

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

HUMBERTO DE CARVALHO ARAGÃO NETO

**INVESTIGAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTINOCICEPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA
DO ÁCIDO 3-CUMARINO CARBOXÍLICO**

JOÃO PESSOA – PB

2022

HUMBERTO DE CARVALHO ARAGÃO NETO

**INVESTIGAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTINOCICEPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA
DO ÁCIDO 3-CUMARINO CARBOXÍLICO**

Tese de doutorado 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 doutor em Inovação Tecnológica em Medicamentos.

Orientador: Prof. Dr. Reinaldo Nóbrega de Almeida

Coorientador: Prof. Dr. Abrahão Alves de Oliveira Filho

JOÃO PESSOA – PB

2022

HUMBERTO DE CARVALHO ARAGÃO NETO

**INVESTIGAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTINOCICEPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA
DO ÁCIDO 3-CUMARINO CARBOXÍLICO**

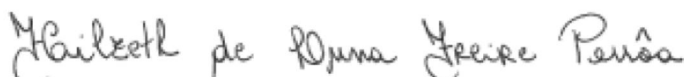
Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba, como requisito para a obtenção do título de doutor em Inovação Tecnológica em Medicamentos.

Aprovado em: 15 de julho de 2022

BANCA EXAMINADORA:



Prof. Dr. Reinaldo Nóbrega de Almeida (Presidente)



Prof.ª Dr.ª Hilzeth de Luna Freire Pessoa (Examinadora Interna)



Prof. Dr. João Euclides Fernandes Braga (Examinador Interno)



Prof. Dr. Renan Marinho Braga (Examinador Externo)



Prof.ª Dr.ª Paula Regina Rodrigues Salgado (Examinadora Externa)

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

A659i Aragão Neto, Humberto de Carvalho.

Investigação das atividades antinociceptiva e antiinflamatória do ácido 3-cumarino carboxílico / Humberto de Carvalho Aragão Neto. - João Pessoa, 2022. 194 f. : il.

Orientação: Reinaldo Nóbrega de Almeida.

Coorientação: Abrahão Alves de Oliveira Filho.

Tese (Doutorado) - UFPB/CCS.

1. Anti-inflamatórios. 2. Cumarina. 3. Analgesia. 4. Inflamação. 5. Docking. 6. Ciclooxigenase. I. de Almeida, Reinaldo Nóbrega. II. de Oliveira Filho, Abrahão Alves. III. Título.

UFPB/BC

CDU 615.276(043)

RESUMO

ARAGÃO NETO, H.C. **Investigação das atividades antinociceptiva e anti-inflamatória do ácido 3-cumarino carboxílico**. 2022. 195p. Tese (Pós-graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos) - UFPB / CCS, João Pessoa - PB.

A dor é uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a dano real ou potencial, ou descrita em termos de tal dano. Estimativas sugerem que 20% dos adultos sofrem de algum tipo de dor em todo o mundo, como por exemplo a dor orofacial. O tratamento de distúrbios da dor orofacial é difícil e controverso. O uso terapêutico de anti-inflamatórios não esteroidais como analgésicos está associado a um amplo espectro de efeitos adversos, incluindo lesões gastrointestinais, eventos cardiovasculares e toxicidade renal. Nesse contexto, as cumarinas compreendem uma importante classe de compostos fenólicos, exibindo diversos efeitos farmacológicos. Suas aplicações terapêuticas dependem da estrutura química central e dos padrões de substituição no anel aromático destes compostos. As cumarinas simples representam a principal subclasse com propriedades anti-inflamatórias. Estudos demonstram que a inserção de grupos funcionais no carbono 3 do esqueleto básico cumarínico resulta em agentes farmacológicos com potente efeito anti-inflamatório. Nessa conjuntura, o ácido 3-cumarino carboxílico (A3CC) é um derivado substituído das cumarinas simples, cujos efeitos em modelos de dor e inflamação ainda não foram explorados. O presente estudo se propôs a investigar pela primeira vez os efeitos antinociceptivo e anti-inflamatório do A3CC utilizando abordagens *in silico*, *in vitro* e *in vivo*. Os softwares PASS, Molinspiration, Volsurf+, OSIRIS DataWarrior e MetaSite 6 foram utilizados para estabelecer dados sobre espectro de atividade, biodisponibilidade, toxicidade, permeabilidade hematoencefálica, druglikeness e perfil metabólico. O efeito sob eritrócitos humanos foi investigado através de ensaios de hemólise e fragilidade osmótica. A atividade antinociceptiva foi avaliada nos modelos de contorções abdominais induzidas por ácido acético, nocicepção orofacial induzida por glutamato e formalina, e este último foi utilizado na investigação da participação da via opioide e de canais K^{+ATP} . A atividade anti-inflamatória foi analisada através do modelo de edema de pata induzido por carragenina e corroborada por estudos de docking molecular com a enzima cicloxigenase (COX). O A3CC demonstrou possuir viabilidade na circulação sanguínea ao exibir baixo percentual de hemólise frente a eritrócitos humanos, além de ser capaz de proteger a membrana eritrocitária no teste de fragilidade osmótica ($p < 0,001$). Ele também exibiu propriedades analgésicas, inibindo significativamente o comportamento nociceptivo nos testes de nocicepção orofacial induzida por formalina ($p < 0,001$) e glutamato ($p < 0,001$), bem como no teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético ($p < 0,0001$). O A3CC demonstrou exercer seu efeito perifericamente, ao exibir propriedades anti-inflamatórias de redução do edema de pata induzido por carragenina ($p < 0,05$). Foi constatado por docking molecular que este efeito pode estar relacionado com a inibição da COX-2 por interações com os resíduos de Tyr385 e Ser530.

Palavras-chave: cumarina, docking, cicloxigenase, analgesia, inflamação.

ABSTRACT

ARAGÃO NETO, H.C. **Investigation of the antinociceptive and anti-inflammatory activities of coumarin-3-carboxylic acid**. 2022. 195p. **Thesis** (Postgraduate in Development and Technological Innovation in Medicines) - UFPB / CCS, João Pessoa - PB.

Pain is an unpleasant sensory and emotional experience associated with actual or potential harm, or described in terms of such harm. Estimates suggest that 20% of adults suffer from some type of pain worldwide, such as orofacial pain. The treatment of orofacial pain disorders is difficult and controversial. The therapeutic use of non-steroidal anti-inflammatory drugs as analgesics is associated with a wide spectrum of adverse effects, including gastrointestinal injuries, cardiovascular events, and renal toxicity. In this context, coumarins comprise an important class of phenolic compounds, exhibiting several pharmacological effects. Their therapeutic applications depend on the central chemical structure and the substitution patterns in the aromatic ring of these compounds. Simple coumarins represent the main subclass with anti-inflammatory properties. Studies demonstrate that the insertion of functional groups at carbon 3 of the coumarin basic skeleton results in pharmacological agents with potent anti-inflammatory effects. At this juncture, coumarin-3-carboxylic acid (A3CC) is a substituted derivative of simple coumarins, whose effects on models of pain and inflammation have not yet been explored. The present study aimed to investigate for the first time the antinociceptive and anti-inflammatory effects of A3CC using *in silico*, *in vitro* and *in vivo* approaches. PASS, Molinspiration, Volsurf+, OSIRIS DataWarrior and MetaSite 6 software were used to establish data on spectrum of activity, bioavailability, toxicity, blood-brain permeability, druglikeness and metabolic profile. The effect on human erythrocytes was investigated through hemolysis and osmotic fragility assays. The antinociceptive activity was evaluated in the models of acetic acid-induced writhing test, orofacial nociception induced by glutamate and formalin, and the latter was used to investigate the participation of the opioid pathway and K^+_{ATP} channels. The anti-inflammatory activity was analyzed using the carrageenan-induced paw edema model and corroborated by molecular docking studies with the enzyme cyclooxygenase (COX). A3CC demonstrated viability in the bloodstream by showing a low percentage of hemolysis against human erythrocytes, in addition to being able to protect the erythrocyte membrane in the osmotic fragility test ($p < 0.001$). It also exhibited analgesic properties, significantly inhibiting nociceptive behavior in the formalin ($p < 0.001$) and glutamate ($p < 0.001$) induced orofacial nociception tests, as well as in the acetic acid-induced writhing test ($p < 0.0001$). A3CC has been shown to exert its effect peripherally, by exhibiting anti-inflammatory properties to reduce carrageenan-induced paw edema ($p < 0.05$). It was found by molecular docking that this effect may be related to the inhibition of COX-2 by interactions with residues of Tyr385 and Ser530.

Keywords: coumarin, docking, cyclooxygenase, analgesia, inflammation.

ÍNDICE DE ILUSTRAÇÕES

FIGURAS

Figura 1. Relação entre CGRP e nervo trigêmeo na fisiopatologia da enxaqueca...	24
Figura 2. Esquema simplificado da via ascendente da dor.	25
Figura 3. Terminações nervosas livres.	26
Figura 4. Principais diferenças entre as vias de transmissão da dor.	32
Figura 5. Mecanismo celular de sensibilização do nociceptor.	35
Figura 6. Biossíntese de prostanoídes.	38
Figura 7. Diferenças estruturais na composição de AA das isoformas de COX.....	49
Figura 8. Estrutura química de diferentes classes de cumarinas.	52
Figura 9. Ácido 3-cumarino-carboxílico	56
Figura 10. Resumo esquemático das metodologias realizadas.	64
Figura 11. Previsão do local do metabolismo nas CYPs do fígado, 3A4 (A), 2D6 (B) e 2C9 (C) para o ácido 3-cumarino carboxílico.	83
Figura 12. Representação do acoplamento molecular do A3CC com o grupamento HEME nas isoformas do Citocromo P450, CYP3A4 (A) e CYP2D6 (B) e CYP2C9 (C).	84
Figura 13. Mapa 2D e 3D de interações entre o A3CC e COX-1 (1CQE). As interações em verde representam ligações de hidrogênio, enquanto em roxo representam interações hidrofóbicas.	106
Figura 14. Mapa 2D e 3D de interações entre o A3CC e COX-1 (1DIY). As interações em verde representam ligações de hidrogênio, enquanto em roxo representam interações hidrofóbicas.	107
Figura 15. Mapa 2D e 3D de interações entre o A3CC e COX-2 (3PGH). As interações em verde representam ligações de hidrogênio, enquanto em roxo representam interações hidrofóbicas.	108
Figura 16. Mapa 2D e 3D de interações entre o A3CC e COX-2 (1CX2). As interações em verde representam ligações de hidrogênio, enquanto em roxo representam interações hidrofóbicas.	109
Figura 17. Resumo das interações do A3CC com as isoformas da COX.	128

ÍNDICE DE ILUSTRAÇÕES

GRÁFICOS

Gráfico 1. Avaliação hemolítica em eritrócitos humanos do grupo sanguíneo “A” induzida pelo ácido 3-cumarino carboxílico.	88
Gráfico 2. Avaliação hemolítica em eritrócitos humanos do grupo sanguíneo “B” induzida pelo ácido 3-cumarino carboxílico.	88
Gráfico 3. Avaliação hemolítica em eritrócitos humanos do grupo sanguíneo “O” induzida pelo ácido 3-cumarino carboxílico.	89
Gráfico 4. Avaliação anti-hemolítica em eritrócitos humanos do grupo sanguíneo “A” induzida pelo ácido 3-cumarino carboxílico.	90
Gráfico 5. Avaliação anti-hemolítica em eritrócitos humanos do grupo sanguíneo “B” induzida pelo ácido 3-cumarino carboxílico.	90
Gráfico 6. Avaliação anti-hemolítica em eritrócitos humanos do grupo sanguíneo “O” induzida pelo ácido 3-cumarino carboxílico.	91
Gráfico 7. Efeito do ácido 3-cumarino carboxílico no número de contorções abdominais induzidas por ácido acético.	92
Gráfico 8. Efeito do ácido 3-cumarino carboxílico no comportamento de face rubbing induzido pelo glutamato.	93
Gráfico 9. Efeito do ácido 3-cumarino carboxílico na primeira fase da formalina orofacial.	94
Gráfico 10. Efeito do ácido 3-cumarino carboxílico na segunda fase da formalina orofacial.	95
Gráfico 11. Investigação da participação via opioide no efeito do ácido 3-cumarino carboxílico na primeira fase da formalina orofacial.	96
Gráfico 12. Investigação da participação via opioide no efeito do ácido 3-cumarino carboxílico na segunda fase da formalina orofacial.	97
Gráfico 13. Investigação da participação dos canais K ⁺ ATP no efeito do ácido 3-cumarino carboxílico na primeira fase da formalina orofacial.	98
Gráfico 14. Investigação da participação dos canais K ⁺ ATP no efeito do ácido 3-cumarino carboxílico na segunda fase da formalina orofacial.	99
Gráfico 15. Efeito do ácido 3-cumarino carboxílico no edema de pata induzido por carragenina.	100

ÍNDICE DE ILUSTRAÇÕES

TABELAS

Tabela 1. Ferramentas farmacológicas utilizadas para o estudo das vias de sinalização envolvidas na possível antinocicepção mediada pelo ácido 3-cumarino carboxílico.....	71
Tabela 2. Espectro geral das probabilidades de atividades farmacológicas do ácido 3-cumarino carboxílico.	78
Tabela 3. Propriedades moleculares do ácido 3-cumarino carboxílico, calculadas no <i>software</i> Molinspiration.	79
Tabela 4. Predição de bioatividades, calculadas no <i>software</i> Molinspiration, para o ácido 3-cumarino carboxílico.....	80
Tabela 5. Descrição dos riscos de toxicidade <i>in silico</i> do ácido 3-cumarino carboxílico, avaliada pelo <i>software</i> OSIRIS Data Warrior 5.0.....	81
Tabela 6. Predição das isoenzimas responsáveis pelo metabolismo do ácido 3-cumarino carboxílico e principais sítios de metabolização.	85
Tabela 7. Principais metabólitos gerados a partir do ácido 3-cumarino carboxílico..	86
Tabela 8. Predição da probabilidade de interação entre A3CC e COX-1, -2 utilizando a função de pontuação Moldock Score.	101
Tabela 9. Predição da probabilidade de interação entre A3CC e COX-1, -2 utilizando a função de pontuação Plants Score.....	102
Tabela 10. Predição da probabilidade de interação entre A3CC e COX-1, -2 utilizando a função de pontuação GOLD Score.	103
Tabela 11. Predição da probabilidade de interação entre A3CC e COX-1, -2 utilizando a função de pontuação Autodock Score.....	104
Tabela 12. Predição da probabilidade de interação entre A3CC e COX-1, -2 utilizando o consenso entre todas as funções de pontuação: Moldock Score, Plants Score, GOLD Score e Autodock Score.....	105

LISTRA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

*.mol	MDL mol file
2D	Bidimensional
3D	Tridimensional
Å	Angstrom
A3CC	Ácido 3-cumarino-carboxílico
AA	Ácido araquidônico
AAS	Ácido acetilsalicílico
AchE	Acetilcolinesterase
ADME	Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção
AINEs	Anti-inflamatórios não esteroidais
Ala	Alanina
AMPA	Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4- isoxazolepropiónico
ANOVA	Análise de Variância
Arg	Arginina
ATM	Articulação temporomandibular
ATPi	Trifosfato de adenosina intracelular
AVI	Anos vividos com incapacidade
B2R	Receptor B2 de bradicinina
BACE	β -secretase
BChE	Butirilcolinesterase
BHE	Barreira hematoencefálica
CCDC	The Cambridge Crystallographic Data Centre
CGRP	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
COX	Ciclooxigenase
CV	Cardiovasculares

CYP	Citocromo P450
DAG	Diacylglicerol
DEXA	Dexametasona
DL₅₀	Dose letal mediana
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
e.p.m.	Erro padrão da média
ERO	Espécies reativas de oxigênio
ESR	Efeito toxico no sistema reprodutor
et al.	E colaboradores
EUA	Estados Unidos da América
g	Grama
GBD	Global Burden of Disease
GI	Gastrointestinais
Gln	Glutamina
Glu	Ácido glutâmico
Gly	Glicina
GPCR	Receptor acoplados à proteína G
h	Hora
His	Histidina
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
i.p.	Intraperitoneal
IASP	Internacional Association for the Study of Pain
IC₅₀	Concentração inibitória média
ID	Identificador
IgE	Imunoglobulina E
IL	Interleucina

Ile	Isoleucina
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
IP3	Inositol trifosfato
IRR	Irritabilidade de tecido
K⁺	Potássio
K⁺_{ATP}	Canais de potássio sensíveis a trifosfato de adenosina
Kcal/mol	Quilocaloria por mol
kg	Quilograma
Kir6.x	Canais de potássio retificadores internos
L	Litro
Leu	Leucina
LogP_{o/w}	Coeficiente de partição
LOX	Lipoxigenase
LPS	Lipopolissacarídeo
LTB4	Leucotrieno B4
LTM	Neurônios mecanossensíveis de baixo limiar
MAO	Monoaminaoxidase
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
Met	Metionina
mg	Miligrama(s)
min	Minuto(s)
mL	Mililitros
MM	Massa molecular
mm³	Milímetros Cúbicos
MORF	Morfina
mPGES-1	Prostaglandina E sintase-1 microsomal
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2H-tetrazólio

MUT	Estruturas comprovadamente mutagênicas
MVD	Molegro Virtual Docker
n	Número de animais
NaCl	Cloreto de sódio
nALH	Número de grupos aceptores de ligação hidrogênio
Na_v	Canais de sódio dependentes de voltagem
nDLH	Número de grupos doadores de ligação hidrogênio
NF-κB	Factor nuclear kappa B
nm	Nanômetro
NMDA	N-metil D-Aspartato
NMDAR	Receptor N-metil D-Aspartato
NO	Óxido nítrico
NS	Neurônios nociceptivos específicos
OA	Odontalgia atípica
OMS	Organização Mundial da Saúde
p	Probabilidade de significância
P	Probabilidade de interação
P total	Probabilidade total de interação
P&D	Pesquisa e desenvolvimento
p.n.	Perinasal
Pa	Probabilidade de ser ativo
PDB	Protein Data Bank
PGD₂	Prostaglandina D ₂
PGE₂	Prostaglandina E ₂
PGF_{2α}	Prostaglandina F _{2α}
PGG₂	Prostaglandina G ₂
PGH₂	Prostaglandina H ₂

PGI₂	Prostaciclina
pH	Potencial hidrogeniônico
Phe	Fenilalanina
Pi	Probabilidade de ser inativo
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinase
PIP2	4,5-bisfosfato de fosfatidilinositol
PKA	Proteína quinase A
PLA₂	Fosfolipase A ₂
PLC	Fosfolipase C
QSAR	Relação estrutura-atividade quantitativa
RMSD	Root Mean Square Deviation
rpm	Rotações por minuto
s.c.	Subcutânea
SDF	Spatial Data File
Ser	Serina
SNC	Sistema nervoso central
SoM	Sítio de Predição Metabólica
St.	Saint
SUR	Receptores de sulfonilureia
TGI	Trato gastrointestinal
TH	Tiouréia
TNF-α	Fator de necrose tumoral α
Trp	Triptofano
TRP	Receptores de potencial transitório
TRPA1	Receptor potencial transitório anquirina 1
TRPV1	Receptor potencial transitório vanilóide 1
Tween 80	Polioxetileno Sorbitano Monoleato

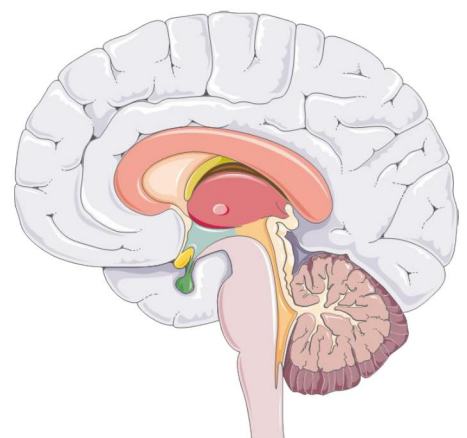
TXA₂	Tromboxano A ₂
TXB₂	Tromboxano B ₂
Tyr	Tirosina
Val	Valina
WDR	Neurônios de ampla faixa dinâmica
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
δ	Delta
κ	Kappa
μ	Mu
μg	Microgramas
μL	Microlitros
μm	Micrômetro
μM	Micromolar
π	Pi

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	21
2.1 Classificação e prevalência da dor	21
2.2 Fisiopatologia da dor	24
2.3 Dor orofacial e limitações no tratamento	28
2.4 Fisiopatologia da orofacial	31
2.5 Inflamação	34
2.6 Modelos <i>in silico</i> de atividade biológica	43
2.7 Considerações gerais sobre cumarinas	50
2.8 Ácido 3-cumarino-carboxílico	55
3. OBJETIVO	60
3.1 Objetivo geral	60
3.2 Objetivos específicos	60
4. MATERIAL	62
4.1 Substância teste	62
4.2 Animais	62
4.3 Condições experimentais	63
4.4 Eritrócitos humanos	63
5. MÉTODOS	63
5.1 Avaliação do espectro de atividades farmacológicas do ácido 3-cumarino carboxílico	64
5.2 Avaliação do perfil de biodisponibilidade oral e <i>druglikeness</i> do ácido 3-cumarino carboxílico	65
5.3 Avaliação da permeabilidade do ácido 3-cumarino carboxílico na barreira hematoencefálica	66
5.4 Avaliação do fator de risco de toxicidade do ácido 3-cumarino carboxílico	66

5.5	Avaliação dos possíveis metabólitos gerados a partir do ácido 3-cumarino carboxílico	66
5.6	Avaliação da atividade hemolítica do ácido 3-cumarino carboxílico em eritrócitos humanos	67
5.7	Avaliação da atividade anti-hemolítica do ácido 3-cumarino carboxílico em eritrócitos humanos	68
5.8	Avaliação do ácido 3-cumarino carboxílico no teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético.....	68
5.9	Avaliação do ácido 3-cumarino carboxílico no teste do glutamato orofacial	69
5.10	Avaliação do ácido 3-cumarino carboxílico no teste da formalina orofacial .	69
5.11	Avaliação da interação do ácido 3-cumarino carboxílico com os receptores da via opioide e canais de K^{+}_{ATP} no teste da formalina orofacial	70
5.12	Avaliação do ácido 3-cumarino carboxílico no teste do edema de pata induzido por carragenina	72
5.13	Avaliação da interação entre COX-1 e -2 com o ácido 3-cumarino carboxílico no docking molecular	72
5.14	Análise estatística	75
6.	RESULTADOS	77
6.1	Espectro de atividades farmacológicas do ácido 3-cumarino carboxílico	77
6.2	Perfil de biodisponibilidade oral e <i>druglikeness</i> do ácido 3-cumarino carboxílico	78
6.3	Avaliação da permeabilidade do ácido 3-cumarino carboxílico na barreira hematoencefálica.....	80
6.4	Avaliação do fator de risco de toxicidade do ácido 3-cumarino carboxílico .	81
6.5	Avaliação dos possíveis metabólitos gerados a partir do ácido 3-cumarino carboxílico	82
6.6	Efeito hemolítico do ácido 3-cumarino carboxílico em eritrócitos humanos .	87
6.7	Efeito anti-hemolítico do ácido 3-cumarino carboxílico em eritrócitos humanos.....	89

6.8	Efeito do ácido 3-cumarino carboxílico no teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético.....	91
6.9	Efeito do ácido 3-cumarino carboxílico no teste de glutamato orofacial.....	92
6.10	Efeito do ácido 3-cumarino carboxílico no teste de formalina orofacial.....	93
6.11	Interação do ácido 3-cumarino carboxílico com receptores da via opioide no teste de formalina orofacial	95
6.12	Interação do ácido 3-cumarino carboxílico com canais K^{+}_{ATP} no teste da formalina orofacial	97
6.13	Efeito do ácido 3-cumarino carboxílico no edema de pata induzido por carragenina.....	99
6.14	Avaliação da ancoragem molecular do ácido 3-cumarino carboxílico com possíveis alvos farmacológicos.....	100
7.	DISCUSSÃO	111
8.	CONCLUSÃO.....	135
9.	REFERÊNCIAS.....	137
	ANEXOS.....	189
	Anexo I – ARTIGOS PUBLICADOS EM PERIÓDICOS DURANTE A VIGÊNCIA DO DOUTORADO	189
	Anexo II – CAPÍTULOS DE LIVRO PUBLICADOS DURANTE A VIGÊNCIA DO DOUTORADO	191
	Anexo III – CERTIDÕES.....	192



INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A dor é uma experiência associada a lesão real ou potencial, sendo caracterizada como uma experiência subjetiva que requer percepção central para ser reconhecida em termos de dano. Já nocicepção é caracterizada pelo processamento dos estímulos nocivos que afetam o indivíduo, cuja origem pode ser térmica, química, mecânica e inflamatória, desencadeando a sensação de dor (LOESER; TREEDE, 2008). A dor possui uma função fisiológica fundamentalmente importante, alertando o indivíduo para ameaças ao seu bem-estar e garantindo a preservação da integridade do organismo, uma vez que a exposição a estímulos nocivos é percebida geralmente como uma sensação desagradável (BELL, 2018).

A dor orofacial está associada a diversos distúrbios, desde doenças inflamatórias até síndromes de dor neuropática, envolvendo dores associadas à cabeça, face, pescoço e estruturas intraorais (LIU, Qing *et al.*, 2021). Essa condição pode causar uma grande variedade da intensidade de dor, muitas vezes interferindo diretamente na qualidade de vida do indivíduo. Assim, torna-se um componente importante da assistência à saúde (HARGREAVES, 2011). Sua prevalência é de 30,2% nos países em desenvolvimento, sendo uma condição que causa impactos negativos no cotidiano dos indivíduos, pois causa desconforto e limitação funcional (COSTA *et al.*, 2020).

A inflamação é classicamente associada à dor, calor, rubor, edema (tumor) e perda de função (KIDD; URBAN, 2001). A dor inflamatória é ocasionada por um prejuízo à integridade dos tecidos a nível celular. Os estados inflamatórios são caracterizados por situações em que estímulos normalmente inofensivos geram dor (DAS, 2015). Exemplos de dor inflamatória incluem dor secundária a lesão tecidual e infecção, bem como artrite reumatoide (KIDD; URBAN, 2001). Após lesão tecidual, os nociceptores no tecido afetado tornam-se sensibilizados devido à liberação de mediadores pró-inflamatórios no local da lesão, bem como de células imunes que invadem o local da lesão (HASSANPOUR; REZAEI; RAZAVI, 2020; ONASANWO; ROTU, 2016). A interação entre mediadores inflamatórios e nociceptores diminui o limiar da dor e aumenta a transmissão nociceptiva, facilitando sua percepção pelo sistema nervoso (JOHNSON; GREENWOOD-VAN MEERVELD, 2014). A inflamação e o trauma de tecidos e nervos podem afetar suas vias de sinalização e promover

disfunção (BABOS *et al.*, 2013; GOMES JÚNIOR *et al.*, 2020). Além disso, a intensa produção de mediadores inflamatórios, danos aos nervos periféricos ou a infecções podem evocar dor por meio da ativação e sensibilização neuronal (LIU, Qing *et al.*, 2021).

A classe dos opioides abrange uma série de fármacos analgésicos que são eficazes em aliviar a dor aguda intensa. No entanto, sua administração crônica está associada ao risco de overdose fatal, abuso e efeitos adversos, como depressão, sedação e constipação. O desenvolvimento de tolerância e o fenômeno da hiperalgesia induzida por opioides são outras situações que prejudicam o manejo da dor (BOTZ; BÖLCSKEI; HELYES, 2017).

Outra classe comumente utilizada para aliviar dor e inflamação é a dos anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs). Apesar de seus efeitos benéficos, o uso crônico desses fármacos é limitado em virtude de seus efeitos colaterais. Os efeitos gastrointestinais ocorrem mais frequentemente, e vão desde leve dispepsia a grave sangramento. A nefropatia também é uma complicação comum. Por serem medicamentos de venda livre, sua ampla disponibilidade favorece o uso indevido e perigosas combinações com outros fármacos (SMITH, Misty; WILCOX; WHITE, 2007).

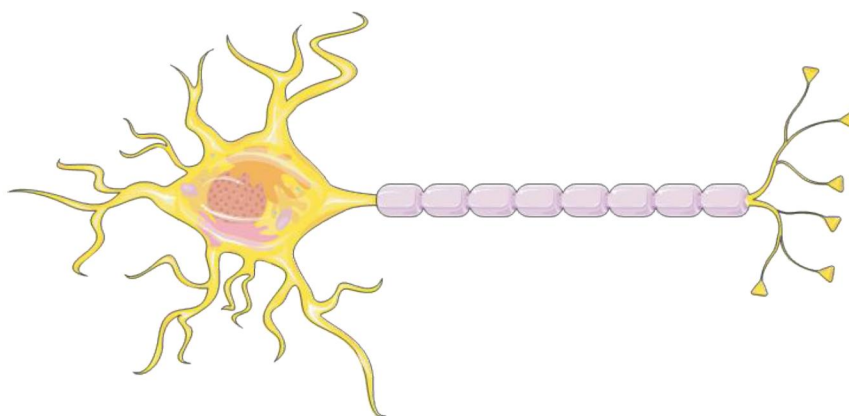
Sendo um problema global de saúde pública, o manejo da dor depende de um tratamento eficaz. Os fármacos atuais tentam garantir uma analgesia ideal com o mínimo de efeitos adversos (DE FEO *et al.*, 2020). A dependência física, as reações adversas e a tendência ao abuso observados dentro dos medicamentos disponíveis tornam necessárias a busca por novas moléculas (DE FEO *et al.*, 2020; XIAO *et al.*, 2016).

As cumarinas (1,2-benzopirona) fazem parte de um grupo de compostos heterocíclicos presentes em várias famílias de plantas. Elas apresentam anéis de benzeno e α -pirona fundidos que estão presentes em quantidades específicas nas plantas. São classificadas principalmente como cumarinas simples, furanocumarinas, piranocumarinas, dicumarinas e fenilcumarinas (BAROT *et al.*, 2015). Aproximadamente 3.560 derivados cumarínicos foram identificados e isolados de plantas (JIA, 2003). Inúmeras atividades biológicas têm sido demonstradas para cumarinas e seus derivados, incluindo propriedades anti-inflamatórias

(KALKHAMBKAR *et al.*, 2008), antioxidantes (TYAGI *et al.*, 2005), anticancerígenas (LEE, Shin Hwa *et al.*, 2008) e antimicrobianas (BORGES *et al.*, 2005).

O ácido 3-cumarino carboxílico é um análogo sintético da cumarina simples. Essa molécula é conhecida por possuir algumas aplicações importantes na área da química experimental. Ela pode ser utilizada para detecção de radicais hidroxila produzidos em processos químicos (MANEVICH; HELD; BIAGLOW, 1997), como sonda fluorescente (PERONI *et al.*, 2002) e é capaz de formar compostos de coordenação com lantanídeos (KOSTOVA; MOMEKOV; STANCHEVA, 2007).

Moléculas contendo compostos fenólicos possuem alta capacidade antioxidante, efeitos analgésicos e anti-inflamatórios, podendo serem utilizadas como adjuvantes no manejo de condições dolorosas (SHAH *et al.*, 2014). Assim, são necessários estudos para descobrir novos fármacos que possam modular a dor e a inflamação (GOMES JÚNIOR *et al.*, 2020). Diante disso, o presente estudo contribui para um melhor entendimento acerca do efeito antinociceptivo e anti-inflamatório do ácido 3-cumarino carboxílico.



FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Classificação e prevalência da dor

De acordo com a *Internacional Association for the Study of Pain* (IASP), a dor é uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a dano real ou potencial, ou descrita em termos de tal dano (LOESER; TREEDE, 2008). Dessa forma, a dor é caracterizada como uma experiência subjetiva, requerendo, portanto, sua percepção por estruturas cerebrais (BELL, 2018). Por isso, a percepção da dor requer a capacidade de avaliar o ambiente e formar um julgamento subjetivo sobre as informações nociceptivas recebidas, com base em experiências passadas e memórias. Assim, a dor requer consciência, cujos detalhes variam entre indivíduos (APKARIAN, 2019). Por ser uma experiência universal, ela continua sendo motivo de debate sobre novas alternativas de controle das diversas condições dolorosas (ORR; SHANK; BLACK, 2017).

A dor possui uma função fisiológica fundamentalmente importante, alertando o indivíduo para ameaças ao seu bem-estar e garantindo a preservação da integridade do organismo, uma vez que a exposição a estímulos nocivos é percebida geralmente como uma sensação desagradável (BELL, 2018). Os conceitos de dor e nocicepção contrastam entre si, e não devem ser confundidos, uma vez que a dor pode ocorrer independentemente da nocicepção, e vice-versa (LOESER; TREEDE, 2008). A nocicepção é definida como o processamento e codificação dos estímulos nocivos no sistema nervoso central (SNC) (BELL, 2018). Os neurônios nociceptivos conduzem estímulos que podem ou não causar percepção da dor. Atualmente é utilizado o argumento de que a capacidade nociceptiva está presente ao longo da vida, no entanto, o decurso da existência do indivíduo deve ocorrer principalmente sem dor (APKARIAN, 2019). Uma ampla variedade de estímulos térmicos, químicos, mecânicos e inflamatórios podem desencadear a experiência dolorosa, que também pode ser proveniente da associação desses estímulos, percebida após modulação do estímulo no sistema nervoso central. A dor também pode resultar de uma lesão ou doença que afete o sistema somatossensorial, chamada de dor neuropática (BELL, 2018; LOESER; TREEDE, 2008).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), as formas de classificação da dor mais utilizados na prática clínica incluem o anatômico, etiológico, fisiopatológico e a duração (ORR; SHANK; BLACK, 2017). O sistema de classificação da dor fisiopatológica é baseado no mecanismo de lesão que resultou dor no corpo. As duas principais vias fisiológicas são a nociceptiva e neuropática. A dor nociceptiva é uma resposta corporal normal à lesão e pode resultar de tecidos danificados, como órgãos internos, músculos ou ossos (ORR; SHANK; BLACK, 2017). As duas grandes categorias de dores nociceptivas são somáticas e viscerais. A dor somática refere-se a lesões no sistema musculoesquelético, incluindo pele, músculos e ossos (WHO, 2012). Já a dor visceral, também conhecida como dor referida, correlaciona-se com tecidos de órgãos internos e pode ser sentida em áreas distantes do local afetado.

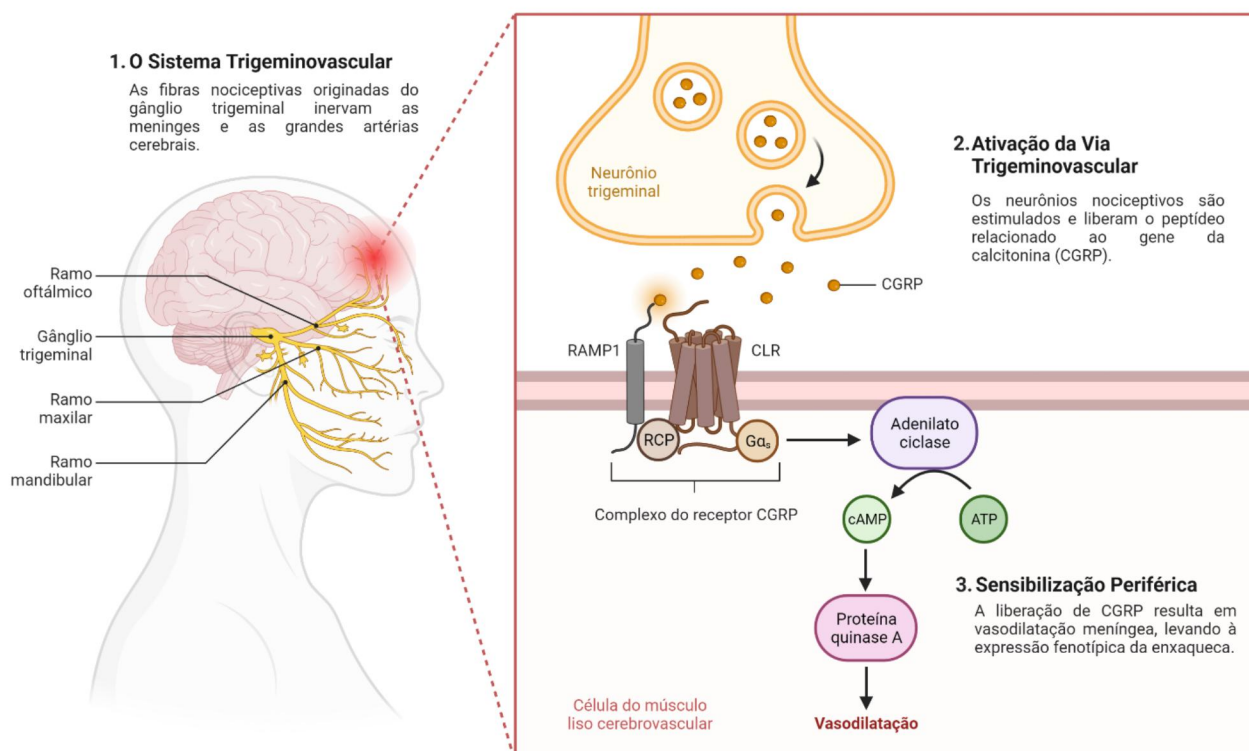
Estimativas da atenção primária sugerem que entre 10 e 25% dos adultos que residem na Europa e na América do Norte sofrem de dor persistente, podendo alcançar a marca de 40% nos Estados Unidos da América (DAHLHAMER *et al.*, 2018; REID *et al.*, 2011). Apesar da onipresença da dor, seja aguda, crônica ou intermitente, pesquisadores e profissionais da saúde pública não abordam esta questão como um tema prioritário. A dor é um problema multifacetado e interdisciplinar no qual a causa muitas vezes está associada a determinantes sociais de saúde, e há algum tempo vem crescendo tanto em números absolutos quanto em sua distribuição desigual no mundo (GOLDBERG, Daniel S; MCGEE, 2011). A *Academy of Pain Medicine* relata que a dor atinge mais americanos do que doenças crônicas como câncer, diabetes e doenças cardíacas combinadas (ORR; SHANK; BLACK, 2017). Apesar da avançada infraestrutura e da menor prevalência de fatores de risco em países de primeiro mundo, a taxa de dor crônica nestes locais é comparável com as taxas dos países de baixa renda. Nos Estados Unidos, por exemplo, 1 em cada 3 adultos sofre de dor crônica (KOHRT; GRIFFITH; PATEL, 2018). Abordar a dor como um problema de saúde pública global contribuiria na formulação e estabelecimento de políticas públicas de saúde para enfrentamento deste problema.

Globalmente, a lombalgia é a principal causa de incapacidade, representando a cada ano 57,6 milhões de anos vividos com incapacidade (AVI), seguida por dores de cabeça (45,1 milhões de AVI), dor de pescoço (28,9 milhões de AVI), e outras dores musculoesqueléticas (28,9 milhões de AVI). Uma meta-análise de dor crônica e persistente em países de baixa e média renda, incluindo 119 estudos

(47.133 indivíduos) demonstrou taxas de prevalência entre a população geral de 42% para dores de cabeça, 34% para dor crônica não especificada, 25% para dor musculoesquelética e 21% para lombalgia, sendo tais taxas consideravelmente maiores em populações idosas (KOHRT; GRIFFITH; PATEL, 2018).

De acordo com dados da *Global Burden of Disease* (GBD), as dores de cabeça estão entre as condições mais prevalentes e incapacitantes, sendo uma das principais preocupações de saúde pública em todos os países e regiões do mundo. Corroborando outros estudos epidemiológicos, a GBD identificou em 2019 que a enxaqueca sozinha foi a segunda entre as causas incapacitantes, e a primeira entre mulheres com menos de 50 anos de idade. Na mais nova meta-análise sobre a temática, que englobou 347 publicações, foi identificado que a prevalência global estimada de dores de cabeça é de 52% em países de alta renda. E a cada dia, 15,8% da população mundial sofre com dores de cabeça (STOVNER *et al.*, 2022). Uma série de estudos indicam a íntima relação entre o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) e o sistema trigeminovascular, que juntos desempenham um papel chave na regulação da vasculatura craniana e impactam diretamente a transmissão da dor (Figura 1) (DODICK, 2018; EDVINSSON, 2017; IYENGAR *et al.*, 2019; MARTELLETTI; EDVINSSON; ASHINA, 2019).

Figura 1. Relação entre CGRP e nervo trigêmeo na fisiopatologia da enxaqueca.

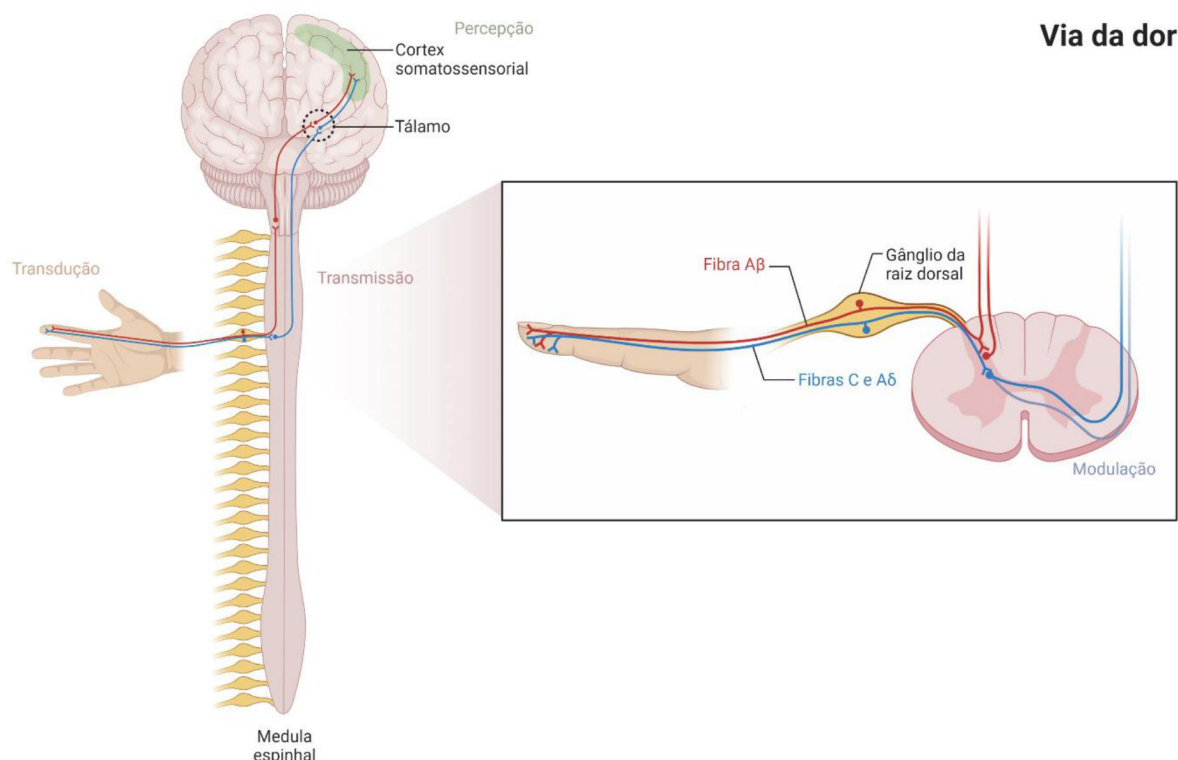


Fonte: Adaptado de “The Role of CGRP and the Trigeminal System in Migraine Pathophysiology”, por BioRender.com (2022). Acessado em <https://app.biorender.com/biorender-templates>.

2.2 Fisiopatologia da dor

A dor nociceptiva corresponde à dor aguda produzida como resultado da estimulação nociva de receptores presentes em pele e órgãos internos, na ausência de sensibilização, e é descrita como uma sensação dolorida ou latejante (WOOLF, 2004). A nocicepção é um processo pelo qual uma intensa energia mecânica, térmica ou química é detectada por uma subpopulação de fibras nervosas, denominadas nociceptores, (BASBAUM *et al.*, 2009; WOOLF; MANNION, 1999). A percepção da dor compreende quatro estágios principais (Figura 2): transdução, que engloba a ativação de terminações nervosas livres; transmissão, que consiste na condução de potenciais de ação ao longo dos axônios; percepção, que envolve o processamento cortical do estímulo nociceptivo; e modulação, que se baseia na ativação de circuitos descendentes inibitórios da dor (CARR; GOUDAS, 1999).

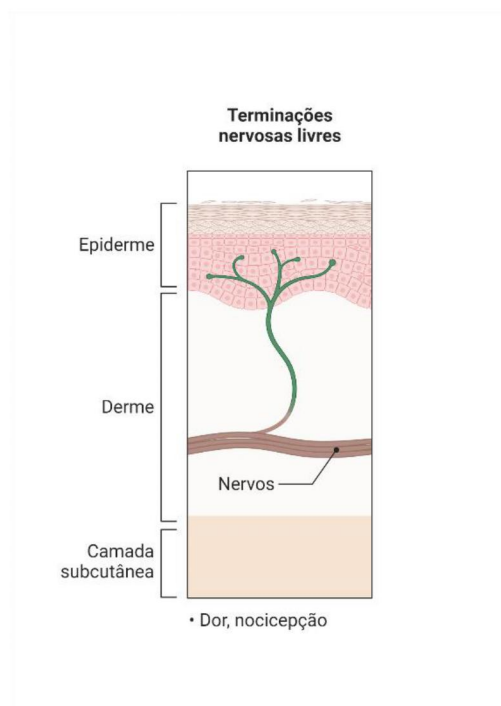
Figura 2. Esquema simplificado da via ascendente da dor.



Inicialmente o estímulo nocivo é percebido por nociceptores periféricos, que traduzem o sinal e o transmitem para o SNC. A primeira sinapse ocorre no corno dorsal da medula espinhal, onde esses neurônios de projeção ascendem com informações referentes a dor. A percepção da dor ocorre no córtex somatossensorial e pode enviar sinais modulatórios de volta para a medula espinhal a fim de reduzir a percepção nociva. Fonte: Adaptado de “Somatosensory Afferents Convey Information from the Periphery to Central Circuits”, por BioRender.com (2022). Acessado em <https://app.biorender.com/biorender-templates>.

A primeira etapa consiste na percepção dos estímulos nocivos, que são detectados por nociceptores mecânicos, térmicos e químicos encontrados em terminações nervosas livres (Figura 3) presentes na pele e em órgãos internos. Os impulsos nociceptivos são transmitidos da periferia para a medula espinhal por meio de fibras nervosas aferentes primárias, que podem ser mielinizadas ou não-mielinizadas (DAS, 2015).

Figura 3. Terminações nervosas livres.



Fonte: Adaptado de “Types of Skin Mechanoreceptors”, por BioRender.com (2022). Acessado em <https://app.biorender.com/biorender-templates>.

Os componentes da “via da dor” participam de conexões anatômicas particulares na medula espinhal, tronco cerebral, tálamo e córtex, fazendo a ponte entre o influxo sensorial gerado nas fibras aferentes primárias com estruturas do SNC responsáveis pela percepção consciente da sensação dolorosa (WOOLF, 2011).

Existem duas classes principais de nociceptores, as fibras A δ e C (MEYER *et al.*, 2008). As fibras nervosas aferentes primárias mielinizadas são denominadas fibras A δ (2-6 μm), e medeiam a dor localizada ou rápida. Elas diferem de outro grupo de fibras mielinizadas, as fibras A β (>10 μm), que possuem maior diâmetro e respondem a estímulos mecânicos inócuos. A segunda classe de fibras nervosas que conduzem estímulos nocivos são as fibras C de pequeno diâmetro (0,4 a 1,2 μm), que são desprovidas de bainha de mielina, e conduzem a dor deslocalizada ou lenta. Nesse contexto, as fibras C e A δ são responsáveis pela transmissão de estímulos nocivos, enquanto as fibras A β transmitem estímulos mecânicos como o toque (BASBAUM *et al.*, 2009; URCH, 2007).

Fibras C chegam através dos gânglios da raiz dorsal até as lâminas superficiais I e II do corno dorsal da medula espinhal. Já as fibras A δ se projetam para a lâmina I, como também para a lâmina V, localizada mais profundamente no corno dorsal. O baixo limiar, rapidamente conduz as fibras aferentes A β , que respondem ao toque leve, projetam-se para lâminas profundas (III, IV e V) (BASBAUM *et al.*, 2009).

Os neurônios do corno dorsal compreendem neurônios de projeção, que são o principal meio de transferência de informações sensoriais da medula espinhal para o cérebro; interneurônios e neurônios proprioespinhais. Muitos neurônios de projeção têm axônios que cruzam a linha média e ascendem para várias áreas do cérebro, incluindo o tálamo, substância cinzenta periaquedutal e núcleo parabraquial lateral (LEE, Greg I.; NEUMEISTER, 2020).

Os interneurônios transferem impulsos para outros interneurônios ou para neurônios ascendentes. Esses neurônios podem ser inibitórios ou excitatórios. Além disso, a ativação de vias inibitórias descendentes endógenas também podem modular os neurônios do corno dorsal, reduzindo a percepção nociceptiva (DAS, 2015).

Neurônios de projeção dentro das lâminas I e V constituem a principal conexão do corno dorsal para os altos centros. Esses neurônios estão na origem de múltiplas vias, incluindo as vias dos tratos espinotalâmico e espinoreticular, que transportam mensagens de dor para o tálamo e tronco cerebral, respectivamente. A partir desses loci do tronco encefálico e do tálamo, a informação chega às estruturas corticais (BASBAUM *et al.*, 2009). Uma vez que os impulsos tenham sido transferidos dos aferentes primários, a maioria dos neurônios de segunda ordem cruza para o lado oposto da medula espinhal e entra no trato espinotalâmico anterolateral, que ascende para os centros superiores. O sistema anterolateral transmite impulsos em um ritmo mais lento, mas carrega um espectro muito mais amplo de informações sensoriais, como dor, calor, frio e sensações táteis grosseiras (OKESON, 2014; ROWE, 2011).

A percepção nociceptiva é transportada principalmente pelo sistema anterolateral, que é dividido em dois tratos: o trato neoespinotalâmico e o trato paleoespinotalâmico. O trato neoespinotalâmico transporta as entradas nociceptivas e adentra diretamente para os centros superiores. O trato paleoespinotalâmico carrega predominantemente a nocicepção mais lenta da fibra C e viaja por muitos outros centros antes de atingir o cérebro (OKESON, 2014; ROWE, 2011).

2.3 Dor orofacial e limitações no tratamento

O local anatômico onde a dor é percebida representa uma das classificações mais elementares. Exemplos dessa classificação são a dor de cabeça e pescoço, dor torácica, dor abdominal e dor nas extremidades. As subdivisões de dores de cabeça e pescoço incluem dores orofaciais, dores de cabeça e dores cervicais (OKESON, 2014).

A dor também pode ser classificada como nociceptiva e neuropática. A nociceptiva é causada por ativação de nociceptores, e subdivide-se em superficial e profunda, sendo esta última somática ou visceral (BENOLIEL *et al.*, 2019). A dor musculoesquelética é um tipo de dor somática, e é subdividida em dor muscular, dor na articulação temporomandibular (ATM), dor óssea e periosteal, dor do tecido conjuntivo mole e dor dentária de origem periodontal (OKESON, 2014; SVENSSON; MAY, 2017). A forma mais comum de dor musculoesquelética que afeta a cabeça, pescoço e face é a dor miofascial (BORG-STEIN; SIMONS, 2002), que é um distúrbio de dor regional. A principal característica da dor miofascial é a formação de pontos-gatilho miofasciais, que reduzem a amplitude de movimento dos músculos afetados. Além disso, quando provocados, os pontos-gatilho miofasciais causam reprodução da dor em locais distantes da origem (CONTI *et al.*, 2003).

A dor neuropática é uma das condições mais desafiadoras e complexas, uma vez que resulta de uma anormalidade em um ou mais componentes do sistema nervoso, seja ele periférico, central ou autônomo (BAAD-HANSEN; BENOLIEL, 2017). Esses distúrbios compreendem um grupo de subtipos precipitados por lesão neural ou doença que pode resultar em um problema de dor neuropática, sensação anormal ou déficit sensorial. A dor neuropática não requer a presença de um estímulo nocivo em contraste com a dor somática, que requer. Essas manifestações de dor geralmente são mantidas por alterações no complexo do tronco encefálico trigeminal conhecido como neuroplasticidade central (CODERRE, Terence J. *et al.*, 1993). Quando a neuroplasticidade central é prolongada, o resultado é um estado de dor crônica ou fisiopatológica (CONTI *et al.*, 2003).

Um efeito importante da neuroplasticidade central é a hiperexcitabilidade dos neurônios de segunda ordem no tronco cerebral trigeminal conhecida como sensibilização central (REN, K; DUBNER, 1999). As consequências clínicas da

sensibilização central incluem alodinia, hiperalgesia e disseminação da dor. Outros mecanismos neurais periféricos, como inflamação neurogênica, também podem contribuir para a dor fisiopatológica (REN, K; DUBNER, 1999). Acredita-se que a atividade nociceptiva contínua e sustentada possa levar à neuroplasticidade central. As características gerais da dor neuropática incluem dor na ausência de nocicepção óbvia; dor que pode ser intensa e desproporcional ao grau de estimulação; qualidade da dor que é brilhante, estimulante e ardente; e dor que não responde relativamente a baixas doses de analgésicos narcóticos (CONTI *et al.*, 2003).

A dor neuropática é dividida em desordens episódicas e contínuas. Os distúrbios episódicos são caracterizados por períodos de remissão total entre episódios de dor paroxística. Tais episódios podem ser iniciados por toques na face, boca ou dentes (ANANTHAN; BENOLIEL, 2020; CONTI *et al.*, 2003). Consistem em surtos rápidos e curtos que passam e retornam após alguns segundos. A neuralgia episódica mais comum que afeta a região orofacial é a neuralgia do trigêmeo (ARAYA *et al.*, 2020). Ela tem sido descrita na literatura como uma das apresentações mais debilitantes da dor orofacial. Seu diagnóstico é baseado na sintomatologia, como dor restrita ao local de uma ou mais divisões do nervo trigêmeo; surtos súbitos de dor, intensos e com duração entre 1 segundo e 2 minutos; e dor desencadeada por estímulos ou toques na região orofacial que normalmente não causariam dor (ANANTHAN; BENOLIEL, 2020; ARAYA *et al.*, 2020).

Em contraste, os distúrbios neuropáticos contínuos têm dor constante e sem remissão de níveis variados de intensidade sem quaisquer períodos de remissão total. A odontalgia atípica (OA) é um excelente exemplo de um distúrbio de dor neuropática contínua. A gestão da OA é extremamente difícil e nenhuma abordagem única provou ser universalmente eficaz. A OA é um distúrbio crônico que deixa perplexo e frustra tanto o paciente quanto o clínico (CONTI *et al.*, 2003).

Muitos pacientes que apresentam dor orofacial têm uma causa estrutural orgânica responsável. O principal objetivo da terapia para tais queixas é identificar a causa e eliminá-la. Muita dor somática resulta de trauma, lesão intrínseca, infecções e doenças que induzir reações inflamatórias. Há ocasiões em que a condição somática que gera a dor é refratária à terapia, e a queixa persiste como dor estrutural crônica (OKESON, 2014).

A terapia da dor é atualmente um dos desafios da medicina moderna. Os distúrbios da dor orofacial são frequentes na população geral e seu tratamento farmacológico é difícil e controverso (WEISS; EHRHARDT; TOLBA, 2017). Isso se deve em parte à compreensão limitada da fisiopatologia dos distúrbios da dor que surgem das estruturas inervadas pelo nervo trigêmeo. As razões adicionais incluem a escassez de modelos animais, que permitem avaliar a capacidade de resposta dos nociceptores, a magnitude da reação nociceptiva, medindo a linha de base e a liberação estimulada de neuropeptídeos durante a ativação de aferentes do trigêmeo (ARAYA *et al.*, 2020; HARGREAVES, 2011; ZUBRZYCKI; STASIOLEK; ZUBRZYCKA, 2019).

Diversas terapias, incluindo analgésicos, anti-inflamatórios e medicamentos adjuvantes, fisioterapia e bloqueio anestésico têm sido propostas para o tratamento da dor miofascial. O uso de medicamentos analgésicos e anti-inflamatórios é o primeiro passo terapêutico. São eficientes no controle da dor aguda e podem auxiliar na fisioterapia; entretanto, o uso crônico não é indicado (CONTI *et al.*, 2003). Antidepressivos tricíclicos como amitriptilina, clorimipramina e nortriptilina atuam como inibidores da recaptação de serotonina e auxiliam na modulação da dor e nos padrões de sono. O tratamento da dor musculoesquelética pode ser difícil em casos crônicos (CONTI *et al.*, 2003; CRANDALL, 2018).

No caso da odontalgia atípica, as abordagens mais utilizadas para o tratamento são a farmacoterapia com antidepressivos tricíclicos e estabilizadores de membrana e aplicações tópicas de capsaicina (SINDRUP *et al.*, 2005).

Em termos de neuralgia do trigêmeo, o tratamento de primeira linha permanece com o uso de anticonvulsivantes, devido a uma longa história de uso e efeitos colaterais relativamente toleráveis. Os pacientes que falham na terapia médica têm que recorrer a opções cirúrgicas (XU; XIE; JACKSON, 2021). A carbamazepina é altamente eficaz na redução da dor, apresentando eficácia de até 70% dos pacientes tratados. No entanto, o uso de carbamazepina tem sido associado a uma variedade de reações de hipersensibilidade, desde exantemas maculopapulares leves até síndrome de hipersensibilidade, reação medicamentosa com eosinofilia e sintomas sistêmicos, pustulose exantemática generalizada aguda, síndrome de Stevens-Johnson e necrólise epidérmica tóxica; sendo estas caracterizadas como reações adversas cutâneas graves (HAMASAKI *et al.*, 2018). Frequentemente, essas reações

requerem a descontinuação da carbamazepina, devido ao desconforto causado aos pacientes ou devido à sua gravidade e caráter de risco de vida (XU; XIE; JACKSON, 2021).

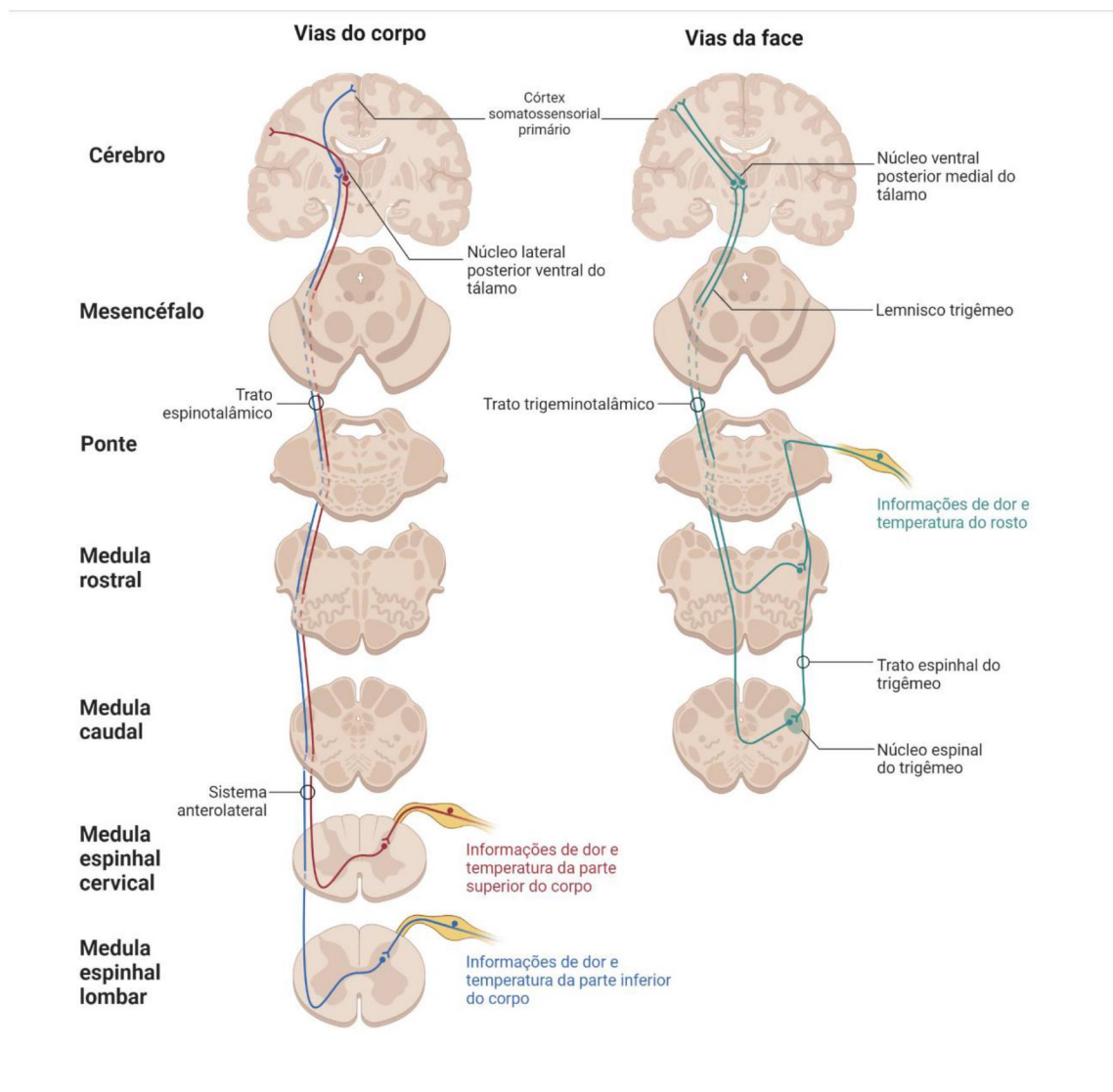
A elucidação dos mecanismos moleculares subjacentes à neuralgia do trigêmeo abrirá o caminho para terapias novas, mais eficazes e menos invasivas (ARAYA *et al.*, 2020). A farmacologia e os mecanismos moleculares de transmissão sensorial no sistema trigeminal não foram totalmente identificados até o momento, o que está associado à falta de tratamento eficaz para síndromes dolorosas originárias da área orofacial (XU; XIE; JACKSON, 2021).

2.4 Fisiopatologia da orofacial

Devido à rica inervação da cabeça, face e estruturas orais, diagnosticar a dor orofacial é complexo e difícil. Noventa por cento das dores orofaciais surgem dos dentes e estruturas orais (OKESON, 2014). Uma vez descartados os problemas dentários, as condições de dor musculoesquelética e neuropática são as causas mais comuns de dor facial. A sensação de dor das estruturas intraorais e extraorais da cabeça e face são transportadas para o SNC pelo sistema trigeminal (ROWE, 2011). Em vez de uma única via nervosa, o termo “sistema trigêmeo” refere-se a um arranjo complexo de fibras de transmissão nervosa, interneurônios e conexões sinápticas que processam informações recebidas das três divisões desse nervo (CONTI *et al.*, 2003).

Diferentemente das vias neurais comuns, que transmitem impulsos somáticos para a medula espinhal, a informação de estímulos advindos da face e de estruturas orais não entra na medula espinhal (Figura 4). Em vez disso, a entrada sensorial da face e da boca é conduzida pelo quinto nervo craniano, o nervo trigêmeo (OKESON, 2014). Por ser um nervo misto, o trigêmeo contém fibras sensoriais e motoras. As fibras sensoriais inervam a parte anterior da face, dentes, membranas mucosas das cavidades oral e nasal, conjuntiva, dura-máter e vasos sanguíneos intra e extracranianos. As fibras motoras suprem os músculos da mastigação. Com exceção da propriocepção, a informação sensorial da face e da boca é transportada por neurônios aferentes primários através do gânglio trigeminal para fazer sinapse com neurônios de segunda ordem no complexo do tronco cerebral trigeminal (CONTI *et al.*, 2003; ROWE, 2011).

Figura 4. Principais diferenças entre as vias de transmissão da dor.



Fonte: Adaptado de “Discriminative Pain Pathways”, por BioRender.com (2022). Acessado em <https://app.biorender.com/biorender-templates>.

O complexo do tronco cerebral trigeminal pode ser dividido em núcleo sensorial principal, que está localizado rostralmente e recebe aferentes periodontais e alguns aferentes pulpare, e núcleo do trato espinhal, que está localizado mais caudalmente (COOPER; SESSLE, 1992). O núcleo do trato espinhal, por sua vez, é composto por três núcleos separados, sendo eles o subnúcleo oral, o subnúcleo interpolar e o subnúcleo caudal. O subnúcleo caudal está localizado na medula, às vezes se estendendo até o nível de C2 ou C3, e é o principal local de retransmissão

cerebral de informações nociceptivas provenientes da região orofacial, por esse motivo, ele é frequentemente denominado corno dorsal medular (MERRILL, 1997). Tanto os sinais nociceptivos que chegam ao subnúcleo caudal quanto os sinais nociceptivos projetados em seu caminho para o tálamo podem ser modulados por fibras nervosas descendentes de níveis superiores do SNC ou por drogas (ROWE, 2011).

Impulsos transportados pelo nervo trigêmeo entram diretamente no tronco encefálico na região da ponte para fazer sinapse no núcleo do trato espinhal. O subnúcleo caudal tem sido particularmente implicado em mecanismos nociceptivos trigeminais com base em observações eletrofisiológicas de neurônios nociceptivos, recebendo projeções dos aferentes nociceptivos faciais (HARGREAVES, 2011; OKESON, 2014).

Os neurônios de segunda ordem projetam-se para o tálamo a partir de junções sinápticas com aferentes primários no subnúcleo caudal. Assim como no corno dorsal, esses interneurônios apresentam três tipos de células de transmissão. Neurônios de ampla faixa dinâmica (WDR), que respondem a estímulos táteis e nociceptivos em uma ampla faixa de intensidades; neurônios nociceptivos específicos (NS), que respondem exclusivamente a estímulos nociceptivos finos; e neurônios mecanossensíveis de baixo limiar (LTM), que respondem a estímulos táteis leves (OKESON, 2014). Os axônios desses neurônios formam um trato ascendente, conduzindo sinais nociceptivos para níveis mais altos do cérebro para posterior processamento (CONTI *et al.*, 2003).

Os neurônios WDR e NS predominam nas lâminas I, II, V e VI e compõem as vias nociceptivas do trigêmeo. Todos eles recebem estímulos de estruturas cutâneas, e pelo menos metade deles também recebe estímulos de estruturas profundas da boca e da face. Neurônios LTM predominam nas lâminas III e IV, e são implicados na transmissão do toque na região da face e boca. Além disso, neurônios LTM são excitados por forte estimulação elétrica das polpas dentárias e podem estar envolvidos em algumas situações patológicas dolorosas (HARGREAVES, 2011; ROWE, 2011).

Outra grande conexão sináptica na transmissão da dor ocorre no tálamo, onde os axônios que passam no trato trigeminotalâmico fazem sinapse com neurônios

de terceira ordem. Todas as informações sensoriais da medula espinhal e do tronco encefálico passam pelo tálamo, tornando-o uma das principais estações de retransmissão entre o tronco encefálico e diferentes partes do córtex somatossensorial. A nível talâmico, o potencial de ação é submetido a um extenso processamento por meio de interações entre seus vários núcleos e por interconexões com as regiões límbicas, hipotalâmicas e corticais. Até que o sinal nociceptivo ascenda ao tálamo, a maioria das reações no SNC ocorrem de natureza reflexa. Somente quando o tálamo está envolvido, os elementos de consciência e alerta são introduzidos. Por fim, após a transmissão dos sinais nociceptivos, ocorre a percepção da dor no córtex parietal posterior do cérebro (CONTI *et al.*, 2003; HARGREAVES, 2011; ROWE, 2011).

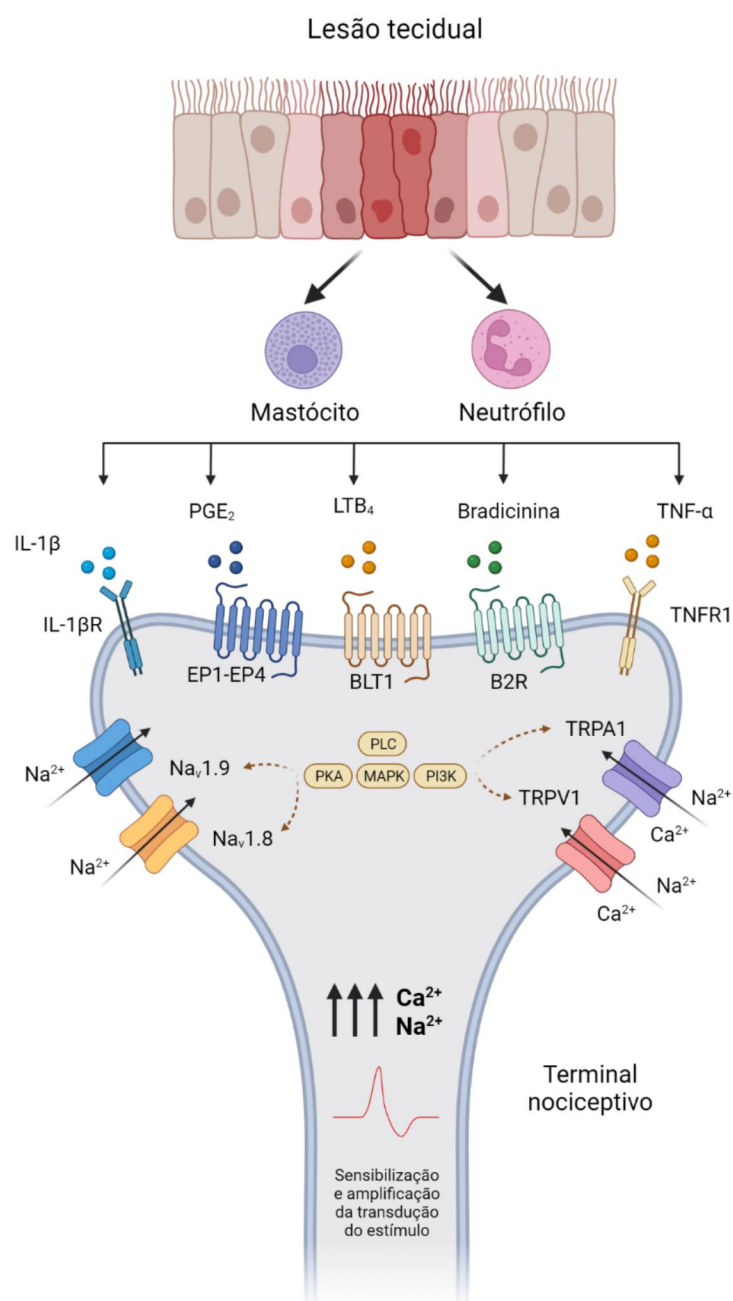
2.5 Inflamação

Enquanto a dor aguda é adaptativa, a inflamação local e a lesão frequentemente resultam em um estado de dor iniciado por estímulos inócuos ou moderadamente aversivos (WOLLER *et al.*, 2017). A inflamação ou lesão tecidual libera mediadores capazes de reduzir o limiar dos nociceptores, promovendo alodinia (dor em resposta a um estímulo não-nociceptivo) ou hiperalgesia (aumento da sensibilidade à dor) (LOESER; TREEDE, 2008; ORR; SHANK; BLACK, 2017; WOLLER *et al.*, 2017).

Após a ocorrência de dano tecidual, as células imunes, bem como células afetadas, liberam uma série de mediadores químicos, principalmente citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas, prostaglandinas, fatores de crescimento nervoso, purinas, aminas, íons, bradicininas, óxido nítrico entre outros, que contribuem a sensibilização do nociceptor (Figura 5) (DAS, 2015). Os terminais periféricos dos nociceptores expressam receptores para muitos desses mediadores inflamatórios. Sua atuação consiste em reduzir o limiar de ativação de canais iônicos, como o receptor potencial transitório vanilóide 1 (TRPV1) e canais de sódio dependentes de voltagem (Na_v), induzindo eventos de fosforilação ou aumentando níveis de expressão (CHEN, Lihong; YANG; GROSSER, 2013). A sensibilização periférica consiste no aumento da sensibilidade dos terminais periféricos no tecido inflamado, e contribui para alodinia e hiperalgesia (BASBAUM *et al.*, 2009). Apesar de ser desconfortável, a

hipersensibilidade à dor contribui para a proteção dos tecidos lesados, pois desencoraja a atividade, e assim, reduz o estresse mecânico.

Figura 5. Mecanismo celular de sensibilização do nociceptor.



As células imunes liberam mediadores, que são detectados pelos nociceptores para modular a transdução da dor. Interleucina (IL) 1β, fator de necrose tumoral α (TNF-α), prostaglandina E2 (PGE₂), leucotrieno B4 (LTB₄) e bradicinina se ligam a seus receptores para mediar o disparo neuronal. As cascatas de sinalização através de fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K), proteína quinase ativada por

mitógeno (MAPK) e proteína quinase A (PKA) levam à ativação do TRPV1 e receptor potencial transitório anquirina 1 (TRPA1), bem como Nav1.8 e Nav1.9. A fosfolipase C (PLC) é fosforilada após a ativação do receptor de bradicinina (B2R), promovendo conversão do 4,5-bisfosfato de fosfatidilinositol (PIP2) em inositol trifosfato (IP3) e diacilglicerol (DAG). O IP3, por sua vez, medeia a liberação de cálcio intracelular, que sensibiliza a atividade de TRPV1 e TRPA1. O resultado geral dessas vias imunomediadas em nociceptores é a diminuição do limiar para respostas a estímulos mecânicos ou térmicos, que levam a um aumento da sensibilidade à dor. Fonte: Adaptado de Pankaj (2019). Criado pelo autor com BioRender.com.

O segundo mecanismo subjacente à hipersensibilidade à dor é denominado sensibilização central (LATREMOLIERE; WOOLF, 2009). Além dos mediadores inflamatórios, a lesão tecidual também estimula a liberação de neurotransmissores, como substância P e glutamato, dos terminais centrais dos nociceptores, bem como aumenta a produção de PGE₂, IL-1 β e TNF- α na medula espinhal. Essa exacerbação de estímulo nos neurônios do corno dorsal promove respostas anormais aos sinais sensoriais periféricos (COSTIGAN; WOOLF, 2000). Dessa forma, a dor é percebida em regiões distantes do local lesado, e estímulos táteis, antes inócuos, agora são processados como uma sensação dolorosa. Os processos subjacentes à sensibilização central refletem a plasticidade do sistema nociceptivo, sendo geralmente reversíveis dentro de um curto prazo após respostas adequadas desse sistema. No entanto, doenças inflamatórias crônicas podem condicionar uma modificação duradoura na arquitetura do sistema nociceptivo, o que pode levar a alterações permanentes em sua responsividade. Tais mecanismos contribuem para a dor crônica (DAS, 2015).

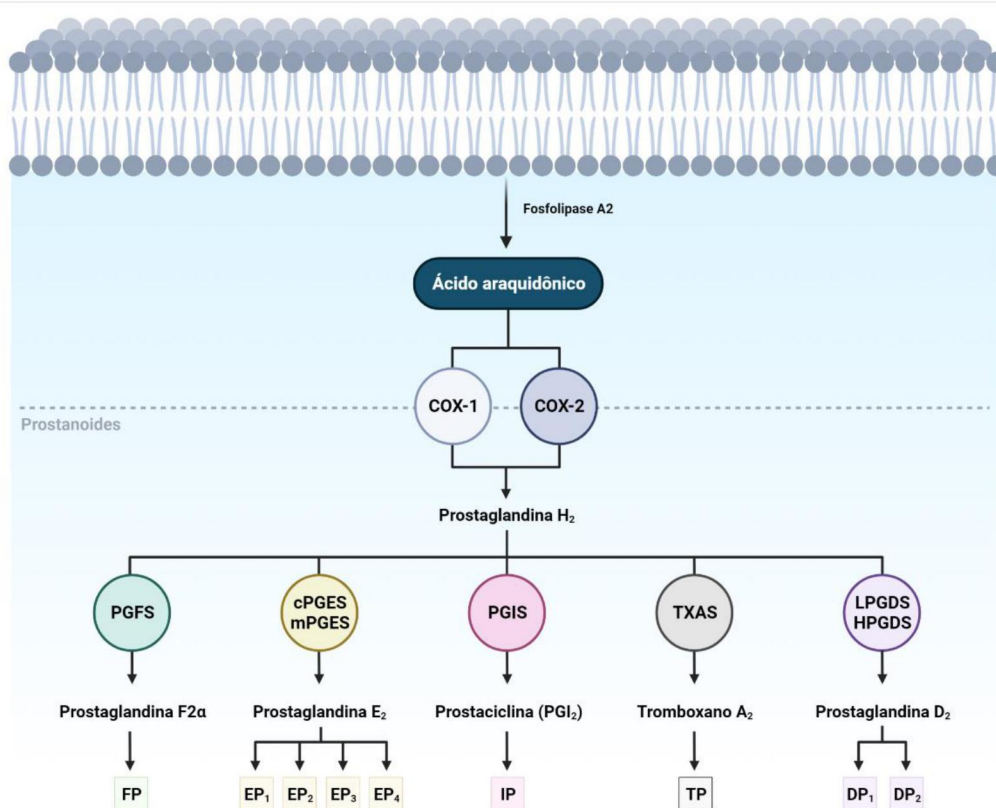
Os fármacos mais utilizados para o tratamento da dor inflamatória compreendem os da classe dos AINEs, como ácido acetilsalicílico (AAS), naproxeno e ibuprofeno (HIJOS-MALLADA; SOSTRES; GOMOLLÓN, 2022). Esses agentes terapêuticos inibem a enzima ciclooxigenase (COX), que possui duas isoformas, COX-1 e COX-2. A inibição dessas enzimas reduz a produção de prostanóides, que são mediadores capazes de favorecer a sensibilização periférica e central na dor inflamatória. Assim, o efeito analgésico dos AINEs é parcialmente explicado pela redução ou reversão da sensibilização periférica promovida pelos prostanóides. O efeito dos AINEs também pode ser percebido na medula espinhal, reduzindo a sensibilização central (CHEN, Lihong; YANG; GROSSER, 2013).

Hoje são investigadas abordagens mais específicas para direcionar a sinalização de prostanóides na dor inflamatória, como a inibição de enzimas e receptores envolvidos no processo (HIJOS-MALLADA; SOSTRES; GOMOLLÓN, 2022).

Três reações enzimáticas sequenciais são responsáveis por originar os prostanóides, e esse processo é iniciado com a liberação de ácido araquidônico (AA) dos fosfolipídios de membrana pela fosfolipase A₂ (PLA₂). Esses três grupos de enzimas responsáveis pela metabolização do AA englobam as COXs, lipoxigenases (LOX) ou epoxigenases, cujo resultado consiste na síntese de prostanóides, leucotrienos ou ácidos epoxieicosatrienoicos. Os eicosanóides gerados em todas as três vias têm sido implicados na sinalização da dor inflamatória (CALDER, 2020).

A segunda etapa na síntese de prostanóides envolve a atividade das enzimas COX-1 e -2, que catalisam a conversão de AA em endoperóxidos instáveis: prostaglandina G₂ (PGG₂), e então em prostaglandina H₂ (PGH₂). As isoformas da COX possuem dois sítios ativos, o primeiro com função cicloxigenase e outro com função peroxidase (MAGALHÃES *et al.*, 2012). Existem diferenças estruturais entre COX-1 e -2 dentro do sítio ativo, mas para a conversão do AA em prostanóides, as etapas enzimáticas de oxidação, formando PGG₂, seguido por peroxidação, para produzir PGH₂, são idênticas para ambas isoformas. Os diferentes prostanóides são gerados a partir do intermediário PGH₂ através da atividade de isomerases e sintases específicas do tecido (CAPONE *et al.*, 2007). Até o momento, cinco prostanóides bioativos são conhecidos por serem gerados pelas COXs em mamíferos: prostaglandina E₂ (PGE₂), prostaciclina (PGI₂), prostaglandina D₂ (PGD₂), prostaglandina F_{2α} (PGF_{2α}) e tromboxano A₂ (TXA₂) (Figura 6) (DAS, 2015).

Figura 6. Biossíntese de prostanóides.



Fonte: Adaptado de Mitchell (2019). Criado pelo autor com BioRender.com.

Embora COX-1 e COX-2 compartilhem atividades ciclooxygenase e peroxidase, essas isoformas são reguladas de forma diferente. A COX-2 requer níveis consideravelmente mais baixos de hidroperóxidos para iniciar a catálise pela ciclooxygenase em comparação com a COX-1. Além disso, a atividade da COX-2 ocorre em níveis mais baixos de AA livre do que a atividade da COX-1 (BRUNO, Annalisa; TACCONELLI; PATRIGNANI, 2014).

A COX-1 é expressa constitutivamente na maioria dos tecidos e é responsável pela produção basal de prostanóides com funções homeostáticas, como integridade do trato gastrointestinal (TGI) e renal, função plaquetária e diferenciação de macrófagos (HIJOS-MALLADA; SOSTRES; GOMOLLÓN, 2022). Ela está envolvida na síntese de prostaglandinas que estimulam a produção e secreção de muco e bicarbonato, aumentam o fluxo sanguíneo da mucosa e promovem a proliferação de células epiteliais. A COX-1 induz as plaquetas a produzirem TXA₂, que

estimula a agregação plaquetária na presença de danos nos vasos sanguíneos (GARCÍA-RAYADO; NAVARRO; LANAS, 2018). A COX-2 não é expressa, ou pode ser expressa apenas em níveis marginais sob condições basais, mas é regulada positivamente em resposta a fatores pró-inflamatórios, hormônios e fatores de crescimento. Ela está envolvida na síntese de prostaglandinas que induzem inflamação, dor e febre, bem como na proliferação celular, promoção da angiogênese e restauração da integridade da mucosa (GARCÍA-RAYADO; NAVARRO; LANAS, 2018).

Os prostanóides atuam em receptores acoplados à proteína G (GPCRs), ou seja, quatro subtipos de receptores PGE₂ (EP₁, EP₂, EP₃ e EP₄), dois receptores PGD₂ (DP₁, DP₂), um receptor PGI₂ (IP), um receptor PGF_{2α} (FP) e um receptor TXA₂ (TP) (DAS, 2015).

Os prostanóides dependentes de COX-1 desempenham um papel essencial na citoproteção gastrointestinal (GI) e na função plaquetária, enquanto os prostanóides dependentes de COX-2 desempenham papéis dominantes em processos fisiopatológicos, como inflamação e câncer, mas também em processos fisiológicos, como vasoproteção e manutenção do fluxo sanguíneo renal e regulação da excreção de sódio (BRUNO, Annalisa; TACCONELLI; PATRIGNANI, 2014).

Modelos de inflamação podem avaliar respostas à dor usando a latência de retirada da pata após estímulos quentes, uma medida de hipersensibilidade térmica à dor; ou avaliando o limiar de retirada da pata após estímulos mecânicos, que seria um índice de hipersensibilidade mecânica à dor; ou até mesmo contabilizando o número de contorções abdominais (CHEN, Lihong; YANG; GROSSER, 2013).

O ácido acético pode produzir inflamação peritoneal, que causa contração dos músculos abdominais seguida de alongamento dos membros posteriores. Essa resposta é considerada um modelo de dor inflamatória visceral, uma vez que o agente químico ativa diretamente canais catiônicos não seletivos expressos em nociceptores viscerais e somáticos que inervam o peritônio e induz inflamação por meio da liberação de vários mediadores inflamatórios em órgãos viscerais subdiafragmáticos e nas paredes musculares subcutâneas (IKEDA *et al.*, 2001; PARK *et al.*, 2013; SATYANARAYANA *et al.*, 2004).

Evidências de modelos inflamatórios experimentais mostram que a indução de COX-2 é responsável em grande parte pela alta taxa de produção de prostanoídes no local da inflamação. Nesse sentido, o modelo de edema de pata induzido por carragenina é capaz demonstrar a hiper-regulação da COX-2 no tecido afetado pelo estímulo químico, enquanto a expressão de COX-1 permanece inalterada (SEIBERT *et al.*, 1994).

O edema de pata induzido por carragenina é um dos testes mais populares usados para avaliar atividade anti-inflamatória (WINTER; RISLEY; NUSS, 1962). É um teste altamente sensível e reprodutível para AINEs e há muito se estabeleceu como um modelo válido (WILLOUGHBY; DIROSA, 1972). A inflamação induzida por carragenina é útil na detecção de novos fármacos, portanto, tem valor preditivo significativo para agentes anti-inflamatórios que atuam por meio de mediadores da inflamação aguda (VINEGAR; SCHREIBER; HUGO, 1969). O desenvolvimento de edema induzido pela injeção de carragenina causa uma resposta inflamatória aguda e local. Na fase inicial (0-1 h), histamina, serotonina e bradicinina são os primeiros mediadores envolvidos, enquanto prostaglandinas e várias citocinas como IL-1 β , IL-6, IL-10 e TNF- α estão implicados na segunda fase (CRUNKHORN; MEACOCK, 1971).

Além da indução local no tecido inflamado, a COX-2 também é regulada positivamente no SNC durante a inflamação periférica, bem como é constitutivamente expressa em baixos níveis nos neurônios da medula espinhal e nas células da glia. Estudos também demonstram o aumento significativo da expressão de COX-2 na medula espinhal quando há inflamação evocada pela carragenina, enquanto a COX-1 permanece inalterada (BELOEIL *et al.*, 2009). A produção de prostanoídes resultante contribui para a hipersensibilidade central observada na inflamação (CALDER, 2020).

Compreender o papel da COX-2 central e periférica na dor inflamatória pode ajudar a desenvolver estratégias analgésicas mais eficazes e otimizar a seleção de agentes terapêuticos com base na seletividade da COX-2 ou na capacidade de penetrar no SNC.

Apesar da ação majoritária da COX-2 na inflamação, dados humanos indicam que os prostanoídes derivados da COX-1 desempenham um papel na fase

inicial, enquanto a regulação positiva da COX-2 ocorre posteriormente (SMYTH *et al.*, 2009).

Dessa forma, ambas enzimas estão envolvidas na reação inflamatória e contribuem para a sensibilização da dor periférica e central. Os papéis relativos das isoformas no início e durante a resposta à dor podem depender do tipo de estímulo inflamatório ou dos níveis relativos de cada isoforma nos tecidos-alvo. Essa diferença entre isoformas ocasiona distintas formas de aliviar a dor. A decisão sobre o uso de inibidores seletivos e não seletivos pode promover benefício terapêutico para os pacientes. Esses aspectos são importantes no desenvolvimento de abordagens específicas para o manejo da dor com AINEs, onde cada paciente apresenta uma condição personalíssima, e a escolha correta pode otimizar o benefício terapêutico e mitigar os riscos potenciais associados.

A PGE₂ exerce propriedades hiperalgésicas na periferia devido a seu efeito sensibilizador nos nervos aferentes primários, por mecanismos diretos e indiretos. Ela é capaz de modular diretamente a função de canais iônicos atuando nos receptores EP, em particular EP₁ e EP₄ (DAS, 2015).

Além disso, a PGE₂ também possui efeitos indiretos, incluindo o aumento da sensibilidade dos neurônios periféricos a outros agentes químicos excitatórios (VASKO; CAMPBELL; WAITE, 1994).

O envolvimento da PGE₂ na hiperalgesia central foi ilustrado em vários modelos experimentais. A injeção de formalina na pata traseira evoca uma liberação espinhal bifásica de PGE₂, que contribui para a resposta nociva percebida em função do estímulo induzido pela formalina (MALMBERG; YAKSH, 1995).

Em nível pré-sináptico, a PGE₂ promove aumento da nocicepção por facilitar a liberação espinhal do neurotransmissor excitatório glutamato ou neuropeptídeos, incluindo substância P e CGRP (HINGTGEN; VASKO, 1994; NISHIHAM *et al.*, 1995). Isso foi mediado por um aumento na corrente de entrada de cálcio. Já em nível pós-sináptico, a PGE₂ se liga ao receptor EP₂ para ativar diretamente neurônios do corno dorsal, potencializando a atividade dos receptores ativados por glutamato, como ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4- isoxazolepropiónico (AMPA) e N-metil D-Aspartato (NMDA), cuja ativação promove abertura de canais catiônicos não seletivos (BABA *et al.*, 2001; DAS, 2015). Tais eventos contribuem para

a transmissão de respostas nociceptivas. Além disso, a PGE₂ também pode facilitar a sensibilização central ao bloquear a subunidade $\alpha 3$ do receptor glicinérgico, cuja capacidade inibitória fica comprometida (HARVEY *et al.*, 2004).

Como a inibição da COX-2 está associada a um risco cardiovascular (CV) atribuível à inibição da PGI₂, a inibição direcionada à via da PGE₂ vêm sendo atribuída como uma estratégia alternativa. A atenção tem se voltado mais especificamente para a prostaglandina E sintase-1 microssomal (mPGES-1), uma enzima limitante na síntese de PGE₂, que está frequentemente acoplada à COX-2. Dessa forma, a mPGES-1 pode ser um alvo útil para o tratamento da dor associada à doença inflamatória (CHEN, Lihong; YANG; GROSSER, 2013).

A existência de quatro subtipos de receptores EP (EP₁₋₄) codificados por genes distintos também contribui para a diversidade da atividade biológica da PGE₂. EP₂ é expresso em neurônios da medula espinhal do sistema nociceptivo, e EP₁, EP₃ e EP₄ são expressos em aferentes nociceptivos primários (DAS, 2015; KAWAMURA *et al.*, 1997).

O impacto da PGE₂ na dor inflamatória aguda pôde ser avaliado pelo modelo de contorções induzidas por ácido acético, onde a resposta à dor em camundongos *knockout* para o receptor EP₁ demonstrou ser idêntica àquela promovida por inibição da COX (STOCK *et al.*, 2001).

O uso terapêutico de AINEs como anti-inflamatórios e analgésicos está associado a um amplo espectro de efeitos adversos, incluindo lesões GI, eventos cardiovasculares (CV), toxicidade renal, insuficiência cardíaca congestiva e elevação da pressão arterial, entre outros. Recentemente, os eventos CV têm causado muita preocupação, mas a toxicidade GI é provavelmente o efeito adverso mais importante, devido à sua frequência e gravidade (BRUNO, Annalisa; TACCONELLI; PATRIGNANI, 2014; GARCÍA-RAYADO; NAVARRO; LANAS, 2018). Por existir uma diversa contribuição dos receptores EP no estímulo à dor inflamatória, a inibição dos receptores periféricos EP_{1/4} e central EP₂ pode fornecer efeitos analgésicos para síndromes dolorosas específicas. Esta pode ser uma estratégia promissora caso o envolvimento do receptor EP seja identificado como um dos principais responsáveis pela condição dolorosa. Assim, sua inibição pode ser útil para complementar outras

terapias em uma abordagem individualizada (CHEN, Lihong; YANG; GROSSER, 2013).

2.6 Modelos *in silico* de atividade biológica

A pesquisa e desenvolvimento (P&D) de um novo medicamento é um processo dispendioso, que exige dezenas de milhões de dólares e cerca de dez a vinte anos. Apesar da enorme quantidade de etapas, ainda restam lacunas, que por vezes resultam na descontinuação do medicamento. Para lidar com esse problema, várias técnicas *in silico* estão sendo usadas durante o estágio inicial da P&D para identificar possíveis problemas de segurança, permitindo aumentar a taxa de sucesso e reduzir os custos associados. Dessa forma, algumas etapas da P&D estão sendo abolidas pela indústria farmacêutica, uma vez que os estudos *in silico* conseguem substituir satisfatoriamente determinados modelos experimentais *in vivo* (BRUNO, Agostino *et al.*, 2019). Anualmente, a indústria farmacêutica investe aproximadamente 10% do seu faturamento no aperfeiçoamento de algoritmos de simulação capazes de avaliar milhares de ligantes em curto intervalo de tempo (KITCHEN *et al.*, 2004).

O avanço na capacidade de processamento dos computadores coloca em ênfase a área da bioinformática, que fornece valiosas contribuições para a investigação de novas moléculas com atividades biológicas. Os estudos *in silico* permitem prever alvos terapêuticos, toxicidade, permeabilidade de membranas, metabolismo, entre outros, e assim antecipar ou confirmar se um composto é capaz de exercer efeitos benéficos (DI; KERNS, 2008).

Em termos farmacocinéticos, na maioria das vias, uma etapa limitante para que um fármaco promova seu efeito é a absorção. Em 1997, Christopher A. Lipinski, trabalhando para a Indústria Farmacêutica Pfizer, desenvolveu um modelo capaz de fornecer uma boa previsão do perfil de biodisponibilidade oral de novas moléculas. A regra dos 5 de Lipinski é assim conhecida por seus parâmetros serem múltiplos de cinco. É um método simples, rápido e de baixo custo, que permite avaliar a *drug-likeness*. As regras obedecem a um padrão de referência baseado em pesquisa, documentação e justificativa sólidas. Compostos que atendem a todos os parâmetros possuem maior probabilidade de serem absorvidos após administração oral (DI; KERNS, 2008). De acordo com essa regra, uma molécula pode apresentar boa

absorção caso seu peso molecular seja $\leq 500 \text{ g.mol}^{-1}$, seu coeficiente de partição ($\text{LogP}_{o/w}$) seja ≤ 5 , o número de aceptores de hidrogênio (soma de átomos de oxigênio e nitrogênio) seja ≤ 10 , e número de grupos doadores de hidrogênio (soma de OH e NH) seja ≤ 5 . No máximo um parâmetro pode ser violado para a molécula ser considerada candidata a fármaco (LIPINSKI, Christopher A. *et al.*, 2012).

No contexto dos modelos *in silico*, o *docking* (ancoramento) molecular vêm ganhando espaço em virtude do avanço biotecnológico dos métodos de purificação de proteínas, cristalografia de raio-X e espectroscopia de ressonância magnética nuclear. A identificação detalhada de estruturas proteicas, bem como o depósito das estruturas cristalografadas em bancos de dados públicos confere maior diversidade na avaliação de possíveis interações. Isso também favorece a eficiência do acoplamento, uma vez que para obtenção de êxito é necessário o prévio conhecimento do sítio de ligação (MENG *et al.*, 2011).

O *docking* molecular é um instrumento capaz de prever geométrica e energeticamente o complexo de interação físico-química formado entre moléculas, denominadas ligantes, com estruturas tridimensionais de macromoléculas presentes no organismo, que podem ser lipídios, proteínas, ácidos nucleicos, entre outros. Essa informação é determinante para o planejamento racional de fármacos, uma vez que oferece um excelente direcionamento. O estudo das orientações e conformações permite estabelecer quais os pontos chave de ligação, e assim promover substituições na estrutura molecular que favoreçam a afinidade e especificidade pelo receptor, reduzindo assim a dose necessária para promover os efeitos terapêuticos, e consequentemente reduzindo também a incidência de efeitos adversos (ALMEIDA, 2014; BROOIJMANS; KUNTZ, 2003).

Essa técnica tem se tornado uma alternativa, rápida, barata e de alta eficiência, capaz de contribuir com a redução do tempo e custos durante o processo de desenvolvimento de novos medicamentos. Sua utilização está associada ao *screening* virtual de compostos, bem como à descoberta e otimização de compostos líderes. Os algoritmos de busca, os graus de liberdade configuracionais e conformacionais, as funções de pontuação (*score*) e as funções *fitness* (de ajuste) são peças-chave no *docking* molecular, pois permitem pesquisar por diferentes conformações e orientações com base na complementariedade química e estérica entre ligante e alvo, bem como identificar o melhor cenário energético, caracterizado

pela formação do complexo de menor energia (ALMEIDA, 2014; BROOIJMANS; KUNTZ, 2003).

Para determinar a afinidade do ligante com o sítio ativo é necessário que estejam presentes alguns fatores determinantes, como alto nível de complementaridade estérica, alta complementaridade de propriedades associadas às superfícies de contato, conformação energeticamente favorável e poucas interações repulsivas (ALMEIDA, 2014). A afinidade entre ligante e alvo ocorre através de interações intermoleculares, como forças de Van der Waals, interações hidrofóbicas, π - π , interações iônicas ou eletrostáticas, ligações de hidrogênio e ligações covalentes (GURYANOV; FIORUCCI; TENNIKOVA, 2016).

As interações eletrostáticas resultam da atração entre dipolos e/ou íons de cargas opostas. Em pH fisiológico, alguns aminoácidos encontram-se ionizados, podendo interagir com moléculas que apresentem grupos carregados. Essas interações variam energeticamente entre 1 e 7 kcal/mol e são divididas em íon-dipolo e dipolo-dipolo. A primeira é resultado da força de interação entre um íon e uma espécie neutra polarizável, já a segunda consiste na interação entre dois grupamentos com cargas opostas, principalmente em decorrência da diferença de eletronegatividade entre um heteroátomo e um átomo de carbono (BARREIRO; FRAGA, 2015).

As interações de Van der Waals ocorrem entre todos os átomos, e são representadas por interações dipolo permanente-dipolo permanente, dipolo permanente-dipolo induzido e dipolo induzido-dipolo induzido. A força atrativa entre os átomos ocorre em virtude de uma assimetria transitória na distribuição eletrônica de um átomo, induzindo por consequência uma assimetria complementar no átomo vizinho (ROTH; NEAL; LENHOFF, 1996). Configuram interações energeticamente fracas, variando entre 0,5 e 1,0 kcal/mol, e geralmente ocorrem em função da polarização transiente de ligações carbono-hidrogênio ou carbono-carbono. Apesar do baixo potencial energético, essas interações são essenciais ao reconhecimento molecular, uma vez que, somadas, as múltiplas interações contribuem significativamente para o resultado final (BARREIRO; FRAGA, 2015).

As interações hidrofóbicas ocorrem devido a presença de cadeias ou subunidades apolares no sítio de ligação ou no ligante. Elas são individualmente

fracas, aproximadamente 1 kcal/mol. Geralmente essas subunidades encontram-se solvatadas por moléculas de água. A aproximação entre as superfícies hidrofóbicas colapsa a estrutura de água, favorecendo a interação ligante-receptor à custa do ganho entrópico associado à desorganização do sistema (BARREIRO; FRAGA, 2015).

De todas as interações não covalentes, as ligações de hidrogênio são consideradas as mais importantes para os sistemas biológicos pois participam ativamente na manutenção do complexo ligante-receptor. Apesar de ocorrerem em menor número que as interações lipofílicas, elas são responsáveis pela estabilidade das conformações bioativas das α -hélices e folhas β , bem como das bases púricas e pirimídicas, sendo, portanto, essenciais à vida. Além disso, as propriedades da água, álcoois, ácidos orgânicos e aminas estão intimamente relacionadas com a formação dessas interações. A formação de ligações de hidrogênio é possível devido a presença do átomo de hidrogênio e de heteroátomos eletronegativos, como oxigênio, nitrogênio, flúor. Normalmente essas interações são consideradas estáveis quando a distância entre o átomo de hidrogênio e o átomo aceptor é menor que 2,0 angstroms (Å). A força dessas interações está relacionada com a natureza dos átomos envolvidos, ou seja, com a diferença de eletronegatividade. Algumas podem ser consideradas tão fortes quanto ligações covalentes, onde a energia varia entre 20 e 40 kcal/mol. As ligações de hidrogênio mais comuns possuem energia variando entre 5 e 15 kcal/mol. E existem ainda as ligações fracas, que variam de 1 a 5 kcal/mol. Considerando-se que interações mais fortes do que 10 kcal/mol dificilmente são rompidas em processos não enzimáticos, a força da ligação de hidrogênio é determinante para a formação do complexo fármaco-receptor, bem como para os efeitos gerados (BARREIRO; FRAGA, 2015).

O algoritmo de busca do *docking* pode adotar diferentes métodos de acordo com o grau de flexibilidade. Na primeira abordagem, o alvo molecular é considerado rígido e o ligante apresenta apenas graus de liberdade translacional e rotacional, na segunda o alvo molecular é rígido e o ligante apresenta todos os graus de liberdade (translacionais, rotacionais, vibracionais e conformacionais), e na última o alvo molecular é flexível ou parcialmente flexível e todos os graus de liberdade do ligante são considerados (DI; KERNS, 2008).

O *docking* de validação, denominado *redocking*, avalia a eficiência das funções de busca e pontuação. Para isso, o complexo cristalográfico é separado em proteína e ligante, e então ambos são submetidos ao *docking*. A eficácia da função de busca é avaliada pelo RMSD (do inglês *Root Mean Square Deviation*) do ligante cristalográfico, sendo consensual que a validação da metodologia exige valores de RMSD menores que 2 Å (PLEWCZYNSKI *et al.*, 2011). Considerando que o *docking* não precisa possuir exatidão maior que a resolução da estrutura cristalográfica, também é aceitável utilizar a resolução da estrutura como valor limite de RMSD (ONODERA; SATOU; HIROTA, 2007).

O *docking* molecular pode empregar métodos baseados na mecânica molecular ou na mecânica quântica. De forma resumida, a diferença resta na inclusão do movimento dos elétrons nos cálculos. A mecânica molecular assume as leis de Newton, onde os átomos são tratados como corpos sólidos, esféricos, dotados de carga, raio, massa e polarizabilidade definidas. Já a mecânica quântica é capaz de estabelecer as propriedades eletrônicas dos sistemas (LEACH, 2001).

A função de pontuação, responsável por prever a energia livre de ligação dos complexos, é dividida em três tipos: funções derivadas dos campos de força, empíricas e baseadas em conhecimento. A primeira utiliza potenciais derivados dos campos de força da mecânica molecular relacionados à entalpia e termos entrópicos relacionados à mobilidade conformacional. As funções empíricas são baseadas no somatório de termos entálpicos e entrópicos. Por fim, as funções baseadas em conhecimento reproduzem a energia livre de ligação como um potencial de forças calculadas a partir da frequência de contatos interatômicos (KITCHEN *et al.*, 2004). A eficiência da função de pontuação é avaliada comparando os valores de energia do ligante experimental com os valores apresentados pelo ligante cristalográfico, bem como através da correlação dos valores teóricos com dados experimentais. A melhor conformação é aquela que assume o valor de energia de interação mais favorável, ou seja, o valor mais negativo (GANI, 2007).

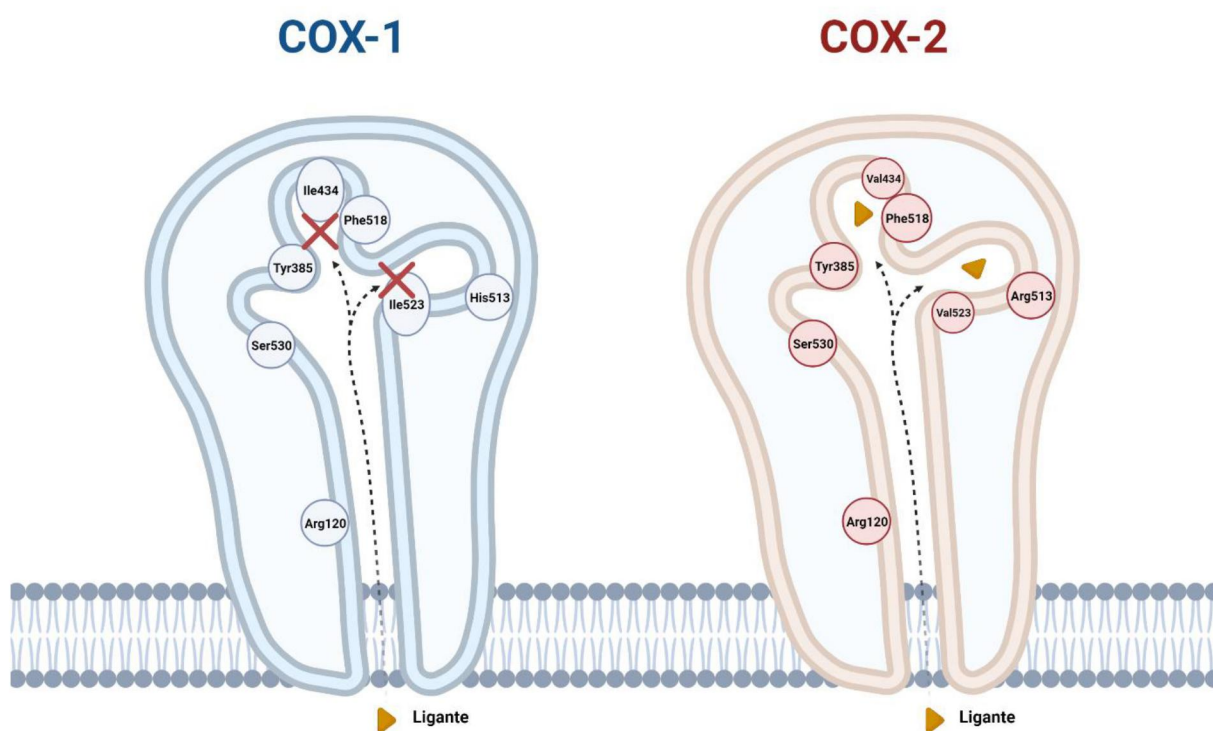
Diversas classes de compostos naturais demonstram potencial em promover efeitos anti-inflamatórios por inibição das isoformas da COX, entre elas, flavonoides (DASH *et al.*, 2015), sesquiterpenos (WUBE *et al.*, 2008), fenilpropanoides (HUSS *et al.*, 2002) e triterpenos (ZHANG, Yanjun *et al.*, 2004).

A literatura descreve três mecanismos principais de inibição da COX. O primeiro consiste em uma inibição irreversível através de ligação covalente, efetuada mediante acetilação do resíduo de Ser530 na COX-1, impedindo a interação de ácido araquidônico (AA) com o sítio. A segunda se trata de uma inibição reversível tempo-independente, efetuada por fármacos que competem com o AA pelo sítio ativo da COX em ambas isoformas. A última também ocorre por inibição reversível, no entanto, lenta e tempo-dependente, efetuada por inibidores não-seletivos ou por inibidores COX-2-seletivos. A inibição tempo-dependente normalmente acontece através de interações eletrostáticas ou por mudanças conformacionais na estrutura enzimática, permitindo que ocorram interações extras (HINZ; BRUNE, 2002; KURUMBAIL *et al.*, 1996; MARNETT, 2002).

O sítio ativo da COX consiste em um longo canal lipofílico. A constrição logo na entrada do canal é feita pelos resíduos de Tyr355, Arg120 e Glu524 presentes na superfície enzimática. Através de interações eletrostáticas, os resíduos de Arg120 e Glu524 mantém a hélice D fixa e a entrada do canal aberta. Porém, quando está presente um substrato/inibidor que contenha grupo ácido, ele pode interagir por ligações de hidrogênio com o resíduo de Arg120, o que facilita a quebra da interação Arg120-Glu524, relaxando a hélice e fechando a entrada do sítio, contribuindo para a interação entre grupo ácido e sítio ativo. No topo do canal, a aproximadamente 13 Å de Arg120, encontra-se o resíduo catalítico Tyr385, que é responsável pela conversão de AA em PGG₂. A sobreposição das estruturas tridimensionais (3D) de COX-1 e -2 indica que os resíduos que compõem o canal lipofílico, os sítios catalíticos e os resíduos adjacentes são idênticos, exceto por duas variações: Ile em COX-1 é substituída por Val na COX-2 nas posições 434 e 523 (VANE; BAKHLE; BOTTING, 1998). Tanto em COX-1 como COX-2 o canal lipofílico é envolto por resíduos de Ala527, Gly526, Leu384, Phe381, Phe513, Ser530 e Trp387, e ainda existe uma cavidade adjacente formada por Met113, Leu359, Leu531, Tyr355, Val116 e Val349. A principal diferença entre as isoformas é que em COX-2, os resíduos Leu352, Phe518, Ser353, Tyr355, Val434 e Val523 formam uma cavidade lipofílica maior e mais acessível quando comparado a COX-1. Por ser menos volumoso, o resíduo de Val523 permite o acesso do inibidor ao bolso lateral hidrofílico (Figura 7). Em COX-1 esse acesso é inviável, uma vez que a cadeia lateral da Ile é maior e gera impedimento estérico (SMITH, William L.; DEWITT; GARAVITO, 2000). Já na posição 434, a

substituição da Ile por Val contribui para a abertura do bolso lateral na COX-2, dado que a cadeia lateral de 434 e Phe518 constituem o portão de entrada desta cavidade. Essa variação está relacionada com a seletividade da isoforma, uma vez que o menor volume da valina permite melhor acomodação do ligante no canal e promove distanciamento do resíduo de Ser530, que é acetilável, proporcionando maior variação de substratos. Outra diferença entre as isoformas consiste na cavidade polar anexa, que é circundada por Gln192, His90 e pelo resíduo da posição 513, que na COX-1 é histidina e na COX-2 é arginina. A maior extensão do grupo guanidina, presente em Arg513, em comparação com anel imidazol, presente em His513, favorece a ocorrência de interações com grupos polares dos ligantes (GARAVITO; MULICHAK, 2003).

Figura 7. Diferenças estruturais na composição de AA das isoformas de COX.



Fonte: Elaborado pelo autor. Criado com BioRender.com.

O atual cenário, proporcionado pela bioinformática, permite delinear de forma mais clara e precisa diversos tipos de estudos, utilizando modelos *in silico* para

direcionar e/ou confirmar dados experimentais. As estruturas tridimensionais das isoformas da COX já foram notoriamente estabelecidas, bem como os sítios de interação com ligantes específicos. Esses fatores favorecem a utilização de técnicas de *docking* molecular a fim de desenvolver novos fármacos de alta afinidade e especificidade, e ainda, sem as limitações associadas aos efeitos colaterais dos AINES.

2.7 Considerações gerais sobre cumarinas

As cumarinas, também conhecidas como 1,2-benzopironas, possuem em seu esqueleto básico anéis benzeno e α -pirona fundidos, e compreendem uma importante classe de compostos fenólicos (BAROT *et al.*, 2015). São encontradas em fungos, bactérias e várias espécies de plantas, particularmente em plantas comestíveis e medicinais de diferentes famílias botânicas (DETSI; KONTOGIORGIS; HADJIPAVLOU-LITINA, 2017). São compostos heterocíclicos, e podem estar presentes na natureza como heterosídeos ou na forma livre. As cumarinas são metabólitos secundários de plantas, e ocorrem em diferentes partes, como raízes, sementes, nozes, flores e frutos (ANNUNZIATA *et al.*, 2020). Sua biossíntese acontece pela via do ácido chiquímico, via ácido cinâmico, através do metabolismo da fenilalanina (GARG *et al.*, 2020). Plantas com hábitos muito diversificados são capazes de promover sua biossíntese, como árvores, arbustos e ervas. Aproximadamente 3.560 derivados cumarínicos já foram isolados e identificados (JIA, 2003).

O termo cumarina originou-se de “cumaru”, que é o nome popular para a planta nativa do Brasil *Dipteryx odorata*, da família Fabaceae (PEREIRA, Thiago Moreira *et al.*, 2018). *Dipteryx odorata* é uma planta endêmica da América Central e do Norte da América do Sul, amplamente difundida na região da Floresta Amazônica, da qual a cumarina foi isolada pela primeira vez por Vogel em 1820 (LONČARIĆ *et al.*, 2020). Suas sementes, batizadas de fava tonka ou fava de cumaru, são uma fonte natural de cumarina, composto amplamente explorado por setores industriais, sendo utilizado por empresas de fragrâncias, principalmente como fixador e potencializador em perfumes, além de ser adicionado a sabonetes, detergentes, cremes dentais, corantes, tabaco e produtos alcoólicos (BAROT *et al.*, 2015; DETSI;

KONTOGIORGIS; HADJIPAVLOU-LITINA, 2017; GARG *et al.*, 2020). Sua importância também é clara na indústria alimentícia, onde suas atividades fungicidas e antioxidantes são exploradas (CARNEIRO *et al.*, 2021). Compostos à base de cumarina também têm sido utilizados nas áreas biomédica, farmacêutica, química, na pesquisa e diagnóstico, como insumos farmacêuticos ativos, pesticidas, grupos protetores fotocliváveis, sondas biológicas fluorescentes, sondas de monitoramento de atividade enzimática, na tecnologia a laser, na catálise fotorredutora orgânica e na imagem celular (ANNUNZIATA *et al.*, 2020; DETSI; KONTOGIORGIS; HADJIPAVLOU-LITINA, 2017). Apesar de todas essas aplicações, as cumarinas se destacam por suas propriedades luminescentes. A luminescência de alguns derivados resulta das propriedades intrínsecas de transferência de carga entre sistemas π - π conjugados, ricos em elétrons (MUKHTAR *et al.*, 2022; PEREIRA, Thiago Moreira *et al.*, 2018).

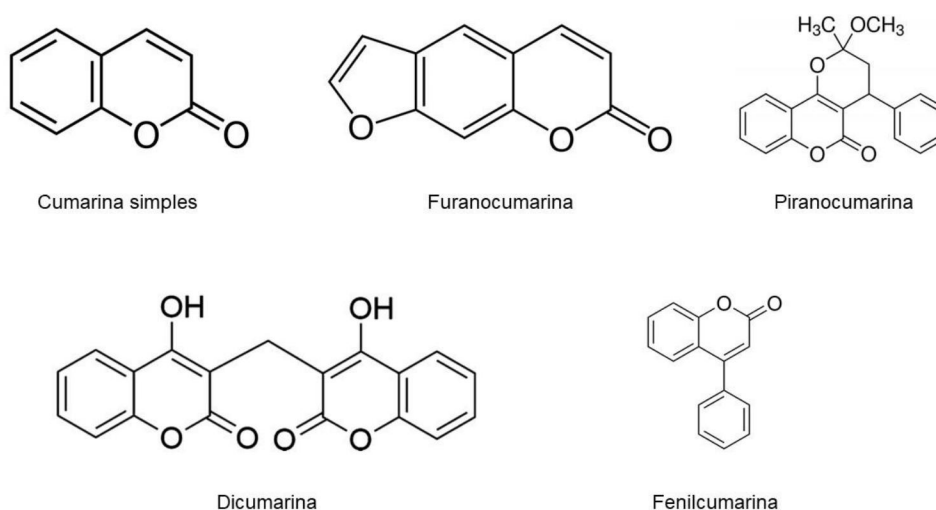
A cumarina é um sólido cristalino incolor com cheiro doce, semelhante ao da baunilha. Apesar do aroma adocicado, ela possui sabor desagradável, sendo o motivo de ser evitada por animais. As plantas que sintetizam cumarinas são naturalmente preservadas, pois esse composto serve como proteção contra predadores (DETSI; KONTOGIORGIS; HADJIPAVLOU-LITINA, 2017; MUKHTAR *et al.*, 2022). Além disso, elas também oferecem benefícios a fisiologia vegetal, atuando como antioxidantes e inibidores enzimáticos. Esta classe de substâncias está envolvida no controle do crescimento das plantas, respiração, fotossíntese e defesa contra infecções (BAROT *et al.*, 2015; PEREIRA, Thiago Moreira *et al.*, 2018).

As cumarinas estão amplamente distribuídas em diferentes famílias de plantas, como Fabaceae, Rutaceae, Apiaceae, Asteraceae, Leguminosae e Thymelaeaceae (XIA *et al.*, 2022). Isso explica o grande interesse nas técnicas de extração e caracterização de cumarinas naturais e na síntese de seus derivados. Além disso, a simplicidade de sua estrutura química é muito atrativa, assim como a reatividade dos anéis benzeno e pirona. As ligações duplas conjugadas são responsáveis por gerar um ambiente eletrônico importante para os efeitos dessa classe de compostos (ANNUNZIATA *et al.*, 2020; STEFANACHI *et al.*, 2018).

As cumarinas naturais são subdivididas em diferentes classes, com base em sua diversidade química e complexidade. Elas podem ser classificadas como cumarinas simples, isocumarinas, furanocumarinas, piranocumarinas (angulares e

lineares), biscumarinas e outras cumarinas, como fenilcumarinas (Figura 8) (BAROT *et al.*, 2015; DETSI; KONTOGIORGIS; HADJIPAVLOU-LITINA, 2017). As cumarinas simples são compostas por moléculas com padrões de substituição hidroxila, alcoxila e alquila em sua estrutura básica. A classe das cumarinas simples representa a principal classe de derivados cumarínicos com propriedades anti-inflamatórias (DI STASI, 2021; NASIR *et al.*, 2022). Ela serve como modelo primordial para o design e síntese de derivados farmacologicamente ativos, cujas inserções geralmente favorecem a capacidade de sequestro de radicais livres em diferentes modelos experimentais (CARNEIRO *et al.*, 2021; LONČARIĆ *et al.*, 2020).

Figura 8. Estrutura química de diferentes classes de cumarinas.



Fonte: Elaborado pelo autor.

O núcleo O-heterocíclico das cumarinas é altamente significativo, conferindo a esses compostos naturais perspectivas terapêuticas promissoras. Entre suas características principais, podemos destacar baixo peso molecular, estrutura simples, alta biodisponibilidade, alta solubilidade na maioria dos solventes orgânicos e baixa toxicidade, que, juntamente com suas atividades biológicas multifacetadas, garantem-lhes um papel de destaque na pesquisa e desenvolvimento de medicamentos (ANNUNZIATA *et al.*, 2020; CARNEIRO *et al.*, 2021).

Devido a eficácia do grupo farmacofórico das cumarinas, o isolamento, caracterização estrutural, e estudos de atividades biológicas vêm sendo cada vez mais frequentes. A maioria das cumarinas extraídas tem atividade biológica e, portanto, a síntese de derivados tem se tornado uma alternativa interessante, uma vez que o processo de extração é demorado (LONČARIĆ *et al.*, 2020). A síntese de cumarinas possibilita obter compostos conhecidos em maior escala, bem como novos derivados com finalidades biológicas e industriais. A síntese de cumarinas começou em meados do século XIX com a descoberta da condensação entre salicilaldeído e anidrido acético por Perkin (PEREIRA, Thiago Moreira *et al.*, 2018). Muitos métodos têm sido empregados para sua síntese, mas cada um possui diferentes materiais de partida e condições de reação.

Múltiplas abordagens sintéticas foram descritas, com diferentes compostos de partida, como aldeídos, fenóis, cetonas e ácidos carboxílicos. Há também uma grande diversidade de técnicas, solventes e catalisadores, visando aprimorar o rendimento das reações (ANNUNZIATA *et al.*, 2020; PEREIRA, Thiago Moreira *et al.*, 2018). Os métodos mais utilizados para a síntese de derivados cumarínicos abrangem a reação de Perkin, a condensação de Knoevenagel, a condensação de Pechmann, a reação de Wittig, a reação de Baylis-Hillman, o rearranjo de Claisen e a reação de acoplamento cruzado de Vilsmeier-Haack e Suzuki (LONČARIĆ *et al.*, 2020; PEREIRA, Thiago Moreira *et al.*, 2018).

Atividades biológicas e aplicações terapêuticas das cumarinas dependem da estrutura química central e dos padrões de substituição no anel aromático. As substituições podem ser possíveis em qualquer um dos seis sítios disponíveis de seu núcleo básico, e a diversidade estrutural leva a múltiplas atividades farmacológicas. A estrutura química peculiar e das propriedades físico-químicas de seu anel o-heterocíclico permite fácil ligação a muitos alvos proteicos (ANNUNZIATA *et al.*, 2020; CARNEIRO *et al.*, 2021). A característica planar, aromática e lipofílica permite a interação com diversos alvos biológicos, principalmente sítios de ligação lipofílicos, estabelecendo interações hidrofóbicas fortes e, mais frequentemente, interações π - π com aminoácidos aromáticos, como fenilalanina (Phe), tirosina (Tyr) e triptofano (Trp) (STEFANACHI *et al.*, 2018; XIA *et al.*, 2022). Aminoácidos carregados positivamente podem se ligar a cumarinas por meio de fortes interações cátion- π (ANNUNZIATA *et al.*, 2020; STEFANACHI *et al.*, 2018). Além disso, o grupo lactona da cumarina confere

à molécula a capacidade de fazer fortes ligações polares, como ligações de hidrogênio e interações dipolo-dipolo. Outro aspecto importante é que enzimas com atividade esterase são capazes de abrir o anel lactona, e os metabólitos resultantes dessa hidrólise podem ser ativos. Neste caso, as cumarinas atuam como pró-fármacos (STEFANACHI *et al.*, 2018). Qualquer que seja o mecanismo de ação das cumarinas, a força de sua ligação ao alvo é aumentada por interações adicionais envolvendo os substituintes presentes no núcleo cumarínico. O tipo de substituinte e o padrão de substituição determinam, além da potência e energia global de ligação, as interações seletivas com alvos específicos (GARG *et al.*, 2020).

As cumarinas exibem vários efeitos farmacológicos, incluindo anticoagulante, antimicrobiano, anti-inflamatório, anti-HIV, neuroprotetor, antidiabético, anticonvulsivante, anticancerígena, entre outros. Algumas cumarinas também demonstram capacidade de inibir a acetilcolinesterase (AChE) e a monoaminaoxidase (MAO) (BAROT *et al.*, 2015; DETSI; KONTOGIORGIS; HADJIPAVLOU-LITINA, 2017; GARG *et al.*, 2020). O potencial antioxidante de cumarinas naturais e sintéticas em sistemas biológicos tem sido demonstrado nos últimos anos (HASSANEIN *et al.*, 2020). Elas podem influenciar processos inflamatórios mediados por radicais livres, e consequentemente reduzir edema e inflamação tecidual (DI STASI, 2021; NASIR *et al.*, 2022).

Estudos de docking molecular revelam que a estrutura básica da cumarina permite que ocorram diversos tipos de interações intermoleculares. Seus efeitos biológicos estão associados à sua capacidade de exercer interações π - π , hidrofóbicas, eletrostáticas, ligações de hidrogênio, coordenação de metais e interações não covalentes de Van der Waals com os vários sítios ativos no organismo e, por conta disso, exibem um perfil *multitarget* (CARNEIRO *et al.*, 2021; REN, Qing-Cheng *et al.*, 2018; XIA *et al.*, 2022). Em geral, pode-se estabelecer que esta família de compostos segue a regra dos cinco de Lipinski e exibem boa permeabilidade em membranas celulares, sendo essa uma característica essencial na maioria dos fármacos (CARNEIRO *et al.*, 2021).

O núcleo cumarínico tem sido uma fonte de inspiração para o design de novas moléculas funcionais no campo medicinal, servindo como excelente ponto de partida. Muitos análogos estão sendo desenvolvidos no campo experimental como candidatos a medicamentos de maior potência, menor toxicidade e efeitos colaterais,

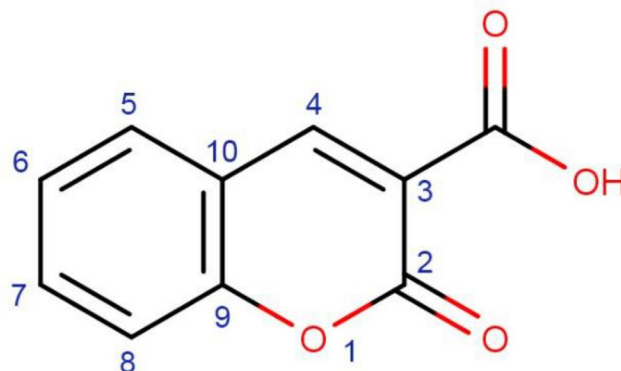
maior biodisponibilidade e maior espectro de ação (PEREIRA, Thiago Moreira *et al.*, 2018). Atualmente alguns medicamentos contendo o núcleo cumarínico podem ser encontrados comercialmente e são amplamente difundidos na clínica, como por exemplo, Armillarisin (antibiótico), Novobiocina (antibiótico), Varfarina (anticoagulante), Fenprocumon (anticoagulante), Himecromone (colerético e antiespasmódico) (XIA *et al.*, 2022).

Apesar dos inúmeros benefícios, a quantidade de medicamentos derivados da cumarina ainda é baixa, sendo necessário mais esforços para a obtenção de compostos com propriedades farmacocinéticas apreciáveis, juntamente com alta eficácia e baixo perfil de toxicidade. Outro fator limitante é que ainda há pouca informação sobre os mecanismos celulares de ação dos derivados cumarínicos, sendo um campo que permanece obscuro. Vários possíveis mecanismos foram propostos para determinadas cumarinas, os quais não foram investigados em profundidade (GARG *et al.*, 2020). Assim, existe a necessidade de determinar o exato mecanismo responsável por seus efeitos.

2.8 Ácido 3-cumarino-carboxílico

O ácido 3-cumarino-carboxílico (C-3-COOH) foi descrito pela primeira vez por Stuart (1886), que o sintetizou a partir de salicilaldeído e ácido malônico em ácido acético glacial (DOBSON; GERKIN, 1996). Esta molécula apresenta em sua estrutura o núcleo básico das cumarinas, sendo, portanto, classificada como um análogo sintético da classe das cumarinas simples (Figura 9).

Figura 9. Ácido 3-cumarino-carboxílico



Fonte: Elaborado pelo autor.

Comparado com outros derivados cumarínicos, o ácido 3-cumarino carboxílico (A3CC) possui algumas aplicações importantes. Por exemplo, na química ele tem sido empregado para a determinação do radical hidroxila no caso de radiólise gama (γ) e fotocátalise (MANEVICH; HELD; BIAGLOW, 1997; NÁFRÁDI *et al.*, 2020), também exibe propriedades de luminescência, sendo aplicado como sonda fluorescente (PERONI *et al.*, 2002; YAN *et al.*, 2012), e é utilizado como sensibilizador de oxigênio tripleto (SPECHT; MARTIC; FARID, 1982).

A literatura relata que o A3CC é capaz de gerar compostos de coordenação com vários metais, principalmente os que compõem a série dos lantanídeos, e seus complexos exibem atividade antiproliferativa (KOSTOVA; MOMEKOV; STANCHEVA, 2007). Shahbaz *et al.* (2022) avaliaram que o cocrystal A3CC e tiouréia (A3CC:TH) exibiu potente atividade de eliminação de radicais 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), com concentração inibitória média (IC_{50}) de $127,9 \pm 5,9 \mu M$, em comparação com uma IC_{50} de $111,6 \pm 2,4 \mu M$ da N-acetil-L-cisteína.

A viabilidade celular *in vitro* do A3CC, e de seu cocrystal A3CC:TH (1:1) também foi avaliada através do ensaio com brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT), utilizando uma linhagem celular de fibroblasto e a cicloheximida como padrão. Os resultados demonstraram que ambos compostos possuem natureza não citotóxica (SHAHBAZ *et al.*, 2022).

Outro exemplo de cocristalização bem sucedida do A3CC ocorreu com a sertralina, onde é relatado um aprimoramento no efeito antidepressivo e na biodisponibilidade da sertralina (ESCUDERO *et al.*, 2016).

O A3CC também já demonstrou possuir significativa atividade antileishmania, com uma IC_{50} de $27,2 \pm 0,8 \mu\text{g mL}^{-1}$ em comparação com valores de $3,1 \pm 0,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $15,5 \pm 0,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ da anfotericina B e miltefosina, respectivamente (SHAHBAZ *et al.*, 2022). Outros estudos evidenciaram que a reação do A3CC com alquildiaminas gerou análogos capazes de exibir atividades antibacterianas (LIN *et al.*, 2012).

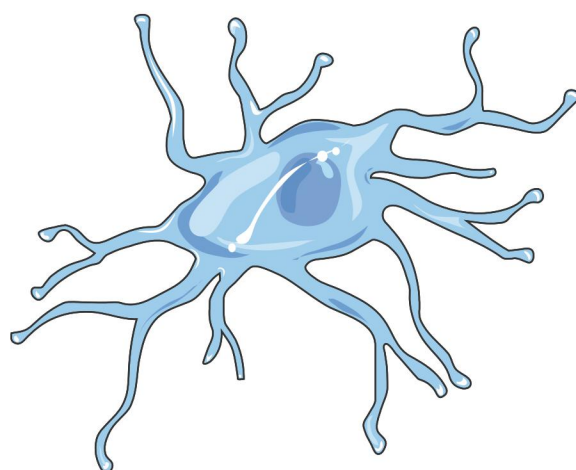
A farmacoterapia padrão-ouro para o manejo da dor envolve o uso de AINES e opioides, introduzidos décadas atrás. Apesar dos inúmeros esforços na área, poucos medicamentos com novos mecanismos de ação foram levados para a clínica. Entre os fármacos utilizados atualmente, ainda existem limitações em vários aspectos, muitos são caros, disponíveis apenas por via parenteral, seus efeitos colaterais de longo prazo geralmente limitam sua utilização e não reduzem efetivamente a dor (BOTZ; BÖLCSKEI; HELYES, 2017).

A dor e inflamação persistentes e de diferentes origens representam um problema multifacetado, gerando impactos nas áreas médica, social e econômica, e sua farmacoterapia ainda é limitada. Portanto, há uma urgente necessidade em desenvolver agentes anti-inflamatórios e analgésicos.

As contribuições de Shahbaz e colaboradores (2022) revelam que o A3CC é um potencial candidato para a síntese de cocristais com outras moléculas, bioativas ou não, a fim de explorar suas propriedades ou aprimorar suas aplicações biológicas. Os dados da literatura também demonstram que o A3CC possui um excelente arcabouço para modificações estruturais, que por vezes, promovem melhorias em sua atividade biológica.

Apesar do A3CC ser um composto disponível comercialmente, o que o torna de relativamente fácil acesso, bem como compartilhar características estruturais com outras cumarinas que apresentam diversos efeitos biológicos interessantes, as atividades desta molécula ainda não foram amplamente exploradas, dando margem para o desenvolvimento de novas pesquisas. O presente estudo se propõe a

investigar pela primeira vez os efeitos antinociceptivo e anti-inflamatório do A3CC, frente a modelos experimentais de dor e inflamação.



OBJETIVOS

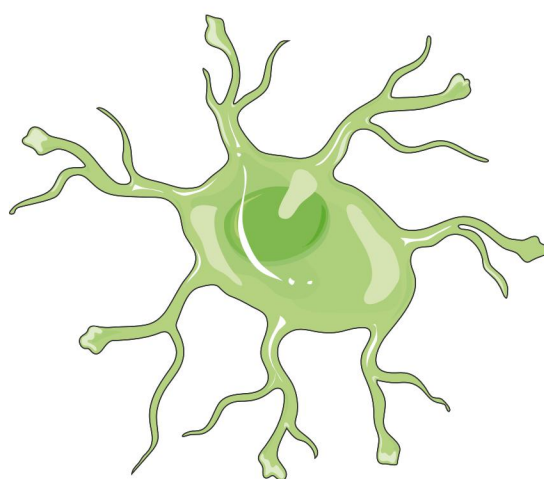
3. OBJETIVO

3.1 Objetivo geral

- Avaliar o efeito antinociceptivo e anti-inflamatório do ácido 3-cumarino carboxílico utilizando metodologias *in silico*, *in vitro* e *in vivo*.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar o espectro geral de atividades farmacológicas do ácido 3-cumarino carboxílico utilizando o *software* PASS;
- Predizer teoricamente o perfil de biodisponibilidade oral e *druglikeness* do ácido 3-cumarino carboxílico utilizando o *software* Molinspiration;
- Analisar a penetração do ácido 3-cumarino carboxílico pela barreira hematoencefálica (BHE) utilizando o modelo de permeabilidade utilizando o *software* Volsurf+;
- Detectar o de fator de risco de toxicidade utilizando o *software* OSIRIS DataWarrior;
- Predizer possíveis metabólitos gerados pelo ácido 3-cumarino carboxílico através do *software* MetaSite 6;
- Verificar a atividade hemolítica e anti-hemolítica do ácido 3-cumarino carboxílico em eritrócitos humanos dos tipos sanguíneos A, B e O;
- Investigar o efeito antinociceptivo do ácido 3-cumarino carboxílico através do modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético;
- Analisar a ação antinociceptiva do ácido 3-cumarino carboxílico nos modelos de glutamato orofacial e formalina orofacial;
- Investigar a participação do sistema opioidérgico e canais de potássio sensíveis a trifosfato de adenosina (K^+_{ATP}) na possível antinocicepção promovida pelo ácido 3-cumarino carboxílico no modelo de formalina orofacial;
- Analisar a possível atividade anti-inflamatório do ácido 3-cumarino carboxílico no modelo de edema de pata induzida por carragenina;
- Realizar o estudo de docking molecular do ácido 3-cumarino carboxílico com as isoformas 1 e 2 da enzima cicloxigenase.



MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL

4.1 Colaborações

O estudo foi conduzido em parceria com o laboratório de Farmacologia da Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF), o laboratório de Análises Clínicas da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG) e o laboratório de Químioinformática da Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

4.2 Substâncias

O ácido 3-cumarino carboxílico, dexametasona, ácido acético, formalina, glutamato, MK-801, naloxona, glibenclamida e carragenina foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, EUA), e o cloridrato de morfina foi adquirido da Vetec (Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Brasil). O cloreto de sódio (NaCl) e Triton X-100 foram fornecidos pela UFCG. Todas as drogas foram diluídas em água destilada, exceto o ácido 3-cumarino carboxílico, que foi diluído em Tween 80 (1%) e água destilada.

4.3 Animais

Nos experimentos *in vivo*, foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) linhagem Swiss, machos com aproximadamente 3 meses de vida, pesando entre 25-35 g, provenientes do biotério setorial da Universidade Federal do Vale do São Francisco. Os animais foram mantidos no biotério, em gaiolas de polietileno, os quais permaneceram sob condições controladas de temperatura ($21 \pm 1^\circ \text{C}$), ciclo claro/escuro de 12 horas cada, com livre acesso a uma ração tipo *pellets* (Purina®) e água disponível em garrafas de polietileno.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), da UNIVASF sob os certificados nº 0001/250221 e 0005/281119. O tratamento e utilização dos animais foram conduzidos de acordo com o Guia para Cuidado e Uso de animais de Laboratório publicado pelo *National Institutes of Health* (NIH publication, n. 85-23, revisado em 1985) e consonantes com os princípios éticos na

experimentação animal adotado pela comissão. Todos os cuidados no sentido de minimizar o sofrimento causado aos animais nos experimentos foram tomados.

4.4 Condições experimentais

Os testes *in vivo* foram realizados de forma colaborativa, no Laboratório de Farmacologia da UNIVASF. No dia anterior ao experimento, os animais foram separados em grupos de no máximo 4 animais por gaiola. Os animais foram pesados e transferidos para o local de realização dos testes, a fim de permitir sua familiarização com o ambiente e minimizar o estresse provocado pela exposição a um novo espaço.

As bancadas metálicas e os aparelhos utilizados foram higienizadas com álcool 70%, entretanto, durante os testes, foi utilizado etanol com baixa graduação (10%), na tentativa de diminuir possíveis odores que possam interferir no comportamento dos animais.

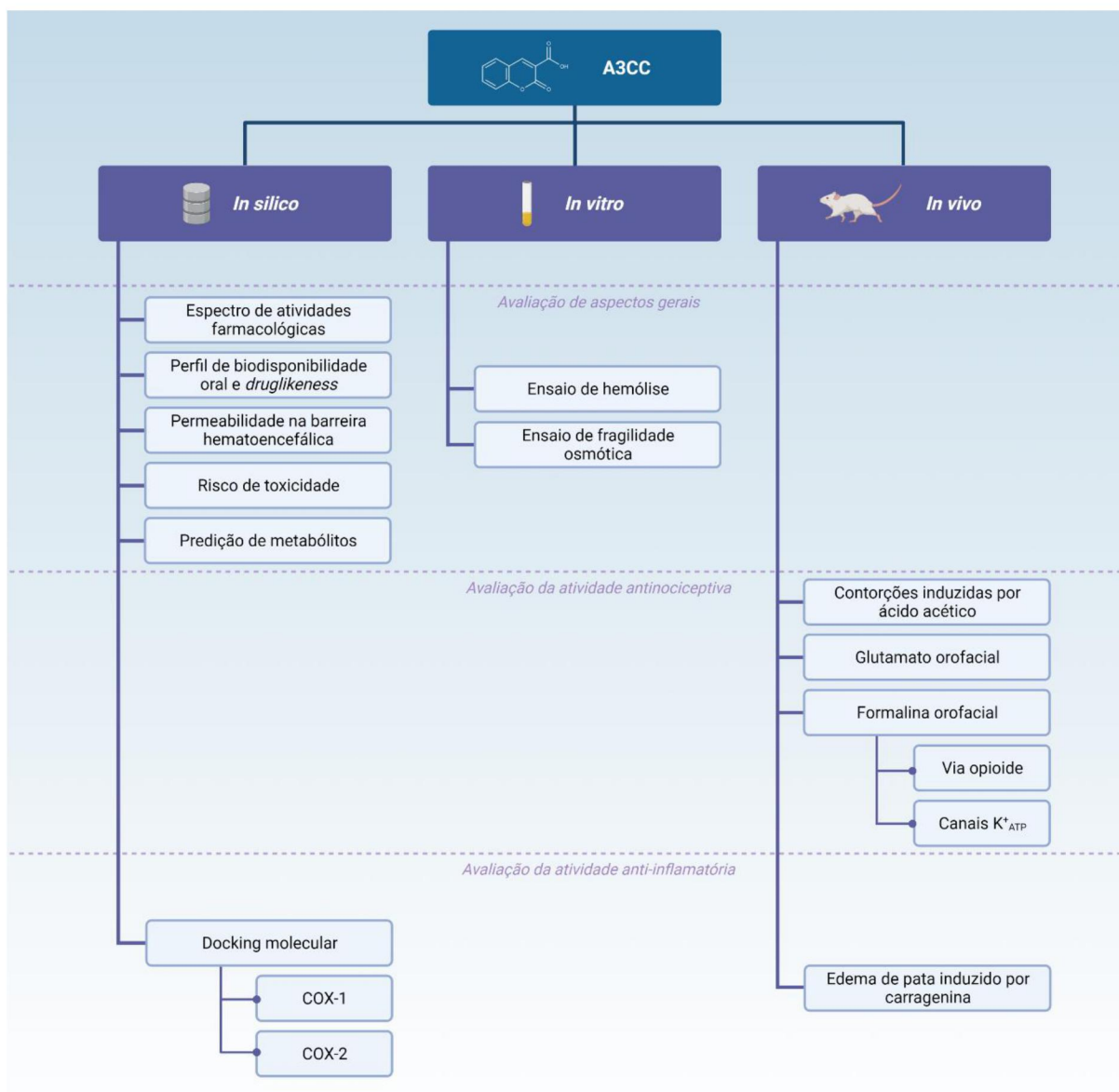
4.5 Eritrócitos humanos

Os eritrócitos humanos referentes aos tipos sanguíneos A, B e O foram oriundos de doadores voluntários saudáveis. Estes foram obtidos do Laboratório de Análises Clínicas - LABVITA, do Centro de Saúde e Tecnologia Rural da Universidade Federal de Campina Grande, campus Patos-PB. A manipulação e o descarte dos eritrócitos foram realizados de acordo com as Normas de Segurança seguidas pela referida unidade. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa (CEP) do Centro de Ciência da Saúde (CCS), da UFPB sob o parecer nº 5.382.413.

5. MÉTODOS

As metodologias que foram utilizadas para investigar as atividades antinociceptiva e anti-inflamatória do ácido 3-cumarino carboxílico estão representadas na figura 10.

Figura 10. Resumo esquemático das metodologias realizadas.



Fonte: Elaborado pelo autor. Criado com BioRender.com.

5.1 Avaliação do espectro de atividades farmacológicas do ácido 3-cumarino carboxílico

Para previsão do espectro de atividade e análise das propriedades farmacológicas do ácido 3-cumarino carboxílico será utilizado o *software* PASS online (<http://www.pharmaexpert.ru/passonline/>), com o objetivo de avaliar o potencial biológico geral de uma molécula orgânica quando em contato com o organismo humano, sendo possível fornecer previsões simultâneas de muitos tipos de atividades

biológicas com base na estrutura dos compostos orgânicos, que refletem os resultados de interação do composto com várias entidades biológicas. Os parâmetros da ação biológica do composto foram interpretados conforme a classificação: Pa (probabilidade de ser ativo) e Pi (probabilidade de ser inativo), estimando a categorização de um composto potencial em ser pertencente à subclasse de compostos ativos ou inativos, respectivamente (SRINIVAS *et al.*, 2014)

5.2 Avaliação do perfil de biodisponibilidade oral e *druglikeness* do ácido 3-cumarino carboxílico

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 regra dos 5 traça um perfil para moléculas dentro de limites de massa molar, lipofilia (representada pelo log P), e hidrofilia (representada pelo número de doadores e aceptores de ligação de hidrogênio). Ela estabelece alguns parâmetros estruturais relevantes para a predição teórica do perfil de biodisponibilidade oral. Esta biodisponibilidade está associada à absorção e à permeabilidade das moléculas e estabelece que para ser um bom fármaco deve atender a 4 parâmetros múltiplos de 5: (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) LogP_{o/w} menor ou igual a 5. Moléculas que violam mais do que uma destas regras podem ter problemas com a biodisponibilidade (LIPINSKI, Christopher A. *et al.*, 2012).

Druglikeness pode ser definida como um equilíbrio de várias propriedades moleculares e características estruturais que determinam se uma molécula é semelhante a outras. Essas propriedades, principalmente hidrofobicidade, distribuição eletrônica, características de ligação de hidrogênio, tamanho e flexibilidade da molécula e a presença de características farmacofóricas influenciam o comportamento da molécula em um organismo vivo, incluindo biodisponibilidade, propriedades de transporte, afinidade com proteínas, reatividade, toxicidade, metabolismo e estabilidade. O método utiliza estatísticas Bayesianas para comparar estruturas de ligantes ativos com estruturas de moléculas inativas e identificar características que

determinam as propriedades de ligação ao alvo específico. O sistema de cálculo de pontuações de atividade para ligantes de GPCR, inibidores de quinase, moduladores de canais iônicos, ligantes de receptores nucleares, inibidores de protease e outros alvos enzimáticos faz a comparação com cerca de 100.000 moléculas. A pontuação de semelhança permite a separação eficiente de moléculas ativas e inativas. Quanto maior o valor da pontuação, maior a probabilidade de que a molécula seja ativa.

5.3 Avaliação da permeabilidade do ácido 3-cumarino carboxílico na barreira hematoencefálica

Para a predição da permeabilidade da barreira hematoencefálica foi realizado o cálculo do descritor Log BB contido no programa Volsurf+ v.1.0.7 para o ácido 3-cumarino carboxílico. Para obtenção de tal finalidade, foi realizada a importação das estruturas dos compostos em 3D salvas no formato *Spatial Data File* (SDF) (CRIVORI *et al.*, 2000; CRUCIANI, Gabriele; PASTOR; GUBA, 2000)

5.4 Avaliação do fator de risco de toxicidade do ácido 3-cumarino carboxílico

Para a predição dos riscos de citotoxicidade foi usado o programa OSIRIS DataWarrior 5.0 (<http://www.openmolecules.org/datawarrior/download.html>) (SANDER *et al.*, 2015), que analisa os possíveis riscos com base na similaridade com estruturas comprovadamente mutagênicas (MUT), efeito tóxico no sistema reprodutor (ESR) e irritabilidade de tecido (IRR). O cálculo prosseguiu com a inserção do ácido 3-cumarino carboxílico, salvo em estrutura 3D no formato SDF.

5.5 Avaliação dos possíveis metabólitos gerados a partir do ácido 3-cumarino carboxílico

Para realizar um estudo metabólico através de métodos computacionais, nesta pesquisa, foi utilizado o *software* MetaSite 6.0 da Molecular Discovery, este prediz as possíveis transformações sofridas por um conjunto de moléculas em um ou

mais citocromos em alguns regiões específicas do corpo como pele, cérebro, fígado e outros (CRUCIANI, Gabriele *et al.*, 2005).

Os cálculos das análises no MetaSite seguem algumas etapas (VIANA, 2019). Primeiramente, o ácido 3-cumarino carboxílico foi importado como dado de entrada no programa MetaSite. Os locais de metabolismo foram calculados para as isoformas do fígado (*Liver*) disponível no programa, enfatizando nas isoformas do Citocromo P450 (CYP) 2D6, 3A4 e 2C9. Em seguida, calculou-se o Sítio de Predição Metabólica (SoM, do inglês *Site of Metabolism*) para as isoformas CYP2D6 e CYP3A4 por meio do *Hot-spots prediction*. O histograma relata os átomos no composto classificado do local mais provável do metabolismo para o menos provável. Os resultados de previsão do SoM são relatados na representação gráfica bidimensional (2D) como um conjunto de pontos coloridos marcando as posições dos grupamentos químicos mais influentes. Os átomos do composto são codificados por cores do local mais provável do metabolismo (vermelho forte) para o local menos provável (vermelho fraco). A região de maior percentual de metabolização é marcada na cor azul. Após o cálculo dos SoM's, realizou-se a contribuição estrutural em *Run 32D analysis*, observando os campos de interação molecular associados ao composto com a CYP, mostrando os átomos que mais contribuem para orientar o local do metabolismo em direção ao grupo heme. A última etapa correspondeu a obtenção da predição dos metabólitos gerados e avaliação da sua abundância e risco de toxicidade.

5.6 Avaliação da atividade hemolítica do ácido 3-cumarino carboxílico em eritrócitos humanos

Para o ensaio, foram utilizadas soluções contendo o ácido 3-cumarino carboxílico em diferentes concentrações (50, 100, 500 e 1000 µg/mL). Amostras de sangue humano A, B e O foram misturadas com NaCl 0,9 % na proporção de 1:30 e centrifugadas a 2500 rpm durante 5 minutos para obtenção dos eritrócitos. Este procedimento foi repetido por mais duas vezes e, o sedimento da última centrifugação ressuspenso em NaCl 0,9% para obter uma suspensão a 0,5% livre de componentes da série branca e plaquetas. Foi adicionado o ácido 3-cumarino carboxílico a 2 mL da suspensão de hemácias nas diferentes concentrações (50, 100, 500 e 1000 µg/mL). Foi realizado o controle negativo (suspensão de eritrócitos sem adição dos produtos -

0 % de hemólise) e o controle positivo (suspensão de eritrócitos acrescida de Triton X-100 a 1% - 100 % de hemólise). Após isso, as amostras foram incubadas por 1 hora à 22 ± 2 °C sob agitação lenta e constante. Decorrido este tempo as amostras foram centrifugadas a 2500 rpm durante 5 minutos e a hemólise quantificada por espectrofotometria em comprimento de onda de 540 nm (RANGEL et al., 1997). Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

5.7 Avaliação da atividade anti-hemolítica do ácido 3-cumarino carboxílico em eritrócitos humanos

Para o ensaio, foram utilizadas soluções contendo o ácido 3-cumarino carboxílico em diferentes concentrações (50, 100, 500 e 1000 µg/mL). A avaliação da fragilidade osmótica dos eritrócitos humanos foi realizada com uma suspensão de eritrócitos a 0,5%. As soluções contendo concentrações diferentes (50, 100, 500 e 1000 µg/mL) do ácido 3-cumarino carboxílico, foram incubadas em tubos contendo 2 mL de uma suspensão de eritrócitos por 1h a 22 ± 2 °C. Decorrido este tempo, as preparações são centrifugadas a 2500 rpm por 5 minutos e o sobrenadante foi descartado.

Os eritrócitos foram ressuspensos em solução hipotônica de cloreto de sódio 0,24% e agitadas a 100 rpm, por uma hora a 22 ± 2 °C. Após este período, as amostras são centrifugadas a 2500 rpm por 5 minutos e a hemólise deve ser quantificada por espectrofotometria em comprimento de onda de 540 nm (DACIE; LEWIS, 2001). Foi realizado o controle negativo (suspensão de eritrócitos sem adição dos produtos - 0 % de hemólise) e o controle positivo (suspensão de eritrócitos acrescida da solução hipotônica - 100 % de hemólise). Os testes foram realizados em triplicata.

5.8 Avaliação do ácido 3-cumarino carboxílico no teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético

Os camundongos foram divididos em cinco grupos (n = 6) e pré-tratados com veículo, ácido 3-cumarino carboxílico (25, 50 e 75 mg/kg, i.p.) ou morfina (10 mg/kg, i.p.). Após trinta minutos dos tratamentos iniciais, foi administrada uma solução

de ácido acético 1% na cavidade peritoneal que provocou uma contorção abdominal caracterizada pela extensão dos membros posteriores e contração da musculatura abdominal (CHEN, Lihong; YANG; GROSSER, 2013). Cada animal foi colocado em uma caixa de observação individual e o número de contorções abdominais foi registrado por dez minutos após administração do estímulo nociceptivo. O efeito nociceptivo foi exibido pela porcentagem de inibição em relação ao número de contorções do grupo controle.

5.9 Avaliação do ácido 3-cumarino carboxílico no teste do glutamato orofacial

O protocolo de nocicepção orofacial foi realizado em camundongos por administração perinatal (p.n.) no lábio superior direito (QUINTANS-JÚNIOR *et al.*, 2010). Os grupos de camundongos (n = 6) foram pré-tratados com veículo, ácido 3-cumarino carboxílico (25, 50, e 75 mg/kg, i.p.) ou com o antagonista não competitivo do receptor N-metil-D-aspartato (NMDA) MK-801 (0,15 mg/kg, i.p.). Após trinta minutos das administrações, os animais receberam uma injeção perinatal de 20 µL de uma solução de glutamato (30 µM) no lábio superior direito e, logo em seguida, foram colocados individualmente em um aparato triangular espelhado, permitindo a visualização do animal, para que fosse cronometrado o tempo que o animal passava “esfregando” o local do estímulo (*face rubbing*). O tempo executando o comportamento de *face rubbing* foi registrado por 15 minutos após a injeção do glutamato.

5.10 Avaliação do ácido 3-cumarino carboxílico no teste da formalina orofacial

Como forma de discriminar se a possível ação do ácido 3-cumarino carboxílico decorre de um efeito antinociceptivo central ou periférico, foi utilizado o teste da formalina orofacial. O protocolo de nocicepção orofacial foi realizado em camundongos por administração p.n. de 20 µL de formalina a 2% (LUCCARINI *et al.*, 2006) no lábio superior direito (área perinatal) dos animais. Após a injeção do estímulo doloroso, os camundongos foram colocados em um aparato triangular composto por

duas paredes espelhadas e uma de vidro transparente, permitindo a visualização do animal, para que seja cronometrado o tempo de *face rubbing* em duas fases (SHIBATA *et al.*, 1989). A primeira fase (0-5 min) ocorre, imediatamente, após a administração da formalina, provocando uma resposta nociceptiva decorrente da estimulação química direta dos nociceptores e liberação de aminoácidos excitatórios (HUNSKAAR, S; FASMER; HOLE, 1985). Em seguida, há um período chamado de interfase (5-15 min) que é caracterizado pelos mecanismos de supressão endógenos da dor. A segunda fase (15-30 min) é conhecida por um processo inflamatório, levando a liberação de mediadores como a serotonina, histamina, bradicinina e prostaglandina (ABBOTT; FRANKLIN; WESTBROOK, 1995).

Para a realização do experimento, os camundongos foram divididos em grupos (n=6) que foram tratados com veículo, três doses do ácido 3-cumarino carboxílico (25, 50 e 75 mg/kg, i.p.) ou morfina (10 mg/kg, i.p.). Após 30 minutos dos tratamentos, foi injetada a solução de formalina 2% na região perinasal, provocando o comportamento de *face rubbing*, que foi registrado nas duas fases acima citadas. Uma redução dessa resposta dolorosa nos animais tratado com a substância teste, quando comparado ao grupo controle negativo, indicará uma atividade antinociceptiva.

5.11 Avaliação da interação do ácido 3-cumarino carboxílico com os receptores da via opioide e canais de K^{+}_{ATP} no teste da formalina orofacial

Por ser um modelo bifásico capaz de examinar diferentes níveis de integração do estímulo nocivo nos sistemas nervosos periférico e central, e por ser o modelo que mais se assemelha à dor clínica em comparação com outros modelos de dor orofacial, o teste da formalina orofacial foi selecionado para a investigação dos possíveis mecanismos de ação do ácido 3-cumarino carboxílico (LUCCARINI *et al.*, 2006).

Para determinar a via envolvida no efeito antinociceptivo ácido 3-cumarino carboxílico, foi estudada a participação do sistema opioidérgico e dos canais K^{+}_{ATP} , por meio da administração das ferramentas farmacológicas (naloxona e glibenclamida, respectivamente) capazes de antagonizar competitivamente ou

bloquear os possíveis alvos proteicos de atuação da substância teste (Tabela 1) (DAS, 2015).

Entre as doses testadas do ácido 3-cumarino carboxílico, as doses de 50 mg/kg e 75 mg/kg se destacaram pelos efeitos apresentados na maioria dos modelos experimentais, e, por não haver diferença significativa entre elas, a dose de 50 mg/kg foi selecionada para a avaliação do mecanismo de ação e do edema de pata induzido por carragenina, uma vez se preza pela menor concentração capaz de promover o efeito farmacológico.

Para a realização do experimento, os camundongos foram divididos em grupos (n=6) que foram tratados com veículo, a dose de 50 mg/kg (i.p.) do ácido 3-cumarino carboxílico, morfina (10 mg/kg, i.p.), naloxona (5 mg/kg, s.c.) + veículo, naloxona (5 mg/kg, s.c.) + morfina (10 mg/kg, i.p.), naloxona (5 mg/kg, s.c.) + ácido 3-cumarino carboxílico (50 mg/kg, i.p.), glibenclamida (10 mg/kg, i.p.) + veículo ou glibenclamida (10 mg/kg, i.p.) + ácido 3-cumarino carboxílico (50 mg/kg, i.p.). O pré-tratamento com os antagonistas, naloxona (5 mg/kg, s.c.) ou glibenclamida (10 mg/kg, i.p.), foi realizado 15 minutos antes da administração dos tratamentos. Após 30 minutos dos tratamentos, foi injetada a solução de formalina 2% na região perinasal, provocando o comportamento de *face rubbing*, que foi registrado.

Tabela 1. Ferramentas farmacológicas utilizadas para o estudo das vias de sinalização envolvidas na possível antinocicepção mediada pelo ácido 3-cumarino carboxílico.

Via de sinalização	Agonista	Antagonista
Opioide	Morfina (10 mg/kg, i.p.)	Naloxona (5 mg/kg, s.c.)
K⁺_{ATP}		Glibenclamida (10 mg/kg, i.p.)

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.12 Avaliação do ácido 3-cumarino carboxílico no teste do edema de pata induzido por carragenina

A administração de 20 µL de carragenina (1%) na região subplantar provoca uma inflamação aguda com consequente formação de edema e hiperalgesia (VINEGAR; SCHREIBER; HUGO, 1969).

Para a realização desse experimento, os camundongos foram divididos randomicamente em grupos (n=6) tratados com veículo, ácido 3-cumarino carboxílico (50 mg/kg, i.p.) ou dexametasona (2 mg/kg, s.c.). Antes do início do experimento, o volume da pata traseira direita de cada animal foi quantificado com o auxílio de um pletismômetro digital, sendo considerado a medida basal.

Trinta minutos após os tratamentos, os animais receberam 20 µL de uma solução de carragenina (1%) na região subplantar da pata posterior direita. O volume da pata (mm³) foi mensurado com o auxílio de um pletismômetro digital nos tempos de 1, 2, 3 e 4 horas após a administração do estímulo nocivo. O parâmetro analisado foi a variação do volume da pata, cuja diminuição indica efeito anti-inflamatório.

5.13 Avaliação da interação entre COX-1 e -2 com o ácido 3-cumarino carboxílico no docking molecular

Foi realizado um consenso de docking a fim de realizar uma avaliação precisa do ácido 3-cumarino carboxílico. Os *softwares* utilizados compreenderam: “GOLD – Protein Ligand Docking Software” – The Cambridge Crystallographic Data Centre (CCDC) 2021.3.0 (<https://www.ccdc.cam.ac.uk/solutions/csd-discovery/components/gold/>), PYRX – Virtual Screening Tool, Source Force, 2022, Slash Dott Media (<https://sourceforge.net/projects/pyrx/>) e Molegro Virtual Docker (MVD) versão 6.0.1. (<http://molexus.io/molegro-virtual-docker/>).

O procedimento para realização de docking molecular compreendeu inicialmente o preparo do A3CC no formato MDL Mol file (*.mol), tendo sido feito o desenho no software Marvin Sketch 18.14 (1998-2020) Chemaxon LTD (<https://chemaxon.com/products/marvin>) e em seguida as estruturas foram convertidas em 3D pelo software Standardizer version 18.17 (1998-2020) Chemaxon LTD (<https://docs.chemaxon.com/display/docs/standardizer-user-s-guide.md>). As

proteínas foram obtidas na biblioteca Protein Data Bank (PDB) RCSB (<https://www.rcsb.org/>), sendo respectivamente: 1CQE, 1DIY, 3PGH e 1CX2.

A plataforma GOLD apresenta quatro funções de *Docking*, sendo estas: ChemScore (uma das funções mais utilizadas para Rescore), Gold Score (função mais utilizada em sítios de características polares) ChemPLP (algoritmo de cálculo de maior velocidade) e ASP (função padrão para cálculos de Rescore). Além das funções de Docking, este software faz cálculos de Rescore, visto que este proporciona um resultado mais acurado. A função de cálculo analisada compreendeu o Gold Score, tendo o algoritmo ASP como função de rescore (GOLDBERG, David E; HOLLAND, 1988; JASIM *et al.*, 2022; NURISSO *et al.*, 2012).

A proteína foi importada no *workspace* e foi aberta a seção de opções globais, onde foi ajustado o estado de protonação dos resíduos de aminoácidos das proteínas em estudo no pH de interesse. Em seguida foi realizada a remoção das moléculas de água e adição de todos os Hidrogênios na estrutura do receptor para a realização do cálculo. Os ligantes foram extraídos da estrutura do receptor para que fosse possível analisar o composto em estudo no exato posicionamento do ligante co-cristalizado na respectiva enzima. A etapa seguinte consistiu na definição do *binding site*, este apresentou 10 Å de raio e o ligante PDB foi selecionado para ocupar o sítio ativo do receptor (apesar deste ter sido extraído, as coordenadas ficaram registradas no receptor. Foi selecionada a opção *virtual screening* e a eficiência de busca do algoritmo genético foi estabelecida em 200%, deixando a simulação de Docking molecular muito flexível. A última etapa foi a adição do A3CC, sendo em seguida escolhida a quantidade de 10 rotações do algoritmo genético para cada ligante analisado.

O segundo software utilizado correspondeu ao PYRX – Virtual Screening Tool, Source Force, 2022, Slash Dott Media (<https://sourceforge.net/projects/pyrx/>). Esta plataforma apresenta dois programas principais, correspondendo a: Auto Dock (version 4.2.6), o qual utiliza campos de força como o AMBER em conjunto com funções de *score* de energia livre, além de mapas de afinidade e mapas eletrostáticos pré-cálculados para átomos específicos (MORRIS *et al.*, 1998; SOLIS-VASQUEZ *et al.*, 2020). O outro programa refere-se ao Auto Dock Vina (version 1.2), o qual corresponde a uma versão mais recente, como também mais aperfeiçoada da plataforma de cálculo. O *software* utiliza por padrão algoritmo de encaixe semi-flexível.

O local de ancoragem do receptor é definido dentro do sítio de ligação do ligante co-cristalizado, sendo identificado através das coordenadas do ligante após importar e marcar a macromolécula (TROTT; OLSON, 2009; XUE *et al.*, 2022). O programa foi usado com parâmetro de encaixe padrão. Além disso, a distância de ligação de hidrogênio (O-H) foi definida em $< 2,50 \text{ \AA}$ entre os átomos doadores e receptores com o mínimo ângulo doador-aceptor de hidrogênio de 120° . O tamanho do Grid foi ajustado para $25 \text{ \AA}$ em cada dimensão.

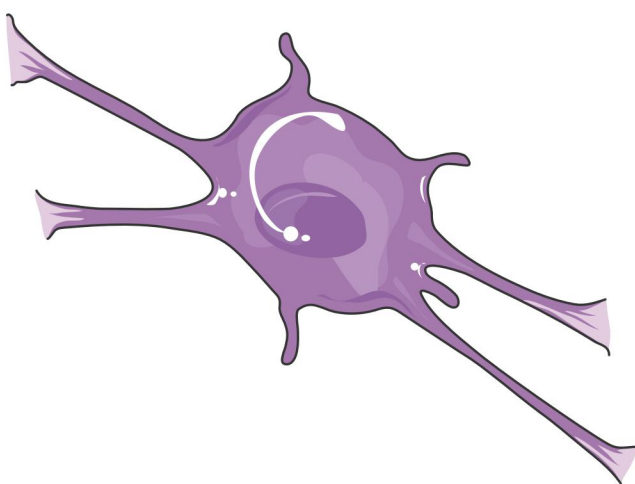
O terceiro *software* utilizado foi o Molegro Virtual Docker (MVD) versão 6.0.1. (<http://molexus.io/molegro-virtual-docker/>). O ligante complexado foi utilizado para definir o sítio ativo. A estrutura da enzima e do A3CC foram preparadas usando os parâmetros padrão do *software*. O algoritmo Moldock SE foi calculado utilizando ao todo 10 execuções; no máximo 1.500 interações; tamanho populacional de 50; 2.000 etapas de minimização para cada resíduo flexível e 2.000 etapas de minimização global por corrida. Para a análise da energia do ligante, foram avaliadas as interações eletrostáticas internas, ligações de hidrogênio internas e torções sp^2-sp^2 . O procedimento de acoplamento foi realizado usando um GRID com raio de $15 \text{ \AA}$ e resolução de $0,30 \text{ \AA}$, para cobrir o local de ligação na molécula no sítio de interação. De forma semelhante, o último algoritmo, Plants Score também foi calculado utilizando o MVD. Após a análise do docking foi conduzido o redocking com o ligante cristalizado para validação dos dados.

Os gráficos em duas dimensões (2D) e três dimensões (3D) foram criados a partir da exportação da análise conduzida no MVD para um arquivo no formato pdb. Em seguida, foi realizada a importação dos resultados no *software* Discovery Studio Visualizer, Biovia, 2020, (<https://discover.3ds.com/>) e geradas as imagens de interação molecular.

A determinação da afinidade do A3CC pelos alvos investigados foi estabelecida por cálculos de probabilidade. A probabilidade foi calculada dividindo-se o escore da molécula em estudo pelo menor escore de energia ($p = \text{Composto Score} / \text{Menor Score}$), para cada algoritmo, e ao final foi calculada uma média geral entre os algoritmos para gerar a média da enzima ($((p) \text{ Total Enzima} = ((p) \text{ Moldock Score} + (p) \text{ Plants Score} + (p) \text{ Vina Score} + (p) \text{ Gold Score}) / 4$) (RODRIGUES *et al.*, 2020; S. MAIA *et al.*, 2020).

5.14 Análise estatística

Os testes estatísticos utilizados para análise dos dados foram definidos de acordo com a característica do experimento. Os dados que obedeceram a distribuição normal de frequência foram analisados através da Análise de Variância “one-way” (ANOVA), seguido do *post hoc* de Dunnett, Bonferroni ou Tukey. Dados não paramétricos foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido pelo *post hoc* de Dunn. Os valores obtidos foram expressos em média $\pm$ erro padrão da média (e.p.m.), sendo os resultados considerados significativos quando $p < 0,05$.



RESULTADOS

6. RESULTADOS

6.1 Espectro de atividades farmacológicas do ácido 3-cumarino carboxílico

Através da análise de probabilidade de atividade farmacológica utilizando o *software* PASS, podemos observar prováveis atividades terapêuticas produzidas pelo ácido 3-cumarino carboxílico. Foram descritas apenas as atividades que possuíram mais de 50% de chances de a molécula ser ativa, bem como as atividades antinociceptiva, antioxidante, analgésica e anestésica. A análise indicou que o ácido 3-cumarino carboxílico apresenta uma possibilidade de 72% de possuir atividade anti-inflamatória, além de 28% de chances de possuir atividade antinociceptiva (Tabela 2).

Tabela 2. Espectro geral das probabilidades de atividades farmacológicas do ácido 3-cumarino carboxílico.

Probabilidade de ser ativo (PA)	Probabilidade de ser inativo (PI)	Atividade
0,835	0,012	Antieczemático
0,809	0,011	Antagonista do receptor de anafilatoxina
0,717	0,014	Anti-inflamatório
0,691	0,006	Antimutagênico
0,64	0,003	Antiurêmico
0,619	0,052	Antisseborreico
0,605	0,009	Inibidor da antranilato-coa ligase
0,577	0,009	Antisséptico
0,546	0,023	Antipruriginoso, alérgico
0,51	0,012	Antipirético
0,284	0,195	Antinociceptivo
0,256	0,034	Antioxidante
0,249	0,1	Estimulante analgésico
0,182	0,154	Anestésico geral

Fonte: Elaborado pelo autor.

6.2 Perfil de biodisponibilidade oral e *druglikeness* do ácido 3-cumarino carboxílico

A absorção é um importante parâmetro a ser levado em consideração durante o planejamento de fármacos e medicamentos. Ela pode ocorrer por dois

mecanismos principais, sendo que o primeiro mecanismo corresponde a absorção transcelular que representa a difusão passiva através das membranas celulares, o segundo mecanismo é denominado de paracelular que representa a passagem pelas células intestinais, além de poder ocorrer por transporte ativo, o qual requer energia e é mediado por carreadores. A absorção é influenciada pelas propriedades moleculares de solubilidade e lipofilia (EGAN; LAURI, 2002; LI, 2001; NAVIA; CHATURVEDI, 1996) .

A predição teórica das propriedades moleculares do ácido 3-cumarino carboxílico, calculadas no *software* Molinspiration, são representadas na Tabela 3. A regra de Lipinski, também conhecida por “regra dos cinco”, foi um dos primeiros parâmetros a correlacionar, propriedades físico-químicas com parâmetros de Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção (ADME) (LIPINSKI, Celio F. *et al.*, 2019; LIPINSKI, Christopher A. *et al.*, 2012). A substância apresenta boa biodisponibilidade teórica por via oral, uma vez que atende aos requisitos preconizados pela regra dos cinco de Lipinski, no qual afirma que ao atender ao menos 4 parâmetros (LogP_{o/w}, MM, nALH e nDLH) provavelmente terá uma boa biodisponibilidade quando administrado por via oral. O ácido 3-cumarino carboxílico apresentou nALH menor que 10, nDLH menor que 5, MM menor que 500 g/mol e LogP_{o/w} menor que 5. Por não ter violado nenhum parâmetro, o ácido 3-cumarino carboxílico possui um bom perfil de biodisponibilidade oral.

Tabela 3. Propriedades moleculares do ácido 3-cumarino carboxílico, calculadas no *software* Molinspiration.

LogP _{o/w}	MM (g/mol)	nALH	nDLH	Violações	TPSA
0.661	190.154	4	1	0	63.6

Legenda: LogP_{o/w} – coeficiente de partição octanol/água; MM - massa molecular; nALH – número de grupos aceptores de ligação de hidrogênio; nDLH – número de grupos doadores de ligação de hidrogênio; Violações – número de violações; TPSA – área superficial polar topológica. Fonte: Elaborado pelo autor.

O perfil de *druglikeness* do ácido 3-cumarino carboxílico também foi avaliado utilizando o *software* Molinspiration. Valores próximos a zero indicam maior

a probabilidade de que a molécula seja ativa diante do alvo. De forma geral, o ácido 3-cumarino carboxílico demonstrou possuir moderada atividade ao interagir com receptores nucleares e enzimas, frente aos demais alvos presume ser inativo, como mostrado na Tabela 3.

Tabela 4. Predição de bioatividades, calculadas no software Molinspiration, para o ácido 3-cumarino carboxílico.

Ligante GPCR	Modulador de canal iônico	Inibidor de quinase	Ligante de receptor nuclear	Inibidor de protease	Inibidor enzimático
-1.03	-0.84	-1.21	-0.42	-0.76	-0.18

Legenda: Ligante GPCR – Ligante de receptores acoplados às proteínas G. Fonte: Elaborado pelo autor.

6.3 Avaliação da permeabilidade do ácido 3-cumarino carboxílico na barreira hematoencefálica

Para serem eficazes como agentes terapêuticos, os fármacos de ação central devem atravessar a BHE, e a entrada no cérebro é um fenômeno complexo que depende de uma multiplicidade de fatores. No entanto, o pressuposto básico utilizado neste modelo é a permeação passiva (CRIVORI *et al.*, 2000; CRUCIANI, Gabriele *et al.*, 2003; CRUCIANI, Gabriele; PASTOR; GUBA, 2000).

O modelo VolSurf+ para permeação BHE é um modelo quantitativo contendo cerca de 500 compostos relacionados, mas quimicamente diversos, extraídos da literatura e dados internos, relatando que são penetrantes no cérebro quando $\log BB > 0,5$, moderadamente permeáveis quando $\log BB$ entre 0 e 0,5, pouca capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica quando $\log BB$ maior superior a -0,3 ou demonstram muito pouca permeação quando $\log BB$ inferior a -0,3 (CRUCIANI, G. *et al.*, 2000).

Para o ácido 3-cumarino carboxílico, os resultados de $\log BB$ corresponderam a -0.0586116 indicando que o composto possivelmente apresenta uma baixa capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica.

6.4 Avaliação do fator de risco de toxicidade do ácido 3-cumarino carboxílico

A toxicidade corresponde a capacidade inerente apresentada por uma substância em produzir efeitos nocivos quer seja em um organismo vivo, ou em um ecossistema. Já o risco tóxico se caracteriza como a probabilidade que o efeito nocivo, ou efeito tóxico, ocorra em função das condições de utilização da substância (OGA; CAMARGO; BATISTUZZO, 2014).

O ácido 3-cumarino carboxílico foi avaliado quanto a toxicidade no programa OSIRIS Data Warrior 5.0 (RORIJE *et al.*, 2013). Os parâmetros avaliados incluíram: mutagenicidade, ou seja, a capacidade que a substância tem de provocar mutações no DNA do organismo no qual esse bioativo está inserido (SUSHKO *et al.*, 2010); tumorigenicidade, que compreende a capacidade do bioativo em provocar o surgimento de tumores (SATO *et al.*, 2019); irritabilidade da pele, a qual corresponde a sensibilidade que o composto pode provocar na pele e em tecidos de órgãos internos como esôfago, laringe, estômago e intestino e toxicidade no sistema reprodutor, que corresponde aos efeitos tóxicos que uma substância pode ter sobre a função sexual e a fertilidade masculina ou feminina (CHANDRA *et al.*, 2015; ROUSSEAU *et al.*, 2021).

O ácido 3-cumarino carboxílico não apresentou alto risco de toxicidade em nenhum dos parâmetros analisados (Tabela 5). O único parâmetro que indicou um possível risco está relacionado efeitos reprodutivos, no entanto, identificado como baixo. Os resultados sugerem que o ácido 3-cumarino carboxílico apresenta efeitos desprezíveis ou nenhum efeito indesejado.

Tabela 5. Descrição dos riscos de toxicidade *in silico* do ácido 3-cumarino carboxílico, avaliada pelo software OSIRIS Data Warrior 5.0.

Mutagenicidade	Tumorigenicidade	Irritabilidade	Toxicidade no sistema reprodutor
Não	Não	Não	Baixa

Fonte: Elaborado pelo autor.

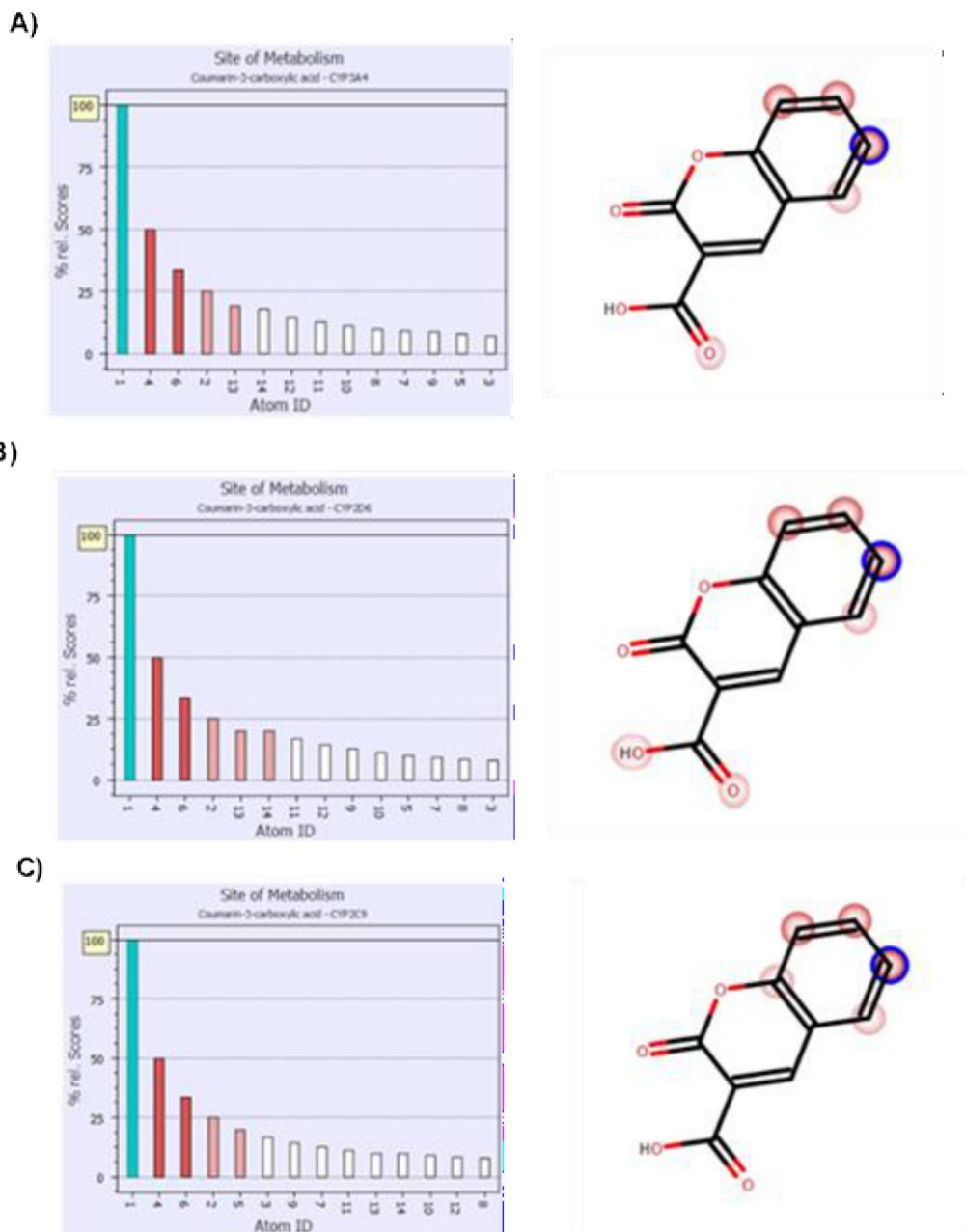
6.5 Avaliação dos possíveis metabólitos gerados a partir do ácido 3-cumarino carboxílico

Enzimas oxidativas exercem predomínio durante a fase 1 de metabolização, entre as quais o CYP assume papel fundamental no metabolismo hepático de xenobióticos. As análises foram desenvolvidas no programa MetaSite v. 6.0 (<https://www.moldiscovery.com/software/metasite/>) (CRUCIANI, Gabriele *et al.*, 2005) com a finalidade de se realizar predições *in silico*, como também, avaliar seu potencial sítio do metabolismo hepático, devido a biotransformações reguladas por citocromos P450.

A informação utilizada nas análises do MetaSite v. 6.0 para a predição metabólica do ácido 3-cumarino carboxílico com o citocromo P450 se apresentam a seguir. Inicialmente foram observados os potenciais pontos instáveis, conhecidos como “*softspots*”, do A3CC, resultantes da sua interação com o CYP. Estes *softspots* são úteis em planejar modificações na estrutura química dos compostos, podendo otimizar o perfil metabólico.

Os dados obtidos indicam que existe maior capacidade do A3CC reconhecer as isoenzimas 3A4, 2D6 e 2C9, que catalisam reações de hidroxilação aromática para formar quatro metabólitos principais. A Figura 10 mostra o A3CC e a região de maior probabilidade de metabolização conforme as CYPs 3A4, 2D6 e 2C9. As barras do histograma representam a probabilidade de os átomos serem metabolizados, onde quanto maior for a barra, mais provável será o metabolismo do átomo. A barra azul demonstrada no gráfico de *Score*, são representadas nos compostos, onde as regiões circuladas em vermelho relatam posições preditas do metabolismo para os compostos, enquanto a região circulada em azul corresponde ao átomo com maior probabilidade de metabolização.

Figura 11. Previsão do local do metabolismo nas CYPs do fígado, 3A4 (A), 2D6 (B) e 2C9 (C) para o ácido 3-cumarino carboxílico.



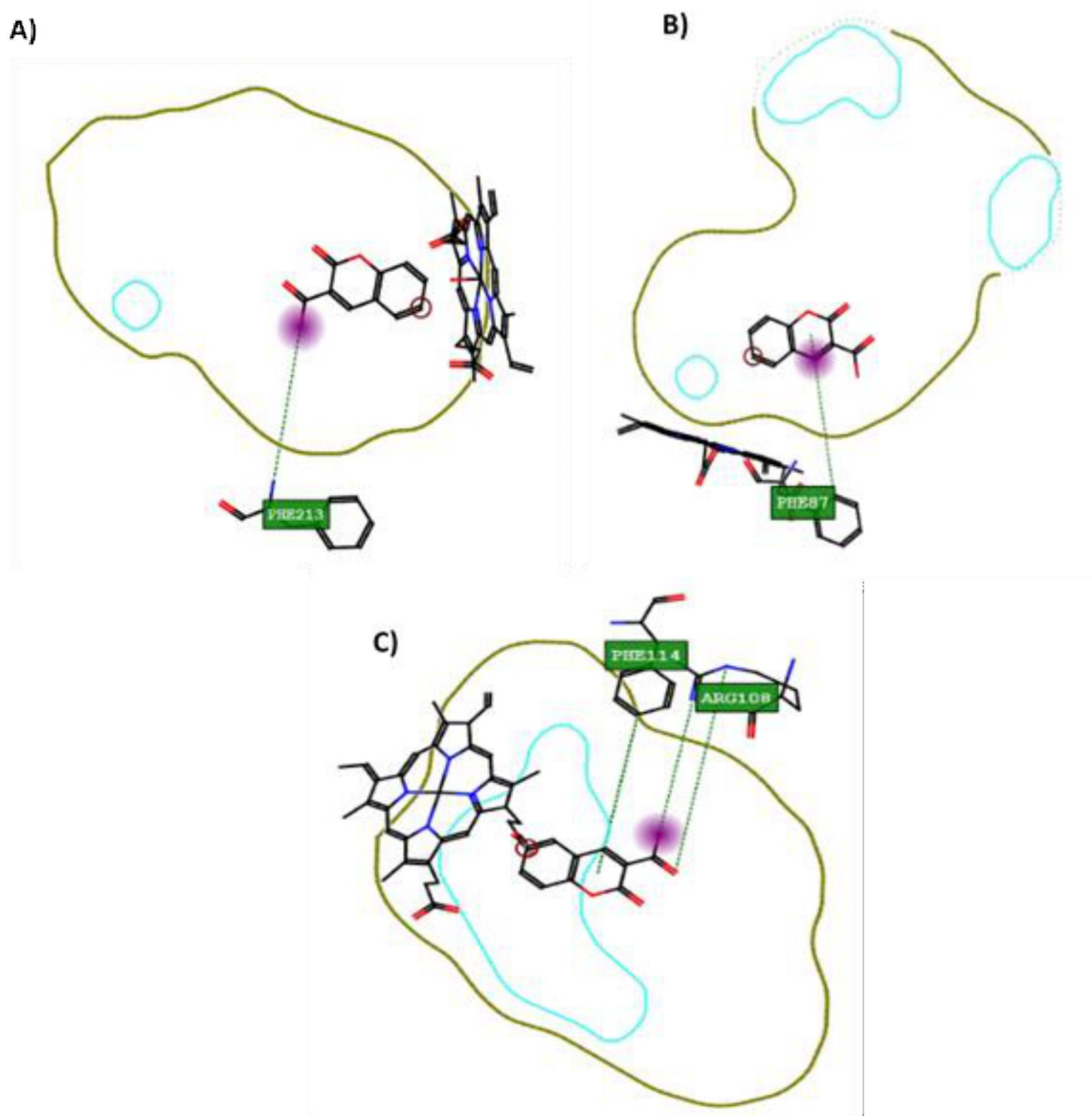
As regiões circuladas em vermelho remetem a posições preditas do metabolismo para o composto, enquanto a região circulada em azul refere-se a região de maior probabilidade de metabolização, além de estar em evidência no gráfico de Score, evidenciada por uma barra também em azul. Fonte: Elaborado pelo autor.

De acordo com esta representação foi observado que as contribuições estruturais destacam as porções moleculares mais prováveis de metabolização

presentes no anel benzeno, sendo o C6 o átomo de maior probabilidade de metabolização nas três CYPs em estudo, equivalendo a 100%.

Para o C6 do anel benzeno, o qual correspondeu ao grupamento com maior probabilidade de metabolização, foram observadas as regiões de acoplamento molecular do A3CC com as isoformas 3A4, 2D6 e 2C9 do citocromo P450, mostrando as interações existentes no sítio do citocromo (Figura 11).

Figura 12. Representação do acoplamento molecular do A3CC com o grupamento HEME nas isoformas do Citocromo P450, CYP3A4 (A) e CYP2D6 (B) e CYP2C9 (C).



Fonte: Elaborado pelo autor.

A figura 12 demonstra que a análise da pose reativa do A3CC na CYP3A4 realizado no MetaSite demonstrou o papel fundamental do grupamento carboxila na exposição molecular. De fato, a interação com esse grupamento químico foi fundamental para o estabelecimento de ligações com o resíduo de Phe213. Com relação ao acoplamento molecular da CYP2D6 com o A3CC, foi observado a interação do resíduo Phe87 com o anel α -pirano.

Por meio da análise do acoplamento molecular com a CYP3A4 e com a CYP2D6, foi perceptível a existência de dois grupos principais na exposição molecular e probabilidade de metabolização, sendo estes referentes ao substituinte carboxila do grupamento ácido carboxílico na CYP3A4 e os átomos de carbono do anel α -pirano com a CYP2D6. Isso foi visualizado com a CYP2C9, onde os dois grupamentos foram identificados, tendo o grupamento carboxila estabelecido duas interações com o resíduo de Arg108, por meio dos átomos de oxigênio dos grupos carbonila e hidroxila. Já os carbonos do anel α -pirano estabeleceram interações com o resíduo de Phe144.

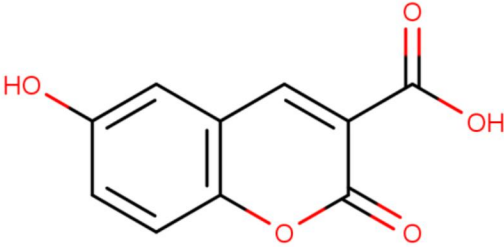
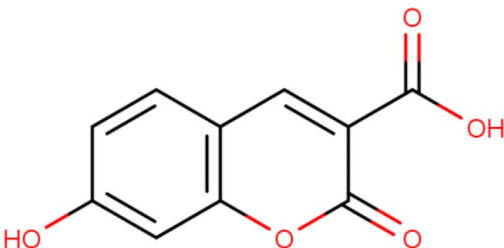
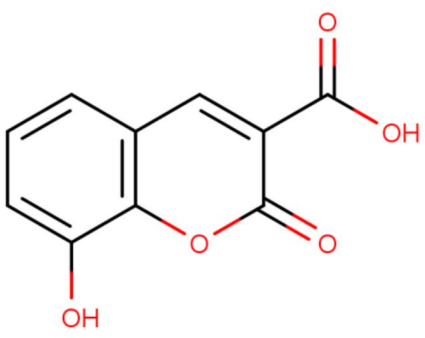
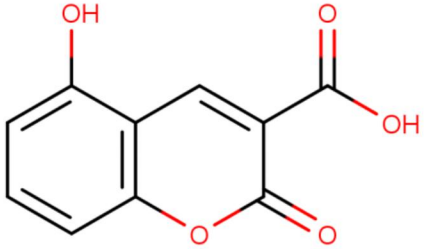
Por fim, foi possível observar os metabólitos oriundos da biotransformação com os citocromos presentes no fígado, possibilitando identificar as reações responsáveis pelo seu metabolismo. Detalhes dos tipos de reações no processo de biotransformação no fígado e os metabólitos produzidos podem ser vistos nas tabelas 6 e 7.

Tabela 6. Predição das isoenzimas responsáveis pelo metabolismo do ácido 3-cumarino carboxílico e principais sítios de metabolização.

CYP	Reação	Sítio de metabolização	Abundância da reação
3A4, 2D6 e 2C9	Hidroxilação aromática	Carbono 6	100%
		Carbono 7	50%
		Carbono 8	33.3%
		Carbono 5	25%

Legenda: CYP – Citocromo P450. Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 7. Principais metabólitos gerados a partir do ácido 3-cumarino carboxílico.

Nome	Metabólito
Ácido 6-hidroxi-2-oxocromeno-3-carboxílico	
Ácido 7-hidroxi-2-oxocromeno-3-carboxílico	
Ácido 8-hidroxi-2-oxocromeno-3-carboxílico	
Ácido 5-hidroxi-2-oxocromeno-3-carboxílico	

Fonte: Elaborado pelo autor.

Os quatro metabólitos das simulações de metabolismo por CYP3A4, CYP2D6 e CYP2C9 foram avaliados em termos de riscos de toxicidade, pois para o

desenvolvimento de um estudo racional de novos fármacos, os riscos dos metabólitos devem ser levados em consideração. Além disso, ressalta-se que os metabólitos também estarão biodisponíveis no organismo, sendo importante também o estudo toxicológico. Altos riscos citotóxicos de metabólitos de alta abundância inviabilizam a P&D de um fármaco bioativo.

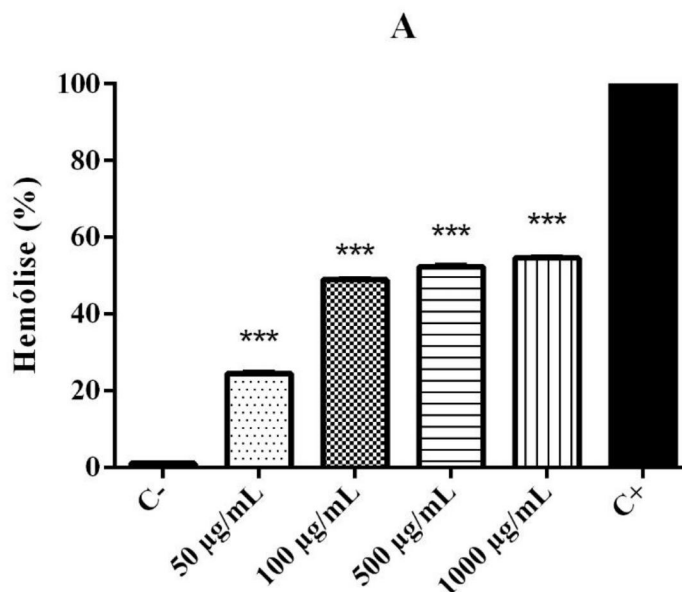
Os resultados analisados a partir do OSIRIS Data Warrior demonstram que a maioria dos metabólitos previstos não apresentaram riscos de toxicidade, sendo alta probabilidade a probabilidade de serem bioativos e não tóxicos. O único metabólito que exibiu risco de toxicidade foi o ácido 8-hidroxi-2-oxocromeno-3-carboxílico, o qual apresentou baixa probabilidade de provocar irritabilidade, além disso, o seu percentual de abundância equivale a apenas 33.3%, sendo dessa forma um percentual de baixa expressividade e relevância.

6.6 Efeito hemolítico do ácido 3-cumarino carboxílico em eritrócitos humanos

O presente estudo realizou o ensaio *in vitro* de citotoxicidade com eritrócitos humanos. Esta análise permite avaliar os possíveis efeitos danosos da molécula à membrana dessas células (FARAG; ALAGAWANY, 2018).

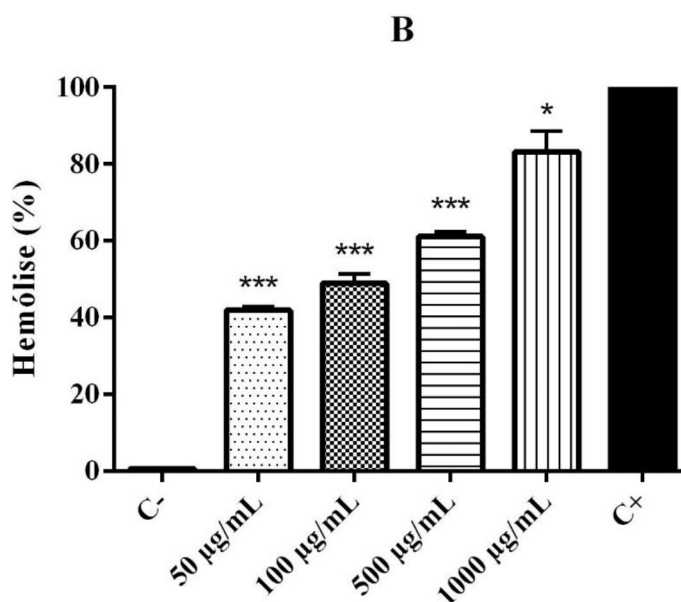
Para detectar a toxicidade inicial do ácido 3-cumarino carboxílico foi utilizada a metodologia de hemólise de eritrócitos, onde a substância testada foi capaz de reduzir a lise sobre os eritrócitos humanos dos tipos sanguíneos A, B e O em todas as concentrações testadas (50µg/mL, 100µg/mL, 500µg/mL e 1000µg/mL) quando comparados ao grupo controle positivo (100% de hemólise), conforme demonstrado nos gráficos 1, 2 e 3.

Gráfico 1. Avaliação hemolítica em eritrócitos humanos do grupo sanguíneo “A” induzida pelo ácido 3-cumarino carboxílico.



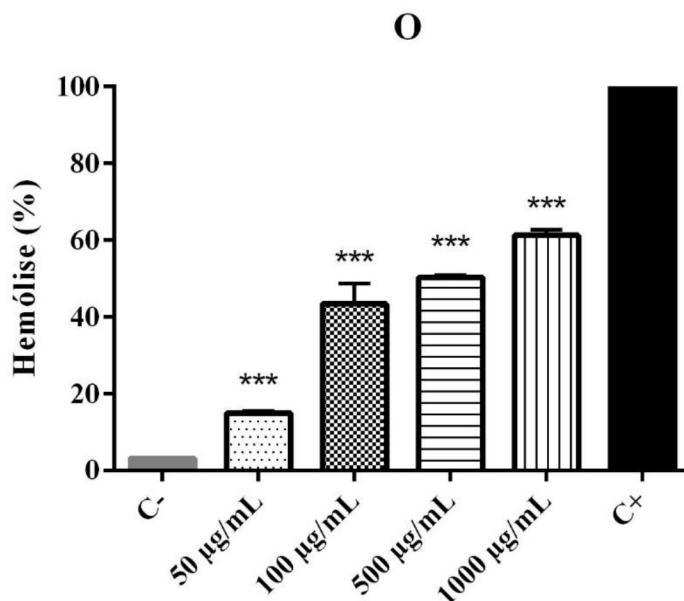
Análise estatística: ANOVA “one-way” seguido do teste de Bonferroni. Cada coluna representa a média $\pm$ e.p.m. *** $p < 0,001$ versus grupo controle positivo. (C-: controle negativo; C+: controle positivo). Fonte: Elaborado pelo autor.

Gráfico 2. Avaliação hemolítica em eritrócitos humanos do grupo sanguíneo “B” induzida pelo ácido 3-cumarino carboxílico.



Análise estatística: ANOVA “one-way” seguido do teste de Bonferroni. Cada coluna representa a média $\pm$ e.p.m. * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ versus grupo controle positivo. (C-: controle negativo; C+: controle positivo). Fonte: Elaborado pelo autor.

Gráfico 3. Avaliação hemolítica em eritrócitos humanos do grupo sanguíneo “O” induzida pelo ácido 3-cumarino carboxílico.

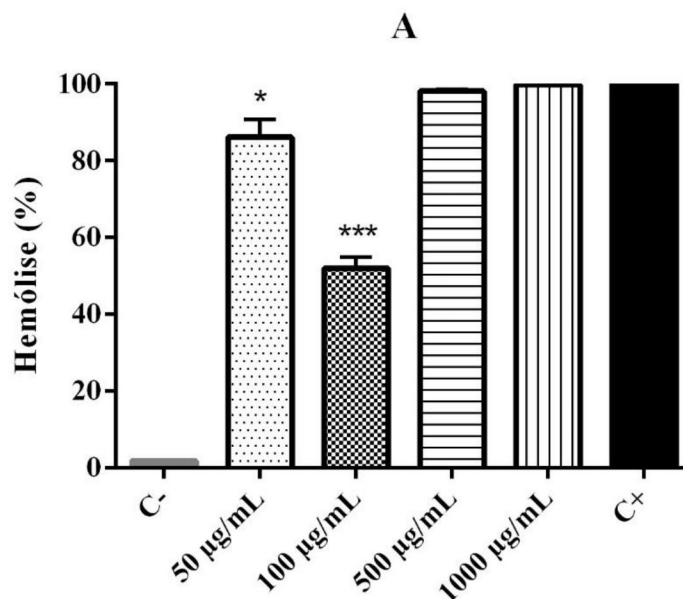


Análise estatística: ANOVA “one-way” seguido do teste de Bonferroni. Cada coluna representa a média $\pm$ e.p.m. *** $p < 0,001$ versus grupo controle positivo. (C-: controle negativo; C+: controle positivo). Fonte: Elaborado pelo autor.

6.7 Efeito anti-hemolítico do ácido 3-cumarino carboxílico em eritrócitos humanos

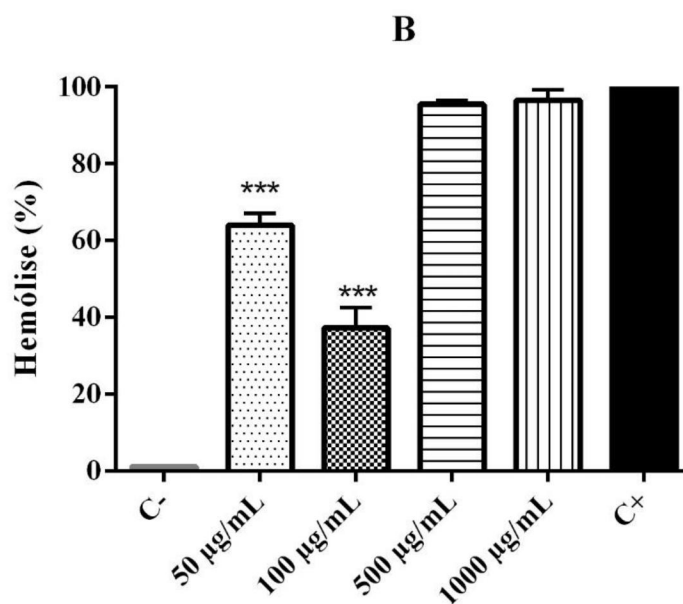
Em um segundo momento, foi realizado o teste anti-hemolítico para verificar o efeito do ácido 3-cumarino carboxílico sobre a fragilidade osmótica dos eritrócitos. Podemos observar que a substância testada, além de não hemolisar, também foi capaz de proteger os eritrócitos humanos contra a hemólise, nos tipos sanguíneos A, B e O, nas concentrações de 50µg/mL e 100µg/mL, quando comparados ao grupo controle positivo (100% de hemólise), conforme indicado nos gráficos 4, 5 e 6.

Gráfico 4. Avaliação anti-hemolítica em eritrócitos humanos do grupo sanguíneo “A” induzida pelo ácido 3-cumarino carboxílico.



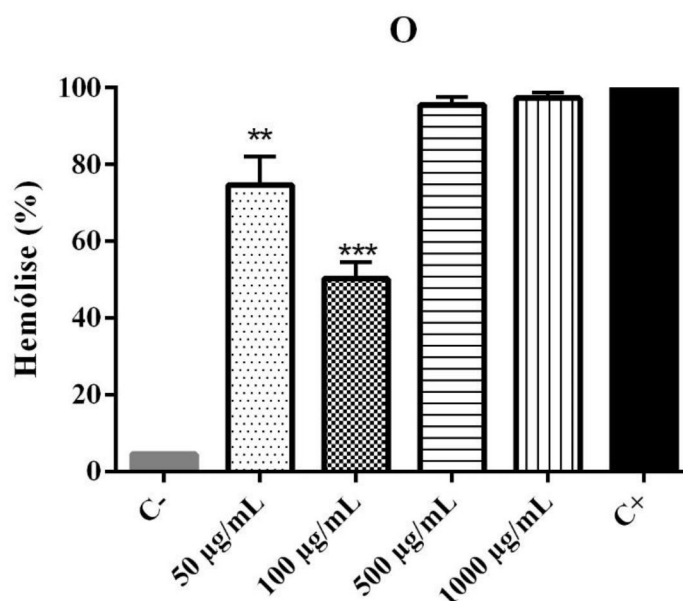
Análise estatística: ANOVA “one-way” seguida do teste de Bonferroni. Cada coluna representa a média $\pm$ e.p.m. * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ *versus* grupo controle positivo. (C⁻: controle negativo; C⁺: controle positivo). Fonte: Elaborado pelo autor.

Gráfico 5. Avaliação anti-hemolítica em eritrócitos humanos do grupo sanguíneo “B” induzida pelo ácido 3-cumarino carboxílico.



Análise estatística: ANOVA “one-way” seguida do teste de Bonferroni. Cada coluna representa a média $\pm$ e.p.m. *** $p < 0,001$ *versus* grupo controle positivo. (C⁻: controle negativo; C⁺: controle positivo). Fonte: Elaborado pelo autor.

Gráfico 6. Avaliação anti-hemolítica em eritrócitos humanos do grupo sanguíneo “O” induzida pelo ácido 3-cumarino carboxílico.

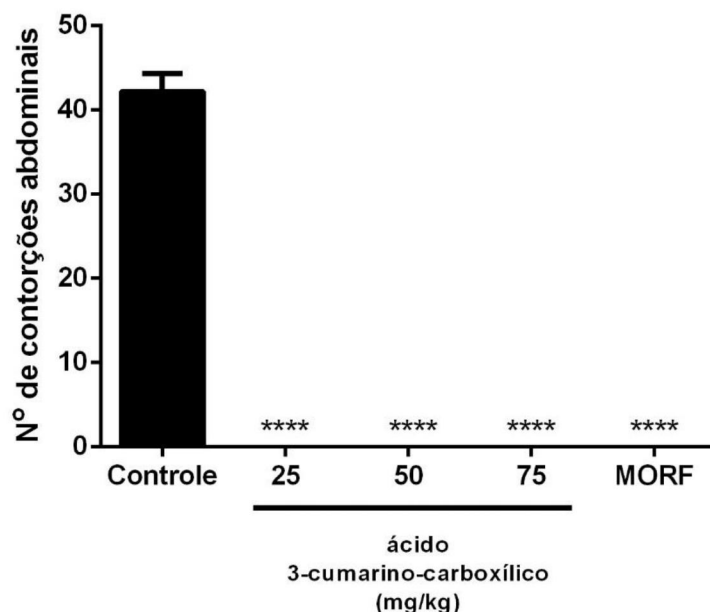


Análise estatística: ANOVA “one-way” seguida do teste de Bonferroni. Cada coluna representa a média $\pm$ e.p.m. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ *versus* grupo controle positivo. (C-: controle negativo; C+: controle positivo). Fonte: Elaborado pelo autor.

6.8 Efeito do ácido 3-cumarino carboxílico no teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético

O ácido 3-cumarino carboxílico nas doses de 25, 50 e 75 mg/kg apresentou redução significativa no número de contorções induzidas pelo ácido acético em relação ao grupo controle ($p < 0,0001$), apresentando porcentagens de inibição de 100,0% em todas as doses, incluindo o grupo tratado com morfina (Gráfico 7).

Gráfico 7. Efeito do ácido 3-cumarino carboxílico no número de contorções abdominais induzidas por ácido acético.

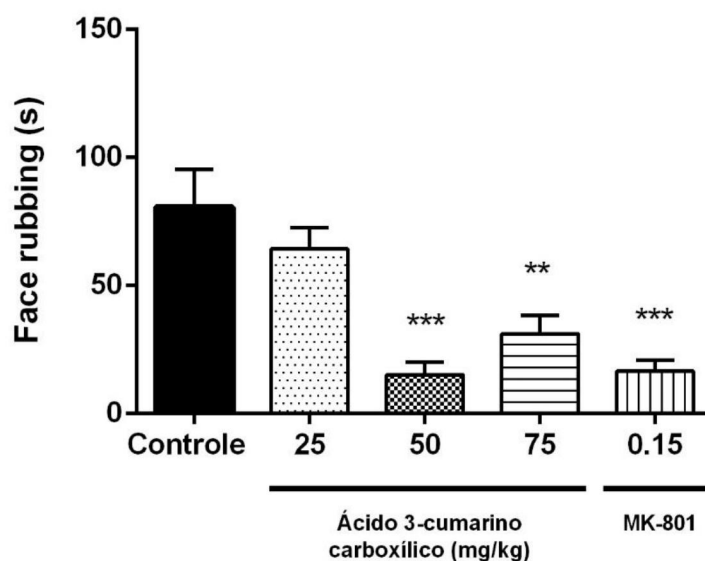


Os camundongos foram pré-tratados com veículo, ácido 3-cumarino carboxílico (25, 50 e 75 mg/kg, i.p.) e morfina (MORF: 10 mg/kg, i.p.), 30 min antes da aplicação de ácido acético (1%, i.p.). Cada coluna representa a média $\pm$ e.p.m. ($n = 6$). Análise estatística: ANOVA “one-way” seguida do teste de Dunnett. **** $p < 0,0001$ versus grupo controle. Fonte: Elaborado pelo autor.

6.9 Efeito do ácido 3-cumarino carboxílico no teste de glutamato orofacial

O pré-tratamento com ácido 3-cumarino carboxílico nas doses de 50 e 75 mg/kg, i.p., diminuiu o tempo de *face rubbing* no teste do glutamato, com valores de inibição de 88,3% ($15,1 \pm 4,9$) e 67,8% ($31,1 \pm 7,1$), respectivamente, em relação ao grupo controle ($80,7 \pm 14,6$). A menor dose de ácido 3-cumarino carboxílico (25 mg/kg, i.p.) não foi eficaz no teste de glutamato ($64,3 \pm 8,4$). Como esperado, o pré-tratamento com MK-801 reduziu o tempo de *face rubbing* (Gráfico 8).

Gráfico 8. Efeito do ácido 3-cumarino carboxílico no comportamento de face rubbing induzido pelo glutamato.

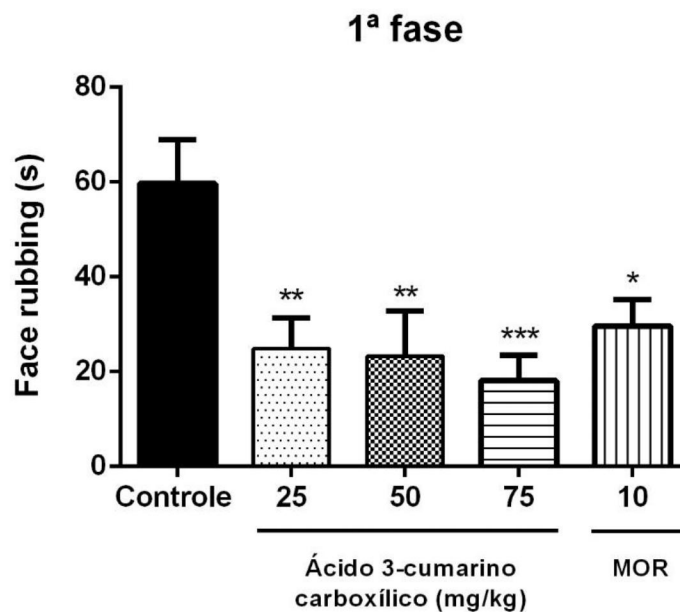


Os camundongos foram pré-tratados com veículo e 3-cumarino carboxílico (25, 50 e 75 mg/kg, i.p.), ou MK-801 (0.15 mg/kg, i.p.), 30 min antes da aplicação de glutamato (30 μ M). Cada coluna representa a média $\pm$ e.p.m. (n = 6). Análise estatística: ANOVA “one-way” seguido do teste de Dunnett. **p < 0,01; ***p < 0,001 *versus* grupo controle. Fonte: Elaborado pelo autor.

6.10 Efeito do ácido 3-cumarino carboxílico no teste de formalina orofacial

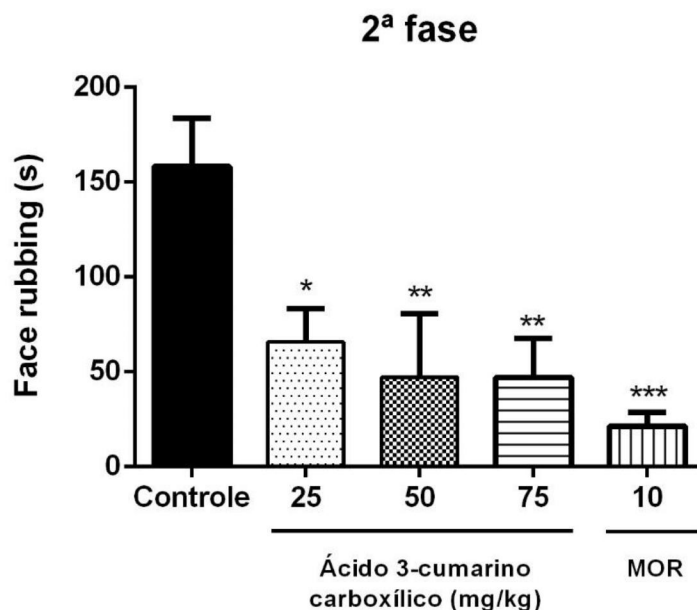
Neste teste, os camundongos que receberam ácido 3-cumarino carboxílico nas doses de 25, 50 ou 75 mg/kg, i.p., passaram significativamente menos tempo realizando o comportamento de *face rubbing* na fase neurogênica do teste, com valores de inibição de 58,3% (24,9 $\pm$ 6,4), 61,0% (23,2 $\pm$ 9,5) e 69,7% (18,1 $\pm$ 5,4) respectivamente, em comparação com os camundongos que receberam apenas veículo (59,3 $\pm$ 9,4) (Gráfico 9). Além disso, também apresentaram um menor tempo de resposta nociceptiva na fase inflamatória, com valores de inibição de 58,5% (65,7 $\pm$ 17,6), 70,2% (47,2 $\pm$ 33,8) e 70,2% (47,1 $\pm$ 20,6) respectivamente, em comparação com os camundongos do grupo controle (158,3 $\pm$ 25,2) (Gráfico 10). O pré-tratamento com morfina reduziu o tempo de *face rubbing* em ambas as fases.

Gráfico 9. Efeito do ácido 3-cumarino carboxílico na primeira fase da formalina orofacial.



Influência do veículo (controle), ácido 3-cumarino carboxílico (25, 50 e 75 mg/kg, i.p.) ou morfina (MOR 10 mg/kg, i.p.) no tempo de *face rubbing*, induzido por formalina na fase neurogênica do teste da formalina orofacial. Cada coluna representa média $\pm$ e.p.m. ($n = 6$). Os dados foram analisados por ANOVA seguido pelo teste de Dunnett. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ em comparação com o grupo controle. Fonte: Elaborado pelo autor.

Gráfico 10. Efeito do ácido 3-cumarino carboxílico na segunda fase da formalina orofacial.



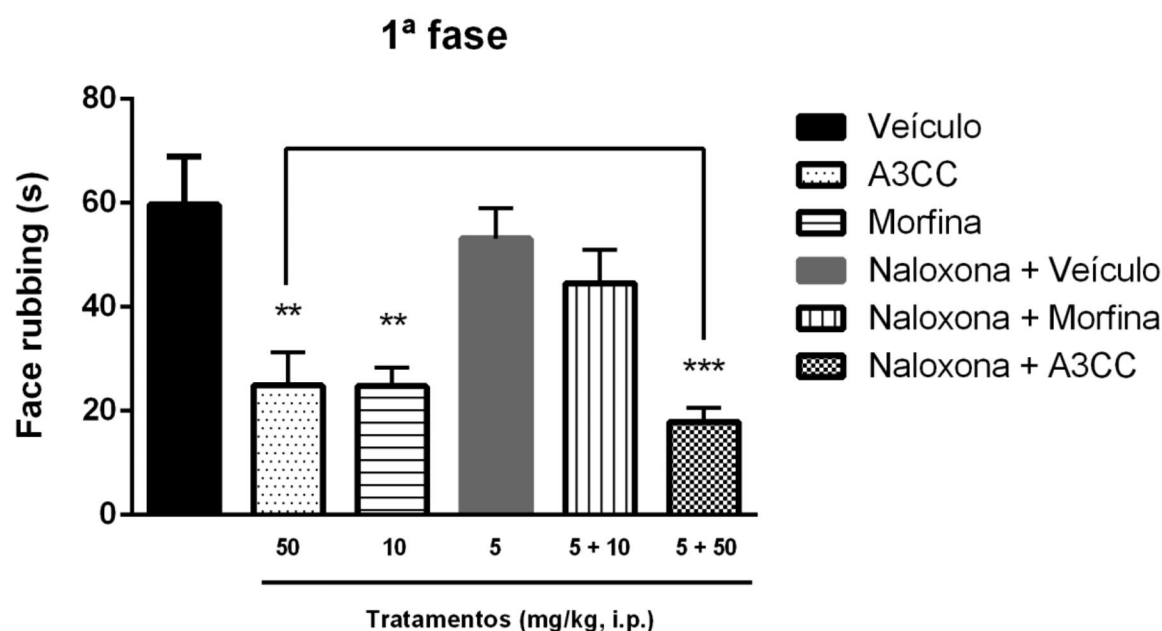
Influência do veículo (controle), ácido 3-cumarino carboxílico (25, 50 e 75 mg/kg, i.p.) ou morfina (MOR 10 mg/kg, i.p.) no tempo de *face rubbing*, induzido por formalina na fase inflamatória do teste da formalina orofacial. Cada coluna representa média $\pm$ e.p.m. ($n = 6$). Os dados foram analisados por ANOVA seguido pelo teste de Dunnett. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ em comparação com o grupo controle. Fonte: Elaborado pelo autor.

6.11 Interação do ácido 3-cumarino carboxílico com receptores da via opioide no teste de formalina orofacial

Pode-se observar nos gráficos 11 e 12, que o ácido 3-cumarino carboxílico na dose de 50 mg/kg, i.p., continuou a promover significativa redução no tempo de *face rubbing* em ambas as fases da formalina ($24,9 \pm 6,4$ e $58,6 \pm 14,3$), quando comparado ao grupo controle ($59,7 \pm 9,1$ e $141,0 \pm 23,5$). O grupo que recebeu a naloxona e o ácido 3-cumarino carboxílico teve significativa redução no comportamento nociceptivo ($17,9 \pm 2,7$ e $74,5 \pm 13,1$) quando comparado ao grupo que foi tratado apenas com o antagonista ($53,2 \pm 5,8$ e $124,7 \pm 17,0$), indicando que o ácido 3-cumarino carboxílico não atua por interação com receptores opioides. O efeito do grupo tratado apenas com o A3CC e do grupo que recebeu A3CC + naloxona é igual, indicando que não houve a reversão do efeito. O grupo que recebeu morfina ($24,8 \pm 3,6$ e $23,4 \pm 5,1$) também teve o tempo de *face rubbing* reduzido quando comparado ao controle. No grupo tratado com naloxona e morfina ($44,6 \pm 6,5$ e $130,6$

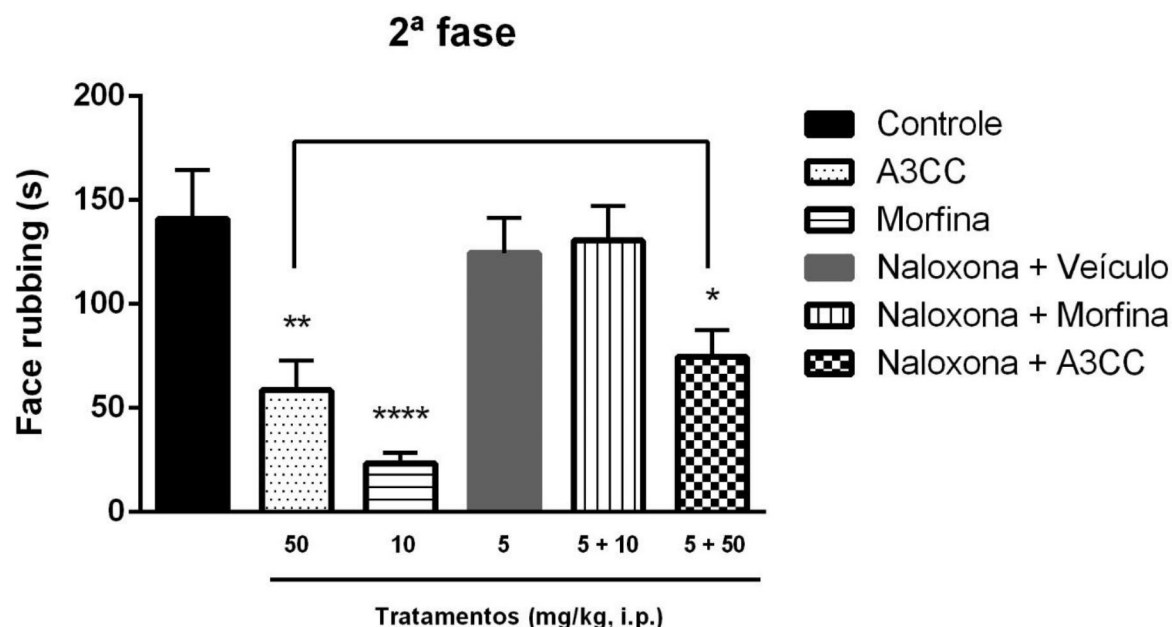
$\pm 16,5$) não houve diferença significativa no tempo de reação provocado pelo estímulo doloroso quando comparado ao grupo que recebeu apenas a naloxona, indicando que nesse caso houve reversão do efeito promovido pela interação da morfina com os receptores opioides.

Gráfico 11. Investigação da participação via opioide no efeito do ácido 3-cumarino carboxílico na primeira fase da formalina orofacial.



Efeito do pré-tratamento com naloxona (5 mg/kg, s.c.) na antinocicepção causada pelo ácido 3-cumarino carboxílico (A3CC: 50 mg/kg, i.p.), na primeira fase do teste da formalina. Cada coluna representa média $\pm$ e.p.m. (n=6) (ANOVA "one-way" seguido pelo teste de Tukey). **p<0,01 e ***p<0,001 *versus* grupo controle. Fonte: Elaborado pelo autor.

Gráfico 12. Investigação da participação via opioide no efeito do ácido 3-cumarino carboxílico na segunda fase da formalina orofacial.

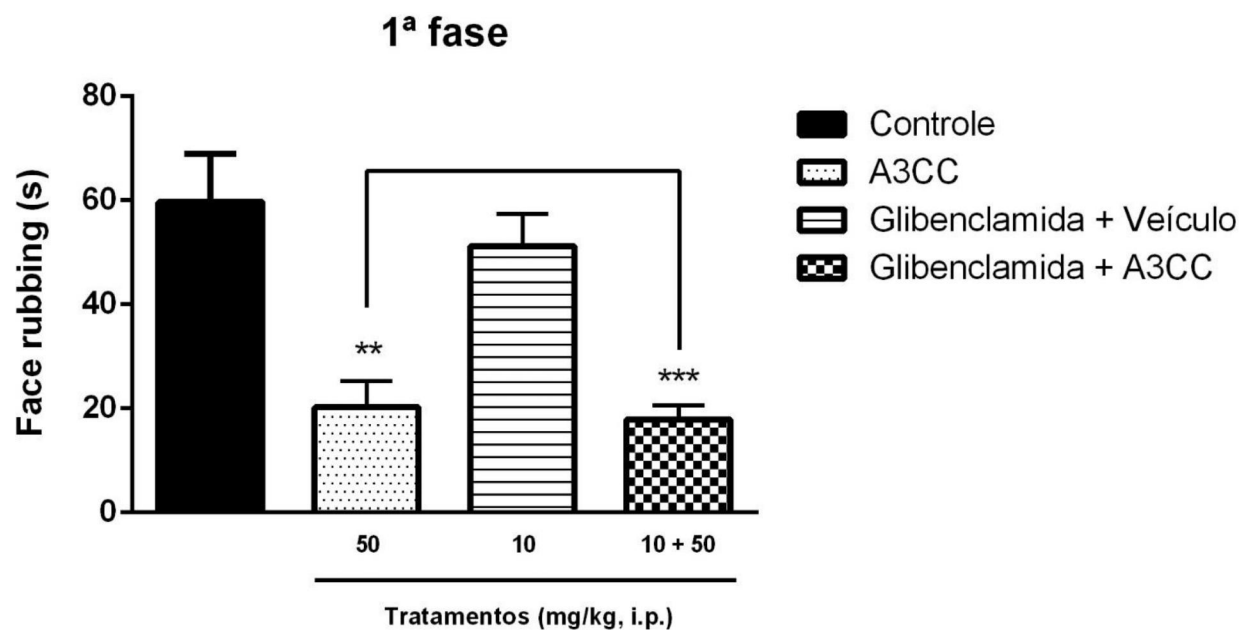


Efeito do pré-tratamento com naloxona (5 mg/kg, s.c.) na antinocicepção causada pelo ácido 3-cumarino carboxílico (A3CC: 50 mg/kg, i.p.), na segunda fase do teste da formalina. Cada coluna representa média ± e.p.m. (n=6) (ANOVA “one-way” seguido pelo teste de Tukey). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e **** $p < 0,0001$ versus grupo controle. Fonte: Elaborado pelo autor.

6.12 Interação do ácido 3-cumarino carboxílico com canais K^+_{ATP} no teste da formalina orofacial

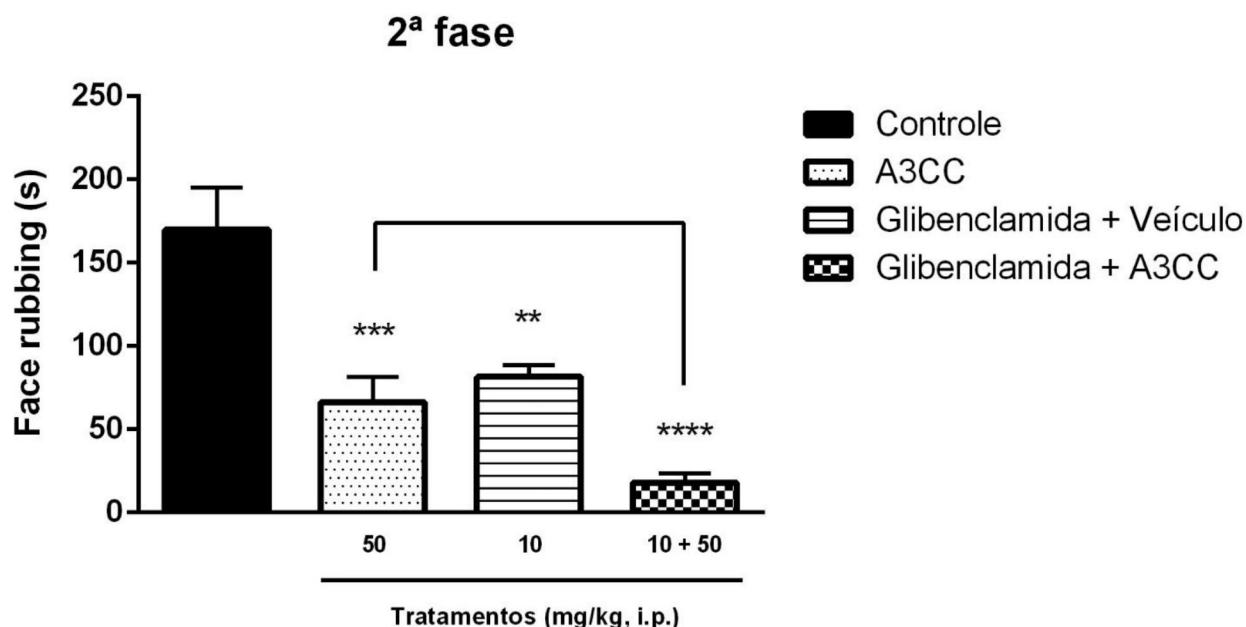
Como apresentado nos Gráficos 13 e 14, os camundongos tratados com ácido 3-cumarino carboxílico (50 mg/kg, i.p.) apresentaram uma diminuição na resposta à dor de 65,9% ($20,2 \pm 4,9$) na primeira e 61,0% ($66,2 \pm 15,0$) na segunda fase, quando comparados ao grupo controle ($59,3 \pm 9,1$ e $169,9 \pm 25,7$). No grupo de animais que recebeu apenas a glibenclamida (10 mg/kg, i.p.), não foi observada qualquer alteração no tempo de *face rubbing* na primeira fase ($51,2 \pm 6,2$), em relação ao grupo controle. O pré-tratamento com glibenclamida nos animais que posteriormente receberam o ácido 3-cumarino carboxílico demonstrou inibição de 65,0% ($17,9 \pm 2,6$) e 77,8% ($18,1 \pm 5,3$) do comportamento nociceptivo. O efeito do grupo tratado apenas com o A3CC e do grupo que recebeu A3CC + glibenclamida é igual, indicando que não houve a reversão do efeito.

Gráfico 13. Investigação da participação dos canais K^+_{ATP} no efeito do ácido 3-cumarino carboxílico na primeira fase da formalina orofacial.



Efeito do pré-tratamento com glibenclamida (10 mg/kg, i.p.) na antinocicepção causada pelo ácido 3-cumarino carboxílico (A3CC, 50 mg/kg, i.p.), na primeira fase do teste da formalina. Cada coluna representa média $\pm$ e.p.m (n=6) (ANOVA “one-way” seguido pelo teste de Tukey). ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ *versus* grupo controle. Fonte: Elaborado pelo autor.

Gráfico 14. Investigação da participação dos canais K^+_{ATP} no efeito do ácido 3-cumarino carboxílico na segunda fase da formalina orofacial.

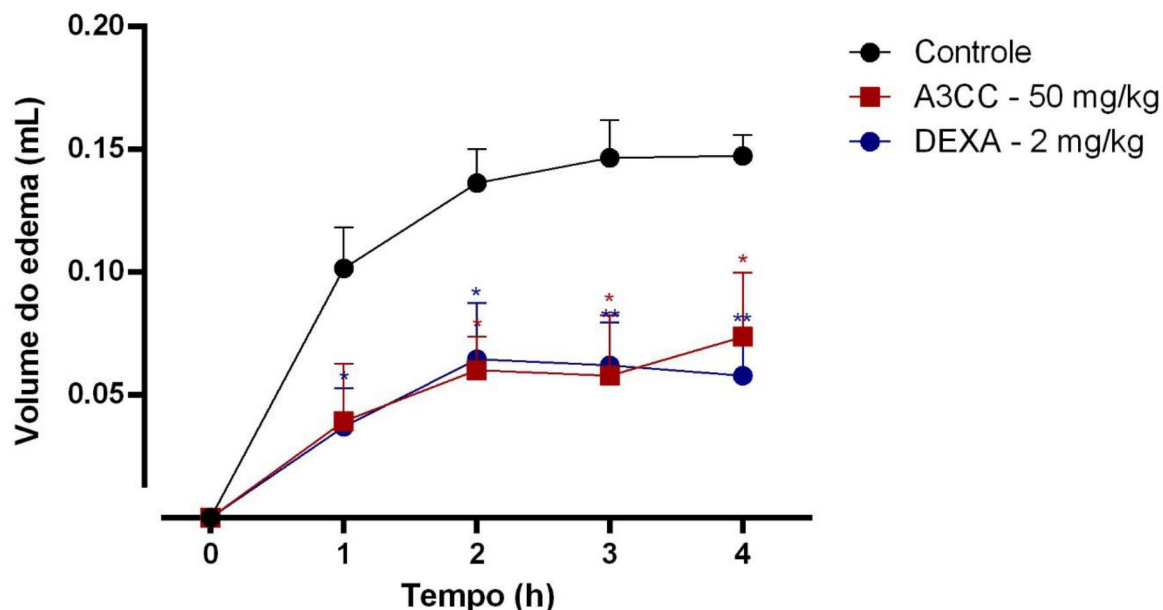


Efeito do pré-tratamento com glibenclamida (10 mg/kg, i.p.) na antinocicepção causada pelo ácido 3-cumarino carboxílico (A3CC, 50 mg/kg, i.p.), na segunda fase do teste da formalina. Cada coluna representa média $\pm$ e.p.m (n=6) (ANOVA "one-way" seguido pelo teste de Tukey). **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001 *versus* grupo controle. Fonte: Elaborado pelo autor.

6.13 Efeito do ácido 3-cumarino carboxílico no edema de pata induzido por carragenina

A administração de ácido 3-cumarino carboxílico na dose de 50 mg/kg, i.p., reduziu significativamente o edema gerado na pata direita 2 horas (0.06 ± 0.01), 3 horas (0.06 ± 0.02) e 4 horas (0.07 ± 0.02) após a injeção intraplantar de carragenina, quando comparado ao grupo controle (0.14 ± 0.01 , 0.15 ± 0.02 e 0.15 ± 0.01). Na primeira hora (0.04 ± 0.02), porém, não houve diferença significativa na variação do volume em relação ao controle (0.10 ± 0.02). O pré-tratamento com dexametasona inibiu a formação de edema de pata nas quatro horas observadas (0.04 ± 0.01 , 0.06 ± 0.02 , 0.06 ± 0.02 e 0.06 ± 0.01), conforme esperado (Gráfico 15).

Gráfico 15. Efeito do ácido 3-cumarino carboxílico no edema de pata induzido por carragenina.



Efeito do ácido 3-cumarino carboxílico (50 mg/kg, i.p.) e dexametasona (DEXA, 2 mg/kg, s.c.) no edema de pata induzido por carragenina. Cada linha representa a média $\pm$ e.p.m. ($n = 6$). Os dados foram analisados por Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ em relação ao grupo controle. Fonte: Elaborado pelo autor.

6.14 Avaliação da ancoragem molecular do ácido 3-cumarino carboxílico com possíveis alvos farmacológicos

As estruturas cristalografadas 3D da COX-1 em complexo com flubirprofeno (PDB ID 1CQE), COX-1 em complexo com o ácido araquidônico (PDB ID 1DIY), COX-2 em complexo com flubirprofeno (PDB ID 3PGH) e COX-2 em complexo com um inibidor seletivo (PDB ID 1CX2) foram adquiridas através do banco de dados do Protein Data Bank (PDB). A estrutura 2D do ácido 3-cumarino carboxílico foi adquirida a partir do banco de dados do PubChem e criada em 2D no *software* Marvin. No *software* Standardizer a estrutura 2D do ácido 3-cumarino carboxílico foi canonizada, foram adicionados hidrogênios, foi realizada a conversão da forma aromática, e o gráfico molecular em 3D foi limpo.

Para identificar a melhor energia de interação ligante-enzima e os resíduos potencialmente envolvidos, os alvos foram acoplados ao ácido 3-cumarino carboxílico. Como mostrado nas tabelas 8, 9, 10 e 11 foram utilizados quatro algoritmos com

diferentes funções de pontuação, Moldock Score, Plants Score, GOLD Score e Autodock Score. A partir do consenso entre todas as pontuações obtidas da interação entre a estrutura cristalográfica e ácido 3-cumarino carboxílico, percebe-se que a 1CX2 (COX-2) obteve a menor probabilidade de interação com o A3CC, com 59%, quando comparado à interação com o ligante COX-2 seletivo SC-558. Em contrapartida, a probabilidade de interação com a 3PGH (COX-2) alcançou 81%, quando comparado à interação com o flubirprofeno, um AINE não seletivo (Tabela 10). Todas as ancoragens apresentaram valores de RMSD abaixo de 2, indicando que o *docking* molecular foi válido.

Tabela 8. Predição da probabilidade de interação entre A3CC e COX-1, -2 utilizando a função de pontuação Moldock Score.

Isoforma	PDB	Ligante	Moldock Score	P
COX-1	1CQE	Flubirprofeno	-104,29	74%
		A3CC	-77,07	
	1DIY	AA	-132,49	46%
		A3CC	-61,08	
COX-2	3PGH	Flubirprofeno	-98,93	79%
		A3CC	-77,89	
	1CX2	SC-558	-146,30	48%
		A3CC	-70,55	

Legenda: P – Probabilidade de interação. Os valores representam a comparação com a interação do ligante cristalográfico. Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 9. Predição da probabilidade de interação entre A3CC e COX-1, -2 utilizando a função de pontuação Plants Score.

Isoforma	PDB	Ligante	Plants Score	P
COX-1	1CQE	Flubirprofeno	-310,79	76%
		A3CC	-240,92	
	1DIY	AA	-551,22	55%
		A3CC	-303,06	
COX-2	3PGH	Flubirprofeno	-573,21	75%
		A3CC	-429,79	
	1CX2	SC-558	-570,94	60%
		A3CC	-342,61	

Legenda: P – Probabilidade de interação. Os valores representam a comparação com a interação do ligante cristalográfico. Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 10. Predição da probabilidade de interação entre A3CC e COX-1, -2 utilizando a função de pontuação GOLD Score.

Isoforma	PDB	Ligante	GOLD Score	P
COX-1	1CQE	Flubirprofeno	36,3785	66%
		A3CC	23,9541	
	1DIY	AA	39,5363	56%
		A3CC	22,0424	
COX-2	3PGH	Flubirprofeno	39,9153	81%
		A3CC	32,2006	
	1CX2	SC-558	53,7745	55%
		A3CC	29,6907	

Legenda: P total – Probabilidade total de interação. Os valores representam a média dos valores obtidos individualmente por cada algoritmo. Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 11. Predição da probabilidade de interação entre A3CC e COX-1, -2 utilizando a função de pontuação Autodock Score.

Isoforma	PDB	Ligante	Autodock Score	P
COX-1	1CQE	Flubirprofeno	-8,9	88%
		A3CC	-7,9	
	1DIY	AA	-7,5	100%
		A3CC	-7,5	
COX-2	3PGH	Flubirprofeno	-9,0	89%
		A3CC	-8,0	
	1CX2	SC-558	-11,3	72%
		A3CC	-8,1	

Legenda: P – Probabilidade de interação. Os valores representam a comparação com a interação do ligante cristalográfico. Fonte: Elaborado pelo autor.

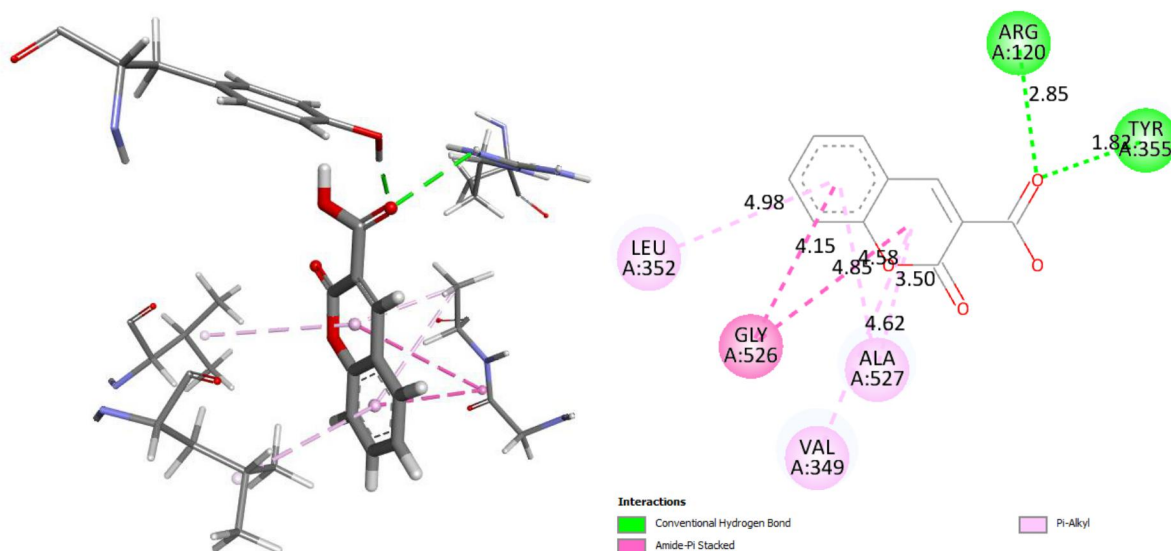
Tabela 12. Predição da probabilidade de interação entre A3CC e COX-1, -2 utilizando o consenso entre todas as funções de pontuação: Moldock Score, Plants Score, GOLD Score e Autodock Score.

Isoforma	PDB	P total	RMSD
COX-1	1CQE	77%	0,2949
	1DIY	64%	0,591
COX-2	3PGH	81%	0,1606
	1CX2	59%	0,9253

Legenda: P total – Probabilidade total de interação. Os valores representam a média dos valores obtidos individualmente por cada algoritmo. Fonte: Elaborado pelo autor.

O docking molecular do ácido 3-cumarino carboxílico com COX-1 (1CQE) exibiu ligações de hidrogênio com os resíduos de Arg120 e Tyr355, com distâncias de 2,85 Å e 1,82 Å respectivamente. O perfil de interações se assemelha ao apresentado pelo flubirprofeno, que também exibiu ligações de hidrogênio com os resíduos de Arg120 (2,32 Å) e Tyr355 (2,04 Å). Como demonstrado na figura 12, também foram exibidas interações hidrofóbicas em Leu352, Gly526, Val349 e Ala527.

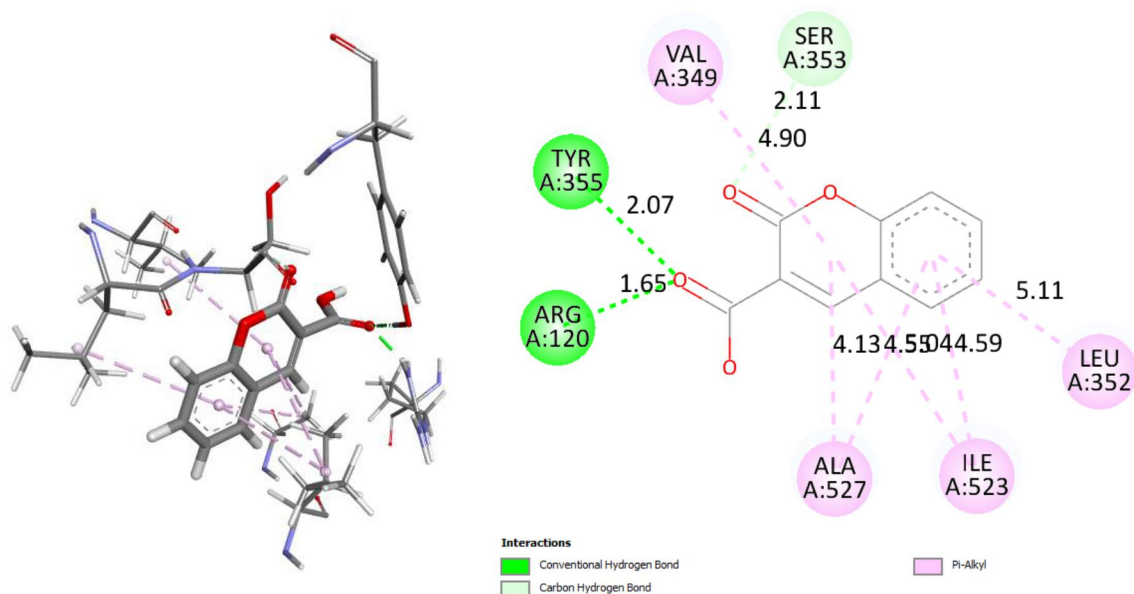
Figura 13. Mapa 2D e 3D de interações entre o A3CC e COX-1 (1CQE). As interações em verde representam ligações de hidrogênio, enquanto em roxo representam interações hidrofóbicas.



Fonte: elaborado pelo autor.

A ancoragem do ácido 3-cumarino carboxílico com COX-1 (1DIY) exibiu ligações de hidrogênio com os resíduos de Arg120, Tyr355 e Ser353, com distâncias de 1,65 Å, 2,07 Å e 2,11 Å respectivamente. O perfil de interações se assemelha ao apresentado pelo ácido araquidônico, que também exibiu ligações de hidrogênio com os resíduos de Arg120 (1,62 Å) e Tyr355 (2,02 Å). Como demonstrado na figura 13, também foram exibidas interações hidrofóbicas em Val349, Ala527, Ile523 e Leu352.

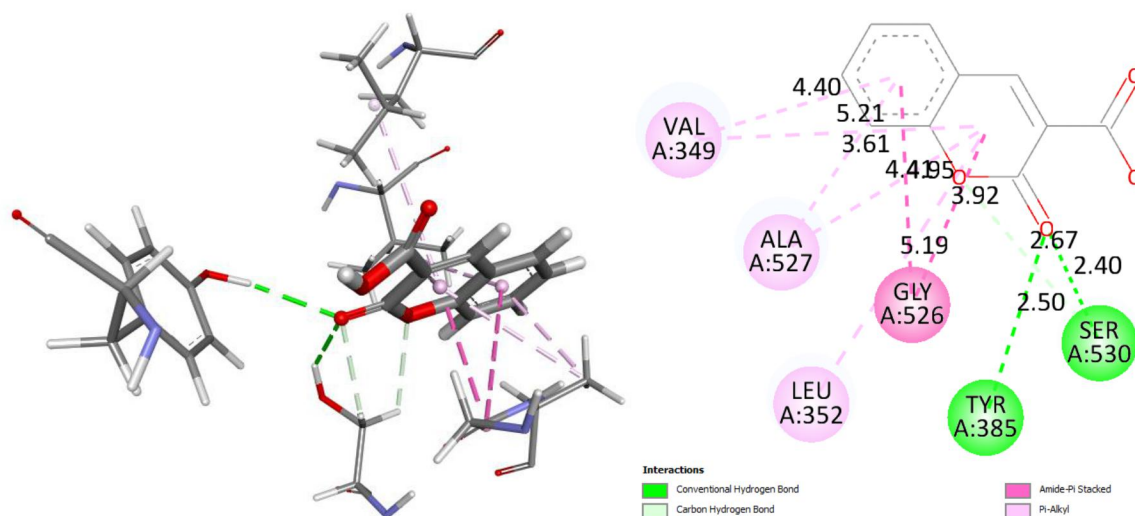
Figura 14. Mapa 2D e 3D de interações entre o A3CC e COX-1 (1DIY). As interações em verde representam ligações de hidrogênio, enquanto em roxo representam interações hidrofóbicas.



Fonte: elaborado pelo autor.

A avaliação do ácido 3-cumarino carboxílico com COX-2 (3PGH) exibiu ligações de hidrogênio com os resíduos de Ser530 e Tyr385, com distâncias de 2,40 Å e 2,50 Å respectivamente. De forma interessante, ambos oxigênios do anel α -pirona são capazes de formar ligações de hidrogênio com Ser530, e com mais de um átomo deste resíduo. O perfil difere um pouco das interações apresentadas pelo flubirprofeno, que exibiu ligações de hidrogênio com os resíduos de Arg120 (2,04 Å) e Tyr355 (2,77 Å), e interação hidrofóbica com Tyr385. Como demonstrado na figura 14, também foram exibidas interações hidrofóbicas em Val349, Ala527, Gly526 e Leu352.

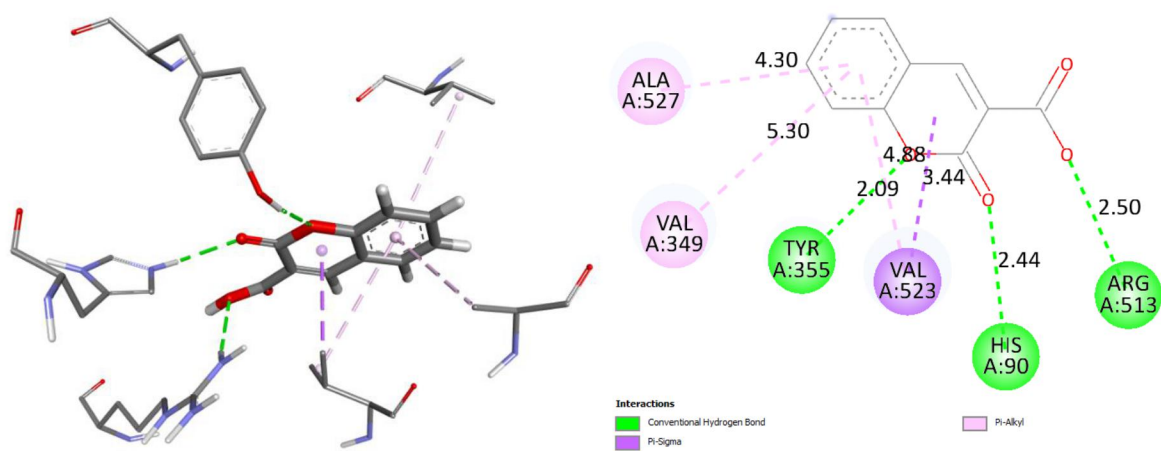
Figura 15. Mapa 2D e 3D de interações entre o A3CC e COX-2 (3PGH). As interações em verde representam ligações de hidrogênio, enquanto em roxo representam interações hidrofóbicas.



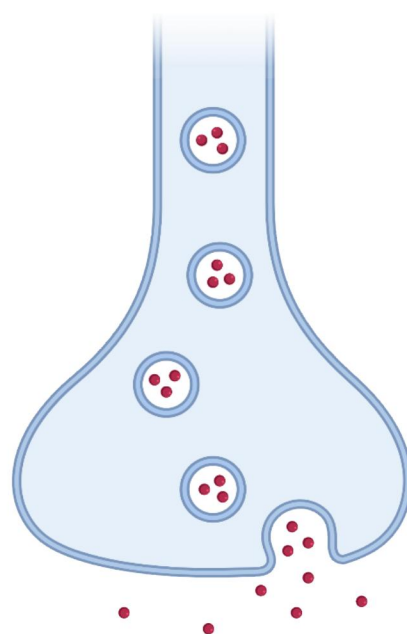
Fonte: elaborado pelo autor.

Por fim, a análise do ácido 3-cumarino carboxílico com COX-2 (1CX2) exibiu ligações de hidrogênio com os resíduos de Arg513, His90 e Tyr355, com distâncias de 2,50 Å, 2,44 Å e 2,09 Å respectivamente. O perfil de interações se assemelha ao apresentado pelo inibidor COX-2 seletivo SC-558, que também exibiu ligações de hidrogênio com os resíduos de Arg513 (2,46 Å), His90 (2,48 Å) e Tyr355 (2,93 Å), além disso interagiu com Ser353, Gln192 e Arg120. Como demonstrado na figura 15, também foram exibidas interações hidrofóbicas em Val349, Ala527 e Val523.

Figura 16. Mapa 2D e 3D de interações entre o A3CC e COX-2 (1CX2). As interações em verde representam ligações de hidrogênio, enquanto em roxo representam interações hidrofóbicas.



Fonte: elaborado pelo autor.



DISCUSSÃO

7. DISCUSSÃO

Inúmeros estudos foram conduzidos com a família das cumarinas, demonstrando que estes compostos apresentam baixa toxicidade e uma boa margem de segurança nas doses experimentais testadas. Com nisso, fica evidenciada a capacidade dessa classe em exibir diferentes atividades farmacológicas, como antibacteriana (FENG, Dongxu *et al.*, 2020), anti-inflamatória (WANG *et al.*, 2020), anticoagulante (KASPERKIEWICZ *et al.*, 2020), anticancerígeno (MATIADIS; SAGNOU, 2020), imunomodulador (MINHAS; BANSAL; BANSAL, 2020) e antioxidante (HASSANEIN *et al.*, 2020). As doses do ácido 3-cumarino carboxílico de 25, 50 e 75 mg/kg foram baseadas em estudos anteriores de toxicidade aguda, onde uma dose letal mediana (DL₅₀) de 200 mg/kg foi estabelecida (DIEKE; ALLEN; RICHTER, 1947).

Os dados do perfil de toxicidade obtidos pelo *software* OSIRIS DataWarrior mostram que o A3CC não possui efeitos mutagênicos, tumorigênicos ou irritantes, e indicam apenas uma baixa possibilidade de exibir efeitos reprodutivos, como disfunção de gônadas e hormônios. Em termos de mutagenicidade, a predição identificada *in silico* foi confirmada *in vitro*, através do teste de Ames. Foi evidenciado que o A3CC e seus metabólitos de fase I não são mutagênicos, indicando que seu emprego terapêutico é possível (THATI *et al.*, 2007). Além disso, diversas cumarinas e derivados não são mutagênicos em testes de micronúcleo (FINN *et al.*, 2002), não exibem propriedades teratogênicas (RIVEIRO *et al.*, 2010) e não são agentes genotóxicos (LAKE, 1999).

A predição do potencial farmacológico do A3CC indicou que este composto possui maior probabilidade (72%) de produzir efeitos anti-inflamatórios em organismos vivos, corroborando com efeitos previamente descritos para moléculas estruturalmente semelhantes, como a 4-hidroxycumarina, 7-hidroxycumarina e 7-metoxycumarina, onde foi identificada a capacidade desses compostos inibirem os efeitos mediados pelo factor nuclear kappa B (NF-κB), PGE₂, COX-2, 5-LOX, IL-1β, TNF-α, IL-6, MAPK, leucócitos e moléculas de adesão, bem como aumentando a ativação de fator nuclear derivado de eritróide 2 (Nrf2) (BURAN *et al.*, 2021; GAGLIOTTI VIGIL DE MELLO; FRODE, 2018; GAO *et al.*, 2020; LIU, Yan-Ping *et al.*,

2020; SONG *et al.*, 2017). Esses resultados sugerem que existe uma enorme diversidade na maneira de agir inibindo o processo inflamatório.

De maneira geral, é estabelecido que a família das cumarinas segue a regra dos cinco de Lipinski e apresenta boa permeabilidade da membrana celular, características comuns encontradas na maioria dos medicamentos disponíveis atualmente (GALKIN; FALLARERO; VUORELA, 2009). Os resultados obtidos através do *software* Molinspiration demonstram que o A3CC não viola nenhum parâmetro da regra dos 5 de Lipinski, favorecendo sua absorção pela via oral. Além disso, o perfil de *druglikeness* sugere que esse composto possui maior possibilidade de agir como um inibidor enzimático e inibidor de receptor nuclear, respectivamente.

Assim como outros derivados cumarínicos possuem a capacidade de inibir enzimas, a exemplo da COX-2, a literatura relata o potencial do A3CC em modular a atividade da enzima MAO, apresentando um log negativo de IC₅₀ (pIC₅₀) de 7,8 e uma seletividade de 2,9 para a MAO-B, enquanto demonstra uma pIC₅₀ de apenas 4,8 para MAO-A. Esses achados indicam que o A3CC é mais ativo atuando como inibidor da MAO-B, e se mostra altamente seletivo para essa isoenzima (CHIMENTI *et al.*, 2004).

Hong *et al.* (2021) investigaram 22 derivados do A3CC, com substituintes nas posições C-3 e C-7 do núcleo cumarínico. Alguns compostos apresentaram boa atividade antiproliferativa contra as linhagens celulares HeLa e HCT116. Também foi descrito que derivados hidroxilados do A3CC são capazes de inibir a síntese de DNA em linhagens celulares derivadas de carcinoma de maneira dependente da concentração (THATI *et al.*, 2007).

Além disso, as cumarinas de uma forma geral apresentam efeitos farmacológicos relacionados à sua interação com enzimas diretamente envolvidas na fisiopatologia de diversas doenças, com destaque para seu papel inibitório de MAO-B (MATOS, Maria J. *et al.*, 2020) e AchE (SINGH, Atamjit *et al.*, 2020) nas doenças neurodegenerativas. Em complemento, pode-se citar diversas outras enzimas nas quais as cumarinas podem atuar, como α -glicosidase (TAFESSE *et al.*, 2020), anidrase carbônica (SWAIN *et al.*, 2020), tirosinase (ASHOORIHA *et al.*, 2020), sulfatase (HNG *et al.*, 2020), xantina oxidase (ERA *et al.*, 2020), butirilcolinesterase (BChE) e β -secretase (BACE) 1 (CARNEIRO *et al.*, 2021). Esses achados corroboram com o perfil afinidade por alvos enzimáticos e nucleares, e somados aos dados de

potencial farmacológico, sugerem que o A3CC pode promover efeitos interagindo com proteínas específicas envolvidas no processo inflamatório.

A toxicidade das cumarinas depende de dois fatores principais: espécie e metabolismo. A via metabólica da 7-hidroxilação, que é a principal via de desintoxicação de cumarinas em seres humanos, e é apenas uma via secundária roedores. Em contraste, a principal via de metabolismo das cumarinas em ratos e camundongos é através da 3,4-epoxidação, resultando na formação de metabólitos tóxicos (LAKE, 1999). Embora exista a possibilidade das cumarinas serem hidroxiladas em todas as seis posições disponíveis (C-3, C-4, C-5, C-6, C-7 e C-8), a 7-hidroxicumarina e 3-hidroxicumarina são os principais metabólitos (BAROT *et al.*, 2015). Pela posição C-3 da estrutura do A3CC já estar ocupada com o grupo ácido, a 3-hidroxilação e consequente formação de metabólitos tóxicos torna-se inviável. A predição dos metabólicos do A3CC mostrou que ocorrem principalmente as reações de 6-hidroxilação, 7-hidroxilação, 8-hidroxilação e 5-hidroxilação, respectivamente. A metabolização ocorre mediante ação das isoenzimas CYP3A4, CYP2C9 e CYP2D6.

Juntas, as CYPs 1A2, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1 e 3A4 correspondem a cerca de 90% do metabolismo oxidativo de xenobióticos. Essas isoenzimas são essenciais ao metabolismo de fármacos e catalisam reações oxidativas, características do metabolismo de fase 1. A hidroxilação aromática é uma das transformações metabólicas mais comuns dessa fase, visto que é necessário a presença de pelo menos um anel aromático na estrutura da molécula. A regiosseletividade do processo de hidroxilação depende da natureza do substituinte ligado ao anel aromático e da interação substrato-enzima (BARREIRO; FRAGA, 2015).

A presença de grupos hidroxila na estrutura do anel do A3CC parece ser importante para alguns efeitos farmacológicos. Em avaliações da atividade antioxidante *in vitro*, a literatura descreve que inserções do grupo hidroxila promove em média um aumento de 37,8 % na capacidade de sequestro de radicais DPPH (MARTÍNEZ-MARTÍNEZ *et al.*, 2012). Isso é confirmado por outros estudos antioxidantes *in vitro* de derivados do A3CC. Os compostos 6-hidroxilados demonstraram melhores atividades de sequestro de radicais quando comparados a compostos não substituídos ou compostos contendo grupos retiradores de elétrons (nitro) e grupos doadores fracos (metoxila) na posição 6. A avaliação da relação estrutura-atividade quantitativa (QSAR) identificou que a presença de grupos hidroxila

no anel aromático do A3CC se correlaciona com maiores atividades de eliminação de radicais DPPH (GOUDGAON; SHESHIKANT; DEEPA, 2012).

Dessa forma, é possível que os metabólitos 6-hidroxilados, que por sua vez são formados majoritariamente, contribuam para o efeito final do A3CC, tendo em vista que o estresse oxidativo pode interferir em processos fisiológicos como inflamação e percepção da dor. A expressão gênica pró-inflamatória induzida por espécies reativas de oxigênio (EROs) promove a ativação de leucócitos e síntese exagerada de citocinas e mediadores inflamatórios, conduzindo o organismo a um estado de inflamação crônica. As EROs podem ativar a expressão gênica através da via da MAPK ou diretamente por meio de fatores transcricionais, como NF- κ B (RANNEH *et al.*, 2017). Além disso, os nervos dos mamíferos são extremamente suscetíveis a radicais livres, devido ao seu alto teor em fosfolipídios e mitocôndrias axonais, e de uma fraca defesa antioxidante neuronal. Em virtude dessas limitações, as EROs podem atuar por diferentes vias para promover a sensibilização periférica/central, impactando a forma como será conduzido o estímulo nocivo. Além de promover redução nas defesas antioxidantes, disfunção mitocondrial, peroxidação lipídica e dano ao DNA, o estresse oxidativo no SNC também promove ativação de células da glia e leucócitos. O aumento de cálcio intracelular é peça chave na etiologia da dor neuropática, e a ativação direta de canais da família dos receptores de potencial transitório (TRP) por EROs permite o influxo deste íon, contribuindo para a sensibilização neuronal (CARRASCO *et al.*, 2018).

O potencial antitumoral do A3CC, de seus derivados hidroxilados, e de seus respectivos complexos com prata foram investigados por Bhumika *et al.* (2007). A hidroxilação do A3CC e a subsequente complexação com prata levaram à produção de uma série de compostos com citotoxicidade dramaticamente aumentada, sugerindo que a hidroxilação, particularmente na posição 6, juntamente com a coordenação de um íon de prata, desempenha um papel importante na mediação não apenas da potência, mas também da cito seletividade. A presença do grupo carboxilato no núcleo cumarínico do A3CC assumiu papel de destaque para o efeito, permitindo uma forte ligação à prata (THATI *et al.*, 2007). Esses estudos indicam que os metabólitos gerados a partir do A3CC podem ser ativos, contribuindo para o efeito farmacológico da molécula. A predição de risco de toxicidade também evidenciou que os metabólitos hidroxilados, quase em sua totalidade, não possuem efeitos

mutagênicos, tumorigênicos, irritantes ou reprodutivos, sugerindo que são seguros do ponto de vista toxicológico.

Os eritrócitos são células altamente vulneráveis a reações envolvendo radicais livres, e portanto, susceptíveis a peroxidação lipídica e hemólise (BRANDÃO *et al.*, 2005; SCHIAR *et al.*, 2007). Por serem o principal componente na circulação sanguínea, eles constituem um modelo celular fundamental para estudar potenciais interações do sangue com agentes químicos e farmacológicos. Alterações morfológicas, ruptura da integridade da membrana eritrocitária, e subsequente hemólise podem ser usadas para determinar a citotoxicidade de vários compostos (MUÑOZ-CASTAÑEDA *et al.*, 2006; PODSIEDLIK; MARKOWICZ-PIASECKA; SIKORA, 2020).

A hemólise, que é caracterizada por danos celulares e extravasamento de hemoglobina devido a fatores mecânicos, alterações no equilíbrio ácido/base, pressão osmótica ou xenobióticos, e é um fator limitante para o sucesso terapêutico ou desenvolvimento de novas drogas (SOUSA *et al.*, 2020). O efeito tóxico produzido por determinadas substâncias pode estar diretamente relacionado a altas capacidades hemolíticas, visto que as hemácias são facilmente sensibilizadas por xenobióticos (SOUSA *et al.*, 2021). A liberação de produtos eritrocitários aumenta a susceptibilidade das células neuronais a sofrerem impacto dos efeitos citotóxicos gerados por espécies reativas de oxigênio, principalmente em virtude do ferro e hemoglobina (PODSIEDLIK; MARKOWICZ-PIASECKA; SIKORA, 2020). A fragilidade osmótica avalia a influência de substâncias nas hemácias e indica a redução do processo de hemólise, expressando a capacidade em manter a integridade estrutural das membranas após exposição ao estresse osmótico (DE ARAÚJO *et al.*, 2018).

Geralmente a cumarina e seus análogos possuem atividade anti-hemolítica muito boa. Para a maioria das biscumarinas praticamente inexistente hemólise (MUKHERJEE *et al.*, 2018). Um grau mais alto de hemólise leva à quebra maciça dos eritrócitos, e a compatibilidade do composto com o sangue diminui. Relatos da literatura revelam que os valores de hemólise são baixos quando inferiores a 40%, entre 40 e 70% hemólise moderada e acima de 70% hemólise alta (RANGEL *et al.*, 1997).

A literatura descreve que síntese de novos ésteres cumarínicos resultou em compostos capazes de exibir alta capacidade de estabilização da membrana eritrocitária e, conseqüentemente, proteger significativamente contra a lise induzida por solução hipotônica. A proteção máxima alcançou o valor de 94,36 % (AL-WABLI; FOUAD; EL-HAGGAR, 2018).

Zhang *et al.* (2014) avaliaram a toxicidade de cinco 4-arilcumarinas e doze 3,4-dihidro-4-arilcumarinas em células da série vermelha. Dos dezessete derivados cumarínicos, nenhum apresentou elevada, ou até mesmo moderada citotoxicidade. Na concentração de 100 µg/mL, a análise hemolítica mostrou que apenas dois compostos apresentaram atividade hemolítica com pouco maior que 5%. Três compostos (200 mg/mL) apresentaram citotoxicidade muito fraca às hemácias e induziram menos de 3,8% de hemólise. E ainda, sete compostos não mostraram citotoxicidade detectável para eritrócitos (ZHANG, Keyun *et al.*, 2014). De forma semelhante, Mukherjee *et al.* (2018) realizaram um estudo visando desvendar eventos celulares que ocorrem após a exposição de um derivado bioativo da 4-hidroxycumarina com células sanguíneas humanas. Foi observado que o derivado exibiu hemólise insignificante quando em contato direto com eritrócitos.

O ácido 3-cumarino carboxílico apresenta efeito hemolítico de baixo a moderado, pouco acima do padrão observado em outras classes de cumarinas. É possível que o esqueleto básico compartilhe propriedades que impeça interações deletérias com células sanguíneas. O aumento gradativo da concentração demonstra aumento do potencial hemolítico, sendo necessário prezar por doses mais baixas. Apesar disso, fatores como via de administração e formulação podem favorecer o uso da molécula, reduzindo ainda mais o grau de hemólise. O mesmo perfil é observado na avaliação da fragilidade osmótica, onde concentrações mais baixas são capazes de impedir o rompimento da membrana eritrocitária, demonstrando o efeito benéfico sobre esse componente celular. Uma vez que não há limitações citotóxicas, a molécula pode ser considerada biocompatível para estudos *in vivo*.

O presente trabalho investigou pela primeira vez o potencial antinociceptivo e anti-inflamatório do ácido 3-cumarino carboxílico em modelos animais. O estudo da atividade analgésica do ácido 3-cumarino carboxílico começou com o teste de contorções, um modelo clássico de dor visceral usado para triagem de novas substâncias analgésicas ou anti-inflamatórias (COLLIER *et al.*, 1968). Nesse modelo

a gênese do estímulo nocivo é caracterizada pela liberação de mediadores inflamatórios (histamina, serotonina, citocinas e eicosanoides) e ativação de neurônios nociceptivos (REJÓN-ORANTES *et al.*, 2013).

Descobriu-se que o ácido 3-cumarino carboxílico produz uma antinocicepção substancial no teste de contorções. Os dados mostraram que o A3CC reduz de forma absoluta o número de contorções induzidas pelo ácido acético nas três doses testadas. Por ser um teste inespecífico, foram necessárias outras abordagens para investigar se o efeito estava sendo produzido periféricamente, em virtude de uma possível atenuação do processo inflamatório, com efeitos periféricos, ou a nível de SNC.

Já foi identificado que a fração acetato de etila do *Eupatorium Triplinerve* apresenta potente ação antinociceptiva, agora mais recentemente foi demonstrado que seu constituinte majoritário, a 7-metoxicumarina, é o principal responsável por esse efeito. Essa cumarina foi capaz de reduzir significativamente o número de contorções abdominais nas contorções induzidas pelo teste do ácido acético, bem como promover uma redução dose-dependente no tempo de lambida da pata no teste da formalina (CHERIYAN *et al.*, 2017). Relatos anteriores mostram que a 7-metoxicumarina demonstrou diminuir a produção de tromboxano B₂ (TXB₂) em plaquetas humanas inibindo ciclooxygenases (SILVÁN *et al.*, 1998) e inibindo a liberação de imunoglobulina E (IgE) (WATANABE; SHINMOTO; TSUSHIDA, 2005), corroborando o efeito observado.

Park *et al.* (2013) avaliaram o efeito da cumarina simples, cuja estrutura é composta pelo esqueleto básico presente no ácido 3-cumarino carboxílico. Eles sugerem que a cumarina exerce uma propriedade antinociceptiva seletiva no modelo de dor visceral induzida pelo ácido acético, em linha com o que foi observado para o ácido 3-cumarino carboxílico.

O glutamato, principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central de vertebrados, atua tanto em receptores ionotrópicos quanto metabotrópicos (PEREIRA, Vanessa; GOUDET, 2019). A ligação do glutamato aos seus receptores desencadeia respostas neuronais excitatórias associadas à ativação do neurônio motor, respostas sensoriais agudas, incluindo o desenvolvimento de uma sensação aumentada de dor (hiperalgesia), alterações sinápticas envolvidas em certos tipos de

formação de memória, e neurotoxicidade cerebral por isquemia cerebral, bem como déficits funcionais por lesão medular (CHUNG *et al.*, 2015; HÁMOR; SCHWENDT, 2021; HANADA, 2020). A administração do glutamato provoca uma ativação direta das fibras aferentes primárias, resultando na liberação de mediadores inflamatórios e neuropeptídeos, assim como ativação dos receptores glutamatérgicos (BORDI; UGOLINI, 1999). Estudos relatam que a resposta nociceptiva induzida pelo glutamato está relacionada a receptores N-metil D-Aspartato (NMDAR) e não-NMDA localizados na região espinhal, supraespinhal e periférica (BEIRITH; SANTOS; CALIXTO, 2002). Esses receptores participam de diversas condições neuropatológicas e psiquiátricas, levando a grandes expectativas para a descoberta de novos antagonistas (HANADA, 2020).

Irvine *et al.* (2012) avaliaram a capacidade de derivados do ácido 3-cumarino carboxílico em potencializar ou inibir receptores NMDA recombinantes e nativos. O ácido 3-cumarino carboxílico apresentou atividade antagonista muito fraca nos receptores contendo GluN2A e GluN2C (15 – 20% de inibição) e foi efetivamente inativo nos receptores contendo GluN2B e GluN2D (0 – 5% de inibição). A introdução de um substituinte bromo ou iodo na posição 6 aumentou a atividade inibitória, especialmente nos receptores contendo GluN2A. O ácido 6-bromocumarina-3-carboxílico inibiu aproximadamente 89, 63, 56 e 24% das respostas GluN2A-D. O derivado 6-iodo apresentou atividade antagonista semelhante, inibindo 93, 55 e 23% das respostas dos receptores GluN2A, GluN2B e GluN2D, respectivamente (COSTA *et al.*, 2010; IRVINE *et al.*, 2012).

A introdução de substituintes polares 7-hidroxi, 7-metoxi ou 7-dietilamino ao anel cumarínico não melhorou a atividade antagonista de NMDAR além daquela observada com o ácido 3-cumarino carboxílico. A adição de um grupo bromo na posição 8 aumentou a potência do antagonista de NMDAR, mas reduziu a seletividade para GluN2A (IRVINE *et al.*, 2012).

O glutamato também induz exocitose de aminoácidos excitatórios, óxido nítrico, cininas e PGE₂ (BEIRITH; SANTOS; CALIXTO, 2002). Na inflamação ou lesão tecidual, há elevação da liberação de glutamato pelas fibras aferentes primárias que ativam receptores específicos no tecido periférico (MILLER *et al.*, 2011). O ácido 3-cumarino carboxílico apresentou efeito antinociceptivo no teste do glutamato orofacial, sugerindo uma possível interação com o sistema glutamatérgico e/ou inibição do

processo inflamação. De acordo com o que foi evidenciado por Irvine *et al.* (2012) é possível que parte da atividade antinociceptiva do ácido 3-cumarino carboxílico esteja relacionada à sua capacidade de antagonizar o receptor NMDA em GluN2A e GluN2C. Mais estudos são necessários para esclarecer a ação do ácido 3-cumarino carboxílico sobre os receptores de glutamato, pois compostos com estruturas semelhantes possuem diferentes interações dentro do sistema glutamatérgico.

Para confirmar o efeito antinociceptivo do ácido 3-cumarino carboxílico, foi realizado o teste da formalina orofacial. A formalina subcutânea ativa os nociceptores A δ e C, bem como os neurônios nociceptivos espinais e trigeminais, e provoca danos teciduais dependente da concentração (RABOISSON; DALLEL, 2004). Por estar relacionado com dano tecidual, o teste de formalina mimetiza algumas características da dor aguda no ser humano (HUNSKAAR, S; FASMER; HOLE, 1985). Esse teste permite examinar diferentes níveis de integração do estímulo nocivo de longa duração nos sistemas nervosos periférico e central (HUNSKAAR, STEINAR; HOLE, 1987). A resposta à formalina é bifásica, com uma primeira fase precoce e de curta duração, promovida pela estimulação direta dos nociceptores, refletindo a dor mediada centralmente. Em seguida vêm um período de pausa, e depois uma segunda fase prolongada (tônica), causada pela inflamação local com liberação de mediadores inflamatórios e hiperalgésicos (ABBOTT; FRANKLIN; WESTBROOK, 1995; HUNSKAAR, S; FASMER; HOLE, 1985). Além disso, existe a possibilidade de alterar a sensibilidade do teste alterando a concentração de formalina, tornando possível detectar efeitos antinociceptivos fracos, e avaliar as respostas a diferentes intensidades de estímulo (CODERRE, Terence J. *et al.*, 2004; ROSLAND *et al.*, 1990).

Injetada na região perinasal, a formalina gera respostas comportamentais características que consistem em episódios recorrentes de fricção da face (LUCCARINI *et al.*, 2006). O tempo que os animais exibem esse comportamento é um índice confiável para quantificar a nocicepção na região trigeminal (RABOISSON; DALLEL, 2004). O teste de formalina orofacial representa um dos modelos animais de nocicepção cutânea persistente na região trigeminal. Ele avalia a magnitude das sensações nociceptivas provocadas por um estímulo químico de longa duração, enquanto a maioria dos testes comumente usados para o estudo da nocicepção orofacial envolve estímulos nocivos breves, como estimulação elétrica da polpa do dente, estimulação térmica nociva ou mecânica da pele facial. Embora esses últimos

procedimentos forneçam informações valiosas sobre alguns dos mecanismos de nocicepção, eles não se assemelham à dor clínica (CAHUSAC *et al.*, 1990; CODERRE, TJ; MELZACK, 1992; ROSENFELD; BROTON; CLAVIER, 1978).

No presente estudo foi verificado que o ácido 3-cumarino carboxílico teve efeito antinociceptivo tanto na fase inicial quanto na fase tardia do teste da formalina. Esse resultado está de acordo com outros achados, uma vez que o efeito antinociceptivo de outras cumarinas com esqueletos químicos semelhantes já foi identificado em ambas as fases do teste da formalina intraplantar (DE ALMEIDA BARROS *et al.*, 2010).

Alonso Castro *et al.* (2018) demonstraram que o Soulatrolide, uma cumarina natural sintetizada pelas folhas da espécie *Calophyllum*, mostrou efeitos antinociceptivos no modelo de ácido acético, e mostrou efeito antinociceptivo em ambas as fases do teste de formalina. Esse efeito anti-inflamatório foi maior do que outras cumarinas diidropiranas e semelhante ao exibido pelo naproxeno (ALONSO-CASTRO *et al.*, 2018).

A propriedade inibitória do ácido 3-cumarino carboxílico em ambas as fases do teste da formalina orofacial não estabelece se o efeito mediado por esse composto ocorre a nível central ou periférico, sendo necessário, portanto, investigar possíveis mecanismos de ação.

O efeito antinociceptivo da cumarina pode ser mediado pela ativação de receptores opioides centrais (PARK *et al.*, 2013). Este é um ponto de partida para a investigação do mecanismo do ácido 3-cumarino carboxílico. Os receptores opióides são membros da superfamília de GPCRs, acoplados a efetores intracelulares via proteína G, principalmente do tipo inibitória (SMITH, Maree T, 2008). A densidade de receptores opioides é alta em várias regiões cerebrais, no corno dorsal da medula espinhal, nos terminais nervosos periféricos e nos tecidos periféricos (FIELDS, 2000). Existem três tipos de receptores opioides, μ (Mu), δ (delta) e κ (kappa), sendo o μ com destacada participação na via da dor, inclusive os efeitos antinociceptivos da maioria dos analgésicos opioides são produzidos pela ativação do receptor μ (SMITH, Maree T, 2008). Os ligantes endógenos para receptores opioides incluem as endomorfina, β -endorfina, met- e leu-encefalina e dinorfinas (RAYNOR *et al.*, 1994). Agonistas opioides ativam esses receptores para produzir analgesia através do sistema inibitório

descendente, impedindo a transmissão nociceptiva excitatória ascendente (FIELDS, 2000). Estudos demonstram que as ações periféricas dos opioides estão aumentadas na inflamação, sugerindo que analgésicos opioides periféricamente seletivos podem ser benéficos como futuros agentes analgésicos, desprovidos de efeitos colaterais no SNC (SMITH, Maree T, 2008). Conforme demonstrado nos resultados, o pré-tratamento com naloxona não reverteu o efeito antinociceptivo do ácido 3-cumarino carboxílico, sugerindo que este composto não exerce seu efeito pela via opioide.

Os canais K^{+}_{ATP} são compostos por 8 subunidades proteicas. Quatro subunidades são membros da família de canais de potássio retificadores internos (Kir6.x), que podem ser Kir6.1 ou Kir6.2, enquanto as outras 4 subunidades são receptores de sulfonilureia (SUR), variando entre SUR1, SUR2A, SUR2B e SUR2C (INAGAKI *et al.*, 1996). A glibenclamida, uma sulfonilureia que atua bloqueando os canais K^{+}_{ATP} , é comumente usada caracterizar o efeito de substâncias que atuam nesse alvo (PEREIRA, Ticiano Praciano *et al.*, 2010).

Os canais K^{+}_{ATP} são fisiologicamente inibidos pelo trifosfato de adenosina intracelular (ATPi) e sua ativação acontece quando o ATPi é reduzido em condições de desafios metabólicos (AGUILAR-BRYAN; BRYAN, 1999). Estes canais possuem ampla distribuição, incluindo cardiomiócitos, células α e β pancreáticas, músculo liso, músculo esquelético e neurônios centrais (AL-KARAGHOLI *et al.*, 2017). Também é evidenciada a presença dos canais K^{+}_{ATP} no sistema trigeminal, visto que as subunidades Kir6.1, Kir6.2, SUR1 e SUR2 são expressas no gânglio trigeminal e no núcleo trigeminal caudalis (PLOUG *et al.*, 2012). No geral, sua atuação é essencial na regulação da secreção de insulina, no controle do tônus vascular e na proteção das células contra o estresse metabólico (ZOGA *et al.*, 2010). A ativação deste canal promove efluxo de potássio (K^{+}), diminuindo a excitabilidade, uma vez que promove hiperpolarização da membrana. Além disso, ele pode atenuar a liberação de neurotransmissores excitatórios e proteger células nervosas contra apoptose (YAMADA; INAGAKI, 2005). O efeito contrário é verdadeiro, visto que a inibição das correntes de K^{+} contribuem para a dor neuropática através do aumento da excitabilidade, liberação amplificada de neurotransmissores e aumento da suscetibilidade à morte celular (WU, Xue-Feng *et al.*, 2011). Como apresentado nos resultados, o pré-tratamento com a glibenclamida não foi capaz de reverter o efeito

gerado pelo ácido 3-cumarino carboxílico, demonstrando que este não atua pelos canais K^+_{ATP} .

O perfil apresentado após a análise nos modelos de contorções abdominais, glutamato orofacial e formalina orofacial, bem como após a investigação da participação de receptores opioides e canais K^+_{ATP} , permite inferir que o efeito mediado pelo A3CC possa estar acontecendo periféricamente, através da inibição do processo inflamatório. Para investigar essa possibilidade foram realizados o modelo de edema de pata induzido por carragenina e o docking molecular para a enzima ciclooxigenase.

O edema de pata induzido por carragenina é o modelo experimental mais realizado para avaliar o efeito anti-inflamatório e apresenta alta sensibilidade e reprodutibilidade (FONSÊCA *et al.*, 2016). A carragenina é um forte estimulante de mediadores pró-inflamatórios para inflamação subaguda utilizada na determinação de drogas anti-inflamatórias eficazes (ZHAO *et al.*, 2019). Esse modelo é reconhecido por produzir um padrão fásico de inflamação (ROSA *et al.*, 2018). A fase primária é caracterizada pela liberação de histamina e serotonina, tornando-se mais evidente entre 60-120 min após o estímulo (ROSA *et al.*, 2018). Já a segunda fase compreende a liberação de bradicinina e prostaglandinas por neutrófilos, eosinófilos e basófilos, perceptível 120 minutos após a administração de carragenina (ROSA *et al.*, 2018; WEI *et al.*, 2018). Também foi investigada a hipótese desse modelo atuar via NF κ B, estimulando a expressão de moléculas de adesão em células endoteliais e aumentando a transcrição de COX-2 em neutrófilos recrutados (MONTES *et al.*, 2016). Assim, a maioria dos anti-inflamatórios tem como alvo a segunda fase (FEHRENBACHER; VASKO; DUARTE, 2012). Os resultados demonstram que o ácido 3-cumarino carboxílico reduziu o edema de pata induzido por carragenina durante o período de observação de 4 horas, exceto na primeira hora, sugerindo existe um componente anti-inflamatório envolvido no seu efeito.

Barros *et al.* (2010) observaram que a administração oral de 7-hidroxycumarina produz efeito antinociceptivo quando avaliada em contorções induzidas por ácido acético, bem como nas duas fases do teste de formalina. Pelas características das metodologias utilizadas, sugere-se que, pelo menos em parte, o efeito da 7-hidroxycumarina se deva à sua ação anti-inflamatória, uma vez que também foi capaz de reduzir o edema de pata induzido por carragenina em camundongos.

A predição de permeabilidade da barreira hematoencefálica permite identificar se um composto é capaz ou não de ser eficaz em alvos específicos presentes no SNC (AGBO *et al.*, 2020). Conforme dados obtidos a partir dos cálculos de descritores no Volsurf+, o A3CC apresenta baixa permeabilidade na BHE, indicando que de fato, seu efeito antinociceptivo acontece periféricamente, corroborando com um possível mecanismo anti-inflamatório em sua ação.

Uma revisão sistemática recente relatou o excepcional desempenho anti-inflamatório das cumarinas no modelo de edema induzido por carragenina. Dos 20 estudos avaliados, abrangendo modelos de edema de orelha, pata, pulmão e cólon, não houve nenhum em que as cumarinas não fossem capazes de inibir a formação do edema (GAGLIOTTI VIGIL DE MELLO; FRODE, 2018). Conforme relatado por Al Wabli *et al.* (2018), a síntese de nove ésteres cumarínicos resultou na significativa redução no volume de edema de pata por todos os compostos, exibindo efeito inibitório máximo de 94,9%, 120 min após o estímulo (AL-WABLI; FOUAD; EL-HAGGAR, 2018).

Estudos anteriores demonstraram que certas cumarinas apresentam efeitos anti-inflamatórios e antinociceptivos (DE ALMEIDA BARROS *et al.*, 2010; DE LIMA, Flávia Oliveira *et al.*, 2011). A seselina, por exemplo, uma ângulo-pirancoumarina amplamente distribuída no reino vegetal, apresentou atividade antinociceptiva apresentando 41,4% de inibição no teste de contorções abdominais de forma dose-dependente. Além disso, provocou uma inibição significativa da resposta da formalina durante a fase inflamatória em 95,3% (LIMA, Vilma *et al.*, 2006). A seselina também exibiu atividade anti-inflamatória através de sua ação em Jak2 (FENG, Lili *et al.*, 2019).

De forma semelhante ao A3CC, o extrato metanólico de *Citrus grandis* administrado oralmente, bem como o extrato de acetato de etila foram capazes de inibir o edema de pata induzido por carragenina até 4 h após a injeção subcutânea de carragenina. Tais extratos, contendo uma série de cumarinas bioativas, foram capazes de produzir potentes efeitos anti-inflamatórios, suprimindo a liberação de bradicinina, TNF- α , leucotrienos, IL-1 β e PGE₂ (ZHAO *et al.*, 2019).

Diversos estudos confirmam o potente efeito anti-inflamatório das cumarinas (REVANKAR *et al.*, 2017; YANG; LEE; SHIN, 2015). Hemshekhar *et al.*

(2013) relataram uma melhora significativa da regulação não enzimática marcadores inflamatórios como TNF- α , IL-1 β , IL-6, COX-2 e PGE₂ pela 4-metil esculetina (HEMSHEKHAR *et al.*, 2013). Em outro estudo, a libanoridina foi capaz de inibir a expressão de mediadores inflamatórios como a óxido nítrico sintase induzível (iNOS), COX-2, TNF- α e IL-1 β de forma dose-dependente em células HT-29 estimuladas por LPS. Além disso, observou-se que a atividade de transcrição de NF- κ B induzida por LPS foi inibida (KANG *et al.*, 2009).

Em consonância com o observado em outros estudos envolvendo cumarinas, o efeito analgésico de outra furanocumarina de ocorrência natural, a imperatorina, foi investigada quanto a sua capacidade em inibir COX-2. Nos modelos de contorções induzidas por ácido acético houve 75,8% de redução do comportamento nociceptivo, enquanto na formalina obteve diminuição de 41,6% (1ª fase) e 60,8% (2ª fase). Resultados imuno-histoquímicos revelaram acentuada redução na expressão de COX-2, iNOS e NF κ B. Também reduziu significativamente os níveis de TNF- α e IL-1 β . No edema de pata induzido por carragenina, o efeito anti-inflamatório máximo foi evidente após 4h (SINGH, Gurjit *et al.*, 2020).

A maioria das moléculas descritas na literatura que seguem a estrutura das cumarinas simples possuem atividade antioxidante, anti-inflamatória e antibacteriana (BAROT *et al.*, 2015). Uma das abordagens para obter novos derivados é inserir grupos funcionais no núcleo cumarínico básico. Essas substituições podem ocorrer em qualquer um dos seis sítios disponíveis, e a diversidade estrutural determina as atividades farmacológicas (BAROT *et al.*, 2015; WU, L. *et al.*, 2009). O ácido 3-cumarínico carboxílico é um derivado substituído das cumarinas simples. Uma série de estudos demonstram que a inserção de grupos funcionais no carbono 3 do esqueleto básico das cumarinas resulta em agentes farmacológicos com potente efeito anti-inflamatório (CHEN, Liu Zeng *et al.*, 2017; MATOS, Maria João *et al.*, 2013; PU *et al.*, 2014; STEFANI *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2020).

Com o objetivo de investigar o perfil de substituição, Wang *et al.* (2020) introduziram grupos benzil sulfona/sulfóxido na posição C-3 do esqueleto cumarínico. Nos ensaios *in vitro* foi observada significativa redução na liberação de TNF- α . Além disso, todos doze compostos foram capazes de inibir a COX-1, alcançando 46,7% de inibição, comparado com 51,1% da indometacina. Em termos de COX-2, foi identificada uma inibição moderada, com valores de até 35,7%. De forma semelhante,

Chen *et al.* (2017) sintetizaram novas arilpirazol-cumarinas, com substituições no C-3. Houve diversidade no efeito apresentado pelos compostos, prevalecendo o perfil anti-inflamatório, com inibição da produção de IL-6, TNF- α e óxido nítrico (NO) através da via de sinalização NF- κ B/MAPK, e supressão da expressão de iNOS e COX-2. Esse mesmo padrão de substituição também foi relatado por Pu *et al.* (2014), que identificou as 3-arilcumarinas como possíveis agentes anti-inflamatórios. 3-arilcumarinas 3, 4 e 6 substituídas também exibiram alta afinidade de interação com receptores de adenosina, sugerindo que podem promover analgesia por esta via (MATOS, Maria João *et al.*, 2013). Corroborando com dados da literatura, derivados da 3-(triazolil)-cumarina foram capazes de inibir a produção de NO derivado de iNOS. Estudos de docking definiram que interações hidrofóbicas com o grupo heme são importantes para a inibição da iNOS (STEFANI *et al.*, 2012). Seguindo essa mesma linha de síntese, Emam *et al.* (2021) identificaram inibição na expressão de NO, COX-1 e -2 em derivados cumarínicos com inserção de chalconas em C-3.

Não só substituições em C-3, mas também inserções de grupos funcionais em C-8 se mostram promissoras. Buran *et al.* (2021) investigou o efeito de 38 derivados com piperidinas e piperazinas aromáticas adicionadas ao C-8 da 7-hidroxycumarina e relatou que essa substituição foi favorável para a promoção dos efeitos anti-inflamatórios de alguns derivados, principalmente através da redução na síntese de nitrito e PGE₂.

O estudo *in silico* de possíveis alvos terapêuticos é uma abordagem relativamente rápida, de baixo custo e excelente retorno, que permite a análise e compreensão dos possíveis mecanismos moleculares envolvidos na atividade farmacológica, e consequentemente reduz perda de tempo e recursos no processo de descoberta de novos fármacos (AGOSTINO, B. *et al.*, 2019).

A investigação do potencial das cumarinas em promover a inibição da enzima cicloxigenase é uma abordagem que vêm ganhando espaço atualmente. Diversos estudos têm demonstrado essa capacidade, evidenciado tanto em cumarinas naturais quanto sintéticas (AGBO *et al.*, 2020; DAWOOD *et al.*, 2015; REVANKAR *et al.*, 2017; SINGH, Gurjit *et al.*, 2020). Alshibl *et al.* (2020) promoveram a síntese de novos derivados cumarínicos para avaliar seu potencial anti-inflamatório. Em alguns compostos, foi demonstrada uma atividade tão potente quanto a aspirina. Foi observada inibição significativa do edema de pata induzido por formaldeído. Os

ensaios *in vitro* estabeleceram que os derivados possuem seletividade pela COX-2. Esses resultados foram confirmados por estudos de docking molecular, demonstrando afinidade com a enzima COX-2 humana. Assim, tais compostos podem servir como candidatos promissores para o futuro da terapia anti-inflamatória (ALSHIBL *et al.*, 2020).

Uma vez identificado o perfil anti-inflamatório associado ao efeito antinociceptivo do A3CC, o docking molecular foi realizado para identificar possíveis alvos de interação, passíveis de estarem envolvidos em sua atividade. A análise de ancoragem molecular do ácido 3-cumarino carboxílico com a COX-1 e -2 foi conduzida utilizando quatro estruturas cristalizadas das isoenzimas, todas com diferentes ligantes. A comparação foi realizada baseado na conformação assumida pelo ligante PDB e na conformação adotada pelo A3CC, utilizando a mesma superfície de interação molecular. A análise conformacional em COX-1 foi semelhante para ambas as estruturas, tendo como base o sítio de ligação do flubirprofeno (1CQE) e do ácido araquidônico (1DIY). Foram observadas ligações de hidrogênio do A3CC com os resíduos de Arg120 e Tyr355, logo na entrada do sítio cicloxigenase. Na figura 16 é representado um resumo de todas as interações apresentadas pelo A3CC com as isoformas da COX.

Os resíduos do sítio ativo da COX são categorizados de cinco formas diferentes. Existem aqueles diretamente envolvidos na abstração de hidrogênio do C-13 do AA, a exemplo de Tyr385; existem os resíduos essenciais para o posicionamento do C-13 do AA, como Gly533 e Tyr348; resíduos críticos para a ligação de alta afinidade com o AA, como é o caso da Arg120; existem aqueles que são críticos para o posicionamento conformacional do AA, favorecendo a produção de PGG₂, que são Val349, Trp387 e Leu534; e por fim, outros resíduos presentes no sítio ativo, que individualmente contribuem menos, mas importantes para a eficiência catalítica (THURESSON *et al.*, 2001).

O centro catalítico da COX abrange a metade superior do canal, estendendo-se de Arg120 a Tyr385. A interação do AA com COX abrange 48 contatos hidrofóbicos e dois contatos hidrofílicos, envolvendo 19 resíduos diferentes. Desses, sete são considerados os mais críticos, entre eles Tyr385 e Arg120. A ausência de interações com estes resíduos desfavorece a catálise do AA. Por exemplo, a mutação de Tyr385 por fenilalanina abole a atividade da ciclooxygenase (PICOT; LOLL;

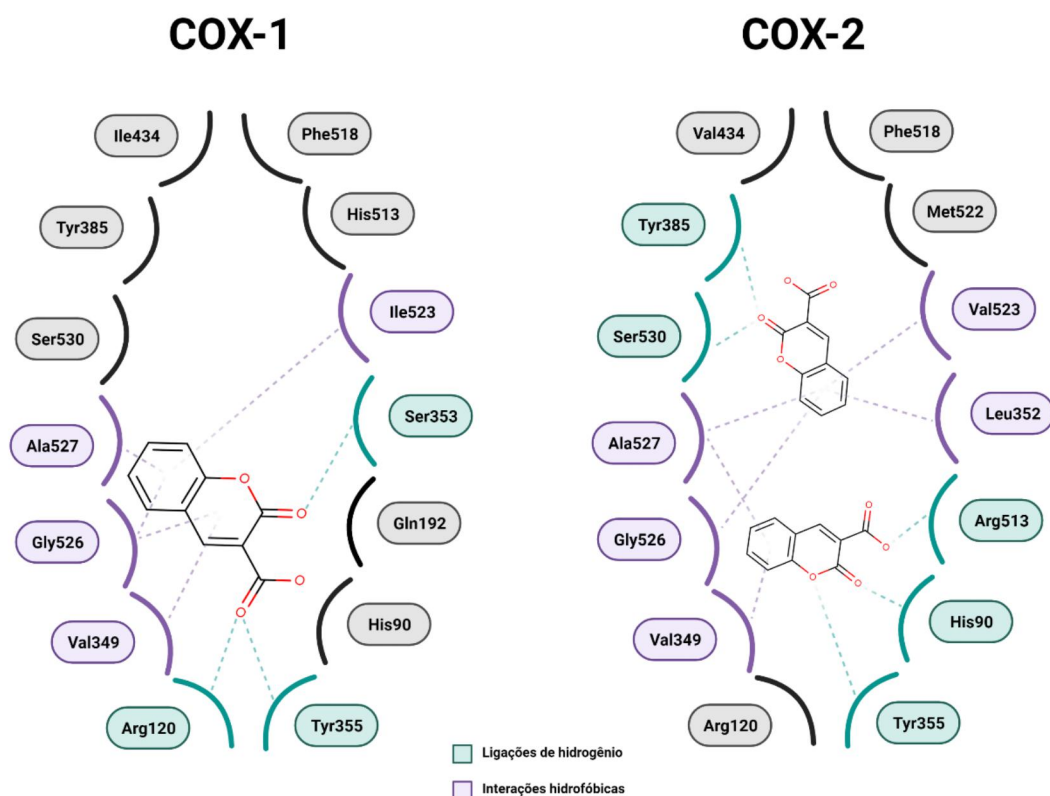
GARAVITO, 1994). A criticidade dos resíduos é determinada quando sua mutação provoca alteração na composição dos produtos de oxigenação. Estudos mutacionais demonstraram que o grupo guanidina de Arg120 é importante para a alta afinidade da ligação (SMITH, William L.; GARAVITO; DEWITT, 1996), que Tyr385 é envolvido como um radical tirosil na abstração do hidrogênio 13*proS* (SHIMOKAWA *et al.*, 1990), e que Ser530 é determinante na especificidade inibitória (GIERSE *et al.*, 1999).

As interações entre o átomo de nitrogênio de Arg120 e o grupo carboxilato de substratos ou inibidores são elementos chave na catálise ou inibição da ciclooxigenase, determinando a alta afinidade da ligação (THURESSON *et al.*, 2001). Dessa forma, as interações assumidas pelo grupo carboxilato do A3CC no sítio da COX-1 parecem exercer papel fundamental em um possível efeito inibitório dessa enzima. O resíduo de Arg120 é considerado crítico para o processo de catálise do AA. A interação com o composto cumarínico sugere que a afinidade da ligação da enzima pelo AA é reduzida, ou até mesmo perdida, resultando em menos subprodutos reacionais capazes de influenciar a percepção da dor, como por exemplo, PGE₂.

Tyr355 reside perto da entrada do canal do sítio ativo da ciclooxigenase, diretamente em frente a Arg120, exercendo um papel sutil ao contribuir com o alinhamento do carboxilato (THURESSON *et al.*, 2001). Assim, a interação do A3CC com o resíduo de Tyr355 favorece o posicionamento do grupo carboxilato para que este possa interagir com o resíduo crítico de Arg120. Outro fator que contribui para a interação do A3CC com COX-1 é que o composto exibe ligações de hidrogênio, que são interações fortes e importantes na manutenção do completo ligante-receptor, conferindo a estabilidade da conformação bioativa. A estabilidade das ligações é confirmada pela distância em Å exibida entre o A3CC e os resíduos (1,65 Å com Arg120 e 1,82 Å com Tyr355).

Em termos de COX-2 o perfil de interações foi ligeiramente diferente. Na estrutura cristalizada com o flubirprofeno (1CX2), o A3CC exibiu ligações de hidrogênio que os resíduos de Tyr385 e Ser530. Tyr385 está envolvido na abstração do hidrogênio 13*proS* do AA, etapa determinante da velocidade na catálise da ciclooxigenase (THURESSON *et al.*, 2001).

Figura 17. Resumo das interações do A3CC com as isoformas da COX.



Fonte: Elaborado pelo autor. Criado com BioRender.com.

Duas reações sequenciais catalisam o AA, a primeira é uma reação de ciclooxigenase, na qual o AA é convertido em PGG₂, seguida por uma reação de peroxidase na qual PGG₂ sofre redução de dois elétrons para PGH₂ (SMITH, William L.; DEWITT; GARAVITO, 2000). Elas ocorrem em locais fisicamente distintos, mas correlacionados, dentro da estrutura da COX. Quando o sítio ativo é ocupado pelo AA, o radical tirosil inicia a reação abstraindo o hidrogênio 13^{proS} para produzir um radical araquidonil. O radical reage com oxigênio molecular para produzir um radical 11-hidroperoxil, que por sua vez forma a PGH₂. A adição de uma segunda molécula de oxigênio no carbono 15 finalmente produz PGG₂ (GARAVITO; MULICHAK, 2003). Dessa forma, o AA é posicionado de maneira que o C-13 fique orientado próximo ao oxigênio fenólico de Tyr385, caracterizando o início da catálise. A velocidade da reação é limitada pela abstração inicial do hidrogênio 13^{proS} do AA (THURESSON; LAKKIDES; SMITH, 2002). Sem essa etapa, não seriam possíveis as adições sequenciais de oxigênio em C-11 e C-15, gerando PGG₂.

A ligação de hidrogênio do A3CC com Tyr385 em COX-2 é crítica para a atividade inibitória da enzima. Essa interação sugere uma possível interferência da cumarina na abstração do hidrogênio 13^{proS} do AA, limitando a velocidade da reação, e assim como relatado para as interações de COX-1, retardando e/ou reduzindo a síntese de prostanóides.

Kiefer *et al.* (2000) relataram uma nova conformação AA no canal, onde o carboxilato está ligado a Tyr385 e Ser530. Este modo de ligação foi considerado como um estado inibitório da COX-2, demonstrado pela interação semelhante de outros fármacos com essa isoenzima. Assim como relatado por Kiefer *et al.* (2000), o A3CC exibiu esse mesmo perfil de interação, corroborando a possível inibição enzimática.

A Ser530, que comumente é alvo de acetilação, encontra-se logo abaixo de Tyr385 de forma que essa reação poderia facilmente bloquear o acesso à parte superior do canal (PICOT; LOLL; GARAVITO, 1994). A acetilação da COX-1 leva à perda completa da atividade, enquanto a acetilação da COX-2 resulta na geração de outros subprodutos do AA, que não prostanóides (LUCIDO *et al.*, 2016). Embora não seja essencial para a catálise, a Ser530 auxilia para que ocorra o alinhamento ideal do substrato em relação ao resíduo de Tyr385, facilitando a abstração de hidrogênio no C-13, bem como contribuindo para a subsequente adição de oxigênio no C-11 (MICHAEL GARAVITO; MALKOWSKI; DEWITT, 2002).

Similarmente ao que aconteceu em COX-1 com Tyr355 e Arg120, o A3CC parece interagir com Ser530 através de ligações de hidrogênio para favorecer e estabilizar a interação da cumarina com o resíduo crítico de Tyr385, que de forma geral, é mais importante para a atividade inibitória de COX-2. Outro fator que deve ser levado em consideração é que a interação com Ser530 pode ainda estar bloqueando o acesso do AA ao resíduo de Tyr385, interferindo na abstração inicial de hidrogênio.

Em um estudo comparativo, verificou-se que a ausência da ligação de hidrogênio com Ser530 em COX-1 poderia ser a causa da seletividade por COX-2, que apresentou essa interação. Essa preferência pela COX-2 é acompanhada de *scores* de pontuação favoráveis. Os autores atribuem o efeito inibitório principalmente às ligações de hidrogênio formadas com Tyr385, Met522 e Ser530 no sítio ativo da COX. Nos testes *in vivo* e *in vitro*, o composto foi capaz de reduzir o edema em 90,7%,

e inibir a COX-2 em 94,1%, corroborando com os dados apresentados no docking (GAUTAM *et al.*, 2011).

Os algoritmos de função de *score* confirmam os dados conformacionais obtidos. O consenso entre os algoritmos Moldock, Plants, GOLD e Autodock permite uma análise mais fidedigna entre os valores obtidos na função de pontuação de cada algoritmo individualmente. Os resultados indicam que as conformações assumidas pelo A3CC são energeticamente favoráveis para que ocorram em meio biológico. A eficiência dessa função de pontuação apontou probabilidades de 81% (3PGH), 77% (1CQE), 64% (1DIY) e 59% (1CX2).

A conformação que obteve a melhor probabilidade, de 81%, foi justamente a que exibiu interações com os resíduos de Tyr385 e Ser530 em COX-2, sugerindo que essas ligações de hidrogênio podem de fato estarem envolvidas nos efeitos inibitórios de COX pelo A3CC. A correlação dos valores teóricos foi confirmada através dos dados experimentais *in vivo*, que evidenciam o potencial anti-inflamatório do A3CC.

AINEs competem com o AA pela ligação ao sítio da ciclooxigenase (PICOT; LOLL; GARAVITO, 1994), inibindo a atividade da ciclooxigenase, mas não a atividade da peroxidase (MARSHALL; KULMACZ, 1988). Os AINEs geralmente se ligam na parte superior do canal, entre Arg120 e Tyr385. Fármacos ácidos, como profenos e fenamatos, interagem com Arg120 em ambas as isoenzimas por meio de ligações de hidrogênio ou interações eletrostáticas, fornecendo energia de ligação e seletividade. As demais interações comumente são hidrofóbicas, exceto por potenciais ligações de hidrogênio com Ser530 (GARAVITO; DEWITT, 1999).

O flurbiprofeno é um exemplo de fármaco ácido que induz uma inibição da ciclooxigenase dependente do tempo. Ele possui o grupo carboxilato em posição favorável para interagir com Arg120 e Ser530. Essas interações impedem que o AA fique em uma conformação ideal para seu correto posicionamento no C-13. Dessa forma, a literatura relata que o flurbiprofeno inibe a reação da ciclooxigenase ao excluir o AA da porção superior do canal (PICOT; LOLL; GARAVITO, 1994). Essas mesmas interações foram observadas no A3CC em COX-1 e -2, respectivamente, indicando possível semelhança no modo de inibir estas isoenzimas.

Em se tratando da outra estrutura cristalizada da COX-2 (1CX2), a diferença no local ancoramento do ligante altamente seletivo SC-558 promoveu a revelação de novas interações pelo A3CC. O grupamento 4-sulfonamida do SC-558 alcança cavidades mais profundas. Ao ser ancorado no mesmo sítio de interação do SC-558, a cumarina apresentou ligações de hidrogênio com Tyr355, His90 e Arg513. Essas mesmas interações foram exibidas pelo inibidor seletivo. Estudos indicam que o substituinte CF_3 do SC-558 se liga à mesma cavidade do grupo carboxilato do flurbiprofeno (LAGES *et al.*, 1998). Esses achados corroboram com o que foi retratado no docking, uma vez que o grupo carboxilato do A3CC exibe semelhanças com o grupo carboxilato do flubirprofeno.

Experimentos de mutagênese sugerem que a inibição seletiva de COX-2 por compostos contendo grupos sulfonamida ou metilsulfóxido pode surgir da interação com o resíduo de Arg513 (KURUMBAIL *et al.*, 1996). Apesar de não possuir esses grupamentos, o A3CC conseguiu exibir ligações de hidrogênio com Arg513, podendo representar uma possível contribuição para a inibição seletiva da COX-2. A maior extensão do grupo guanidina da Arg513 favorece a interações com grupos polares do A3CC. Além disso, o menor volume do resíduo de Val523 em COX-2 facilita o acesso da molécula ao bolso lateral hidrofílico, sendo mais um fator favorável para a interação do A3CC com Arg513.

De forma geral, além das ligações de hidrogênio, o A3CC apresentou interações hidrofóbicas com ambas isoformas, estas incluem Val349, Leu352, Gly526, Ala527, Ile523 e Val523. Dessas, Val349 e Ala527 foram observadas em todas as análises de docking, demonstrando a relevância delas na estabilização do A3CC. Essas interações estão associadas à presença de cadeias apolares no sítio de ligação ou no ligante. Individualmente elas são interações fracas, mas o somatório de suas forças contribui para a estabilização da conformação bioativa.

Estudos indicam que Val349 fornece interações hidrofóbicas com AA, que contribuem para a estabilização e o posicionamento do AA de forma que, após a abstração de hidrogênio, a molécula seja alinhada para produzir PGG_2 (THURESSON *et al.*, 2001). Essa interação hidrofóbica com o A3CC pode ser mais uma pequena contribuição, que somada às outras interações impedem o correto posicionamento do AA, interferindo no processo de catálise.

De fato, a inibição da expressão e/ou atividade de COX-2 é um dos efeitos promovidos pelas cumarinas que constantemente vêm sendo relatado na literatura (GAGLIOTTI VIGIL DE MELLO; FRODE, 2018). Kim et al. (2006) relataram que a 7-hidroxicumarina tem atividade inibitória da COX-2, pois reduz a produção de PGD₂ em mastócitos derivados da medula óssea de camundongo. Além disso, também promoveu inibição da conversão biossintética do ácido araquidônico em prostaglandinas (LEE, R E; BYKADI; RITSCHER, 1981). A 7-hidroxicumarina também demonstrou ser capaz de prevenir a resposta febril induzida por lipopolissacarídeo (LPS) (DE ALMEIDA BARROS et al., 2010).

Dawood et al. (2015) investigaram a atividade anti-inflamatória de derivados cumarínicos com incorporações tiazolina e tiazolidinona no C-3 do esqueleto básico. No modelo de edema de pata induzido por carragenina a maioria dos compostos apresentaram elevada atividade anti-inflamatória, superando a indometacina. Os valores alcançaram até 96,7% de redução do edema. Os resultados foram ainda mais expressivos quando investigada a atividade enzimática de COX-1 e -2. O estudo *in vitro* mostrou que todos os 22 derivados exibiram melhor perfil inibitório de COX-2 do que a indometacina, com valores de IC₅₀ variando entre 0,3 a 0,8 µM, demonstrando uma relação de potência e seletividade semelhante à do celecoxibe. Em termos de COX-1, todos foram menos ativos que a indometacina, evidenciando sua seletividade por COX-2. O estudo de docking foi realizado para prever o modo de ligação dos compostos dentro do sítio ativo da COX-2. Observou-se que o score de pontuação foi paralelo e diretamente proporcional à atividade biológica. Em termos de interações ligante-receptor, tanto Arg120 quanto Tyr355 foram os resíduos mais predominantes e fundamentais para as interações. De forma geral, o átomo de oxigênio eletronegativo do anel cumarínico exibiu ligações de hidrogênio com o grupo -NH₂ de Arg120 e o grupo -OH de Tyr355 (DAWOOD et al., 2015).

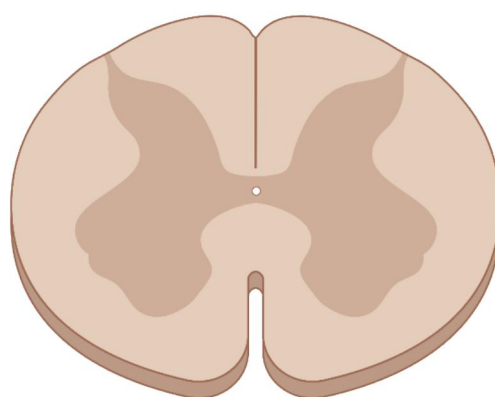
Estudos demonstram que moléculas híbridas de furocumarinas e estilbeno possuem efeitos inibitórios de AChE, BChE, β-secretase, COX-2 e LOX-5, além de possuir capacidade de sequestrar radicais livres. Destaque para o 8-(3,5-dimetoxifenil)-4-(3,5-dimetoxiestiril)furocromen-2-ona, que exibiu IC₅₀ de 8,6 ± 0,0 para a COX-2. Essa atividade inibitória da COX-2 havia sido previamente estimada pelo cálculo de descritores moleculares usando o Molinspiration, e depois confirmada por ensaios *in vitro*. No docking molecular, houve 19 contatos interações hidrofóbicas

com o sítio catalítico da COX-2, e nenhuma ligação de hidrogênio, revelando contribuições favoráveis para o efeito inibitório significativo da enzima (AGBO *et al.*, 2020).

Apesar do estudo de cumarinas sintéticas utilizadas como inibidores de COX ainda estar em fase inicial, nas últimas décadas houve crescimento do número de trabalhos relacionados ao papel de cada resíduo presente no sítio catalítico dessa enzima, facilitando a pesquisa e desenvolvimento de novos compostos que possuam efeitos colaterais reduzidos.

Diante das limitações terapêuticas associadas aos atuais fármacos utilizados para combater dor e inflamação, o A3CC torna-se uma potencial opção para o manejo das condições dolorosas, podendo contribuir para o efeito desejado, bem como, caso utilizado de forma complementar, para a redução da dose e consequentemente dos efeitos colaterais de outros fármacos. No entanto, o desenvolvimento de estudos mais robustos faz-se necessário, com finalidade de elucidar em definitivo a forma de atuação deste composto.

O ácido 3-cumarino carboxílico demonstrou possuir afinidade por alvos enzimáticos, conforme relatado pela literatura e por esta pesquisa. Perspectivas na área da psicofarmacologia para futuros estudos envolve a interação deste composto com estas proteínas. A aplicação de tecnologia farmacêutica para o desenvolvimento de uma formulação capaz de aprimorar sua biodisponibilidade no sistema nervoso central pode favorecer a avaliação da atividade antidepressiva desta molécula frente a enzimas específicas, como por exemplo a monoamina oxidase.

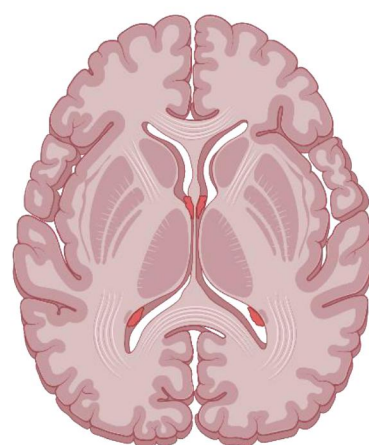


CONCLUSÃO

8. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no estudo da atividade antinociceptiva e anti-inflamatória do ácido 3-cumarino carboxílico permitem que sejam apontadas as seguintes constatações:

- O A3CC demonstra possuir viabilidade na circulação sanguínea ao exibir baixo percentual de hemólise frente a eritrócitos humanos, além de ser capaz de proteger a membrana eritrocitária no teste de fragilidade osmótica;
- O A3CC aparenta ser uma promissora opção para o tratamento de condições relacionadas à dor ao apresentar propriedades antinociceptivas, inibindo significativamente o comportamento nociceptivo nos testes de nocicepção orofacial induzida por formalina e glutamato, bem como no teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético;
- O A3CC demonstrou exercer seu efeito periféricamente, ao exibir propriedades anti-inflamatórias de redução do edema de pata induzido por carragenina;
- A ação anti-inflamatória do A3CC foi confirmada por estudos de docking molecular, e parece estar relacionada a inibição da COX-2 por interações com os resíduos de Tyr385 e Ser530.



REFERÊNCIAS

9. REFERÊNCIAS

ABBOTT, Frances V.; FRANKLIN, Keith B.J.; WESTBROOK, Frederick R. The formalin test: scoring properties of the first and second phases of the pain response in rats. **Pain**, vol. 60, no. 1, p. 91–102, Jan. 1995. DOI 10.1016/0304-3959(94)00095-V. Available at: <https://journals.lww.com/00006396-199501000-00009>.

AGBO, Emmanuel N.; GILDENHUYS, Samantha; CHOONG, Yee Siew; MPHAAHLELE, Malose J.; MORE, Garland K. Synthesis of furocoumarin–stilbene hybrids as potential multifunctional drugs against multiple biochemical targets associated with Alzheimer’s disease. **Bioorganic Chemistry**, vol. 101, p. 103997, Aug. 2020. DOI 10.1016/j.bioorg.2020.103997. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0045206820312943>.

AGUILAR-BRYAN, Lydia; BRYAN, Joseph. Molecular Biology of Adenosine Triphosphate-Sensitive Potassium Channels*. **Endocrine Reviews**, vol. 20, no. 2, p. 101–135, 1 Apr. 1999. DOI 10.1210/edrv.20.2.0361. Available at: <https://academic.oup.com/edrv/article/20/2/101/2530810>.

AL-KARAGHOLI, Mohammad Al-Mahdi; HANSEN, Jakob Møller; SEVERINSEN, Johanne; JANSEN-OLESEN, Inger; ASHINA, Messoud. The KATP channel in migraine pathophysiology: a novel therapeutic target for migraine. **The Journal of Headache and Pain**, vol. 18, no. 1, p. 90, 23 Dec. 2017. DOI 10.1186/s10194-017-0800-8. Available at: <https://thejournalofheadacheandpain.biomedcentral.com/articles/10.1186/s10194-017-0800-8>.

AL-WABLI, Reem; FOUAD, Mohammad; EL-HAGGAR, Radwan. Synthesis, In-vivo and In-vitro Anti-inflammatory Evaluation of some Novel Coumarin Derivatives. **Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry**, vol. 17, no. 2, p. 115–124, 10 Dec. 2018. DOI 10.2174/1871523017666180816163448. Available at: <http://www.eurekaselect.com/164718/article>.

ALMEIDA, Marcius da Silva. **Bioinformática da Biologia à Flexibilidade Molecular**. [S. l.: s. n.], 2014.

ALONSO-CASTRO, Angel Josabad; GUZMÁN-GUTIÉRREZ, Silvia Laura; BETANCOURT, Clara Alba; GASCA-MARTÍNEZ, Deisy; ÁLVAREZ-MARTÍNEZ, Karla Lorena; PÉREZ-NICOLÁS, Miriam; ESPITIA-PINZÓN, Clara Inés; REYES-CHILPA, Ricardo. Antinociceptive, anti-inflammatory, and central nervous system (CNS) effects of the natural coumarin soulattrolide. **Drug Development Research**, vol. 79, no. 7, p. 332–338, Nov. 2018. DOI 10.1002/ddr.21471. Available at: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ddr.21471>.

ALSHIBL, Hanan M.; AL-ABDULLAH, Ebtehal S.; HAIBA, Mogedda E.; ALKAHTANI, Hamad M.; AWAD, Ghada E.A.; MAHMOUD, Ahlam H.; IBRAHIM, Bassant M.M.; BARI, Ahmed; VILLINGER, Alexander. Synthesis and Evaluation of New Coumarin Derivatives as Antioxidant, Antimicrobial, and Anti-Inflammatory Agents. **Molecules**, vol. 25, no. 14, p. 3251, 16 Jul. 2020. DOI 10.3390/molecules25143251. Available at: <https://www.mdpi.com/1420-3049/25/14/3251>.

ANANTHAN, Sowmya; BENOLIEL, Rafael. Chronic orofacial pain. **Journal of Neural Transmission**, vol. 127, no. 4, p. 575–588, 4 Apr. 2020. DOI 10.1007/s00702-020-02157-3. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s00702-020-02157-3>.

ANNUNZIATA, Francesca; PINNA, Cecilia; DALLAVALLE, Sabrina; TAMBORINI, Lucia; PINTO, Andrea. An Overview of Coumarin as a Versatile and Readily Accessible Scaffold with Broad-Ranging Biological Activities. **International Journal of Molecular Sciences**, vol. 21, no. 13, p. 4618, 29 Jun. 2020. DOI 10.3390/ijms21134618. Available at: <https://www.mdpi.com/1422-0067/21/13/4618>.

APKARIAN, Apkar Vania. Definitions of nociception, pain, and chronic pain with implications regarding science and society. **Neuroscience Letters**, vol. 702, p. 1–2, May 2019. DOI 10.1016/j.neulet.2018.11.039. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304394018308255>.

ARAYA, Erika Ivanna; CLAUDINO, Rafaela Franco; PIOVESAN, Elcio Juliato; CHICHORRO, Juliana Geremias. Trigeminal Neuralgia: Basic and Clinical Aspects. **Current Neuropharmacology**, vol. 18, no. 2, p. 109–119, 23 Jan. 2020. DOI 10.2174/1570159X17666191010094350. Available at: <http://www.eurekaselect.com/175516/article>.

ASHOORIHA, Morteza; KHOSHNEVISZADEH, Mehdi; KHOSHNEVISZADEH, Mahsima; RAFIEI, Alireza; KARDAN, Mostafa; YAZDIAN-ROBATI, Rezvan; EMAMI, Saeed. Kojic acid–natural product conjugates as mushroom tyrosinase inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry**, vol. 201, p. 112480, Sep. 2020. DOI 10.1016/j.ejmech.2020.112480. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0223523420304517>.

BAAD-HANSEN, Lene; BENOLIEL, Rafael. Neuropathic orofacial pain: Facts and fiction. **Cephalalgia**, vol. 37, no. 7, p. 670–679, 12 Jun. 2017. DOI 10.1177/0333102417706310. Available at: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0333102417706310>.

BABA, Hiroshi; KOHNO, Tatsuro; MOORE, Kimberly A.; WOOLF, Clifford J. Direct Activation of Rat Spinal Dorsal Horn Neurons by Prostaglandin E2. **The Journal of Neuroscience**, vol. 21, no. 5, p. 1750–1756, 1 Mar. 2001. DOI 10.1523/JNEUROSCI.21-05-01750.2001. Available at: <https://www.jneurosci.org/lookup/doi/10.1523/JNEUROSCI.21-05-01750.2001>.

BABOS, Mary Beth; GRADY, Brittany; WISNOFF, Warren; MCGHEE, Christy. Pathophysiology of pain. **Disease-a-month : DM**, vol. 59, no. 10, p. 330–58, Oct. 2013. DOI 10.1016/j.disamonth.2013.05.003. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24075688>.

BARAL, Pankaj; UDIT, Swalpa; CHIU, Isaac M. Pain and immunity: implications for host defence. **Nature Reviews Immunology**, vol. 19, no. 7, p. 433–447, 15 Jul. 2019. DOI 10.1038/s41577-019-0147-2. Available at: <http://www.nature.com/articles/s41577-019-0147-2>.

BAROT, Kuldipsinh P.; JAIN, Shailesh V.; KREMER, Laurent; SINGH, Shubhra; GHATE, Manjunath D. Recent advances and therapeutic journey of coumarins: current status and perspectives. **Medicinal Chemistry Research**, vol. 24, no. 7, p. 2771–2798, 11 Jul. 2015. DOI 10.1007/s00044-015-1350-8. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s00044-015-1350-8>.

BARREIRO, Eliezer J.; FRAGA, Carlos Alberto Mansour. **Química Medicinal: As Bases Moleculares da Terapêutica**. [S. l.: s. n.], 2015.

BASBAUM, Allan I.; BAUTISTA, Diana M.; SCHERRER, Grégory; JULIUS, David. Cellular and Molecular Mechanisms of Pain. **Cell**, vol. 139, no. 2, p. 267–284, Oct. 2009. DOI 10.1016/j.cell.2009.09.028. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867409012434>.

BEIRITH, Alessandra; SANTOS, Adair R S; CALIXTO, João B. Mechanisms underlying the nociception and paw oedema caused by injection of glutamate into the mouse paw. **Brain research**, vol. 924, no. 2, p. 219–28, 11 Jan. 2002. DOI 10.1016/s0006-8993(01)03240-1. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11750907>.

BELL, A. The neurobiology of acute pain. **The Veterinary Journal**, vol. 237, p. 55–62, Jul. 2018. DOI 10.1016/j.tvjl.2018.05.004. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1090023318301746>.

BELOEIL, Hélène; GENTILI, Marc; BENHAMOU, Dan; MAZOIT, Jean-Xavier. The Effect of a Peripheral Block on Inflammation-Induced Prostaglandin E2 and Cyclooxygenase Expression in Rats. **Anesthesia & Analgesia**, vol. 109, no. 3, p. 943–950, Sep. 2009. DOI 10.1213/ane.0b013e3181aff25e. Available at: <https://journals.lww.com/00000539-200909000-00040>.

BENOLIEL, Rafael; SVENSSON, Peter; EVERS, Stefan; WANG, Shuu-Jiun; BARKE, Antonia; KORWISI, Beatrice; RIEF, Winfried; TREEDE, Rolf-Detlef. The IASP classification of chronic pain for ICD-11: chronic secondary headache or orofacial pain.

Pain, vol. 160, no. 1, p. 60–68, Jan. 2019. DOI 10.1097/j.pain.0000000000001435. Available at: <https://journals.lww.com/00006396-201901000-00008>.

BORDI, Fabio; UGOLINI, Annarosa. Group I metabotropic glutamate receptors: implications for brain diseases. **Progress in Neurobiology**, vol. 59, no. 1, p. 55–79, Sep. 1999. DOI 10.1016/S0301-0082(98)00095-1. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0301008298000951>.

BORG-STEIN, Joanne; SIMONS, David G. Myofascial pain. **Archives of Physical Medicine and Rehabilitation**, vol. 83, p. S40–S47, Mar. 2002. DOI 10.1053/apmr.2002.32155. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003999302800119>.

BORGES, F; ROLEIRA, F; MILHAZES, N; SANTANA, L; URIARTE, E. Simple coumarins and analogues in medicinal chemistry: occurrence, synthesis and biological activity. **Current medicinal chemistry**, vol. 12, no. 8, p. 887–916, 2005. DOI 10.2174/0929867053507315. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15853704>.

BOTZ, Bálint; BÖLCSKEI, Kata; HELYES, Zsuzsanna. Challenges to develop novel anti-inflammatory and analgesic drugs. **WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology**, vol. 9, no. 3, 31 May 2017. DOI 10.1002/wnan.1427. Available at: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/wnan.1427>.

BRANDÃO, Ricardo; LARA, Fabiana S.; PAGLIOSA, Letícia B.; SOARES, Félix A.; ROCHA, João B.T.; NOGUEIRA, Cristina W.; FARINA, Marcelo. Hemolytic Effects of Sodium Selenite and Mercuric Chloride in Human Blood. **Drug and Chemical Toxicology**, vol. 28, no. 4, p. 397–407, 9 Jan. 2005. DOI 10.1080/01480540500262763. Available at: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/01480540500262763>.

BROOIJMANS, Natasja; KUNTZ, Irwin D. Molecular Recognition and Docking Algorithms. **Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure**, vol. 32, no.

1, p. 335–373, Jun. 2003. DOI 10.1146/annurev.biophys.32.110601.142532. Available at: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.biophys.32.110601.142532>.

BRUNO, Agostino; COSTANTINO, Gabriele; SARTORI, Luca; RADI, Marco. The In Silico Drug Discovery Toolbox: Applications in Lead Discovery and Optimization. **Current Medicinal Chemistry**, vol. 26, no. 21, p. 3838–3873, 19 Sep. 2019. DOI 10.2174/0929867324666171107101035. Available at: <http://www.eurekaselect.com/156873/article>.

BRUNO, Annalisa; TACCONELLI, Stefania; PATRIGNANI, Paola. Variability in the Response to Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs: Mechanisms and Perspectives. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, vol. 114, no. 1, p. 56–63, Jan. 2014. DOI 10.1111/bcpt.12117. Available at: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/bcpt.12117>.

BURAN, Kerem; REIS, Rengin; SIPAHI, Hande; ÖNEN BAYRAM, F. Esra. Piperazine and piperidine-substituted 7-hydroxy coumarins for the development of anti-inflammatory agents. **Archiv der Pharmazie**, vol. 354, no. 7, p. 2000354, 22 Jul. 2021. DOI 10.1002/ardp.202000354. Available at: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ardp.202000354>.

CAHUSAC, P.M.B.; MORRIS, R.; SALT, T.E.; HILL, R.G. Sensory responses of caudal trigeminal neurons to thermal and mechanical stimuli and their behavioural correlates in the rat. **Neuroscience**, vol. 36, no. 2, p. 543–551, Jan. 1990. DOI 10.1016/0306-4522(90)90444-9. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0306452290904449>.

CALDER, Philip C. Eicosanoids. **Essays in Biochemistry**, vol. 64, no. 3, p. 423–441, 23 Sep. 2020. DOI 10.1042/EBC20190083. Available at: <https://portlandpress.com/essaysbiochem/article/64/3/423/226134/Eicosanoids>.

CAPONE, Marta L.; TACCONELLI, Stefania; DI FRANCESCO, Luigia; SACCHETTI, Andrea; SCIULLI, Maria G.; PATRIGNANI, Paola. Pharmacodynamic of

cyclooxygenase inhibitors in humans. **Prostaglandins & Other Lipid Mediators**, vol. 82, no. 1–4, p. 85–94, Jan. 2007. DOI 10.1016/j.prostaglandins.2006.05.019. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S109888230600058X>.

CARNEIRO, Aitor; MATOS, Maria João; URIARTE, Eugenio; SANTANA, Lourdes. Trending Topics on Coumarin and Its Derivatives in 2020. **Molecules**, vol. 26, no. 2, p. 501, 19 Jan. 2021. DOI 10.3390/molecules26020501. Available at: <https://www.mdpi.com/1420-3049/26/2/501>.

CARR, Daniel B; GOUDAS, Leonidas C. Acute pain. **The Lancet**, vol. 353, no. 9169, p. 2051–2058, Jun. 1999. DOI 10.1016/S0140-6736(99)03313-9. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673699033139>.

CARRASCO, Cristina; NAZIROGLU, Mustafa; RODRÍGUEZ, Ana B.; PARIENTE, José A. Neuropathic pain: Delving into the oxidative origin and the possible implication of transient receptor potential channels. **Frontiers in Physiology**, vol. 9, no. FEB, p. 1–15, 2018. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00095>.

CHANDRA, Sundeep A.; STOKES, Alan H.; HAILEY, Rick; MERRILL, Christine L.; MELICH, David H.; DESMET, Kristina; FURST, Sylvia M.; PETERSON, Richard A.; MELLON-KUSIBAB, Katherine; ADLER, Rick R. Dermal Toxicity Studies. **Toxicologic Pathology**, vol. 43, no. 4, p. 474–481, 10 Jun. 2015. DOI 10.1177/0192623314548765. Available at: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0192623314548765>.

CHEN, Lihong; YANG, Guangrui; GROSSER, Tilo. Prostanoids and inflammatory pain. **Prostaglandins & Other Lipid Mediators**, vol. 104–105, p. 58–66, Jul. 2013. DOI 10.1016/j.prostaglandins.2012.08.006. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1098882312001165>.

CHEN, Liu Zeng; SUN, Wei Wei; BO, Li; WANG, Jie Quan; XIU, Cheng; TANG, Wen Jian; SHI, Jing Bo; ZHOU, Hai Pin; LIU, Xin Hua. New arylpyrazoline-coumarins: Synthesis and anti-inflammatory activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**,

vol. 138, p. 170–181, Sep. 2017. DOI 10.1016/j.ejmech.2017.06.044. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0223523417304907>.

CHERIYAN, Binoy Varghese; KADHIRVELU, Parimala; NADIPELLY, Jagan; SHANMUGASUNDARAM, Jaikumar; SAYELI, Vijaykumar; SUBRAMANIAN, Viswanathan. Anti-nociceptive Effect of 7-methoxy Coumarin from Eupatorium Triplinerve vahl (Asteraceae). **Pharmacognosy magazine**, vol. 13, no. 49, p. 81–84, 2017. DOI 10.4103/0973-1296.197650. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28216887>.

CHIMENTI, Franco; SECCI, Daniela; BOLASCO, Adriana; CHIMENTI, Paola; GRANESE, Arianna; BEFANI, Olivia; TURINI, Paola; ALCARO, Stefano; ORTUSO, Francesco. Inhibition of monoamine oxidases by coumarin-3-acyl derivatives: biological activity and computational study. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, vol. 14, no. 14, p. 3697–3703, Jul. 2004. DOI 10.1016/j.bmcl.2004.05.010. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960894X04006432>.

CHUNG, Man-Kyo; LEE, Jongseok; JOSEPH, John; SALOMAN, Jami; RO, Jin Y. Peripheral Group I Metabotropic Glutamate Receptor Activation Leads to Muscle Mechanical Hyperalgesia Through TRPV1 Phosphorylation in the Rat. **The Journal of Pain**, vol. 16, no. 1, p. 67–76, Jan. 2015. DOI 10.1016/j.jpain.2014.10.008. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S152659001400995X>.

CODERRE, Terence J.; FUNDYTUS, Marian E.; MCKENNA, John E.; DALAL, Suntanu; MELZACK, Ronald. The formalin test: a validation of the weighted-scores method of behavioural pain rating. **Pain**, vol. 54, no. 1, p. 43–50, Jul. 2004. DOI 10.1016/0304-3959(93)90098-A. Available at: <https://journals.lww.com/00006396-199307000-00007>.

CODERRE, Terence J.; KATZ, Joel; VACCARINO, Anthony L.; MELZACK, Ronald. Contribution of central neuroplasticity to pathological pain: review of clinical and experimental evidence. **Pain**, vol. 52, no. 3, p. 259–285, Mar. 1993. DOI 10.1016/0304-3959(93)90161-H. Available at: <https://journals.lww.com/00006396-199303000-00007>.

199303000-00002.

CODERRE, TJ; MELZACK, R. The contribution of excitatory amino acids to central sensitization and persistent nociception after formalin-induced tissue injury. **The Journal of Neuroscience**, vol. 12, no. 9, p. 3665–3670, 1 Sep. 1992. DOI 10.1523/JNEUROSCI.12-09-03665.1992. Available at: <https://www.jneurosci.org/lookup/doi/10.1523/JNEUROSCI.12-09-03665.1992>.

COLLIER, H. O. J.; DINNEEN, L. C.; JOHNSON, CHRISTINE A.; SCHNEIDER, C. THE ABDOMINAL CONSTRICTION RESPONSE AND ITS SUPPRESSION BY ANALGESIC DRUGS IN THE MOUSE. **British Journal of Pharmacology and Chemotherapy**, vol. 32, no. 2, p. 295–310, Feb. 1968. DOI 10.1111/j.1476-5381.1968.tb00973.x. Available at: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1476-5381.1968.tb00973.x>.

CONTI, Paulo César Rodrigues; PERTES, Richard A.; HEIR, Gary M.; NASRI, Cibele; COHEN, Harold V.; ARAÚJO, Carlos dos Reis Pereira de. Orofacial pain: basic mechanisms and implication for successful management. **Journal of Applied Oral Science**, vol. 11, no. 1, p. 1–7, Mar. 2003. DOI 10.1590/S1678-77572003000100002. Available at: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1678-77572003000100002&lng=en&tlng=en.

COOPER, B.Y.; SESSLE, B.J. Anatomy, Physiology, and Pathophysiology of Trigeminal System Paresthesias and Dysesthesias. **Oral and Maxillofacial Surgery Clinics of North America**, vol. 4, no. 2, p. 297–322, May 1992. DOI 10.1016/S1042-3699(20)30590-2. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1042369920305902>.

COSTA, Blaise Mathias; IRVINE, Mark W.; FANG, Guangyu; EAVES, Richard J.; MAYO-MARTIN, Marie Belen; SKIFTER, Donald A.; JANE, David E.; MONAGHAN, Daniel T. A Novel Family of Negative and Positive Allosteric Modulators of NMDA Receptors. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, vol. 335, no. 3, p. 614–621, Dec. 2010. DOI 10.1124/jpet.110.174144. Available at:

<http://jpet.aspetjournals.org/lookup/doi/10.1124/jpet.110.174144>.

COSTA, Tereza Karla Vieira Lopes da; BARROS, Mariana Silva; BRAGA, Renan Marrinho; VIANA, Jéssika de Oliveira; SOUSA, Frederico Barbosa de; SCOTTI, Luciana; SCOTTI, Marcus Tullius; BATISTA, André Ulisses Dantas; ALMEIDA, Reinaldo Nóbrega de; CASTRO, Ricardo Dias de. Orofacial antinociceptive activity and anchorage molecular mechanism in silico of geraniol. **Brazilian Oral Research**, vol. 34, 2020. DOI 10.1590/1807-3107bor-2020.vol34.0094. Available at: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1806-83242020000100266&tlng=en.

COSTIGAN, Michael; WOOLF, Clifford J. Pain: Molecular mechanisms. **The Journal of Pain**, vol. 1, no. 3, p. 35–44, Sep. 2000. DOI 10.1054/jpai.2000.9818. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1526590000280413>.

CRANDALL, Jeffrey A. An Introduction to Orofacial Pain. **Dental Clinics of North America**, vol. 62, no. 4, p. 511–523, Oct. 2018. DOI 10.1016/j.cden.2018.05.001. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0011853218300405>.

CRIVORI, Patrizia; CRUCIANI, Gabriele; CARRUPT, Pierre-Alain; TESTA, Bernard. Predicting Blood–Brain Barrier Permeation from Three-Dimensional Molecular Structure. **Journal of Medicinal Chemistry**, vol. 43, no. 11, p. 2204–2216, 1 Jun. 2000. DOI 10.1021/jm990968+. Available at: <https://doi.org/10.1021/jm990968+>.

CRUCIANI, G.; CRIVORI, P.; CARRUPT, P.-A.; TESTA, B. Molecular fields in quantitative structure–permeation relationships: the VolSurf approach. **Journal of Molecular Structure: THEOCHEM**, vol. 503, no. 1–2, p. 17–30, May 2000. DOI 10.1016/S0166-1280(99)00360-7. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166128099003607>.

CRUCIANI, Gabriele; CAROSATI, Emanuele; DE BOECK, Benoit; ETHIRAJULU, Kantharaj; MACKIE, Claire; HOWE, Trevor; VIANELLO, Riccardo. MetaSite: Understanding Metabolism in Human Cytochromes from the Perspective of the

Chemist. **Journal of Medicinal Chemistry**, vol. 48, no. 22, p. 6970–6979, 1 Nov. 2005. DOI 10.1021/jm050529c. Available at: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jm050529c>.

CRUCIANI, Gabriele; MENICONI, Mirco; CAROSATI, Emanuele; ZAMORA, Ismael; MANNHOLD, Raimund. VOLSURF: A Tool for Drug ADME-Properties Prediction. [S. l.: s. n.], 2003. p. 406–419. DOI 10.1002/3527601473.ch17. Available at: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/3527601473.ch17>.

CRUCIANI, Gabriele; PASTOR, Manuel; GUBA, Wolfgang. VolSurf: a new tool for the pharmacokinetic optimization of lead compounds. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, vol. 11, p. S29–S39, Oct. 2000. DOI 10.1016/S0928-0987(00)00162-7. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928098700001627>.

CRUNKHORN, PEARL; MEACOCK, S. C. R. Mediators of the inflammation induced in the rat paw by carrageenin. **British Journal of Pharmacology**, vol. 42, no. 3, p. 392–402, Jul. 1971. DOI 10.1111/j.1476-5381.1971.tb07124.x. Available at: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1476-5381.1971.tb07124.x>.

DACIE, J.V.; LEWIS, S.M. Practical Haematology. **Harcourt Publishers Limited**, vol. 9th Editio, p. 444–451, 2001. .

DAHLHAMER, James; LUCAS, Jacqueline; ZELAYA, Carla; NAHIN, Richard; MACKEY, Sean; DEBAR, Lynn; KERNS, Robert; VON KORFF, Michael; PORTER, Linda; HELMICK, Charles. Prevalence of Chronic Pain and High-Impact Chronic Pain Among Adults — United States, 2016. **MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report**, vol. 67, no. 36, p. 1001–1006, 14 Sep. 2018. DOI 10.15585/mmwr.mm6736a2. Available at: http://www.cdc.gov/mmwr/volumes/67/wr/mm6736a2.htm?s_cid=mm6736a2_w.

DAS, Vaskar. An Introduction to Pain Pathways and Pain “Targets.” [S. l.: s. n.], 2015. p. 1–30. DOI 10.1016/bs.pmbts.2015.01.003. Available at:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1877117315000046>.

DASH, Raju; UDDIN, Mir Muhammad; HOSEN, S.M. Zahid; RAHIM, Zahed Bin; DINAR, AbuMansur; KABIR, Mohammad; SULTAN, Ramiz Ahmed; ISLAM, Ashekul; HOSSAIN, Md Kamrul. Molecular docking analysis of known flavonoids as dual COX-2 inhibitors in the context of cancer. **Bioinformation**, vol. 11, no. 12, p. 543–549, 31 Dec. 2015. DOI 10.6026/97320630011543. Available at: <http://bioinformation.net/011/97320630011543.htm>.

DAWOOD, Dina H.; BATRAN, Rasha Z.; FARGHALY, Thoraya A.; KHEDR, Mohammed A.; ABDULLA, Mohamed M. New Coumarin Derivatives as Potent Selective COX-2 Inhibitors: Synthesis, Anti-Inflammatory, QSAR, and Molecular Modeling Studies. **Archiv der Pharmazie**, vol. 348, no. 12, p. 875–888, Dec. 2015. DOI 10.1002/ardp.201500274. Available at: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ardp.201500274>.

DE ALMEIDA BARROS, Taís A; DE FREITAS, Luis A R; FILHO, José M B; NUNES, Xirley P; GIULIETTI, Ana M; DE SOUZA, Glória E; DOS SANTOS, Ricardo R; SOARES, Milena B P; VILLARREAL, Cristiane F. Antinociceptive and anti-inflammatory properties of 7-hydroxycoumarin in experimental animal models: potential therapeutic for the control of inflammatory chronic pain. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, vol. 62, no. 2, p. 205–213, 2010. <https://doi.org/10.1211/jpp.62.02.0008>.

DE ARAÚJO, Josenildo Segundo Chaves; DE CASTILHO, Aline Rogéria Freire; LIRA, Andressa Brito; PEREIRA, Andréia Vieira; DE AZEVÊDO, Tatiane Kelly Barbosa; DE BRITO COSTA, Edja Maria de Melo; PEREIRA, Maria do Socorro Vieira; PESSÔA, Hilzeth de Luna Freire; PEREIRA, Jozinete Vieira. Antibacterial activity against cariogenic bacteria and cytotoxic and genotoxic potential of *Anacardium occidentale* L. and *Anadenanthera macrocarpa* (Benth.) Brenan extracts. **Archives of Oral Biology**, vol. 85, p. 113–119, Jan. 2018. DOI 10.1016/j.archoralbio.2017.10.008. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003996917303278>.

DE FEO, Martina; PALADINI, Antonella; FERRI, Claudio; CARDUCCI, Augusto; DEL PINTO, Rita; VARRASSI, Giustino; GRASSI, Davide. Anti-Inflammatory and Anti-Nociceptive Effects of Cocoa: A Review on Future Perspectives in Treatment of Pain. **Pain and Therapy**, vol. 9, no. 1, p. 231–240, 20 Jun. 2020. DOI 10.1007/s40122-020-00165-5. Available at: <https://link.springer.com/10.1007/s40122-020-00165-5>.

DE LIMA, Flávia Oliveira; NONATO, Fabiana Regina; COUTO, Ricardo David; BARBOSA FILHO, José Maria; NUNES, Xirley Pereira; RIBEIRO DOS SANTOS, Ricardo; SOARES, Milena Botelho Pereira; VILLARREAL, Cristiane Flora. Mechanisms involved in the antinociceptive effects of 7-hydroxycoumarin. **Journal of natural products**, vol. 74, no. 4, p. 596–602, 25 Apr. 2011. DOI 10.1021/np100621c. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21417376>.

DETSI, Anastasia; KONTOGIORGIS, Christos; HADJIPAVLOU-LITINA, Dimitra. Coumarin derivatives: an updated patent review (2015-2016). **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, vol. 27, no. 11, p. 1201–1226, 2 Nov. 2017. DOI 10.1080/13543776.2017.1360284. Available at: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/13543776.2017.1360284>.

DI, Li; KERNS, Edward H. **Drug-Like Properties: Concepts, Structure Design and Methods from ADME to Toxicity Optimization**. [S. l.]: Academic Press, 2008. <https://doi.org/10.1016/C2013-0-18378-X>.

DI STASI, Luiz C. Coumarin Derivatives in Inflammatory Bowel Disease. **Molecules**, vol. 26, no. 2, p. 422, 15 Jan. 2021. DOI 10.3390/molecules26020422. Available at: <https://www.mdpi.com/1420-3049/26/2/422>.

DIEKE, S. H.; ALLEN, G. S.; RICHTER, C. P. The acute toxicity of thioureas and related compounds to wild and domestic Norway rats. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, vol. 90, no. 3, p. 260–270, 1947. .

DOBSON, A. J.; GERKIN, R. E. Coumarin-3-carboxylic Acid. **Acta Crystallographica Section C Crystal Structure Communications**, vol. 52, no. 12, p. 3081–3083, 15

Dec. 1996. DOI 10.1107/S0108270196010852. Available at: <http://scripts.iucr.org/cgi-bin/paper?S0108270196010852>.

DODICK, David W. A Phase-by-Phase Review of Migraine Pathophysiology. **Headache**, vol. 58, p. 4–16, 2018. <https://doi.org/10.1111/head.13300>.

EDVINSSON, Lars. The Trigeminovascular Pathway: Role of CGRP and CGRP Receptors in Migraine. **Headache**, vol. 57, p. 47–55, 2017. <https://doi.org/10.1111/head.13081>.

EGAN, William J.; LAURI, Georgio. Prediction of intestinal permeability. **Advanced Drug Delivery Reviews**, vol. 54, no. 3, p. 273–289, Mar. 2002. DOI 10.1016/S0169-409X(02)00004-2. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169409X02000042>.

EMAM, Soha H.; SONOUSHI, Amr; OSMAN, Eman O.; HWANG, Dukhyun; KIM, Gun-Do; HASSAN, Rasha A. Design and synthesis of methoxyphenyl- and coumarin-based chalcone derivatives as anti-inflammatory agents by inhibition of NO production and down-regulation of NF- κ B in LPS-induced RAW264.7 macrophage cells. **Bioorganic Chemistry**, vol. 107, p. 104630, Feb. 2021. DOI 10.1016/j.bioorg.2021.104630. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0045206821000067>.

ERA, Benedetta; DELOGU, Giovanna L.; PINTUS, Francesca; FAIS, Antonella; GATTO, Gianluca; URIARTE, Eugenio; BORGES, Fernanda; KUMAR, Amit; MATOS, Maria J. Looking for new xanthine oxidase inhibitors: 3-Phenylcoumarins versus 2-phenylbenzofurans. **International Journal of Biological Macromolecules**, vol. 162, p. 774–780, Nov. 2020. DOI 10.1016/j.ijbiomac.2020.06.152. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813020335935>.

ESCUADERO, Graciela E.; LAINO, Carlos H.; ECHEVERRÍA, Gustavo A.; PIRO, Oscar E.; MARTINI, Nancy; RODRÍGUEZ, Ailén N.; MARTÍNEZ MEDINA, Juan J.; LÓPEZ TÉVEZ, Libertad L.; FERRER, Evelina G.; WILLIAMS, Patricia A.M. Improving the antidepressant action and the bioavailability of sertraline by co-crystallization with

coumarin 3-carboxylate. Structural determination. **Chemico-Biological Interactions**, vol. 249, p. 46–55, Apr. 2016. DOI 10.1016/j.cbi.2016.03.010. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009279716300746>.

FARAG, Mayada Ragab; ALAGAWANY, Mahmoud. Erythrocytes as a biological model for screening of xenobiotics toxicity. **Chemico-Biological Interactions**, vol. 279, p. 73–83, Jan. 2018. DOI 10.1016/j.cbi.2017.11.007. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009279717308487>.

FEHRENBACHER, Jill C.; VASKO, Michael R.; DUARTE, Djane B. Models of Inflammation: Carrageenan- or Complete Freund's Adjuvant (CFA)-Induced Edema and Hypersensitivity in the Rat. **Current Protocols in Pharmacology**, vol. 56, no. 1, p. 5.4.1-5.4.4, Mar. 2012. DOI 10.1002/0471141755.ph0504s56. Available at: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/0471141755.ph0504s56>.

FENG, Dongxu; ZHANG, Aihua; YANG, Yuan; YANG, Peng. Coumarin-containing hybrids and their antibacterial activities. **Archiv der Pharmazie**, vol. 353, no. 6, p. 1900380, 6 Jun. 2020. DOI 10.1002/ardp.201900380. Available at: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ardp.201900380>.

FENG, Lili; SUN, Yi; SONG, Pingping; XU, Lisha; WU, Xingxin; WU, Xuefeng; SHEN, Yan; SUN, Yang; KONG, Lingdong; WU, Xudong; XU, Qiang. Seselin ameliorates inflammation via targeting Jak2 to suppress the proinflammatory phenotype of macrophages. **British Journal of Pharmacology**, vol. 176, no. 2, p. 317–333, 4 Jan. 2019. DOI 10.1111/bph.14521. Available at: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/bph.14521>.

FIELDS, Howard L. Pain modulation: expectation, opioid analgesia and virtual pain. [S. l.: s. n.], 2000. p. 245–253. DOI 10.1016/S0079-6123(08)62143-3. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0079612308621433>.

FINN, Gregory J.; KENEALY, Emma; CREAVEN, Bernadette S.; EGAN, Denise A. In vitro cytotoxic potential and mechanism of action of selected coumarins, using human

renal cell lines. **Cancer Letters**, vol. 183, no. 1, p. 61–68, Sep. 2002. DOI 10.1016/S0304-3835(02)00102-7. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304383502001027>.

FONSÊCA, Diogo V.; SALGADO, Paula R. R.; DE CARVALHO, Fabíola L.; SALVADORI, Mirian Graciela S. S.; PENHA, Antônia Rosângela S.; LEITE, Fagner C.; BORGES, Clóvis José S.; PIUVEZAM, Marcia R.; PORDEUS, Liana Clébia de Moraes; SOUSA, Damião P.; ALMEIDA, Reinaldo N. Nerolidol exhibits antinociceptive and anti-inflammatory activity: involvement of the GABAergic system and proinflammatory cytokines. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, vol. 30, no. 1, p. 14–22, Feb. 2016. DOI 10.1111/fcp.12166. Available at: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/fcp.12166>.

GAGLIOTTI VIGIL DE MELLO, Silvana Virginia; FRODE, Tania Silvia. In Vitro and In Vivo Experimental Model-based Approaches for Investigating Anti-inflammatory Properties of Coumarins. **Current Medicinal Chemistry**, vol. 25, no. 12, p. 1446–1476, 19 Apr. 2018. DOI 10.2174/0929867324666170502122740. Available at: <https://www.eurekaselect.com/152058/article>.

GALKIN, Anna; FALLARERO, Adyary; VUORELA, Pia M. Coumarins permeability in Caco-2 cell model. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, vol. 61, no. 2, p. 177–184, 1 Feb. 2009. DOI 10.1211/jpp/61.02.0006. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1211/jpp/61.02.0006>.

GANI, Osman A .B. S. M. Signposts of Docking and Scoring in Drug Design. **Chemical Biology & Drug Design**, vol. 70, no. 4, p. 360–365, Oct. 2007. DOI 10.1111/j.1747-0285.2007.00571.x. Available at: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1747-0285.2007.00571.x>.

GAO, Jintao; CHEN, Fangru; FANG, Huanan; MI, Jing; QI, Qi; YANG, Mengjuan. Daphnetin inhibits proliferation and inflammatory response in human HaCaT keratinocytes and ameliorates imiquimod-induced psoriasis-like skin lesion in mice. **Biological Research**, vol. 53, no. 1, p. 48, 20 Dec. 2020. DOI 10.1186/s40659-020-

00316-0. Available at: <https://biolres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40659-020-00316-0>.

GARAVITO, R. Michael; MULICHAK, Anne M. The Structure of Mammalian Cyclooxygenases. **Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure**, vol. 32, no. 1, p. 183–206, Jun. 2003. DOI 10.1146/annurev.biophys.32.110601.141906. Available at: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.biophys.32.110601.141906>.

GARAVITO, R.Michael; DEWITT, David L. The cyclooxygenase isoforms: structural insights into the conversion of arachidonic acid to prostaglandins. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, vol. 1441, no. 2–3, p. 278–287, Nov. 1999. DOI 10.1016/S1388-1981(99)00147-X. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S138819819900147X>.

GARCÍA-RAYADO, Guillermo; NAVARRO, Mercedes; LANAS, Angel. NSAID induced gastrointestinal damage and designing GI-sparing NSAIDs. **Expert Review of Clinical Pharmacology**, vol. 11, no. 10, p. 1031–1043, 3 Oct. 2018. DOI 10.1080/17512433.2018.1516143. Available at: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/17512433.2018.1516143>.

GARG, Sourbh Suren; GUPTA, Jeena; SHARMA, Shikha; SAHU, Debasis. An insight into the therapeutic applications of coumarin compounds and their mechanisms of action. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, vol. 152, p. 105424, Sep. 2020. DOI 10.1016/j.ejps.2020.105424. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S092809872030213X>.

GAUTAM, Raju; JACHAK, Sanjay M.; KUMAR, Vivek; MOHAN, C. Gopi. Synthesis, biological evaluation and molecular docking studies of stellatin derivatives as cyclooxygenase (COX-1, COX-2) inhibitors and anti-inflammatory agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, vol. 21, no. 6, p. 1612–1616, Mar. 2011. DOI 10.1016/j.bmcl.2011.01.116. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960894X11001508>.

GIERSE, J K; KOBOLDT, C M; WALKER, M C; SEIBERT, K; ISAKSON, P C. Kinetic basis for selective inhibition of cyclo-oxygenases. **The Biochemical journal**, vol. 339 (Pt 3, p. 607–14, 1 May 1999. DOI 10215599. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10215599>.

GOLDBERG, Daniel S; MCGEE, Summer J. Pain as a global public health priority. **BMC Public Health**, vol. 11, no. 1, p. 770, 6 Dec. 2011. DOI 10.1186/1471-2458-11-770. Available at: <http://bmcpublichealth.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2458-11-770>.

GOLDBERG, David E; HOLLAND, John H. Genetic Algorithms and Machine Learning. **Machine Learning**, vol. 3, no. 2, p. 95–99, 1988. DOI 10.1023/A:1022602019183. Available at: <https://doi.org/10.1023/A:1022602019183>.

GOMES JÚNIOR, Antonio Luiz; ISLAM, Muhammad Torequl; NICOLAU, Lucas Antonio Duarte; DE SOUZA, Luan Kevin Miranda; ARAÚJO, Tiago de Souza Lopes; LOPES DE OLIVEIRA, Guilherme Antônio; DE MELO NOGUEIRA, Kerolayne; DA SILVA LOPES, Luciano; MEDEIROS, Jand-Venes Rolim; MUBARAK, Mohammad S.; MELO-CAVALCANTE, Ana Amélia de Carvalho. Anti-Inflammatory, Antinociceptive, and Antioxidant Properties of Anacardic Acid in Experimental Models. **ACS Omega**, vol. 5, no. 31, p. 19506–19515, 11 Aug. 2020. DOI 10.1021/acsomega.0c01775. Available at: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsomega.0c01775>.

GOUDGAON, N M; SHESHIKANT, B U; DEEPA, D. Synthesis and biological activities of 3-{6-[3-(substituted phenyl)-1-phenyl-1H-pyrazol-4-yl]-2-thioxo-1,2,5,6-tetrahydropyrimidin-4-yl}-2H-chromen-2-ones. **Heterocyclic Lett.**, vol. 2, p. 154–161, 1 Jan. 2012. .

GURYANOV, Ivan; FIORUCCI, Stefano; TENNIKOVA, Tatiana. Receptor-ligand interactions: Advanced biomedical applications. **Materials Science and Engineering: C**, vol. 68, p. 890–903, Nov. 2016. DOI 10.1016/j.msec.2016.07.072. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928493116307469>.

HAMASAKI, Tadashi; YANO, Shigetoshi; NAKAMURA, Kazumi; YAMADA, Kazumichi. Pregabalin as a salvage preoperative treatment for refractory trigeminal neuralgia. **Journal of Clinical Neuroscience**, vol. 47, p. 240–244, Jan. 2018. DOI 10.1016/j.jocn.2017.10.039. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0967586817310974>.

HÁMOR, Peter U.; SCHWENDT, Marek. Metabotropic Glutamate Receptor Trafficking and its Role in Drug-Induced Neurobehavioral Plasticity. **Brain Plasticity**, vol. 7, no. 2, p. 61–76, 19 Oct. 2021. DOI 10.3233/BPL-210120. Available at: <https://www.medra.org/servlet/aliasResolver?alias=iospress&doi=10.3233/BPL-210120>.

HANADA, Takahisa. Ionotropic Glutamate Receptors in Epilepsy: A Review Focusing on AMPA and NMDA Receptors. **Biomolecules**, vol. 10, no. 3, p. 464, 18 Mar. 2020. DOI 10.3390/biom10030464. Available at: <https://www.mdpi.com/2218-273X/10/3/464>.

HARGREAVES, Kenneth M. Orofacial pain. **Pain**, vol. 152, no. 3, p. S25–S32, Mar. 2011. DOI 10.1016/j.pain.2010.12.024. Available at: <https://journals.lww.com/00006396-201103001-00005>.

HARVEY, Robert J.; DEPNER, Ulrike B.; WÄSSLE, Heinz; AHMADI, Seifollah; HEINDL, Cornelia; REINOLD, Heiko; SMART, Trevor G.; HARVEY, Kirsten; SCHÜTZ, Burkhard; ABO-SALEM, Osama M.; ZIMMER, Andreas; POISBEAU, Pierrick; WELZL, Hans; WOLFER, David P.; BETZ, Heinrich; ZEILHOFER, Hanns Ulrich; MÜLLER, Ulrike. GlyR $\alpha 3$: An Essential Target for Spinal PGE₂-Mediated Inflammatory Pain Sensitization. **Science**, vol. 304, no. 5672, p. 884–887, 7 May 2004. DOI 10.1126/science.1094925. Available at: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.1094925>.

HASSANEIN, Emad H. M.; SAYED, Ahmed M.; HUSSEIN, Omnia E.; MAHMOUD, Ayman M. Coumarins as Modulators of the Keap1/Nrf2/ARE Signaling Pathway. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, vol. 2020, p. 1–25, 25 Apr. 2020. DOI

10.1155/2020/1675957. Available at:
<https://www.hindawi.com/journals/omcl/2020/1675957/>.

HASSANPOUR, Shahin; REZAEI, Hadis; RAZAVI, Seyyed Mojtaba. Anti-nociceptive and antioxidant activity of betaine on formalin- and writhing tests induced pain in mice. **Behavioural Brain Research**, vol. 390, p. 112699, Jul. 2020. DOI 10.1016/j.bbr.2020.112699. Available at:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166432820303983>.

HEMSHEKHAR, M.; SUNITHA, K.; THUSHARA, R.M.; SEBASTIN SANTHOSH, M.; SHANMUGA SUNDARAM, M.; KEMPARAJU, K.; GIRISH, K.S. Antiarthritic and antiinflammatory propensity of 4-methylesculetin, a coumarin derivative. **Biochimie**, vol. 95, no. 6, p. 1326–1335, Jun. 2013. DOI 10.1016/j.biochi.2013.02.014. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0300908413000710>.

HIJOS-MALLADA, Gonzalo; SOSTRES, Carlos; GOMOLLÓN, Fernando. AINE, toxicidad gastrointestinal y enfermedad inflamatoria intestinal. **Gastroenterología y Hepatología**, vol. 45, no. 3, p. 215–222, Mar. 2022. DOI 10.1016/j.gastrohep.2021.06.003. Available at:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0210570521002016>.

HINGTGEN, Cynthia M.; VASKO, Michael R. Prostacyclin enhances the evoked-release of substance P and calcitonin gene-related peptide from rat sensory neurons. **Brain Research**, vol. 655, no. 1–2, p. 51–60, Aug. 1994. DOI 10.1016/0006-8993(94)91596-2. Available at:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0006899394915962>.

HINZ, Burkhard; BRUNE, Kay. Cyclooxygenase-2—10 Years Later. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, vol. 300, no. 2, p. 367–375, 1 Feb. 2002. DOI 10.1124/jpet.300.2.367. Available at:
<http://jpet.aspetjournals.org/lookup/doi/10.1124/jpet.300.2.367>.

HNG, Yue; LIN, Mei-Hsiang; LIN, Tzung-Sheng; LIU, I-Chen; LIN, I-Chun; LU, Yeh-

Lin; CHANG, Chiao-Nien; CHIU, Pei-Fang; TSAI, Keng-Chang; CHEN, Mei-Jou; LIANG, Pi-Hui. Design and synthesis of 3-benzylaminocoumarin-7-O-sulfamate derivatives as steroid sulfatase inhibitors. **Bioorganic Chemistry**, vol. 96, p. 103618, Mar. 2020. DOI 10.1016/j.bioorg.2020.103618. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0045206819320772>.

HUNSKAAR, S; FASMER, O B; HOLE, K. Formalin test in mice, a useful technique for evaluating mild analgesics. **Journal of neuroscience methods**, vol. 14, no. 1, p. 69–76, Jun. 1985. DOI 10.1016/0165-0270(85)90116-5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4033190>.

HUNSKAAR, Steinar; HOLE, Kjell. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain**, vol. 30, no. 1, p. 103–114, Jul. 1987. DOI 10.1016/0304-3959(87)90088-1. Available at: <https://journals.lww.com/00006396-198707000-00010>.

HUSS, U.; RINGBOM, T.; PERERA, P.; BOHLIN, L.; VASÄNGE, M. Screening of Ubiquitous Plant Constituents for COX-2 Inhibition with a Scintillation Proximity Based Assay. **Journal of Natural Products**, vol. 65, no. 11, p. 1517–1521, 1 Nov. 2002. DOI 10.1021/np020023m. Available at: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/np020023m>.

IKEDA, Yuri; UENO, Akinori; NARABA, Hiroaki; OH-ISHI, Sachiko. Involvement of vanilloid receptor VR1 and prostanoids in the acid-induced writhing responses of mice. **Life Sciences**, vol. 69, no. 24, p. 2911–2919, Nov. 2001. DOI 10.1016/S0024-3205(01)01374-1. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0024320501013741>.

INAGAKI, Nobuya; GONOI, Tohru; IV, John P.Clement; WANG, Chang-Zheng; AGUILAR-BRYAN, Lydia; BRYAN, Joseph; SEINO, Susumu. A Family of Sulfonylurea Receptors Determines the Pharmacological Properties of ATP-Sensitive K⁺ Channels. **Neuron**, vol. 16, no. 5, p. 1011–1017, May 1996. DOI 10.1016/S0896-6273(00)80124-5. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896627300801245>.

IRVINE, Mark W.; COSTA, Blaise M.; VOLIANSKIS, Arturas; FANG, Guangyu; CEOLIN, Laura; COLLINGRIDGE, Graham L.; MONAGHAN, Daniel T.; JANE, David E. Coumarin-3-carboxylic acid derivatives as potentiators and inhibitors of recombinant and native N-methyl-d-aspartate receptors. **Neurochemistry International**, vol. 61, no. 4, p. 593–600, Sep. 2012. DOI 10.1016/j.neuint.2011.12.020. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0197018612000058>.

IYENGAR, Smriti; JOHNSON, Kirk W.; OSSIPOV, Michael H.; AURORA, Sheena K. CGRP and the Trigeminal System in Migraine. **Headache**, vol. 59, no. 5, p. 659–681, 2019. <https://doi.org/10.1111/head.13529>.

JASIM, Mahmood H.M.; ABED, Mohammed N.; QAZZAZ, Mohannad E.; ALFAHAD, Mohanad; ALASSAF, Fawaz A. Aspirin-aromatic amino acid conjugates as selective Cox-2 inhibitors: A docking study. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, vol. 20, no. 3, p. 579–583, 17 Jan. 2022. DOI 10.4314/tjpr.v20i3.20. Available at: <https://www.ajol.info/index.php/tjpr/article/view/220162>.

JI, Hong; TAN, Yaling; GAN, Nana; ZHANG, Jing; LI, Shannuo; ZHENG, Xuan; WANG, Zhaohua; YI, Wei. Synthesis and anticancer activity of new coumarin-3-carboxylic acid derivatives as potential lactate transport inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, vol. 29, p. 115870, Jan. 2021. DOI 10.1016/j.bmc.2020.115870. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0968089620307008>.

JIA, QI. Generating and Screening a Natural Product Library for Cyclooxygenase and Lipoxygenase Dual Inhibitors. [*S. l.: s. n.*], 2003. p. 643–718. DOI 10.1016/S1572-5995(03)80016-9. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1572599503800169>.

JOHNSON, Anthony C; GREENWOOD-VAN MEERVELD, Beverley. Stress-induced pain: a target for the development of novel therapeutics. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, vol. 351, no. 2, p. 327–35, Nov. 2014. DOI 10.1124/jpet.114.218065. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25194019>.

KALKHAMBKAR, Rajesh G.; KULKARNI, Geeta M.; KAMANAVALLI, Chandrappa M.; PREMKUMAR, N.; ASDAQ, S.M.B.; SUN, Chung Ming. Synthesis and biological activities of some new fluorinated coumarins and 1-aza coumarins. **European Journal of Medicinal Chemistry**, vol. 43, no. 10, p. 2178–2188, Oct. 2008. DOI 10.1016/j.ejmech.2007.08.007. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0223523407003303>.

KANG, Kyong-Hwa; KONG, Chang-Suk; SEO, Youngwan; KIM, Moon-Moo; KIM, Se-Kwon. Anti-inflammatory effect of coumarins isolated from *Corydalis heterocarpa* in HT-29 human colon carcinoma cells. **Food and Chemical Toxicology**, vol. 47, no. 8, p. 2129–2134, Aug. 2009. DOI 10.1016/j.fct.2009.05.036. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278691509002646>.

KASPERKIEWICZ, Kinga; PONCZEK, Michał B.; OWCZAREK, Jacek; GUGA, Piotr; BUDZISZ, Elżbieta. Antagonists of Vitamin K—Popular Coumarin Drugs and New Synthetic and Natural Coumarin Derivatives. **Molecules**, vol. 25, no. 6, p. 1465, 24 Mar. 2020. DOI 10.3390/molecules25061465. Available at: <https://www.mdpi.com/1420-3049/25/6/1465>.

KAWAMURA, Toru; YAMAUCHI, Takeshi; KOYAMA, Mamoru; MARUYAMA, Tomoyuki; AKIRA, Toshiaki; NAKAMURA, Norifumi. Expression of prostaglandin EP2 receptor mRNA in the rat spinal cord. **Life Sciences**, vol. 61, no. 21, p. 2111–2116, Oct. 1997. DOI 10.1016/S0024-3205(97)00884-9. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0024320597008849>.

KIDD, B.L.; URBAN, L.A. Mechanisms of inflammatory pain. **British Journal of Anaesthesia**, vol. 87, no. 1, p. 3–11, Jul. 2001. DOI 10.1093/bja/87.1.3. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0007091217363390>.

KIEFER, James R.; PAWLITZ, Jennifer L.; MORELAND, Kirby T.; STEGEMAN, Roderick A.; HOOD, William F.; GIERSE, James K.; STEVENS, Anna M.; GOODWIN, Douglas C.; ROWLINSON, Scott W.; MARNETT, Lawrence J.; STALLINGS, William C.; KURUMBAIL, Ravi G. Structural insights into the stereochemistry of the

cyclooxygenase reaction. **Nature**, vol. 405, no. 6782, p. 97–101, May 2000. DOI 10.1038/35011103. Available at: <http://www.nature.com/articles/35011103>.

KIM, Ju Sun; KIM, Jin Cheul; SHIM, Sang Hee; LEE, Eun Ju; JIN, Wen Yi; BAE, Kihwan; SON, Kun Ho; KIM, Hyun Pyo; KANG, Sam Sik; CHANG, Hyeun Wook. Chemical constituents of the root of *Dystaenia takeshimana* and their anti-inflammatory activity. **Archives of Pharmacal Research**, vol. 29, no. 8, p. 617–623, Aug. 2006. DOI 10.1007/BF02968244. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/BF02968244>.

KITCHEN, Douglas B.; DECORNEZ, Hélène; FURR, John R.; BAJORATH, Jürgen. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. **Nature Reviews Drug Discovery**, vol. 3, no. 11, p. 935–949, 1 Nov. 2004. DOI 10.1038/nrd1549. Available at: <https://www.nature.com/articles/nrd1549>.

KOVRT, Brandon A.; GRIFFITH, James L.; PATEL, Vikram. Chronic pain and mental health: integrated solutions for global problems. **Pain**, vol. 159, no. 1, p. S85–S90, Sep. 2018. DOI 10.1097/j.pain.0000000000001296. Available at: <https://journals.lww.com/00006396-201809001-00013>.

KOSTOVA, Irena; MOMEKOV, Georgi; STANCHEVA, Peya. New Samarium(III), Gadolinium(III), and Dysprosium(III) Complexes of Coumarin-3-Carboxylic Acid as Antiproliferative Agents. **Metal-Based Drugs**, vol. 2007, p. 1–8, 27 Feb. 2007. DOI 10.1155/2007/15925. Available at: <https://www.hindawi.com/journals/mbd/2007/015925/abs/>.

KURUMBAIL, Ravi G.; STEVENS, Anna M.; GIERSE, James K.; MCDONALD, Joseph J.; STEGEMAN, Roderick A.; PAK, Jina Y.; GILDEHAUS, Daniel; IYASHIRO, Julie M.; PENNING, Thomas D.; SEIBERT, Karen; ISAKSON, Peter C.; STALLINGS, William C. Structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by anti-inflammatory agents. **Nature**, vol. 384, no. 6610, p. 644–648, 26 Dec. 1996. DOI 10.1038/384644a0. Available at: <http://www.nature.com/articles/384644a0>.

LAGES, Adriana dos Santos; ROMEIRO, Nelilma Correia; FRAGA, Carlos Alberto

Manssour; BARREIRO, Eliezer Jesus. Inibidores seletivos de prostaglandina endoperoxídeo sintase-2 (PGHS-2): nova estratégia para o tratamento da inflamação. **Química Nova**, vol. 21, no. 6, p. 761–771, Nov. 1998. DOI 10.1590/S0100-40421998000600017. Available at: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40421998000600017&lng=pt&nrm=iso&tling=pt.

LAKE, B.G. Coumarin Metabolism, Toxicity and Carcinogenicity: Relevance for Human Risk Assessment. **Food and Chemical Toxicology**, vol. 37, no. 4, p. 423–453, Apr. 1999. DOI 10.1016/S0278-6915(99)00010-1. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278691599000101>.

LATREMOLIERE, Alban; WOOLF, Clifford J. Central Sensitization: A Generator of Pain Hypersensitivity by Central Neural Plasticity. **The Journal of Pain**, vol. 10, no. 9, p. 895–926, Sep. 2009. DOI 10.1016/j.jpain.2009.06.012. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1526590009006099>.

LEACH, Andrew R. **Molecular Modelling: Principles and applications**. Second edi. London: Prentice Hall, 2001.

LEE, Greg I.; NEUMEISTER, Michael W. Pain: Pathways and Physiology. **Clinics in Plastic Surgery**, vol. 47, no. 2, p. 173–180, Apr. 2020. DOI 10.1016/j.cps.2019.11.001. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0094129819301130>.

LEE, R E; BYKADI, G; RITSCHER, W A. Inhibition of prostaglandin biosynthesis by coumarin, 4-hydroxycoumarin, and 7-hydroxycoumarin. **Arzneimittel-Forschung**, vol. 31, no. 4, p. 640–2, 1981. DOI 7195710. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7195710>.

LEE, Shin Hwa; PARK, Cheol; JIN, Cheng-Yun; KIM, Gi-Young; MOON, Sung-Kwon; HYUN, Jin Won; LEE, Won Ho; CHOI, Byung Tae; KWON, Taeg Kyu; YOO, Young Hyun; CHOI, Yung Hyun. Involvement of extracellular signal-related kinase signaling

in esculetin induced G1 arrest of human leukemia U937 cells. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, vol. 62, no. 10, p. 723–729, Dec. 2008. DOI 10.1016/j.biopha.2007.12.001. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S075333220700279X>.

LI, Albert P. Screening for human ADME/Tox drug properties in drug discovery. **Drug Discovery Today**, vol. 6, no. 7, p. 357–366, Apr. 2001. DOI 10.1016/S1359-6446(01)01712-3. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359644601017123>.

LIMA, Vilma; SILVA, Caio B; MAFEZOLI, Jair; BEZERRA, Mirna M; MORAES, M Odorico; MOURÃO, Guilherme S M M; SILVA, J Nunes; OLIVEIRA, M Conceição F. Antinociceptive activity of the pyranocoumarin seselin in mice. **Fitoterapia**, vol. 77, no. 7–8, p. 574–8, Dec. 2006. DOI 10.1016/j.fitote.2006.09.005. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17055189>.

LIN, Pen-Yuan; YEH, Kuang-Sheng; SU, Chien-Ling; SHEU, Shiow-Yunn; CHEN, Tiffany; OU, Keng-Liang; LIN, Mei-Hsiang; LEE, Lin-Wen. Synthesis and Antibacterial Activities of Novel 4-Hydroxy-7-hydroxy- and 3-Carboxycoumarin Derivatives. **Molecules**, vol. 17, no. 9, p. 10846–10863, 10 Sep. 2012. DOI 10.3390/molecules170910846. Available at: <http://www.mdpi.com/1420-3049/17/9/10846>.

LIPINSKI, Celio F.; MALTAROLLO, Vinicius G.; OLIVEIRA, Patricia R.; DA SILVA, Alberico B. F.; HONORIO, Kathia Maria. Advances and Perspectives in Applying Deep Learning for Drug Design and Discovery. **Frontiers in Robotics and AI**, vol. 6, 5 Nov. 2019. DOI 10.3389/frobt.2019.00108. Available at: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/frobt.2019.00108/full>.

LIPINSKI, Christopher A.; LOMBARDO, Franco; DOMINY, Beryl W.; FEENEY, Paul J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, vol. 64, no. SUPPL., p. 4–17, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.019>.

LIU, Qing; HE, Hongwen; MAI, Lijia; YANG, Shengyan; FAN, Wenguo; HUANG, Fang. Peripherally Acting Opioids in Orofacial Pain. **Frontiers in Neuroscience**, vol. 15, 4 May 2021. DOI 10.3389/fnins.2021.665445. Available at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnins.2021.665445/full>.

LIU, Yan-Ping; YAN, Gui; XIE, Yu-Tong; LIN, Tian-Ci; ZHANG, Wei; LI, Juan; WU, Ying-Ju; ZHOU, Jun-Yu; FU, Yan-Hui. Bioactive prenylated coumarins as potential anti-inflammatory and anti-HIV agents from *Clausena lenis*. **Bioorganic Chemistry**, vol. 97, p. 103699, Apr. 2020. DOI 10.1016/j.bioorg.2020.103699. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S004520681931870X>.

LOESER, John D.; TREEDE, Rolf-Detlef. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology ☆. **Pain**, vol. 137, no. 3, p. 473–477, 31 Jul. 2008. DOI 10.1016/j.pain.2008.04.025. Available at: <https://journals.lww.com/00006396-200807310-00005>.

LONČARIĆ, Melita; GAŠO-SOKAČ, Dajana; JOKIĆ, Stela; MOLNAR, Maja. Recent Advances in the Synthesis of Coumarin Derivatives from Different Starting Materials. **Biomolecules**, vol. 10, no. 1, p. 151, 16 Jan. 2020. DOI 10.3390/biom10010151. Available at: <https://www.mdpi.com/2218-273X/10/1/151>.

LUCCARINI, P; CHILDERIC, A; GAYDIER, A; VOISIN, D; DALLEL, R. The Orofacial Formalin Test in the Mouse: A Behavioral Model for Studying Physiology and Modulation of Trigeminal Nociception. **The Journal of Pain**, vol. 7, no. 12, p. 908–914, Dec. 2006. DOI 10.1016/j.jpain.2006.04.010. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1526590006007644>.

LUCIDO, Michael J.; ORLANDO, Benjamin J.; VECCHIO, Alex J.; MALKOWSKI, Michael G. Crystal Structure of Aspirin-Acetylated Human Cyclooxygenase-2: Insight into the Formation of Products with Reversed Stereochemistry. **Biochemistry**, vol. 55, no. 8, p. 1226–1238, 1 Mar. 2016. DOI 10.1021/acs.biochem.5b01378. Available at: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.biochem.5b01378>.

MAGALHÃES, Wendell Santos; CORRÊA, Célia Maria; ALENCASTRO, Ricardo Bicca de; NAGEM, Tanus Jorge. Bases moleculares da ação anti-inflamatória dos ácidos oleanólico e ursólico sobre as isoformas da ciclo-oxigenase por docking e dinâmica molecular. **Química Nova**, vol. 35, no. 2, p. 241–248, 2012. DOI 10.1590/S0100-40422012000200003. Available at: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422012000200003&lng=pt&nrm=iso&tlng=en.

MALMBERG, AB; YAKSH, TL. Cyclooxygenase inhibition and the spinal release of prostaglandin E2 and amino acids evoked by paw formalin injection: a microdialysis study in unanesthetized rats. **The Journal of Neuroscience**, vol. 15, no. 4, p. 2768–2776, 1 Apr. 1995. DOI 10.1523/JNEUROSCI.15-04-02768.1995. Available at: <https://www.jneurosci.org/lookup/doi/10.1523/JNEUROSCI.15-04-02768.1995>.

MANEVICH, Yefim; HELD, Kathryn D.; BIAGLOW, John E. Coumarin-3-Carboxylic Acid as a Detector for Hydroxyl Radicals Generated Chemically and by Gamma Radiation. **Radiation Research**, vol. 148, no. 6, p. 580, Dec. 1997. DOI 10.2307/3579734. Available at: <https://www.jstor.org/stable/3579734?origin=crossref>.

MARNETT, Lawrence J. Recent developments in cyclooxygenase inhibition. **Prostaglandins & Other Lipid Mediators**, vol. 68–69, p. 153–164, Aug. 2002. DOI 10.1016/S0090-6980(02)00027-8. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0090698002000278>.

MARSHALL, Paul J.; KULMACZ, Richard J. Prostaglandin H synthase: Distinct binding sites for cyclooxygenase and peroxidase substrates. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, vol. 266, no. 1, p. 162–170, Oct. 1988. DOI 10.1016/0003-9861(88)90246-9. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0003986188902469>.

MARTELLETTI, Paolo; EDVINSSON, Lars; ASHINA, Messoud. Shaping the future of migraine targeting Calcitonin-Gene-Related-Peptide with the Disease-Modifying Migraine Drugs (DMMDs). **Journal of Headache and Pain**, vol. 20, no. 1, p. 19–21,

2019. <https://doi.org/10.1186/s10194-019-1009-9>.

MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, Francisco; RAZO-HERNÁNDEZ, Rodrigo; PERAZA-CAMPOS, Ana; VILLANUEVA-GARCÍA, Manuel; SUMAYA-MARTÍNEZ, Maria; CANO, Daniel; GÓMEZ-SANDOVAL, Zeferino. Synthesis and in Vitro Antioxidant Activity Evaluation of 3-Carboxycoumarin Derivatives and QSAR Study of Their DPPH• Radical Scavenging Activity. **Molecules**, vol. 17, no. 12, p. 14882–14898, 13 Dec. 2012. DOI 10.3390/molecules171214882. Available at: <http://www.mdpi.com/1420-3049/17/12/14882>.

MATIADIS, Dimitris; SAGNOU, Marina. Pyrazoline Hybrids as Promising Anticancer Agents: An Up-to-Date Overview. **International Journal of Molecular Sciences**, vol. 21, no. 15, p. 5507, 31 Jul. 2020. DOI 10.3390/ijms21155507. Available at: <https://www.mdpi.com/1422-0067/21/15/5507>.

MATOS, Maria J.; HERRERA IBATÁ, Diana M.; URIARTE, Eugenio; VIÑA, Dolores. Coumarin-Rasagiline Hybrids as Potent and Selective h MAO-B Inhibitors, Antioxidants, and Neuroprotective Agents. **ChemMedChem**, vol. 15, no. 6, p. 532–538, 18 Mar. 2020. DOI 10.1002/cmdc.202000018. Available at: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cmdc.202000018>.

MATOS, Maria João; HOGGER, Veronika; GASPAR, Alexandra; KACHLER, Sonja; BORGES, Fernanda; URIARTE, Eugenio; SANTANA, Lourdes; KLOTZ, Karl-Norbert. Synthesis and adenosine receptors binding affinities of a series of 3-aryl coumarins. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, vol. 65, no. 11, p. 1590–1597, 14 Oct. 2013. DOI 10.1111/jphp.12135. Available at: <https://academic.oup.com/jpp/article/65/11/1590-1597/6132862>.

MENG, Xuan-Yu; ZHANG, Hong-Xing; MEZEI, Mihaly; CUI, Meng. Molecular Docking: A Powerful Approach for Structure-Based Drug Discovery. **Current Computer Aided-Drug Design**, vol. 7, no. 2, p. 146–157, 1 Jun. 2011. DOI 10.2174/157340911795677602. Available at: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1573->

4099&volume=7&issue=2&spage=146.

MERRILL, R L. Orofacial pain mechanisms and their clinical application. **Dental clinics of North America**, vol. 41, no. 2, p. 167–88, Apr. 1997. DOI 9142478. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9142478>.

MEYER, Richard A.; RINGKAMP, Matthias; CAMPBELL, James N.; RAJA, Srinivasa N. Peripheral mechanisms of cutaneous nociception. **Wall and Melzack's Textbook of Pain**. [S. l.]: Elsevier, 2008. p. 3–34. DOI 10.1016/B0-443-07287-6/50006-0. Available at: <https://www.elsevier.com/books-and-journals/deleted-doi>.

MICHAEL GARAVITO, R; MALKOWSKI, Michael G; DEWITT, David L. The structures of prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2. **Prostaglandins & Other Lipid Mediators**, vol. 68–69, p. 129–152, Aug. 2002. DOI 10.1016/S0090-6980(02)00026-6. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0090698002000266>.

MILLER, Kenneth E.; HOFFMAN, E. Matthew; SUTHARSHAN, Mathura; SCHECHTER, Ruben. Glutamate pharmacology and metabolism in peripheral primary afferents: Physiological and pathophysiological mechanisms. **Pharmacology & Therapeutics**, vol. 130, no. 3, p. 283–309, Jun. 2011. DOI 10.1016/j.pharmthera.2011.01.005. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0163725811000222>.

MINHAS, Richa; BANSAL, Gulshan; BANSAL, Yogita. Novel Coupled Molecules from Active Structural Motifs of Synthetic and Natural Origin as Immunosuppressants. **Medicinal Chemistry**, vol. 16, no. 4, p. 544–554, 20 May 2020. DOI 10.2174/1573406415666190409111459. Available at: <https://www.eurekaselect.com/171468/article>.

MITCHELL, Jane A; KIRKBY, Nicholas S. Eicosanoids, prostacyclin and cyclooxygenase in the cardiovascular system. **British Journal of Pharmacology**, vol. 176, no. 8, p. 1038–1050, 14 Apr. 2019. DOI 10.1111/bph.14167. Available at: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/bph.14167>.

MONTES, G. C.; HAMMES, N.; DA ROCHA, M. D.; MONTAGNOLI, T. L.; FRAGA, C. A. M.; BARREIRO, E. J.; SUDO, R. T.; ZAPATA-SUDO, G. Treatment with Adenosine Receptor Agonist Ameliorates Pain Induced by Acute and Chronic Inflammation. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, vol. 358, no. 2, p. 315–323, 13 Jul. 2016. DOI 10.1124/jpet.115.231241. Available at: <http://jpet.aspetjournals.org/cgi/doi/10.1124/jpet.115.231241>.

MORRIS, Garrett M.; GOODSELL, David S.; HALLIDAY, Robert S.; HUEY, Ruth; HART, William E.; BELEW, Richard K.; OLSON, Arthur J. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. **Journal of Computational Chemistry**, vol. 19, no. 14, p. 1639–1662, 15 Nov. 1998. DOI 10.1002/(SICI)1096-987X(19981115)19:14<1639::AID-JCC10>3.0.CO;2-B. Available at: [https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/\(SICI\)1096-987X\(19981115\)19:14%3C1639::AID-JCC10%3E3.0.CO;2-B](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/(SICI)1096-987X(19981115)19:14%3C1639::AID-JCC10%3E3.0.CO;2-B).

MUKHERJEE, Abhijit; GHOSH, Suvranil; SARKAR, Rudraditya; SAMANTA, Satyajit; GHOSH, Sudipta; PAL, Mahadeb; MAJEE, Adinath; SEN, Sukanta Kumar; SINGH, Bula. Synthesis, characterization and unravelling the molecular interaction of new bioactive 4-hydroxycoumarin derivative with biopolymer: Insights from spectroscopic and theoretical aspect. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, vol. 189, p. 124–137, Dec. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2018.10.003>.

MUKHTAR, Aqsa; MANSHA, Asim; ASIM, Sadia; SHAHZAD, Alina; BIBI, Shamsa. Excited State Complexes of Coumarin Derivatives. **Journal of Fluorescence**, vol. 32, no. 1, p. 1–17, 27 Jan. 2022. DOI 10.1007/s10895-021-02807-z. Available at: <https://link.springer.com/10.1007/s10895-021-02807-z>.

MUÑOZ-CASTAÑEDA, Juan; MUNTANÉ, Jordi; MUÑOZ, María C; BUJALANCE, Inmaculada; MONTILLA, Pedro; TÚNEZ, Isaac. Estradiol and catecholestrogens protect against adriamycin-induced oxidative stress in erythrocytes of ovariectomized rats. **Toxicology Letters**, vol. 160, no. 3, p. 196–203, 25 Jan. 2006. DOI 10.1016/j.toxlet.2005.07.003. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378427405002092>.

NÁFRÁDI, Máté; FARKAS, Luca; ALAPI, Tünde; HERNÁDI, Klára; KOVÁCS, Krisztina; WOJNÁROVITS, László; TAKÁCS, Erzsébet. Application of coumarin and coumarin-3-carboxylic acid for the determination of hydroxyl radicals during different advanced oxidation processes. **Radiation Physics and Chemistry**, vol. 170, p. 108610, May 2020. DOI 10.1016/j.radphyschem.2019.108610. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0969806X19312575>.

NASIR, Naurah Nabihah; SEKAR, Mahendran; FULORIA, Shivkanya; GAN, Siew Hua; RANI, Nur Najihah Izzati Mat; RAVI, Subban; BEGUM, M. Yasmin; CHIDAMBARAM, Kumarappan; SATHASIVAM, Kathiresan V.; JEYABALAN, Srikanth; DHIRAVIDAMANI, Arulmozhi; THANGAVELU, Lakshmi; LUM, Pei Teng; SUBRAMANIYAN, Vetriselvan; WU, Yuan Seng; AZAD, Abul Kalam; FULORIA, Neeraj Kumar. Kirenol: A Potential Natural Lead Molecule for a New Drug Design, Development, and Therapy for Inflammation. **Molecules**, vol. 27, no. 3, p. 734, 23 Jan. 2022. DOI 10.3390/molecules27030734. Available at: <https://www.mdpi.com/1420-3049/27/3/734>.

NAVIA, M; CHATURVEDI, P. Design principles for orally bioavailable drugs. **Drug Discovery Today**, vol. 1, no. 5, p. 179–189, May 1996. DOI 10.1016/1359-6446(96)10020-9. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/1359644696100209>.

NISHIHAM, Isao; TOSHIKI, Minami; WATANABE, Yasuyoshi; ITO, Seiji; HAYAISHI, Osamu. Prostaglandin E2 stimulates glutamate release from synaptosomes of rat spinal cord. **Neuroscience Letters**, vol. 196, no. 1–2, p. 57–60, Aug. 1995. DOI 10.1016/0304-3940(95)11839-O. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/030439409511839O>.

NURISSO, Alessandra; BRAVO, Juan; CARRUPT, Pierre-Alain; DAINA, Antoine. Molecular Docking Using the Molecular Lipophilicity Potential as Hydrophobic Descriptor: Impact on GOLD Docking Performance. **Journal of Chemical Information and Modeling**, vol. 52, no. 5, p. 1319–1327, 25 May 2012. DOI 10.1021/ci200515g. Available at: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ci200515g>.

OGA, SEIZI; CAMARGO, MÁRCIA MARIA DE ALMEIDA; BATISTUZZO, JOSÉ ANTONIO DE OLIVEIRA. **Fundamentos de Toxicologia**. 4ª Ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2014.

OKESON, Jeffrey P. **Bell's Oral and Facial Pain**. Seventh ed. Chicago, Illinois: Quintessence Publishing Co. Inc., 2014.

ONASANWO, Samuel A; ROTU, Rume A. Antinociceptive and anti-inflammatory potentials of kolaviron: mechanisms of action. **Journal of basic and clinical physiology and pharmacology**, vol. 27, no. 4, p. 363–70, 1 Jun. 2016. DOI 10.1515/jbcpp-2015-0075. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26812784>.

ONODERA, Kenji; SATOU, Kazuhito; HIROTA, Hiroshi. Evaluations of Molecular Docking Programs for Virtual Screening. **Journal of Chemical Information and Modeling**, vol. 47, no. 4, p. 1609–1618, 1 Jul. 2007. DOI 10.1021/ci7000378. Available at: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ci7000378>.

ORR, Patty Montgomery; SHANK, Bettina Cobb; BLACK, Amy Conner. The Role of Pain Classification Systems in Pain Management. **Critical Care Nursing Clinics of North America**, vol. 29, no. 4, p. 407–418, Dec. 2017. DOI 10.1016/j.cnc.2017.08.002. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0899588517300552>.

PARK, Soo-Hyun; SIM, Yun-Beom; KANG, Yu-Jung; KIM, Sung-Su; KIM, Chea-Ha; KIM, Su-Jin; LIM, Su-Min; SUH, Hong-Won. Antinociceptive Profiles and Mechanisms of Orally Administered Coumarin in Mice. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, vol. 36, no. 6, p. 925–930, 2013. DOI 10.1248/bpb.b12-00905. Available at: https://www.jstage.jst.go.jp/article/bpb/36/6/36_b12-00905/_article.

PEREIRA, Thiago Moreira; FRANCO, Daiana Portella; VITORIO, Felipe; KUMMERLE, Arthur Eugen. Coumarin Compounds in Medicinal Chemistry: Some Important Examples from the Last Years. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, vol. 18, no. 2, p. 124–148, 24 Apr. 2018. DOI 10.2174/1568026618666180329115523. Available

at: <https://www.eurekaselect.com/160838/article>.

PEREIRA, Ticiana Praciano; CAMPOS, Adriana Rolim; LEAL, Luzia Kalyne A M; PIERDONÁ, Taiana Magalhães; TOYAMA, Marcos H; MONTEIRO, Helena Serra Azul; MARTINS, Alice Maria Costa. K⁺(ATP) channels-independent analgesic action of *Crotalus durissus cumanensis* venom. **Natural product communications**, vol. 5, no. 7, p. 1103–6, Jul. 2010. DOI 20734950. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20734950>.

PEREIRA, Vanessa; GOUDET, Cyril. Emerging Trends in Pain Modulation by Metabotropic Glutamate Receptors. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, vol. 11, 4 Jan. 2019. DOI 10.3389/fnmol.2018.00464. Available at: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fnmol.2018.00464/full>.

PERONI, Elisa; CAMINATI, Gabriella; BAGLIONI, Piero; NUTI, Francesca; CHELLI, Mario; PAPINI, Anna M. A new lipophilic fluorescent probe for interaction studies of bioactive lipopeptides with membrane models. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, vol. 12, no. 13, p. 1731–1734, Jul. 2002. DOI 10.1016/S0960-894X(02)00253-6. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960894X02002536>.

PICOT, Daniel; LOLL, Patrick J.; GARAVITO, R. Michael. The X-ray crystal structure of the membrane protein prostaglandin H₂ synthase-1. **Nature**, vol. 367, no. 6460, p. 243–249, Jan. 1994. DOI 10.1038/367243a0. Available at: <http://www.nature.com/articles/367243a0>.

PLEWCZYNSKI, Dariusz; ŁAŻNIEWSKI, Michał; AUGUSTYNIAK, Rafał; GINALSKI, Krzysztof. Can we trust docking results? Evaluation of seven commonly used programs on PDBbind database. **Journal of Computational Chemistry**, vol. 32, no. 4, p. 742–755, Mar. 2011. DOI 10.1002/jcc.21643. Available at: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jcc.21643>.

PLOUG, KB; AMRUTKAR, DV; BAUN, M; RAMACHANDRAN, R; IVERSEN, A; LUND, TM; GUPTA, S; HAY-SCHMIDT, A; OLESEN, J; JANSEN-OLESEN, I. K ATP channel

openers in the trigeminovascular system. **Cephalalgia**, vol. 32, no. 1, p. 55–65, 5 Jan. 2012. DOI 10.1177/0333102411430266. Available at: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0333102411430266>.

PODSIEDLIK, Maria; MARKOWICZ-PIASECKA, Magdalena; SIKORA, Joanna. Erythrocytes as model cells for biocompatibility assessment, cytotoxicity screening of xenobiotics and drug delivery. **Chemico-Biological Interactions**, vol. 332, p. 109305, Dec. 2020. DOI 10.1016/j.cbi.2020.109305. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009279720316896>.

PU, Wenchen; LIN, Yuan; ZHANG, Jianshuo; WANG, Fei; WANG, Chun; ZHANG, Guolin. 3-Arylcoumarins: Synthesis and potent anti-inflammatory activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, vol. 24, no. 23, p. 5432–5434, Dec. 2014. DOI 10.1016/j.bmcl.2014.10.033. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960894X14010932>.

QUINTANS-JÚNIOR, Lucindo José; MELO, Mônica S; DE SOUSA, Damião P; ARAUJO, Adriano Antunes Souza; ONOFRE, Alexandre C S; GELAIN, Daniel P; GONÇALVES, Juan C R; ARAÚJO, Demétrius A M; ALMEIDA, Jackson R G S; BONJARDIM, Leonardo R. Antinociceptive effects of citronellal in formalin-, capsaicin-, and glutamate-induced orofacial nociception in rodents and its action on nerve excitability. **Journal of orofacial pain**, United States, vol. 24, no. 3, p. 305–312, 2010.

RABOISSON, Patrick; DALLEL, Radhouane. The orofacial formalin test. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, vol. 28, no. 2, p. 219–226, Apr. 2004. DOI 10.1016/j.neubiorev.2003.12.003. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0149763403001593>.

RANGEL, Marisa; MALPEZZI, Elena L.A.; SUSINI, Sylvia M.M.; DE FREITAS, JoséCarlos. Hemolytic activity in extracts of the diatom *Nitzschia*. **Toxicon**, vol. 35, no. 2, p. 305–309, Feb. 1997. DOI 10.1016/S0041-0101(96)00148-1. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0041010196001481>.

RANNEH, Yazan; ALI, Faisal; AKIM, Abdah Md; HAMID, Hasiah Abd; KHAZAAI, Huzwah; FADEL, Abdulmannan. Crosstalk between reactive oxygen species and pro-inflammatory markers in developing various chronic diseases: a review. **Applied Biological Chemistry**, vol. 60, no. 3, p. 327–338, 2017. <https://doi.org/10.1007/s13765-017-0285-9>.

RAYNOR, K; KONG, H; CHEN, Y; YASUDA, K; YU, L; BELL, G I; REISINE, T. Pharmacological characterization of the cloned kappa-, delta-, and mu-opioid receptors. **Molecular pharmacology**, vol. 45, no. 2, p. 330–4, Feb. 1994. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8114680>.

REID, Kim J.; HARKER, Julie; BALA, Malgorzata M.; TRUYERS, Carla; KELLEN, Eliane; BEKKERING, Geertruida Elsiena; KLEIJNEN, Jos. Epidemiology of chronic non-cancer pain in Europe: narrative review of prevalence, pain treatments and pain impact. **Current Medical Research and Opinion**, vol. 27, no. 2, p. 449–462, 3 Feb. 2011. DOI 10.1185/03007995.2010.545813. Available at: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1185/03007995.2010.545813>.

REJÓN-ORANTES, J.C.; PERDOMO SUARÉZ, D.P.; REJÓN-RODRÍGUEZ, A.; HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ, S.; GARCÍA LIÉVANO, O.E.; LÓPEZ RODRÍGUEZ, D.; PÉREZ DE LA MORA, M. Aqueous root extracts from *Mimosa albida* Humb. & Bonpl. ex Willd display antinociceptive activity in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, vol. 149, no. 2, p. 522–526, Sep. 2013. DOI 10.1016/j.jep.2013.07.010. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378874113004996>.

REN, K; DUBNER, R. Central nervous system plasticity and persistent pain. **Journal of orofacial pain**, vol. 13, no. 3, p. 155–63; discussion 164-71, 1999. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10823030>.

REN, Qing-Cheng; GAO, Chuan; XU, Zhi; FENG, Lian-Shun; LIU, Ming-Liang; WU, Xiang; ZHAO, Feng. Bis-coumarin Derivatives and Their Biological Activities. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, vol. 18, no. 2, p. 101–113, 24 Apr. 2018. DOI

10.2174/1568026618666180221114515. Available at:
<https://www.eurekaselect.com/159990/article>.

REVANKAR, Hrishikesh Mohan; BUKHARI, Syed Nasir Abbas; KUMAR, Gajjela Bharath; QIN, Hua-Li. Coumarins scaffolds as COX inhibitors. **Bioorganic Chemistry**, vol. 71, p. 146–159, Apr. 2017. DOI 10.1016/j.bioorg.2017.02.001. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0045206816303960>.

RIVEIRO, M.; DE KIMPE, N.; MOGLIONI, A.; VAZQUEZ, R.; MONCZOR, F.; SHAYO, C.; DAVIO, C. Coumarins: Old Compounds with Novel Promising Therapeutic Perspectives. **Current Medicinal Chemistry**, vol. 17, no. 13, p. 1325–1338, 1 May 2010. DOI 10.2174/092986710790936284. Available at: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=0929-8673&volume=17&issue=13&spage=1325>.

RODRIGUES, Gabriela Cristina Soares; DOS SANTOS MAIA, Mayara; DE MENEZES, Renata Priscila Barros; CAVALCANTI, Andreza Barbosa Silva; DE SOUSA, Natália Ferreira; DE MOURA, Érika Paiva; MONTEIRO, Alex France Messias; SCOTTI, Luciana; SCOTTI, Marcus Tullius. Ligand and Structure-based Virtual Screening of Lamiaceae Diterpenes with Potential Activity against a Novel Coronavirus (2019-nCoV). **Current Topics in Medicinal Chemistry**, vol. 20, no. 24, p. 2126–2145, 2 Nov. 2020. DOI 10.2174/1568026620666200716114546. Available at: <https://www.eurekaselect.com/183800/article>.

RORIJE, Emiel; ALDENBERG, Tom; BUIST, Harrie; KROESE, Dinant; SCHÜÜRMAN, Gerrit. The OSIRIS Weight of Evidence approach: ITS for skin sensitisation. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, vol. 67, no. 2, p. 146–156, Nov. 2013. DOI 10.1016/j.yrtph.2013.06.003. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0273230013000895>.

ROSA, Suzan Gonçalves; BRÜNING, César Augusto; PESARICO, Ana Paula; SOUZA, Ana Cristina Guerra de; NOGUEIRA, Cristina Wayne. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of 2,2'-dipyridyl diselenide through reduction of inducible nitric

oxide synthase, nuclear factor-kappa B and c-Jun N-terminal kinase phosphorylation levels in the mouse spinal cord. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, vol. 48, p. 38–45, Jul. 2018. DOI 10.1016/j.jtemb.2018.02.021. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0946672X17309574>.

ROSENFELD, J.Peter; BROTON, James G.; CLAVIER, Ronald M. A reliable, facial nociception device for unrestrained, awake animals: Effects of morphine and trigeminal complex lesions. **Physiology & Behavior**, vol. 21, no. 2, p. 287–290, Aug. 1978. DOI 10.1016/0031-9384(78)90056-2. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0031938478900562>.

ROSLAND, Jan Henrik; TJØLSEN, Arne; MÆHLE, Bjørn; HOLE, Kjell. The formalin test in mice: effect of formalin concentration. **Pain**, vol. 42, no. 2, p. 235–242, Aug. 1990. DOI 10.1016/0304-3959(90)91167-H. Available at: <https://journals.lww.com/00006396-199008000-00012>.

ROTH, C.M.; NEAL, B.L.; LENHOFF, A.M. Van der Waals interactions involving proteins. **Biophysical Journal**, vol. 70, no. 2, p. 977–987, Feb. 1996. DOI 10.1016/S0006-3495(96)79641-8. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006349596796418>.

ROUSSEAU, Cécile F.; SABBAH-PETROVER, Emmanuelle; REVAUD, Deborah; VOISIN, Emmanuelle M.; RUTHSATZ, Manfred; CHIAVAROLI, Carlo. Toxicological Aspects in the Regulation of Gene Therapy Medicinal Products. **Regulatory Toxicology**. Cham: Springer International Publishing, 2021. p. 1431–1458. DOI 10.1007/978-3-030-57499-4_141. Available at: https://link.springer.com/10.1007/978-3-030-57499-4_141.

ROWE, Christopher. **Neurosciences**. [S. l.: s. n.], 2011. vol. 52, . <https://doi.org/10.2307/j.ctvw1d7fz.6>.

S. MAIA, Mayara; DE SOUSA, Natália F.; RODRIGUES, Gabriela C.S.; MONTEIRO, Alex F.M.; SCOTTI, Marcus T.; SCOTTI, Luciana. Lignans and Neolignans Anti-

tuberculosis Identified by QSAR and Molecular Modeling. **Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening**, vol. 23, no. 6, p. 504–516, 5 Oct. 2020. DOI 10.2174/1386207323666200226094940. Available at: <https://www.eurekaselect.com/179748/article>.

SANDER, Thomas; FREYSS, Joel; VON KORFF, Modest; RUFENER, Christian. DataWarrior: An Open-Source Program For Chemistry Aware Data Visualization And Analysis. **Journal of Chemical Information and Modeling**, vol. 55, no. 2, p. 460–473, 23 Feb. 2015. DOI 10.1021/ci500588j. Available at: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ci500588j>.

SATO, Y.; BANDO, H.; DI PIAZZA, M.; GOWING, G.; HERBERTS, C.; JACKMAN, S.; LEONI, G.; LIBERTINI, S.; MACLACHLAN, T.; MCBLANE, J.W.; PEREIRA MOURIÈS, L.; SHARPE, M.; SHINGLETON, W.; SURMACZ-CORDLE, B.; YAMAMOTO, K.; VAN DER LAAN, J.W. Tumorigenicity assessment of cell therapy products: The need for global consensus and points to consider. **Cytotherapy**, vol. 21, no. 11, p. 1095–1111, Nov. 2019. DOI 10.1016/j.jcyt.2019.10.001. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1465324919308618>.

SATYANARAYANA, Padi S.V.; JAIN, Naveen K.; SINGH, Amarjit; KULKARNI, Shrinivas K. Isobolographic analysis of interaction between cyclooxygenase inhibitors and tramadol in acetic acid-induced writhing in mice. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, vol. 28, no. 4, p. 641–649, Jul. 2004. DOI 10.1016/j.pnpbp.2004.01.015. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S027858460400034X>.

SCHIAR, Viviane Patrícia P.; DOS SANTOS, Danúbia B.; LÜDTKE, Diogo S.; VARGAS, Fabrício; PAIXÃO, Márcio W.; NOGUEIRA, Cristina W.; ZENI, Gilson; ROCHA, João Batista T. Screening of potentially toxic chalcogens in erythrocytes. **Toxicology in Vitro**, vol. 21, no. 1, p. 139–145, Feb. 2007. DOI 10.1016/j.tiv.2006.08.006. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0887233306001767>.

SEIBERT, K; ZHANG, Y; LEAHY, K; HAUSER, S; MASFERRER, J; PERKINS, W; LEE, L; ISAKSON, P. Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, vol. 91, no. 25, p. 12013–12017, 6 Dec. 1994. DOI 10.1073/pnas.91.25.12013. Available at: <https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.91.25.12013>.

SHAH, Syed Muhammad Mukarram; SADIQ, Abdul; SHAH, Syed Muhammad Hassan; ULLAH, Farhat. Antioxidant, total phenolic contents and antinociceptive potential of *Teucrium stocksianum* methanolic extract in different animal models. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, vol. 14, no. 1, p. 181, 2014. DOI 10.1186/1472-6882-14-181. Available at: <https://doi.org/10.1186/1472-6882-14-181>.

SHAHBAZ, Muhammad; KHAN, Umair Ahmed; CHAUDHARY, M. Iqbal; YOUSUF, Sammer. A new bioactive cocrystal of coumarin-3-carboxylic acid and thiourea: detailed structural features and biological activity studies. **Acta Crystallographica Section C Structural Chemistry**, vol. 78, no. 3, p. 192–200, 1 Mar. 2022. DOI 10.1107/S205322962200081X. Available at: <https://scripts.iucr.org/cgi-bin/paper?S205322962200081X>.

SHIBATA, Manabu; OHKUBO, Tsuyako; TAKAHASHI, Hiroshi; INOKI, Reizo. Modified formalin test: characteristic biphasic pain response. **Pain**, vol. 38, no. 3, p. 347–352, Sep. 1989. DOI 10.1016/0304-3959(89)90222-4. Available at: <https://journals.lww.com/00006396-198909000-00014>.

SHIMOKAWA, T; KULMACZ, R J; DEWITT, D L; SMITH, W L. Tyrosine 385 of prostaglandin endoperoxide synthase is required for cyclooxygenase catalysis. **The Journal of biological chemistry**, vol. 265, no. 33, p. 20073–6, 25 Nov. 1990. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2122967>.

SILVÁN, A. M.; ABAD, M. J.; BERMEJO, P.; VILLAR, A. Effects of compounds extracted from *Santolina oblongifolia* on TXB2 release in human platelets. **Inflammopharmacology**, vol. 6, no. 3, p. 255–263, Sep. 1998. DOI 10.1007/s10787-

998-0024-2. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s10787-998-0024-2>.

SINDRUP, Soren H.; OTTO, Marit; FINNERUP, Nanna B.; JENSEN, Troels S. Antidepressants in the Treatment of Neuropathic Pain. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, vol. 96, no. 6, p. 399–409, Jun. 2005. DOI 10.1111/j.1742-7843.2005.pto_96696601.x. Available at: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1742-7843.2005.pto_96696601.x.

SINGH, Atamjit; SHARMA, Sahil; ARORA, Saroj; ATTRI, Shivani; KAUR, Prabhjot; KAUR GULATI, Harmandeep; BHAGAT, Kavita; KUMAR, Nitish; SINGH, Harbinder; VIR SINGH, Jatinder; MOHINDER SINGH BEDI, Preet. New coumarin-benzotriazole based hybrid molecules as inhibitors of acetylcholinesterase and amyloid aggregation. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, vol. 30, no. 20, p. 127477, Oct. 2020. DOI 10.1016/j.bmcl.2020.127477. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960894X20305886>.

SINGH, Gurjit; KAUR, Jashanpreet; KAUR, Manpreet; SINGH, Palwinder; BHATTI, Rajbir. Anti-nociceptive and anti-inflammatory effect of imperatorin: evidences for involvement of COX-2, iNOS, NFκB and inflammatory cytokines. **International Journal of Neuroscience**, vol. 130, no. 2, p. 176–185, 1 Feb. 2020. DOI 10.1080/00207454.2019.1667789. Available at: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/00207454.2019.1667789>.

SMITH, Maree T. Differences between and combinations of opioids re-visited. **Current Opinion in Anaesthesiology**, vol. 21, no. 5, p. 596–601, Oct. 2008. DOI 10.1097/ACO.0b013e32830a4c4a. Available at: <https://journals.lww.com/00001503-200810000-00013>.

SMITH, Misty; WILCOX, Karen S.; WHITE, H. Steve. Discovery of antiepileptic drugs. **Neurotherapeutics**, vol. 4, no. 1, p. 12–17, Jan. 2007. DOI 10.1016/j.nurt.2006.11.009. Available at: <http://link.springer.com/10.1016/j.nurt.2006.11.009>.

SMITH, William L.; DEWITT, David L.; GARAVITO, R. Michael. Cyclooxygenases: Structural, Cellular, and Molecular Biology. **Annual Review of Biochemistry**, vol. 69, no. 1, p. 145–182, Jun. 2000. DOI 10.1146/annurev.biochem.69.1.145. Available at: <https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.biochem.69.1.145>.

SMITH, William L.; GARAVITO, R. Michael; DEWITT, David L. Prostaglandin Endoperoxide H Synthases (Cyclooxygenases)-1 and -2. **Journal of Biological Chemistry**, vol. 271, no. 52, p. 33157–33160, Dec. 1996. DOI 10.1074/jbc.271.52.33157. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021925819786487>.

SMYTH, Emer M.; GROSSER, Tilo; WANG, Miao; YU, Ying; FITZGERALD, Garret A. Prostanoids in health and disease. **Journal of Lipid Research**, vol. 50, p. S423–S428, Apr. 2009. DOI 10.1194/jlr.R800094-JLR200. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002227520306507>.

SOLIS-VASQUEZ, Leonardo; SANTOS-MARTINS, Diogo; KOCH, Andreas; FORLI, Stefano. Evaluating the Energy Efficiency of OpenCL-accelerated AutoDock Molecular Docking. Mar. 2020. **2020 28th Euromicro International Conference on Parallel, Distributed and Network-Based Processing (PDP)** [...]. [S. l.]: IEEE, Mar. 2020. p. 162–166. DOI 10.1109/PDP50117.2020.00031. Available at: <https://ieeexplore.ieee.org/document/9092332/>.

SONG, Jia-Ling; YUAN, Yao; TAN, Hai-Bo; HUANG, Ri-Ming; LIU, Hong-Xin; XU, Zhi-Fang; QIU, Sheng-Xiang. Anti-inflammatory and antimicrobial coumarins from the stems of *Eurya chinensis*. **Journal of Asian Natural Products Research**, vol. 19, no. 3, p. 222–228, 4 Mar. 2017. DOI 10.1080/10286020.2016.1191474. Available at: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10286020.2016.1191474>.

SOUSA, A. P.; FERNANDES, D. A.; FERREIRA, M. D. L.; CORDEIRO, L. V.; SOUZA, M. F. V.; PESSOA, H. L. F.; OLIVEIRA FILHO, A. A.; SÁ, R. C. S. Analysis of the toxicological and pharmacokinetic profile of Kaempferol-3-O- β -D-(6"-E-p-coumaryl) glucopyranoside - Tiliroside: in silico, in vitro and ex vivo assay. **Brazilian Journal of**

Biology, vol. 83, 2020. DOI 10.1590/1519-6984.244127. Available at: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1519-69842023000100112&tlng=en.

SOUSA, A.P.; OLIVEIRA, M.S.; FERNANDES, D.A.; FERREIRA, M.D.L.; CORDEIRO, L.V.; SOUZA, M.F.V.; FERNANDES, L.M.D.; SOUZA, H.D.S.; OLIVEIRA FILHO, A.A.; PESSOA, H.L.F.; SÁ, R.C.S. In silico, in vitro, and ex vivo studies of the toxicological and pharmacological properties of the flavonoid 5,7-dihydroxy-3,8,4'-trimethoxy. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, vol. 54, no. 10, 2021. DOI 10.1590/1414-431x2021e11203. Available at: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-879X2021001000613&tlng=en.

SPECHT, Dnolad P.; MARTIC, Peter A.; FARID, Samir. Ketocoumarins. **Tetrahedron**, vol. 38, no. 9, p. 1203–1211, Jan. 1982. DOI 10.1016/0040-4020(82)85104-1. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0040402082851041>.

SRINIVAS, Nakka; SANDEEP, Kusuma S; ANUSHA, Y.; DEVENDRA, Bellary Nagaraju. In Vitro Cytotoxic Evaluation and Detoxification of Monocrotaline (Mct) Alkaloid: An In Silico Approach. 2014. **Int. Inv. Journal Biochemistry and Bioinformatics**. Available at: <https://www.semanticscholar.org/paper/In-Vitro-Cytotoxic-Evaluation-and-Detoxification-of-Srinivas-Sandeep/cc423e351253db8580b756a8cbfc7699e7b5c524>. Accessed on: 18 Apr. 2022.

STEFANACHI, Angela; LEONETTI, Francesco; PISANI, Leonardo; CATTO, Marco; CAROTTI, Angelo. Coumarin: A Natural, Privileged and Versatile Scaffold for Bioactive Compounds. **Molecules**, vol. 23, no. 2, p. 250, 27 Jan. 2018. DOI 10.3390/molecules23020250. Available at: <https://www.mdpi.com/1420-3049/23/2/250>.

STEFANI, Hélio A.; GUEOGJAN, Karina; MANARIN, Flávia; FARSKY, Sandra H.P.; ZUKERMAN-SCHPECTOR, Julio; CARACELLI, Ignez; PIZANO RODRIGUES, Sergio

R.; MUSCARÁ, Marcelo N.; TEIXEIRA, Simone A.; SANTIN, José R.; MACHADO, Isabel D.; BOLONHEIS, Simone M.; CURI, Rui; VINOLO, Marco A. Synthesis, biological evaluation and molecular docking studies of 3-(triazolyl)-coumarin derivatives: Effect on inducible nitric oxide synthase. **European Journal of Medicinal Chemistry**, vol. 58, p. 117–127, Dec. 2012. DOI 10.1016/j.ejmech.2012.10.010. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0223523412006137>.

STOCK, Jeffrey L.; SHINJO, Katsuhiko; BURKHARDT, John; ROACH, Marsha; TANIGUCHI, Kana; ISHIKAWA, Toshihisa; KIM, Hyung-Suk; FLANNERY, Patrick J.; COFFMAN, Thomas M.; MCNEISH, John D.; AUDOLY, Laurent P. The prostaglandin E2 EP1 receptor mediates pain perception and regulates blood pressure. **Journal of Clinical Investigation**, vol. 107, no. 3, p. 325–331, 1 Feb. 2001. DOI 10.1172/JCI6749. Available at: <http://www.jci.org/articles/view/6749>.

STOVNER, Lars Jacob; HAGEN, Knut; LINDE, Mattias; STEINER, Timothy J. The global prevalence of headache: an update, with analysis of the influences of methodological factors on prevalence estimates. **The Journal of Headache and Pain**, vol. 23, no. 1, p. 34, 12 Dec. 2022. DOI 10.1186/s10194-022-01402-2. Available at: <https://thejournalofheadacheandpain.biomedcentral.com/articles/10.1186/s10194-022-01402-2>.

SUSHKO, Iurii; NOVOTARSKYI, Sergii; KÖRNER, Robert; PANDEY, Anil Kumar; CHERKASOV, Artem; LI, Jiazhong; GRAMATICA, Paola; HANSEN, Katja; SCHROETER, Timon; MÜLLER, Klaus-Robert; XI, Lili; LIU, Huanxiang; YAO, Xiaojun; ÖBERG, Tomas; HORMOZDIARI, Farhad; DAO, Phuong; SAHINALP, Cenk; TODESCHINI, Roberto; POLISHCHUK, Pavel; ... TETKO, Igor V. Applicability Domains for Classification Problems: Benchmarking of Distance to Models for Ames Mutagenicity Set. **Journal of Chemical Information and Modeling**, vol. 50, no. 12, p. 2094–2111, 27 Dec. 2010. DOI 10.1021/ci100253r. Available at: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ci100253r>.

SVENSSON, Peter; MAY, Arne. Classification: The key to understanding facial pain. **Cephalalgia**, vol. 37, no. 7, p. 609–612, 12 Jun. 2017. DOI

10.1177/0333102417706313. Available at:
<http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0333102417706313>.

SWAIN, Baijayantimala; ANGELI, Andrea; SINGH, Priti; SUPURAN, Claudiu T.; ARIFUDDIN, Mohammed. New coumarin/sulfocoumarin linked phenylacrylamides as selective transmembrane carbonic anhydrase inhibitors: Synthesis and in-vitro biological evaluation. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, vol. 28, no. 15, p. 115586, Aug. 2020. DOI 10.1016/j.bmc.2020.115586. Available at:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0968089620304168>.

TAFESSE, Tadesse Bekele; BULE, Mohammed Hussen; KHOABI, Mehdi; FARAMARZI, Mohammad Ali; ABDOLLAHI, Mohammad; AMINI, Mohsen. Coumarin-based Scaffold as α -glucosidase Inhibitory Activity: Implication for the Development of Potent Antidiabetic Agents. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, vol. 20, no. 2, p. 134–151, 17 Mar. 2020. DOI 10.2174/1389557519666190925162536. Available at:
<http://www.eurekaselect.com/175125/article>.

THATI, Bhumika; NOBLE, Andy; CREAVER, Bernadette S.; WALSH, Maureen; MCCANN, Malachy; KAVANAGH, Kevin; DEVEREUX, Michael; EGAN, Denise A. RETRACTED: In vitro anti-tumour and cyto-selective effects of coumarin-3-carboxylic acid and three of its hydroxylated derivatives, along with their silver-based complexes, using human epithelial carcinoma cell lines. **Cancer Letters**, vol. 248, no. 2, p. 321–331, Apr. 2007. DOI 10.1016/j.canlet.2006.08.009. Available at:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304383506005039>.

THURESSON, Elizabeth D.; LAKKIDES, Karen M.; RIEKE, Caroline Jill; SUN, Ying; WINGERD, Byron A.; MICIELLI, Renée; MULICHAK, Anne M.; MALKOWSKI, Michael G.; GARAVITO, R. Michael; SMITH, William L. Prostaglandin Endoperoxide H Synthase-1. **Journal of Biological Chemistry**, vol. 276, no. 13, p. 10347–10357, Mar. 2001. DOI 10.1074/jbc.M009377200. Available at:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021925819343108>.

THURESSON, Elizabeth D.; LAKKIDES, Karen M.; SMITH, William L. Pgg211r-Hpete

and 15r/S-Hpete are Formed From Different Conformers of Arachidonic Acid in the Prostaglandin Endoperoxide H Synthase-1 Cyclooxygenase Site. [S. l.: s. n.], 2002. p. 67–72. DOI 10.1007/978-1-4615-0193-0_11. Available at: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4615-0193-0_11.

TROTT, Oleg; OLSON, Arthur J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **Journal of Computational Chemistry**, , p. NA-NA, 2009. DOI 10.1002/jcc.21334. Available at: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jcc.21334>.

TYAGI, Yogesh K.; KUMAR, Ajit; RAJ, Hanumantharao G.; VOHRA, Parag; GUPTA, Garima; KUMARI, Ranju; KUMAR, Pankaj; GUPTA, Rajinder K. Synthesis of novel amino and acetyl amino-4-methylcoumarins and evaluation of their antioxidant activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, vol. 40, no. 4, p. 413–420, Apr. 2005. DOI 10.1016/j.ejmech.2004.09.002. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0223523404001862>.

URCH, Catherine. Normal Pain Transmission. **Reviews in Pain**, vol. 1, no. 1, p. 2–6, 3 Aug. 2007. DOI 10.1177/204946370700100102. Available at: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/204946370700100102>.

VANE, J. R.; BAKHLE, Y. S.; BOTTING, R. M. CYCLOOXYGENASES 1 AND 2. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, vol. 38, no. 1, p. 97–120, Apr. 1998. DOI 10.1146/annurev.pharmtox.38.1.97. Available at: <https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.pharmtox.38.1.97>.

VASKO, MR; CAMPBELL, WB; WAITE, KJ. Prostaglandin E2 enhances bradykinin-stimulated release of neuropeptides from rat sensory neurons in culture. **The Journal of Neuroscience**, vol. 14, no. 8, p. 4987–4997, 1 Aug. 1994. DOI 10.1523/JNEUROSCI.14-08-04987.1994. Available at: <https://www.jneurosci.org/lookup/doi/10.1523/JNEUROSCI.14-08-04987.1994>.

VIANA, Jéssika de Oliveira. **Investigações in silico e proposição de farmacóforo**

na pesquisa de novos agentes tuberculostáticos. 2019. Universidade Federal da Paraíba, 2019. Available at: <https://repositorio.ufpb.br/jspui/handle/123456789/20050>.

VINEGAR, R; SCHREIBER, W; HUGO, R. Biphasic development of carrageenin edema in rats. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, vol. 166, no. 1, p. 96–103, Mar. 1969. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5776026>.

WANG, Tao; PENG, Tao; WEN, Xiaoxue; WANG, Gang; LIU, Shuchen; SUN, Yunbo; ZHANG, Shouguo; WANG, Lin. Design, Synthesis and Evaluation of 3-Substituted Coumarin Derivatives as Anti-inflammatory Agents. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, vol. 68, no. 5, p. 443–446, 1 May 2020. DOI 10.1248/cpb.c19-01085. Available at: https://www.jstage.jst.go.jp/article/cpb/68/5/68_c19-01085/_article.

WATANABE, Jun; SHINMOTO, Hiroshi; TSUSHIDA, Tojiro. Coumarin and Flavone Derivatives from Estragon and Thyme as Inhibitors of Chemical Mediator Release from RBL-2H3 Cells. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, vol. 69, no. 1, p. 1–6, 22 Jan. 2005. DOI 10.1271/bbb.69.1. Available at: <https://academic.oup.com/bbb/article/69/1/1-6/5953386>.

WEI, Mengying; MA, Yinghui; LIU, Yuanyuan; ZHOU, Yuan; MEN, Lihui; YUE, Kexin; PI, Zifeng; LIU, Zhiqiang; LIU, Zhongying. Urinary metabolomics study on the anti-inflammation effects of flavonoids obtained from Glycyrrhiza. **Journal of Chromatography B**, vol. 1086, p. 1–10, Jun. 2018. DOI 10.1016/j.jchromb.2018.04.007. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1570023217317506>.

WEISS, Austin L.; EHRHARDT, Ken P.; TOLBA, Reda. Atypical Facial Pain: a Comprehensive, Evidence-Based Review. **Current Pain and Headache Reports**, vol. 21, no. 2, p. 8, 1 Feb. 2017. DOI 10.1007/s11916-017-0609-9. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s11916-017-0609-9>.

WHO. WHO guidelines on the pharmacological treatment of persisting pain in children

with medical illnesses. 2012. Available at: www.who.int. Accessed on: 12 Apr. 2022.

WILLOUGHBY, D A; DIROSA, M. Studies on the mode of action of non-steroid anti-inflammatory drugs. **Annals of the Rheumatic Diseases**, vol. 31, no. 6, p. 540–540, 1 Nov. 1972. DOI 10.1136/ard.31.6.540. Available at: <https://ard.bmj.com/lookup/doi/10.1136/ard.31.6.540>.

WINTER, C. A.; RISLEY, E. A.; NUSS, G. W. Carrageenin-Induced Edema in Hind Paw of the Rat as an Assay for Antiinflammatory Drugs. **Experimental Biology and Medicine**, vol. 111, no. 3, p. 544–547, 1 Dec. 1962. DOI 10.3181/00379727-111-27849. Available at: <http://ebm.sagepub.com/lookup/doi/10.3181/00379727-111-27849>.

WOLLER, Sarah A.; EDDINGER, Kelly A.; CORR, Maripat; YAKSH, Tony L. An overview of pathways encoding nociception. **Clinical and Experimental Rheumatology**, vol. 35, no. 5, p. S40–S46, 2017. .

WOOLF, Clifford J. Central sensitization: Implications for the diagnosis and treatment of pain. **Pain**, vol. 152, no. 3, p. S2–S15, Mar. 2011. DOI 10.1016/j.pain.2010.09.030. Available at: <https://journals.lww.com/00006396-201103001-00002>.

WOOLF, Clifford J. Pain: Moving from Symptom Control toward Mechanism-Specific Pharmacologic Management. **Annals of Internal Medicine**, vol. 140, no. 6, p. 441, 16 Mar. 2004. DOI 10.7326/0003-4819-140-8-200404200-00010. Available at: <http://annals.org/article.aspx?doi=10.7326/0003-4819-140-8-200404200-00010>.

WOOLF, Clifford J; MANNION, Richard J. Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms, and management. **The Lancet**, vol. 353, no. 9168, p. 1959–1964, Jun. 1999. DOI 10.1016/S0140-6736(99)01307-0. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673699013070>.

WU, L.; WANG, X.; XU, W.; FARZANEH, F.; XU, R. The Structure and Pharmacological Functions of Coumarins and Their Derivatives. **Current Medicinal**

Chemistry, vol. 16, no. 32, p. 4236–4260, 1 Nov. 2009. DOI 10.2174/092986709789578187. Available at: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=0929-8673&volume=16&issue=32&spage=4236>.

WU, Xue-Feng; LIU, Wen-Tao; LIU, Yue-Peng; HUANG, Zhi-Jiang; ZHANG, Yan-Kai; SONG, Xue-Jun. Reopening of ATP-sensitive potassium channels reduces neuropathic pain and regulates astroglial gap junctions in the rat spinal cord. **Pain**, vol. 152, no. 11, p. 2605–2615, Nov. 2011. DOI 10.1016/j.pain.2011.08.003. Available at: <https://journals.lww.com/00006396-201111000-00023>.

WUBE, Abraham Abebe; WENZIG, Eva-Maria; GIBBONS, Simon; ASRES, Kaleab; BAUER, Rudolf; BUCAR, Franz. Constituents of the stem bark of *Discopodium penninervium* and their LTB₄ and COX-1 and -2 inhibitory activities. **Phytochemistry**, vol. 69, no. 4, p. 982–987, Feb. 2008. DOI 10.1016/j.phytochem.2007.11.001. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0031942207006504>.

XIA, Dongguo; LIU, Hao; CHENG, Xiang; MARASWAMI, Manikantha; CHEN, Yiting; LV, Xianhai. Recent Developments of Coumarin-based Hybrids in Drug Discovery. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, vol. 22, no. 4, p. 269–283, Feb. 2022. DOI 10.2174/1568026622666220105105450. Available at: <https://www.eurekaselect.com/199972/article>.

XIAO, Xiao; WANG, Xiaoyu; GUI, Xuan; CHEN, Lu; HUANG, Baokang. Natural Flavonoids as Promising Analgesic Candidates: A Systematic Review. **Chemistry & biodiversity**, vol. 13, no. 11, p. 1427–1440, Nov. 2016. DOI 10.1002/cbdv.201600060. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27449823>.

XU, Risheng; XIE, Michael E; JACKSON, Christopher M. Trigeminal Neuralgia: Current Approaches and Emerging Interventions. **Journal of Pain Research**, vol. Volume 14, p. 3437–3463, Nov. 2021. DOI 10.2147/JPR.S331036. Available at: <https://www.dovepress.com/trigeminal-neuralgia-current-approaches-and-emerging-interventions-peer-reviewed-fulltext-article-JPR>.

XUE, Qiao; LIU, Xian; RUSSELL, Paul; LI, Jin; PAN, Wenxiao; FU, Jianjie; ZHANG, Aiqian. Evaluation of the binding performance of flavonoids to estrogen receptor alpha by Autodock, Autodock Vina and Surflex-Dock. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, vol. 233, p. 113323, Mar. 2022. DOI 10.1016/j.ecoenv.2022.113323. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0147651322001634>.

YAMADA, K; INAGAKI, N. Neuroprotection by K channels. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, vol. 38, no. 6, p. 945–949, Jun. 2005. DOI 10.1016/j.yjmcc.2004.11.020. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022282804003608>.

YAN, Dongpeng; DELORI, Amit; LLOYD, Gareth O.; PATEL, Bhavnita; FRIŠČIĆ, Tomislav; DAY, Graeme M.; BUČAR, Dejan-Krešimir; JONES, William; LU, Jun; WEI, Min; EVANS, David G.; DUAN, Xue. Modification of luminescent properties of a coumarin derivative by formation of multi-component crystals. **CrystEngComm**, vol. 14, no. 16, p. 5121, 2012. DOI 10.1039/c2ce25217a. Available at: <http://xlink.rsc.org/?DOI=c2ce25217a>.

YANG, In Jun; LEE, Dong Ung; SHIN, Heung Mook. Anti-inflammatory and antioxidant effects of coumarins isolated from *Foeniculum vulgare* in lipopolysaccharide-stimulated macrophages and 12- O -tetradecanoylphorbol-13-acetate-stimulated mice. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, vol. 37, no. 3, p. 308–317, 4 May 2015. DOI 10.3109/08923973.2015.1038751. Available at: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/08923973.2015.1038751>.

ZHANG, Keyun; DING, Weixian; SUN, Jie; ZHANG, Bin; LU, Fujiao; LAI, Ren; ZOU, Yong; YEDID, Gabriel. Antioxidant and antitumor activities of 4-arylcoumarins and 4-aryl-3,4-dihydrocoumarins. **Biochimie**, vol. 107, p. 203–210, Dec. 2014. DOI 10.1016/j.biochi.2014.03.014. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0300908414001072>.

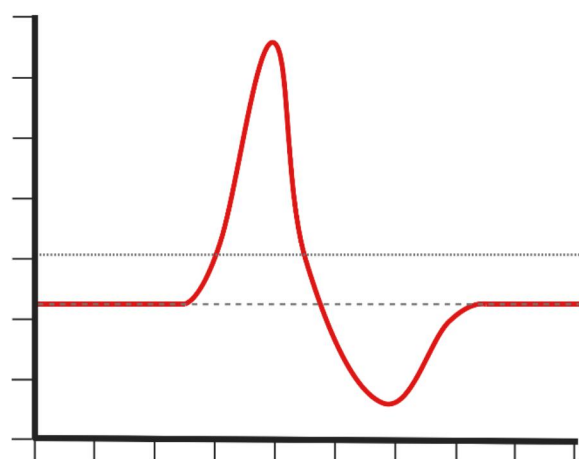
ZHANG, Yanjun; JAYAPRAKASAM, Bolleddula; SEERAM, Navindra P.; OLSON, Lawrence K.; DEWITT, David; NAIR, Muraleedharan G. Insulin Secretion and

Cyclooxygenase Enzyme Inhibition by Cabernet Sauvignon Grape Skin Compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol. 52, no. 2, p. 228–233, 1 Jan. 2004. DOI 10.1021/jf034616u. Available at: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf034616u>.

ZHAO, Yun-Li; YANG, Xiong-Wu; WU, Bai-Fen; SHANG, Jian-Hua; LIU, Ya-Ping; ZHI-DAI; LUO, Xiao-Dong. Anti-inflammatory Effect of Pomelo Peel and Its Bioactive Coumarins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol. 67, no. 32, p. 8810–8818, 14 Aug. 2019. DOI 10.1021/acs.jafc.9b02511. Available at: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jafc.9b02511>.

ZOGA, Vasiliki; KAWANO, Takashi; LIANG, Mei-Ying; BIENENGRAEBER, Martin; WEIHRAUCH, Dorothee; MCCALLUM, Bruce; GEMES, Geza; HOGAN, Quinn; SARANTOPOULOS, Constantine. K ATP Channel Subunits in Rat Dorsal Root Ganglia: Alterations by Painful Axotomy. **Molecular Pain**, vol. 6, p. 1744-8069-6–6, 1 Jan. 2010. DOI 10.1186/1744-8069-6-6. Available at: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1186/1744-8069-6-6>.

ZUBRZYCKI, M.; STASIOLEK, M.; ZUBRZYCKA, M. Opioid and Endocannabinoid System in Orofacial Pain. **Physiological Research**, , p. 705–715, 21 Oct. 2019. DOI 10.33549/physiolres.934159. Available at: http://www.biomed.cas.cz/physiolres/pdf/2019/68_705.pdf.



ANEXOS

ANEXOS

Anexo I – ARTIGOS PUBLICADOS EM PERIÓDICOS DURANTE A VIGÊNCIA DO DOUTORADO

ARAGÃO NETO, Humberto de Carvalho; SOUSA, Aleson Pereira de; MEDEIROS, Maria Alice Araújo de; ALVES, Millena de Souza; ALMEIDA, Reinaldo Nóbrega de; FILHO, Abrahão Alves de Oliveira. Avaliação da citotoxicidade do ácido 3-cumarino carboxílico em eritrócitos humanos. **Research, Society and Development**, vol. 2022, p. 1–10, 2022. <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v11i7.29965>

ASSIS, Davidson Barbosa; **ARAGÃO NETO, Humberto de Carvalho**; DA FONSECA, Diogo Vilar; DE ANDRADE, Humberto Hugo Nunes; BRAGA, Renan Marinho; BADR, Nader; MAIA, Mayara dos Santos; CASTRO, Ricardo Dias; SCOTTI, Luciana; SCOTTI, Marcus Tullius; DE ALMEIDA, Reinaldo Nóbrega. Antinociceptive activity of chemical components of essential oils that involves docking studies: A review. **Frontiers in Pharmacology**, vol. 11, no. May, p. 1–19, 2020. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00777>.

ARAGÃO NETO, Humberto de Carvalho; COSTA, Camila Medeiros; PITA, João Carlos Lima Rodrigues; CASTRO, Ricardo Dias de; VASCONCELOS, Inácio Ricardo Alves; BENEDITO, Rubens Batista. Epidemiological and laboratory profile of patients confirmed with Covid-19 and admitted to a reference hospital. **Research, Society and Development**, vol. 10, no. 15, p. e421101523067, 29 Nov. 2021. DOI 10.33448/rsd-v10i15.23067. Available at: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/23067>.

CUNHA, Saraghina Maria Donato da; ALVES, Cezar Augusto; SILVA, Isabela Bezerra da; OLIVEIRA FILHO, Abrahão Alves de; CORREIO, Francisco Cunha Nunes; CUNHA, Sheylla Maria Donato da; **ARAGÃO NETO, Humberto de Carvalho**. Analysis of hematological parameters of COVID-19 / SARS-CoV-2 positive patients

treated at a university hospital in northeastern Brazil. **Research, Society and Development**, vol. 11, no. 6, p. e41711629012, 2022. <https://doi.org/10.33448/rsd-v11i6.29012>.

COSTA, Aratã Oliveira Cortez; **ARAGÃO NETO, Humberto de Carvalho**; NUNES, Ana Paula Lopes; DE CASTRO, Ricardo Dias; DE ALMEIDA, Reinaldo Nóbrega. Covid-19: Is reinfection possible? **EXCLI Journal**, vol. 20, p. 522–536, 2021. <https://doi.org/10.17179/excli2021-3383>.

SOUSA, Hianka Greice Lopes de; FERREIRA, Laércia Karla Diega Paiva; **ARAGÃO NETO, Humberto de Carvalho**; FLÔR, Atalia Ferreira de Lima; BARBOSA-FILHO, José Maria; ALVES, José Luiz de Brito; BRAGA, Valdir de Andrade; ALMEIDA, Reinaldo Nóbrega de; PIUVEZAM, Marcia Regina; SANTOS, Cláudio Roberto Bezerra dos. Warifteine Therapeutic Treatment Reduced Leukocyte Recruitment and Anxiety-Like Response in Ovalbumin-Induced Allergic Pulmonary Inflammation / Tratamento Terapêutico Com Warifteína Reduz Recrutamento De Leucócitos E Resposta Semelhante À Ansiedade Na Inflamação Pulmonar Alérgica Induzida Por Ovalbumina. **Brazilian Journal of Development**, vol. 6, no. 9, p. 65737–65754, 2020. <https://doi.org/10.34117/bjdv6n9-124>.

BRAGA, Renan Marinho; DE ANDRADE, Humberto Hugo Nunes; **ARAGÃO NETO, Humberto de Carvalho**; DA CRUZ, Ryldene Marques Duarte; ASSIS, Davidson Barbosa; CAVALCANTE-SILVA, Luiz Henrique Agra; RODRIGUES-MASCARENHAS, Sandra; PORDEUS, Liana Clébia de Moraes; QUINTANS-JÚNIOR, Lucindo José; DE ALMEIDA, Reinaldo Nóbrega. Antinociceptive and anti-inflammatory effect of lippia pedunculosa hayek essential oil and its β -cyclodextrin inclusion complex. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas**, vol. 20, no. 2, p. 162–176, 2021. <https://doi.org/10.37360/blacpma.21.20.2.13>.

Anexo II – CAPÍTULOS DE LIVRO PUBLICADOS DURANTE A VIGÊNCIA DO DOUTORADO

ARAGÃO NETO, H. C.; CASTRO, RICARDO DIAS; ALMEIDA, REINALDO N. As plantas medicinais numa abordagem histórica e etnofarmacológica. In: Micheline Freire Donato. (Org.). **Bioprospecção e Inovação Tecnológica de Produtos Naturais e Derivados de Plantas e Animais**. 1ª ed. João Pessoa: Editora UFPB, 2020, vol. 1, p. 23-42.

ARAGÃO NETO, H. C.; FONSÊCA, DIOGO V.; BRAGA, R. M.; ANDRADE, H. H. N.; ALMEIDA, R. N. Estudo não clínico da atividade anticonvulsivante do (+)-3-careno em modelos *in vivo*. In: Giselle Medeiros da Costa One; Maria Luísa Souto Porto. (Org.). **Farmácia Interativa**. 01ª ed. João Pessoa: Instituto Medeiros de Educação Avançada, 2019, v. 01, p. 769-785.

BRAGA, R. M.; SILVA, D. F.; ANDRADE, H. H. N.; **ARAGÃO NETO, H. C.**; FONSÊCA, DIOGO V. Canalopatias correlacionadas a crises de ausência. In: Giselle Medeiros da Costa One. (Org.). **Saúde Interativa**. 03ª ed. João Pessoa, 2019, v. 03, p. 1651-1669.

Anexo III – CERTIDÕES



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
MINISTÉRIO DE CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

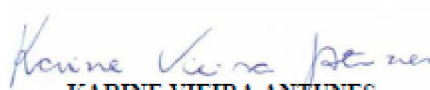


Certificado de autorização

Certificamos que o projeto intitulado: "Avaliação da atividade anticonvulsivante e antinociceptiva orofacial de derivados cumarínicos em camundongos", registrado com o nº 0005/281119, sob a responsabilidade de **Diogo Vilar da Fonsêca** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Universidade Federal do Vale do São Francisco - UNIVASF, em 28/11/2019.

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Início: 10/03/2020 a 10/12/2020
Espécie/linhagem/raça	<i>Mus musculus</i>
Nº de animais	256
Peso/Idade	25-35g/ 3 meses
Sexo	M
Origem	Biotério Setorial da Universidade Federal do Vale do São Francisco

Em: 06/02/2020


KARINE VIEIRA ANTUNES
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/UNIVASF



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
MINISTÉRIO DE CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



Certificado de autorização

Certificamos que o projeto intitulado: “Investigação do efeito da 7-hidroxycumarina (umbeliferona) e do ácido 3-cumarino-carboxílico em modelos animais de nocicepção orofacial e inflamação”, registrado com o nº 0001/250221, sob a responsabilidade de Diogo Vilar da Fonsêca - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Universidade Federal do Vale do São Francisco - UNIVASF, em 25/02/2021.

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Início: 01/07/2021 a 20/01/2023
Espécie/linhagem/raça	<i>Mus musculus</i>
Nº de animais	210
Peso/Idade	25-35g / 3 meses
Sexo	M
Origem	Biotério Central da Universidade Federal do Vale do São Francisco

Em: 30/06/2021

Diego César Nunes da Silva
DIEGO CÉSAR NUNES DA SILVA
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/UNIVASF