBROVSKIY, P.A.; STEPANOVA, A. V.; LOPATINA, N. V., LITVINOV, Y.N. Behavior of subadult mountain voles of two species (*Alticola strelzowi* and *A. tuvinicus*) in the open field test. **Contemporary problems of ecology**. v.10, n.3, p. 224-229, 2017.

ZAGLI, G.; VIOLA, L. Critical Care Sedation: The Concept. In: **Critical Care Sedation**. Springer, Cham,. p. 1-8, 2018.

ZAKARIA, Y.; AZLAN, N.Z.; NIK, N.F, MUHAMMAD, H. Phytochemicals and acute oral toxicity studies of the aqueous extract of *Vernonia amygdalina* from state of Malaysia. **J Med Plants Stud**, v.4, n.3, p. 1-5, 2016.

ZHANG M.; *et al.* Depression and anxiety behaviour in a rat model of chronic migraine. **J Headache Pain**. v.18, n.1, p.27, 2017.

ZIMCIKOVA, E.; *et al.* Behavioral effects of antiepileptic drugs in rats: Are the effects on mood and behavior detectable in open-field test?. **Seizure**, v. 52, p. 35-40, 2017.

ZHAO, D.; *et al.* Antidepressant-like Effect of a Chalcone Compound, DHIPC and Its Possible Mechanism. **Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR**, v. 17, n. 1, p. 193, 2018.

ZHONG, Z *et al.* A meta-analysis of effects of selective serotonin reuptake inhibitors on blood pressure in depression treatment: outcomes from placebo and serotonin and noradrenaline reuptake inhibitor controlled trials. **Neuropsychiatric disease and treatment**, v. 13, p. 2781, 2017.

ZHUANG, C.; *et al.* Chalcone: A Privileged Structure in Medicinal Chemistry. **Chemical reviews**, v. 117, n.12, p.7762–7810, 2017.