

Avaliação da Atividade Antinociceptiva e Anti-inflamatória em Camundongos do Derivado *N*-acilidrazona LASSBio-1587

In Mice Evaluation of Antinociceptive and Anti-inflammatory Activity of N-acylhydrazone Derivative LASSBio-1587

Juliane C. Silva,^{a,b,c} Raimundo G. Oliveira-Júnior,^a Mariana G. Silva,^a Erica M. Lavor,^{a,d} Juliana M. D. Soares,^a Sarah R. G. Lima-Saraiva,^a Tâmara C. Diniz,^{a,d} Maria Alice M. B. Medeiros,^{a,d} Lídia M. Lima,^a Eliezer J. Barreiro,^e Jackson Roberto G. S. Almeida^{a,d,*} 

^a Universidade Federal do Vale do São Francisco, Núcleo de Estudos e Pesquisas de Plantas Mediciniais, CEP 56304-205, Petrolina-PE, Brasil.

^b Universidade Estadual de Ciências da Saúde de Alagoas, Núcleo de Ciências Biológicas, CEP 57010-382, Maceió-AL, Brasil.

^c Centro Universitário CESMAC, Colegiado de Medicina, CEP 57160-000, Maceió-AL, Brasil.

^d Universidade Estadual de Feira de Santana, Campus de Feira de Santana, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, CEP 44036-900, Feira de Santana-BA, Brasil.

^e Universidade Federal do Rio de Janeiro, Campus Rio de Janeiro, Instituto de Ciências Biomédicas, CEP 21944-190, Rio de Janeiro-RJ, Brasil.

*E-mail: jackson.guedes@univasf.edu.br

Recebido em: 25 de Fevereiro de 2021

Aceito em: 01 de Junho de 2021

Publicado online: 27 de Setembro de 2021

Pain is one of the most common symptoms of a variety of diseases and can be described as an unpleasant sensory and emotional experience associated with actual or potential tissue damage. The inflammatory process corresponds to a protective response to an infection or injury and may increase pain sensitivity. Anti-inflammatory and analgesic drugs are widely used, however, many of them are not well tolerated due to their side effects, which encourages the search for new therapeutic alternatives. Thus, this paper describes the potential of LASSBio-1587, an *N*-acylhydrazone, to attenuate the nociception and inflammation in mice using the following methodologies: acetic acid induced abdominal writhing test, formalin test and migration of leukocytes in the peritoneal cavity. It was observed that LASSBio-1587 showed antinociceptive activity in acetic acid induced abdominal writhing test (inhibition of 81.61% and 85.91% at doses of 20 and 40 mg/kg, respectively) and formalin test (in the first phase showed inhibition of 56.24% and 53.95%, and in the second phase 90.23% and 93.49% for the doses of 20 and 40 mg/kg, respectively). In the carrageenan-induced peritonitis test, treatment with LASSBio-1587 (20 and 40 mg/kg) produced an inhibition of leukocyte migration of 63.46% and 74.30%, respectively, similarly to observed for dexamethasone. Therefore, it is suggested that this hydrazone derivative presents antinociceptive and anti-inflammatory activity, and that its action is mainly due to peripheral mechanisms, as the attenuation of the inflammatory response.

Keywords: *N*-acylhydrazones; pain; antinociceptive effect, inflammation; anti-inflammatory effect.

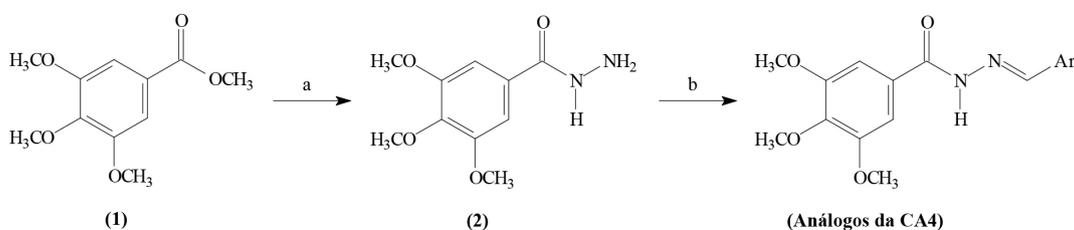
1. Introdução

O processo inflamatório corresponde a uma resposta protetora diante de uma infecção ou lesão, podendo gerar a eliminação da causa inicial da lesão celular e das células necróticas. A composição deste mecanismo de defesa é um sistema inato de respostas celulares e humorais.¹

A dor inflamatória resulta da sensibilização dos neurônios nociceptivos sensoriais primários.² Os fármacos utilizados para alívio ou cessar desta dor são os analgésicos. A ação analgésica central pode ser mediada por meio da inibição dos receptores da dor central, enquanto o efeito analgésico periférico pode ser mediado através da inibição da ciclooxigenase (COX) e/ou lipoxigenase (LOX), além de outros mediadores inflamatórios.³ Os analgésicos de ação central, como os opioides, a exemplo da morfina, compreendem fármacos capazes de aliviar a dor por atuarem em receptores de superfície celular no SNC, os receptores opioides.⁴ Contudo, o uso destes é restrito devido aos seus efeitos adversos, potencial de dependência e desenvolvimento de tolerância.^{5,6}

Em razão disto, a investigação de novos fármacos analgésicos e anti-inflamatórios com eficácia elevada e toxicidade reduzida é bastante incentivada atualmente. Dentre os métodos de desenvolvimento de fármacos, a alteração molecular é bastante promissora.⁷ Neste contexto, as *N*-acilidrazonas se mostram como uma importante classe de compostos químicos sintéticos, com diversas atividades biológicas descritas na literatura.⁸⁻¹⁵

Diante disto, o presente trabalho teve como objetivo investigar a atividade antinociceptiva e anti-inflamatória de uma nova *N*-acilidrazona (LASSBio-1587) em modelos experimentais utilizando camundongos.



Esquema 1. Obtenção de análogos da combretastatina A (CA4). Condições e reagentes: a) 80% aq. $N_2H_4 \cdot H_2O$, EtOH, refluxo, 2 h, 93%. b) ArCHO, EtOH, HCl (cat), r.t., 0,5-4 h. Adaptado da referência 16

2. Parte Experimental

2.1. Obtenção da série congênere de análogos da combretastatina A (CA4)

Inicialmente foi obtido o composto 3,4,5-trimetoxibenzoilidrazida (**2**). A uma solução de metil 3,4,5-trimetoxibenzoato (**1**) (2,00 g, 8,84 mmol) em metanol absoluto (26 mL), 8,56 mL (176,8 mmol) de hidrato de hidrazina 80% foram adicionados. A mistura da reação foi deixada sob refluxo durante 5 horas, quando uma análise por cromatografia em camada delgada (CCD) indicou o final da reação. Em seguida, o meio foi vertido em gelo e o precipitado resultante foi separado por filtração para se obter o 3,4,5-trimetoxibenzoilidrazida (**2**) como um sólido branco. Para a preparação dos análogos 3,4,5-trimetoxibenzoil-arilidrazonas (série congênere de análogos), a uma solução de **2** (0,2 g, 0,884 mmol) em etanol absoluto (7 mL) contendo uma gota de ácido clorídrico 37%, foram adicionados 0,884 mmol do derivado aldeído correspondente. A mistura foi agitada à temperatura ambiente até que a CCD indicasse o fim da reação (0,5-4 h). Em seguida, a mistura foi vertida em gelo e o precipitado foi separado por filtração e seco.¹⁶ O esquema 1 mostra as principais condições e reagentes utilizados no processo.

Foi obtida uma série contendo 13 compostos,¹⁶ entre eles, o LASSBio-1587 (Figura 1), que foi avaliado neste trabalho quanto à sua atividade antinociceptiva e anti-inflamatória.

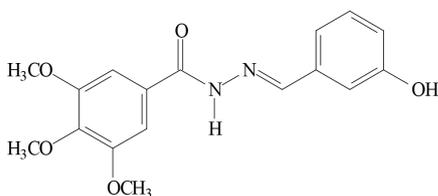


Figura 1. Estrutura química do LASSBio-1587

2.2. Animais

Foram utilizados camundongos albinos Swiss (*Mus musculus*) machos, pesando entre 35-40 g, provenientes do Biotério da Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF), Campus Ciências Agrárias. Os animais foram alojados em caixas de polipropileno contendo

no máximo 6 animais ($n = 6$), mantidos em ambiente com temperatura controlada (22 ± 1 °C), em um ciclo claro-escuro de 12 horas, com a fase de luz iniciando às 6:00 e terminando às 18:00 horas, com acesso livre a água e a ração comercial tipo “pellets” (Labina®). Todos os procedimentos foram conduzidos conforme os princípios éticos na experimentação animal de acordo com a Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNIVASF (autorização número 0013/021014) e os cuidados para o manuseio dos animais foram realizados de acordo com a International Association for the Study of Pain - IASP (Associação Internacional para o Estudo da Dor).

2.3. Teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético

O presente teste foi realizado de acordo com o método descrito por Collier et al. (1968) com alterações.¹⁷ Os camundongos foram separados em cinco grupos com seis animais cada ($n=30$). A nocicepção foi induzida com uma solução de ácido acético 0,9% por via intraperitoneal (i.p.) em um volume de 0,1 mL/10 g. Os camundongos foram tratados com LASSBio-1587 (20 e 40 mg/kg), ou com veículo (salina) aplicados por via oral (v.o.) 1 hora antes do agente nociceptivo. Indometacina (20 mg/kg) e morfina (10 mg/kg) foram usados como fármacos padrão, sendo injetados por via i.p. 30 minutos antes do ácido acético. O parâmetro observado foi o número de contorções abdominais (contração do abdômen, rotação pélvica, acompanhada de expansão dos membros posteriores), registrado entre 5 e 15 minutos após administração do ácido acético.^{18,6}

2.4. Teste da formalina

A metodologia foi realizada de acordo com Hunskaar & Hole (1987).¹⁹ A solução de formalina (2,5% em salina 0,9%) foi aplicada por via subplantar na pata posterior direita, em um volume de 20 μ L/pata.²⁰ Os camundongos foram analisados em uma câmara com um espelho montado em três lados para permitir a visão das patas, e o tempo (em segundos) gasto lambendo e mordendo a pata injetada foi avaliado como um indicador de dor. Esta resposta foi mensurada durante 5 minutos (primeira fase, dor neurogênica) e entre 15 e 30 minutos após a injeção da formalina (segunda fase, dor inflamatória).²¹ Os animais receberam veículo (salina, v.o.), LASSBio-1587 (20 e 40 mg/kg, v.o.), indometacina (20 mg/

kg, i.p.) e morfina (10 mg/kg, i.p.), aplicados 1 hora antes da injeção da formalina.⁶

2.5. Migração de leucócitos na cavidade peritoneal

Os camundongos foram separados em cinco grupos de seis animais cada ($n = 30$). A migração de leucócitos foi estimulada por injeção de carragenina (1%, i.p., 0,25 mL)²² na cavidade intraperitoneal 1 hora depois da aplicação de LASSBio-1587 (20 e 40 mg/kg, v.o.), veículo (salina, v.o.). Para a dexametasona (2 mg/kg, i.p.) a solução de carragenina foi injetada 30 minutos depois.²³ A migração de leucócitos foi aferida 4 horas após o estímulo, sendo os animais eutanasiados e as células da cavidade peritoneal foram coletadas com 3 mL de solução salina contendo 1 mM de EDTA. Prontamente, uma breve massagem foi realizada, e em seguida foi colhido o fluido peritoneal, que foi centrifugado (3000 rpm por 6 min) em temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e 300 μ L de EDTA foi acrescentado ao precipitado, do qual foi retirado uma alíquota de 10 μ L. Foi acrescentado 200 μ L de solução de Turk à alíquota e o total de células foi contado em uma câmara de Neubauer, em um microscópio óptico. Os resultados foram expressos como número de leucócitos/mL.^{24,6}

2.6. Análise estatística

Os dados foram avaliados no software Graph Pad Prism versão 6.0 (San Diego, CA, EUA) por análise de variância (ANOVA) one-way seguida pelo teste de Tukey. Os resultados estão apresentados como média \pm erro padrão da média (e.p.m) e as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

3. Resultados e Discussão

Para a avaliação da atividade antinociceptiva do LASSBio-1587 foi realizado inicialmente o teste de

contorções abdominais induzidas por ácido acético. A nocicepção induzida por ácido acético é um modelo químico de dor visceral que possui efeito periférico e não específico.²⁵ Este teste é uma resposta reflexa à irritação peritoneal e à peritonite produzidas pela injeção intraperitoneal de uma solução de ácido acético 0,9%, que se baseia na contagem das contorções da região abdominal seguidas de torção do tronco e extensão dos membros posteriores.^{6,26} Esta metodologia envolve liberação de serotonina, bradicinina, substância P e mediadores do sistema simpático.²⁷ O ácido acético administrado por via intraperitoneal também pode ativar canais catiônicos não-seletivos das vias aferentes.²⁵ Além disso, a liberação de prostanoídes, em geral, níveis elevados de PGE₂ e PGF2 α , bem como produtos da lipoxigenase em fluidos peritoneais têm sido associados a este método por alguns pesquisadores.^{6,28}

Nesse modelo experimental, observou-se que o tratamento com LASSBio-1587 (20 e 40 mg/kg) provocou uma redução estatisticamente significativa ($p < 0,05$) da nocicepção provocada pelo ácido acético, conforme demonstrado na Figura 2. LASSBio-1587 reduziu o número de contorções em 81,61% (20 mg/kg) e 85,91% (40 mg/kg), quando comparado ao grupo controle negativo. Indometacina e morfina demonstraram uma redução de 67,53% e 100% do número de contorções, respectivamente.

Conforme mencionado anteriormente, o teste de contorções abdominais é inespecífico e não permite identificar as vias nociceptivas específicas pelas quais o LASSBio-1587 poderia atuar. Dessa forma, a molécula foi submetida ao ensaio de nocicepção induzida pela formalina. O teste de formalina possui duas fases distintas. A primeira fase, também chamada de fase neurogênica, ocorre imediatamente após a injeção de formalina. Acredita-se que esta seja provocada pelo efeito da formalina diretamente sobre as fibras C, e ocorre liberação de substância P e bradicinina. A segunda fase, também chamada de fase inflamatória, inicia-se aproximadamente 20 min após a administração da formalina. Ela está relacionada ao desenvolvimento da resposta inflamatória e à liberação de

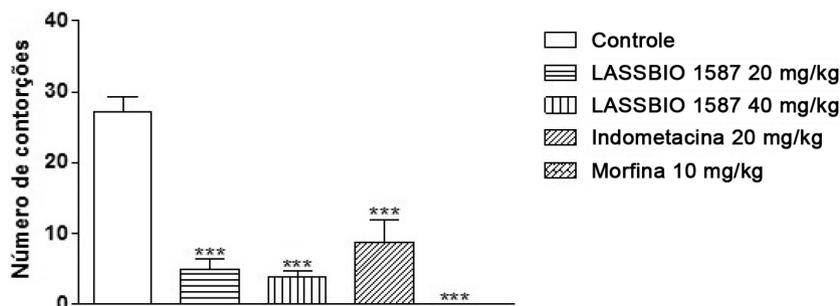


Figura 2. Efeito do LASSBio-1587 (20 e 40 mg/kg, v.o.), indometacina (20 mg/kg, i.p.) e morfina (10 mg/kg, i.p.) no teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos ($n=6$). Solução salina (controle negativo, v.o.) e LASSBio-1587 (20 e 40 mg/kg) foram administrados 60 minutos antes da injeção intraperitoneal de ácido acético 0,8% (v/v). Indometacina (20 mg/kg) e morfina (10 mg/kg) foram administradas 30 minutos antes da injeção intraperitoneal de ácido acético 0,9% (v/v). O número de contorções abdominais foi avaliado entre 5 e 15 minutos após administração do ácido acético. Os valores em cada coluna representam a média \pm e.p.m. do número de contorções abdominais. Foi realizado o teste ANOVA, seguido pelo pós-teste de Tukey. Valores significativos:

*** $p < 0,05$ versus controle

mediadores nociceptivos, na qual está envolvida a liberação de histamina, serotonina, prostaglandina e bradicinina. Os fármacos de ação central, como os analgésicos opioides, inibem igualmente a primeira e a segunda fase, já os de ação periférica, como os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) e os anti-inflamatórios esteroidais (AIEs) inibem apenas a segunda fase.²⁴

Nesse teste, o pré-tratamento com LASSBio-1587 nas doses de 20 e 40 mg/kg diminuiu ($p < 0,05$) em 56,24% e 53,95%, respectivamente, o tempo de lambida de pata na primeira fase e em 90,23% e 93,49%, respectivamente, na segunda fase do teste ($p < 0,05$) (Figura 3) quando comparados ao controle. Indometacina (20 mg/kg) e morfina (10 mg/kg) apresentaram atividade antinociceptiva nas duas fases ($p < 0,05$). Semelhante ao que foi observado após o tratamento com indometacina, o efeito farmacológico de LASSBio-1587 (20 e 40 mg/kg) foi mais pronunciado na segunda fase do teste de formalina, sugerindo que a atividade antinociceptiva da molécula esteja relacionada a sua capacidade de atenuar o processo inflamatório.

Estudos realizados anteriormente também demonstraram a atividade antinociceptiva de derivados hidrazônicos em modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético e/ou no teste de formalina, reafirmando que a combinação de hidrazonas com outros grupos funcionais melhora as propriedades biológicas e fornece moléculas farmacologicamente ativas.^{27,29-31} Estes trabalhos mostram a avaliação da atividade antinociceptiva e/ou anti-

inflamatória de novas isoxazolil-aril-hidrazonas, derivados indano-hidrazônicos e de de hidrazonas e semicarbazona derivadas do novo heterociclo pirrolidina[1,2-d][1,2,4]-2-oxadiazolina.

As estruturas químicas desses compostos não estão relacionadas com o LASSBio-1587, pois esse composto trata-se de uma *N*-acilidrazona. A avaliação da atividade antinociceptiva e anti-inflamatória do LASSBio-1586 (um derivado *N*-acilidrazona) em modelos experimentais em camundongos demonstrou que esse composto atenua o comportamento nociceptivo e a resposta inflamatória. LASSBio-1586 exibiu potente atividade anti-inflamatória. O estudo do mecanismo de ação demonstrou o possível envolvimento das vias de sinalização nitrérgica, serotoninérgica e histaminérgica. Estudo de docking molecular indicou que LASSBio-1586 é capaz de bloquear a enzima COX-2, reduzindo o metabolismo do ácido araquidônico e, conseqüentemente, diminuindo a produção de prostaglandinas, importantes mediadores inflamatórios.³¹ A semelhança nas estruturas químicas desses compostos mostra o potencial desse tipo de molécula quanto à atividade antinociceptiva e anti-inflamatória. Estudos posteriores poderão ser realizados, na tentativa de estabelecer uma relação estrutura-atividade entre os compostos.

Para investigar a possível ação anti-inflamatória do LASSBio-1587 foi realizado o teste de migração de leucócitos para a cavidade peritoneal induzida pela injeção de carragenina^{6,32}. A migração de leucócitos

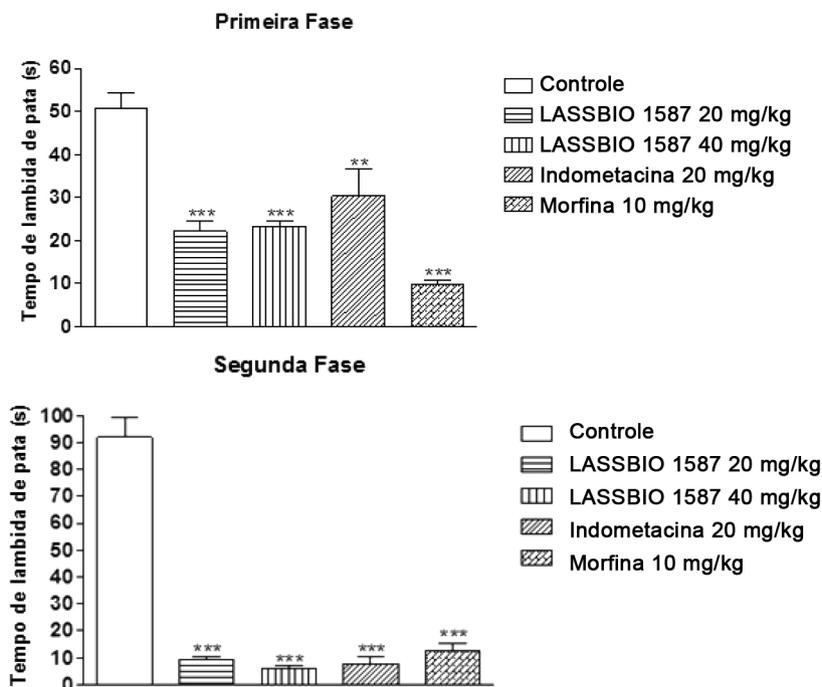


Figura 3: Efeito do LASSBio-1587 (20 e 40 mg/kg, v.o.), indometacina (20 mg/kg, i.p.) e morfina (10 mg/kg, i.p.) no teste da formalina (1ª e 2ª fases) em camundongos (n=6). Solução salina (controle negativo, v.o.), LASSBio-1587 (20 e 40 mg/kg), indometacina (20 mg/kg) e morfina (10 mg/kg) foram administrados 1 hora antes da injeção subplantar da formalina. O tempo (em segundos) gasto lambendo e mordendo a pata injetada foi avaliado durante 5 minutos (primeira fase, dor neurogênica) e entre 15 e 30 minutos após a injeção da formalina (segunda fase, dor inflamatória). Os valores em cada coluna representam a média \pm e.p.m. Foi realizado o teste ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. Valores significativos: *** $p < 0,05$ versus controle

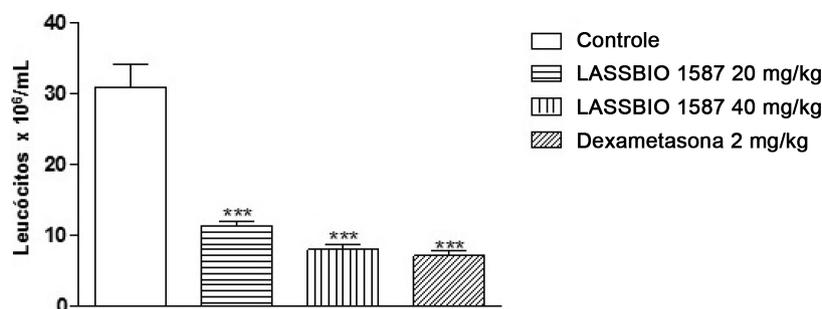


Figura 4: Efeito do LASSBio-1587 (20 e 40 mg/kg, v.o.) e da dexametasona (2 mg/kg, i.p.) na migração de leucócitos para a cavidade peritoneal induzida por carragenina em camundongos (n=6). A migração de leucócitos foi estimulada por injeção de carragenina (1%, i.p., 0,25 mL) na cavidade intraperitoneal 1 hora após a administração de LASSBio-1587 (20 e 40 mg/kg) e do veículo, e 30 minutos após a injeção de dexametasona (2 mg/kg). A migração de leucócitos foi avaliada 4 horas após o estímulo. Os valores em cada coluna representam a média ± e.p.m. Foi realizado o teste ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. Valores significativos: *** $p < 0,05$ versus controle

é fundamental para a resposta imunológica durante a inflamação, e esta é necessária para a entrada de neutrófilos, monócitos e células T (por exemplo) para os locais de lesão, infecção e estresse.¹ A influência de fármacos neste parâmetro da resposta inflamatória, é analisada através da quantificação dos leucócitos, os quais são particularmente sensíveis aos anti-inflamatórios esteroidais. A partir do exsudato inflamatório obtido do peritônio, os mediadores inflamatórios também podem ser avaliados e dosados.⁶

O teste de peritonite induzida por carragenina demonstrou que a administração oral de LASSBio-1587 (20 e 40 mg/kg) inibiu em 63,46% e 74,30%, respectivamente, a migração leucocitária para a cavidade peritoneal dos animais ($p < 0,05$) (Figura 4). Esses resultados foram equivalentes ao demonstrado após o tratamento com dexametasona (2 mg/kg), fármaco padrão utilizado, que inibiu em 76,96% a migração de leucócitos ($p < 0,05$). Pode-se sugerir então que LASSBio-1587, bem como outras hidrazonas já avaliadas nesse mesmo modelo experimental³³, apresenta atividade anti-inflamatória.

4. Conclusão

Pode-se concluir que LASSBio-1587 apresentou atividade antinociceptiva e anti-inflamatória nos modelos experimentais avaliados, atuando possivelmente por meio de mecanismos de ação central e periféricos, com destaque para seu potencial anti-inflamatório. Esses resultados encorajam os estudos posteriores com essa substância, principalmente na tentativa de identificar seu mecanismo de ação e seu perfil farmacocinético.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Fármacos e Medicamentos (INCT-INOVAR), Projeto CNPq 465.249/2014-0, Projeto FAPERJ E-26/010.000090/2018, pelo apoio financeiro.

Referências Bibliográficas

- Campos, J. K. L.; Araújo, C. S. F.; Araujo, T. F. S.; Santos, A. F. S.; Teixeira, J. A.; Lima, V. L. M.; Coelho, L. C. B. B.; Anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Bauhinia monandra* leaf lectin. *Biochimie Open* **2016**, *2*, 62. [[CrossRef](#)]
- Cunha, T. M.; Verri, W. A.; Silva, J. S.; Poole, S.; Cunha, F. Q.; Ferreira, S. H. A.; Cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2005**, *102*, 1755. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Chavan, M. J.; Wakte, P. S.; Shinde, D. B.; Analgesic and anti-inflammatory activity of Caryophyllene oxide from *Annona squamosa* L. bark. *Phytomedicine* **2010**, *17*, 149. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Quintão, N. L. M.; Campos, M. M.; Calixto, J. B.; Modelos animais para o estudo de drogas analgésicas. In: CARLINI, E. A.; MENDES, F. R. *Protocolos em Psicofarmacologia Comportamental*, 1a ed., FAP-UNIFESP: São Paulo, 2011.
- Morgan, M. M.; Christie, M. J.; Analysis of opioid efficacy, tolerance, addiction and dependence from cell culture to human. *British Journal of Pharmacology* **2011**, *164*, 1322. [[CrossRef](#)]
- Silva, J. C.; *Dissertação de mestrado*, Universidade Federal do Vale do São Francisco, 2013. [[Link](#)]
- Silva, S. C.; *Dissertação de mestrado*, Universidade Federal de Pernambuco, 2015. [[Link](#)]
- Gu, W.; Wu, R.; Qi, S.; Gu, C.; Si, F.; Synthesis and antibacterial evaluation of New *N*-acylhydrazone derivatives from dehydroabietic acid. *Molecules* **2012**, *17*, 4634. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Cachiba, T. H.; Carvalho, B. D.; Carvalho, D. T.; Cusinato, M.; Prado, C. G.; Dias, A. L. T.; Síntese e avaliação preliminar da atividade antibacteriana e antifúngica de derivados *N*-acilidrazônicos. *Química Nova* **2012**, *35*, 1566. [[CrossRef](#)]
- Barreiro, E. J.; Fraga, C. A. M.; Miranda, A. L. P. C. R.; A química medicinal de *N*-acilidrazonas: novos compostos-protótipos de fármacos analgésicos, anti-inflamatórios e anti-trombóticos. *Química Nova* **2002**, *25*, 129. [[CrossRef](#)]

11. Bispo Júnior, W.; Alexandre-Moreira, M. S.; Alves, M. A.; Perez-Rebolledo, A.; Parrilha, G. L.; Castellano, E. E.; Piro, O. E.; Barreiro, E. J.; Lima, L. M.; Beraldo, H.; Analgesic and anti-inflammatory activities of salicylaldehyde 2-chlorobenzoyl hydrazone (H(2)LASSBio-466), salicylaldehyde 4-chlorobenzoyl hydrazone (H(2)LASSBio-1064) and their zinc(II) complexes. *Molecules* **2011**, *16*, 6902. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Duarte, C. M.; *Tese de doutorado*, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2006. [[Link](#)]
13. Bezerra Netto, H. J. C.; *Dissertação de mestrado*, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2004. [[Link](#)]
14. Silva, J. C.; Araújo, C. S.; Lima-Saraiva, S. R. G.; Oliveira-Junior, R. G.; Diniz, T. C.; Wanderley, C. W. S.; Palheta-Júnior, R. C.; Mendes, R. L.; Guimarães, A. G.; Quintans-Júnior, L. J.; Almeida, J. R. G. S.; Antinociceptive and anti-inflammatory activities of the ethanolic extract of *Annona vepretorum* Mart. (Annonaceae) in rodents. *BMC Complementary and Alternative Medicine* **2015**, *15*, 197. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Caixeiro, J. M. R.; *Tese de doutorado*, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2007. [[Link](#)]
16. Amaral, D. N.; Cavalcanti, B. C.; Bezerra, D. P.; Ferreira, P. M. P.; Castro, R. P.; Sabino, J. R.; Machado, C. M. L.; Chammas, R.; Pessoa, C.; Sant'Anna, C. M. R.; Barreiro, E. J. Lima, L. M.; Docking, Synthesis and Antiproliferative Activity of *N*-Acyldhydrazone Derivatives Designed as Combretastatin A4 Analogues. *PLoS One* **2014**, *9*, e85380. [[CrossRef](#)]
17. Collier, H. O.; Dinneen, L. C.; Johnson, C. A.; Schneider, C.; The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. *British Journal of Pharmacology and Chemotherapy* **1968**, *32*, 295. [[CrossRef](#)]
18. Queiroz, A. C.; Lira, D. P.; Dias, T. L. M. F.; Souza, E. T.; Matta, C. B. B.; Aquino, A. B.; Silva, L. H. A. C.; Silva, D. J. C.; Mella, E. A. C.; Agra, M. F.; Barbosa-Filho, J. M.; Araújo-Júnior, J. X.; Santos, B. V. O.; Alexandre-Moreira, M. S.; The antinociceptive and anti-inflammatory activities of *Piptadenia stipulacea* Benth. (Fabaceae). *Journal of Ethnopharmacology* **2010**, *128*, 377. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Hunskaar, S.; Hole, K.; The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain* **1987**, *30*, 103. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Santos, D. A.; Fukui, M. J.; Nanayakkara, N. P. D.; Khan, S. I.; Sousa, J. P. B.; Bastos, J. K.; Andrade, S. F.; Silva-Filho, A. A.; Quintão, N. L. M.; Anti-inflammatory and antinociceptive effects of *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae) in different experimental models. *Journal of Ethnopharmacology* **2010**, *127*, 543. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Almeida, J. R. G. S.; Lima, J. T.; Oliveira, H. R.; Oliveira, M. R.; Meira, P. R. M.; Lúcio, A. S. S. C.; Barbosa-Filho, J. M.; Quintans-Junior, L. J.; Antinociceptive activity of discretamine isolated from *Duguetia moricandiana*. *Natural Product Research* **2011**, *25*, 1908. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Andrade, G. S.; Guimarães, A. G.; Santana, M. T.; Siqueira, R. S.; Passos, L. O.; Machado, S. M. F.; Ribeiro, A. S.; Sobral, M.; Almeida, J. R. G. S.; Quintans-Junior, L. J.; Phytochemical screening, antinociceptive and anti-inflammatory effects of the essential oil of *Myrcia pubiflora* in mice. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* **2012**, *22*, 181. [[CrossRef](#)]
23. Bastos, L. F.; Merlo, L. A.; Rocha, L. T.; Coelho, M. M.; Characterization of the antinociceptive and anti-inflammatory activities of doxycycline and minocycline in different experimental models. *European Journal of Pharmacology* **2007**, *576*, 171. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Melo, M. S.; Guimarães, A. G.; Santana, M. F.; Siqueira, R. S.; Lima, A. C. B.; Dias, A. S.; Santos, M. R. V.; Onofre, A. S. C.; Quintans, J. S. S.; Sousa, D. P.; Almeida, J. R. G. S.; Estevam, C. S.; Araujo, B. S.; Quintans-Junior, L. J.; Anti-inflammatory and redox-protective activities of citronellal. *Biological Research* **2011**, *44*, 363. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Santa-Cecília, F. V.; Freitas, L. A. S.; Vilela, F. C.; Veloso, C. C.; Rocha, C. Q.; Moreira, M. E. C.; Dias, D. F.; Giusti-Paiva, A.; Santos, M. H.; Antinociceptive and anti-inflammatory properties of 7-epiclusianone, a prenylated benzophenone from *Garcinia brasiliensis*. *European Journal of Pharmacology* **2011**, *670*, 280. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Whittle, B. A.; Release of a kinin by intraperitoneal injection of chemical agents in mice. *International Journal of Neuropharmacology* **1964**, *3*, 369. [[CrossRef](#)]
27. Reis, S. L. G. B.; Almeida, V. M.; Almeida, G. C.; Boaviagem, K. M.; Mendes, C. C. D. B.; Faria, A. R.; Síntese e avaliação preliminar da atividade antinociceptiva de novas isoxazolililidrazonas. *Química Nova* **2011**, *34*, 76. [[CrossRef](#)]
28. Verma, P. R.; Joharapurkar, A. A.; Chatpalliwar, V. A.; Asnani, A.; Antinociceptive activity of alcoholic extract of *Hemidesmus indicus* R. Br. in mice. *Journal of Ethnopharmacology* **2005**, *102*, 298. [[CrossRef](#)]
29. Ávila, R. M. D.; *Dissertação de mestrado*, Universidade Federal de Alfenas, 2010. [[Link](#)]
30. Mendes, C. C. D. B.; *Dissertação de mestrado*, Universidade Federal de Pernambuco, 2010. [[Link](#)]
31. Silva, J. C.; Oliveira Junior, R. G.; Silva, M. G.; Lavor, E. M.; Soares, J. M. D.; Lima-Saraiva, S. R. G.; Diniz, T. C.; Mendes, R. L.; Alencar-Filho, E. B.; Barreiro, E. J.; Lima, L. M.; Almeida, J. R. G. S.; LASSBio-1586, an *N*-acyldhydrazone derivative, attenuates nociceptive behavior and the inflammatory response in mice. *Plos One* **2018**, *13*, e0199009 [[CrossRef](#)]
32. Verma, G.; Marella, A.; Shaquiquzzaman, M.; Akhtar, M.; Ali, M. R.; Alam, M. M.; A review exploring biological activities of hydrazones. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences* **2014**, *6*, 69. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Zhang, C. X.; Dai, Z. R.; Cai, Q. X. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Sipunculus nudus* L. extract. *Journal of Ethnopharmacology* **2011**, *137*, 1177. [[CrossRef](#)]