



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA - UFPB

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE - CCS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS SINTÉTICOS E
BIOATIVOS – PPgPNSB

NAYANA MARIA MEDEIROS VILAR BARBOSA

**ESTUDO INTEGRADO DO POTENCIAL ANSIOLÍTICO-
SÍMILE E NEUROPROTETOR DO DERIVADO
TIOFÊNICO 6CN07: ABORDAGENS *IN SILICO*, *IN VIVO*
E *IN VITRO***

JOÃO PESSOA – PB

2026

NAYANA MARIA MEDEIROS VILAR BARBOSA

**ESTUDO INTEGRADO DO POTENCIAL ANSIOLÍTICO-
SÍMILE E NEUROPROTETOR DO DERIVADO
TIOFÊNICO 6CN07: ABORDAGENS *IN SILICO*, *IN VIVO*
E *IN VITRO***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais Sintéticos e Bioativos da Universidade Federal da Paraíba – UFPB, como requisito para obtenção do título de Mestre.

Área de Concentração: Farmacologia.

Linha de Pesquisa: Psicofarmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Cícero Francisco Bezerra Felipe

Coorientador: Prof. Dr. Álefe Brito Monteiro

JOÃO PESSOA – PB

2026

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

B238e Barbosa, Nayana Maria Medeiros Vilar.

Estudo integrado do potencial ansiolítico-símile e neuroprotetor do derivado tiofênico 6CN07 : abordagens in silico, in vivo e in vitro / Nayana Maria Medeiros Vilar Barbosa. - João Pessoa, 2026.

140 f. : il.

Orientação: Cícero Francisco Bezerra Felipe.

Coorientação: Álefe Brito Monteiro.

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS.

1. Ansiedade. 2. GABA. 3. Serotonina. 4. Estresse oxidativo. 5. Compostos heterocíclicos. I. Felipe, Cícero Francisco Bezerra. II. Monteiro, Álefe Brito. III. Título.

UFPB/BC

CDU 615.214:616.89-008.441(043)



Universidade Federal da Paraíba
Centro de Ciências da Saúde
Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos



Ata da 529ª (quingentésima vigésima nona) Dissertação de Mestrado do(a) aluno(a) do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos **Nayana Maria Medeiros Vilar Barbosa**, candidato(a) ao Título de “Mestre” em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos na área de concentração Farmacologia.

Às quatorze horas (14h00) do dia vinte e cinco de fevereiro do ano de dois mil e vinte e seis (25/02/2026), em ambiente virtual de videoconferência através do aplicativo Google Meet, link: <https://meet.google.com/gxy-vsytg-cdg>, reuniram-se em caráter de Solenidade Pública os membros da Comissão designada para examinar o(a) discente **Nayana Maria Medeiros Vilar Barbosa**, candidato(a) ao Título de “MESTRE” em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos na área de concentração Farmacologia. Foram componentes da Comissão Examinadora os pesquisadores Silvia Lima Costa, Ph.D em Neurociência; Francisco Jaime Bezerra Mendonça Junior, Ph.D em Ciências Biológicas; Alefe Brito Monteiro, Ph.D em Farmacologia e Cícero Francisco Bezerra Felipe, Ph.D em Farmacologia. Sendo a primeira, integrante do corpo docente da Universidade Federal da Bahia; o segundo, integrante do corpo docente da Universidade Estadual da Paraíba; o penúltimo, integrante do corpo docente da Faculdade Três Marias; e o último integrante do corpo docente da Universidade Federal da Paraíba. Dando início aos trabalhos, o(a) Presidente da Comissão, professor(a) Cícero Francisco Bezerra Felipe, após declarar os objetivos da reunião, apresentou o(a) candidato(a) **Nayana Maria Medeiros Vilar Barbosa**, a quem concedeu a palavra para que dissertasse oral e sucintamente sobre o tema apresentado e intitulado “**Estudo integrado do potencial ansiolítico-símile e neuroprotetor do derivado tiofênico 6CN07: abordagens *in silico*, *in vivo* e *in vitro***”. Após discorrer sobre o referido tema durante cerca de quarenta minutos, o(a) candidato(a) foi arguido(a) pelos examinadores na forma regimental. Em seguida, passou a comissão, em caráter secreto, a proceder à avaliação e julgamento do trabalho, concluindo por atribuir-lhe o conceito APROVADO(A). Em face da aprovação, declarou o(a) Presidente achar-se o(a) examinado(a) **Nayana Maria Medeiros Vilar Barbosa** legalmente habilitado(a) a receber o Título de “MESTRE” em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, na área de concentração Farmacologia, cabendo a Universidade Federal da Paraíba, providências, como de direito, a expedição do Diploma que o(a) mesmo(a) faz jus. Nada mais havendo a tratar, foi lavrada a presente ata que é abaixo assinada pelos membros da Comissão e pelo(a) discente.

Prof. Dr. Cícero Francisco Bezerra Felipe (Orientador)

Documento assinado digitalmente
gov.br CÍCERO FRANCISCO BEZERRA FELIPE
Data: 02/03/2026 14:56:06-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Alefe Brito Monteiro (Coorientador)

Documento assinado digitalmente
gov.br ALEFE BRITO MONTEIRO
Data: 02/03/2026 13:12:24-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof.^a Dr.^a Silvia Lima Costa (Examinadora)

Documento assinado digitalmente
gov.br SILVIA LIMA COSTA
Data: 02/03/2026 12:02:26-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Francisco Jaime Bezerra Mendonça Junior (Examinador)

Nayana Maria Medeiros Vilar Barbosa (Discente)

Documento assinado digitalmente
gov.br NAYANA MARIA MEDEIROS VILAR BARBOSA
Data: 02/03/2026 16:56:57-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Documento assinado digitalmente
gov.br FRANCISCO JAIME BEZERRA MENDONÇA JUNIO
Data: 26/02/2026 12:33:00-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

DEDICATÓRIA

À Deus.

“Consagre ao Senhor tudo o que você faz, e os seus planos serão bem-sucedidos”

Prov 16:3

À ciência permite ao tempo transformar a matéria em esperança e o conhecimento em saúde.

In memoriam, ao meu Nick.

A vida que me acompanhou durante 21 anos, ensinando-me que o cuidado e a cura residem, acima de tudo, na persistência do amor.

AGRADECIMENTOS

À Deus, meu ponto de partida e de chegada, meu suporte, refúgio, entrega e fé. Senhor dos meus dias, das minhas decisões e da minha vida. Se hoje escrevo, ouço, falo e defendo ideias, é porque Sua misericórdia me sustentou até aqui.

À Nayana, que persistiu e insistiu na vida por meio dos estudos, do trabalho e da abdicação. Que meu eu do futuro jamais se esqueça do que meu eu do pretérito, mesmo com medo, fui capaz de realizar — e de ser absurdamente feliz enquanto realizava esse sonho.

Aos meus pais, Ionara e Messias, que nunca mediram esforços para me apoiar e incentivar no caminho da docência e da construção das minhas formações acadêmicas. Aos meus irmãos, que igualmente me acolhem, confortam e apoiam minhas decisões.

À minha irmã, Nayara, meu refúgio, minha segurança e meu alicerce nos dias difíceis. Obrigada por estar sempre ao meu lado, com apoio constante e presença firme.

Ao meu companheiro, André, presente em todas as etapas, angústias, medos e incertezas, sempre trazendo paz, conforto, confiança e alegria. Sou imensamente feliz por compartilhar a vida com alguém que acredita no meu potencial, sobretudo quando eu mesma não consigo enxergá-lo. Que não mede esforços para ajudar quando necessário e que permanece, seja no caos ou na glória.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Cícero Felipe, com quem trilho uma jornada desde a graduação em Ciências Farmacêuticas, como orientador, mestre, amigo e ser humano. Quem dera todos pudessem ter o privilégio de ter um Cícero na vida. Um orientador que, além de orientar, escuta, abraça, acolhe, defende e guia, mesmo quando tudo se torna incerto, mesmo quando o que foi pareceu não ser. Minha eterna gratidão por acreditar em mim quando eu mesma não acreditei.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Álefe Monteiro. A vida foi muito generosa ao colocá-lo no meu caminho — talvez um pouco exigente por ter sido em meio ao seu doutorado, com inúmeros experimentos e incontáveis horas de laboratório, não é, Ori? Memórias que não serão esquecidas. Ori, há muito de você neste trabalho, graças a tudo o que aprendi a partir da sua trajetória, do seu rigor científico e da sua amizade.

À minha dupla de mestrado, Mayara Pessoa. Uma amizade improvável, iniciada em meio a uma seleção distinta e consolidada em um laboratório em comum. Quem diria que se tornaria uma relação tão sincera e forte? Obrigada por dividir comigo as dores, tornar a jornada mais leve, prazerosa e por encontrar alegria em cada maratona.

Ao meu amigo Pablo, que a vida me presenteou na trajetória acadêmico-científica. O que começou como uma colaboração resultou em uma amizade pautada em admiração, respeito, alegrias, conselhos mútuos e uma bela jornada de produção e convergência científica.

Ao Laboratório de Psicofarmacologia e aos meus queridos colegas de bancada — Caio, Filipe, João, Lari e Duda — obrigada pelo suporte, pela parceria na maratona que é fazer pesquisa, pelas incontáveis horas de análise e pelas melhores companhias nos intervalos e lanches de experimento.

À Profa. Dra. Silvia Lima Costa, que me acolheu durante um mês em sua casa científica, em Salvador, e me permitiu explorar as fronteiras que a ciência oferece ao investigar novas perspectivas e metodologias.

À Profa. Dra. Cleonice Santos, meu suporte, amiga, orientadora e guia durante minha permanência em Salvador. Gratidão pela simplicidade, disponibilidade e parceria ao longo desse processo.

À Universidade Federal da Paraíba, por me possibilitar a conquista do título de Mestre em uma das mais reconhecidas Pós-Graduações na área de Farmacologia, oferecendo estrutura adequada e um corpo docente qualificado e comprometido com o ensino e a pesquisa.

Aos órgãos de fomento, em especial à CAPES, pelo suporte essencial para a execução desta pesquisa científica em uma instituição pública de ensino.

SUMÁRIO

RESUMO.....	15
ABSTRACT	16
1 INTRODUÇÃO	16
2 REFERENCIAL TEÓRICO	20
2.1 Transtornos de Ansiedade	20
2.2 Neurobiologia dos Transtornos de Ansiedade	23
2.2.1 Sistema GABAérgico.....	24
2.2.2 Sistema Serotoninérgico.....	26
2.2.3 Sistema Glutamatérgico	27
2.2.4 Estresse oxidativo	29
2.3 Farmacoterapia dos transtornos de ansiedade	30
2.4 Derivados tiofênicos.....	32
2.4.1 Atividades farmacológicas dos derivados tiofênicos.....	33
2.4.2 Derivado tiofênico 6CN07	34
3 JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA	37
4 HIPÓTESES	39
4.1 Hipótese nula (H0):.....	39
4.2 Hipótese alternativa (H1):.....	39
5 OBJETIVOS.....	41
5.1 Objetivo Geral.....	41
5.2 Objetivos Específicos.....	41
6 METODOLOGIA	43
6.1 Materiais.....	43
6.1.1 Composto teste	43
6.1.2 Fármacos e Reagentes	43
6.1.3 Equipamentos e utensílios.....	43
6.2 Animais.....	44
6.3 Protocolos Experimentais	45
6.3.1 Metodologias <i>in silico</i>	46
6.3.2 Metodologias <i>in vivo</i>	49
6.3.3 Metodologias <i>in vitro</i>	56
6.4 Análise Estatística.....	61
7 RESULTADOS	63

7.1	Metodologias <i>in silico</i>	63
7.2	Metodologias <i>in vivo</i>	80
7.3	Metodologias <i>in vitro</i>	102
8	DISCUSSÃO	110
9	CONCLUSÕES	125
10	REFERÊNCIAS.....	127

ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

5-HT – 5-hidroxitriptamina (serotonina)

5-HT_{1A} – Receptor serotoninérgico subtipo 1A

5-HT_{2A} – Receptor serotoninérgico subtipo 2A

5-HT₃ – Receptor serotoninérgico subtipo 3

5-HT₄ – Receptor serotoninérgico subtipo 4

AMPA – Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico

BAI – *Beck Anxiety Inventory* (Inventário de Ansiedade de Beck)

BZD – Benzodiazepínicos

CAT – Catalase

Cl⁻ – Íon cloreto

D2 – Receptor dopaminérgico subtipo D2

DSM-V – Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais, 5ª edição

EAAT-1 (GLAST) – Transportador Glutamato-Aspartato

EAAT-2 (GLT-1) – Transportador de Glutamato 1

EAATs – Transportadores de Aminoácidos Excitatórios

GABA – Ácido Gama-aminobutírico

GABA_A – Receptor GABA subtipo A (ionotrópico)

GABA_B – Receptor GABA subtipo B (metabotrópico)

HPA – Eixo Hipotálamo–Hipófise–Adrenal

ISRS – Inibidores Seletivos da Recaptação de Serotonina

IRSN – Inibidores da Recaptação de Serotonina e Noradrenalina

NET – Transportador de Noradrenalina

NMDA – N-metil-D-aspartato

SERT –Transportador de Serotonina

SNC – Sistema Nervoso Central

SOD – Superóxido Dismutase

TA – Transtorno de Ansiedade

TNF- α – Fator de Necrose Tumoral Alfa

TPH2 – Triptofano Hidroxilase 2

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Circuito de Papez e processamento da experiência emocional.	23
Figura 2. Mecanismos neurobiológicos multifatoriais associados aos Transtornos de Ansiedade (TA).	24
Figura 3. Estrutura e nomenclatura química do derivado tiofênico 6CN07.....	35
Figura 4. Síntese dos protocolos experimentais.	45
Figura 5. Metodologia ilustrada do aparelho labirinto em cruz elevado (LCE). ...	51
Figura 6. Metodologia ilustrada do aparelho campo aberto (CA).....	52
Figura 7. Metodologia ilustrada do aparelho <i>Rota Rod</i> (RR).....	53
Figura 8. Metodologia ilustrada do aparelho Caixa Claro-Escuro (CCE).....	55
Figura 9. Metodologia ilustrada dos procedimentos aplicados para análise do estresse oxidativo.	57
Figura 10. Metodologia ilustrada da cultura primária enriquecida com astrócitos.	60
Figura 11. Predição <i>in silico</i> do perfil farmacocinético do 6CN07 através da plataforma PhaKinPro.....	63
Figura 12. Predição <i>in silico</i> do perfil farmacocinético por meio da plataforma SwissADME.....	65
Figura 13. Predição <i>in silico</i> do perfil toxicológico do composto por meio da plataforma OSIRIS Property Explorer.	66
Figura 14. Avaliação <i>in silico</i> do perfil toxicológico por modelagem computacional (StopTox).	67
Figura 15. Predição <i>in silico</i> das propriedades de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (ADMET) do composto em estudo, realizada por meio da plataforma pkCSM, baseada em modelagem computacional (QSAR) dependente da estrutura molecular.....	69
Figura 16. Mapas de interação molecular 2D dos complexos formados com o alvo Receptor de serotonina 1A (5-HT1A) (PDB: 8FYX).	72
Figura 17. Mapas de interação molecular 3D dos complexos formados com o alvo Receptor de serotonina 1A (5-HT1A) (PDB: 8FYX).	72
Figura 18. Mapas de interação molecular 2D dos complexos formados com o alvo Receptor de Serotonina 2A (5-HT2A) (PDB: 9LL8).	74

Figura 19. Mapas de interação molecular 3D dos complexos formados com o alvo Receptor de Serotonina 2A (5-HT_{2A}) (PDB: 9LL8).	75
Figura 20. Mapas de interação molecular 2D dos complexos formados com o alvo Receptor de GABA Tipo A (GABA_A) (PDB: 6X3X).	77
Figura 21. Mapas de interação molecular 3D dos complexos formados com o alvo Receptor de GABA Tipo A (GABA_A) (PDB: 6X3X).	77
Figura 22. Mapas de interação molecular 2D dos complexos formados com o alvo Transportador Vesicular de Monoaminas 2 (VMAT₂) (PDB: 8JT9).....	78
Figura 23. Mapas de interação molecular 3D dos complexos formados com o alvo Transportador Vesicular de Monoaminas 2 (VMAT₂) (PDB: 8JT9).....	79
Figura 24. Efeito do 6CN07 sobre o NEBA no teste Labirinto em Cruz Elevado (LCE).	80
Figura 25. Efeito do 6CN07 sobre o TPBA no teste Labirinto em Cruz Elevado (LCE).	81
Figura 26. Efeito do 6CN07 sobre o NCT no teste Campo Aberto (CA).	82
Figura 27. Efeito do 6CN07 sobre o NG no teste Campo Aberto (CA).	83
Figura 28. Efeito do 6CN07 sobre o NR no teste Campo Aberto (CA).....	84
Figura 29. Efeito do 6CN07 sobre o NQ no teste Rota Rod (RR).	85
Figura 30. Efeito do 6CN07 sobre o TP no teste Rota Rod (RR).....	86
Figura 31. Efeito do antagonista flumazenil em associação ao 6CN07 sobre o NEBA no teste Labirinto em Cruz Elevado (LCE).	88
Figura 32. Efeito do antagonista flumazenil em associação ao 6CN07 sobre o TPBA no teste Labirinto em Cruz Elevado (LCE).	89
Figura 33. Efeito do antagonista flumazenil em associação ao 6CN07 sobre o NECC no teste Caixa Claro Escuro (CCE).	90
Figura 34. Efeito do antagonista flumazenil em associação ao 6CN07 sobre o TPCC no teste Caixa Claro Escuro (CCE).	92
Figura 35. Efeito do antagonista 5-HT₂, cetanserina, em associação ao 6CN07 sobre o NEBA no teste Labirinto em Cruz Elevado (LCE).	94
Figura 36. Efeito do antagonista 5-HT₂, cetanserina, em associação ao 6CN07 sobre o TPBA no teste Labirinto em Cruz Elevado (LCE).....	95
Figura 37. Efeito do antagonista 5-HT₂, cetanserina, em associação ao 6CN07 sobre o NECC no teste Caixa Claro Escuro (CCE).	96

Figura 38. Efeito do antagonista 5-HT₂, cetanserina, em associação ao 6CN07 sobre o TPCC no teste Caixa Claro Escuro (CCE).....	97
Figura 39. Efeito do 6CN07 na presença do pentilenotetrazol sobre o NEBA no teste Labirinto em Cruz Elevado (LCE).	99
Figura 40. Efeito do 6CN07 na presença do pentilenotetrazol sobre o TPBA no teste Labirinto em Cruz Elevado (LCE).	100
Figura 41. Efeito do 6CN07 na presença do pentilenotetrazol sobre o NECC no teste Caixa Claro Escuro (CCE).	101
Figura 42. Efeito do 6CN07 na presença do pentilenotetrazol sobre o TPCC no teste Caixa Claro Escuro (CCE).	102
Figura 43. Efeito do 6CN07 sobre GSH frente ao estímulo ansiogênico com pentilenotetrazol.	103
Figura 44. Efeito do 6CN07 sobre nitrito frente ao estímulo ansiogênico com pentilenotetrazol.	104
Figura 45. Efeito do 6CN07 sobre a peroxidação lipídica, pelo MDA, frente ao estímulo ansiogênico com pentilenotetrazol.	105
Figura 46. Viabilidade celular do 6CN07 frente à excitotoxicidade glutamatérgica avaliada pelo teste WST-1 em culturas primárias de células da glia.	107
Figura 47. Contraste de fases do derivado tiofênico 6CN07 em cultura primária de micróglia enriquecida com astrócitos em meio a excitotoxicidade glutamatérgica.	108

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Sintomas físicos e psíquicos dos Transtornos de Ansiedade (TA).	20
Quadro 2. Classificação dos transtornos de ansiedade segundo o DSM-5.	21
Quadro 3. Inventário de Beck (BAI) para diagnóstico e acompanhamento clínico dos transtornos de ansiedade.....	22
Quadro 4. Escore do Inventário de Beck e classificação.....	22
Quadro 5. Fármacos e reagentes utilizados no presente estudo.	43
Quadro 6. Equipamentos e utensílios.	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. <i>Moldock Scores</i> e RMSD dos diferentes complexos formados no <i>Docking</i> Molecular.....	70
--	-----------

RESUMO

Os transtornos de ansiedade constituem um importante problema de saúde pública e, apesar da diversidade de fármacos ansiolíticos, o tratamento ainda é limitado por resposta clínica insatisfatória e efeitos adversos que comprometem a adesão ao tratamento. Tais fatores evidenciam a necessidade de investigar novos compostos com perfis farmacológicos mais eficazes e seguros. Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo investigar o potencial ansiolítico-símile do derivado tiofênico 6CN07 e seu possível mecanismo de ação através de abordagens *in silico*, *in vivo* e *in vitro*. As análises *in silico* indicaram que o 6CN07 apresentou propriedades físico-químicas e farmacocinéticas compatíveis com fármacos de ação no sistema nervoso central, além de interações favoráveis com importantes alvos envolvidos na neurobiologia da ansiedade, a saber os receptores 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} e GABA_A. Em relação às metodologias *in vivo*, o 6CN07 apresentou efeito ansiolítico-símile em camundongos submetidos aos testes do labirinto em cruz elevado e da caixa claro-escuro, sem induzir prejuízo na atividade locomotora ou na coordenação motora. Estudos de antagonismo farmacológico indicaram o possível envolvimento dos receptores GABA_A e 5-HT_{2A} no efeito do composto. Adicionalmente, o 6CN07 também apresentou efeito ansiolítico-símile no modelo de ansiedade induzida por pentilenotetrazol, além de atenuar o estresse oxidativo associado ao modelo. Por fim, nas análises *in vitro* realizadas em cultura de astrócitos, na presença de glutamato, o 6CN07 preservou a viabilidade celular frente à excitotoxicidade glutamatérgica, sugerindo um possível efeito neuroprotetor. Tomados em conjunto, os resultados sugerem que o composto 6CN07 apresenta um perfil farmacocinético e físico-químico compatível com fármacos ansiolíticos, cujo mecanismo de ação parece envolver a neurotransmissão GABAérgica e serotoninérgica, atenuação do estresse oxidativo e neuroproteção frente à excitotoxicidade glutamatérgica. Entretanto, estudos adicionais em nível molecular são necessários para uma melhor compreensão dos efeitos do derivado tiofênico.

Palavras-Chave: Ansiedade; GABA; Serotonina; Estresse Oxidativo; Compostos Heterocíclicos.

ABSTRACT

Anxiety disorders represent a significant public health challenge, and despite the diversity of anxiolytic drugs available, treatment remains limited by unsatisfactory clinical responses and adverse effects that compromise patient adherence. These factors highlight the urgent need to investigate new compounds with more effective and safer pharmacological profiles. In this context, the present study aimed to investigate the anxiolytic-like potential of the thiophene derivative 6CN07 and its possible mechanism of action through *in silico*, *in vivo*, and *in vitro* approaches. *In silico* analyses indicated that 6CN07 presented physicochemical and pharmacokinetic properties compatible with central nervous system-acting drugs, in addition to favorable interactions with key targets involved in the neurobiology of anxiety, namely 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A}, and GABA receptors. Regarding *in vivo* methodologies, 6CN07 promoted anxiolytic-like effects in mice subjected to the Elevated Plus Maze (EPM) and Light-Dark Box (LDB) tests, without inducing impairment in locomotor activity or motor coordination. Pharmacological antagonism studies indicated the possible involvement of GABA_A and 5-HT_{2A} receptors in the compound's effect. Additionally, 6CN07 exhibited an anxiolytic-like effect in the pentylenetetrazol (PTZ)-induced anxiety model and attenuated the oxidative stress associated with this model. Finally, *in vitro* analyses performed on astrocyte cultures in the presence of glutamate showed that 6CN07 preserved cell viability against glutamatergic excitotoxicity, suggesting a potential neuroprotective effect. Taken together, these results suggest that compound 6CN07 possesses a pharmacokinetic and physicochemical profile compatible with anxiolytic drugs, whose mechanism of action appears to involve GABAergic and serotonergic neurotransmission, attenuation of oxidative stress, and neuroprotection against glutamatergic excitotoxicity. However, further studies at the molecular level are necessary for a better understanding of this thiophene derivative's effects.

Keywords: Anxiety; GABA; Serotonin; Oxidative stress; Heterocyclic compounds.



INTRODUÇÃO



1 INTRODUÇÃO

A ansiedade consiste em uma resposta emocional natural e adaptativa, fundamental para a sobrevivência do organismo, uma vez que prepara o indivíduo para lidar com situações percebidas como ameaçadoras. No entanto, quando essa resposta ocorre de forma exacerbada, persistente e desproporcional ao estímulo desencadeante, ela pode evoluir para um transtorno psiquiátrico clinicamente relevante e potencialmente incapacitante (HILBERT et al., 2014). Segundo o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-V), os transtornos de ansiedade (TA) caracterizam-se por um conjunto de manifestações somáticas e psíquicas, incluindo palpitações, taquicardia, dispneia, elevação da pressão arterial, tensão muscular, cefaleia, náuseas, distúrbios do sono e sudorese excessiva, associados a sintomas como fadiga, irritabilidade, dificuldade de concentração e sensação persistente de angústia (APA, 2014).

Os transtornos de ansiedade representam atualmente a condição psiquiátrica mais prevalente em escala global. Estimativas recentes indicam que aproximadamente 31% da população mundial será acometida por algum transtorno de ansiedade ao longo da vida, superando inclusive os quadros depressivos, cuja prevalência é estimada em 28,9% (OPAS, 2024). No Brasil, esses transtornos apresentam prevalência particularmente elevada, com cerca de 9,3% da população diagnosticada, configurando o país como líder mundial em número de casos reportados (OPAS, 2020). Apesar da ampla utilização da terapia farmacológica na prática clínica, os fármacos atualmente disponíveis para o tratamento dos transtornos de ansiedade estão frequentemente associados a efeitos adversos relevantes que incluem sedação, prejuízo cognitivo e risco de dependência, o que compromete a adesão terapêutica e a segurança a longo prazo (BAES et al., 2017).

Evidências epidemiológicas demonstram que a incidência e a prevalência dos transtornos de ansiedade continuam a aumentar de forma consistente ao longo das últimas décadas, com importantes variações geográficas. Dados globais indicam que o número estimado de casos incidentes aumentou de 31,13 milhões em 1990 para 45,82 milhões em 2019. Em 2021, foram registrados aproximadamente 359,2 milhões de casos em todo o mundo, com uma prevalência de 4.421,9 casos por 100.000 habitantes, representando um aumento de cerca de 18% em relação a 1990. No mesmo período, os transtornos de ansiedade foram responsáveis por 53,9 milhões de casos incidentes, com uma taxa de

incidência padronizada por idade de 678,3 por 100.000 habitantes, refletindo um crescimento de 20,6% desde 1990 (WU et al., 2025).

Reconhecidos pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como os transtornos mentais mais prevalentes, os transtornos de ansiedade afetaram aproximadamente 301 milhões de indivíduos em 2019. De acordo com o *Global Burden of Disease, Injuries and Risk Factors Study* (GBD), houve um aumento de 16,7% na taxa de anos de vida ajustados por incapacidade (DALY) entre 2010 e 2021. Projeções baseadas em modelos bayesianos do tipo idade-período-coorte indicam que a prevalência global poderá atingir cerca de 4.566 casos por 100.000 habitantes em 2030 ($\approx 4,6\%$) e 5.753 casos por 100.000 habitantes em 2050 ($\approx 5,8\%$), reforçando a tendência de crescimento contínuo desse agravo (ZHOU et al., 2025).

O GBD, um projeto multicêntrico que quantifica perdas de saúde em escala global, também aponta que os transtornos mentais figuram entre as principais causas de carga global de doenças, sendo os transtornos de ansiedade, depressão e esquizofrenia responsáveis por uma proporção expressiva dos DALYs associados à saúde mental. Essa carga elevada se distribui ao longo de toda a vida e afeta ambos os sexos de maneira significativa. Ademais, apesar da disponibilidade de diversas intervenções farmacológicas e não farmacológicas eficazes, não houve redução substancial na prevalência nem na carga global desses transtornos desde 1990, evidenciando limitações importantes das abordagens terapêuticas atuais (WANG et al., 2025).

Nesse contexto, a identificação e o desenvolvimento de novos agentes ansiolíticos têm impulsionado a pesquisa científica e a indústria farmacêutica pela busca de novas moléculas com potencial efeito ansiolítico. A neurobiologia dos transtornos de ansiedade envolve alterações complexas em múltiplos sistemas, incluindo a redução da neurotransmissão GABAérgica e serotoninérgica, e o aumento da atividade glutamatérgica, além da ativação do processo neuroinflamatório e do estresse oxidativo. Esses mecanismos têm sido amplamente associados à disfunção neuronal e à manutenção dos sintomas ansiosos, o que justifica o interesse crescente por compostos com propriedades neuroprotetoras, antioxidantes e anti-inflamatórias (DENG et al., 2018).

Dentre os compostos sintéticos investigados, os derivados tiofênicos têm se destacado como uma classe promissora, apresentando ampla diversidade estrutural e potencial terapêutico associado a diferentes atividades biológicas. Estudos prévios

revelaram um derivado tiofênico dotado de efeitos ansiolítico-símile, antioxidante e neuroprotetor, sugerindo o potencial dessa importante classe química como candidato no desenvolvimento de novas estratégias farmacológicas para o tratamento dos transtornos de ansiedade (FORTES et al., 2013a; FORTES et al., 2013b). Diante desse cenário, o presente estudo teve como objetivo avaliar o potencial ansiolítico-símile do composto 6CN07, um derivado tiofênico, por meio da integração de abordagens *in silico*, *in vivo* e *in vitro*.

REFERENCIAL TEÓRICO

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Transtornos de Ansiedade

Os TA são caracterizados por um estado ansioso exacerbado e persistente (DSM-5) com sinais e sintomas físicos e psíquicos. Os sinais e sintomas estão associados a alterações endócrinas, funcionais e estruturais, que ocorrem de maneira simultânea ou isolada (Quadro 1) (SZUHANY; SIMON, 2022).

Quadro 1. Sintomas físicos e psíquicos dos Transtornos de Ansiedade (TA).

Sintomas Físicos	Sintomas Psíquicos
Palpitações	Inquietação
Falta de ar	Irritabilidade
Taquicardia	Fadiga
Aumento da pressão arterial	Dificuldade de Concentração
Sudorese excessiva	Angústia intensa
Dor de cabeça	
Alteração de hábitos intestinais	
Náuseas	
Tensão e dor muscular	
Perturbações do sono	

Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) indicam que, no primeiro ano da pandemia de COVID-19, a prevalência global de ansiedade e depressão aumentou em 25%. No Brasil, aproximadamente 14 % da população apresenta características desses transtornos, sendo um dos países com as maiores prevalências de casos (BONADIMAN et al., 2020).

O diagnóstico dos transtornos de ansiedade é embasado no Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-V) e, em conjunto, pela Classificação Internacional de Doenças (CID-11). Essas ferramentas elencam os diversos critérios, sinais e sintomas específicos de cada tipo de transtorno de ansiedade (Quadro 2) (APA, 2014; LACK, 2024).

Quadro 2. Classificação dos transtornos de ansiedade segundo o DSM-5.

Classificação	Definição	Sintomas
Transtorno do pânico	Episódio abrupto de ansiedade e medo com início súbito, dotado de sintomas físicos;	Dor no peito Falta de ar; Sensação de morte iminente; Calafrios ou ondas de calor
Transtorno de ansiedade social (Fobia social)	Episódio no qual a pessoa se sente observada e analisada pelos outros. Comer, escrever, falar na frente dos outros;	Tremores, sudorese, enrubescimento, palpitações, amnésia iminente;
Transtorno de Ansiedade Generalizada (TAG)	Início insidioso e precoce com curso crônico de gravidade ou curso episódico. Com alta dificuldade de controle da preocupação.	Inquietação com sensação de risco ou excitatória; fadiga intensa; tensão muscular; distúrbios do sono (ausência de sono ou dificuldade de sono REM)
Transtorno de Ansiedade Induzido por substâncias	Utilização de substâncias que causam a ansiedade, principalmente, na sua ausência.	Necessidade de utilização da droga para sensação de bem-estar; Abstinência pela droga.
Fobia Específica	Medo ou ansiedade acerca de um objeto ou situação. Exemplo: voar, tirar sangue, injeção;	Sensação circunscrita ao objeto/situação. Excitabilidade neuronal; desmaio ou quase desmaio.
Agorafobia	Medo ou ansiedade intensos ocasionados pela exposição real ou prevista a diversas situações. (andar de ônibus, locais fechados, multidão, local aberto)	Tontura, desmaio, náuseas, desorientação.
Mutismo seletivo	Fracasso consistente ao tentar falar em situações corriqueiras de fala (escola, por exemplo).	Timidez excessiva, isolamento social, apego, traços compulsivos, negativismo.
Transtorno de ansiedade da separação	Medo ou ansiedade impróprios e excessivo com quem o indivíduo possui apego.	Pesadelos recorrentes de separação abrupta, medo de fazer qualquer atividade sem a pessoa de apego;
Transtorno de Ansiedade Devido a Outra Condição Médica	Ansiedade ou medo intenso diante de algum quadro clínico, exame físico ou achados laboratoriais	Sintomas Clássicos de Ansiedade ou ataques de pânico;

O Inventário de Ansiedade de Beck (BAI), desenvolvido pelo médico psiquiatra e pesquisador em psicanálise, Dr. Aaron Temkin Beck, em 1970, também é uma

ferramenta importante no diagnóstico. O inventário é composto por uma escala com 21 características que, após preenchimento pelo próprio paciente, é possível inferir a gravidade do quadro de ansiedade (Quadro 3). Os 21 itens são respondidos de acordo com a intensidade que cada indivíduo apresenta no cotidiano, utilizando uma escala de Likert, variando de 0 (nada) até 3 (gravemente) (Quadro 4) (JULIAN et al., 2011).

Quadro 3. Inventário de Beck (BAI) para diagnóstico e acompanhamento clínico dos transtornos de ansiedade.

Escala de Ansiedade de Beck	Ausente (0)	Suave (1)	Moderado (2)	Severo (3)
1. Dormência ou formigamento				
2. Sensação de calor				
3. tremor nas pernas				
4. Incapaz de relaxar				
5. Medo de eventos ruins				
6. Confuso ou delirante				
7. Coração acelerado				
8. Inseguro (a)				
9. Apavorado (a)				
10. Nervoso (a)				
11. Sensação de sufocamento				
12. Tremor nas mãos				
13. Trêmulo (a)				
14. Medo de perder o controle				
15. Dificuldade de respirar				
16. Medo de morrer				
17. Assustado (a)				
18. Indigestão				
19. Desmaios				
20. Rubor facial				
21. Sudorese				

Quadro 4. Escore do Inventário de Beck e classificação.

Interpretação do Escore Total do BAI	
Escore Total	Gravidade da Ansiedade
0-7	Grau mínimo
8-15	Ansiedade Leve
16-25	Ansiedade moderada
26-63	Ansiedade grave

2.2 Neurobiologia dos Transtornos de Ansiedade

O córtex e o sistema límbico são áreas importantes para o processamento adequado das emoções (MALÉZIEUX; KLEIN; GOGOLLA, 2023). O “Circuito de Papez” (Figura 1) é o nome dado ao conjunto de estruturas do sistema límbico, formado pelo hipocampo, fórnice, corpos mamilares, núcleo anterior do tálamo, giro do cíngulo, amígdala, córtex frontobasal e córtex orbitobasal. Esse circuito é finamente regulado por um vasto sistema de neurotransmissores, como GABA, glutamato, serotonina e noradrenalina. Estes sistemas estão relacionados à geração e regulação de sentimentos como o medo e ansiedade e, sua desregulação pode levar ao desenvolvimento de diversos transtornos mentais (PANG et al., 2024).

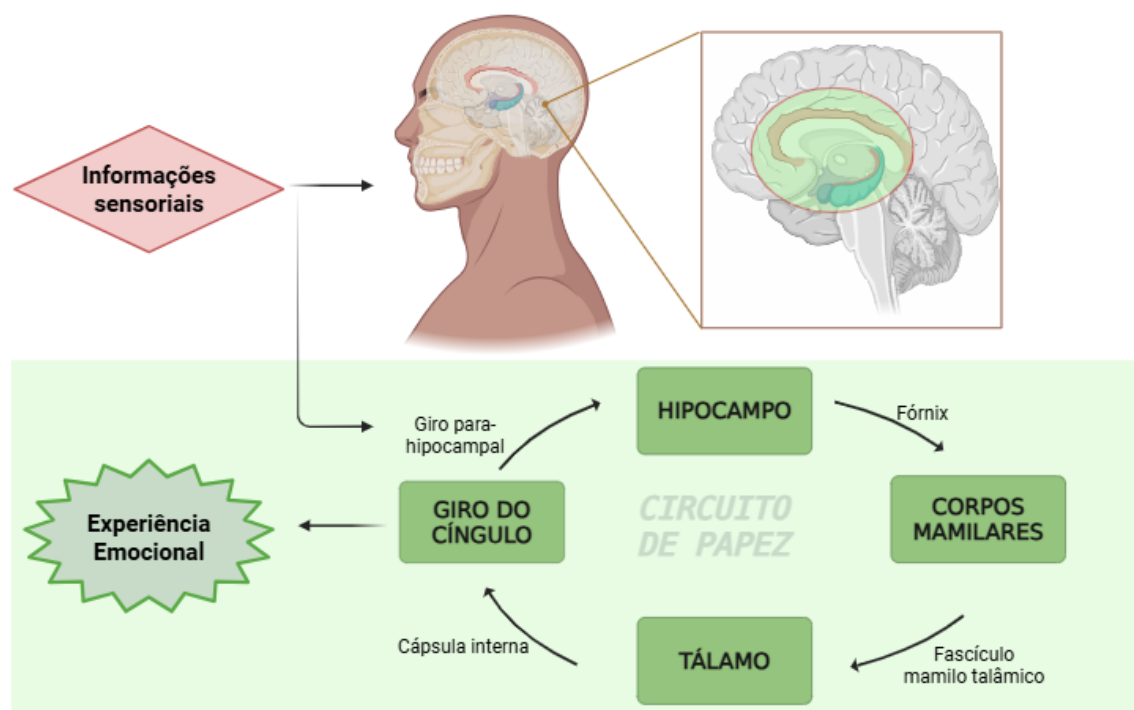


Figura 1. Circuito de Papez e processamento da experiência emocional.

Fonte: Adaptado de ROCHA, JÚNIOR e ROCHA (2015). Elaborado pela autora (2026), utilizando a plataforma BioRender.com.

A neurobiologia dos transtornos de ansiedade é multifatorial e envolve, a princípio, alterações na atividade dos sistemas GABAérgico, glutamatérgico, serotoninérgico e noradrenérgico (KOEN et al., 2011; BANDELOW et al., 2022). Além da alteração nos sistemas de neurotransmissão, ocorre também a ativação de vias

bioquímicas, endócrinas e imunológicas como o estresse oxidativo, o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e a neuroinflamação, respectivamente (Figura 2) (HARRO et al., 2018; WANG et al., 2020).

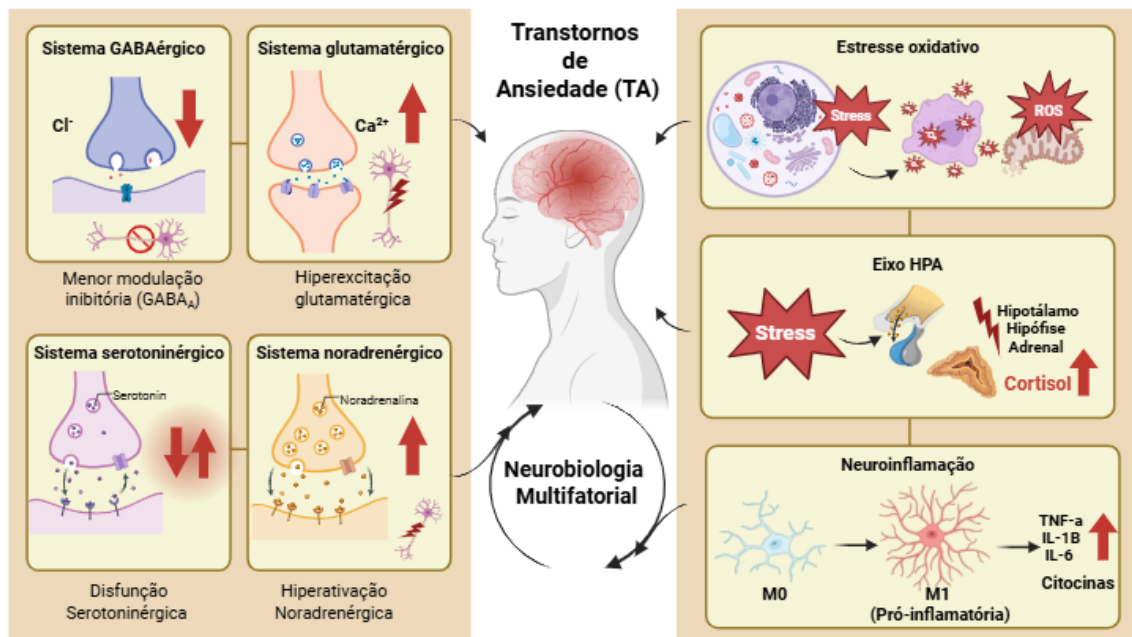


Figura 2. Mecanismos neurobiológicos multifatoriais associados aos Transtornos de Ansiedade (TA).

Fonte: Elaborado pela autora (2026), utilizando a plataforma BioRender.com.

2.2.1 Sistema GABAérgico

Dentre os principais pontos de controle da homeostase cerebral está a neurotransmissão GABAérgica, uma vez que ela ocupa papel central na regulação das forças excitatórias e inibitórias, bem como na modulação do comportamento emocional, sendo um dos alicerces neurobiológicos dos transtornos de ansiedade. O ácido gama-aminobutírico (GABA) é o principal neurotransmissor inibitório no sistema nervoso central, promovendo a hiperpolarização de neurônios por meio de sua ligação ao receptor GABA_A, desencadeando uma resposta em milissegundos. A integridade desse sistema, portanto, é essencial para manter o equilíbrio entre os processos excitatórios e inibitórios, contribuindo diretamente para a estabilidade funcional dos circuitos do medo e da ansiedade, além de outros transtornos como epilepsia. Disfunções entre sinais excitatórios oriundos da amígdala e o falho controle inibitório do córtex estão entre as teorias mais aceitas na relação entre GABA e ansiedade (ARORA et al., 2024).

Evidências recentes sugerem que uma redução da atividade GABAérgica ou alterações na expressão de subunidades dos receptores GABA_A estão associadas a um padrão comportamental análogo à ansiedade em modelos experimentais, refletindo um déficit funcional desse sistema em estados ansiosos, com hiperestimulação da amígdala. Além disso, a neuroimagem funcional em humanos tem documentado níveis reduzidos de GABA em diversas regiões corticais de indivíduos com transtornos de ansiedade, reforçando a hipótese de que a disfunção desta via contribui para a fisiopatologia desses transtornos (ARORA et al., 2024; QIN et al., 2021; ELSAID et al., 2025).

No plano farmacoterapêutico, a modulação da via GABAérgica permanece um dos mecanismos mais eficazes e bem caracterizados para o alívio dos sintomas ansiosos, pela ação dos benzodiazepínicos, como diazepam, midazolam, alprazolam, que atuam como moduladores alostéricos positivos dos receptores GABA_A aumentando a afinidade do GABA pelo receptor, facilitando a abertura do canal iônico e, consequentemente, promove um influxo massivo de íons Cl⁻ que promovem a hiperpolarização. No entanto, o uso clínico desses agentes é limitado por efeitos colaterais como sedação, amnésia anterógrada e diminuição da coordenação motora, além de tolerância e risco de dependência (BABAEV et al., 2018).

A compreensão detalhada dos mecanismos moleculares que regem a função e regulação do receptor GABA_A, incluindo a diversidade de subunidades e sítios alostéricos existentes, permite ampliar as perspectivas de desenvolvimento de novas intervenções farmacológicas sem os efeitos adversos clássicos, oferecendo uma base racional para a investigação de compostos como o 6CN07, que podem interagir com a neurotransmissão GABAérgica e contribuir para a modulação da ansiedade de forma mais precisa (ARORA et al., 2024; MOHLER, 2011).

Nesse contexto, para investigar a participação do sistema GABAérgico no efeito de novos compostos, utiliza-se frequentemente em pesquisas pré-clínicas o antagonista seletivo do sítio benzodiazepínico no receptor GABA_A, o flumazenil. Seu uso é realizado em protocolos de antagonismo farmacológico que permite distinguir se a atividade ansiolítica de uma molécula decorre de uma modulação alostérica positiva nesse receptor, de forma semelhante aos benzodiazepínicos clássicos, como citado anteriormente (GONZALEZ et al., 1997). Portanto, a ausência de reversão do efeito ansiolítico pelo flumazenil sugere que o mecanismo de ação do composto estudado independe da via

benzodiazepínica direta, direcionando a investigação para outros sistemas neurotransmissores, como o serotoninérgico ou glutamatérgico.

2.2.2 Sistema Serotoninérgico

O sistema serotoninérgico está localizado nos núcleos da rafe no mesencéfalo, constituindo um grupo único de neurônios, uma vez que são responsáveis por expressarem o principal substrato para a síntese de serotonina, a triptofano hidroxilase-2 (TPH2), enzima limitante na formação do neurotransmissor serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT) (ALBERT et al., 2014).

O receptor 5-HT_{1A} é expresso abundantemente no hipocampo, septo, amígdala e córtex pré-frontal onde modula as ações da 5-HT sobre o medo, a ansiedade, o estresse e cognição. O mecanismo de ação associado ao receptor 5HT_{1A} envolve o acoplamento às proteínas inibitórias Gi/Go, as quais inibem a atividade nos heterorreceptores nos neurônios-alvo e do autorreceptor pré-sináptico, regulando a liberação de 5-HT (LENICOV et al., 2007). Desequilíbrios do balanço entre os heterorreceptores e autorreceptores estão frequentemente associados à neurobiologia da depressão e da ansiedade, respectivamente (GARCIA-GARCIA et al., 2014)

O receptor 5-HT_{2A} representa segundo principal tipo de receptor serotoninérgico, amplamente distribuído no córtex, estriado ventral, hipocampo e amígdala. Ao contrário do subtipo 5-HT_{1A}, o receptor 5-HT_{2A} está acoplado à proteína Gq, que medeia as ações excitatórias da serotonina nos neurônios-alvo, embora existam funções complementares para outros receptores estimulatórios no córtex pré-frontal, como os receptores 5-HT₃, 5-HT₄ e 5-HT₇. O resultado dessas ações são as respostas comportamentais à novidade e ameaça, que são associadas ao estado de ansiedade do organismo, uma vez que potencializam a liberação de serotonina em áreas corticais envolvidas no processamento da ansiedade (WEISSTAUB et al., 2006).

Diversas linhas de evidência indicam que a ativação de receptores 5-HT_{2A} está centralmente associada à neurobiologia da ansiedade. No nível pós-sináptico, essa ativação promove a supressão da neurotransmissão GABAérgica no córtex frontal, mediada pela fosforilação dos receptores GABA_A via proteína cinase C. Essa redução do tônus inibitório cortical reforça o papel pró-ansiosgênico desse receptor (MILLAN, 2003).

Paralelamente, estudos farmacológicos demonstram que a estimulação dos receptores 5-HT_{2A} promove o aumento do efluxo de glutamato em circuitos corticolímbicos, contribuindo para um estado de hiperexcitabilidade neuronal (ROCHER et al., 1999; MELLER et al., 2002).

Embora essa hiperexcitabilidade seja classicamente descrita sob a ótica neuronal, a literatura ressalta que esse fenômeno é exacerbado por fontes não neuronais. Nesse contexto, a sinalização glutamatérgica disfuncional está intimamente ligada à resposta glial, onde a falha na homeostase mantida pelos astrócitos contribui para a excitotoxicidade observada nos transtornos de ansiedade (HAROON et al., 2017). Corroborando essa importância mecânica, o uso de antagonistas 5-HT_{2A}, como a cetanserina, tem demonstrado propriedades ansiolíticas consistentes em modelos experimentais (COSTALL et al., 1995; GRIEBEL et al., 1997). Essa íntima relação entre a modulação serotoninérgica e o desequilíbrio nos níveis de aminoácidos excitatórios e inibitórios direciona o foco para o papel do sistema glutamatérgico na neurobiologia da ansiedade.

2.2.3 Sistema Glutamatérgico

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório no sistema nervoso central, sendo responsável pela maior porção da atividade sináptica excitatória. Presente em praticamente todos os circuitos neurais, interconectando sistemas corticais e subcorticais, esse sistema desempenha funções primordiais no neurodesenvolvimento, na plasticidade sináptica, na formação da memória e nos processos de aprendizado e cognição. Além disso, o sistema glutamatérgico desenvolve importante atividade celular, tanto em neurônios quanto em células da glia, especialmente nos astrócitos. Tal atividade influencia a síntese proteica e metabolismo energético, além de atuar como precursor de moléculas neuroativas, como a glutatona, que mitiga o estresse oxidativo, e o GABA, principal neurotransmissor inibitório do SNC (NASIR *et al.*, 2020).

Seu mecanismo de ação envolve atividade em dois tipos de receptores: os ionotrópicos e os metabotrópicos. Os primeiros são canais iônicos controlados por ligantes, cujos agonistas seletivos incluem o N-metil-D-aspartato (NMDA), o ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiônico (AMPA) e cainato. O segundo grupo de

receptores são proteínas transmembranares acopladas a proteína G, divididas em oito subtipos denominados mGluR₍₁₋₈₎, que a transmissão glutamatérgica por vias intracelulares de forma mais lenta e duradoura, responsáveis pela liberação de neurotransmissores (YU et al., 2025).

Além do subtipo de receptor, a localização é decisiva em relação ao efeito fisiológico ou patológico do glutamato. Além dos receptores sinápticos, existem receptores extrassinápticos, ativados quando o glutamato extravasa a fenda sináptica, mesmo em pequenas quantidades, cuja ativação está relacionada à redução da plasticidade neuronal e efeitos pró morte celular (PÁL, 2018).

Dessa forma, é de suma importância um controle rigoroso na retenção de glutamato dentro da fenda sináptica, principalmente por células da glia. Nesse contexto, os astrócitos desempenham papel central nesta regulação, uma vez que são responsáveis por captar o glutamato via transportadores de aminoácidos excitadores (EAATs) e o converter em glutamina para reciclagem metabólica, processo essencial para prevenir a excitação excessiva e, conseqüentemente, a excitotoxicidade (HAROON et al., 2017; MAGDALENO ROMAN et al., 2024).

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central e, embora essencial à neurotransmissão fisiológica, pode atuar como neurotoxina quando presente em concentrações elevadas no espaço extracelular, desencadeando processos de excitotoxicidade. Essa excitotoxicidade tem sido implicada não apenas em doenças neurodegenerativas, acidente vascular cerebral e epilepsias, mas também em mecanismos subjacentes a transtornos de ansiedade, nos quais o desequilíbrio entre neurotransmissão excitatória e inibitória pode contribuir para a hiperexcitabilidade neuronal e a disfunção das redes córtico-límbicas envolvidas na resposta ao estresse. Dado que a região hipocampal desempenha papel crítico na integração de sinais emocionais e na modulação da ansiedade, a manutenção de níveis estritamente controlados de glutamato extracelular é fundamental para prevenir respostas neurotóxicas que podem agravar estados de ansiedade (Chakraborty et al., 2023).

Esse controle homeostático é majoritariamente exercido por transportadores de aminoácidos excitatórios (EAATs), especialmente os subtipos EAAT-1 (GLAST) e EAAT-2 (GLT-1), expressos predominantemente em astrócitos. Estes transportadores captam a maior parte do glutamato liberado sinapticamente, evitando sua acumulação no

espaço extracelular e protegendo as células vizinhas contra a excitotoxicidade. Astrócitos se destacam por sua maior eficiência na captação de glutamato em comparação aos neurônios, derivada de um potencial de membrana estável, gradientes iônicos favoráveis e disponibilidade de ATP, os quais sustentam o transporte ativo de glutamato (ANDERSEN et al., 2021).

No contexto dos modelos experimentais que exploram a neurobiologia da ansiedade, a exposição de culturas gliais a concentrações elevadas de glutamato reproduz aspectos da disfunção glutamatérgica observada em estados de ansiedade patológica, incluindo redução da capacidade antioxidante e comprometimento da viabilidade celular (McGRATH et al., 2022). Assim, a avaliação de compostos com potencial modulador dessa resposta em ensaios *in vitro* de excitotoxicidade glutamatérgica permite investigar mecanismos celulares de uma possível gliomodulação e neuroproteção que podem estar associados aos efeitos ansiogênicos ou ansiolíticos *in vivo*.

2.2.4 Estresse oxidativo

O estresse oxidativo tem sido amplamente implicado na fisiopatologia dos transtornos de ansiedade, sendo caracterizado por um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e a capacidade dos sistemas antioxidantes endógenos em neutralizá-las. Evidências clínicas e experimentais indicam que indivíduos com transtornos ansiosos apresentam aumento de marcadores de peroxidação lipídica, oxidação proteica e dano ao DNA, associados à redução da atividade de enzimas antioxidantes, como superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase. No sistema nervoso central, esse desequilíbrio redox compromete a integridade neuronal e sináptica, favorece disfunções mitocondriais e contribui para alterações na neurotransmissão excitatória e inibitória, especialmente nos sistemas glutamatérgico, GABAérgico e serotoninérgico, que são diretamente envolvidos na regulação da ansiedade (JOMOVÁ et al., 2023).

Além disso, o estresse oxidativo exerce papel relevante na ativação e na modulação da resposta glial, particularmente de astrócitos e micróglia, células fundamentais para a manutenção da homeostase sináptica e metabólica cerebral. A ativação glial sustentada em condições de desequilíbrio redox pode amplificar processos

neuroinflamatórios e excitotóxicos, promovendo aumento da liberação de glutamato, sobrecarga de cálcio intracelular e agravamento da disfunção mitocondrial. Nesse contexto, modelos experimentais que induzem hiperexcitabilidade neuronal, como a administração de pentilenotetrazol, têm demonstrado aumento concomitante de comportamentos ansiosos e de marcadores de estresse oxidativo, reforçando a interconexão entre esses processos (ALI et al., 2025). Assim, estratégias farmacológicas capazes de modular a excitabilidade neuronal e, simultaneamente, preservar a homeostase redox e a função mitocondrial emergem como abordagens promissoras para o manejo da ansiedade, sobretudo em condições associadas à hiperexcitabilidade e vulnerabilidade neuronal (SIMPSON et al., 2020).

2.3 Farmacoterapia dos transtornos de ansiedade

A farmacoterapia dos transtornos de ansiedade atualmente abrange três classes principais de fármacos, a saber: inibidores seletivos da receptação de serotonina (ISRS), os quais aumentam a disponibilidade da serotonina na fenda sináptica (BALDWIN et al., 2014), inibidores da recaptção de serotonina e noradrenalina (IRSN), que inibem concomitantemente os transportadores de 5-HT e NE, aumentando a concentração desses neurotransmissores na fenda sináptica (BANDELOW et al., 2022); e os benzodiazepínicos, moduladores alostéricos positivos do receptor GABA_A, os quais aumentam a condutância do íon cloreto (Cl⁻) através do seu canal na estrutura do receptor, diminuindo a excitabilidade neuronal (STAHL et al., 2019).

Embora os ISRS, IRSN e BZD, sejam amplamente utilizados no manejo dos transtornos de ansiedade, esses fármacos são dotados de efeitos colaterais indesejáveis que acabam interferindo na adesão farmacoterapêutica e, como consequência, ocorre uma descontinuação do tratamento farmacológico (BAES et al., 2017; FREITAS et al., 2022; QUEMEL et al., 2021).

Historicamente, a farmacoterapia dos transtornos de ansiedade foi monopolizada pela introdução dos benzodiazepínicos (BZDs) no mercado na década de 1960. Antes deles, era comumente utilizado o etanol, ópio, sais de brometo, hidrato cloral e barbitúricos, sendo este último considerado um marco na farmacoterapia no século XX, por produzir um efeito ansiolítico satisfatório (GRIEBEL et al., 2013a). Embora fossem

populares e com rápido efeito, essa classe de fármacos promove alterações comportamentais, motoras, sedação, dependência e toxicidade fatal. Posteriormente, houve o lançamento da reserpina e clorpromazina, fármacos com perfil ansiolítico de maneira mais seletiva em meados de 1950 (CRYAN et al., 2012).

Nesse contexto, os benzodiazepínicos ao serem lançados no mercado, monopolizaram a farmacoterapia, uma vez que são fármacos que atuam como moduladores alostéricos positivos do receptor GABA_A potencializando a afinidade do neurotransmissor inibitório GABA ao seu sítio de ligação no receptor promovendo, como resultado, aumento da frequência de abertura dos canais e influxo do íon cloreto (Cl⁻) que rapidamente promove o efeito ansiolítico (KATZUNG, 2023). Embora proporcionem alívio sintomático imediato, a literatura científica contemporânea adverte que o uso prolongado de BZDs resulta em tolerância farmacológica e dependência, além de efeitos adversos significativos, como sedação profunda, prejuízo cognitivo e relaxamento muscular excessivo. Tais limitações impulsionaram a busca por agentes capazes de dissociar a eficácia ansiolítica dos efeitos sedativos e do potencial de abuso (PENG et al., 2022).

Posteriormente, houve a descoberta da buspirona, um dos fármacos não benzodiazepínicos mais estudados, embora seu mecanismo de ação não esteja totalmente elucidado (CRYAN et al., 2012). Esse composto parece atuar majoritariamente no receptor de serotonina 5-HT_{1A} como agonista parcial e também apresenta afinidade por receptores de dopamina D₂. Como efeitos, tem-se o alívio da ansiedade, sem causar efeitos sedativos, hipnóticos ou eufóricos, sendo desprovido de atividade antiepiléptica e miorrelaxante, quando comparado aos benzodiazepínicos (GOLAN, 2014).

Os ISRS são antidepressivos que atuam promovendo um aumento da disponibilidade de serotonina na fenda sináptica devido a inibição do transportador pré-sináptico de serotonina (SERT). São exemplos de fármacos a fluoxetina, paroxetina, sertralina, citalopram e escitalopram que estão dentre os mais utilizados, atualmente (EDINOFF et al., 2021).

Os IRSN também são considerados antidepressivos e tem como mecanismo de ação a inibição da recaptação de serotonina e noradrenalina da fenda sináptica, ao se ligar no SERT, mas também no transportador pré-sináptico de noradrenalina (NAT). Este processo de ligação aos transportadores de serotonina e noradrenalina pré-sinápticos,

concomitantemente, promove aumento na concentração desses neurotransmissores na fenda sináptica. Dentre os fármacos disponíveis no mercado dessa classe se destacam a duloxetine e venlafaxina (ALBERNAZ, 2021).

Apesar da miríade de substâncias disponíveis para o tratamento dos distúrbios de ansiedade, estes fármacos são dotados de efeitos colaterais que, muitas vezes, podem dificultar a adesão do paciente e, assim, prejudicar o tratamento. Com isso muitos estudos têm sido desenvolvidos com o intuito de descobrir novas moléculas com potencial efeito ansiolítico e com menos efeitos colaterais. Como exemplo tem-se o composto 5TIO1, um derivado 2-aminotiofênico que apresentou efeito ansiolítico-símile, o qual foi revertido pelo flumazenil, um antagonista competitivo do receptor GABA_A, segundo o estudo publicado por Fortes et al (2013) (FORTES *et al.*, 2013a).

2.4 Derivados tiofênicos

Os derivados tiofênicos pertencem à classe dos compostos heterocíclicos, caracterizados pela presença do anel tiofeno, uma estrutura aromática de cinco membros composta por quatro átomos de carbono (C) e um átomo de enxofre (S) como heteroátomo. O tiofeno foi identificado pela primeira vez em 1882 por Victor Meyer como um contaminante do benzeno, apresentando propriedades físico-químicas semelhantes às desse hidrocarboneto aromático, incluindo ponto de ebulição e características organolépticas (DEEP et al., 2016).

Do ponto de vista sintético, o anel tiofênico pode ser obtido por diferentes metodologias, destacando-se a reação de Gewald, amplamente empregada na síntese de derivados 2-aminotiofênicos. Essa reação consiste na condensação de uma cetona ou aldeído com um composto contendo metileno ativo, na presença de enxofre elementar em meio básico. O mecanismo envolve inicialmente a formação de um intermediário do tipo Knoevenagel, seguida de ciclização com o enxofre, culminando na formação do anel aromático tiofênico (CHAUDHARY et al., 2012; DA CRUZ et al., 2021; MISHRA et al., 2011).

Essa metodologia apresenta rendimentos de moderados a elevados, além de grande versatilidade estrutural, o que a torna particularmente atrativa para aplicações em

química medicinal e no desenvolvimento de novas entidades químicas bioativas (PUTEROVA et al., 2010; TIETZE et al., 2015).

2.4.1 Atividades farmacológicas dos derivados tiofênicos

Compostos heterocíclicos constituem uma das classes estruturais mais relevantes em fármacos atualmente utilizados na clínica, sendo amplamente encontrados na natureza. Entre esses, os derivados tiofênicos destacam-se por exibirem um amplo espectro de atividades farmacológicas. Diversos fármacos contendo o núcleo tiofeno em sua estrutura química encontram-se em uso terapêutico, especialmente no tratamento de distúrbios do SNC, como os antiepilépticos tiagabina, etizolam e brotizolam (AMR et al., 2010), o antipsicótico olanzapina (MELTZER; FIBIGER, 1996) e o antidepressivo duloxetine (CHAUDHARY et al., 2012; DA CUNHA et al., 2011; KUMAR et al., 2019; KUNDA et al., 2013).

Além dessas aplicações clínicas, a literatura descreve uma variedade de atividades farmacológicas associadas aos derivados tiofênicos, incluindo ações analgésicas, antimicrobianas, antileishmaniose, antitumorais, antiparkinsonianas, antidepressivas, antifúngicas, anticonvulsivantes e neuroprotetoras, bem como potencial terapêutico em doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer (AMRR et al., 2010; BERNARDO et al., 2026; dos SANTOS et al., 2026; DIAS et al., 2026; DA CRUZ et al., 2021; MISHRA et al., 2011). É importante enfatizar que o núcleo tiofênico exerce papel estrutural relevante para a atividade biológica desses compostos, sendo relatado que a presença de heteroátomos como enxofre e nitrogênio pode potencializar seus efeitos farmacológicos (AMR et al., 2010).

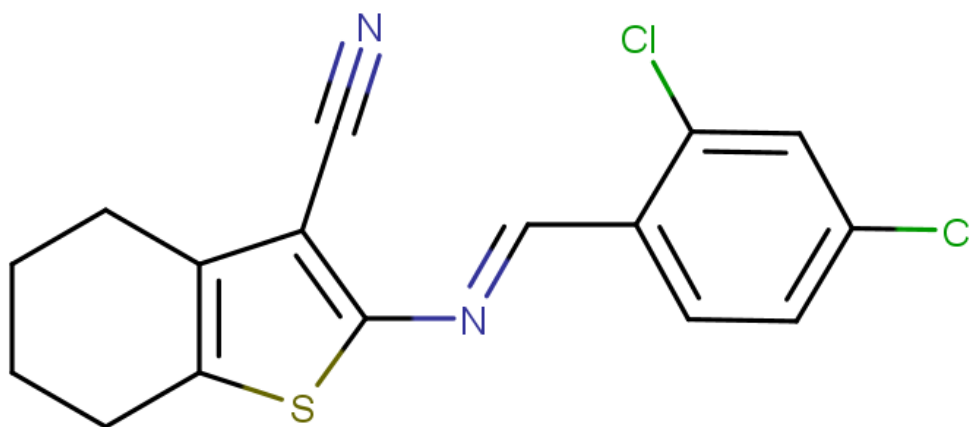
Sabe-se que existe uma relação entre transtornos de ansiedade e o aumento do estresse oxidativo no SNC, contribuindo para o desenvolvimento e agravamento da sintomatologia, considerando a elevada vulnerabilidade cerebral às espécies reativas de oxigênio (ROS) (FORTES et al., 2013b). Nesse sentido, derivados tiofênicos têm se mostrado particularmente promissores devido às suas propriedades antioxidantes e neuroprotetoras. Fortes et al. (2013) demonstraram que o derivado tiofênico 5TIO1 reduziu significativamente a peroxidação lipídica, os níveis de nitrito e modulou a atividade de enzimas antioxidantes, como catalase (CAT) e superóxido dismutase

mitocondrial (Mn-SOD), reforçando o potencial desses compostos na atenuação de processos neurotóxicos associados ao estresse oxidativo (FORTES et al., 2013a; FORTES et al., 2013b).

2.4.2 Derivado tiofênico 6CN07

Tendo em vista o grande potencial farmacológico dos derivados tiofênicos, o presente estudo selecionou o derivado 6CN07 como candidato a fármaco com efeito ansiolítico-símile (Figura 3). O composto foi obtido por meio da reação de Gewald, estratégia sintética consolidada na obtenção de derivados 2-aminotiofênicos e amplamente empregada em química medicinal devido à sua eficiência e versatilidade (CHAUDHARY et al., 2012; DA CRUZ, 2021; MISHRA; JHA, 2011). A escolha dessa rota sintética permite a introdução racional de substituintes capazes de influenciar diretamente propriedades farmacodinâmicas e farmacocinéticas, favorecendo a geração de novas entidades químicas bioativas (PUTEROVA et al., 2010; TIETZE et al., 2015).

Nesse contexto, o 6CN07 configura-se como um derivado tiofênico sintético promissor, cuja investigação do potencial ansiolítico-símile foi conduzida por meio de uma abordagem integrada envolvendo metodologias *in silico*, *in vitro* e *in vivo*, possibilitando a correlação entre estrutura química, propriedades farmacológicas e mecanismos celulares subjacentes ao seu perfil neurofarmacológico.



2-((2,4-diclorobenzilideno)amino)-4,5,6,7-tetra-hidrobenzo[*b*]tiofeno-3-carbonitrila

Figura 3. Estrutura e nomenclatura química do derivado tiofênico 6CN07.

JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA

3 JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA

Apesar dos avanços no tratamento farmacológico dos transtornos de ansiedade, as terapias atualmente disponíveis ainda apresentam limitações significativas, incluindo resposta clínica insatisfatória em parcela expressiva dos pacientes, efeitos adversos que comprometem a adesão ao tratamento e mecanismos de ação restritos a poucos sistemas de neurotransmissores (STRAWN et al., 2023). Adicionalmente, muitos dos fármacos utilizados na prática clínica atuam predominantemente de forma sintomática, sem abordar processos celulares e moleculares subjacentes, como a hiperexcitabilidade neuronal, a disfunção mitocondrial e o estresse oxidativo, que vêm sendo cada vez mais reconhecidos como componentes relevantes da fisiopatologia da ansiedade e de suas comorbidades (FAGAN; BALDWIN, 2023; GUO et al., 2023).

Nesse contexto, a investigação de novos compostos com mecanismos de ação alternativos ou multimodais representa uma estratégia promissora para o desenvolvimento de abordagens terapêuticas mais eficazes e seguras (MAHIMA; MAZUMDER; PENTELA, 2025). O estudo do derivado tiofênico 6CN07 insere-se nessa perspectiva ao explorar, de forma integrada, sua interação com alvos moleculares relevantes, seus efeitos comportamentais e seu impacto sobre parâmetros celulares associados à homeostase redox e à função glial. A abordagem pré-clínica adotada neste trabalho contribui para a ampliação do conhecimento sobre novos candidatos farmacológicos com potencial ansiolítico, além de fornecer bases mecanísticas que podem orientar o desenvolvimento futuro de terapias capazes de modular a ansiedade de maneira mais abrangente, particularmente em contextos associados à hiperexcitabilidade neuronal e ao desequilíbrio redox.



HIPÓTESES



4 HIPÓTESES

4.1 Hipótese nula (H0):

O tratamento com 6CN07 não promove efeitos comportamentais indicativos de ação no SNC, sendo destituído de propriedade ansiolítica-símile.

4.2 Hipótese alternativa (H1):

O tratamento com 6CN07 promove efeitos comportamentais indicativos de ação no SNC, sendo dotado de propriedade ansiolítica-símile, através do(a):

- Maior permeabilidade no sistema nervoso central, com interações favoráveis com receptores GABAérgicos e serotoninérgicos;
- Redução do comportamento tipo ansioso, com participação das vias GABAérgica e/ou serotoninérgica, em animais submetidos a modelos comportamentais etológicos;
- Redução do comportamento tipo ansioso, decorrente da redução do estresse oxidativo hipocampal, em animais tratados com pentilenotetrazol;
- Aumento da viabilidade celular em cultura primária de células da glia tratadas com glutamato.



OBJETIVOS



5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo Geral

Investigar o efeito ansiolítico-símile e a toxicidade do derivado 2-aminotiofênico 6CN07 através de metodologias *in silico*, *in vivo* e *in vitro*.

5.2 Objetivos Específicos

- Prever, por meio de metodologias *in silico*, as características físico-químicas e farmacocinéticas do 6CN07 e sua interação com alvos farmacológicos envolvidos na neurobiologia da ansiedade;
- Avaliar, por meio de metodologias *in vivo*, os efeitos do comportamentais do 6CN07 em camundongos e a participação da neurotransmissão GABAérgica e serotoninérgica no efeito ansiolítico-símile do composto;
- Determinar, por meio de metodologias *in vitro*, efeito do 6CN07 sobre a concentração hipocampal de marcadores de estresse oxidativo em camundongos pré-tratados com pentilenotetrazol;
- Avaliar, por meio de metodologias *in vitro*, o efeito do 6CN07 sobre a viabilidade celular em cultura primária de células da glia frente à excitotoxicidade glutamatérgica;
- Sugerir, com base nas metodologias supracitadas, um possível mecanismo de ação para o efeito ansiolítico-símile do derivado 6CN07.



METODOLOGIA



6 METODOLOGIA

6.1 Materiais

6.1.1 Composto teste

O derivado 2-aminotiofênico 6CN07 foi sintetizado e cedido pelo Prof. Dr. Francisco Jaime Bezerra Mendonça Júnior, coordenador do Laboratório de Síntese e Vetorização de Moléculas (LSVM) da Universidade Estadual da Paraíba – UEPB, Campus V.

6.1.2 Fármacos e Reagentes

As drogas utilizadas estão listadas no quadro 1 de acordo com sua procedência.

Quadro 5. Fármacos e reagentes utilizados no presente estudo.

ÍTEM	PROCEDÊNCIA
Álcool Etílico	Merck Milipore
Buspirona	Cristália
Cetamina	Packe-Davis
Diazepam	Cristália
Flumazenil	Cristália
Solução Fisiológica 0,9%	Eurofarma
Cetanserina	Sigma-Aldrich
Tween 80	Sigma-Aldrich
Xilazina	Bayer

6.1.3 Equipamentos e utensílios

Os equipamentos e utensílios estão listados no quadro 2 de acordo com sua procedência.

Quadro 6. Equipamentos e utensílios.

ÍTEM	PROCEDÊNCIA
Agulha	BD Brasil
Balança Analítica	Toledo do Brasil
Bastão de Vidro	Laborglas
Béquer 10 mL	Laborglas
Caixa Claro-Escuro	Insight
Campo aberto	Insight
Cronômetro	Unilab ETQ
Espátula para Pesagem	Laborglas
Labirinto em cruz elevado	Insight
Pipeta Automática 2 – 20 µL	Eppendorf
Ponteira para Pipeta Automática	Eppendorf
<i>Rota Rod</i>	Insight
Seringa de 1,0 mL	BD Brasil

6.2 Animais

Um total de 280 camundongos *Swiss* albinos machos (*Mus musculus*), com peso médio de 25 g, provenientes da Unidade de Produção Animal – UPA do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos – IPeFarM, da Universidade Federal da Paraíba – UFPB, foram utilizados na presente pesquisa. Em conformidade com as normas e procedimentos de biossegurança para biotérios, os animais foram divididos em grupos de oito animais e mantidos em gaiolas de polipropileno em ambiente com temperatura de 23 ± 2°C, ciclo claro/escuro de 12h e com água e ração *ad libitum*.

Todos os protocolos experimentais foram desenvolvidos mediante aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA da UFPB (nº 5940100524, aprovado em 21/10/2024) e da UFBA (2485270223, aprovado em 16/06/2023). Para tanto, a proposta da pesquisa levou em consideração as normas e diretrizes bioéticas vigentes para ensaios envolvendo animais (*Guide for the care and use of laboratory animals*, do NIH - National Institute of Health-EUA, 1996; Lei Federal Nº 11.794/2008; Princípios Éticos da Experimentação Animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA). Todos os procedimentos adotados foram estabelecidos de acordo com o decreto nº.

24.645 de 10 de julho de 1934 que asseguram os direitos dos animais, estabelecendo medidas de proteção aos mesmos, e conforme a lei n.º 6.638 de 8 de maio de 1979, que normatiza as práticas didático científicas da vivisseção de animais (BRASIL, 1934; BRASIL, 1979).

Ao final dos experimentos, todos os animais foram eutanasiados com injeção intraperitoneal da associação de xilazina (30 mg/kg) e cetamina (300 mg/kg), como recomendado pela Diretriz da Prática de Eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA.

6.3 Protocolos Experimentais

Os protocolos experimentais adotados de acordo com as hipóteses propostas são apresentados, de maneira resumida, na figura 4.

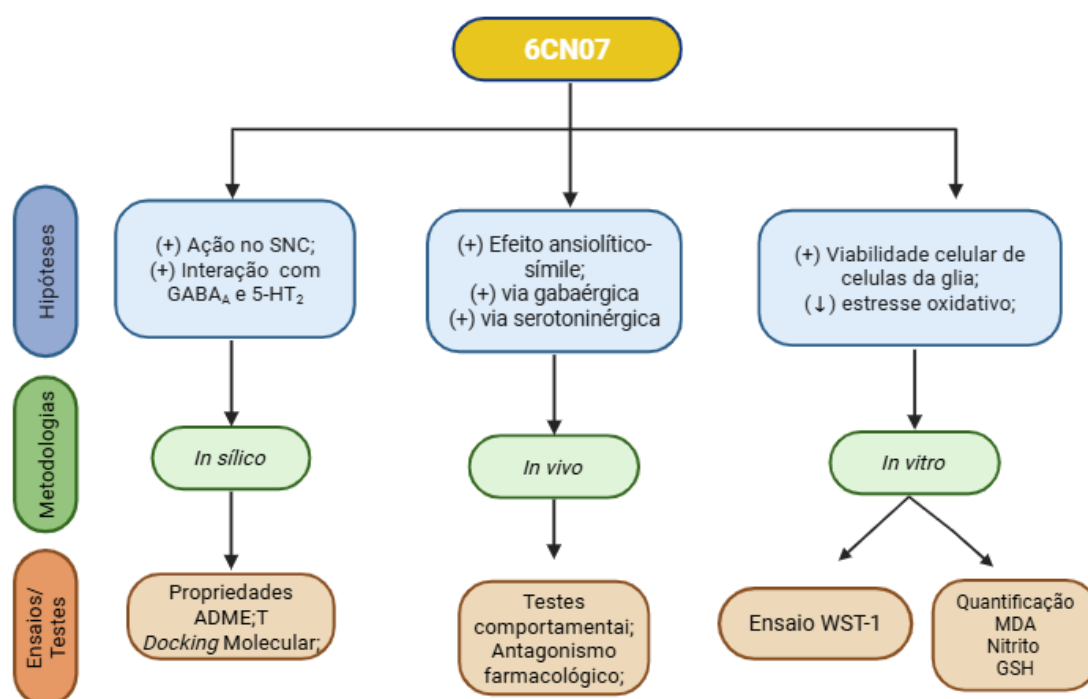


Figura 4. Síntese dos protocolos experimentais.

6.3.1 Metodologias *in silico*

6.3.1.1 Predição de propriedades físico-químicas e farmacocinéticas

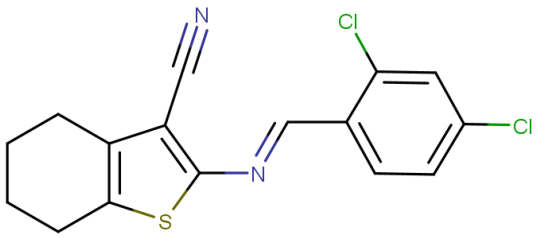
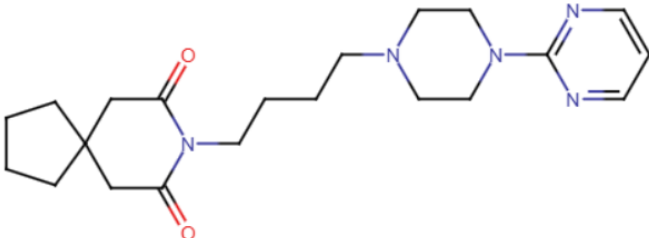
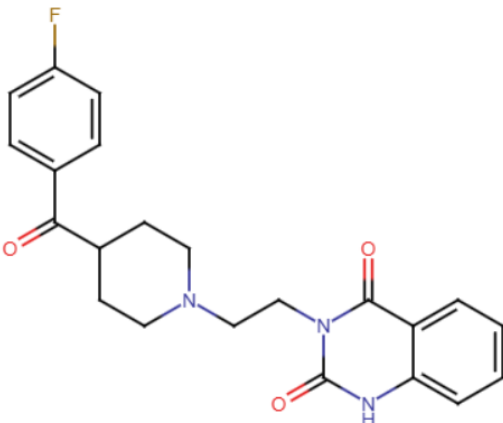
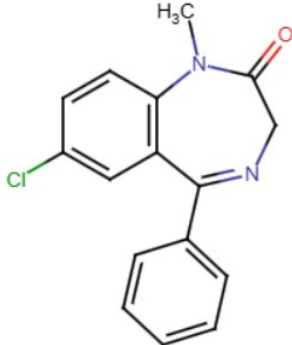
A predição *in silico* dos parâmetros de absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME) foi calculada usando as ferramentas web de acesso aberto Swiss ADME (Instituto Suíço de Bioinformática, Lausanne, Suíça) (DAINA et al., 2017; SwissADME, 2025) e PhaKinPro: *Pharmacokinetic Property Calculator* (RATH et al., 2024). A previsão de toxicidade foi realizada no software DataWarrior v. 4.7.2, OpenMolecules (Actelion Pharmaceuticals Ltd., Allschwil, Suíça) (SANDER et al., 2015; SANDER et al., 2025).

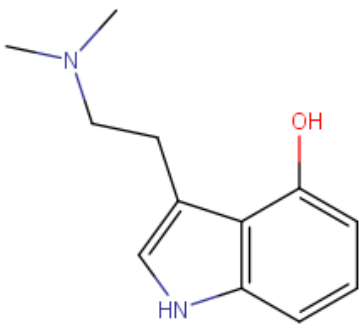
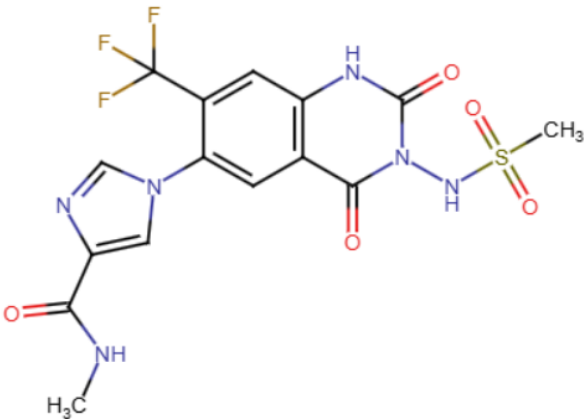
6.3.1.2 Docking Molecular

A simulação de *Docking* molecular foi conduzida para avaliar a afinidade de ligação do composto 2-((2,4-dichlorobenzylidene)amino)-4,5,6,7-tetrahydrobenzo[b]thiophene-3-carbonitrile (6CN07) frente aos alvos relacionados à farmacoterapia dos transtornos de ansiedade. Os ligantes apresentados foram modelados no software MarvinSketch v.23.14 (CHEMAXON, 2023), sendo submetidos a etapas de minimização de energia para a otimização da estrutura pelo método de Mecânica Molecular (MMFF), seguido pelo método semi-empírico Austin Model 1 (AM1), implementados no software Spartan 14 (WAVEFUNCTION, 2023) (Quadro 03).

A estrutura cristalográfica dos alvos descritos, os quais estão envolvidos na atividade ansiolítica, foi obtida na base de dados *Protein Data Bank* (PDB) (BERMAN, 2000) (Quadro 04). A seleção dos alvos do estudo foi antecedida por uma pesquisa bibliográfica, sendo observada a ação dos alvos na mediação dos processos da neurobiologia da ansiedade.

Quadro 3. Ligantes componentes das simulações de *Docking Molecular*.

Ligante	Estrutura química
2-((2,4-dichlorobenzylidene)amino)-4,5,6,7-tetrahydrobenzo[b]thiophene-3-carbonitrile (6CN07)	
Buspirona	
Cetanserina	
Diazepam	

Psilocina	
N-methyl-1-{3-[(methylsulfonyl)amino]-2,4-dioxo-7-(trifluoromethyl)-1,2,3,4-tetrahydroquinazolin-6-yl}-1H-imidazole-4-carboxamide (WAY-100635)	

Quadro 4. Descrição dos alvos utilizados na simulação de *Docking* molecular.

Alvo	Código PDB	Resolução	Ligante co-cristalizado
Receptor de serotonina subtipo 1A (5-HT _{1A})	8FYX (WARREN et al., 2024)	2.62 Å	Buspirona
Receptor de serotonina subtipo 2A (5-HT _{2A})	9LL8 (XU et al., 2026)	2.62 Å	Psilocina
Transportador Vesicular de Monoaminas 2 (VMAT ₂)	8JT9 (WU et al., 2024)	2.97 Å	Cetanserina
Receptor GABA subtipo A	6X3X	2.92 Å	Diazepam

A simulação de *Docking* molecular foi desenvolvida no software Molegro Virtual Docker 6.0 (MVD), sendo previamente realizada a remoção de todas as moléculas de água e cofatores do ambiente de cálculo (MOLEXUS, 2013). A simulação foi antecedida pelo processo de validação dos alvos em estudo e consequente avaliação da precisão e confiabilidade dos resultados da ancoragem molecular por meio do processo de *Redocking*, sendo calculada a métrica relacionada ao Desvio Quadrático Médio (RMSD) das poses geradas.

O cálculo dos valores de RMSD representa uma etapa crucial para avaliar a reprodutibilidade do cálculo desenvolvido pelo algoritmo do programa MVD, sendo que valores ≤ 2 Å são considerados aceitáveis. Os valores de escore de afinidade adotados foram correspondentes as poses geradas segundo a função de pontuação MolDock Score, considerando as contribuições da energia interna, ligações de hidrogênio e energia torsional, sendo mantido o resultado referente a pose de menor escore de afinidade. Trinta execuções independentes foram realizadas usando o algoritmo MolDock SE e uma grade com raio de 18 Å e resolução de 0,30 Å foi gerada centrada nas posições dos ligantes cristalográficos dos alvos selecionados.

6.3.2 Metodologias *in vivo*

6.3.2.1 Preparação da solução com composto teste

A solução do derivado tiofênico 6CN07 foi preparada respeitando os princípios farmacotécnicos necessários para a obtenção de uma suspensão homogênea. Inicialmente, o composto foi pesado em balança analítica de precisão e, em seguida, foi adicionado Tween 80 a 1% (v/v), um tensoativo não iônico com propriedades emulsificantes e solubilizantes, empregado para promover a solubilização inicial do composto. Posteriormente, completou-se o volume com solução salina estéril q.s.p., obtendo-se a solução final utilizada nos testes.

6.3.2.2 Protocolos Experimentais

Para cada protocolo, os camundongos foram submetidos a um período de jejum de 2 a 4 h prévias aos testes. Decorrido este tempo, os animais foram tratados via oral (v.o) com salina (NaCl 0,9% em água destilada – 10 mL/kg) ou com 6CN07, nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg. Essas doses foram escolhidas de acordo com testes prévios de toxicidade oral desenvolvidos com o composto em nosso laboratório. O diazepam, fármaco benzodiazepínico padrão para efeito ansiolítico, sedativo e miorrelaxante, foi administrado por via intraperitoneal (i.p.) nas doses de 1, 2 e 4 mg/kg, respectivamente. A buspirona, fármaco serotoninérgico padrão para efeito ansiolítico foi administrada por via intraperitoneal (i.p.) na dose de 5 mg/kg. Todas as substâncias utilizadas foram solubilizadas em Tween 80 a 1% em solução salina de NaCl a 0,9% (veículo). O volume administrado não excedeu 0,1 mL/10 g de peso.

6.3.2.3 Testes Comportamentais

Os experimentos foram realizados sempre no mesmo horário (12h00 às 16h00), em uma sala devidamente livre de ruídos, com temperatura constante ($23 \pm 2^{\circ}\text{C}$) e iluminação de pouca intensidade. A manipulação dos animais foi realizada seguindo os princípios éticos para a experimentação animal, relatados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), havendo um único observador responsável pela análise de cada etapa do experimento e outro para a aplicação das substâncias escolhidas neste estudo. Todos os observadores foram previamente certificados nos princípios éticos, boas práticas de bioterismo e cuidados básicos com animais de laboratório.

Labirinto em Cruz Elevado (LCE):

O teste do Labirinto em Cruz Elevado (LCE) é um dos modelos animais mais validados para o rastreio de substâncias com potencial ansiolítico ou ansiogênico. O fundamento deste teste baseia-se no conflito motivacional dos roedores entre o impulso exploratório inato do animal e a esquiva defensiva em áreas abertas e elevadas, que representam maior risco de predação. A redução da esquiva, observada pelo aumento da exploração dos braços abertos, é interpretada como um efeito do tipo ansiolítico neste teste (RODGERS; DALVI, 1997).

O LCE para camundongos consistiu em um aparelho em acrílico, formado por dois braços abertos (30 x 5 cm) e dois braços fechados (30 x 5 x 25 cm), unidos perpendicularmente entre si por uma plataforma central (5 x 5 cm), formando uma cruz, elevada a 45 cm do solo. Os animais foram divididos em grupos compostos por seis camundongos, os quais foram pré-tratados por via oral com veículo (Tween 80 a 1,0% em solução salina) ou 6CN07 (25, 50 e 100 mg/kg) ou, por via intraperitoneal, com diazepam (1 mg/kg) ou buspirona (5 mg/kg). Decorridos 60 minutos da administração, cada animal foi colocado individualmente no centro do aparelho, com o focinho voltado para um dos braços fechados. Durante 5 min cada animal foi observado quanto aos seguintes parâmetros comportamentais: número de entradas nos braços abertos (NEBA) e tempo de permanência do animal nos braços abertos (TPBA) (figura 5).

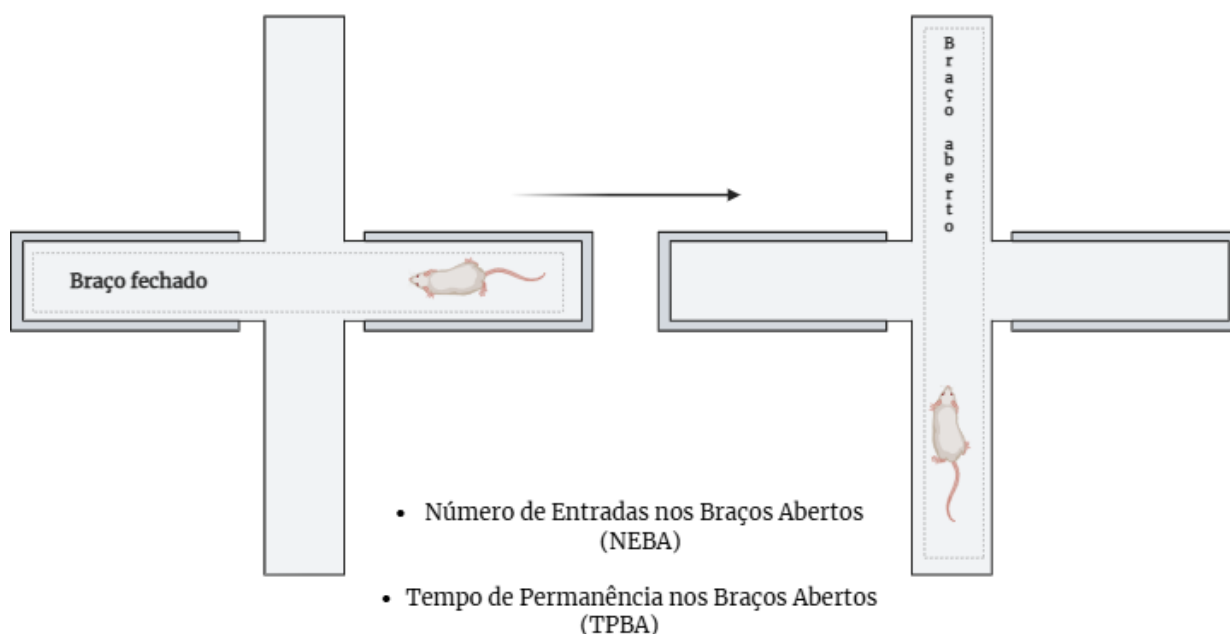


Figura 5. Metodologia ilustrada do aparelho labirinto em cruz elevado (LCE).

Fonte: Elaborado pela autora (2026), utilizando a plataforma BioRender.com.

Campo Aberto (CA):

O teste do Campo Aberto (CA) é utilizado para avaliar a atividade locomotora e o comportamento exploratório de roedores em um ambiente desconhecido. Etologicamente, o animal apresenta o comportamento de tigmotaxia, ou seja, prioriza a locomoção através de áreas periféricas. Dessa forma, a frequência de cruzamentos e o tempo de permanência

nos quadrantes centrais são indicadores de comportamento do tipo ansiolítico, enquanto a distância total percorrida, contabilizada em número de cruzamentos, serve como parâmetro de controle para descartar efeitos sedativos ou estimulantes que possam mascarar os resultados de outros testes de ansiedade (KRAEUTER; GUEST; SARNYAI, 2018).

O CA consiste em uma arena circular confeccionada de acrílico transparente (30 x 30 cm) e piso de acrílico branco/opaco (30 x 30 x 15 cm), dividido em doze seções dispostas em dois círculos concêntricos. Os animais foram divididos em grupos compostos por seis camundongos, os quais foram pré-tratados por via oral com veículo (Tween 80 a 1,0% em solução salina) ou 6CN07 (25, 50 e 100 mg/kg) ou, por via intraperitoneal, com diazepam (2 mg/kg). Decorridos 60 min da administração, cada camundongo foi colocado individualmente no centro do aparelho. Durante 5 min o animal foi observado quanto aos seguintes parâmetros comportamentais: número de cruzamentos (totais, periféricos e centrais), número de *rearing* e número de *grooming* (figura 6).

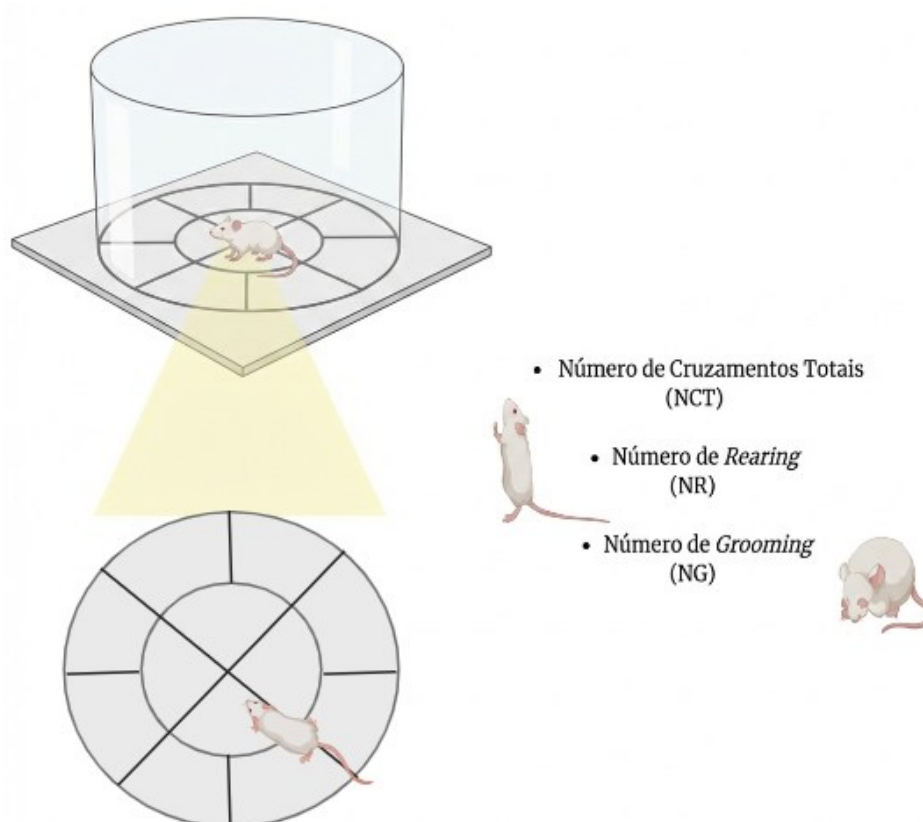


Figura 6. Metodologia ilustrada do aparelho campo aberto (CA).

Fonte: Elaborado pela autora (2026), utilizando a plataforma BioRender.com.

Rota Rod (RR):

O teste do Rota-Rod é considerado padrão ouro para a avaliação da coordenação motora e do equilíbrio em roedores. Diferente dos modelos de ansiedade, este ensaio motor é essencial na triagem farmacológica para garantir que os efeitos observados em outros testes não sejam decorrentes de déficits motores, ataxia ou relaxamento muscular excessivo (DEACON, 2013).

O RR consiste em uma barra rotatória de 2,5 cm de diâmetro, elevada a 25 cm do piso, a uma rotação de 12 rpm. Os animais foram divididos em grupos compostos por seis camundongos, os quais foram pré-tratados por via oral com veículo (Tween 80 a 1,0% em solução salina) ou 6CN07 (25, 50 e 100 mg/kg) ou, por via intraperitoneal, com diazepam (4 mg/kg). Decorridos 60 min da administração, cada camundongo foi colocado individualmente na barra rotatória. Durante 1 min o animal foi observado quanto aos seguintes parâmetros comportamentais: número de quedas (sendo o limite máximo de 3) e o tempo de permanência na barra (60 seg) (MATTER e FRANCA et al., 2006) (figura 7).

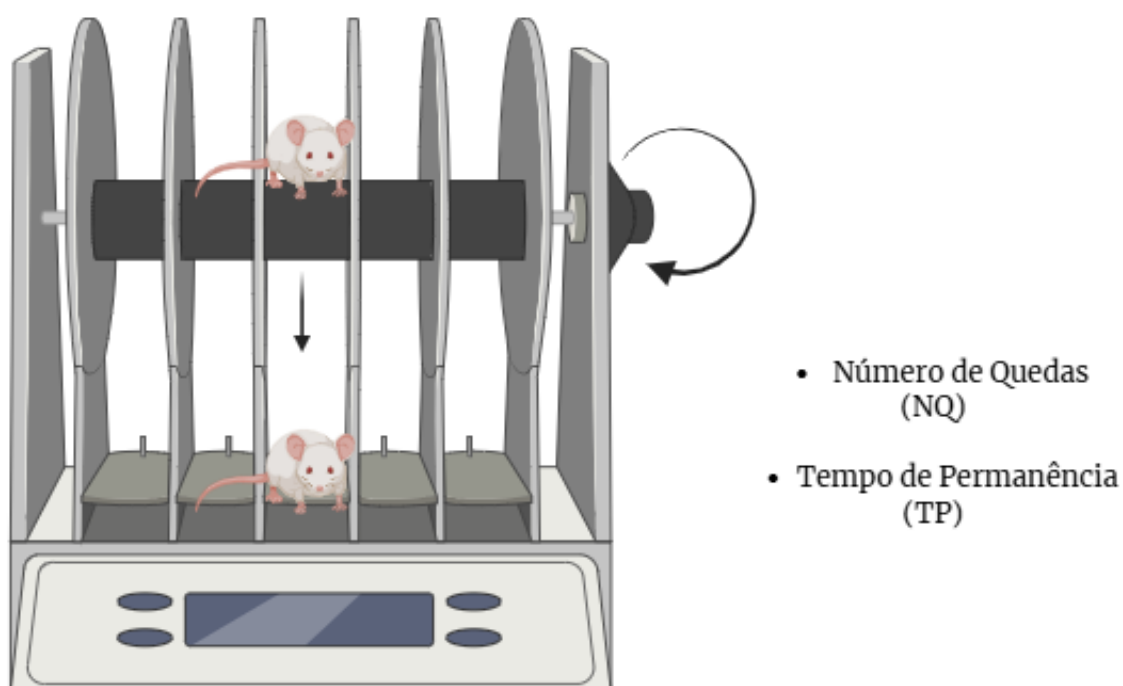


Figura 7. Metodologia ilustrada do aparelho *Rota Rod* (RR).

Fonte: Elaborado pela autora (2026), utilizando a plataforma BioRender.com.

Caixa Claro-Escuro:

O modelo da Caixa Claro-Escuro (CCE) fundamenta-se na aversão natural dos roedores a ambientes iluminados (fotofobia). O teste avalia o comportamento de permanência no compartimento “seguro” e escuro e a motivação para explorar o ambiente novo e iluminado. Logo, a quantificação no número de transições e no tempo de permanência para o compartimento claro permitem inferir a modulação de sistemas neuroquímicos relacionados à ansiedade (BOURIN; HASCÖET, 2003).

A caixa consiste em um ambiente que contém duas câmaras, uma totalmente escura contendo apenas uma porta no centro que se liga à câmara clara que é, por sua vez aberta a luz natural ($45 \times 25 \times 25$ cm), conforme descrito por Crawley e Goodwin (1980). Nesse contexto, a análise do efeito ansiolítico se dá pelo processo de transição entre o compartimento escuro e o compartimento claro, bem como seu tempo de permanência em cada compartimento de acordo com a concentração da droga utilizada. O benzodiazepínico Diazepam, ansiolítico padrão do teste, reverte o processo ansiogênico ao aumentar o influxo do íon Cl^- , favorecendo a atividade GABAérgica. O efeito ansiolítico, nesse caso, é observado quando o número de transições do compartimento escuro para o claro aumenta, bem como o tempo de permanência no compartimento claro (ANDRADE et. al., 2020) (figura 8).

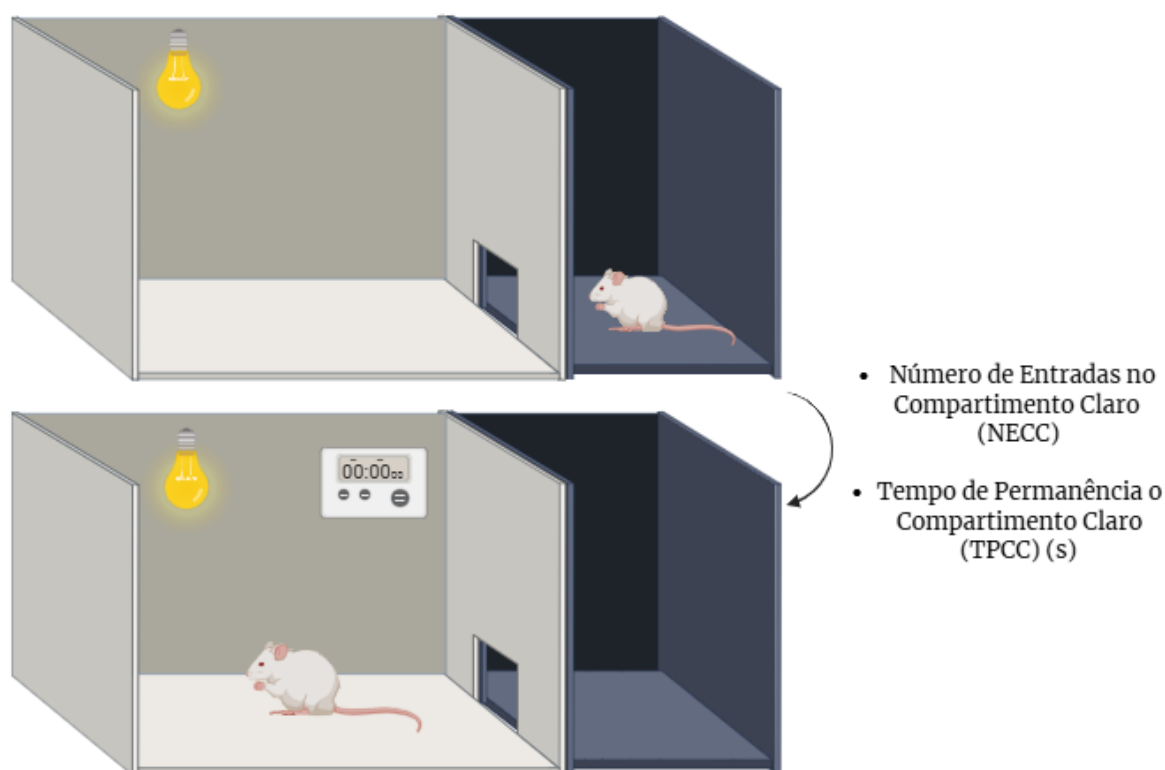


Figura 8. Metodologia ilustrada do aparelho Caixa Claro-Escuro (CCE).

Fonte: Elaborado pela autora (2026), utilizando a plataforma BioRender.com.

Avaliação do envolvimento do receptor $GABA_A$:

Para fins de elucidar o mecanismo de ação do 6CN07 foi utilizado o flumazenil, um antagonista competitivo benzodiazepínico. Para tanto, grupos distintos de seis camundongos foram pré-tratados intraperitonealmente com flumazenil (20 mg/kg) e, após 15 min, com 6CN07 (50 mg/kg, v.o.) ou diazepam (1 mg/kg, i.p.). Como controle do experimento, grupos de animais foram tratados isoladamente com solução salina (10 mL/kg, v.o.) ou 6CN07 (50 mg/kg, v.o.) ou com diazepam (2 mg/kg, i.p.). Após 60 minutos, todos os camundongos foram submetidos individualmente ao labirinto em cruz elevado.

Avaliação do envolvimento do receptor 5-HT₂:

Para fins de elucidar o mecanismo de ação do 6CN07 foi utilizado a cetanserina, um antagonista do receptor 5-HT₂. Para tanto, grupos distintos de seis camundongos foram pré-tratados intraperitonealmente com cetanserina (5 mg/kg) e, após 15 min, com 6CN07 (50 mg/kg, v.o.) ou bupiriona (5 mg/kg, v.o.). Como controle do experimento,

grupos de animais foram tratados isoladamente com solução salina (10 mL/kg, v.o.) ou 6CN07 (50 mg/kg, v.o.) ou buspirona (5 mg/kg, v.o.). Após 60 minutos, todos os camundongos foram submetidos individualmente ao labirinto em cruz elevado.

Avaliação do efeito ansiolítico frente à indução química com PTZ:

O pentilenotetrazol, composto pró-convulsivante, que promove hiperexcitação neural ao bloquear canais de GABA e modular a atividade dos receptores NMDA e AMPA ao induzir um aumento da liberação de glutamato, atua também como agente ansiogênico em baixas doses (30 mg/kg, i.p.) (ALI et al., 2025). Dessa forma, com o objetivo de avaliar o efeito ansiolítico do 6CN07 frente a indução química do PTZ, camundongos machos foram distribuídos em grupos (n = 6) e pré-tratados oralmente com veículo (Tween 80 a 1% em solução salina de NaCl a 0,9%) ou 6CN07 (50mg/kg). Uma hora após, os animais receberam uma injeção intraperitoneal de PTZ (30 mg/kg) com objetivo de estimular efeito ansiogênico. Um último grupo foi tratado oralmente com veículo, mas não recebeu PTZ. Decorridos trinta minutos, todos os grupos foram submetidos, individualmente, aos testes comportamentais labirinto em cruz elevado seguido de caixa claro escuro.

6.3.3 Metodologias *in vitro*

6.3.3.1 Estresse oxidativo

Camundongos machos foram distribuídos em grupos (n = 6) e pré-tratados oralmente com veículo (Tween 80 a 1% em solução salina de NaCl a 0,9%) ou diazepam (2 mg/kg) ou 6CN07 (50 mg/kg). Uma hora após, todos os animais receberam uma injeção intraperitoneal de PTZ (30 mg/kg) com objetivo de estimular um efeito ansiogênico. Um último grupo foi tratado oralmente com veículo, mas não recebeu PTZ. Decorridos trinta minutos, todos os roedores foram eutanasiados e rapidamente decapitados para remoção do encéfalo e dissecação do hipocampo (figura 9). O material coletado foi utilizado para as análises descritas a seguir.

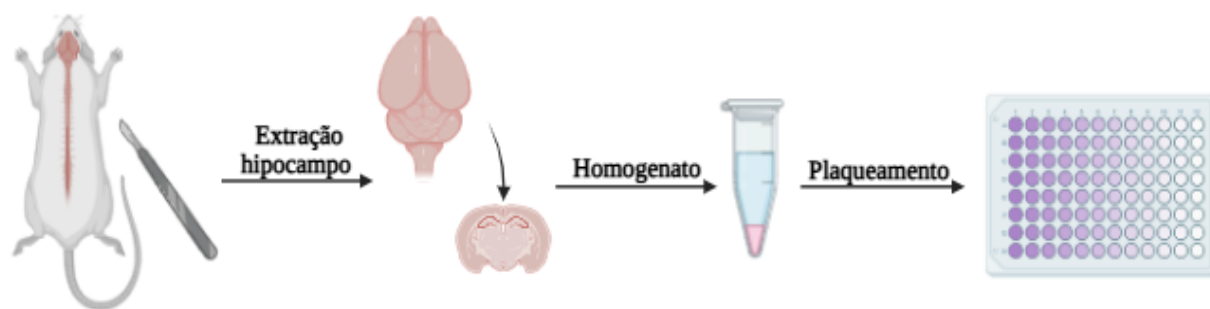


Figura 9. Metodologia ilustrada dos procedimentos aplicados para análise do estresse oxidativo.

Fonte: Elaborado pela autora (2026), utilizando a plataforma BioRender.com.

Quantificação de glutathiona reduzida (GSH):

Este teste é baseado na reação do 5,5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB) com grupos tiol (método de Ellman). Para essa análise, foram preparados homogenatos de hipocampo a 10% p/v em tampão EDTA 0,02 M (10% p/v) e misturados com uma solução de ácido tricloroacético a 50%. As amostras foram centrifugadas (3000 rpm/15 minutos) e o sobrenadante coletado e misturado com tampão Tris-HCl 0,4 M, pH 8,9 e DTNB 0,01 M. A concentração de GSH, $\mu\text{g/g}$ de tecido úmido foi determinada por espectrofotometria a 412 nm (Sedlak & Lindsay, 1968).

Quantificação de nitrito:

Em condições ácidas, o nitrito reage com a sulfonilamida formando um composto intermediário, o sal diazônico. Em seguida este sal reage com o N-naftil-etilenodiamina (NEED) formando um azo estável de coloração púrpura. A concentração de nitrito foi determinada conforme o método de Green et al. (1981).

Para tanto, foram preparados homogenatos de hipocampo a 10% p/v, utilizando tampão de cloreto de potássio a 1,15% p/v, os quais foram submetidos à centrifugação por 15 minutos em uma centrífuga refrigerada (4° C) a 15.000 rpm. A técnica utilizou o reagente de Griess (N-1- naftiletilenodiamina a 0,1%, água bidestilada, sulfanilamida a 1% e ácido fosfórico a 5%, na proporção de 1:1:1:1). Este reativo revela a presença de nitrito em amostras biológicas por meio de uma reação de diazotização que forma um cromóforo de cor rósea, com um pico de absorbância em 560 nm). Em 100 μL do reagente

de Griess foram adicionados 100µL do sobrenadante homogenato e, para o branco foram utilizados 100 µL do reagente de Griess acrescidos de 100 µL de salina. Finalmente, 100 µL do branco e das amostras foram transferidos para uma placa de Elisa onde foi determinada a absorbância do produto da reação, em um comprimento de onda de 540 nm. Os valores das absorbâncias foram interpolados em uma curva-padrão de nitrito de sódio e os resultados expressos em micromolar (µM).

Quantificação das substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS):

A peroxidação lipídica foi avaliada pela determinação da concentração das substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS), conforme o método de Draper e Hadley (1990). Para tanto, foram preparados homogenatos de hipocampo a 10% p/v, utilizando tampão de cloreto de potássio a 1,15% p/v. Em um tubo de ensaio 50 µL do homogenato foram misturados a 200 µL de uma solução de ácido tiobarbitúrico a 0,6% p/v em hidróxido de sódio 0,5 N e 200 µL de ácido tricloroacético a 10% p/v. Em seguida a mistura foi submetida à agitação e posterior incubação em banho-maria (95 – 100°C) por 15 minutos. Decorrido este tempo, os tubos foram introduzidos em um banho de gelo para cessar a reação. O material resfriado foi, então, centrifugado por 5 minutos a 4.000 rpm; 100 µL do sobrenadante foram transferidos para uma placa de Elisa para determinação da absorbância do produto da reação, em um comprimento de onda de 540 nm. Os valores das absorbâncias foram interpolados em uma curva-padrão de malonildialdeído (MDA) e os resultados foram expressos em micromol (µmol) de malonildialdeído (MDA) por grama de tecido.

6.3.3.2 Citotoxicidade

Foram utilizados ratos Wistar neonatos (P0 – P2), do Biotério do Instituto de Ciências da Saúde da UFBA (ICS-UFBA) e todos os procedimentos adotados estavam em conformidade com as Diretrizes Brasileiras de Boas Práticas para Produção, Manutenção e Utilização de animais em atividades de Pesquisa Científica e aprovados pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais do ICS (CEUA/ICS nº 6731220818).

Cultura Primária de Células da Glia:

A cultura primária de células da glia foi realizada de acordo com o método descrito

por Almeida et. al. 2025. Os ratos neonatos foram decapitados, os hemisférios cerebrais foram expostos e isolados assepticamente. As meninges e vasos sanguíneos foram retirados do córtex com auxílio de pinças. A dissecação do córtex foi realizada mecanicamente com pipeta pasteur, seguido da preparação do homogenato do tecido, o qual foi posteriormente filtrado em membrana de Nitex estéril de 75 µm. As células obtidas foram plaqueadas em frascos pré-revestidos com poli-D-lisina (25 µg/mL) em PBS e suspensas em meio DMEM (Dubecco's Modified Eagle Medium - Cultilab), suplementado com 10% de soro fetal bovino; 44 mM de bicarbonato de sódio; 1% de penicilina; 1% de estreptomicina; 7 mM de glicose à 50 mg/L (Isofarma, CE, Brasil). Os frascos foram mantidos em câmara úmida com 5% CO₂ a 37°C, durante 10 dias, até atingirem confluência. Ao atingir a confluência, as micróglia foram removidas, após agitação a 230 rpm a 37 °C por 3 h, permanecendo no tapete celular a cultura primária enriquecida de astrócitos. Em seguida foi acrescido novo meio DMEM (Gibco, Gaithersburg, MD), suplementado com 10% de SFB (Cultilab, SP, Brasil), 2 mM de L-glutamina, 3 mM de bicarbonato de sódio, 100 UI/mL de penicilina/estreptomicina e 7 mM de glicose e incubadas a 37 °C em atmosfera úmida e controlada, contendo 5% de CO₂ por mais 5 dias. Após esse período de incubação, foi realizado o processo de dissociação do tapete celular com tripsina 0,05% e EDTA 0,02% (Tripsina/ EDTA, Sigma Aldrich, Saint Luis, MO, USA, 9002077) diluídas em PBS isento de cálcio e magnésio e, posteriormente, realizado o replaqueamento das células, a uma densidade de $3,3 \times 10^4$ células/poço em placas de poliestireno de 96 poços ou $2,0 \times 10^5$ células/poço em placas de poliestireno de 24 poços para os testes (Figura 10).

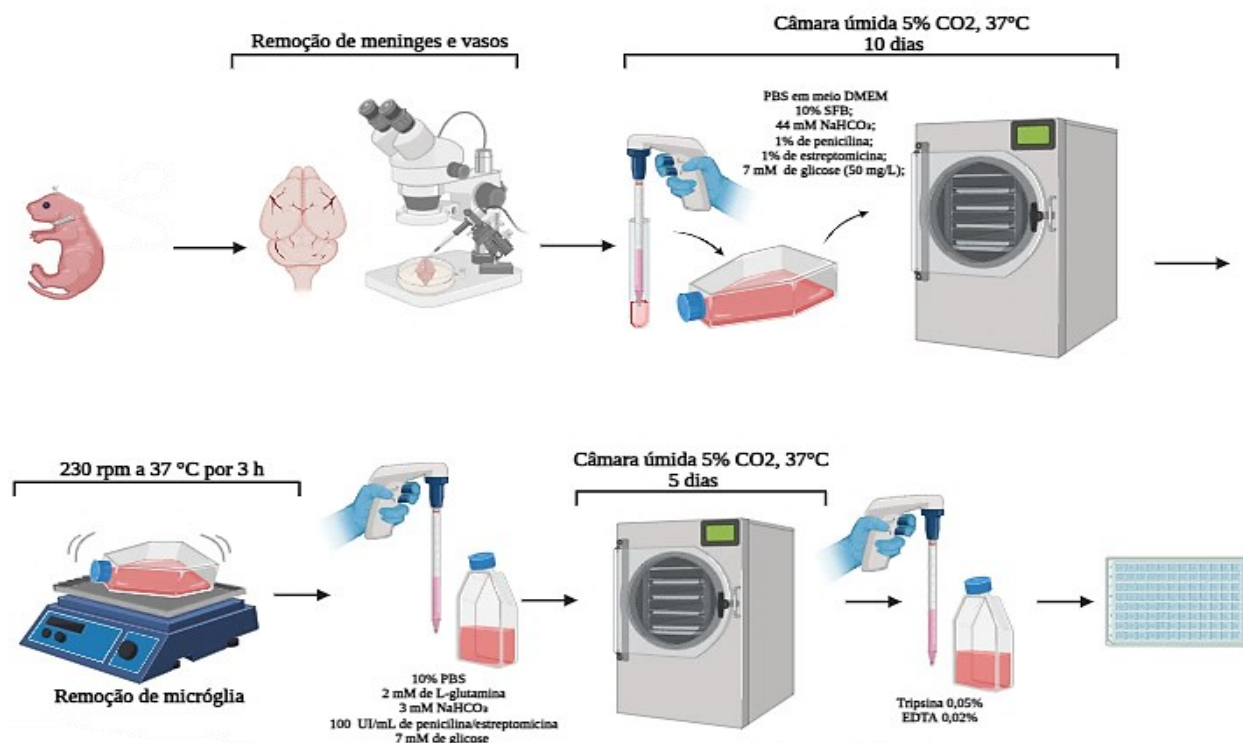


Figura 10. Metodologia ilustrada da cultura primária enriquecida com astrócitos.

Fonte: Elaborado pela autora (2026), utilizando a plataforma BioRender.com.

6.3.3.3 Viabilidade Celular (WST-1) com contraste de fases

A avaliação da viabilidade celular foi realizada pelo ensaio colorimétrico baseado no sal tetrazólio WST-1 (Reagente de Proliferação Celular, Sigma-Aldrich, EUA; cód. 5015944001, lote 79278800), que quantifica indiretamente a atividade mitocondrial das células viáveis. O método baseia-se na conversão do sal de tetrazólio levemente avermelhado, WST-1, em um composto formazan de coloração vermelho-escuro, catalisada pelas desidrogenases mitocondriais ativas em células metabolicamente íntegras (YIN et al., 2012; SIGMA-ALDRICH, 2020). As células foram cultivadas em microplacas de 96 poços de fundo plano, em atmosfera umidificada (37 °C; 5–6,5% CO₂) e volume final de 100 µL de meio de cultura por poço. Após os tratamentos experimentais (veículo DMSO 0,1%; GLUT 20 mM; 6CN07 0,1 e 1,0 µM), adicionou-se 10 µL do reagente WST-1 a cada poço. As placas foram incubadas por 1 hora a 37 °C sob as mesmas condições atmosféricas, seguidas de agitação suave por 1 minuto em agitador de microplacas. A absorbância das amostras foi mensurada em leitor de microplacas Varioskan Flash Multimode Reader (Thermo Scientific) no intervalo de 420–480 nm.

6.4 Análise Estatística

Os dados foram inicialmente avaliados quanto à distribuição; os valores que obedeceram a uma distribuição normal foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M.), analisados por ANOVA de uma via seguida do pós-teste de *Tukey* ou pelo teste t não pareado, quando necessária a comparação entre dois grupos. Para todas as análises foi adotado o nível para rejeição da hipótese de nulidade os valores de p menores que 0,05 ($p < 0,05$).

RESULTADOS

7 RESULTADOS

7.1 Metodologias *in silico*

As predições relacionadas as propriedades de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (ADMET) do derivado tiofênico 6CN07 foram realizadas utilizando as plataformas de acesso aberto PhaKinPro: *Pharmacokinetic Property Calculator*, Swiss ADME e Osiris DataWarrior. Essas plataformas empregam modelos computacionais baseados na estrutura molecular para a predição de parâmetros físico-químicos e farmacocinéticos relevantes. Isso permite estimar a viabilidade do composto como candidato a fármaco de administração oral, além de subsidiar a interpretação dos resultados obtidos nos ensaios *in vivo* conduzidos no presente estudo.

A plataforma PhaKinPro: *Pharmacokinetic Property Calculator* indicou que o derivado 6CN07 apresentou boa distribuição no sistema nervoso central, com 62,0% de probabilidade para atravessar a barreira hematoencefálica (Figura 11).



Figura 11. Predição *in silico* do perfil farmacocinético do 6CN07 através da plataforma PhaKinPro.

Adicionalmente, a plataforma SwissADME revelou que o composto apresentou peso molecular inferior a 500 Da, característica associada a melhor absorção e difusão tecidual; área de superfície polar topológica (TPSA) de 64,39 Å², valor amplamente compatível com absorção oral (TPSA < 140 Å²) e permeabilidade ao sistema nervoso central (TPSA < 90 Å²) eficientes, decorrente de uma relação adequada entre doadores e

aceptores de ligações de hidrogênio, indicando ausência de polaridade excessiva (Figura 10).

A plataforma também revelou valor de LogP consensual de 5,08 para o 6CN07, com variação entre 3,6 e 7,1, sugerindo lipofilicidade relativamente elevada. A análise de solubilidade em água, por outrolado, classificou o 6CN07 como pobremente solúvel em dois dos três modelos avaliados (Figura 12).

Em relação à absorção, o SwissADME indicou que o derivado tiofênico apresentou alta absorção gastrointestinal, sugerindo boa permeabilidade intestinal. O 6CN07 não foi predito como substrato da glicoproteína P, mas apresentou predição de inibição para as isoformas do citocromo P450 CYP1A2, CYP2C19 e CYP2C9, mas não para as isoformas CYP2D6 e CYP3A4 (Figura 12).

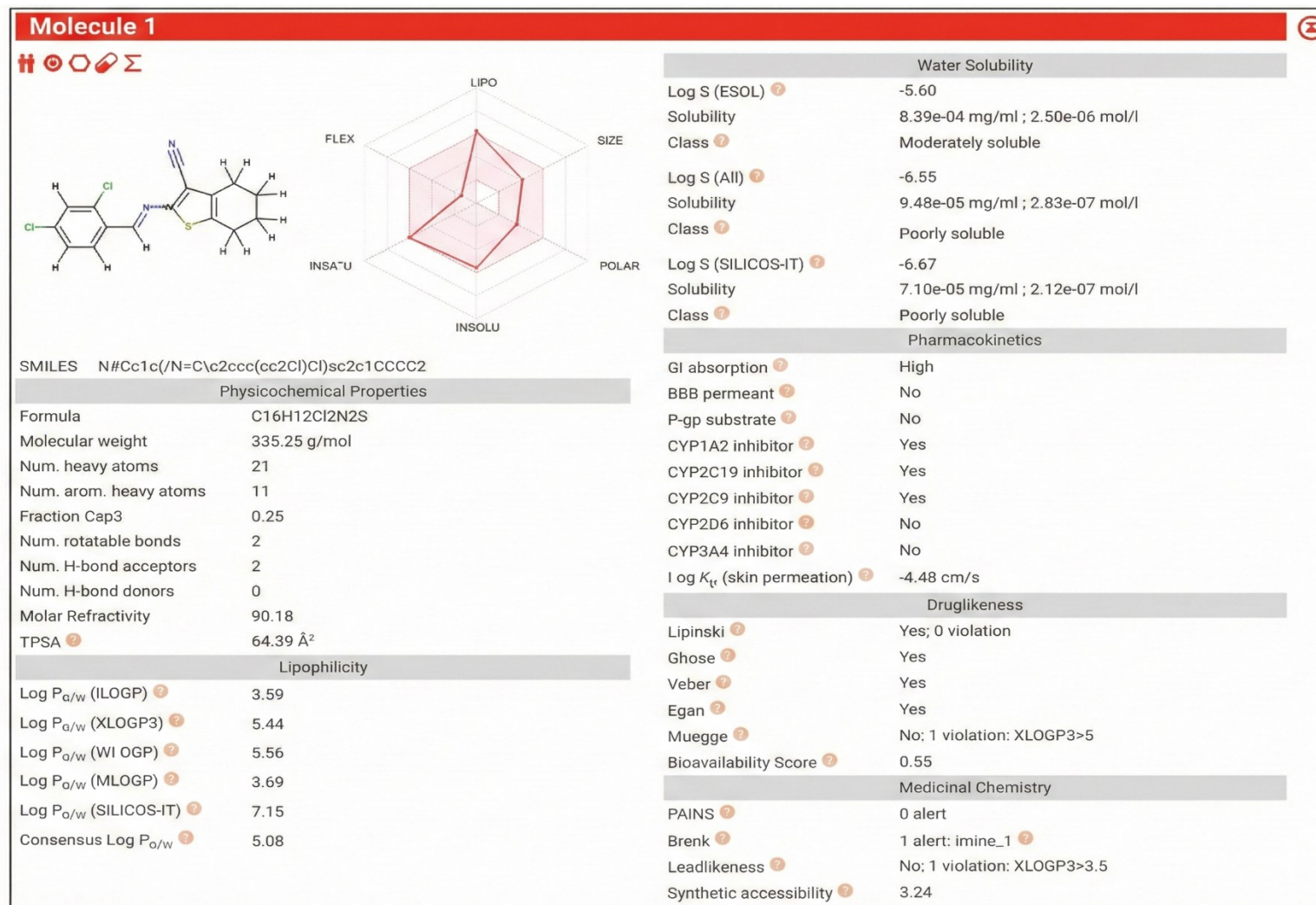


Figura 12. Predição *in silico* do perfil farmacocinético por meio da plataforma SwissADME.

A predição do perfil toxicológico foi realizada utilizando a plataforma OSIRIS Property Explorer, a qual avalia riscos toxicológicos com base em alertas estruturais e modelos QSAR (Quantitative Structure-Activity Relationship). Por meio dessa ferramenta, foi possível analisar parâmetros como mutagenicidade, tumorigenicidade, toxicidade reprodutiva e potencial irritante. Esses *endpoints* são considerados de elevada relevância na toxicologia regulatória e nos estudos não clínicos, conforme diretrizes estabelecidas pela ANVISA (2013).

Nesta análise, não foi observado qualquer grau de toxicidade associado ao derivado tiofênico para os parâmetros avaliados pelo software (Figura 13).

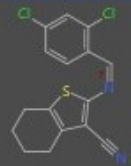
	Structure	Molecule Name	Mutagenic	Tumorigenic	Reproductive Effective	Irritant
1		M0001	none	none	none	none

Figura 13. Predição *in silico* do perfil toxicológico do composto por meio da plataforma OSIRIS Property Explorer.

Em associação, foi aplicada uma segunda ferramenta preditiva, a plataforma StopTox. Nessa análise, foram considerados exclusivamente os *endpoints* relacionados à via de administração oral, incluindo toxicidade oral aguda (DL₅₀) e toxicidade sistêmica. Essa abordagem foi adotada com o objetivo de garantir coerência entre o modelo computacional e a via de administração empregada posteriormente nas metodologias *in vivo*. Em consonância com os resultados obtidos anteriormente, o derivado tiofênico demonstrou perfil não tóxico para administração oral aguda, apresentando nível de confiança preditiva de 53% (Figura 14). Este dado corrobora com resultados de experimentos prévios realizados por nosso grupo, cuja DL₅₀ oral estimada foi superior a 2000 mg/kg (dados não mostrados).

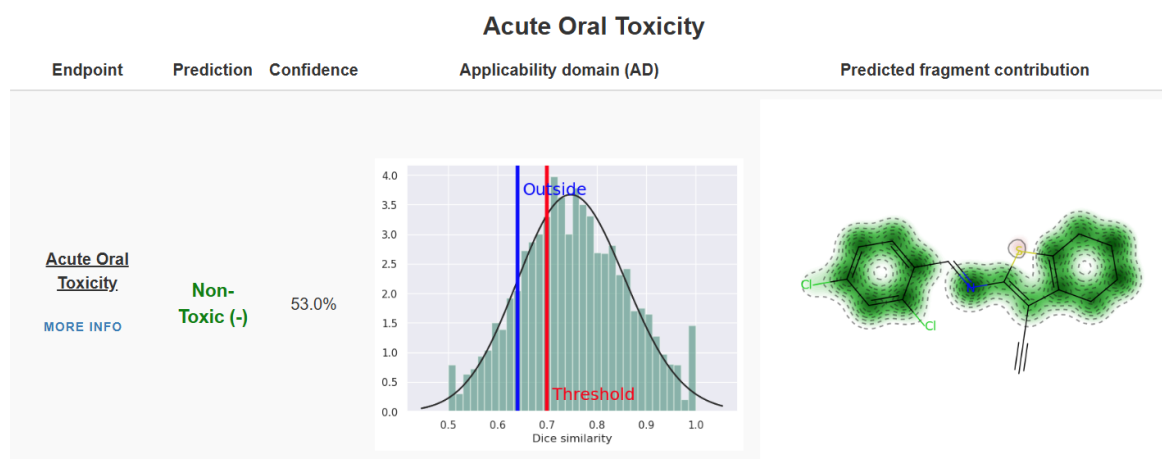
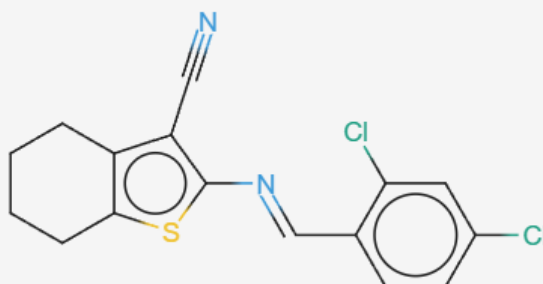


Figura 14. Avaliação *in silico* do perfil toxicológico por modelagem computacional (StopTox).

A avaliação do perfil farmacocinético e toxicológico foi ainda complementada por meio da plataforma pkCSM, a qual emprega modelos QSAR (Quantitative Structure-Activity Relationship), baseados na estrutura molecular para a predição de parâmetros relacionados à absorção, distribuição, metabolismo e excreção, além de estimar *endpoints* toxicológicos a partir de dados logarítmicos e categóricos. Essa análise permitiu uma abordagem integrada do perfil de segurança do composto, reforçando os achados *in silico* previamente realizados (figura 15).

Molecule Depiction



SMILES

Molecule properties:

Descriptor	Value
Molecular Weight	335.259
LogP	5.55598
#Rotatable Bonds	2
#Acceptors	3
#Donors	0
Surface Area	137.207

Property	Model Name	Predicted Value	Unit
Absorption	Water solubility	-6.831	Numeric (log mol/L)
Absorption	Caco2 permeability	1.47	Numeric (log Papp in 10 ⁻⁶ cm/s)
Absorption	Intestinal absorption (human)	92.485	Numeric (% Absorbed)
Absorption	Skin Permeability	-2.3	Numeric (log Kp)
Absorption	P-glycoprotein substrate	No	Categorical (Yes/No)
Absorption	P-glycoprotein I inhibitor	Yes	Categorical (Yes/No)
Absorption	P-glycoprotein II inhibitor	No	Categorical (Yes/No)

Distribution	VDss (human)	0.953	Numeric (log L/kg)
Distribution	Fraction unbound (human)	0	Numeric (Fu)
Distribution	BBB permeability	0.106	Numeric (log BB)
Distribution	CNS permeability	-1.204	Numeric (log PS)
Metabolism	CYP2D6 substrate	No	Categorical (Yes/No)
Metabolism	CYP3A4 substrate	Yes	Categorical (Yes/No)
Metabolism	CYP1A2 inhibitor	Yes	Categorical (Yes/No)
Metabolism	CYP2C19 inhibitor	Yes	Categorical (Yes/No)
Metabolism	CYP2C9 inhibitor	Yes	Categorical (Yes/No)
Metabolism	CYP2D6 inhibitor	No	Categorical (Yes/No)
Metabolism	CYP3A4 inhibitor	No	Categorical (Yes/No)
Excretion	Total Clearance	-0.019	Numeric (log ml/min/kg)
Excretion	Renal OCT2 substrate	No	Categorical (Yes/No)

Toxicity	AMES toxicity	No	Categorical (Yes/No)
Toxicity	Max. tolerated dose (human)	0.205	Numeric (log mg/kg/day)
Toxicity	hERG I inhibitor	No	Categorical (Yes/No)
Toxicity	hERG II inhibitor	No	Categorical (Yes/No)
Toxicity	Oral Rat Acute Toxicity (LD50)	2.605	Numeric (mol/kg)
Toxicity	Oral Rat Chronic Toxicity (LOAEL)	0.722	Numeric (log mg/kg_bw/day)
Toxicity	Hepatotoxicity	No	Categorical (Yes/No)
Toxicity	Skin Sensitisation	No	Categorical (Yes/No)
Toxicity	<i>T.Pyriformis</i> toxicity	2.689	Numeric (log ug/L)
Toxicity	Minnow toxicity	-1.845	Numeric (log mM)

Figura 15. Predição *in silico* das propriedades de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (ADMET) do composto em estudo, realizada por meio da plataforma pkCSM, baseada em modelagem computacional (QSAR) dependente da estrutura molecular.

Posteriormente o composto sintético 2-((2,4-diclorobenzilideno)amino)-4,5,6,7-tetrahidrobenzeno[b]tiofeno-3-carbonitrila (6CN07) foi submetido à triagem virtual por simulação de *docking* molecular com os moléculas-alvo envolvidas na neurobiologia dos

transtornos de ansiedade. Os resultados da simulação de *docking* molecular podem ser visualizados na Tabela 01.

Tabela 1. *Moldock Scores* e RMSD dos diferentes complexos formados no *Docking* Molecular.

Alvo	PDB ID	Ligantes	MolDock	RMSD
Receptor de serotonina 1A (5-HT _{1A})	8FYX	6CN07	-88.63	0.20
		WAY-100635	-133.67	
		Buspirona	-131.75	
Receptor de Serotonina 2A (5-HT _{2A})	9LL8	6CN07	-89.57	0.20
		Buspirona	-102.34	
		Cetanserina	-100.70	
Transportador Vesicular de Monoaminas 2 (VMAT ₂)	8JT9	6CN07	-87.92	0.20
		Cetanserina	-112.303	
		Psilocina	-85.25	
Receptor de GABA Tipo A (GABA _A)	6X3X	6CN07	-52.32	0.24
		Diazepam	-67.19	

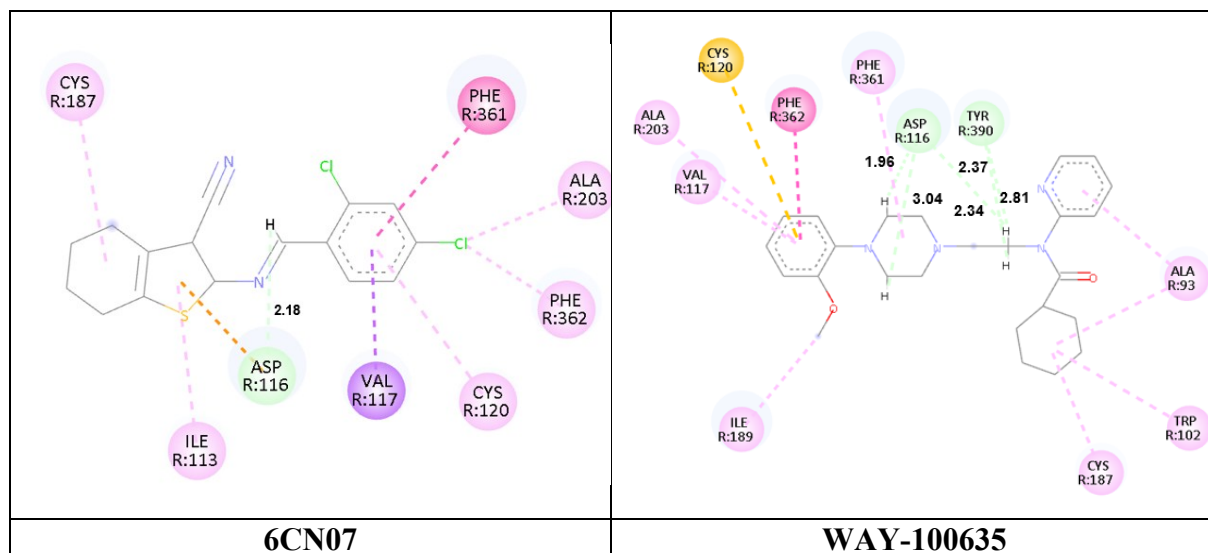
Previamente à realização das simulações de *docking* molecular, foi executado o procedimento de *redocking*, com a finalidade de avaliar a reprodutibilidade do algoritmo de cálculo *MolDock Score* e validar os alvos biológicos investigados. A análise dos resultados, baseada na métrica de *Root Mean Square Deviation* (RMSD), revelou valores inferiores a 2Å, corroborando a robustez, a confiabilidade e a adequação da metodologia empregada.

Em relação aos valores de afinidade dos complexos formados entre o 6CN07 e os alvos biológicos avaliados, observou-se que o composto teste apresentou valores de score negativos em todos os sistemas analisados, indicando probabilidade favorável de formação de complexos estáveis com os alvos escolhidos. Para receptores GABA_A (PDB: 6X3X) e 5-HT_{2A} (PDB: 9LL8), verificou-se que o complexo envolvendo o composto 6CN07 apresentou maior afinidade de ligação quando comparado aos respectivos fármacos padrão. No receptor GABA_A, foram obtidos scores de -52,32 para o 6CN07 e -67,19 para o diazepam. No receptor de serotonina 5-HT_{2A} (PDB: 9LL8), foi observado que o complexo formado com o derivado

tiofeno 6CN07 apresentou score de -89.57, para a fármaco bupiriona foi -102.34, para o antagonista Cetanserina -100.70 e para o ligante co-cristalizado Psilocina -85.25. No alvo Receptor de serotonina 1A (5-HT_{1A}) (PDB: 8FYX), o controle WAY-100635 apresentou a maior afinidade de ligação (-133,67), seguido pelo ligante co-cristalizado bupiriona (-131,75) e pelo composto teste 6CN07 (-88,63). Já no alvo Transportador Vesicular de Monoaminas 2 (VMAT₂) (PDB: 8JT9), o ligante co-cristalizado cetanserina exibiu a maior afinidade de ligação (-112,30), ao passo que o complexo formado com o derivado tiofênico 6CN07 apresentou score de -87,92.

Ressalta-se que os valores de score obtidos nas simulações de *docking* molecular correspondem a estimativas teóricas de afinidade e a modos de ligação putativos, representando previsões computacionais que requerem validação experimental adicional (WANG et al., 2002). Na seção seguinte são demonstrados os mapas de interação molecular estabelecidos entre os complexos referentes ao composto controle 6CN07 e aos alvos em estudo.

As Figuras 16 e 17 demonstram os mapas de interações 2D e 3D estabelecidas pelos complexos referentes ao 6CN07, composto controle WAY-100635 e ligante co-cristalizado Bupiriona com o receptor 5-HT_{1A} (PDB: 8FYX).



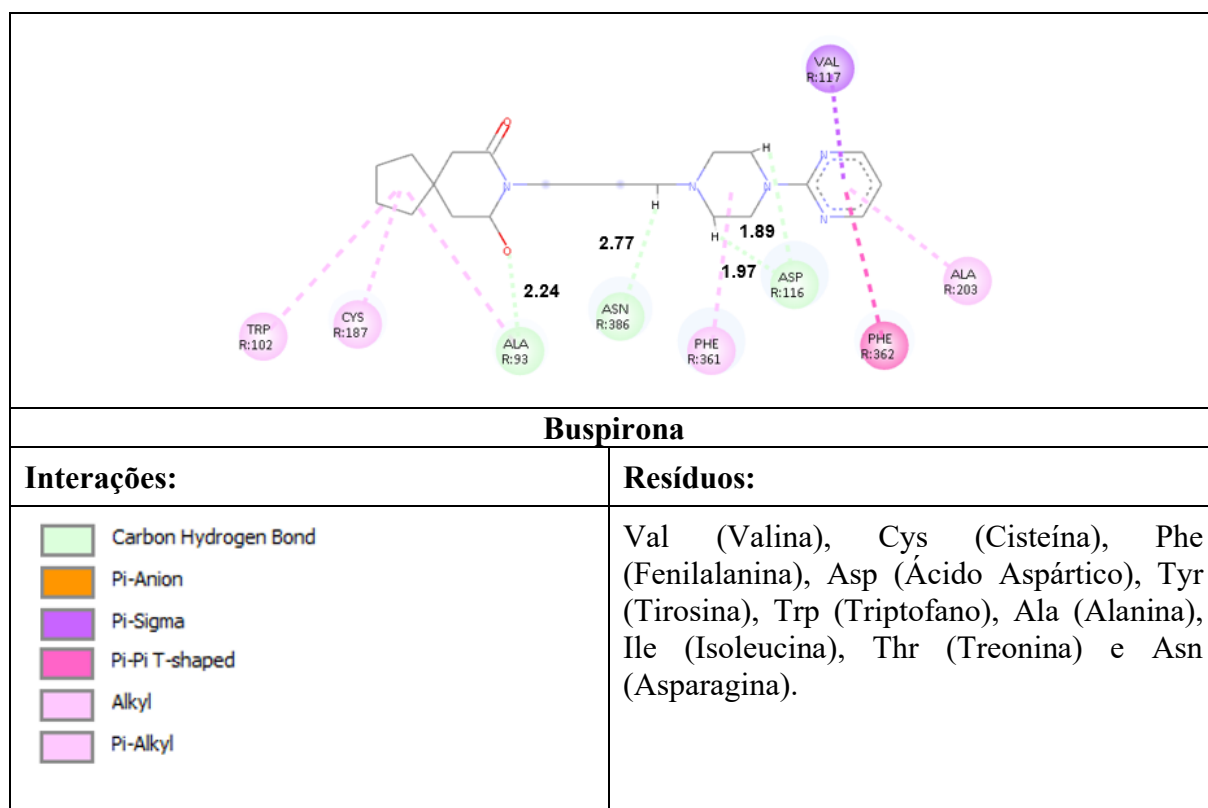


Figura 16. Mapas de interação molecular 2D dos complexos formados com o alvo Receptor de serotonina 1A (5-HT1A) (PDB: 8FYX).

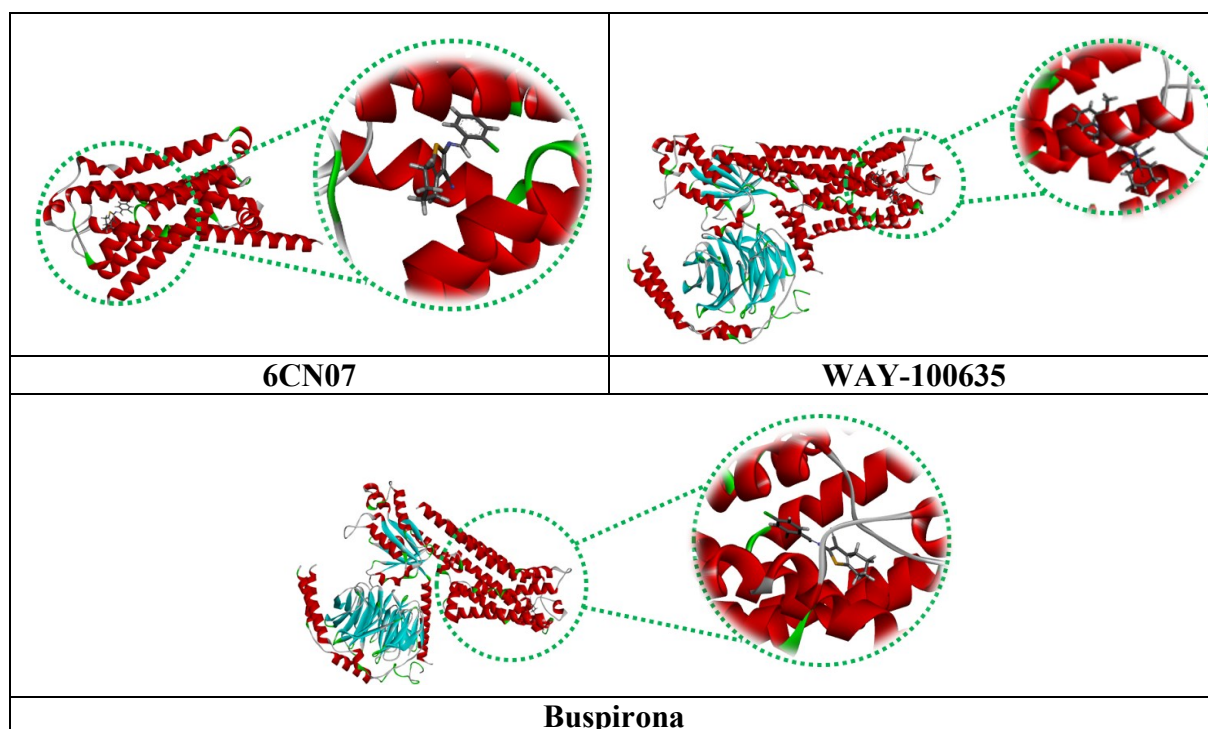


Figura 17. Mapas de interação molecular 3D dos complexos formados com o alvo Receptor de serotonina 1A (5-HT1A) (PDB: 8FYX).

A análise dos mapas de interação molecular em 2D revelou que os complexos referentes ao derivado 6CN07, o composto controle WAY-100635 e o ligante co-cristalizado buspirona interagem de maneira consistente com resíduos-chave do sítio de ligação do receptor 5-HT_{1A} acoplado à proteína Gi (PDB: 8FYX).

Para o complexo do composto 6CN07, foram observadas interações hidrofóbicas. Interações do tipo π -alquila foram vistas com os resíduos Ile113, Cys187, Ala203 e Cys120, consideradas interações críticas para a estabilização do ligante no sítio ativo. Além disso, o composto apresentou uma interação de hidrogênio convencional por meio do resíduo Asp116, com distâncias aproximadas de 2,18 Å. Interações adicionais do tipo empilhamento π - π com Phe361 e Phe362, interação π -sigma com Val117 e uma interação do tipo π -enxofre entre Asp116 e o enxofre do anel tiofeno.

O complexo formado pelo composto controle WAY-100635 apresentou um padrão de interação semelhante ao observado no composto 6CN07, estabelecendo interações do tipo carbono-hidrogênio por meio dos resíduos Asp116 e Tyr390, com distâncias variando entre 1,89 e 3,04 Å. O ligante também formou interações π - π em forma de T com resíduos aromáticos como Phe362 interações hidrofóbicas do tipo alquila com Ile189 e π -alquila com Trp102, Cys187, Ala93, Phe361, Ala203, Val117, também sendo observada uma interação do tipo pi-sulfur por meio do resíduo Cys120, indicando um modo de ligação compatível com antagonistas clássicos do receptor 5-HT_{1A} (WARREN et al., 2024).

Já o ligante co-cristalizado buspirona (C) apresentou interações estabilizadoras importantes, incluindo interações do tipo carbono-hidrogênio convencionais com Asp116, Ala93 e Asn386, com distâncias de aproximadamente 1,89 a 2,24 Å. Também foram observadas interações π - σ e π - π em forma de T com os resíduos aromáticos Val117 e Phe362, além de interações hidrofóbicas do tipo π -alquila com Trp102, Cys187, Phe361, Ala203 e Ala93, reforçando a relevância desses resíduos para o reconhecimento molecular no sítio ativo (ZLATOVIC et al, 2006). De modo geral, os três complexos compartilham interações críticas com resíduos aromáticos e hidrofóbicos do receptor, especialmente Trp102, Cys187 e Ala93, sugerindo que o composto 6CN07 apresenta um modo de ligação comparável ao do controle positivo e do ligante co-cristalizado, com potencial afinidade pelo receptor 5-HT_{1A}.

As Figuras 18 e 19 demonstram os mapas de interações 2D e 3D estabelecidas pelos complexos referentes ao 6CN07, Buspirona, cetanserina e ligante co-cristalizado Psilocina (91Q) com o alvo Receptor de Serotonina 2A (5-HT_{2A}) (PDB: 9LL8).

6CN07	Buspirona
Cetanserina	Psilocina
Interações:	Resíduos:
- Conventional Hydrogen Bond - Carbon Hydrogen Bond - Halogen (Cl, Br, I) - Pi-Anion - Pi-Sulfur - Pi-Pi Stacked - Pi-Pi T-shaped - Alkyl - Pi-Alkyl	Tyr (Tirosina), Val (Valina), Phe (Fenilalanina), Trp (Triptofano), Ile (Isoleucina), Ser (Serina), Asp (Ácido Aspártico), Gly (Glicina), Asn (Asparagina) e Leu (Leucina).

Figura 18. Mapas de interação molecular 2D dos complexos formados com o alvo Receptor de Serotonina 2A (5-HT_{2A}) (PDB: 9LL8).

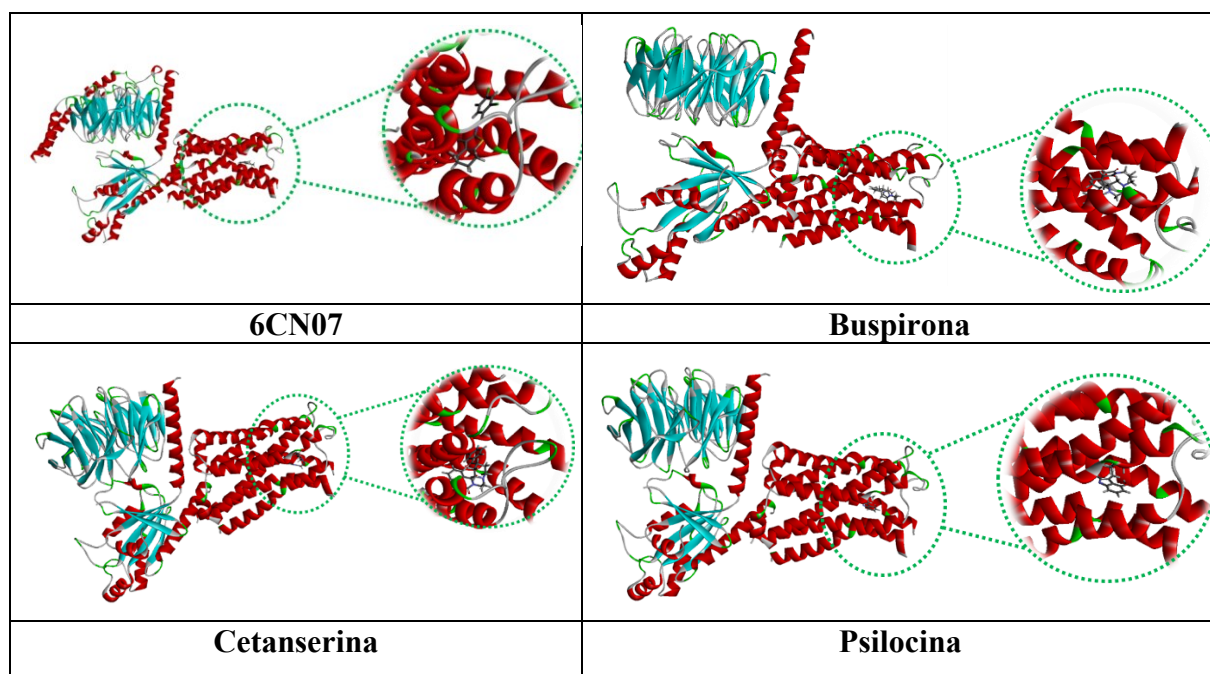


Figura 19. Mapas de interação molecular 3D dos complexos formados com o alvo Receptor de Serotonina 2A (5-HT_{2A}) (PDB: 9LL8).

O complexo referente ao composto 6CN07 apresentou como interações mais relevantes as ligações de hidrogênio com os resíduos Thr160 (2.40 Å) e Ser159 (2.60 Å), ambas através do grupamento nitrila do derivado. Além disso, destacam-se as interações hidrofóbicas do tipo π -alquila com Val156, Phe234, Phe340 e Val366, além de uma interação tipo alquila com o resíduo Tyr370 com o átomo de cloro. Adicionalmente, observa-se uma interação do tipo π -sulfur estabelecida pelo aminoácido Phe339 contribuindo para a estabilização do ligante no sítio e uma interação do tipo π -aniônica do resíduo Asp155 com o anel aromático.

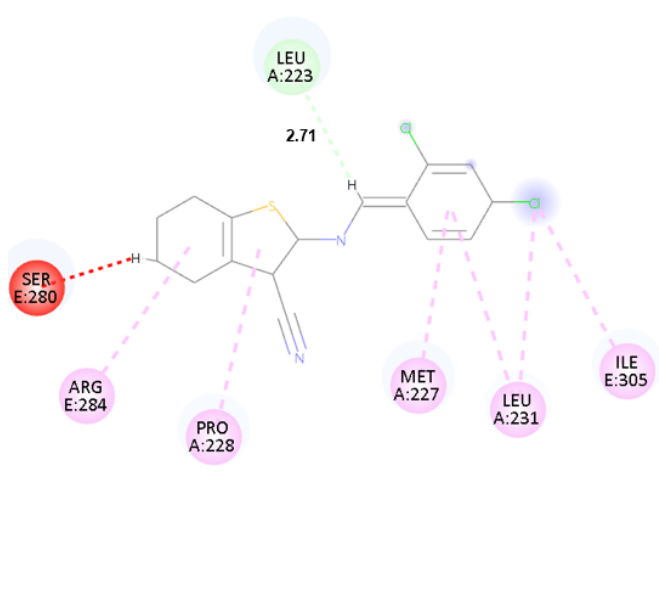
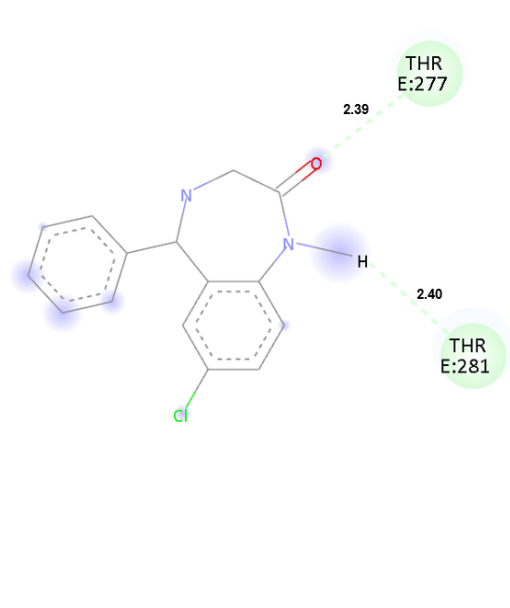
No complexo do composto bupropiona, observa-se um padrão de interações mais polar, com interações de hidrogênio importantes envolvendo o resíduo Asn343 (3.02 Å) e interações do tipo carbono-hidrogênio por meio dos resíduos Asp155 (2,24 Å e 2,46 Å), Gly238 (2,64 Å), Phe234 (2.51 Å) e Val366 (2,45 Å). A bupropiona também estabeleceu contatos hidrofóbicos do tipo alquila e π -alquila com resíduos como Phe339, Leu229, Val156 e Val366, como também foi observada uma interação do tipo π -ânion por meio do resíduo Asp155, indicando uma combinação de interações polares e hidrofóbicas para estabilização no sítio de ligação.

No complexo referente à cetanserina, observa-se a formação de interações de hidrogênio com os resíduos Asp155, com distâncias de 2,26 Å e 2,56 Å e uma interação por meio do resíduo Ser159 (3.01), além de interações hidrofóbicas do tipo π -alquila com os resíduos Trp336, Phe339, Tyr370, Val156 e Val366, além de duas interações do tipo π - π empilhado e π - π em

forma de T por meio dos resíduos Phe340 e Phe234. Também é observada uma interação do tipo π -sigma com Val156 e um contato adicional do tipo π -ânion com Asp155, sugerindo um modo de ligação estabilizado principalmente por contatos hidrofóbicos associados a interações polares específicas.

Por fim, o complexo do ligante co-cristalizado psilocina apresentou uma ligação de hidrogênio com Ser242 (2,67 Å), além de interações adicionais do tipo carbono-hidrogênio com Asp155 (2,41 Å, 2,42 Å e 2,71 Å). Também foram observadas interações hidrofóbicas do tipo π -alquila com Val156 e π - π em forma de T por meio do resíduo Phe340. De maneira geral, a figura evidencia que o composto 6CN07 compartilha interações importantes com o alvo, especialmente a ligação de hidrogênio convencional com Ser242 e contatos hidrofóbicos do tipo π -alquila com Val156, resíduo visualizado em todos os complexos em estudo, sugerindo um modo de ligação compatível com o sítio ativo (XU et al., 2026).

As Figuras 20 e 21 demonstram os mapas de interações 2D e 3D estabelecidas pelos complexos referentes ao composto teste derivado tiofeno 6CN07 e ligante co-cristalizado Diazepam com o alvo Receptor de GABA Tipo A (GABA_A) (PDB: 6X3X).

	
6CN07	Diazepam
Interações:	Resíduos:

 Unfavorable Bump  Carbon Hydrogen Bond  Alkyl  Pi-Alkyl	Arg (Arginina), Asp (Ácido Aspártico), Phe (Fenilalanina), Thr (Treonina) e Ser (Serina).
---	---

Figura 20. Mapas de interação molecular 2D dos complexos formados com o alvo Receptor de GABA Tipo A (GABA_A) (PDB: 6X3X).

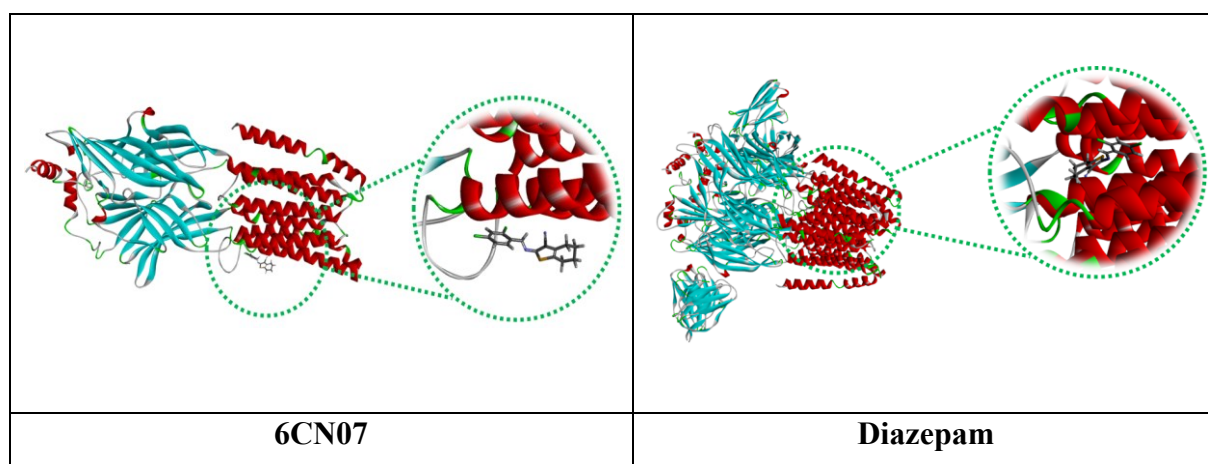


Figura 21. Mapas de interação molecular 3D dos complexos formados com o alvo Receptor de GABA Tipo A (GABA_A) (PDB: 6X3X).

A análise dos mapas de interação molecular em 2D dos complexos formados pelo composto 6CN07 e pelo ligante co-cristalizado diazepam com o receptor humano GABA_A subtipo $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ (PDB: 6X3X) revelou padrões de interação distintos, sugerindo modos de ligação diferentes no sítio avaliado.

Para o composto 6CN07, a análise do *docking* revelou uma interação de hidrogênio entre o resíduo Leu223 (2.71 Å) e o grupamento imina do derivado. Interações hidrofóbicas do tipo π -alquila foram observadas com os resíduos Pro228, Met227, Leu231 e Ile305, além de uma interação tipo alquila com o resíduo Arg284. Ademais, observou-se uma interação “*unfavorable donor-donor*” com o resíduo Ser280.

Em contraste, o ligante co-cristalizado diazepam (B) apresentou um padrão de interação caracterizado predominantemente por interações do tipo carbono-hidrogênio com os resíduos Thr277 (2.39 Å) e Thr281 (2.40 Å). O modo de ligação do diazepam é compatível com sua interação conhecida no sítio benzodiazepínico alostérico do receptor GABA_A (KIM et al., 2020). De forma geral, não foram observadas semelhanças relevantes no padrão de interação

molecular entre os complexos formados pelo composto 6CN07 e pelo diazepam, indicando modos de ligação distintos no receptor GABA_A $\alpha 1\beta 2\gamma 2$.

Por fim, as Figuras 22 e 23 demonstram os mapas de interações 2D e 3D estabelecidas pelos complexos referentes ao composto teste, o derivado tiofeno 6CN07, e ligante co-cristalizado Cetanserina com o Transportador Vesicular de Monoaminas 2 (VMAT₂) (PDB: 8JT9).

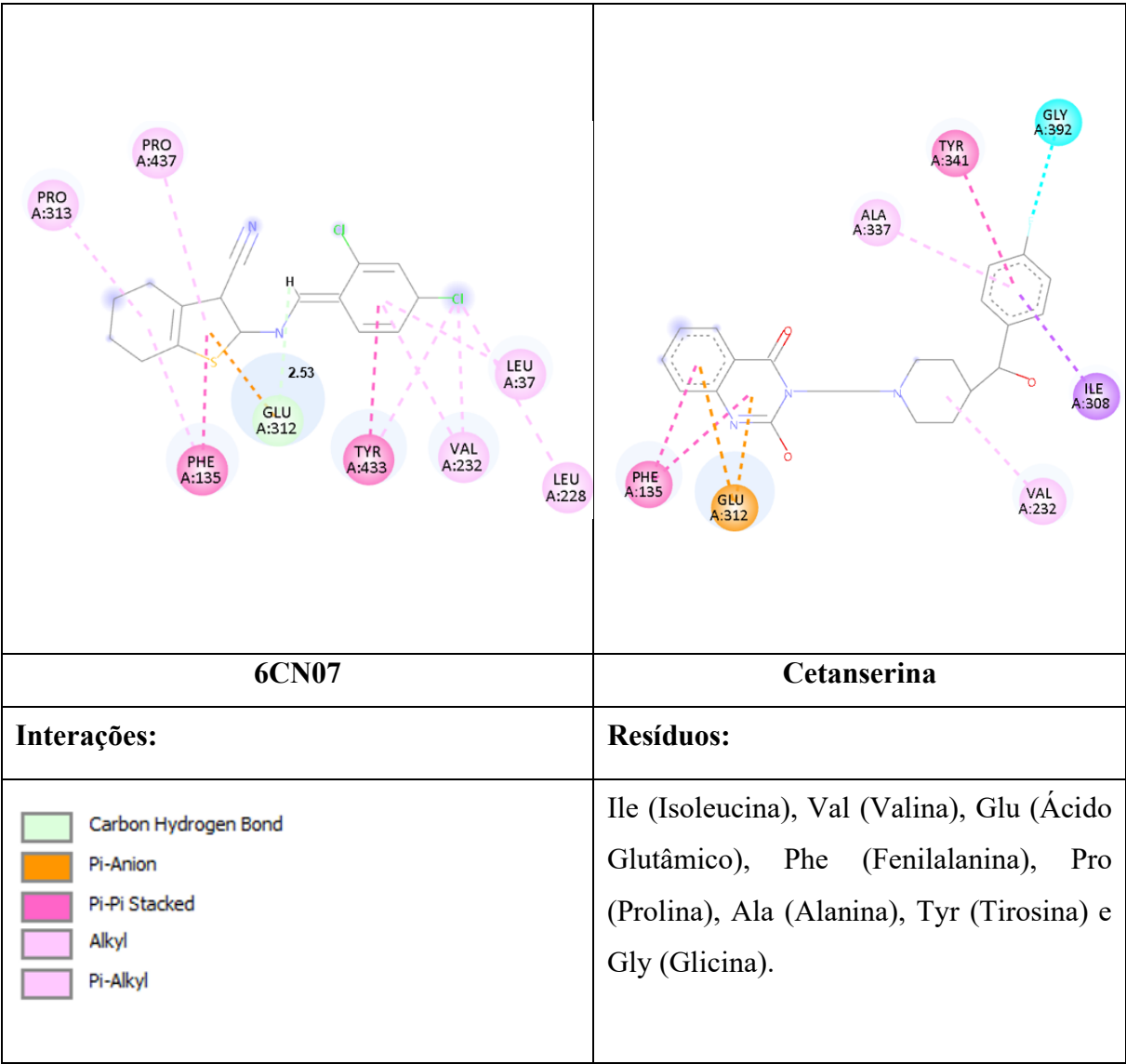


Figura 22. Mapas de interação molecular 2D dos complexos formados com o alvo Transportador Vesicular de Monoaminas 2 (VMAT₂) (PDB: 8JT9).

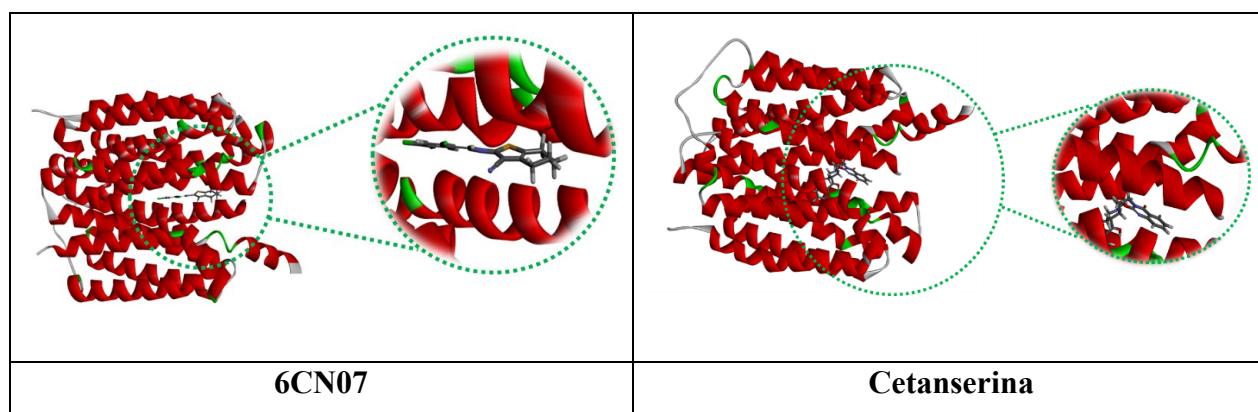


Figura 23. Mapas de interação molecular 3D dos complexos formados com o alvo Transportador Vesicular de Monoaminas 2 (VMAT2) (PDB: 8JT9).

A análise dos mapas de interação molecular em 2D dos complexos formados pelo composto 6CN07 e pelo ligante co-cristalizado ketanserina com o alvo transportador vesicular de monoaminas 2 humano (VMAT₂) (PDB: 8JT9) evidenciou interações hidrofóbicas e eletrostáticas relevantes para a estabilização dos complexos no sítio de ligação.

Para o complexo referente ao composto 6CN07, observou-se uma ligação de hidrogênio com o resíduo Glu312 (2,53 Å) com o grupo imina do derivado. Adicionalmente, esse mesmo resíduo estabeleceu interação do tipo π -enxofre com o átomo de enxofre do anel tiofeno. Além disso, interações do tipo π -alquila foram observadas com os resíduos Pro437, Val232, Leu37 e Leu228, considerada crítica para a ancoragem hidrofóbica do ligante, além de uma interação do tipo π - π com o resíduo Tyr433.

O complexo do ligante co-cristalizado cetanserina apresentou um padrão de interação consistente com o observado experimentalmente, formando uma interação π -ânion com o resíduo Glu312, semelhante à observada para o composto 6CN07, sugerindo um modo de ligação conservado. Além disso, foram observadas interações π - π empilhadas, π -alquila e π -sigma com Phe135, Ala337, Val232, Tyr341 e Ile308, contribuindo para a estabilização hidrofóbica do complexo. Interações adicionais do tipo halogênio com resíduos polares e aromáticos, como Gly392, também foram identificadas, reforçando a afinidade do ligante pelo sítio de ligação do transportador VMAT2 (WU et al., 2024).

De forma geral, ambos os complexos compartilham interações críticas com os resíduos Val232 e Glu312, destacando-se a interação π -alquila com Val232 e a interação π -ânion com Glu312 como determinantes para o reconhecimento molecular.

7.2 Metodologias *in vivo*

No labirinto em cruz elevado foram analisados os seguintes parâmetros comportamentais: número de entradas nos braços abertos (NEBA) e o tempo de permanência nos braços abertos (TPBA). A figura 24 representa o efeito do tratamento oral com o composto 6CN07 (25, 50, 100 e 200 mg/kg) sobre o NEBA.

Na figura é possível observar que o DZP 1 mg/kg ($11,7 \pm 1,4$) aumentou significativamente o NEBA em 88,6%, quando comparado ao grupo veículo ($1,3 \pm 0,4$). De forma semelhante, o 6CN07 nas doses de 25, 50, 100 e 200 mg/kg ($4,3 \pm 0,2$; $7,8 \pm 0,5$; $5,0 \pm 1,1$; $5,7 \pm 0,9$, respectivamente) aumentou significativamente o NEBA em 69,3%, 83,1%, 73,4% e 76,5%, respectivamente, quando comparado ao grupo veículo ($1,3 \pm 0,4$). Além disso, não houve diferença significativa entre as doses do derivado aminotiofênico.

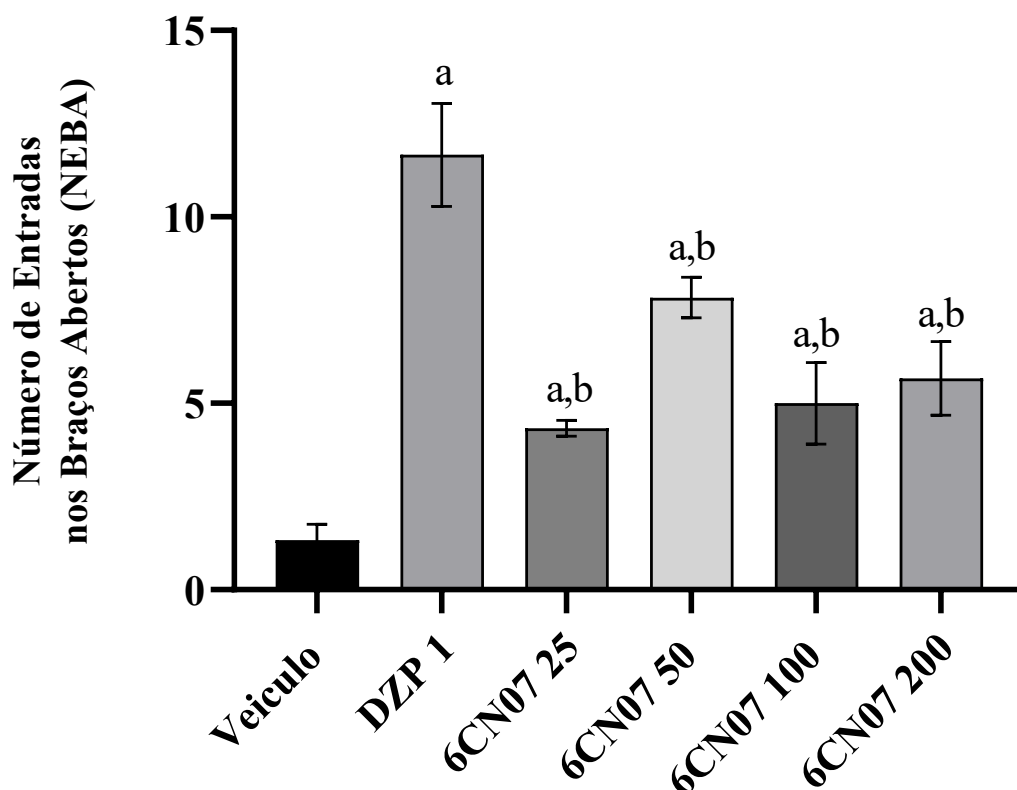


Figura 24. Efeito do 6CN07 sobre o NEBA no teste Labirinto em Cruz Elevado (LCE).

As colunas representam a média $\pm$ erro padrão da média (EPM), analisados através da ANOVA seguido do pós-teste de *Tukey* (post hoc). Valores significativos: “a” e “b” vs “veículo”, DZP 1 quando $p < 0.05$. DZP 1 = Diazepam 1 mg/kg; 6CN07 = Derivado tiofênico 6CN07 25, 50, 100 e 200 mg/kg; NEBA = Número de Entradas nos Braços Abertos.

A figura 25 representa o efeito do tratamento oral com o composto 6CN07 (25, 50, 100 e 200 mg/kg) sobre o TPBA.

Na figura é possível observar que o DZP 1 mg/kg ($71,3 \pm 7,5$) aumentou significativamente o TPBA em 94,6%, quando comparado ao grupo veículo ($3,8 \pm 1,3$). De forma semelhante, o 6CN07 nas doses de 25, 50, 100 e 200 mg/kg ($38,6 \pm 9,7$; $69,8 \pm 4,3$; $40,1 \pm 14,6$; $37,8 \pm 6,8$, respectivamente) aumentou significativamente o TPBA em 90,1%, 94,5%, 90,5% e 89,9%, respectivamente, quando comparado ao grupo veículo ($1,3 \pm 0,4$). Além disso, não houve diferença significativa entre as doses do derivado aminotiofênico.

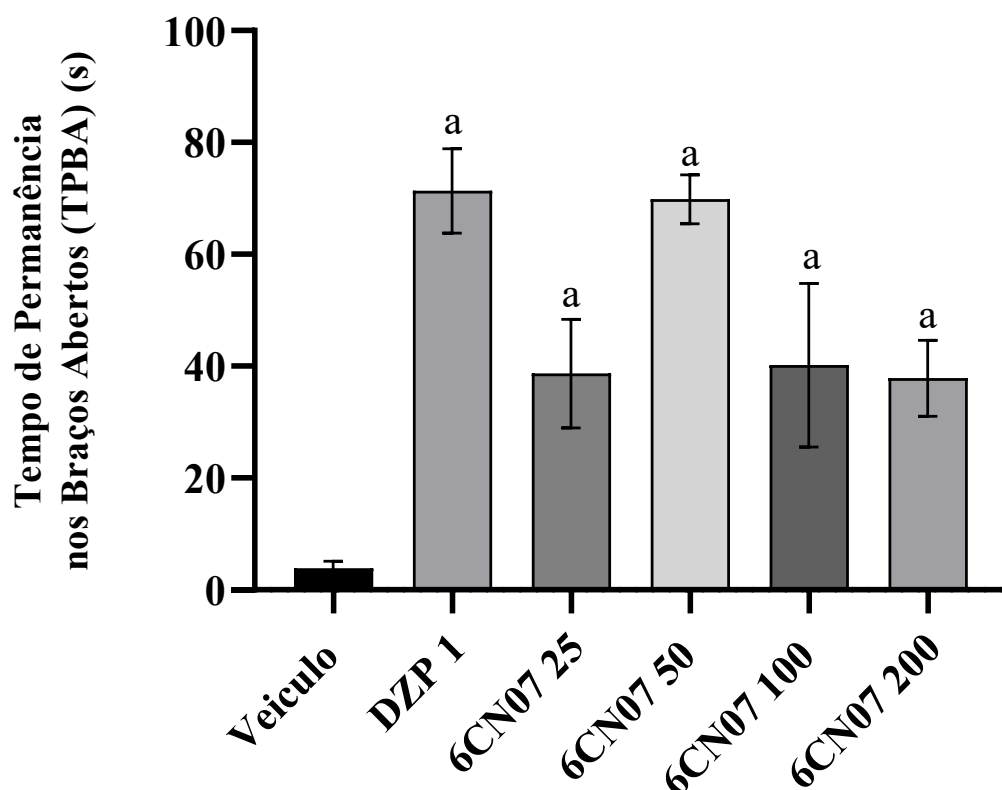


Figura 25. Efeito do 6CN07 sobre o TPBA no teste Labirinto em Cruz Elevado (LCE).

As colunas representam a média $\pm$ erro padrão da média (EPM), analisados através da ANOVA seguido do pós-teste de *Tukey* (post hoc). Valores significativos: “a” vs “veículo”, quando $p < 0.05$. DZP 1 = Diazepam 1 mg/kg; 6CN07 = Derivado tiofênico 6CN07 25, 50, 100 e 200 mg/kg; TPBA = Tempo de Permanência nos Braços Abertos, em segundos (s).

No teste campo aberto, os parâmetros analisados foram o número de cruzamentos totais (NCT), número de *rearing* (NR) e número de *grooming* (NG). A figura 26 representa o efeito do tratamento oral com o composto 6CN07 (25, 50, 100 e 200 mg/kg) sobre o NCT. Na figura é possível observar que o DZP 2 mg/kg ($140,2 \pm 1,4$) aumentou significativamente o NCT em 41,9%, quando comparado ao grupo veículo ($81,3 \pm 4,2$). De forma semelhante, o 6CN07 nas doses de 25, 50, 100 e 200 mg/kg ($115,3 \pm 8,0$; $117,3 \pm 9,7$; $107,5 \pm 3,9$; $115,5 \pm 8,8$, respectivamente) aumentou significativamente o NCT em 29,5%, 30,7%, 24,3% e 29,6%, respectivamente, quando comparado ao grupo veículo ($81,3 \pm 4,2$). Além disso, não houve diferença significativa entre as doses do derivado aminotiofênico.

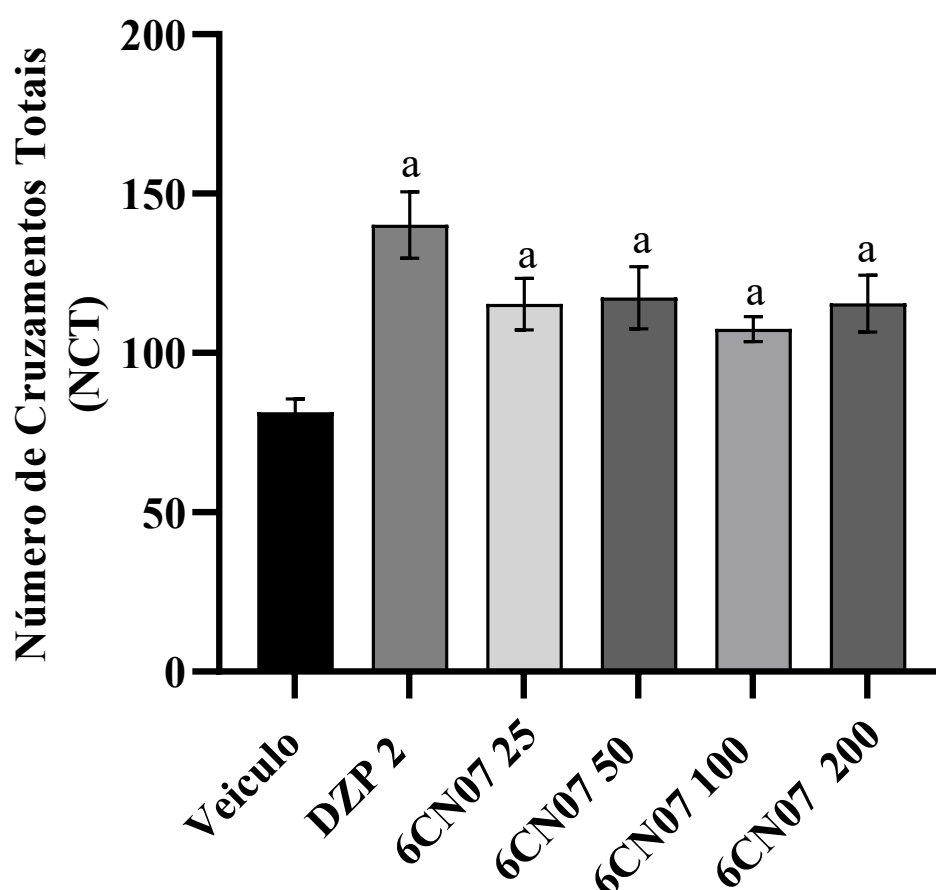


Figura 26. Efeito do 6CN07 sobre o NCT no teste Campo Aberto (CA).

As colunas representam a média ± erro padrão da média (EPM), analisados através da ANOVA seguido do pós-teste de *Tukey* (post hoc). Valores significativos: “a” vs “veículo”, quando $p < 0.05$. DZP 2 = Diazepam 2 mg/kg; 6CN07 = Derivado tiofênico 6CN07 25, 50, 100 e 200 mg/kg; NCT = Número de Cruzamentos Totais.

A figura 27 representa o efeito do tratamento oral com o composto 6CN07 (25, 50, 100 e 200 mg/kg) sobre o Número de *grooming* (NG). Na figura é possível observar que houve diferença significativa apenas no grupo 6CN07 50 e 100 mg/kg ($0,8 \pm 0,1$; $0,8 \pm 0,3$) em comparação ao grupo veículo ($2,0 \pm 0,3$). Em termos percentuais, é evidente que o 6CN07 50 e 100 mg/kg diminuíram ambos, aproximadamente, 58,4% o número de *grooming* dos animais quando comparado ao grupo veículo. Além disso, não houve diferença significativa entre as diferentes doses do derivado aminotiofênico.

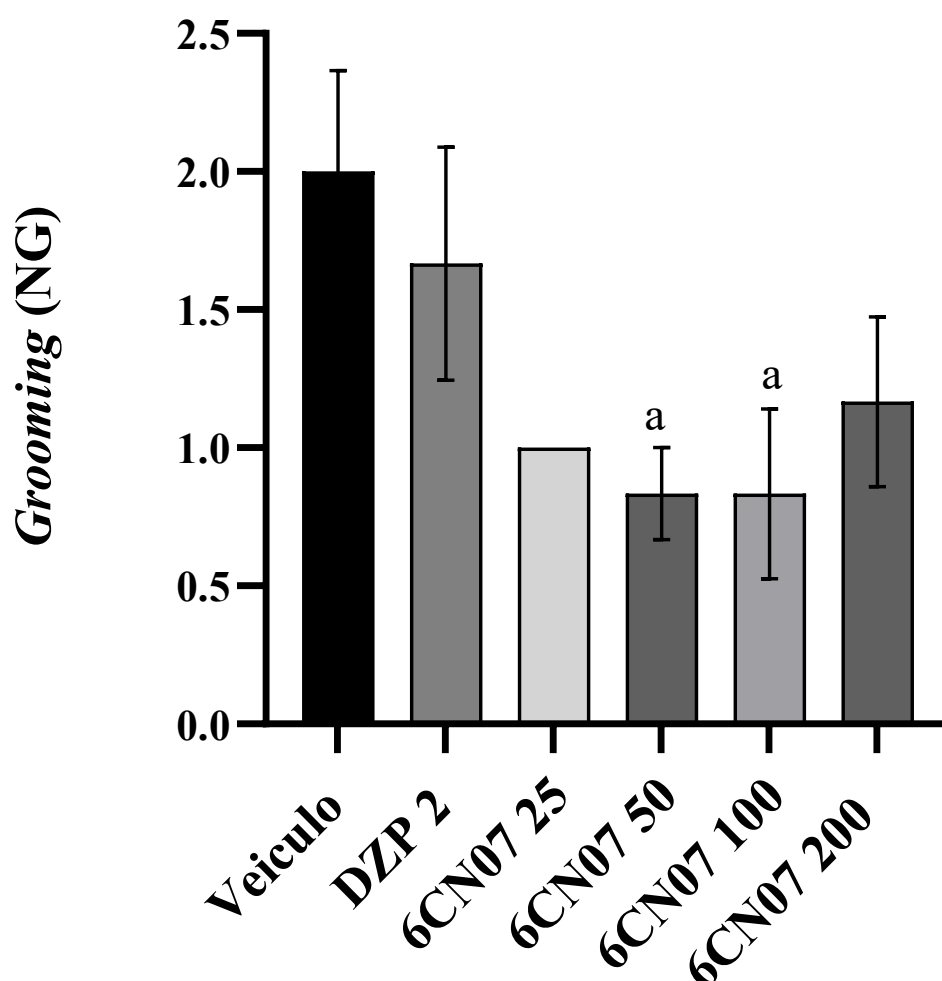


Figura 27. Efeito do 6CN07 sobre o NG no teste Campo Aberto (CA).

As colunas representam a média $\pm$ erro padrão da média (EPM), analisados através da ANOVA seguido do pós-teste de *Tukey* (post hoc). Valores significativos: “a” vs “veículo”, quando $p < 0.05$. DZP 2 = Diazepam 2 mg/kg; 6CN07 = Derivado tiofênico 6CN07 25, 50, 100 e 200 mg/kg; NG = Número de *Grooming*.

A figura 28 representa o efeito do tratamento oral com o composto 6CN07 (25, 50, 100 e 200 mg/kg) sobre o Número de *rearing* (NR). Na figura é possível observar que o DZP 2 mg/kg ($25,1 \pm 4,2$) aumentou significativamente o NR em 42,4%, quando comparado ao grupo veículo ($14,5 \pm 1,3$). De forma semelhante, o 6CN07 nas doses de 25, 50, 100 e 200 mg/kg ($24,0 \pm 3,1$; $22,3 \pm 2,2$; $26,3 \pm 0,5$; $37,3 \pm 2,1$, respectivamente) aumentou significativamente o NR em 39,6%, 35,1%, 44,9% e 61,2%, respectivamente, quando comparado ao grupo veículo ($81,3 \pm 4,2$). Além disso, não houve diferença significativa entre as doses do derivado aminotiofênico.

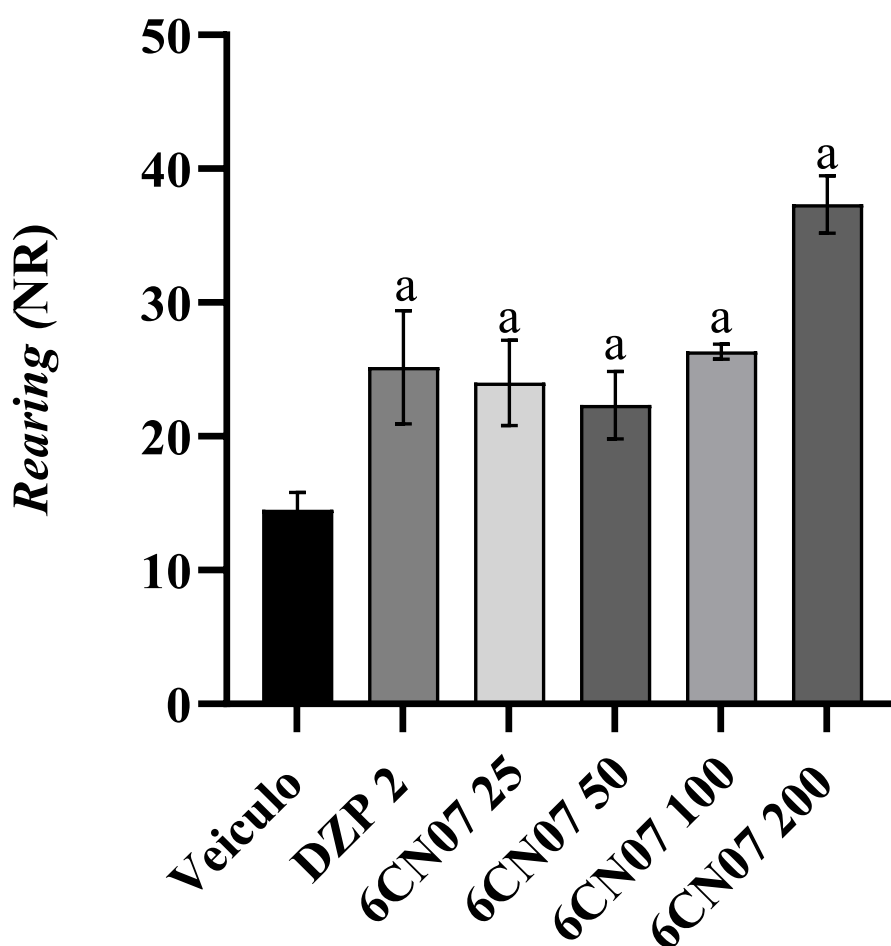


Figura 28. Efeito do 6CN07 sobre o NR no teste Campo Aberto (CA).

As colunas representam a média $\pm$ erro padrão da média (EPM), analisados através da ANOVA seguido do pós-teste de *Tukey* (post hoc). Valores significativos: “a” vs “veículo”, quando $p < 0.05$. DZP 2 = Diazepam 2 mg/kg; 6CN07 = Derivado tiofênico 6CN07 25, 50, 100 e 200 mg/kg; NR = Número de *Rearing*.

No teste do Rota Rod foram analisados os seguintes parâmetros comportamentais: número de quedas (NQ) e o tempo de permanência na barra giratória (TP). A figura 29 representa o efeito do tratamento oral com o composto 6CN07 (25, 50, 100 e 200 mg/kg) sobre o NQ. Na figura é possível observar que o DZP 4 mg/kg ($3,0 \pm 0,0$) aumentou significativamente o NQ em 100%, quando comparado ao grupo veículo ($0,2 \pm 0,2$). Ao contrário do diazepam, o 6CN07 nas doses de 25, 50, 100 e 200 mg/kg ($0,0 \pm 0,0$; $0,0 \pm 0,0$; $0,2 \pm 0,2$; $0,0 \pm 0,0$, respectivamente) não apresentou diferença significativa em relação ao grupo veículo.

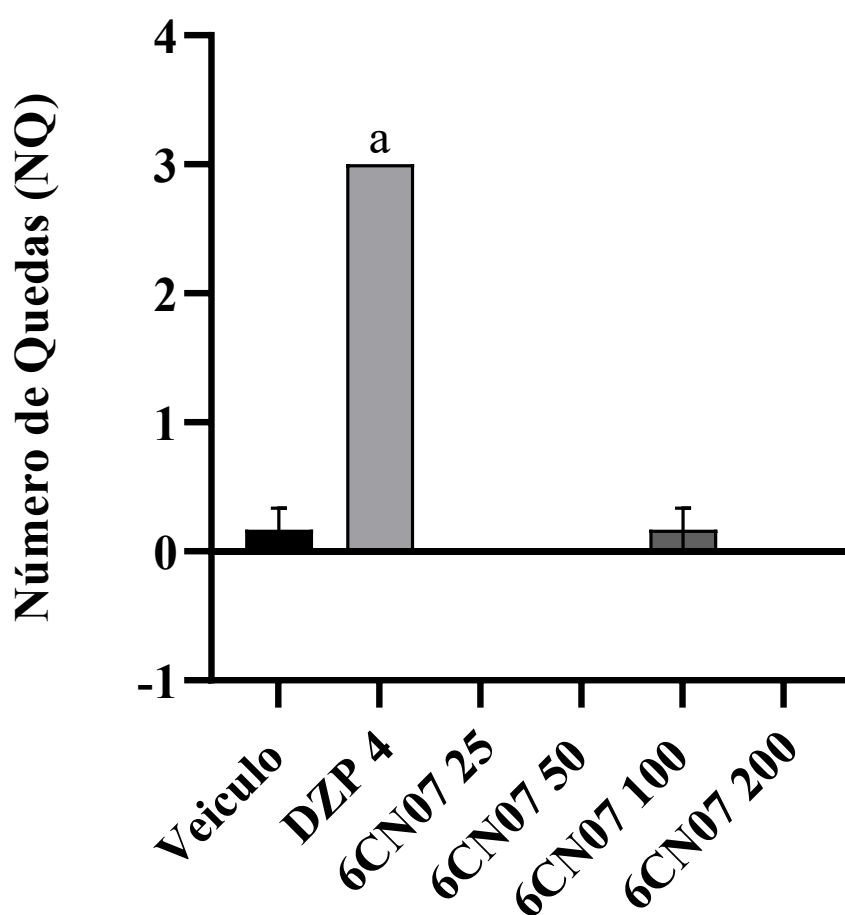


Figura 29. Efeito do 6CN07 sobre o NQ no teste Rota Rod (RR).

As colunas representam a média $\pm$ erro padrão da média (EPM), analisados através da ANOVA seguido do pós-teste de *Tukey* (post hoc). Valores significativos: “a” vs “veículo”, quando $p < 0.05$. DZP 4 = Diazepam 4 mg/kg; 6CN07 = Derivado tiofênico 6CN07 25, 50, 100 e 200 mg/kg; NQ = Número de Quedas.

A figura 30 representa o efeito do tratamento oral com o composto 6CN07 (25, 50, 100 e 200 mg/kg) sobre o TP. Na figura é possível observar que o DZP 4 mg/kg ($13,0 \pm 1,4$) diminuiu

significativamente o TP em 78,3%, quando comparado ao grupo veículo ($60,0 \pm 0,0$). Ao contrário do diazepam, o 6CN07 nas doses de 25, 50, 100 e 200 mg/kg ($60,0 \pm 0,0$; $60,0 \pm 0,0$; $60,0 \pm 0,0$; $60,0 \pm 0,0$, respectivamente) não apresentou diferença significativa em relação ao veículo.

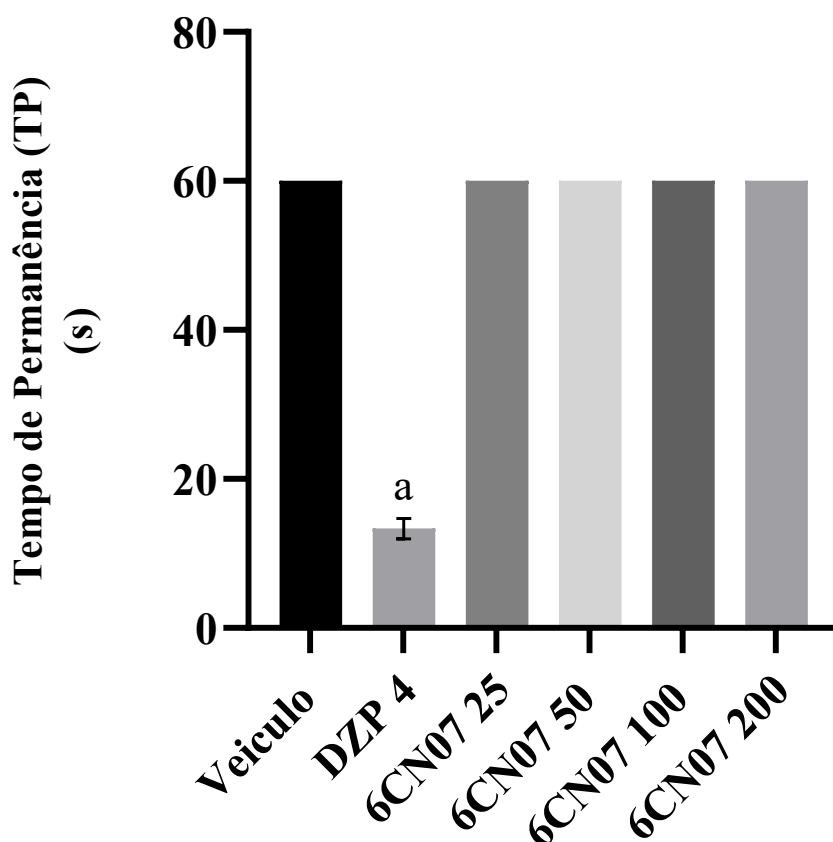


Figura 30. Efeito do 6CN07 sobre o TP no teste Rota Rod (RR).

As colunas representam a média $\pm$ erro padrão da média (EPM), analisados através da ANOVA seguido do pós-teste de *Tukey* (post hoc). Valores significativos: “a” vs “veículo”, quando $p < 0.05$. DZP 4 = Diazepam 4 mg/kg; 6CN07 = Derivado tiofênico 6CN07 25, 50, 100 e 200 mg/kg; TP = Tempo de Permanência, em segundos (s).

1.2.2 Antagonismo GABAérgico

Com o objetivo de analisar o possível envolvimento da via gabaérgica no mecanismo de ação ansiolítico-símile do derivado 6CN07, foi realizado o teste de antagonismo com flumazenil. Para tanto, foi determinada a dose de 50mg/kg do 6CN07 para utilizar neste e nos

testes subsequentes, uma vez que foi a menor dose que apresentou significância em todos os testes realizados previamente.

A figura 31 representa o efeito do antagonismo realizado com o tratamento intraperitoneal do flumazenil 20mg/kg frente ao tratamento oral com o composto 6CN07 50 mg/kg sobre o NEBA. Como controle positivo foi utilizado o benzodiazepínico diazepam na dose intraperitoneal de 1 mg/kg. Na figura é possível observar que o DZP 1 mg/kg ($11,7 \pm 1,3$) aumentou significativamente o NEBA em 71,5%, quando comparado ao grupo veículo ($3,3 \pm 0,5$). O pré-tratamento com flumazenil, no grupo DZP 1 + FLU 20 ($5,1 \pm 0,8$), apresentou redução significativa de 55,8% do NEBA em comparação ao grupo tratado isoladamente com diazepam ($11,7 \pm 1,3$). De forma semelhante, o 6CN07 na dose de 50mg/kg ($6,1 \pm 1,0$) aumentou significativamente o NEBA em 46%, quando comparado ao grupo veículo ($3,3 \pm 0,5$), e o pré-tratamento com flumazenil, no grupo 6CN07 50 + FLU 20 ($3,1 \pm 0,7$), reduziu significativamente o NEBA em 48,6% quando comparado ao grupo tratado com o derivado isoladamente ($6,1 \pm 1,0$).

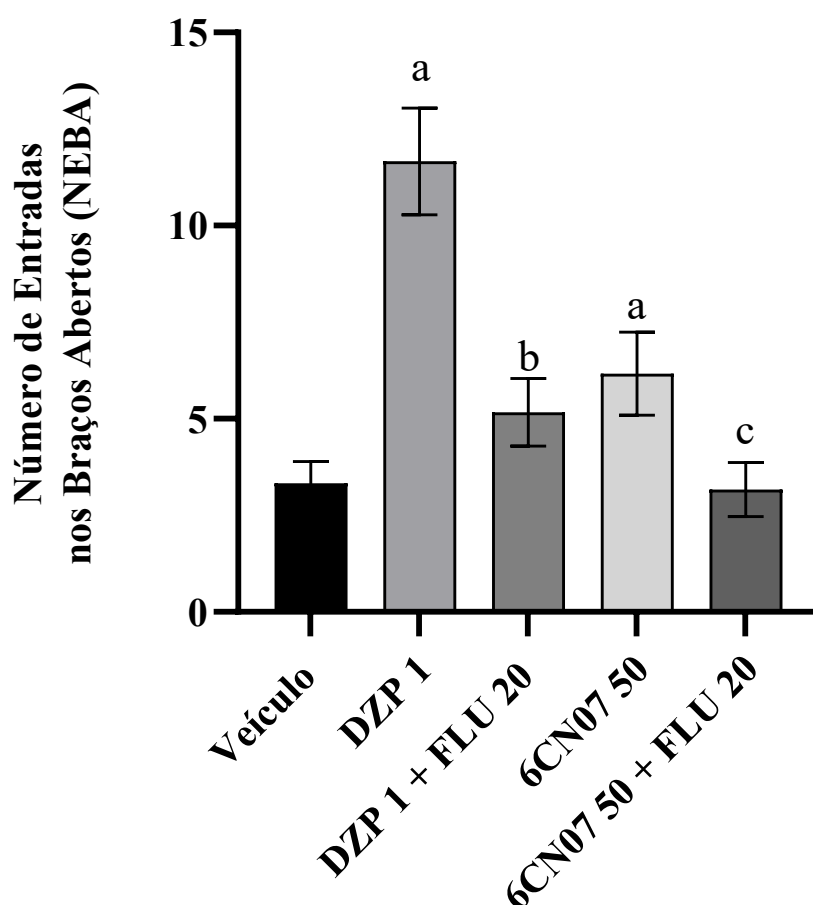


Figura 31. Efeito do antagonista flumazenil em associação ao 6CN07 sobre o NEBA no teste Labirinto em Cruz Elevado (LCE).

As colunas representam a média $\pm$ erro padrão da média (EPM), analisados através da ANOVA seguido do pós-teste de *Tukey* (post hoc). Valores significativos: “a” e “b” vs “veículo” e “DZP 1”, respectivamente, quando $p < 0.05$. DZP 1 = Diazepam 1 mg/kg; FLU 20 = Flumazenil 20 mg/kg; 6CN07 50 = Derivado tiofênico 50 mg/kg; NEBA = Número de Entradas nos Braços Abertos.

A figura 32 representa o efeito do antagonismo realizado com o tratamento intraperitoneal do flumazenil 20mg/kg frente ao tratamento oral com o composto 6CN07 50 mg/kg sobre o TPBA. Como controle positivo foi utilizado o benzodiazepínico diazepam na dose intraperitoneal de 1 mg/kg. Na figura é possível observar que o DZP 1 mg/kg ($95,7 \pm 9,8$) aumentou significativamente o TPBA em 63,8%, quando comparado ao grupo veículo ($34,7 \pm 9,3$). O pré-tratamento com flumazenil, no grupo DZP 1 + FLU 20 ($42,2 \pm 6,1$), apresentou redução significativa de 55,9% do TPBA em comparação ao grupo tratado isoladamente com diazepam ($95,7 \pm 9,8$). De forma semelhante, o 6CN07 na dose de 50 mg/kg ($64,7 \pm 9,6$) aumentou significativamente o TPBA em 46,4%, quando comparado ao grupo veículo ($34,7 \pm 9,3$).

9,3), e o pré-tratamento com flumazenil, no grupo 6CN07 50 + FLU 20 ($39,8 \pm 7,8$), reduziu significativamente o TPBA em 38,4% quando comparado ao grupo tratado com o derivado isoladamente ($64,7 \pm 9,6$).

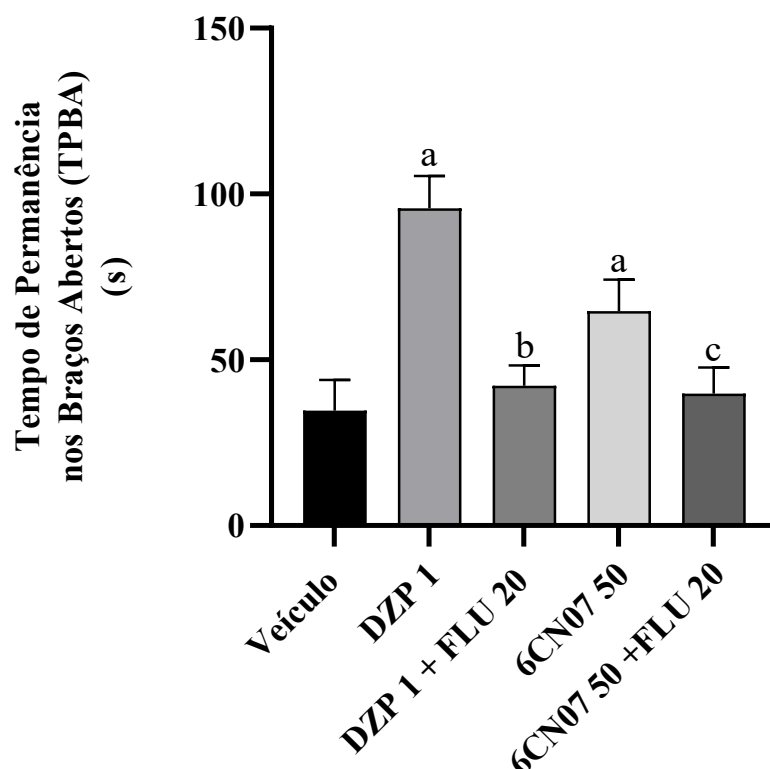


Figura 32. Efeito do antagonista flumazenil em associação ao 6CN07 sobre o TPBA no teste Labirinto em Cruz Elevado (LCE).

As colunas representam a média $\pm$ erro padrão da média (EPM), analisados através da ANOVA seguido do pós-teste de *Tukey* (post hoc). Valores significativos: “a”, “b” e “c” vs “veículo”, “DZP 1” e “6CN07 50”, respectivamente, quando $p < 0.05$. DZP 1 = Diazepam 1 mg/kg; FLU 20 = Flumazenil 20 mg/kg; 6CN07 50 = Derivado tiofênico 50 mg/kg; TPBA = Tempo de Permanência nos Braços Abertos.

Posteriormente ao teste comportamental no LCE, os animais foram submetidos ao teste Caixa Claro-Escuro (CCE), com o objetivo de evidenciar e ampliar o efeito ansiolítico-símile e o possível envolvimento da via GABAérgica através do antagonismo com flumazenil. Neste teste foram analisados os seguintes parâmetros comportamentais: Número de entradas no compartimento claro (NECC) e o Tempo de permanência no compartimento claro (TPCC).

A figura 33 representa o efeito do antagonismo realizado com o tratamento intraperitoneal do flumazenil 20mg/kg frente ao tratamento oral com o composto 6CN07 50 mg/kg sobre o NECC. Como controle positivo foi utilizado o benzodiazepínico diazepam na

dose intraperitoneal de 1 mg/kg. Na figura é possível observar que o DZP 1 mg/kg ($29,2 \pm 0,9$) aumentou significativamente o NECC em 45,7%, quando comparado ao grupo veículo ($15,8 \pm 0,4$). O pré-tratamento com flumazenil, no grupo DZP 1 + FLU 20 ($17,3 \pm 0,8$), apresentou redução significativa de 40,6% do NECC em comparação ao grupo tratado isoladamente com diazepam ($29,2 \pm 0,9$). De forma semelhante, o 6CN07 na dose de 50 mg/kg ($19,5 \pm 1,1$) aumentou significativamente o NECC em 18,9%, quando comparado ao grupo veículo ($15,8 \pm 0,4$), e o pré-tratamento com flumazenil, no grupo 6CN07 50 + FLU 20 ($12,7 \pm 0,9$), reduziu significativamente o NECC em 35,0% quando comparado ao grupo tratado com o derivado isoladamente ($19,5 \pm 1,1$).

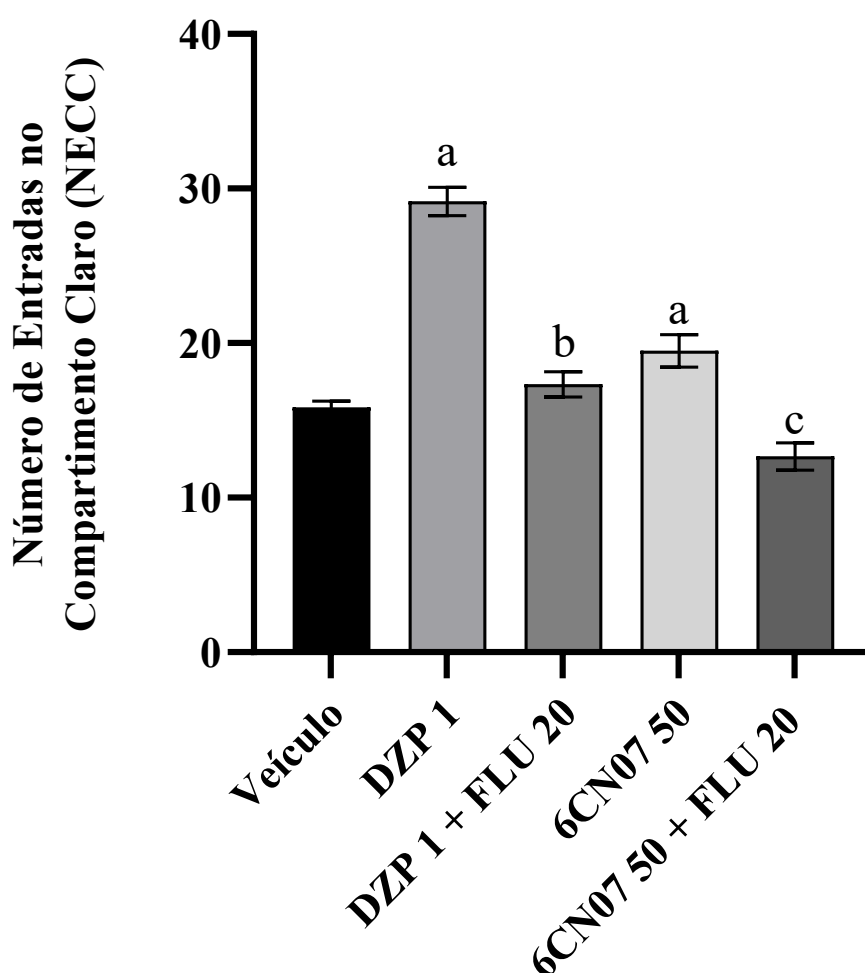


Figura 33. Efeito do antagonista flumazenil em associação ao 6CN07 sobre o NECC no teste Caixa Claro Escuro (CCE).

As colunas representam a média $\pm$ erro padrão da média (EPM), analisados através da ANOVA seguido do pós-teste de *Tukey* (post hoc). Valores significativos: “a”, “b” e “c” vs “veículo”, “DZP 1” e “6CN07 50”,

respectivamente, quando $p < 0.05$. DZP 1 = Diazepam 1 mg/kg; FLU 20 = Flumazenil 20 mg/kg; 6CN07 50 = Derivado tiofênico 50 mg/kg; NECC = Número de Entradas no Compartimento Claro.

A figura 34 representa o efeito do antagonismo realizado com o tratamento intraperitoneal do flumazenil 20mg/kg frente ao tratamento oral com o composto 6CN07 50 mg/kg sobre o TPCC. Como controle positivo foi utilizado o benzodiazepínico diazepam na dose intraperitoneal de 1 mg/kg. Na figura é possível observar que o DZP 1 mg/kg ($161,8 \pm 7,7$) aumentou significativamente o TPCC em 36,7%, quando comparado ao grupo veículo ($102,5 \pm 5,6$). O pré-tratamento com flumazenil, no grupo DZP 1 + FLU 20 ($68,2 \pm 5,3$), apresentou redução significativa de 57,9% do TPCC em comparação ao grupo tratado isoladamente com diazepam ($161,8 \pm 7,7$). De forma semelhante, o 6CN07 na dose de 50 mg/kg ($124,2 \pm 9,5$) não aumentou significativamente o TPCC, quando comparado ao grupo veículo ($102,5 \pm 5,6$), e o pré-tratamento com flumazenil, no grupo 6CN07 50 + FLU 20 ($66,7 \pm 3,4$), reduziu significativamente o TPCC em 53,7% quando comparado ao grupo tratado com o derivado isoladamente ($124,2 \pm 9,5$).

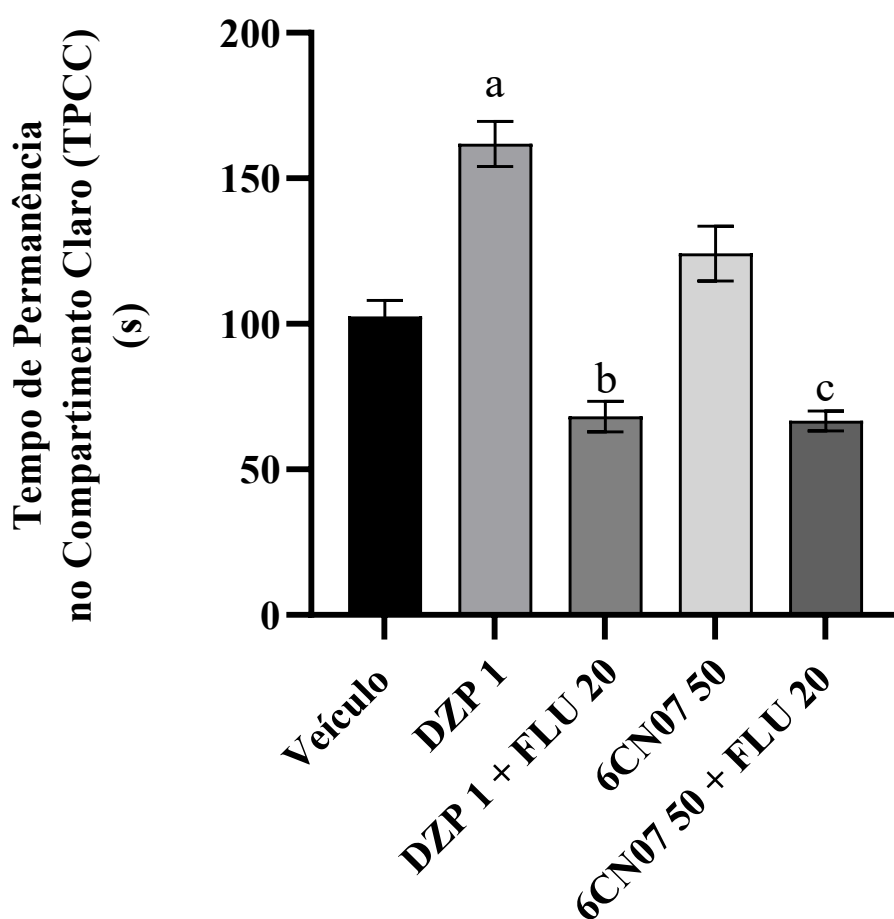


Figura 34. Efeito do antagonista flumazenil em associação ao 6CN07 sobre o TPCC no teste Caixa Claro Escuro (CCE).

As colunas representam a média $\pm$ erro padrão da média (EPM), analisados através da ANOVA seguido do pós-teste de *Tukey* (post hoc). Valores significativos: “a”, “b” e “c” vs “veículo”, “DZP 1” e “6CN07 50”, respectivamente, quando $p < 0.05$. DZP 1 = Diazepam 1 mg/kg; FLU 20 = Flumazenil 20 mg/kg; 6CN07 50 = Derivado tiofênico 50 mg/kg; TPCC = Tempo de Permanência no Compartimento Claro.

1.2.3 Antagonismo Serotoninérgico

Com o objetivo de elucidar o mecanismo de ação do derivado 6CN07 foi realizado além do antagonismo gabaérgico, o antagonismo serotoninérgico a fim de analisar o envolvimento do efeito ansiolítico-símile através da modulação em receptores serotoninérgicos, como o 5-HT₂, uma vez que estão diretamente relacionados com a neurobiologia dos transtornos de ansiedade. Para este antagonismo, foram realizados os mesmos testes, LCE e CCE. Entretanto,

o fármaco padrão utilizado como controle positivo foi a buspirona na dose de 5 mg/kg e como antagonista serotoninérgico foi utilizado a cetanserina na dose de 5 mg/kg.

A figura 35 representa o efeito do antagonismo realizado com o tratamento intraperitoneal da cetanserina 5mg/kg frente ao tratamento oral com o composto 6CN07 50 mg/kg sobre o NEBA. Na figura é possível observar que a buspirona 5 mg/kg ($9,8 \pm 1,0$) aumentou significativamente o NEBA em 37,3%, quando comparado ao grupo veículo ($6,2 \pm 0,7$). O pré-tratamento com cetanserina, no grupo BUSP 5 + CET 5 ($0,0 \pm 0,0$), apresentou redução significativa do NEBA em comparação ao grupo tratado isoladamente com buspirona ($9,8 \pm 1,0$). De forma semelhante, o 6CN07 na dose de 50 mg/kg ($7,7 \pm 1,5$) não aumentou significativamente o NEBA, quando comparado ao grupo veículo ($6,2 \pm 0,7$), e o pré-tratamento com cetanserina, no grupo 6CN07 50 + CET 5 ($1,3 \pm 0,3$), reduziu significativamente o NEBA em 82,7% quando comparado ao grupo tratado com o derivado isoladamente ($7,7 \pm 1,5$).

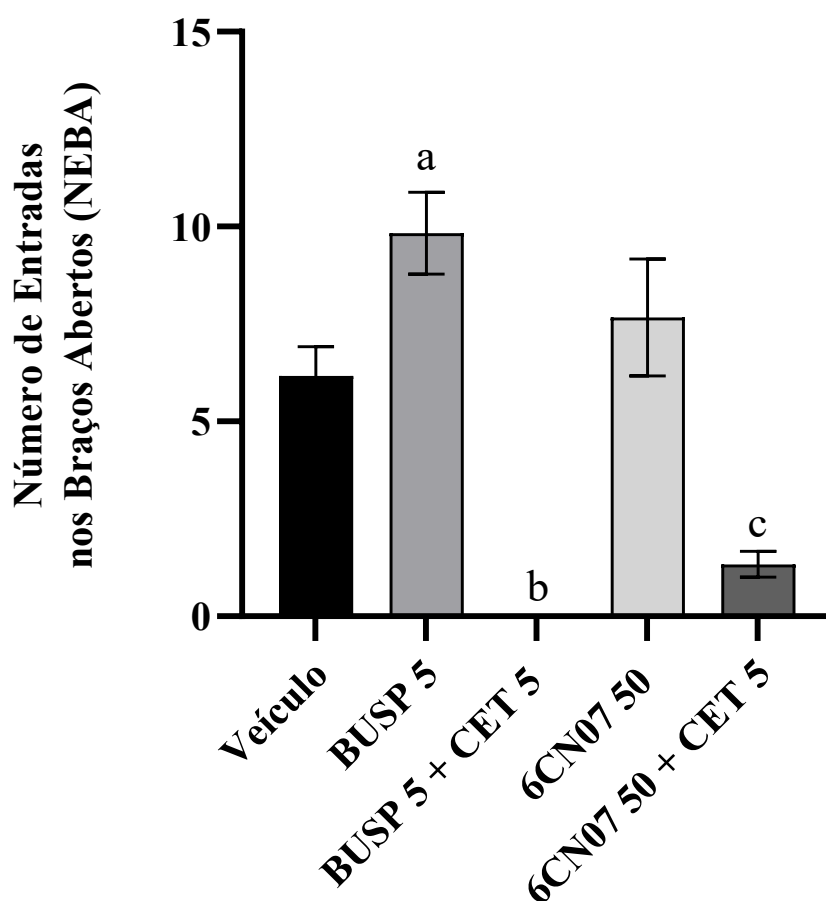


Figura 35. Efeito do antagonista 5-HT₂, cetanserina, em associação ao 6CN07 sobre o NEBA no teste Labirinto em Cruz Elevado (LCE).

As colunas representam a média $\pm$ erro padrão da média (EPM), analisados através da ANOVA seguido do pós-teste de *Tukey* (post hoc). Valores significativos: “a”, “b” e “c” vs “veículo”, “BUSP 5” e “6CN07 50”, respectivamente, quando $p < 0.05$. DZP 1 = Diazepam 1 mg/kg; BUSP 5 = Buspirona 5 mg/kg; CET 5 = Cetanserina 5 mg/kg; 6CN07 50 = Derivado tiofênico 50 mg/kg; NEBA = Número de Entradas nos Braços Abertos.

A figura 36 representa o efeito do antagonismo realizado com o tratamento intraperitoneal da cetanserina 5mg/kg frente ao tratamento oral com o composto 6CN07 50 mg/kg sobre o TPBA. Na figura é possível observar que a buspirona 5 mg/kg ($81,0 \pm 15,2$) aumentou significativamente o TPBA em 46,3%, quando comparado ao grupo veículo ($43,5 \pm 8,3$). O pré-tratamento com cetanserina, no grupo BUSP 5 + CET 5 ($0,0 \pm 0,0$), apresentou redução significativa do TPBA em comparação ao grupo tratado isoladamente com buspirona ($81,0 \pm 15,2$). De forma semelhante, o 6CN07 na dose de 50 mg/kg ($74,3 \pm 13,8$) não aumentou significativamente o TPBA, quando comparado ao grupo veículo ($43,5 \pm 8,3$), e o pré-tratamento com cetanserina, no grupo 6CN07 50 + CET 5 ($10,8 \pm 3,4$), reduziu

significativamente o TPBA em 86,1% quando comparado ao grupo tratado com o derivado isoladamente ($74,3 \pm 13,8$).

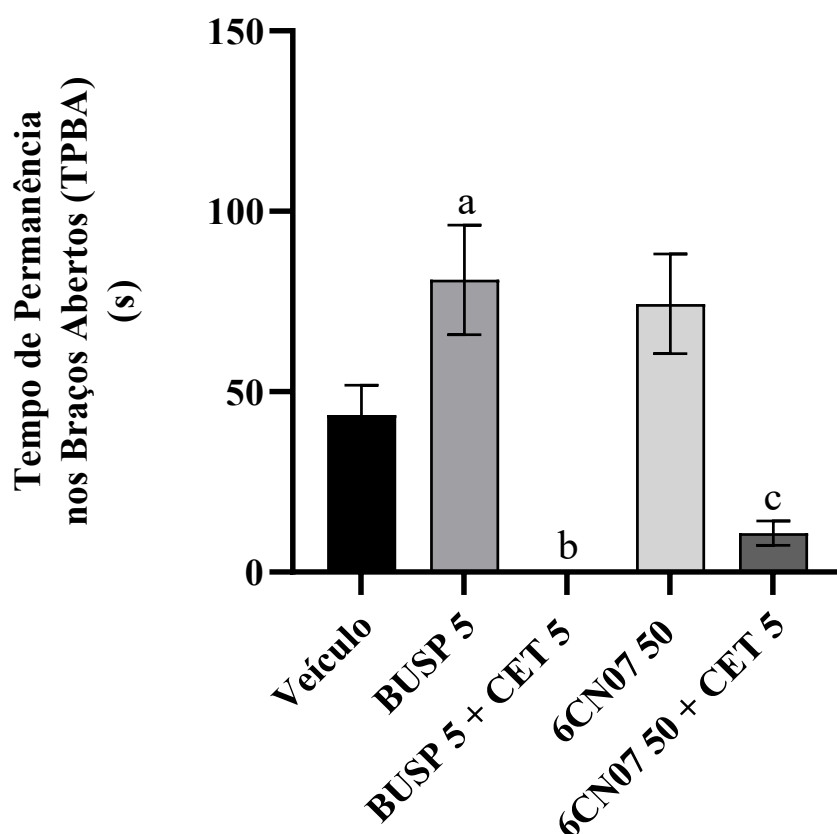


Figura 36. Efeito do antagonista 5-HT₂, cetanserina, em associação ao 6CN07 sobre o TPBA no teste Labirinto em Cruz Elevado (LCE).

As colunas representam a média $\pm$ erro padrão da média (EPM), analisados através da ANOVA seguido do pós-teste de *Tukey* (post hoc). Valores significativos: “a”, “b” e “c” vs “veículo”, “BUSP 5” e “6CN07 50”, respectivamente, quando $p < 0.05$. BUSP 5 = Buspirona 5 mg/kg; CET 5 = Cetanserina 5 mg/kg; 6CN07 50 = Derivado tiofênico 50 mg/kg; TPBA = Tempo de Permanência nos Braços Abertos.

A figura 37 representa o efeito do antagonismo realizado com o tratamento intraperitoneal da cetanserina 5mg/kg frente ao tratamento oral com o composto 6CN07 50 mg/kg sobre o NECC.

Na figura é possível observar que a bupiriona 5 mg/kg ($20,3 \pm 0,6$) aumentou significativamente o NECC em 17,2%, quando comparado ao grupo veículo ($16,8 \pm 0,8$). O

pré-tratamento com cetanserina, no grupo BUSP 5 + CET 5 ($1,5 \pm 0,2$), apresentou redução significativa de 92,6% do NECC em comparação ao grupo tratado isoladamente com buspirona ($20,3 \pm 0,6$). De forma semelhante, o 6CN07 na dose de 50 mg/kg ($18,3 \pm 0,4$) não aumentou significativamente o NECC, quando comparado ao grupo veículo ($16,8 \pm 0,8$), e o pré-tratamento com cetanserina, no grupo 6CN07 50 + CET 5 ($1,8 \pm 0,5$), reduziu significativamente o NECC em 90,0% quando comparado ao grupo tratado com o derivado isoladamente ($18,3 \pm 0,4$).

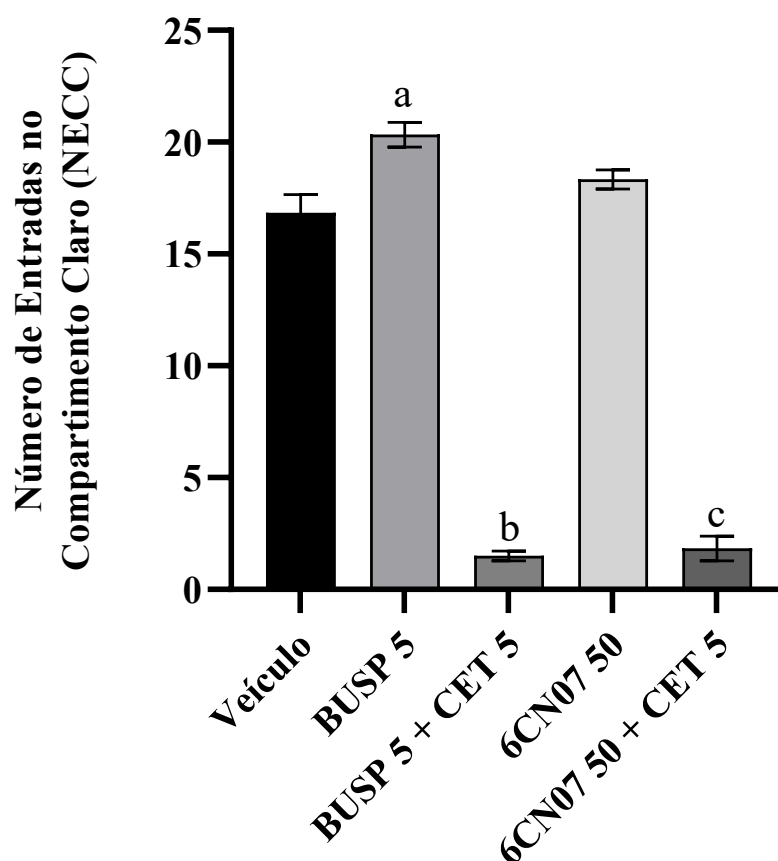


Figura 37. Efeito do antagonista 5-HT₂, cetanserina, em associação ao 6CN07 sobre o NECC no teste Caixa Claro Escuro (CCE).

As colunas representam a média $\pm$ erro padrão da média (EPM), analisados através da ANOVA seguido do pós-teste de *Tukey* (post hoc). Valores significativos: “a”, “b” e “c” vs “veículo”, “BUSP 5” e “6CN07 50”, respectivamente, quando $p < 0.05$. DZP 1 = Diazepam 1 mg/kg; BUSP 5 = Buspirona 5 mg/kg; CET 5 = Cetanserina 5 mg/kg; 6CN07 50 = Derivado tiofênico 50 mg/kg; NECC = Número de Entradas no Compartimento Claro.

A figura 38 representa o efeito do antagonismo realizado com o tratamento intraperitoneal da cetanserina 5mg/kg frente ao tratamento oral com o composto 6CN07 50 mg/kg sobre o TPCC.

Na figura é possível observar que a bupiriona 5 mg/kg ($138,5 \pm 4,2$) aumentou significativamente o TPCC em 29,1%, quando comparado ao grupo veículo ($98,2 \pm 4,5$). O pré-tratamento com cetanserina, no grupo BUSP 5 + CET 5 ($6,0 \pm 1,3$), apresentou redução significativa de 95,7% do TPCC em comparação ao grupo tratado isoladamente com bupiriona ($138,5 \pm 4,2$). De forma semelhante, o 6CN07 na dose de 50 mg/kg ($125,0 \pm 4,2$) aumentou significativamente o TPCC em 21,5%, quando comparado ao grupo veículo ($98,2 \pm 4,5$), e o pré-tratamento com cetanserina, no grupo 6CN07 50 + CET 5 ($9,8 \pm 2,9$), reduziu significativamente o TPCC em 92,1% quando comparado ao grupo tratado com o derivado isoladamente ($125,0 \pm 4,2$).

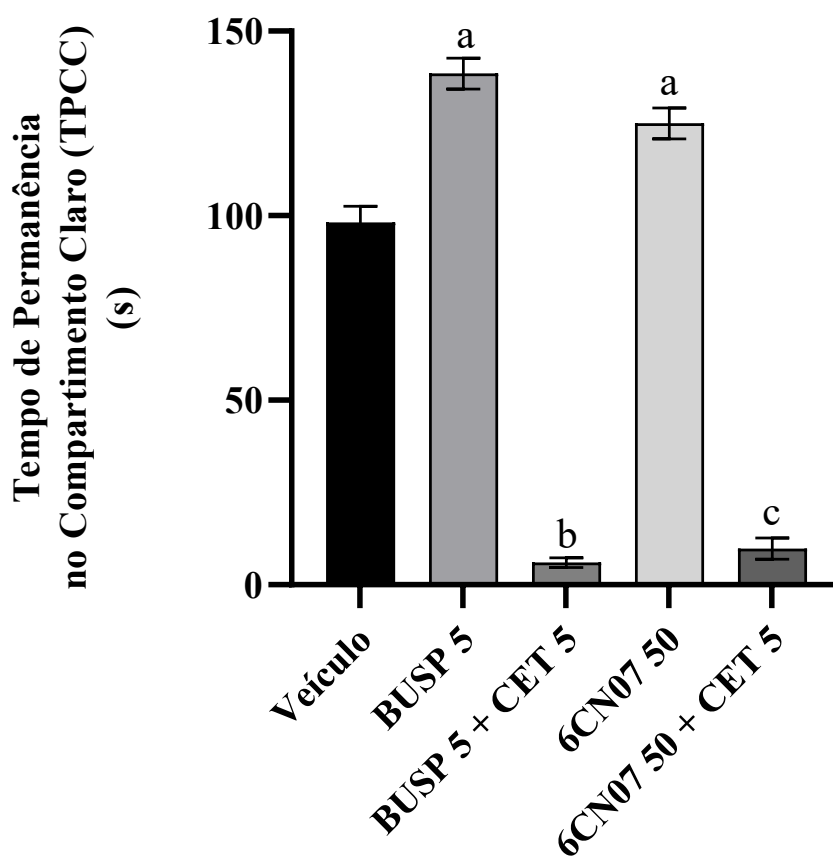


Figura 38. Efeito do antagonista 5-HT₂, cetanserina, em associação ao 6CN07 sobre o TPCC no teste Caixa Claro Escuro (CCE).

As colunas representam a média $\pm$ erro padrão da média (EPM), analisados através da ANOVA seguido do pós-teste de *Tukey* (post hoc). Valores significativos: “a”, “b” e “c” vs “veículo”, “BUSP 5” e “6CN07 50”, respectivamente, quando $p < 0.05$. DZP 1 = Diazepam 1 mg/kg; BUSP 5 = Buspirona 5 mg/kg; CET 5 = Cetanserina 5 mg/kg; 6CN07 50 = Derivado tiofênico 50 mg/kg; TPCC = Tempo de Permanência no Compartimento Claro.

1.2.4 Ansiedade induzida por Pentilenotetrazol

A figura 39 representa o efeito do tratamento oral com o composto 6CN07 (50 mg/kg) na presença do pentilenotetrazol (30 mg/kg) sobre o NEBA. É possível observar que o PTZ 30 mg/kg ($1,8 \pm 0,3$) reduziu significativamente o NEBA em 60,7%, quando comparado ao grupo veículo ($4,6 \pm 0,4$). O grupo 6CN07 + PTZ ($7,0 \pm 0,5$) apresentou um aumento significativo de 33,3% no NEBA, quando comparado ao grupo veículo ($4,6 \pm 0,4$), assim como de 73,8% quando comparado ao grupo tratado isoladamente com PTZ 30mg/kg ($1,8 \pm 0,3$).

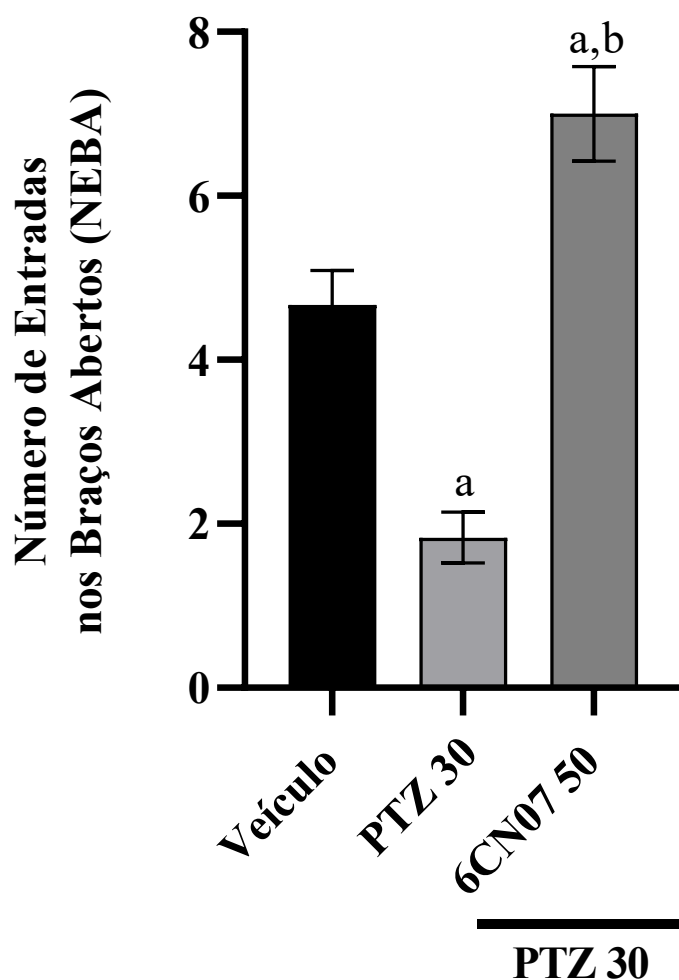


Figura 39. Efeito do 6CN07 na presença do pentilenotetrazol sobre o NEBA no teste Labirinto em Cruz Elevado (LCE).

As colunas representam a média $\pm$ erro padrão da média (EPM), analisados através da ANOVA seguido do pós-teste de *Tukey* (post hoc). Valores significativos: “a” e “b” vs “veículo” e “PTZ 30”, respectivamente, quando $p < 0.05$. PTZ 30 = Pentilenotetrazol 30 mg/kg; 6CN07 50 = Derivado tiofênico 50 mg/kg; NEBA = Número de Entradas nos Braços Abertos.

A figura 40 representa o efeito do tratamento oral com o composto 6CN07 (50 mg/kg) na presença do pentilenotetrazol (30 mg/kg) sobre o TPBA. É possível observar que o PTZ 30 mg/kg ($29,6 \pm 6,9$) reduziu significativamente o TPBA em 53,9%, quando comparado ao grupo veículo ($64,3 \pm 5,3$). O grupo 6CN07 + PTZ ($73,8 \pm 6,6$), apresentou um aumento significativo de 59,8% no TPBA, quando comparado ao tratado isoladamente com PTZ 30mg/kg ($29,6 \pm 6,9$).

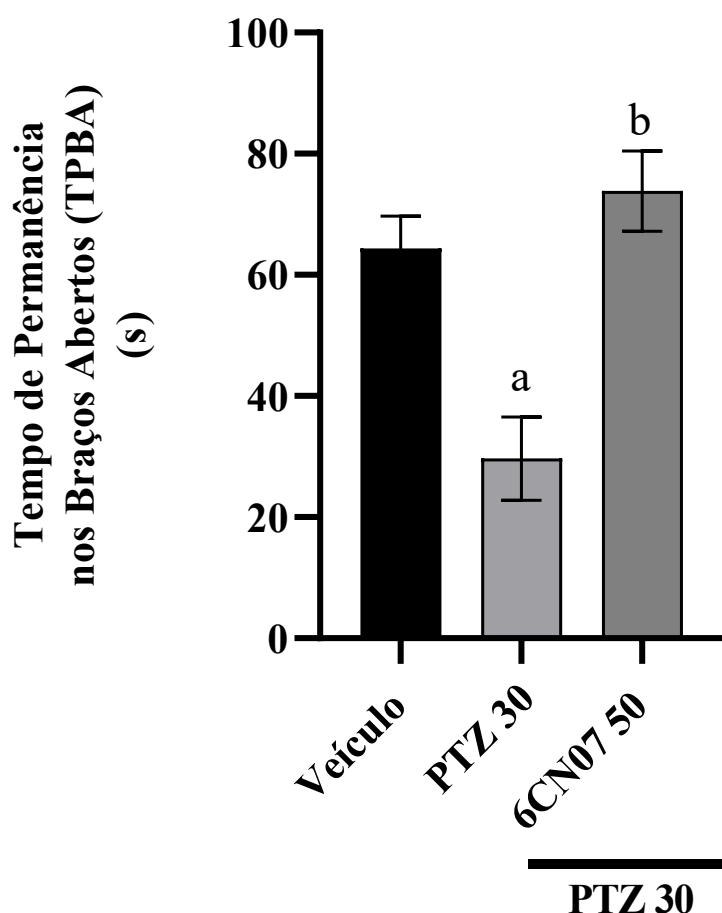


Figura 40. Efeito do 6CN07 na presença do pentilenotetrazol sobre o TPBA no teste Labirinto em Cruz Elevado (LCE).

As colunas representam a média $\pm$ erro padrão da média (EPM), analisados através da ANOVA seguido do pós-teste de *Tukey* (post hoc). Valores significativos: “a” e “b” vs “veículo” e “PTZ 30”, respectivamente, quando $p < 0.05$. PTZ 30 = Pentilenotetrazol 30 mg/kg; 6CN07 50 = Derivado tiofênico 50 mg/kg; TPBA = Tempo de permanência nos Braços Abertos, em segundos (s).

A figura 41 representa o efeito do tratamento oral com o composto 6CN07 (50 mg/kg) na presença do pentilenotetrazol (30 mg/kg) sobre o NECC. É possível observar que o PTZ 30 mg/kg ($5,8 \pm 0,1$) reduziu significativamente o NECC em 58,9%, quando comparado ao grupo veículo ($14,1 \pm 0,4$). O grupo 6CN07 + PTZ ($16,5 \pm 0,5$) apresentou um aumento significativo de 14,1% no NECC, quando comparado ao grupo veículo ($14,1 \pm 0,4$), assim como de 64,7% quando comparado ao grupo tratado isoladamente com PTZ 30mg/kg ($5,8 \pm 0,1$).

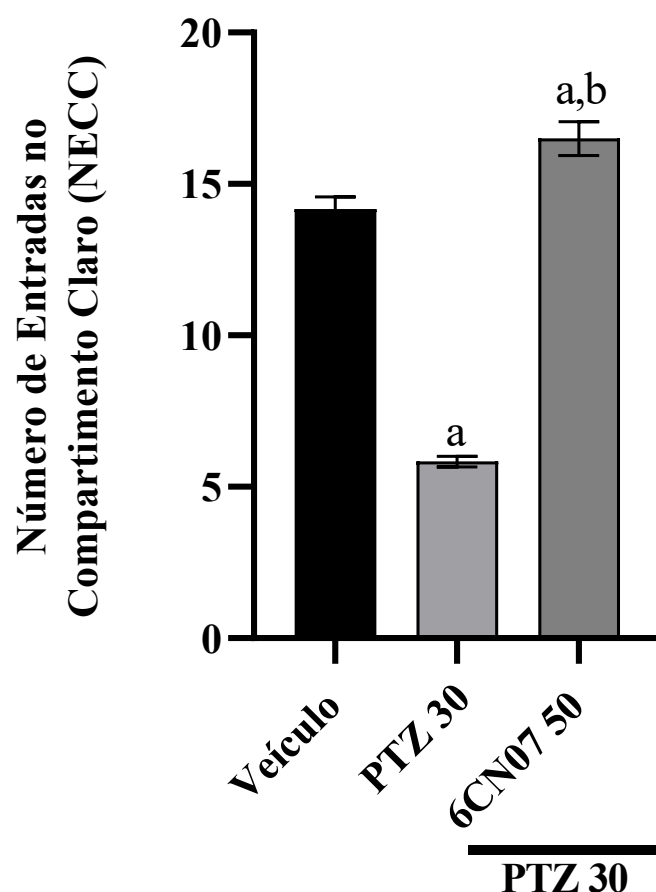


Figura 41. Efeito do 6CN07 na presença do pentilenotetrazol sobre o NECC no teste Caixa Claro Escuro (CCE).

As colunas representam a média $\pm$ erro padrão da média (EPM), analisados através da ANOVA seguido do pós-teste de *Tukey* (post hoc). Valores significativos: “a” e “b” vs “veículo” e “PTZ 30”, respectivamente, quando $p < 0.05$. PTZ 30 = Pentilenotetrazol 30 mg/kg; 6CN07 50 = Derivado tiofênico 50 mg/kg; NECC = Número de Entradas no Compartimento Claro.

A figura 42 representa o efeito do tratamento oral com o composto 6CN07 (50 mg/kg) na presença do pentilenotetrazol (30 mg/kg) sobre o TPCC. É possível observar que o PTZ 30 mg/kg ($41,3 \pm 4,8$) reduziu significativamente o TPCC em 52,6%, quando comparado ao grupo veículo ($87,1 \pm 4,6$). O grupo 6CN07 + PTZ ($116,3 \pm 8,2$), apresentou um aumento significativo de 25% no NECC, quando comparado ao grupo veículo ($87,1 \pm 4,6$), assim como de 64,5% quando comparado ao grupo tratado isoladamente com PTZ 30mg/kg ($41,3 \pm 4,8$) (Figura 40).

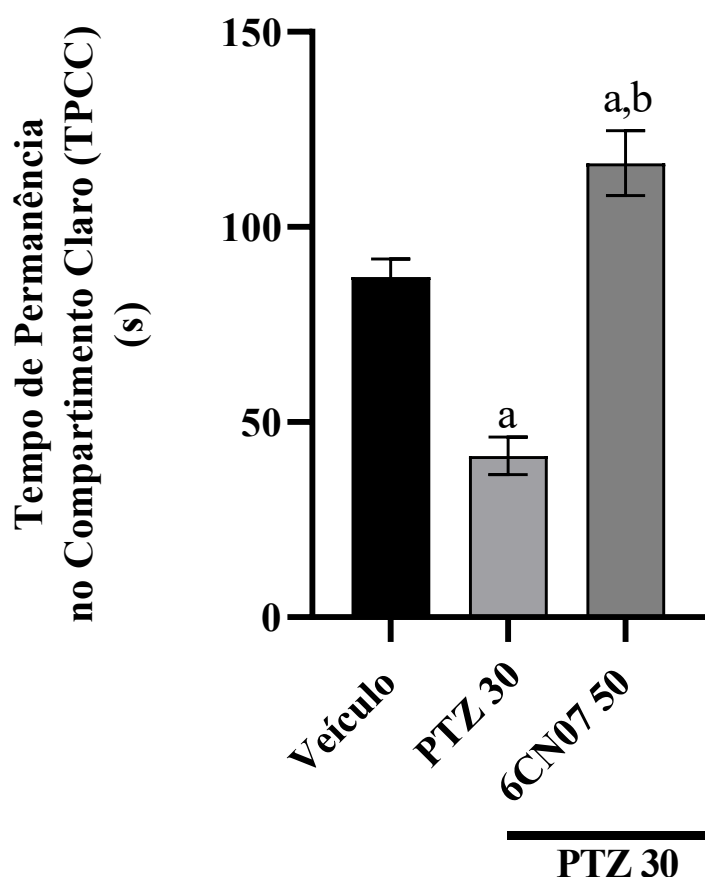


Figura 42. Efeito do 6CN07 na presença do pentilenotetrazol sobre o TPCC no teste Caixa Claro Escuro (CCE).

As colunas representam a média $\pm$ erro padrão da média (EPM), analisados através da ANOVA seguido do pós-teste de *Tukey* (post hoc). Valores significativos: “a” e “b” vs “veículo” e “PTZ 30”, respectivamente, quando $p < 0.05$. PTZ 30 = Pentilenotetrazol 30 mg/kg; 6CN07 50 = Derivado tiofênico 50 mg/kg; TPCC = Tempo de Permanência no Compartimento Claro.

7.3 Metodologias *in vitro*

7.3.1. Estresse Oxidativo

Para investigar o possível efeito antioxidante do composto 6CN07 e sua participação nos mecanismos envolvidos na modulação do estresse oxidativo induzido pelo pentilenotetrazol (PTZ), foram realizados ensaios visando à avaliação de marcadores-chave do equilíbrio redox, com ênfase na quantificação dos níveis de glutathiona reduzida (GSH), nitrito e malonaldeído.

A figura 43 representa a quantificação dos níveis de glutathiona reduzida (GSH) em função dos grupos tratados oralmente com 6CN07 e/ou intraperitonealmente com pentilenotetrazol (30 mg/kg). É possível observar que o PTZ 30 mg/kg ($6,3 \pm 1,7$) reduziu

significativamente a GSH em 59,7%, quando comparado ao grupo veículo ($15,8 \pm 2,0$). O grupo 6CN07 + PTZ ($18,3 \pm 4,6$) apresentou um aumento significativo de 65,3% no GSH, quando comparado ao grupo tratado isoladamente com PTZ 30mg/kg ($6,3 \pm 1,7$).

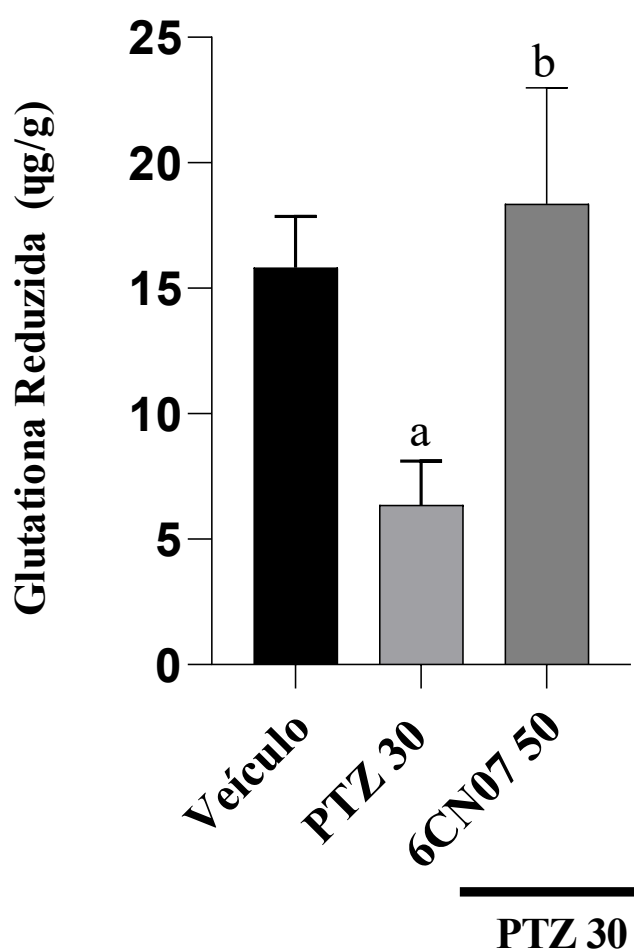


Figura 43. Efeito do 6CN07 sobre GSH frente ao estímulo ansiogênico com pentilenotetrazol.

As colunas representam a média $\pm$ erro padrão da média (EPM), analisados através da ANOVA seguido do pós-teste de *Tukey* (post hoc). Valores significativos: “a”, “b” vs “veículo” e “PTZ 30”, respectivamente, quando $p < 0.05$. PTZ = Pentilenotetrazol 30 mg/kg; 6CN07 50 = Derivado tiofênico 6CN07 50 mg/kg; GSH = Glutathiona reduzida.

A figura 44 representa a quantificação dos níveis de nitrito (NO_2^-) em função dos grupos tratados oralmente com 6CN07 e/ou intraperitonealmente com pentilenotetrazol (30 mg/kg). É possível observar que o PTZ 30 mg/kg ($599,5 \pm 82,7$) aumentou significativamente os níveis

de nitrito em 41,1%, quando comparado ao grupo veículo ($353,2 \pm 14,1$). Entretanto, não foi observada diferença significativa entre o grupo 6CN07 + PTZ ($18,3 \pm 4,6$) e o veículo.

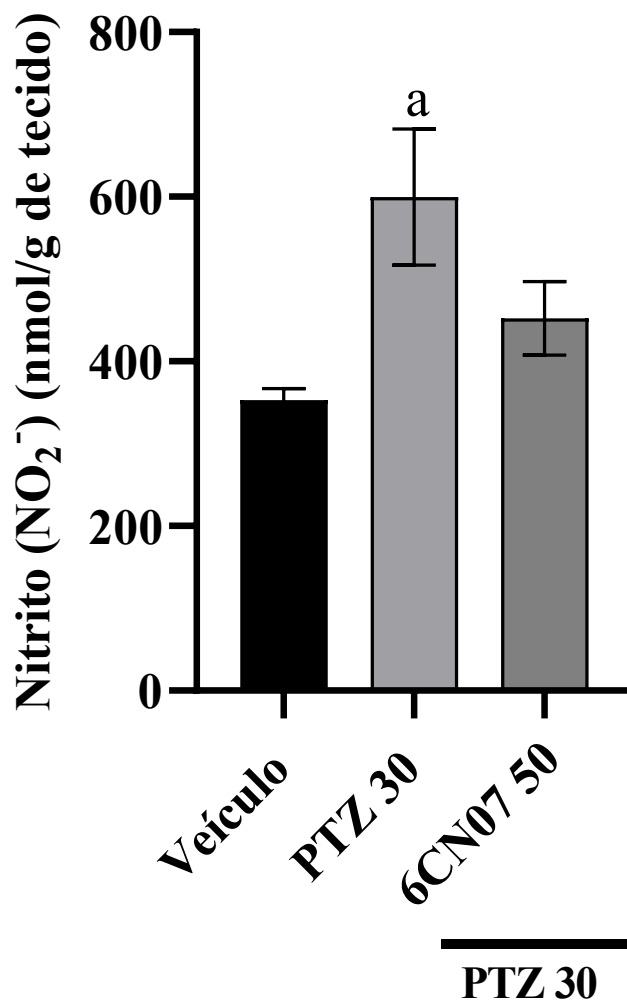


Figura 44. Efeito do 6CN07 sobre nitrito frente ao estímulo ansiogênico com pentilenotetrazol.

As colunas representam a média $\pm$ erro padrão da média (EPM), analisados através da ANOVA seguido do pós-teste de *Tukey* (post hoc). Valores significativos: “a” vs “veículo”, quando $p < 0.05$. PTZ = Pentilenotetrazol 30 mg/kg; 6CN07 50 = Derivado tiofênico 6CN07 50 mg/kg;

A figura 45 representa a quantificação dos níveis de malonaldeído (MDA), produto da peroxidação lipídica, em função dos grupos tratados oralmente com 6CN07 e/ou intraperitonealmente com pentilenotetrazol (30 mg/kg). É possível observar que o PTZ 30 mg/kg ($13,4 \pm 0,8$) reduziu significativamente os níveis de MDA em 26,6%, quando comparado

ao grupo veículo ($18,3 \pm 1,3$). Da mesma maneira, o grupo 6CN07 + PTZ 30 ($13,3 \pm 0,2$) reduziu significativamente os níveis de MDA em 27,4% quando comparado ao grupo veículo ($18,3 \pm 1,3$). Não foi observada diferença significativa entre demais grupos.

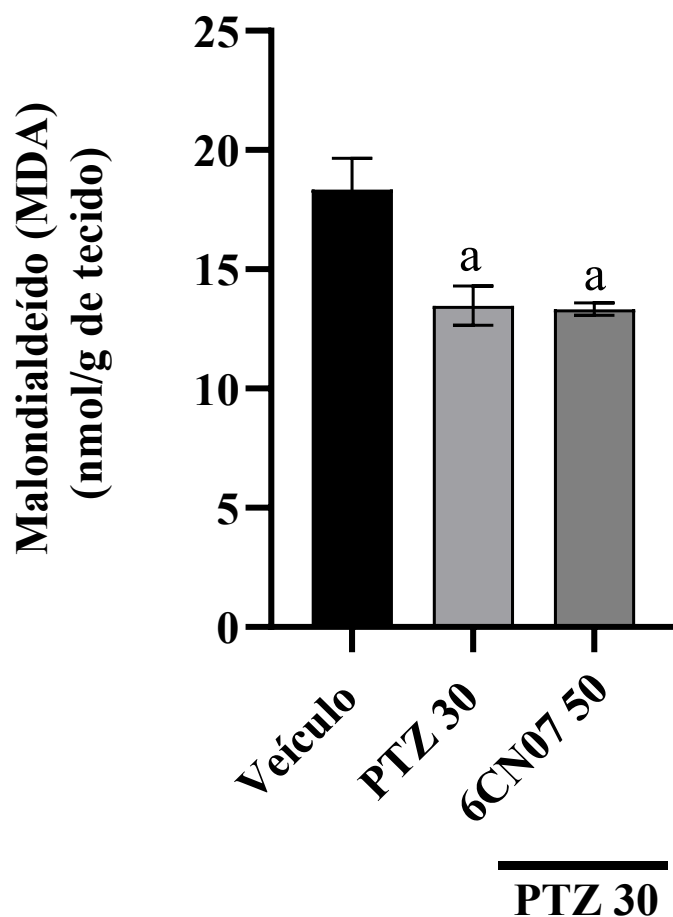


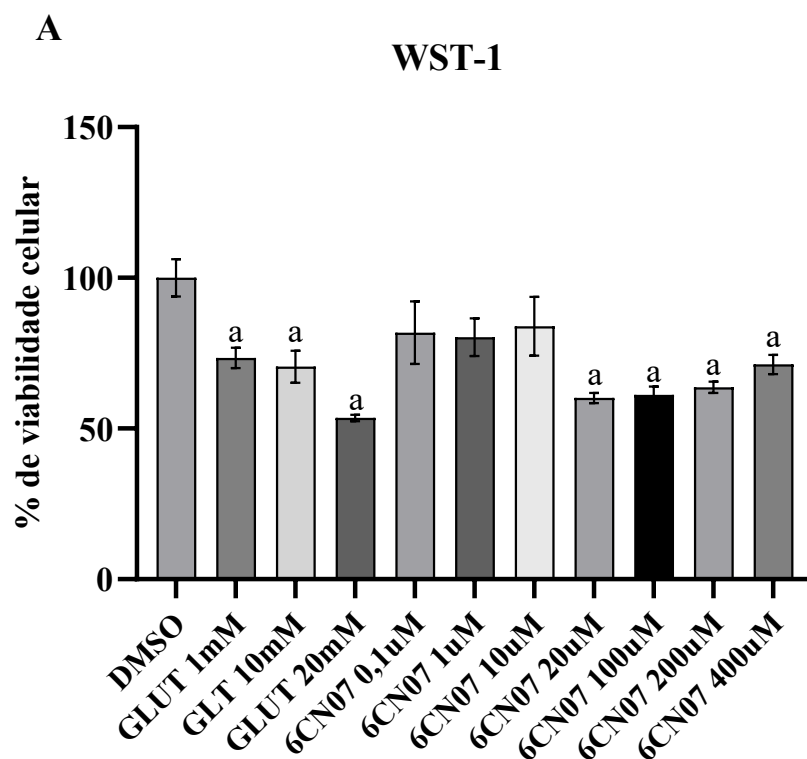
Figura 45. Efeito do 6CN07 sobre a peroxidação lipídica, pelo MDA, frente ao estímulo ansiogênico com pentilenotetrazol.

As colunas representam a média $\pm$ erro padrão da média (EPM), analisados através da ANOVA seguido do pós-teste de *Tukey* (post hoc). Valores significativos: “a” vs “veículo”, quando $p < 0.05$. PTZ = Pentilenotetrazol 30 mg/kg; 6CN07 50 = Derivado tiofênico 6CN07 50 mg/kg; MDA = Malondialdeído;

7.3.2. Citotoxicidade

A viabilidade das células da cultura primária enriquecida com astrócitos pelo ensaio colorimétrico baseado no sal tetrazólio WST-1, que quantifica indiretamente a atividade mitocondrial das células viáveis. Os resultados estão expressos em percentual de viabilidade celular dos poços de células tratadas com glutamato 1, 10 e 20mM ($0,8 \pm 0,03$; $0,7 \pm 0,05$; $0,5$

$\pm 0,01$, respectivamente) e com 6CN07 0,1, 1,0, 10, 20, 100, 200 e 400 μM ($0,8 \pm 0,10$; $0,8 \pm 0,01$; $0,8 \pm 0,10$; $0,6 \pm 0,01$; $0,6 \pm 0,02$; $0,6 \pm 0,01$; $0,6 \pm 0,03$, respectivamente) em relação ao grupo controle DMSO 0,1% ($1,0 \pm 0,06$) (figura 46A e 46B) e (Figura 47).



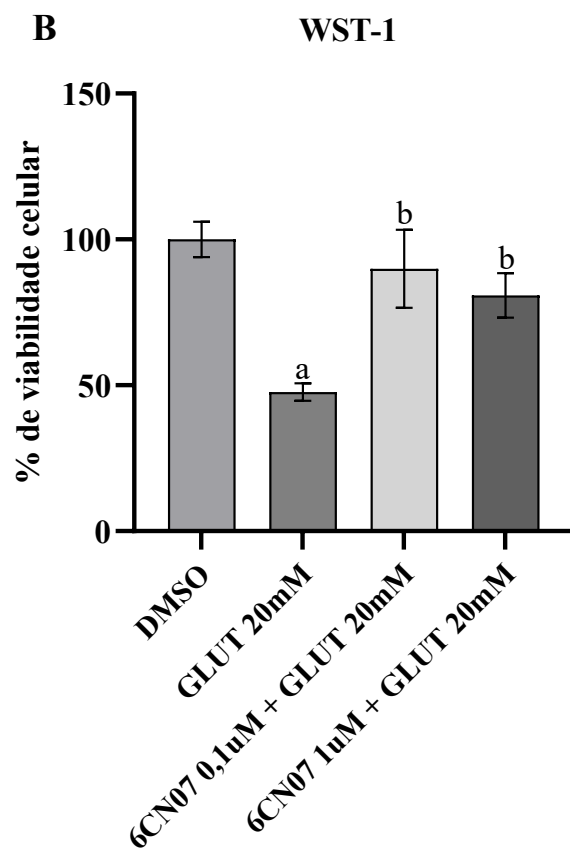


Figura 46. Viabilidade celular do 6CN07 frente à excitotoxicidade glutamatérgica avaliada pelo teste WST-1 em culturas primárias de células da glia.

As médias dos valores de absorbância (eixo y) para cada grupo experimental (eixo x) são expressas como porcentagem do controle (DMSO 0,1%), considerado como 100%. Valores significativos: “a” vs “DMSO”; “b” vs “GLUT 20 mM” quando $p < 0.05$.

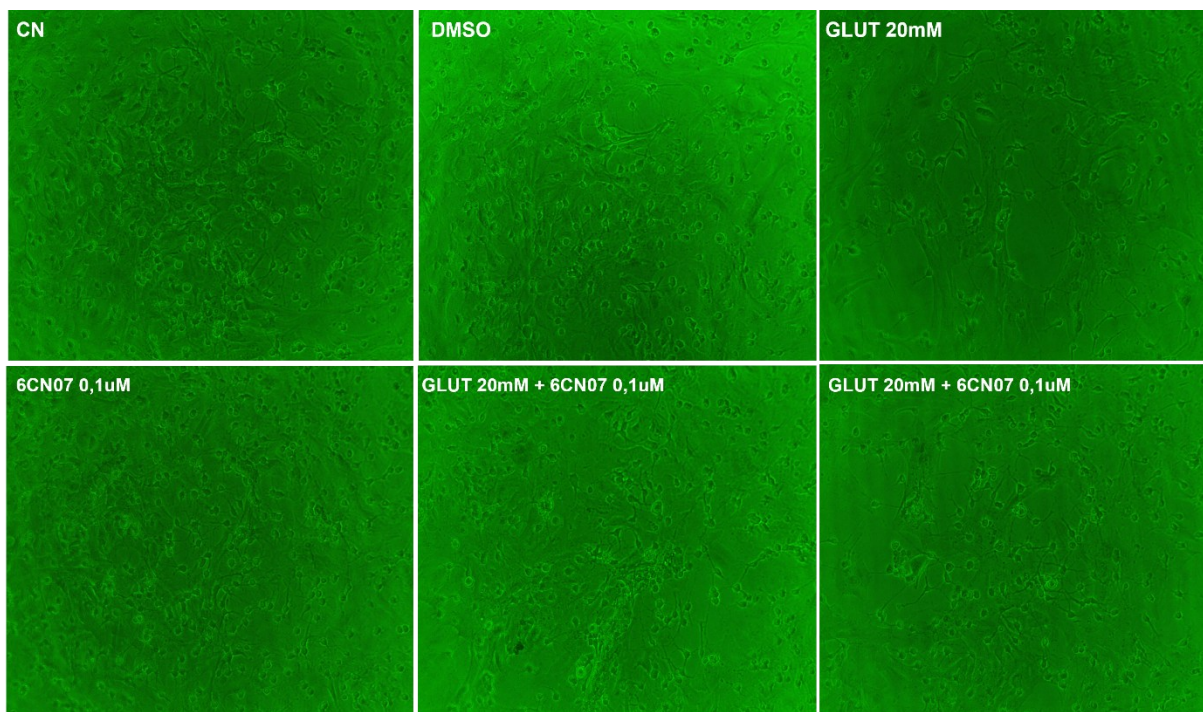


Figura 47. Contraste de fases do derivado tiofênico 6CN07 em cultura primária de micróglia enriquecida com astrócitos em meio a excitotoxicidade glutamatérgica.

Descrição morfológica: No grupo controle (CN) e no grupo veículo (DMSO), observa-se uma camada celular íntegra, com alta densidade, células apresentando morfologia predominantemente poligonal a levemente arredondada, contornos bem definidos e citoplasma homogêneo, além de organização celular preservada. No grupo tratado com glutamato 20 mM, verifica-se notória alteração morfológica, caracterizada por redução da densidade celular, perda da confluência, células com retração citoplasmática e arredondamento acentuado, com diminuição e/ou ausência de prolongamentos celulares, além de áreas com descontinuidade da confluência, sugestivas de dano celular e morte por excitotoxicidade. O tratamento com 6CN07 (0,1 μ M) isoladamente não promoveu alterações morfológicas relevantes, mantendo padrão semelhante ao controle. Nos grupos tratados com glutamato associado ao 6CN07, observa-se atenuação das alterações induzidas pelo glutamato, evidenciada por maior densidade celular, menor número de células retraídas e melhor organização da monocamada.

DISCUSSÃO

8 DISCUSSÃO

Inicialmente, a caracterização *in silico* do perfil farmacocinético e toxicológico do derivado tiofênico 6CN07 foi conduzida como etapa fundamental no processo de desenvolvimento racional de candidatos a fármacos, uma vez que propriedades inadequadas relacionadas à absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (ADMET) estão entre os principais fatores de insucesso durante o desenvolvimento e transição entre fases pré-clínicas e clínicas na pesquisa de novos fármacos (WU et al., 2020).

No presente estudo, o 6CN07 exibiu peso molecular inferior a 500 Da, alinhado às características físico-químicas clássicas associadas a melhor absorção oral e distribuição tecidual. Na literatura, compostos com peso molecular <500 Da são historicamente correlacionados a maior probabilidade de sucesso em perfis de ADME, uma vez que baseado na Regra dos Cinco de Lipinski (Ro5) têm maior probabilidade de ser um composto bem absorvido pelo organismo (BENET et al., 2016; IVANOVIC et al., 2020).

A superfície polar topológica (TPSA) de 64,39 Å² indica que o 6CN07 possui polaridade compatível com absorção oral eficiente e potencial permeabilidade ao sistema nervoso central (SNC), pois valores de TPSA <140 Å² estão fortemente associados a absorção intestinal e valores <90 Å² favorecem a penetração da barreira hematoencefálica (BBB), ou seja, quanto maior a superfície, maior a dificuldade em ultrapassar a barreira hematoencefálica, característica não vista no derivado do presente estudo e, portanto, favorável à ação no SNC. Corroborando esse achado, a relação equilibrada entre doadores e aceptores de ligações de hidrogênio reforça esse perfil, apontando para uma molécula suficientemente permeável, sem a polaridade excessiva que comprometeria sua difusibilidade entre membranas (JANICKA et al., 2024).

O valor de LogP consensual para o derivado tiofênico foi de 5,08. Esse parâmetro avalia a quão lipofílica e o valor obtido é indicativo de que a molécula parece ser dotada de lipofilicidade relativamente elevada, o corrobora com a hipótese de que o 6CN07 apresenta boa permeabilidade através de membranas biológicas e distribuição em compartimentos lipídicos, mas simultaneamente pode limitar a solubilidade em meio aquoso (DAINA et al., 2017).

No que tange ao efeito do 6CN07 no SNC, as predições geradas pela plataforma PhaKinPro indicaram que o composto possui elevada probabilidade de apresentar efeito no sistema nervoso central. Esse resultado sugere que o perfil estrutural do derivado tiofênico

apresenta boa previsibilidade do comportamento farmacocinético para o SNC, baseado em bancos de dados farmacocinéticos já registrados (RATH et al., 2024).

A plataforma PhaKinPro também indicou que o derivado tiofênico apresentou permeabilidade à barreira hematoencefálica (BHE) de 62,0%, situada dentro do domínio de aplicabilidade do modelo escolhido, indicando que o composto parece ser capaz de se difundir através da barreira hematoencefálica. Esse achado, entretanto, é divergente em relação à predição realizada pelo *SwissADME*, que indicou uma ausência de permeabilidade frente a BHE. Essa discrepância pode ser justificada devido à natureza dos algoritmos aplicados em cada software. O *SwissADME* utiliza o modelo BOILED-Egg que impõe um limite de corte rigoroso baseado na lipofilicidade quando $\text{Log P} > 5,0$. Por outro lado, o PhaKinPro adota uma abordagem multivariada que considera relações estruturais e o núcleo tiofeno (RATH et al., 2024). Diante deste cenário contraditório, o valor de TPSA obtido se torna um descritor crítico, por estar significativamente abaixo do limiar de 70 – 90 Å². Ele fundamenta a viabilidade termodinâmica da difusão passiva através da BHE vista em ambos os softwares. A penalização imposta pelo *SwissADME* devido ao LogP elevado reflete uma cautela do modelo quanto à solubilidade, mas não necessariamente à capacidade intrínseca de permeação (DAINA et al., 2017). Logo, os efeitos farmacológicos observados nas metodologias *in vivo* resolvem o conflito, validando a acurácia do PhaKinPro e confirmando que as características lipofílicas do 6CN07, embora elevadas, são compatíveis com a difusibilidade na BHE.

Com relação ao metabolismo, a predição de inibição das isoformas do citocromo P450 (CYP1A2, CYP2C19 e CYP2C9) sugere um possível risco de interações medicamentosas, quando utilizado concomitantemente com fármacos metabolizados por essas enzimas. Em contrapartida, a ausência de inibição das isoformas CYP2D6 e CYP3A4 são achados especialmente relevantes dada a ampla participação do CYP3A4 no metabolismo de xenobióticos, uma vez que aproximadamente 65% dos fármacos aprovados pelo FDA são substrato, 30% inibidores e 5% indutores da CYP3A4 (HAKKOLA et al., 2020). Esses resultados indicam a necessidade de estudos experimentais adicionais para caracterizar melhor o efeito do 6CN07 sobre a atividade de enzimas envolvidas no metabolismo hepático.

A avaliação toxicológica *in silico* do derivado tiofênico 6CN07 não evidenciou riscos associados à mutagenicidade, tumorigenicidade, toxicidade reprodutiva ou potencial irritante nas análises conduzidas pelo OSIRIS Property Explorer. Esse perfil é particularmente relevante para as etapas iniciais do desenvolvimento de fármacos, principalmente para fármacos

sintéticos inéditos, nas quais predições negativas para esses *endpoints* são utilizadas como critérios de priorização de moléculas com maior probabilidade de segurança pré-clínica (BENIGNI et al., 2011). De forma complementar, a plataforma StopTox indicou baixo risco de toxicidade aguda oral e sistêmica para o 6CN07, ainda que com nível de confiança intermediário, resultado compatível com as limitações inerentes a modelos QSAR baseados exclusivamente em descritores estruturais (KHAN et al., 2019). Corroborando com esses achados, testes de toxicidade oral aguda realizados previamente por nosso grupo (dados não publicados) mostraram que a DL₅₀ oral do composto foi superior a 2000 mg/kg, sendo considerado seguro. A convergência desses achados com as predições obtidas pelo pkCSM reforça um perfil seguro para o composto, sustentando a progressão do 6CN07 para os ensaios complementares *in silico*, *in vitro* e *in vivo*.

Nesse contexto, a modelagem molecular (*docking molecular*) é um método *in silico* fundamental na pesquisa pré-clínica, pois prevê como as moléculas candidatas se ligam aos alvos biológicos, ajudando a selecionar e otimizar novos candidatos a fármacos e direcionar as melhores opções para análises *in vivo* e *in vitro* (PINZI and RASTELLI, 2019). Essa ferramenta é indispensável na química medicinal pois auxilia na identificação e validação de alvos moleculares, esclarecendo possíveis mecanismos de ação por meio da visualização de interações fármaco-proteína através da energia de ligação. A validação metodológica foi confirmada por *redocking*, considerado o pilar de validação metodológica em ensaios *in silico*, uma vez que consiste em um procedimento computacional que mimetiza a realidade biológica ao utilizar alvos estruturalmente estabilizados com seus ligantes co-cristalizados. Para tanto, utiliza-se os valores de RMSD (*Root Mean Square Deviation*) que mede distância média entre os átomos da pose predita e os da estrutura cristalográfica original. Valores inferiores a 2 Å asseguram a confiabilidade do protocolo e a reprodutibilidade das poses cristalográficas (PAGGI et al., 2024).

Dentre os alvos avaliados, 6CN07 demonstrou afinidade de ligação para o receptor GABA_A, mesmo que inferior ao diazepam. Esse resultado indicou estabilidade energética no sítio de ligação e sugeriu, desde a etapa preditiva, possível envolvimento da neurotransmissão GABAérgica no efeito ansiolítico-símile do derivado, como apresentado posteriormente nos estudos *in vivo*. Essa diferença de valores de escore de energia de ligação somado a análise dos mapas de interação molecular que revela padrões de interação distintos, sugerem que o composto-teste e o Diazepam parecem apresentar modos de ligação diferentes no receptor avaliado (BORGHESE et al., 2025; PUTHENKALAM et al., 2016). Essa possibilidade é

corroborada pelo fato do grupamento imina do 6CN07 apresentar interações do tipo hidrogênio com o resíduo Leu223 (2.71 Å), além de interações hidrofóbicas do tipo π -alquila com os resíduos Pro228, Met227, Leu231 e Ile305, e uma interação tipo alquila com o resíduo Arg284. Ademais, observou-se uma interação “*unfavorable donor-donor*” com o resíduo Ser280. Em contraste, é sabido que o padrão de interação do diazepam com o receptor GABA_A é caracterizado por interações do tipo carbono-hidrogênio com os resíduos Thr277 (2.39 Å) e Thr281 (2.40 Å), sítio benzodiazepínico do receptor (KIM et al., 2020). A literatura sustenta essa hipótese, uma vez que compostos podem modular o receptor GABA_A por resíduos alternativos, resultando em perfis farmacológicos diferenciados e, potencialmente, menor incidência de efeitos adversos associados como sedação excessiva e dependência, características presentes na classe dos benzodiazepínicos (ZHU et al., 2022).

Na sequência, com o objetivo de avaliar a interação do 6CN07 com alvos moleculares do sistema serotoninérgico, foi realizado o *docking* do composto frente aos receptores 5-HT_{1A} e 5-HT_{2A} e ao transportador VMAT₂. Os resultados demonstraram que o 6CN07 apresentou afinidade de ligação inferior, porém estável, à observada aos ligantes co-cristalizados WAY-100635 e buspirona, em relação ao receptor serotoninérgico 5-HT_{1A}. Esse resultado levanta a possibilidade da participação do receptor 5-HT_{1A}, no efeito do composto. Por outro lado, os resultados referentes ao receptor 5-HT_{2A}, demonstram que o 6CN07 apresentou score de energia de ligação próximo aos valores observados para cetanserina e maior que a energia do ligante co-cristalizado psilocina, indicando uma possível interação estrutural energeticamente favorável no sítio ortostérico do alvo. Esses achados direcionaram as hipóteses e, posteriormente, os objetivos deste estudo de que o sistema serotoninérgico, poderia participar do mecanismo de ação do derivado tiofênico 6CN07. A relevância desses alvos foi posteriormente corroborada *in vivo*, uma vez que o antagonismo com cetanserina reduziu significativamente o efeito ansiolítico observado, indicando relação funcional com o receptor 5-HT_{2A} e a possibilidade de um mecanismo multimodal para o derivado, dada a interação também favorável com o receptor GABA_A.

Ainda sobre a hipótese do envolvimento serotoninérgico no efeito do 6CN07, foi investigada a possibilidade do composto interagir com o transportador vesicular de monoaminas 2 (VMAT₂) e, conseqüentemente, modular a disponibilidade de serotonina na fenda sináptica. A predição neste alvo revelou que o 6CN07 apresentou afinidade de ligação inferior à do ligante co-cristalizado cetanserina, mas manteve as interações críticas conservadas, como a interação π -alquila com Val232 e a interação π -ânion com Glu312. Esses achados demonstram a

estabilidade do complexo e a diferença na energia de ligação pode sugerir que o VMAT₂ pode estar envolvido também no efeito do derivado aminotiofênico. Esses resultados estão em consonância com estudos prévios que descrevem derivados tiofênicos e 2-aminotiofenos como *scaffolds* versáteis capazes de estabelecer interações hidrofóbicas e eletrostáticas relevantes em alvos do sistema nervoso central, incluindo receptores ionotrópicos, metabotrópicos e transportadores (DEEP et al., 2021, THAREJA et al., 2023).

Os receptores 5-HT_{1A} e 5-HT_{2A} são amplamente expressos em regiões corticais e límbicas, como o córtex cingulado anterior (ACC), o córtex pré-frontal e a amígdala, desempenhando um papel central na regulação do humor, do medo e da ansiedade. São considerados naturalmente receptores inibitórios e excitatórios, respectivamente. Entretanto, sua ativação modula comportamentos complexos de forma distinta conforme o circuito acionado a jusante. Nesse contexto, o 5HT_{2A} é historicamente um alvo estratégico relevante terapia ansiolítica e antidepressiva. Enquanto sua ativação em interneurônios glutamatérgicos pode desencadear respostas ansiogênicas, a estimulação de interneurônios GABAérgicos promove um controle *top-down* essencial, onde o córtex modula a reatividade da amígdala frente ao estresse e modulação do medo (MIRANDA, 2024).

Atualmente, o receptor 5-HT_{2A} tem sido um alvo de grande interesse clínico, por ser o principal mediador de efeitos de compostos psicodélicos, como por exemplo da psilocibina e do LSD. Em ambientes experimentais, a ativação do 5-HT_{2A} por esses agentes tem sido associada a uma reorganização das redes neurais e aumento da plasticidade sináptica, resultando em melhorias significativas e duradouras em quadros de ansiedade severa e depressão resistente ao tratamento tradicional (FRYC et al., 2025). Nesse contexto, o composto 6CN07 emerge como um candidato promissor, visto que as análises de *docking* molecular demonstraram que o 6CN07 possui afinidade de ligação pelo receptor 5-HT_{2A}, sugerindo uma ancoragem estável e possível modulação serotoninérgica por esse receptor na resposta ansiolítica.

Os resultados obtidos nas metodologias *in silico* foram importantes para nortear a escolha e a realização das metodologias *in vivo*. Esse procedimento foi realizado visando correlacionar a participação dos receptores avaliados nos testes preditivos com os efeitos comportamentais decorrentes da administração oral do 6CN07 em camundongos.

É importante ressaltar que o derivado 6CN07 foi previamente avaliado quanto a toxicidade oral e DL₅₀. Os resultados indicaram que o composto, nas condições testadas, não apresentou quaisquer sinais de toxicidade, e a dose letal estimada foi maior que 2000 mg/kg.

Ademais, a análise microscópica de órgãos como fígado, rins, coração e cérebro não apresentou alterações. Com base na estimativa da DL_{50} , as doses escolhidas para o desenvolvimento do presente trabalho corresponderam a 2,5, 5, 10 e 20% da dose letal mediana. Esses dados foram obtidos através de experimentos prévios realizados pelo grupo de pesquisa, e ainda não foram publicados. Os testes de toxicidade e segurança são vitais na descoberta de fármacos, pois a previsão da toxicidade permite evitar efeitos indesejáveis, aumenta a segurança e reduz o custo total do desenvolvimento de medicamentos (AMORIM et al., 2024). Sendo um teste indispensável, a DL_{50} é um dos passos clássicos na toxicidade aguda *in vivo* para compreender a letalidade e classificar o risco toxicológico para danos em órgãos-alvo, pois seleciona compostos mais seguros para iniciar os testes pré-clínicos e guiar quais moléculas devem avançar nas pesquisas subjacentes (TONHOLO et al., 2023).

Selecionadas as doses, o efeito da administração oral do composto 6CN07 sobre o comportamento do tipo ansioso foi avaliado, inicialmente, no modelo do Labirinto em Cruz Elevado (LCE). Os resultados demonstraram que o composto-teste promoveu aumento significativo tanto no número de entradas quanto no tempo de permanência dos animais nos braços abertos do LCE, em todas as doses avaliadas, indicando possivelmente um efeito ansiolítico-símile. É importante destacar que não houve relação dose-efeito, sugerindo que o efeito máximo do composto parece ocorrer dentro da faixa de doses selecionada, mostrando a necessidade de mais estudos com doses menores do composto.

O Labirinto em Cruz Elevado (LCE) é um teste comportamental amplamente aplicado na psicofarmacologia como um modelo etológico de exploração espontânea e considerado o teste padrão-ouro para a investigação pré-clínica de compostos com efeito ansiolítico-símile, particularmente semelhantes à ação de fármacos benzodiazepínicos (PELLOW e FILE, 1986). O modelo fundamenta-se no conflito inerente de roedores entre a motivação para explorar um ambiente novo e o medo aversivo de áreas abertas e altas (LISTER, 1987).

Dado que os fármacos pertencentes à classe dos benzodiazepínicos apresentam efeitos indesejados como sedação e diminuição coordenação motora, é importante investigar a presença desses efeitos em testes específicos, uma vez que esses podem mascarar ou confundir a interpretação de um agente ansiolítico do tipo benzodiazepínico. Para tanto, foram aplicados os testes de Campo Aberto e Rota Rod com o objetivo de avaliar se o 6CN07, nas doses testadas, é capaz de diminuir a atividade locomotora e/ou a coordenação motora dos animais testados.

O teste do campo aberto constitui um dos modelos comportamentais mais utilizados para a avaliação da atividade locomotora e exploratória de possíveis novas substâncias com ação psicotrópica (Archer, 1973). Desenvolvido por Hall (1934), o campo aberto foi proposto para o estudo da emocionalidade em roedores, sendo amplamente empregado em estudos pré-clínicos na psicofarmacologia. O teste avalia a atividade locomotora e exploratória geral através dos parâmetros de número de cruzamentos entre os quadrantes (NC), número de *grooming* (comportamento de autolimpeza) e número de *rearing* (exploração vertical). Uma redução no número de cruzamentos sugere um efeito sedativo ou depressor do sistema nervoso central. Já um aumento no número de *grooming* é considerado como comportamento de estresse e/ou ansiedade, em contrapartida um elevado número de *rearing* é sugestivo de comportamento ansiolítico para exploração do novo ambiente (KRAEUTER et al., 2018).

O NC é considerado um índice de atividade locomotora, enquanto o NR indica número de elevações sobre as patas traseiras, como comportamento exploratório do animal (Costa-Lotufo et al., 2004). Enquanto que o NG é considerado o comportamento de autolimpeza em um ambiente novo permite inferir tanto o potencial estimulante ou depressor de uma determinada substância, quanto efeitos mais específicos, como aqueles relacionados à atividade do tipo ansiolítica ou sedativa (Olsen, 2000).

A análise dos parâmetros comportamentais no teste campo aberto revelou que o 6CN07 promoveu aumento da atividade exploratória geral, evidenciado pelo aumento do número de cruzamentos e de *rearing*, indicando ausência de prejuízo motor. Adicionalmente, a redução do comportamento de *grooming*, observada especialmente nas doses intermediárias, pode refletir diminuição do estado de ansiedade basal, uma vez que esse comportamento é frequentemente associado a respostas de estresse ou medo em roedores. Tomados em conjunto, esses achados são indicativos de um possível efeito ansiolítico, o que corrobora com os efeitos do composto observados no LCE.

Complementarmente, o teste do *rota-rod* é amplamente utilizado para avaliar o efeito de compostos diversos sobre a coordenação motora e o equilíbrio. Nele são avaliados o tempo de permanência do animal em uma barra cilíndrica em rotação constante, além do número de quedas. Um alto número de quedas (>3) sinalizam déficits motores ou relaxamento muscular excessivo, interferindo diretamente no tempo de permanência na barra giratória (DEACON, 2013).

Nesse teste, o diazepam, em sua maior dose, foi capaz de promover um aumento significativo no número de quedas e, consequentemente, uma redução do tempo de permanência dos animais na barra giratória, como descrito na literatura (BAILEY et al., 1996). De maneira diferente, o 6CN07 não induziu déficits motores nas doses avaliadas, reforçando a sua segurança no que se refere à ausência de efeito sobre a atividade locomotora e, em especial, sobre a coordenação motora. De forma conjunta, esses achados foram primordiais para justificar a seleção da dose intermediária (50 mg/kg) para a realização dos demais testes comportamentais, por representar uma dose eficaz, segura e farmacologicamente significativa em todos os testes realizados até o momento.

Por conseguinte, com o objetivo de analisar o envolvimento da via GABAérgica no mecanismo de ação do 6CN07, foi realizado o teste de antagonismo com Flumazenil, um antagonista competitivo de fármacos benzodiazepínicos. Os resultados demonstram que o efeito ansiolítico-símile induzido pelo derivado tiofênico 6CN07 foi parcialmente revertido pelo antagonista, sugerindo que o efeito do composto parece envolver, pelo menos em parte, a interação do derivado aminotiofênico com o receptor GABA_A. Essa hipótese foi corroborada pelos estudos *in silico* que demonstraram que o 6CN07 apresenta afinidade de ligação ao receptor, ainda que possivelmente por um modo de interação distinto do sítio benzodiazepínico clássico, hipótese compatível com os dados de *docking* molecular previamente apresentados.

Esses achados foram confirmados posteriormente no modelo da Caixa Claro-Escuro. Este modelo etológico é fundamentado na fobia inata dos roedores por ambientes claros e abertos. Diferentemente do LCE, que é considerado um modelo padrão-ouro para a triagem de fármacos benzodiazepínicos, a caixa claro-escuro demonstra uma sensibilidade farmacológica mais ampla, sendo muito aplicada na prospecção de compostos com efeito ansiolítico que envolva o sistema serotoninérgico (BOURIN, 2003). Nele, os parâmetros avaliados consistem no número de entradas no compartimento claro e o tempo de permanência nesse compartimento, que se mantém constantemente iluminado.

Os resultados obtidos no modelo da CCE mostraram que o 6CN07 aumentou tanto o número de entradas, quanto o tempo de permanência dos animais no compartimento claro. Esse efeito também foi parcialmente revertido pelo flumazenil, reforçando o envolvimento da neurotransmissão GABAérgica em diferentes paradigmas comportamentais. Os achados anteriormente descritos são compatíveis, com o estudo de Fortes e colaboradores (2013), que demonstraram o envolvimento da via GABAérgica no efeito ansiolítico-símile derivado 2-

aminotiofênico 5TIO1 quando aplicados os mesmos testes etológicos para essa classe de compostos (FORTES et al., 2013a). esses achados reforçam, ainda mais, os resultados obtidos nos testes *in vivo* e *in silico*.

Além do receptor GABA_A, os estudos *in silico* também apontaram uma interação favorável entre o composto 6CN07 e o receptor 5-HT_{2A}. Para confirmar esse achado, foi realizado o teste de antagonismo com cetanseria, um antagonista competitivo do receptor 5-HT_{2A}. Para tanto, os animais tratados foram submetidos aos modelos do LCE e CCE, como discutidos previamente. Os resultados demonstram que, nos dois modelos estudados, o efeito ansiolítico-símile do 6CN07 foi antagonizado pelo pré-tratamento com cetanserina, sugerindo o envolvimento da via serotoninérgica na ação do composto.

No teste do Labirinto em Cruz Elevado (LCE), a bupirona apresentou o perfil esperado de aumento nos parâmetros ansiolíticos, efeito que foi completamente revertido pelo pré-tratamento com cetanserina, validando o modelo experimental para investigação da sinalização serotoninérgica. De maneira semelhante, o 6CN07 promoveu aumento significativo do número de entradas e do tempo de permanência nos braços abertos, efeitos que foram significativamente reduzidos com o bloqueio dos receptores 5-HT₂, sugerindo que a ativação dessa via contribui de forma crítica para o seu mecanismo de ação.

O mesmo padrão de antagonismo foi reproduzido no teste da Caixa Claro-Escuro (CCE), no qual a cetanserina reduziu de maneira abrupta os efeitos da bupirona e do 6CN07 sobre os parâmetros de exploração do compartimento claro, corroborando a participação serotoninérgica em diferentes paradigmas comportamentais de ansiedade. Essa interpretação é corroborada pelos dados de *docking* molecular, que indicaram afinidade favorável do 6CN07 por alvos serotoninérgicos e gabaérgicos, sustentando a hipótese de que o composto atue como modulador funcional dessas vias.

Compostos ansiolíticos com modulação da via serotoninérgica, como ISRS, IRSN e o agonista parcial 5-HT_{1A}, bupirona, são frequentemente aplicados no tratamento da ansiedade pois promovem aumento da disponibilidade de serotonina ou ativação direta de receptores 5-HT_{1A}. Em modelos comportamentais como o labirinto em cruz elevado (LCE) e a caixa claro-escuro (CCE), esses fármacos promovem aumento do tempo e da exploração em áreas que seriam naturalmente aversivas, como os braços abertos ou compartimento claro, sugerindo um possível efeito ansiolítico nos roedores submetidos. Enquanto ISRS e IRSN frequentemente dependem de administração repetida para expressão plena dos efeitos, a bupirona apresenta

ação direta sobre receptores serotoninérgicos, reforçando o papel da neurotransmissão serotoninérgica na modulação do comportamento tipo-ansioso neste tipo de teste (GRIEBEL et al., 1997b; BORSINI et al., 2002).

Em conjunto, os achados acima descritos indicam que o efeito ansiolítico-símile do 6CN07 parece resultar de um mecanismo multimodal que envolve a participação dos receptores GABA_A e 5-HT_{2A}. Esse é um achado relevante visto que os fármacos atualmente disponíveis para o tratamento dos transtornos de ansiedade atuam por uma via de neurotransmissão apenas: os benzodiazepínicos, como o diazepam, exercem seus efeitos ao modularem alostericamente o receptor GABA_A, os inibidores seletivos da recaptação de serotonina, como a sertralina e fluoxetina, exercem seu efeito aumentando a concentração sináptica de serotonina e, a buspirona, promove seu efeito ao atuar como agonista parcial de receptores 5-HT_{1A}. É sabido que o receptor 5-HT_{2A} desempenha um papel fundamental na neurobiologia da ansiedade e da depressão, dada sua distribuição cortical e límbica. Sua ativação modula a excitabilidade neuronal, bem como o balanço entre neurotransmissão excitatória e inibitória, dependendo dos interneurônios envolvidos (FRYC et al., 2025). Nesse contexto, o 6CN07 ao agir em dois sistemas de neurotransmissão distintos, e igualmente relevantes para a neurobiologia da ansiedade, pode ter seu efeito ansiolítico-símile em detrimento de uma ação sinérgica que envolve a interação do composto com os receptores GABA_A e 5-HT_{2A}.

Ademais, dando continuidade na investigação do efeito ansiolítico-símile do 6CN07, foi realizado o modelo farmacológico de indução de comportamento tipo-ansioso com pentilenotetrazol (PTZ). O PTZ é quimicamente classificado como um derivado tetrazólico e atua como um potente antagonista não competitivo de receptores GABA_A, uma vez que se liga ao canal do íon cloreto e bloqueia a condutância necessária para levar à hiperpolarização celular e efeito inibitório (JUNG et al., 2002). Além do PTZ, há outros compostos como as beta-carbolinas, que promovem comportamentos do tipo ansioso, ao atuarem como agonistas inversos do receptor GABA_A no hipocampo e amígdala (WEI et al., 2022).

O PTZ é amplamente utilizado como agente pró-convulsivante por reduzir a neurotransmissão GABAérgica e, consequentemente, induzir hiperexcitabilidade neuronal, além de promover desequilíbrio redox e disfunção mitocondrial, condições frequentemente associadas tanto às epilepsias quanto aos transtornos de ansiedade. Dado seu mecanismo de ação dose-dependente, em doses baixas (30 mg/kg) o PTZ é empregado como indutor de

comportamento do tipo ansioso e, em doses mais altas, como pró-convulsivante (MONTEIRO et al., 2024).

Nesse contexto, foi avaliado o efeito ansiolítico-símile do 6CN07 frente à indução farmacológica de comportamento do tipo ansioso induzido por PTZ. Os resultados demonstraram que a administração de PTZ promoveu uma série de alterações nos parâmetros comportamentais avaliados no LCE e CCE, indicativos de um efeito ansiogênico. De maneira contrária, o pré-tratamento com 6CN07 preveniu as alterações comportamentais induzidas por PTZ, nos dois modelos avaliados. Este efeito pode ser decorrente, como mostrado pelas metodologias *in silico* e *in vivo*, da interação do composto teste com o receptor GABA_A, molécula-alvo da ação do PTZ. Dessa forma, esse é mais um dado que corrobora com o efeito ansiolítico-símile do derivado aminotiofênico, desta vez, observado em um modelo químico de indução de comportamento do tipo ansioso.

O PTZ, além de induzir alterações no comportamento do animal, também desenvolve dano neural uma vez que atua na ruptura entre o equilíbrio de neurotransmissão excitatória e inibitória. Ao bloquear os receptores tipo GABA_A, o tônus inibitório basal é reduzido e, como consequência, tem-se uma ativação dos receptores ionotrópicos do glutamato no neurônio pós-sináptico. Essa ativação promove um aumento rápido da condutância ao íon sódio, mediada inicialmente pelos receptores AMPA e cainato e, posteriormente, pelo receptor NMDA. Com isso, ocorre também um aumento exacerbado da condutância ao íon cálcio. O acúmulo de cálcio citosólico é papel chave para promover a excitotoxicidade glutamatérgica, uma vez que o íon ativa enzimas citosólicas, como fosfolipases, proteases e a isoforma indutível do óxido nítrico sintase (iNOS). A ativação da iNOS leva à produção de óxido nítrico que, a posteriori, é utilizado na geração de espécies reativas de nitrogênio (ERNS). É importante ressaltar que, durante a excitotoxicidade glutamatérgica as espécies reativas de oxigênio (EROS) também são formadas e, juntamente com as ERNS, promovem estresse oxidativo (MONTEIRO et al., 2024).

De modo a investigar como o tratamento com o 6CN07 responderia ao estresse oxidativo provocado pelo PTZ, os encéfalos dos animais utilizados nos experimentos foram dissecados e os hipocampus extraídos para a quantificação de marcadores não enzimáticos do estresse oxidativo, a saber: malondialdeído (MDA), nitrito e glutathiona reduzida (GSH).

Sabe-se que o estresse oxidativo é um ponto crucial em um cérebro ansioso, inclusive em modelos animais que mimetizam os transtornos de ansiedade, alterando o sistema redox,

principalmente no hipocampo e no córtex cerebral (RAMMAL *et al.*, 2008). Inicialmente foi observado que os grupos tratados isoladamente com PTZ apresentaram uma redução significativa na concentração de GSH e o pré-tratamento com o derivado aminotiofênico foi capaz de reestabelecer a concentração do marcador, corroborando com o fato de que o modelo experimental adotado pode desencadear um desequilíbrio redox e consequente consumo de antioxidantes endógenos no SNC (AKINDUKO *et al.*, 2024). Diante disso é importante enfatizar que o tratamento prévio com o 6CN07 foi capaz não apenas de prevenir a depleção de GSH, mas também de elevar os níveis desse marcador acima daqueles observados no grupo veículo, sugerindo que o composto testado apresenta efeito antioxidante que parece decorrer de um aumento da produção de antioxidantes endógenos. Esse achado é particularmente relevante, uma vez que a manutenção dos níveis de GSH é considerado um fator crítico para a neuroproteção frente a estímulos excitatórios induzidos pelo PTZ (AKDOGAN; YONGUC, 2011; MONTEIRO *et al.*, 2024).

A dosagem de nitrito, um marcador indireto da produção de óxido nítrico e de nitrosação tecidual, revelou que a administração de PTZ causou um aumento na concentração hipocampal desse marcador, mas o pré-tratamento com 6CN07 não foi capaz de prevenir tal fenômeno. Esse resultado pode ser um indicativo de que o efeito antioxidante do composto parece estar mais relacionado ao aumento da produção de moléculas endógenas com capacidade antioxidante, como o GSH, do que em neutralizar as espécies reativas de nitrogênio formadas durante o processo. Dito isso, são necessários mais testes que comprovem a veracidade dessa hipótese.

Por fim, foi realizada a análise da peroxidação lipídica por meio da quantificação de malonaldeído (MDA), produto da peroxidação lipídica, resultado da reação entre fosfolípidos de membrana e radicais livres gerados durante o estresse oxidativo (KROLOW *et al.*, 2014). De acordo com os resultados, não foi evidenciado um aumento na concentração do marcador nos grupos expostos ao PTZ. Isso pode ser decorrente de limitações temporais do modelo experimental, que emprega uma metodologia aguda, e o pico de formação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico pode ocorrer em período de tempo mais longo. Esses achados corroboram em parte com o trabalho de Fortes e colaboradores (2013) que analisaram a atividade antioxidante do derivado 2-aminotiofênico 5TIO1 através da peroxidação lipídica, níveis de óxido nítrico e outros marcadores do estresse oxidativo. De forma integrada, o perfil observado sugere que o principal efeito do 6CN07 está associado à preservação do sistema glutatona, mecanismo amplamente descrito como central na proteção neuronal (AOYAMA,

2021), e que pode contribuir para os efeitos comportamentais observados, sugerindo a hipótese de um papel neuroprotetor e ansiolítico-símile do composto.

Tomados em conjunto, os resultados obtidos nas dosagens bioquímicas de nitrito, GSH e MDA dificultam a realização de uma análise mais robusta acerca do efeito antioxidante da molécula teste. Esse fato pode ter ocorrido em função de o estímulo com pentilenotetrazol não ter sido forte ou duradouro o suficiente para gerar uma resposta pró-oxidante capaz de alterar significativamente a concentração de MDA, ou ao fato de o 6CN07 apresentar um efeito antioxidante mais limitado ao aumento da produção de antioxidantes endógenos, como a GSH, e não à neutralização das espécies reativas de nitrogênio e/ou oxigênio. Diante dessa limitação, é imperativa a realização de outras metodologias que possibilitem uma melhor compreensão do efeito do 6CN07 frente ao estresse oxidativo relacionado ao comportamento tipo ansioso no modelo utilizado.

Para melhor esclarecer e comprovar o efeito neuroprotetor anteriormente suscitado, o 6CN07 foi testado em cultura primária de células da glia, isoladamente ou na presença de glutamato em concentrações tóxicas. Inicialmente, os resultados obtidos demonstraram que o 6CN07 isoladamente, em concentrações inferiores a 20 μ M, não comprometeu a viabilidade células gliais, reforçando seu perfil neuroprotetor nas concentrações testadas. Por outro lado, a exposição das culturas a concentrações de glutamato superiores a 1 mM promoveu uma redução significativa da viabilidade celular, compatível com o estabelecimento de um quadro de excitotoxicidade, caracterizado por sobrecarga metabólica, disfunção mitocondrial e ativação de vias pró-oxidantes, mecanismos amplamente descritos na literatura (HAROON et al., 2016; NASIR et al., 2020; NICOSIA et al., 2024). Em contraste, o tratamento concomitante com o 6CN07, especialmente na concentração de 0,1 μ M, foi capaz de atenuar de forma significativa a perda de viabilidade induzida pelo glutamato, sugerindo um efeito citoprotetor associado possivelmente à preservação da atividade astrocitária e mitocondrial. Esse achado é reforçado pela análise morfológica, na qual se observa manutenção da integridade celular e da rede glial nas culturas tratadas com 6CN07 em associação ao glutamato, em oposição ao aspecto retraído, picnótico e desorganizado observado no grupo exposto apenas ao estímulo excitotóxico. Do ponto de vista mecanístico, a capacidade do 6CN07 de modular a resposta glial à excitotoxicidade pode estar relacionada à sua ação indireta sobre vias associadas ao estresse oxidativo, à homeostase redox e à função mitocondrial, processos nos quais os astrócitos desempenham papel central ao regular a captação de glutamato e a proteção neuronal (MAHMOUD, *et al.*, 2019; ZHOU *et al.*, 2023). Esse perfil é coerente com estudos prévios que

descrevem derivados tiofênicos como *scaffolds* capazes de exercer efeitos no Sistema Nervoso Central como anticonvulsivante, ansiolítico e antipsicótico (CHAWLA, *et al.*, 2023).

Tomados em conjunto, os dados obtidos através das metodologias aplicadas neste trabalho sugerem que o composto 6CN07 apresenta um importante potencial farmacológico como agente ansiolítico, cujo efeito parece decorrer, pelo menos em parte, de sua interação com os sistemas GABAérgico e serotoninérgico, do aumento da produção de compostos antioxidantes endógenos e consequente efeito neuroprotetor. Esses achados abrem várias perspectivas de estudos que permitam o melhor entendimento dos mecanismos anteriormente citados, bem como a investigação de outros mecanismos associados, como a neuroinflamação, por exemplo. Além disso, esses resultados sugerem que o 6CN07 também possa apresentar efeito em outros transtornos neuropsiquiátricos, como os transtornos de humor e as epilepsias.

CONCLUSÕES

9 CONCLUSÕES

As análises *in silico* indicaram que o composto possui características físico-químicas e farmacocinéticas compatíveis com fármacos de ação central, além de interações favoráveis com alvos envolvidos no tratamento dos transtornos de ansiedade, com destaque para receptores GABA_A e 5-HT_{2A}.

Nos estudos *in vivo*, o 6CN07 promoveu efeito ansiolítico-símile em camundongos submetidos aos testes comportamentais, sem induzir prejuízo locomotor ou déficit de coordenação motora, efeitos comumente observados com os fármacos benzodiazepínicos. A investigação farmacológica demonstrou que esse efeito parece envolver os sistemas de neurotransmissão GABAérgico, e serotoninérgico, corroborando com os dados de *docking* molecular.

Nos testes *in vitro*, o 6CN07 aumentou o conteúdo hipocampal de GSH em um modelo de comportamento tipo-ansioso induzido por PTZ, mas não foi capaz de neutralizar espécies reativas de nitrogênio formadas no processo. Esse perfil sugere que o efeito antioxidante do composto parece estar mais relacionado ao aumento da produção de compostos antioxidantes endógenos do que seu efeito sobre a formação de espécies reativas de nitrogênio e oxigênio.

Por fim, o derivado tiofênico contribuiu para a preservação da viabilidade celular glial frente a concentrações neurotóxicas do glutamato, sugerindo um efeito neuroprotetor que parece depender de uma ação indireta sobre vias associadas ao estresse oxidativo, à homeostase redox e à função mitocondrial.

De forma integrada, os resultados permitem concluir que o 6CN07 apresenta um mecanismo de ação multimodal, envolvendo a modulação de duas vias de neurotransmissão distintas, preservação parcial da homeostase redox e manutenção da integridade celular, o que sustenta seu potencial como candidato para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas no tratamento dos transtornos de ansiedade e, possivelmente, demais transtornos neuropsiquiátricos.

REFERÊNCIAS

10 REFERÊNCIAS

- AKINDUKO, A. A. et al. Assessment of the anxiolytic, antidepressant, and antioxidant potential of *Parquetina nigrescens* (Afzel.) Bullock in Wistar rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 321, p. 117597, 2024.
- ALBERNAZ, G. M. **Uso de inibidores seletivos de recaptação (ISR) no tratamento clínico do transtorno de ansiedade generalizada**. [S. l.: s. n.], 2021.
- ALBERT, P. R.; VAHID-ANSARI, F.; LUCKHART, C. Serotonin-prefrontal cortical circuitry in anxiety and depression phenotypes: pivotal role of pre- and post-synaptic 5-HT1A receptor expression. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 8, p. 199, 2014.
- ALI, H. Z. et al. Ambroxol's Role in PTZ-Induced Anxiety-Like Conditions in Mice: Targeting Neuroinflammation and Oxidative Stress via In Vivo and In Silico Approaches. **Molecular Neurobiology**, v. 63, 2025.
- ALMEIDA, Á. M. A. N. et al. The Biflavonoid Agathisflavone Regulates Microglial and Astrocytic Inflammatory Profiles via Glucocorticoid Receptor. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 30, n. 5, p. 1014, 2025.
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION (APA). **Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais: DSM-5**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.
- AMORIM, A. M. B. et al. Enhancing Drug Safety in Drug Development: Integrating Computational Predictions for Improved Toxicity Prediction. **Chemical Research in Toxicology**, v. 37, p. 827-849, 2024.
- AMR, A. E.-G. E. et al. Antiarrhythmic, serotonin antagonist and antianxiety activities of novel substituted thiophene derivatives synthesized from 2-amino-4, 5, 6, 7-tetrahydro-N-phenylbenzo[b]thiophene-3-carboxamide. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 12, p. 5935-5942, 2010.
- ANDERSEN, J. V. et al. Glutamate metabolism and recycling at the excitatory synapse in health and neurodegeneration. **Neuropharmacology**, v. 196, p. 108719, 2021.
- AOYAMA, K. Glutathione no cérebro. **Revista Internacional de Ciências Moleculares**, v. 22, 2021.

ARORA, I. et al. GABAergic implications in anxiety and related disorders. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 724, p. 150218, 2024.

ATMACA, M. et al. Antioxidant enzyme and malondialdehyde levels in patients with social phobia. **Psychiatry Research**, v. 159, n. 1-2, 2008.

BABAEV, O.; PILETTI CHATAIN, C.; KRUEGER-BURG, D. Inhibition in the amygdala anxiety circuitry. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 50, p. 1–16, 2018.

BAES, C. V. W.; JURUENA, M. F. Psicofarmacoterapia para o clínico geral. **Medicina (Ribeirão Preto)**, v. 50, n. supl. 1, p. 22-36, 2020.

BALDWIN, D. et al. Evidence-based pharmacological treatment of anxiety disorders, post-traumatic stress disorder and obsessive-compulsive disorder: a revision of the 2005 guidelines from the British Association for Psychopharmacology. **Journal of Psychopharmacology**, v. 28, n. 5, 2014.

BANDELOW, B. et al. The German Guidelines for the treatment of anxiety disorders: first revision. **European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience**, v. 272, n. 4, 2022.

BEHL, A. et al. Relationship of possible stress-related biochemical markers to oxidative/antioxidative status in obsessive-compulsive disorder. **Neuropsychobiology**, v. 61, n. 4, 2010.

BEIQUE, J. C. et al. Serotonergic regulation of membrane potential in developing rat prefrontal cortex. **Journal of Neuroscience**, v. 24, p. 4807–4817, 2004.

BENET, L. Z.; KRISHNAMURTHY, R.; BICKERTON, G. R. BDDCS, the rule of 5 and drugability. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 101, p. 89–98, 2016.

BENIGNI, R.; BOSSA, C. Mechanisms of chemical carcinogenicity and mutagenicity: a review with implications for predictive toxicology. **Chemical Reviews**, v. 111, n. 4, p. 2507-2536, 2011.

BERMAN, H. M. et al. The protein data bank. **Nucleic Acids Research**, v. 28, n. 1, p. 235-242, 2000.

BONADIMAN, C. et al. Depressive disorders in Brazil: results from the Global Burden of Disease Study 2017. **Population Health Metrics**, v. 18, n. Suppl 1, 2020.

BORCHESE, C. M. et al. A single main-chain hydrogen bond required to keep GABAA receptors closed. **Nature Communications**, v. 16, n. 1, p. 6107, 2025.

BORSINI, F.; PODHORNA, J.; MARAZZITI, D. Do animal models of anxiety predict anxiolytic-like effects of antidepressants?. **Psychopharmacology**, v. 163, n. 2, p. 121–141, 2002.

BOURIN, M.; HASCÖET, M. The mouse light/dark box test. **European Journal of Pharmacology**, v. 463, n. 1-3, p. 55-65, 2003.

BULUT, M. et al. Reduced PON1 enzymatic activity and increased lipid hydroperoxide levels that point out oxidative stress in generalized anxiety disorder. **Journal of Affective Disorders**, v. 150, n. 3, 2013.

CHAKRABORTY, P. et al. Glutamatergic neurotransmission: A potential pharmacotherapeutic target for the treatment of cognitive disorders. **Ageing Research Reviews**, v. 85, p. 101838, 2023.

CHAKRABORTY, S. et al. Correlation between lipid peroxidation-induced TBARS level and disease severity in obsessive-compulsive disorder. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 33, n. 2, 2009.

CHAUDHARY, A.; JHA, K.; KUMAR, S. Biological diversity of thiophene: a review. **Journal of Advanced Scientific Research**, v. 3, n. 3, p. 3-10, 2012.

CHEMAXON. **Marvinsketch** (v. 23.14) [Software]. 2023. Disponível em: <https://chemaxon.com/marvin>.

CHESNOKOVA, V.; PECHNICK, R.; WAWROWSKY, K. Chronic peripheral inflammation, hippocampal neurogenesis, and behavior. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 58, 2016.

CONNOR, T.; LEONARD, B. Depression, stress and immunological activation: the role of cytokines in depressive disorders. **Life Sciences**, v. 62, n. 7, 1998.

COSTALL, B.; NAYLOR, R. J. Behavioural interactions between 5-hydroxytryptophan, neuroleptic agents and 5-HT receptor antagonists in modifying rodent responding to aversive situations. **British Journal of Pharmacology**, v. 116, p. 2989–2999, 1995.

CRYAN, J. F.; SWEENEY, F. F. The age of anxiety: role of animal models of anxiolytic action in drug discovery. **British Journal of Pharmacology**, v. 164, n. 4, p. 1135-1161, 2011.

DA CRUZ, R. M. D. Thiophene-Based Compounds with Potential Anti-Inflammatory Activity. **Pharmaceutics**, v. 14, n. 7, p. 692, 2021.

DAINA, A.; MICHIELIN, O.; ZOETE, V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 42717, 2017.

DEACON, R. Measuring motor coordination in mice. **Journal of Visualized Experiments**, n. 75, p. e2609, 2013.

DEEP, A.; NARASIMHAN, B. Thiophene Scaffold as Prospective Central Nervous System Agent: A Review. **Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 2, p. 158-164, 2016.

DENG, Y. et al. Gentiopicroside abrogates lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior in mice through tryptophan-degrading pathway. **Metabolic Brain Disease**, v. 33, n. 5, 2018.

DIAS, A. G. et al. Nanostructured lipid carriers containing norfloxacin and 2-aminothiophene derivative reduces fluoroquinolone resistance in multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* strains by efflux pump inhibition. **Pharmaceutics**, v. 18, n. 2, p. 183, 2026.

EDINOFF, A. et al. Selective Serotonin Reuptake Inhibitors and Adverse Effects: A Narrative Review. **Neurology International**, v. 13, n. 3, 2021.

ELSAID, S. et al. A proton magnetic resonance spectroscopy (1H MRS) pilot study revealing altered glutamatergic and gamma-aminobutyric acid (GABA)ergic neurotransmission in social anxiety disorder (SAD). **International Journal of Molecular Sciences**, v. 26, n. 14, p. 6915, 2025.

EMHAN, A. et al. Evaluation of oxidative and antioxidative parameters in generalized anxiety disorder. **Psychiatry Research**, v. 230, n. 3, 2015.

FAGAN, H.; BALDWIN, D. Pharmacological treatment of generalized anxiety disorder: current practice and future perspectives. **Expert Review of Neurotherapeutics**, v. 23, n. 6, p. 535-548, 2023.

FIORE, M. et al. Exploratory and displacement behavior in transgenic mice expressing high levels of brain TNF-alpha. **Physiology & Behavior**, v. 63, n. 4, 1998.

FORTES, A. C. et al. Anxiolytic Properties of New Chemical Entity, 5TIO1. **Neurochemical Research**, v. 38, n. 4, p. 726–731, 2013a.

FORTES, A. C. et al. Is oxidative stress in mice brain regions diminished by 2-[(2,6-dichlorobenzylidene)amino]-5,6-dihydro-4H-cyclopenta[b]thiophene-3-carbonitrile? **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2013, p. 194192, 2013b.

FREITAS, J.; PEREIRA, C.; MERENCIANO, L. O uso inadequado de benzodiazepínicos e seus efeitos colaterais. **Global Academic Nursing Journal**, v. 3, 2022.

FRYC, M. et al. Serotonin 2A receptor (5-HT_{2A}) as an evolving biological target: Function, structure, ligands and role in the therapy of neuropsychiatric diseases. **Neuropharmacology**, v. 279, p. 110622, 2025.

GARCIA-GARCIA, A. L. et al. 5-HT_{1A} receptors in mood and anxiety: recent insights into autoreceptor versus heteroreceptor function. **Psychopharmacology**, v. 231, p. 623–636, 2014.

GRAEFF, F. Anxiety, panic and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 29, n. Supl 1, 2007.

GRIEBEL, G.; HOLMES, A. 50 years of hurdles and hope in anxiolytic drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 12, n. 9, 2013a.

GRIEBEL, G. et al. A comparative study of the effects of selective and non-selective 5-HT₂ receptor subtype antagonists in rat and mouse models of anxiety. **Neuropharmacology**, v. 36, n. 6, p. 793–802, 1997b.

GUO, B. et al. Neuroinflammation mechanisms in neuromodulation therapies for anxiety and depression. **Translational Psychiatry**, v. 13, n. 1, p. 5, 2023.

HAKKOLA, J. et al. Inhibition and induction of CYP enzymes in humans: an update. **Archives of Toxicology**, v. 94, n. 11, p. 3671–3722, 2020.

HALLIWELL, B. **Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now?**. *Journal of Neurochemistry*, v. 97, n. 6, 2006.

HARDINGHAM, G. E.; BADING, H. Synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor signalling: implications for neurodegenerative gene-regulation and cell death. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 11, p. 682–696, 2010.

- HAROON, E.; MILLER, A. H.; SANACORA, G. Inflammation, Glutamate, and Glia: A Trio of Trouble in Mood Disorders. **Neuropsychopharmacology**, v. 42, n. 1, p. 193–215, 2016.
- HARRO, J. Animals, anxiety, and anxiety disorders: How to measure anxiety in rodents and why. **Behavioural Brain Research**, v. 352, p. 81-93, 2018.
- HILBERT, K.; LUEKEN, U.; BEESDO-BAUM, K. Neural structures, functioning and connectivity in Generalized Anxiety Disorder. **Journal of Affective Disorders**, v. 158, 2014.
- HUR, J. et al. Anxiety and the Neurobiology of Temporally Uncertain Threat Anticipation. **Journal of Neuroscience**, v. 40, n. 41, p. 7949-7964, 2020.
- IVANOVIĆ, M. M. et al. Molecular Docking and In Silico ADME Prediction of New 2-Substituted-4,5,6,7-Tetrahydrobenzo[b]thiophene-3-carbonitrile Derivatives. **Chemia Naissensis**, v. 3, n. 1, p. 171-190, 2020.
- JACOBSON, N.; NEWMAN, M. Avoidance mediates the relationship between anxiety and depression over a decade later. **Journal of Anxiety Disorders**, v. 28, n. 5, 2014.
- JANICKA, M. et al. Modeling the Blood-Brain Barrier Permeability of Potential Heterocyclic Drugs via Biomimetic IAM Chromatography Technique Combined with QSAR Methodology. **Molecules**, v. 29, n. 2, p. 287, 2024.
- JOMOVÁ, K. et al. Reactive oxygen species, toxicity, oxidative stress, and antioxidants: chronic diseases and aging. **Archives of Toxicology**, v. 97, p. 2499–2574, 2023.
- JULIAN, L. Measures of anxiety: State-Trait Anxiety Inventory (STAI). **Arthritis Care & Research**, v. 63, n. Suppl 11, 2011.
- JUNG, M.; LAL, H.; GATCH, M. B. The discriminative stimulus effects of pentylentetrazol as a model of anxiety: recent developments. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 26, n. 4, p. 429-439, 2002.
- KANG, H. et al. Structural basis for channel gating and blockade in tri-heteromeric GluN1-2B-2D NMDA receptor. **Neuron**, v. 113, n. 7, 2025.
- KAPCZINSKI, F.; QUEVEDO, J.; IZQUIERDO, I. **Bases Biológicas dos Transtornos Psiquiátricos: uma abordagem translacional**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.
- KATZUNG, B. G.; VANDERAH, T. W. **Farmacologia básica e clínica**. 15. ed. Porto Alegre: ArtMed, 2023. *E-book*.

- KIM, J. J. et al. Shared structural mechanisms of general anaesthetics and benzodiazepines. **Nature**, v. 585, n. 7824, p. 303-308, 2020.
- KINTZER, A. F. et al. Structural basis for activation of voltage sensor domains in an ion channel TPC1. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 115, n. 39, p. E9095-E9104, 2018.
- KOEN, N.; STEIN, D. J. Pharmacotherapy of anxiety disorders: a critical review. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 13, n. 4, 2011.
- KRAEUTER, A.; GUEST, P.; SARNYAI, Z. The Open Field Test for Measuring Locomotor Activity and Anxiety-Like Behavior. **Methods in Molecular Biology**, v. 1916, p. 99-103, 2018.
- KROLLOW, R. et al. Oxidative imbalance and anxiety disorders. **Current Neuropharmacology**, v. 12, n. 2, p. 193–204, 2014.
- KRYSTAL, J. et al. Potential psychiatric applications of metabotropic glutamate receptor agonists and antagonists. **CNS Drugs**, v. 24, n. 8, 2010.
- KUMAR, R. et al. Cyclic enaminone as new chemotype for selective cyclooxygenase-2 inhibitory, anti-inflammatory, and analgesic activities. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 182, 2019.
- KUNDA, P. K. et al. Synthesis, anticonvulsant activity and in silico studies of Schiff bases of 2-aminothiophenes via guanidine-catalyzed Gewald reaction. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 12, n. 4, p. 566-576, 2013.
- LACK, C. W. Anxiety Disorders: Diagnoses, Clinical Features, and Epidemiology. **The Psychiatric Clinics of North America**, v. 47, n. 4, p. 613-622, 2024.
- LENICOV, F. R. et al. Cell-type specific induction of tryptophan hydroxylase-2 transcription by calcium mobilization. **Journal of Neurochemistry**, v. 103, p. 2047–2057, 2007.
- LISTER, R. G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology**, v. 92, n. 2, p. 180-185, 1987.
- LIU, J. et al. Estimation of the Global Disease Burden of Depression and Anxiety between 1990 and 2044. **Healthcare (Basel)**, v. 12, n. 17, 2024.
- LORD, K. et al. Social criticism moderates the relationship between anxiety and depression 10 years later. **Journal of Affective Disorders**, v. 274, 2020.

MAGDALENO ROMAN, J. Y.; CHAPA GONZÁLEZ, C. Glutamate and excitotoxicity in central nervous system disorders. **Neuroprotection (Chichester)**, v. 2, n. 2, p. 137–150, 2024.

MAHIMA; MAZUMDER, A.; PENTELA, B. Future Directions in Anxiolytic Therapy: A Comprehensive Review of Novel Targets and Strategies. **Current Neurovascular Research**, v. 22, n. 2, p. 115-136, 2025.

MAHMOUD, S. et al. Astrocytes Maintain Glutamate Homeostasis in the CNS by Controlling the Balance between Glutamate Uptake and Release. **Cells**, v. 8, n. 2, p. 184, 2019.

MALÉZIEUX, M.; KLEIN, A. S.; GOGOLLA, N. Neural Circuits for Emotion. **Annual Review of Neuroscience**, v. 46, p. 211-231, 2023.

MATTER; FRANCA, C. I. F. **Psicofarmacologia: fundamentos práticos**. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 2006.

MCGRATH, T. et al. Emerging Evidence for the Widespread Role of Glutamatergic Dysfunction in Neuropsychiatric Diseases. **Nutrients**, v. 14, n. 5, p. 917, 2022.

MELLER, E. et al. 5-HT_{2A} receptor-mediated efflux of glutamate in rat cerebral cortex: an in vivo microdialysis study. **Neuropharmacology**, v. 43, n. 4, p. 575–581, 2002.

MELTZER, H. Y.; FIBIGER, H. C. Olanzapine: A New Atypical Antipsychotic Drug. **Neuropsychopharmacology**, v. 14, n. 2, p. 83-85, 1996.

MILLAN, M. J. The neurobiology and control of anxious states. **Progress in Neurobiology**, v. 70, n. 2, p. 83-244, 2003.

MIRANDA, L. Antidepressant and anxiolytic effects of 5-HT_{2A} receptor activation in the anterior cingulate cortex and underlying theoretical mechanisms - A comprehensive review of the available literature. **Brain Research**, v. 1846, p. 149226, 2024.

MISHRA, R.; JHA, K. Synthesis, properties and biological activity of thiophene: a review. **Der Pharma Chemica**, v. 3, n. 4, p. 38-54, 2011.

MÖHLER, H. The GABA system in anxiety and depression and its therapeutic potential. **Neuropharmacology**, v. 62, n. 1, p. 42–53, 2012.

MOLEXUS. **Molegro Virtual Docker (Version 6.0)** [Software]. 2013.

MONTEIRO, Á. B. et al. Pentylentetrazole: a review. **Neurochemistry International**, v. 180, p. 105841, 2024.

NASIR, M. et al. Glutamate Systems in DSM-5 Anxiety Disorders: Their Role and a Review of Glutamate and GABA Psychopharmacology. **Frontiers in Psychiatry**, v. 11, p. 548505, 2020.

NGUYEN, T.-T.-L. et al. Pharmaceutical formulations with P-glycoprotein inhibitory effect as promising approaches for enhancing oral drug absorption and bioavailability. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 7, p. 1103, 2021.

OPAS. **Boletim Epidemiológico de Saúde Mental**, Semana 51, 2020.

OPAS. **Pandemia de COVID-19 desencadeia aumento de 25% na prevalência de ansiedade e depressão em todo o mundo**. [S. l.]: OPS/OMS, 2024.

ORAIN, D. et al. 6-Amino quinazolinone sulfonamides as orally active competitive AMPA receptor antagonists. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 22, n. 2, p. 996-999, 2012.

PAGGI, J. M.; PANDIT, A.; DROR, R. O. The Art and Science of Molecular Docking. **Annual Review of Biochemistry**, v. 93, p. 389–410, 2024.

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

PANG, X. et al. Altered neural circuit dynamics between the limbic and prefrontal/default mode network in patients with generalized anxiety disorder. **NeuroImage: Clinical**, v. 43, p. 103640, 2024.

PELLOW, S.; FILE, S. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: A novel test of anxiety in the rat. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 24, p. 525-529, 1986.

PENG, L.; MORFORD, K.; LEVANDER, X. Benzodiazepines and Related Sedatives. **The Medical Clinics of North America**, v. 106, n. 1, p. 113-129, 2022.

PILLAI, S. et al. Anti-inflammatory effects of selective serotonin reuptake inhibitors: implications for neuropsychiatric disorders. **CNS Spectrums**, v. 22, n. 1, 2017.

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

PUTEROVA, Z. et al. Gewald reaction: synthesis, properties and applications of substituted 2-aminothiophenes. **Chemical Papers**, v. 64, n. 3, p. 209-246, 2010.

PUTHENKALAM, R. et al. Structural Studies of GABAA receptor binding sites. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 9, 2016.

QIN, X. et al. GABAA(δ) receptor hypofunction in the amygdala-hippocampal circuit underlies stress-induced anxiety. **Science Bulletin**, v. 67, n. 1, p. 97–110, 2022.

QUEMEL, G. K. C. et al. Revisão integrativa da literatura sobre o aumento no consumo de psicotrópicos em transtornos mentais como a depressão. **Brazilian Applied Science Review**, v. 5, n. 3, p. 1384-1403, 2021.

RATH, M. et al. Pharmacokinetics Profiler (PhaKinPro): Model Development, Validation, and Implementation as a Web Tool for Triaging Compounds with Undesired Pharmacokinetics Profiles. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 67, n. 8, p. 6508-6518, 2024.

RIAZA BERMUDO-SORIANO, C. et al. New perspectives in glutamate and anxiety. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, v. 100, n. 4, p. 668-674, 2012.

ROCHER, C. et al. 5-HT_{2A} receptor-mediated stimulation of corticostriatal glutamatergic transmission: an in vivo electrochemical study. **Journal of Neurochemistry**, v. 72, n. 3, p. 1320–1323, 1999.

RODGERS, R. J.; DALVI, A. Anxiety, defence and the elevated plus-maze. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 21, n. 6, p. 801-810, 1997.

SADOCK, B. J. **Compêndio de Psiquiatria**. 11. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

SANACORA, G. et al. Towards a glutamate hypothesis of depression. **Neuropharmacology**, v. 62, n. 1, p. 91-98, 2012.

SANAROVA, E. V. et al. Using polysorbates to create parenteral dosage forms of hydrophobic substances: a review. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v. 56, n. 7, p. 974–978, 2022.

SANDER, T. et al. DataWarrior: an open-source program for chemistry aware data visualization and analysis. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 55, n. 2, p. 460-473, 2015.

SANDER, T. **Openmolecules.Org**. Disponível em: <https://openmolecules.org/about.html>.

SIES, H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. **Experimental Physiology**, v. 82, n. 2, p. 291-295, 1997.

SILVA, A. J. da et al. Orofacial antinociceptive effect of a novel 2-amino-thiophene derivative and its possible targets of action. **Brazilian Oral Research**, v. 39, p. e099, 2025.

SIMPSON, D.; OLIVER, P. Geração de ROS na microglia. **Antioxidants**, v. 9, 2020.

SOUZA, B. da C. C. **Síntese e Avaliação das Atividades Antifúngica e Antitumoral de Novos Derivados 2-[(arilideno)amino]-cicloalquil[b]tiofeno-3-carbonitrila**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2011.

STAHL, S. M. **Psicofarmacologia: bases neurocientíficas e aplicações práticas**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2019.

STRAWN, J. R. et al. Adverse effects of antidepressant medications and their management in children and adolescents. **Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy**, v. 43, n. 8, p. 675-690, 2023.

SWISS INSTITUTE OF BIOINFORMATICS. **SwissADME: SwissDrugDesign**. Disponível em: <http://www.swissadme.ch>.

THAREJA, S. et al. Recent Advances in the Synthesis and Biological Activity of Thiophene Derivatives. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 23, n. 15, 2023.

TIETZE, L. F. et al. **Reactions and syntheses: in the organic chemistry laboratory**. [S. l.]: John Wiley & Sons, 2015.

TONHOLO, D. R. et al. Preclinical toxicity of innovative molecules: In vitro, in vivo and metabolism prediction. **Chemico-Biological Interactions**, v. 314, p. 108896, 2019.

VIOLETA, I. et al. Lipinski's rule of five, famous extensions and famous exceptions. **Chemia Naissensis**, v. 3, n. 1, p. 171–181, 2020.

WANG, C. et al. Immediate Psychological Responses and Associated Factors during the Initial Stage of the COVID-19 Epidemic. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 17, n. 5, p. 1729, 2020.

WANG, J. et al. GBD: incidence rates and prevalence of anxiety disorders, depression and schizophrenia. **Frontiers in Public Health**, v. 13, 2025.

WANG, R.; LAI, L.; WANG, S. Further development and validation of empirical scoring functions. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 16, n. 1, p. 11-26, 2002.

WARREN, A. L. et al. Structural pharmacology and therapeutic potential of 5-methoxytryptamines. **Nature**, v. 630, n. 8015, p. 237-246, 2024.

WAVEFUNCTION, INC. **Spartan (Version 14)** [Software]. 2014.

WEI, X. et al. FG7142 combined with restraint stress induces anxiogenic-like effects via downregulation gamma-aminobutyric acid type A receptor subunit alpha1 and 5-hydroxytryptamine 1A receptors expression in the hippocampus. **NeuroReport**, v. 33, n. 4, p. 145-152, 2022.

WEISSTAUB, N. V. et al. Cortical 5-HT_{2A} Receptor Signaling Moderates Anxiety-Like Behaviors in Mice. **Science**, v. 313, n. 5786, p. 536-540, 2006.

WU, F. et al. Computational Approaches in Preclinical Studies on Drug Discovery and Development. **Frontiers in Chemistry**, v. 8, art. 726, 2020.

WU, Y. et al. Trends in the epidemiology of anxiety disorders from 1990 to 2021. **Journal of Affective Disorders**, v. 373, p. 166-174, 2025.

XU, Z. et al. Psychedelics elicit their effects by 5-HT_{2A} receptor-mediated G_i signalling. **Nature**, v. 638, p. 1-9, 2026.

YU, S. P. et al. Acute and chronic excitotoxicity in ischemic stroke and late-onset Alzheimer's disease. **Neural Regeneration Research**, v. 20, n. 7, p. 1981-1988, 2025.

YUN, J. Y. et al. The left middle temporal gyrus in the middle of an impaired social-affective communication network in social anxiety disorder. **Journal of Affective Disorders**, v. 214, p. 53–59, 2017.

ZHANG, X. et al. Molecular insights into the design of potential heterocyclic drugs. **Molecules**, v. 29, n. 2, art. 0287, 2024.

ZHU, S. et al. Structural and dynamic mechanisms of GABA_A receptor modulators with opposing activities. **Nature Communications**, v. 13, 2022.

ZLATOVIĆ, M. V. et al. Interaction of arylpiperazine ligands with the hydrophobic part of the 5-HT_{1A} receptor binding site. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 9, p. 2994-3001, 2006.

ZUO, T. et al. An in vitro study on the stimulatory effects of extracellular glutamate on astrocytes. **Molecular Biology Reports**, v. 50, p. 6611–6617, 2023.