



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA  
CAMPUS V  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E SOCIAIS APLICADAS - CCBSA  
CURSO DE BACHAREALDO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**JONAS EMANUEL GUIMARÃES DA SILVA**

**PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS CONTENDO  
CANDIDATO A FÁRMACO ANTI-LEISHMANIA 2-[(1H-5 BROMO-INDOL-2-IL)  
METILENOAMINO]-5,6,7,8-TETRAIDRO-4H-CICLOHEPTA [B] TIOFENO-3-  
CARBONITRILA**

**JOÃO PESSOA  
2016**

**JONAS EMANUEL GUIMARÃES DA SILVA**

**PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS CONTENDO  
CANDIDATO A FÁRMACO ANTI-LEISHMANIA 2-[(1H-5 BROMO-INDOL-2-IL)  
METILENOAMINO]-5,6,7,8-TETRAIDRO-4H-CICLOHEPTA [B] TIOFENO-3-  
CARBONITRILA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado a  
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB),  
como requisito à obtenção do título de  
Bacharel em Ciências Biológicas.

**Área de concentração:** Nanotecnologia

**Orientador:** Prof. Dr. Elquio Eleamen  
Oliveira

**Co-orientadora:** Prof.<sup>a</sup> Dra. Elisangela  
Afonso de Moura Mendonça

**JOÃO PESSOA  
2016**

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da dissertação.

S586p Silva, Jonas Emanuel Guimarães da  
Preparação e caracterização de nanopartículas contendo  
candidato a fármaco anti-leishmania .... [manuscrito] / Jonas  
Emanuel Guimaraes da Silva. - 2016.  
36 p. : il. color.

Digitado.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências  
Biológicas) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de  
Ciências Biológicas e Sociais Aplicadas, 2016.

"Orientação: Prof. Dr. Elquio Eleamen Oliveira,  
Departamento de Ciências Biológicas".

"Co-Orientação: Profa. Dra. Elisângela Afonso de Moura  
Mendonça, Departamento de ".

1. 2-amino-tiofeno. 2. Leishmaniose. 3. Nanopartículas. I.  
Título.

21. ed. CDD 540

JONAS EMANUEL GUIMARÃES DA SILVA

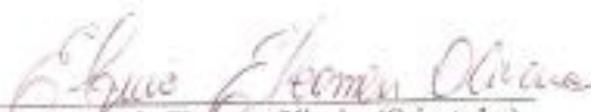
PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS CONTENDO  
CANDIDATO A FÁRMACO ANTI-LEISHMANIA 2-[(1H-5 BROMO-INDOL-2-IL)  
METILENOAMINO]-5,6,7,8-TETRAIDRO-4H-CICLOHEPTA [B] TIOFENO-3-  
CARBONITRILA

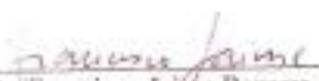
Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à  
Universidade Estadual da Paraíba, como  
requisito para obtenção do título de Bacharel  
em Ciências Biológicas.

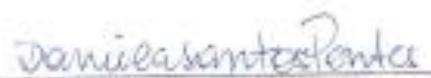
Área de concentração: Nanotecnologia.

Aprovada em: 18/10/2016.

**BANCA EXAMINADORA**

  
Prof. Dr. Elquio Eledmen Oliveira (Orientador)  
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

  
Prof. Dr. Francisco Jaime Bezerra Mendonça Júnior  
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

  
Prof(a). Dra. Daniela Santos Pontes  
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por me conceder forças e saúde para se levantar e batalhar todos os dias.

Ao meu orientador pela paciência, pelos conselhos e por realizar um excelente trabalho em sua profissão.

Ao professor Francisco, pelos diálogos enriquecedores e por contribuir com esse estudo, cedendo o composto estudado neste trabalho.

A professora Elisângela, pela paciência decorrente do iniciar no processo de pesquisa científica, e pela contribuição neste trabalho.

A Silvana, pela contribuição para o desenvolvimento e conclusão deste trabalho.

Aos meus pais pelo esforço diário, não deixando faltar nada em casa e, por me fazer acreditar em meus sonhos, podendo assim estabelecer objetivos pessoais.

A minha namorada, por acreditar em mim, pelas palavras de conforto, e por todo amor, apoio e paciência ao longo dessa jornada.

Ao Grupo LSVM, todos que fazem parte pelo companheirismo, apoio.

A Alisson Felipe Felício, pela paciência, me ensinar a manipular, e ser um conselheiro no decorrer deste trabalho de pesquisa.

Aos meus colegas de classe, pela companhia diária, amizade e apoio.

“Bem-aventurado o homem que acha sabedoria, e o homem que adquire conhecimento; Porque é melhor a sua mercadoria do que artigos de prata, e maior o seu lucro que o ouro mais fino; Mais preciosa é do que os rubis, e tudo o que mais possas desejar não se pode comparar a ela.”

Provérbios 3:13-15

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 METODOLOGIA.....	6
2.1 Parte experimental.....	6
2.1.1 Preparações das nanoesferas de PCL contendo o fármaco derivado 2-amino-tiofeno (SB-83).....	6
2.2 Análises físico-químicas e avaliação da estabilidade das nanoestruturas.....	6
2.2.1 Morfologia, tamanho e distribuição da partícula (PDI).....	6
2.2.2 Potencial Zeta.....	6
2.2.3 Medidas de estabilidade dos nanossistemas.....	6
2.2.4 Solubilidade.....	7
2.2.5 Determinação do comprimento de onda.....	7
2.2.6 Curva Analítica.....	7
2.3 Estudo de liberação <i>in vitro</i> das formulações.....	7
2.4 Eficiência de Encapsulação.....	8
2.5 Avaliação biológica das nanoestruturas.....	8
2.5.1 Ensaios de toxicidade frente à <i>Artemia salina</i> Leach.....	8
2.6 Análise de dados.....	9
2.7 Avaliação da atividade antipromastigota e determinação da concentração que inibe 50% do crescimento dos parasitos (IC <sub>50</sub> ).....	11
3 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	12
3.1 avaliação da estabilidade em função do tempo.....	12
3.2 Morfologia, tamanho, distribuição da partícula e potencial zeta.....	15
3.3 Determinação da solubilidade do SB-83.....	18
3.4 Curva de Calibração.....	18
3.5 Estudo de liberação <i>in vitro</i> das formulações.....	20
3.6 Toxicidade.....	20
3.7 Atividade antileishmania.....	21
3.7.1 Avaliação da atividade antipromastigota e determinação da concentração que inibe 50% do crescimento dos parasitos (CI <sub>50</sub> ).....	21
4 CONCLUSÕES.....	23
5 REFERÊNCIAS.....	25

# PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS CONTENDO CANDIDATO A FÁRMACO ANTI-LEISHMANIA 2-[(1H-5 BROMO-INDOL-2-IL) METILENOAMINO]-5,6,7,8-TETRAIDRO-4H-CICLOHEPTA [B] TIOFENO-3-CARBONITRILA

SILVA, Jonas Emanuel Guimarães \*

## RESUMO

Este estudo teve como objetivo o desenvolvimento e caracterização de nanopartículas contendo o derivado do 2-amino-tiofeno (SB-83), um promissor fármaco anti-leishmania. Nanopartículas foram preparadas pelo método de nanoprecipitação, sendo produzidas sem fármaco e com o SB-83 com 2,5, 5 e 7,5 mg. Posteriormente foi calculado a taxa de eficiência de encapsulação e os sistemas foram avaliados quanto à morfologia, pH, tamanho de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta. Também foi realizado um estudo da toxicidade dos sistemas frente à *Artemias salinas*, estudo de liberação do fármaco *in vitro* e avaliação da atividade antipromastigota. Os resultados demonstram que as formulações apresentam precipitados apenas no dia 90, e o efeito Tyndall foi observado, confirmando o tamanho manométrico das partículas. As formulações desenvolvidas apresentaram forma de oblonga a esférica, e os valores da caracterização foram satisfatórios e variaram de  $149,97 \pm 0,4$  e  $185,03 \pm 3,1$  no tamanho;  $0,11 \pm 0,01$  e  $0,24 \pm 0,01$  polidispersão;  $-8,20 \pm 0,59$  e  $-28,27 \pm 0,21$  potencial zeta, e  $4,04$  à  $5,22$  pH, o melhor resultado da eficiência de encapsulação foi 94,94%, os resultados da liberação só foram captados com 24 horas, o teste de toxicidade mostrou que os nanossistemas sem fármaco apresentam elevada toxicidade, e também ocasionam interferência na forma de ação do fármaco frente as formas promastigotas, com IC<sub>50</sub> de 31,79. Estes resultados demonstraram a viabilidade da formulação no seu aspecto tecnológico, porém, se fazem necessários estudos posteriores quanto a seus benefícios terapêuticos, incluindo um estudo mais aprofundado de toxicidade.

**Palavras-Chave:** 2-amino-tiofeno. Leishmaniose. Nanopartículas.

---

\* Aluno de Graduação em Ciências Biológicas na Universidade Estadual da Paraíba – CampusV.  
E-mail: jonas.8@hotmail.com

## 1 INTRODUÇÃO

As Doenças tropicais negligenciadas (DTN) compartilham várias características em comum, a mais marcante é que as populações afetadas são fortemente assoladas pela pobreza. As DTN não só espalham-se nessas condições, mas também podem exacerbar e perpetuar a pobreza das comunidades afetadas (OMS, 2010; GARG, 2011). A dengue, a doença de Chagas, a leishmaniose, a hanseníase, a malária, a esquistossomose e a tuberculose, são consideradas DTN e embora exista financiamento para pesquisas, o conhecimento produzido não se reverte em avanços terapêuticos, devido ao reduzido potencial de retorno lucrativo para a indústria farmacêutica, essas doenças estão presentes na maioria dos casos em áreas endêmicas compostas por população de baixa renda e poucos serviços médicos (JESUS, 2006), situação observada em países em desenvolvimento. (JUNIOR, *et al.* 2015)

As Leishmanioses representam um complexo de doenças infecciosas causadas por diferentes espécies de parasitas Kinetoplastidas pertencentes à família *Trypanosomatidae* e gênero *Leishmania*. A OMS estima que 350 milhões de pessoas estejam expostas ao risco de infecção, aproximadamente 15 milhões de pessoas se encontram infectadas, presente em mais de 98 países. São consideradas regiões endêmicas, as Américas, a África, Ásia e sul da Europa (BRASIL, 2006a, 2007) e todo ano cerca de 2 milhões de novos casos de leishmaniose são registrados no mundo, e 3 mil novos casos no Brasil. (KAYE, 2011; ALVAR, 2012). A leishmaniose é classificada como uma das doenças “mais negligenciadas”, com base nos limitados recursos investidos no diagnóstico, tratamento e controle, e sua forte associação com a pobreza. (MONTEIRO, 2013). As manifestações clínicas podem variar de lesões de pele nodular e ulcerativas à forma mucocutânea e visceral progressiva, a mais grave (SÁNCHEZ, 2012; CHAPPUIS, 2007). A *Leishmania amazonensis*, espécie que foi utilizada nos testes de avaliação do derivado tiofeno neste estudo, é encontrada principalmente na América Latina, estando associada a diferentes formas clínicas de leishmaniose cutânea, e é o principal agente etiológico da leishmaniose cutânea difusa, que é comumente refratária ao tratamento disponível (DUTRA, 2014; GUIMARÃES, 2009).

Há cerca de 60 anos os fármacos mais usados para o tratamento da leishmaniose são antimônios pentavalente, como antimoniato de meglumina (Glucantime®) e estibogluconato de sódio (Pentostan®). A maior parte dos fármacos utilizados apresentam inúmeros efeitos adversos como anorexia, vômitos, náuseas, dor abdominal, mal-estar, mialgia, artralgia, cefaleia, letargia. Alterações cardiológicas que são dependentes da dose e da duração do tratamento (OMS, 2010). Além disso, a segunda linha de drogas tais como anfotericina B,

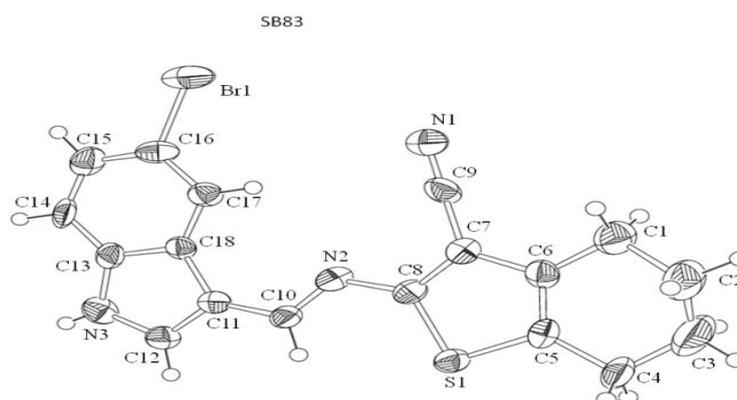
pentamidina, miltefosina, têm custos elevados e podem ser ainda mais tóxicas do que antimônios. (SANTOS, *et al.* 2008; DUTRA, *et al.* 2014). Como é possível constatar, os medicamentos disponíveis não satisfazem de maneira completa as necessidades terapêuticas, tendo em conta a elevada toxicidade que apresentam, e também a fraca biodisponibilidade. O desenvolvimento de novas formas terapêuticas eficazes com efeitos adversos mínimos e que melhorem a qualidade de vida dos pacientes são os objetivos de estudo da comunidade científica.

Promissores agentes antileishmania, que são derivados do tiofeno são particularmente interessantes (GONZALEZ, 2007; TAKAHASHI, 2011). Os derivados tiofenos foram identificados como os metabolitos secundários em organismos, tais como fungos e plantas (MARGL, 2001). Esses compostos heterocíclicos derivados do tiofeno são comumente presentes em moléculas biologicamente ativas, e são relativamente fáceis de serem obtidos, além de possuírem baixo custo (RYU *et al.*, 2003). São descritos na literatura com propriedades: anticonvulsiva, anti-inflamatórias, antitumoral (MOLVI, 2008; SOUZA, 2012; KULANDASAMY, 2009), e também atividade promissora contra antiprotozoários (RODRIGUES *et al.*, 2015). Dentre os heterocíclicos tiofênicos, destacam-se os derivados 2-aminotiofeno, que têm sido bastante relatados nos estudos de investigação de novas drogas, principalmente depois das inovações da rota de síntese da reação de Gewald (TALLEY *et al.*, 2006). Além disso alguns dos derivados de tiofenos mostraram-se eficazes contra formas promastigotas de *L. donovani*, *L. infantum*, *L. braziliensis*, *L. amazonensis* (TAKAHASHI, 2011; LIMA, 2009), evidenciando o potencial que estas moléculas apresentam para o tratamento da leishmaniose.

Recentemente o laboratório de síntese e vetorização de moléculas (LSVM) sintetizou uma série de moléculas derivadas do tiofeno que mostrou atividade promissora para o protozoário da *L. amazonensis*, um dos agentes etiológicos da leishmaniose tegumentar americana. O composto 2- [(1H-5 bromo-indol-2-ilmetilenoamino)-5,6,7,8-Tetraidro-4H-Ciclohepta [b] Tiofeno-3-Carbonitrila (SB-83) possui uma atividade seletiva contra ambas as formas de *L. amazonensis*, com níveis mais baixos de citotoxicidade para as células hospedeiras (RODRIGUES *et al.*, 2015). No teste *in vitro* sobre a eficácia leishmanicida e de citotoxicidade, o SB-83 fármaco usado neste estudo apresentou um excelente valor da concentração inibitório máxima 50% (IC<sub>50</sub>) 3,37 µM, e também os resultados mostraram sua atoxicidade para as hemácias do sangue humano. O índice de seletividade mostrou ser melhor do que medicamentos de referência como o antimoniato de meglumina. A presença do anel indólico aumentou consideravelmente o índice de seletividade, que aponta a segurança dessas

moléculas (RODRIGUES, *et al*, 2015). A ação seletiva contra *L. amazonensis* descrita para os tiofenos analisados neste trabalho foi notavelmente maior do que o antimoniato de meglumina, droga de primeira linha no tratamento da leishmaniose. A anfotericina B, da segunda linha de drogas, apesar de ter atividade antileishmania superior aos compostos avaliados, também mostrou elevada toxicidade para macrófagos (RODRIGUES *et al*, 2015).

**Figura 1.** Estrutura cristalográfica do SB-83.



(RODRIGUES *et al*, 2015).

No entanto, o SB-83 apresenta uma baixa solubilidade em água, que pode ocasionar uma dificuldade nos ensaios biológicos e uma limitação nos estudos *in vitro* e *in vivo*, para superar estes problemas e com a perspectiva de melhorar a biodisponibilidade, foi feita a encapsulação do SB-83 com nanopartículas coloidais que podem eficientemente melhorar a farmacocinética do fármaco.

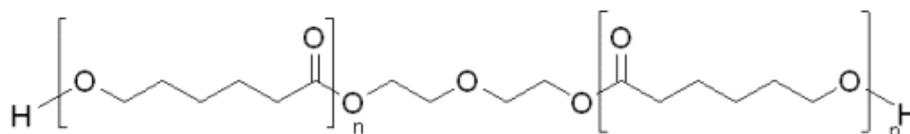
Atualmente o alto interesse em nanotecnologia se dá, pois essa é uma área promissora da pesquisa científica, que tem tido um importante crescimento nos últimos anos, onde integra disciplinas como física, química e biologia. Uma definição prática de nanotecnologia foi proposta por Bawarski como o design, caracterização, produção e aplicação de estruturas, dispositivos e sistemas através da manipulação controlada de tamanho e forma em escala nanométrica. (BAWARSKI *et al.*, 2008). O nanômetro (nm) é uma unidade de medida que corresponde à bilionésima parte do metro. Na área biomédica, os nanossistemas são especialmente desenvolvidos para interagir com as estruturas biológicas, objetivando novas técnicas e dispositivos de diagnóstico, além de tratamentos mais efetivos.

Os sistemas de liberação controlada de fármacos têm como objetivo tornar o composto ativo capaz de se acumular no órgão ou tecido-alvo de forma seletiva e quantitativa,

independente do local e os métodos de sua administração. Estes sistemas podem retardar a liberação do princípio ativo, sustentar a sua liberação e/ou direcioná-lo a sítios específicos de ação (células, órgãos, micro- organismos) (TORCHILIN, 2006). Vários requisitos devem ser levados em consideração no desenvolvimento de nanopartículas como carreador de fármacos. Dentre tais requisitos podemos citar: o tamanho de partículas, as suas propriedades de superfície e a liberação das substâncias farmacologicamente ativas, a fim de se obter a ação do fármaco no local específico desejado, com um aprimoramento da terapêutica e da posologia e diminuição dos efeitos tóxicos (MOHANRAJ *et al.*, 2006).

O polímero utilizado nas formulações Poli- $\epsilon$ -caprolactona (PCL) é um poliéster alifático hidrofóbico bastante utilizado na preparação de sistemas de liberação controlada. Possui baixa degradação, sendo ideal para sistemas de liberação a longo prazo. Sua elevada permeabilidade e a ausência de toxicidade permitem que este polímero sintético seja adequado à nanotecnologia farmacêutica (POHLMANN *et al.*, 2013).

**Figura 2.** Estrutura do polímero poli- $\epsilon$ -caprolactona (PCL)



As principais vantagens dos sistemas de liberação controlada de fármacos são: Promover a vetorização do fármaco; Proteger o conteúdo encapsulado; Manter os níveis plasmáticos do fármaco em concentração constante; Reduzir o número de administrações do fármaco; Reduzir a toxicidade devido a menor liberação do princípio ativo em tecidos saudáveis; Melhor adesão do paciente à terapêutica; Otimizar a dose terapêutica; Possibilitar a incorporação tanto de substâncias hidrofílicas quanto lipofílicas; Promover liberação controlada do princípio ativo ao longo do tempo (TORCHILIN, 2006; PIMENTEL *et al.*, 2007).

Nesse cenário, este trabalho visou o desenvolvimento de um nanosistemas contendo um derivado do tiofeno, o SB-83 que apresenta grande potencialidade biológica. Tendo em vista o número de casos de leishmaniose que acometem o mundo e os tratamentos hoje disponíveis torna-se imprescindível a busca por novos fármacos, com maior interesse terapêutico e menor toxicidade (WERMUTH, 2004; BROWN, 2007). Desta forma, o

trabalho teve como objetivo encapsular o SB-83 em nanopartículas pelo método de deposição interfacial de polímeros pré-formados, ou nanoprecipitação, avaliar a sua estabilidade e obter resultados da caracterização físico-química dos sistemas desenvolvidos, realizar o estudo de liberação das nanopartículas, além da avaliação da toxicidade das nanopartículas, e realização do teste da inibição do crescimento das formas promastigotas da leishmaniose.

## **2 METODOLOGIA**

### **2.1 Parte experimental**

#### **2.1.1 Preparações das nanoesferas de PCL contendo o fármaco derivado 2-amino-tiofeno (SB-83)**

As nanoesferas foram preparadas através do método de nanoprecipitação (precipitação de polímeros pré-formados), envolvendo a mistura de uma fase orgânica em outra aquosa. A fase orgânica constituiu-se do polímero PCL, acetona (solvente orgânico), Span 80 (tensoativo) e o fármaco. A fase aquosa foi composta pelo tensoativo polissorbato 80 (Tween 80) e água destilada. Após dissolução dos constituintes, verteu-se a fase orgânica na fase aquosa. A suspensão resultante foi mantida sob agitação durante 10 min e, em seguida, foi concentrada sob baixa pressão até o volume de 10 mL, com o auxílio de um rotaevaporador (IKA-RV10), a fim de obter o volume de 10 mL. Foram preparadas nanopartículas sem o fármaco (brancas) e com 2,5, 5 e 7,5 mg do fármaco (SB-83).

### **2.2 Análises físico-químicas e avaliação da estabilidade das nanoestruturas**

#### **2.2.1 Morfologia, tamanho e distribuição da partícula (PDI)**

O tamanho médio e a distribuição das partículas foram determinados por espectroscopia de auto-correlação de fótons utilizando um analisador de partículas Nanozetaizer (Malvern ZS90), esses parâmetros foram analisados a 20°C. Já a morfologia das partículas foi observada através de Microscópio eletrônico de transmissão FEI de 200kV, modelo Tecnai20, onde um feixe de elétrons atravessa a amostra sofrendo diversos tipos de espalhamento que dependem das características do material. Interações do feixe com o material geram raios-X característicos que fornecem informações sobre os elementos químicos presentes na amostra.

#### **2.2.2 Potencial Zeta**

A carga de superfície eletrostática das partículas foi determinada a partir da mobilidade eletroforética através do analisador do potencial zeta, Nanozetasizer (Malvern ZS90).

#### **2.2.3 Medidas de estabilidade dos nanossistemas**

Foi realizado a medida de pH das suspensões de nanopartículas foi realizada utilizando-se um pHmetro (digital mPA 210) calibrado com soluções tampão padrão em pH

7,0 e 4,0; e análise macroscópica da precipitação, coloração e fluidez das suspensões de nanopartículas de PCL no tempo (0, 7, 15, 21, 30, 60, 90 dias).

#### **2.2.4 Solubilidade.**

A solubilidade do derivado 2-amino-tiofeno (SB-83), foi realizado em água e tampão fosfato de acordo com a farmacopeia brasileira (BRASIL, 2010). Para o estudo de solubilidade foi feito a pesagem de 20 mg de SB-83 em cada frasco, sendo o total de 6 frascos, 3 frascos para testes com água destilada e 3 frascos para os testes com tampão fosfato, adicionando 20 mL de água destilada e respectivamente 20 mL de tampão fosfato, os frascos foram mantidos 120h sob agitação, em agitadores magnéticos (IKA-Color Squid). Após esse período, foram coletadas alíquotas de 2 mL de cada um dos frascos, e feitas as quantificações em espectrofotometria (Thermo Scientific GENESYS™ 10S Bio) ao  $\lambda_{\text{máx}}$ : 392nm.

#### **2.2.5 Determinação do comprimento de onda**

Para determinarmos o comprimento de onda do SB-83 foi realizado a sua varredura diluído em álcool metílico, entre os comprimentos de onda de 190 a 600 nm em espectrofotometria. (Espectrofotômetro G 10S UV-VIS, Thermo Scientific).

#### **2.2.6 Curva Analítica**

Para a curva analítica foi preparada uma solução-mãe do candidato a fármaco. A partir desta solução uma série de diluições no intervalo de concentrações 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 1; 2; 4; 6  $\mu\text{g/mL}$  foi obtida. Em seguida, foram realizadas leituras das amostras, em triplicata, por espectrofotometria ((Espectrofotômetro G 10S UV-VIS, Thermo Scientific) no comprimento de onda de absorção do analito para a construção da curva analítica.

### **2.3 Estudo de liberação *in vitro* das formulações**

O estudo de liberação *in vitro* das partículas foi realizado pelo método de diálise inversa proposto por Santos-Magalhães e colaboradores (2005). As nanopartículas foram inseridas em saco de diálise (meio doador) e transferida para becker contendo tampão fosfato pH 7,4 (meio receptor). O sistema permaneceu sob agitação constante por 48 horas (2880 minutos). Em tempos pré-determinados 10, 20, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180, 240, 300, 1440, 2880 minutos, alíquotas do meio foram retiradas e analisadas por espectrofotometria UV-VIS

(Thermo Scientific GENESYS™ 10S Bio). Após quantificação, os dados foram analisados para construção do gráfico do perfil de liberação do SB-83.

## 2.4 Eficiência de Encapsulação

Determinou-se o teor do SB-83 nas nanoesferas utilizando-se o método de espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta, onde 1 mL das nanoesferas preparadas foi transferido para os balões volumétricos de 10 mL e, o volume total foi completo com metanol, onde foram mantidas sob agitação no banho de ultrassom, após 40 minutos de agitação, foi retirado 1 mL da amostra filtrada, e transferido para um balão volumétrico de 5 ml e o volume completo com metanol. Para a quantificação do SB-83 foi realizada as leituras em um espectrofotômetro (Thermo Scientific GENESYS™ 10S Bio) no comprimento de onda ( $\lambda_{\text{máx}}=392$  nm). Calculou-se o teor do SB-83 pela equação da reta obtida pela construção de uma curva de calibração. Os nanossistemas foram formulados em duplicata, e as análises foram feitas em triplicata, e determinou-se a eficiência de encapsulação (EE%) do fármaco por meio da seguinte equação (FESSI et al, 2012).

$$\text{E. E (\%)} = \frac{\text{Quantidade do fármaco encapsulado}}{\text{Quantidade inicial do fármaco}} \times 100$$

## 2.5 Avaliação biológica das nanoestruturas

### 2.5.1 Ensaio de toxicidade frente à *Artemia salina* Leach

O teste de letalidade frente à *Artemia salina* Leach foi realizado através do método descrito por Meyer et al. (1982) com modificações. Para a realização do experimento foi preparado um aquário retangular (20cm comprimento x 11cm largura x 13cm altura), contendo uma tela divisória com poros de 2 mm. Um dos lados desse aquário foi coberto e protegido da luz e o outro lado possui uma lâmpada (luz artificial) presa por um suporte. Esse recipiente foi completado com uma solução salina sintética (marca Real Sea) na concentração de 1Kg para 30L. Esse sistema foi abundantemente oxigenado com auxílio de uma bomba de ar a temperatura ambiente (28-32°C) até o período de eclosão das larvas. Para eclosão dos cistos, cerca de uma colher de chá, de cistos de *Artemia salina* (adquiridos comercialmente) foi adicionada no lado protegido da luz do aquário. Sob um sistema aerado, os cistos se desenvolvem, em uma média de 24 a 48h e eclodem, passando para a fase de naúplio. Após esse período, os naúplios por apresentarem fototropismo, atravessaram a tela, sendo atraídos

pelo lado iluminado do aquário. Os náuplios foram retirados do aquário e levados para realização imediata dos ensaios de toxicidade, onde foram separados dez náuplios de *Artemia salina* recém eclodidos, com o auxílio de pipeta de Pasteur e estes foram adicionados à tubos de ensaio. Foi utilizado um tubo controle negativo, contendo apenas o solvente utilizado. Os testes (tubos), com cada uma das doses testadas sem o fármaco e com o fármaco, foram usados os seguintes valores, retirados dos nanossistemas que foram preparados com antecedência (66,6 µL, 133,3 µL, 333,3 µL, 660 µL, 1,33 mL, 2,33 mL, 3,33 mL), testes realizados em triplicata e após o período de observação (24 horas) foram contabilizados, o número de náuplios mortos e vivos em cada tubo com auxílio de uma lupa.

## 2.6 Análise de dados

Na análise de dados foi utilizado o método estatístico Probit, onde utilizando o software Microsoft Excel 2010, foi criada uma tabela com quatro colunas (Tabela 1), onde na primeira foi colocado às concentrações usadas no experimento, na segunda o percentual da média de mortes para cada concentração, na terceira o logaritmo na 10<sup>a</sup> base das concentrações e na última coluna, o valor de Probit, referente ao percentual da média de mortes, obtido a partir da tabela de Finney (1952). (Figura 3)

**Tabela 1.** Tabela criada para análise PROBIT

CONCENTRAÇÃO(µg/ml)	% M	Log.Conc	Probit
10	0	1	0
20	0	1,30103	0
50	0	1,69897	0
100	0	2	0
200	36,66	2,30103	4,64
350	100	2,544068	8,09
500	100	2,69897	8,09

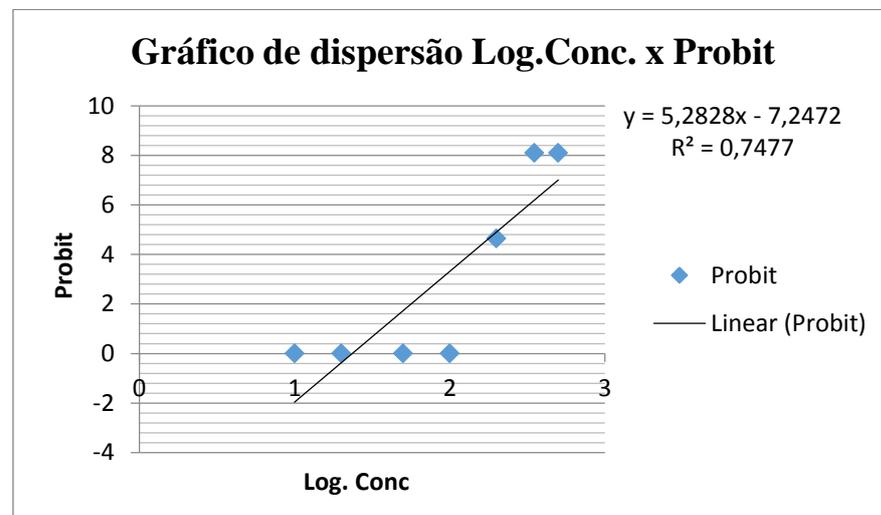
(Silva, 2016)

**Figura 3.** Tabela de conversão do percentual de mortes para o Probit

%	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	-	2,67	2,95	3,12	3,25	3,36	3,45	3,52	3,59	3,66
10	3,72	3,77	3,82	3,87	3,92	3,96	4,01	4,05	4,08	4,12
20	4,16	4,19	4,23	4,26	4,29	4,33	4,36	4,39	4,42	4,45
30	4,48	4,50	4,53	4,56	4,59	4,61	4,64	4,67	4,69	4,72
40	4,75	4,77	4,80	4,82	4,85	4,87	4,90	4,92	4,95	4,97
50	5,00	5,03	5,05	5,08	5,10	5,13	5,15	5,18	5,20	5,23
60	5,25	5,28	5,31	5,33	5,36	5,39	5,41	5,44	5,47	5,50
70	5,52	5,55	5,58	5,61	5,64	5,67	5,71	5,74	5,77	5,81
80	5,84	5,88	5,92	5,95	5,99	6,04	6,08	6,13	6,18	6,23
90	6,28	6,34	6,41	6,48	6,55	6,64	6,75	6,88	7,05	7,33
%	0,0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9
97	6,88	6,90	6,91	6,93	6,94	6,96	6,98	7,00	7,01	7,03
98	7,05	7,07	7,10	7,12	7,14	7,17	7,20	7,23	7,26	7,29
99	7,33	7,37	7,41	7,46	7,51	7,58	7,65	7,75	7,88	8,09

(Finney, 1952)

Em seguida foi obtido um gráfico de dispersão com linha de tendência com os valores do logaritmo na 10ª base das concentrações pelo valor de Probit. (Gráfico 1)

**Gráfico 1.** Gráfico de dispersão com linha de tendência

(SILVA, 2016)

Como mostra o gráfico 1, o programa fornece junto equação da regressão linear, onde “y” se refere aos valores de Probit e “x” ao log das concentrações, também é fornecido o  $R^2$  que representa a confiabilidade dos dados (coeficiente de linearidade), ou seja, quanto mais próximo de 1 for o  $r^2$  mais linear é a reta e mais confiáveis são os dados.

Como pretendíamos obter a concentração letal para 50% dos indivíduos (CL50), substituímos o “y” da equação pelo valor 5, e a resolvemos para obter o valor de “x”, que é o

logaritmo da concentração, no caso o logaritmo da CL<sub>50</sub>. Feito isso foi calculado o inverso do logaritmo, obtendo assim o valor da CL<sub>50</sub>

### **2.7 Avaliação da atividade antipromastigota e determinação da concentração que inibe 50% do crescimento dos parasitos (IC<sub>50</sub>).**

A avaliação da atividade antipromastigota do SB-83 foi realizado em parceria com o laboratório das leishmanioses, da Universidade Federal da Paraíba. A determinação da inibição do crescimento de formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* frente às substâncias em estudo foi realizada utilizando tubos de ensaio rosqueados contendo meio líquido Schneider suplementado com 20% de soro bovino fetal (SBF) e 1% de antibiótico [estreptomicina (100 µg/ml) e penicilina (100 U.I./ml)]. Nos tubos de ensaio foram adicionados 1x10<sup>6</sup> promastigotas/ml de *Leishmania amazonensis* em fase logarítmica de crescimento, na ausência (controle) e presença das concentrações das substâncias avaliadas. Após 72 horas de incubação a 26°C±1, alíquotas das culturas foram retiradas, diluídas em solução de isotom (10,5 g de ácido cítrico, 7 g de NaCl, 15 ml de formol em 1 L de água destilada) na proporção de 1:10, em tubos eppendorfes, os quais, foram submetidos a vigorosa agitação em aparelho vortex por aproximadamente dois minutos. As células foram quantificadas e analisadas sob microscopia óptica comum diretamente em câmara de Neubauer. A contagem do número de parasitos/ml de cultura foi realizada utilizando a fórmula: N° de parasitos = média dos quatro (04) quadrantes x inverso da diluição da amostra x 10<sup>4</sup>. Alíquotas das culturas também foram colocadas em lâminas de vidro, cobertas com lamínulas e observadas quanto à morfologia em microscópio óptico. As culturas controles, cujo crescimento foi considerado 100%, foram mantidas na ausência de substâncias e os cálculos da porcentagem de inibição de crescimento das substâncias avaliadas foram calculados em relação à cultura controle.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

#### 3.1 avaliação da estabilidade em função do tempo

As nanopartículas foram obtidas com êxito através do método de deposição interfacial de polímeros pré-formados (nanoprecipitação). A avaliação da estabilidade dos sistemas é um fator essencial, pois leva em consideração a interação química do fármaco com os componentes da formulação, onde, pode ocorrer modificações de acordo com o tempo de estocagem que a formulação venha a ser submetida, como a presença de precipitados e contaminação das amostras, bem como pH muito ácidos ou muito básicos, pensando nisso, logo após o preparo das formulações foram realizadas as medições do pH, e análise das características macroscópicas ( precipitação, aspecto, coloração e fluidez) medições estas que ocorreram nos dias 0, 7, 15, 21, 30, 60 e 90. (Tabelas 2, 3, 4, 5). Foi observado que os valores de pH não variaram de forma expressiva, e que sinais de precipitação do nanossistema ocorreram no dia 90.

Os ensaios de estabilidade demonstram que as nanoesferas exibiram aspecto fluido, com reflexo (efeito Tyndall) (Fig.4) que é um efeito óptico de espalhamento e dispersão de luz, característico de partículas em escala nanométrica em suspensão, apresentaram também aspecto leitoso, opalescente bastante evidente. Os aspectos macroscópicos das suspensões de nanoesferas foram semelhantes ao descrito na literatura para diferentes sistemas de nanoesferas obtidas pelo método de deposição interfacial de polímeros pré-formados. (PAESE, 2008).

**Figura 4:** Aspecto macroscópico das nanopartículas sem fármaco (Branças) e com fármaco (a) na figura B, o efeito Tyndall nas nanopartículas brancas.



(SILVA, 2016)

As nanopartículas foram submetidas ao teste da eficiência de encapsulação, o método mostrou bons valores do fármaco associado aos nanossistemas, as nanopartículas com 2,5 mg de fármaco tiveram uma eficiência de encapsulação de 94,94%, as nanopartículas com

5,0 mg um percentual de 89,21%, e as nanopartículas com 7,5 mg, 85,53%. O teste de eficiência de encapsulação foi realizado após 24 horas da preparação dos nanossistemas, foi visto como resultado que com o aumento da quantidade de fármaco no nanossistema ocorre uma maior perda do conteúdo do fármaco, onde o fármaco pode ser perdido no processo de formulação, resultando em uma maior eficiência de encapsulação no nanossistema preparado com a menor quantidade de fármaco.

**Tabela 2:** Avaliação da estabilidade, em um período de tempo 0 a 90 dias (Nanoesfera sem fármaco).

<b>TEMPO (DIAS)</b>	<b>CARACTERÍSTICAS DE ASPECTOS MACROSCÓPICOS</b>	<b>pH</b>
0	Sem precipitação no frasco, aspecto leitoso, coloração branca, e fluido.	4,65
7	Sem precipitação no frasco, aspecto leitoso, coloração branca, e fluido.	4,41
15	Sem precipitação no frasco, aspecto leitoso, coloração branca, e fluido.	4,40
21	Sem precipitação no frasco, aspecto leitoso, coloração branca, e fluido.	4,58
30	Com precipitação no frasco, aspecto leitoso, coloração branca, e fluido.	4,50
60	Com precipitação no frasco, aspecto leitoso, coloração branca, e fluido.	4,12
90	Com precipitação no frasco, aspecto leitoso, coloração branca, e fluido.	4,04

(SILVA,2016)

**Tabela 3:** Avaliação da estabilidade, em um período de tempo 0 a 90 dias (2,5 mg de SB-83).

<b>TEMPO (DIAS)</b>	<b>CARACTERÍSTICAS DE ASPECTOS MACROSCÓPICOS</b>	<b>pH</b>
0	Sem precipitação no frasco, aspecto leitoso, coloração amarela, e fluido.	4,80
7	Sem precipitação no frasco, aspecto leitoso, coloração amarela, e fluido.	4,88
15	Sem precipitação no frasco, aspecto leitoso, coloração amarela, e fluido.	4,97
21	Sem precipitação no frasco, aspecto leitoso, coloração amarela, e fluido.	4,86
30	Sem precipitação no frasco, aspecto leitoso, coloração amarela, e fluido.	4,67
60	Sem precipitação no frasco, aspecto leitoso, coloração amarela, e fluido.	4,82
90	Com precipitação no frasco, aspecto leitoso, coloração amarela, e fluido.	4,82

(SILVA,2016)

**Tabela 4:** Avaliação da estabilidade, em um período de tempo 0 a 90 dias (5 mg de SB-83)

<b>TEMPO (DIAS)</b>	<b>CARACTERÍSTICAS DE ASPECTOS MACROSCÓPICOS</b>	<b>pH</b>
0	Sem precipitação no frasco, aspecto leitoso, coloração amarela, e fluido.	4,92
7	Sem precipitação no frasco, aspecto leitoso, coloração amarela, e fluido.	4,72
15	Sem precipitação no frasco, aspecto leitoso, coloração amarela, e fluido.	4,74
21	Sem precipitação no frasco, aspecto leitoso, coloração amarela, e fluido.	4,62
30	Sem precipitação no frasco, aspecto leitoso, coloração amarela, e fluido.	4,62
60	Sem precipitação no frasco, aspecto leitoso, coloração amarela, e fluido.	4,62
90	Com precipitação no frasco, aspecto leitoso, coloração amarela, e fluido.	4,72

(SILVA,2016)

**Tabela 5:** Avaliação da estabilidade, em um período de tempo 0 a 90 dias (7,5 mg de SB-83)

<b>TEMPO (DIAS)</b>	<b>CARACTERÍSTICAS DE ASPECTOS MACROSCÓPICOS</b>	<b>pH</b>
0	Sem precipitação no frasco, aspecto leitoso, coloração amarela, e fluido.	5,08
7	Sem precipitação no frasco, aspecto leitoso, coloração amarela, e fluido.	4,84
15	Sem precipitação no frasco, aspecto leitoso, coloração amarela, e fluido.	4,88
21	Sem precipitação no frasco, aspecto leitoso, coloração amarela, e fluido.	4,89
30	Sem precipitação no frasco, aspecto leitoso, coloração amarela, e fluido.	4,95
60	Sem precipitação no frasco, aspecto leitoso, coloração amarela, e fluido.	4,91
90	Com precipitação no frasco, aspecto leitoso, coloração amarela, e fluido.	5,22

(SILVA,2016)

A alteração do pH pode ser indicio de degradação do polímero, e os dados obtidos demonstram que ao longo do tempo analisado, as alterações das formulações de PCL pode ser atribuída à dissociação dos grupos carboxílicos, presentes como grupos pendentes no polímero, que, em função do tempo, se posicionam na interface partícula/água devido ao relaxamento das cadeias poliméricas. (SCHAFFAZICK *et al*, 2003).

### **3.2 Morfologia, tamanho, distribuição da partícula e potencial zeta**

Geralmente, as nanopartículas, mesmo preparadas através de diferentes métodos, apresentam diâmetros médios entre 100 e 300 nm. Utilizando-se o método de precipitação de polímeros pré-formados, a presença do fármaco na fase orgânica, antes da precipitação do polímero em meio aquoso, também pode ou não influenciar o diâmetro médio de partículas, (CARLETO, 2016; AKYUREK,2016).

Os dados de tamanho de partícula, distribuição das partículas, ou polidispersão (PDI) e potencial zeta foram realizados nos dias 0, 20, 40, 60, 90 (tabela 6). As análises foram realizadas em nanoesferas sem fármaco e com fármaco SB-83 nas concentrações de 2,5, 5 e 7,5 mg. Foi visto nas nanoesferas uma pequena variação no tamanho e distribuição das

partículas, mas dentro da faixa de tamanho esperado para os nanossistemas preparados pela deposição de polímeros pré-formados. A variação do pH entre os nanossistemas é um dos fatores que podem ocasionar a variação no tamanho das nanopartículas e, conseqüentemente, a sua biodistribuição, pois o pH do meio de dispersão parece ser um fator controlador destes aspectos. A partir do valor do PDI determinado (tabela 6), é possível constatar a obtenção de um sistema monodisperso, uma vez que a literatura aponta que as formulações com valores abaixo de 0,3 apresentam esta característica (LIU *et al.*, 2009). Os valores de PDI apresentaram uma variação, mas dentro da faixa que o classifica como monodisperso, demonstrando o caráter homogêneo das formulações obtidas.

O Potencial zeta ( $\zeta$ ) é um indicador útil da carga superficial líquida da partícula e pode ser usado para prever e controlar a estabilidade de suspensões e emulsões coloidais. É definido como o potencial eletrocinético da fronteira hidrodinâmica do plano de cisalhamento de uma carga da partícula adjacente para uma superfície expostas em um líquido (WONGSAGONSUP *et al.*, 2005). Este potencial reflete a carga efetiva nas partículas e se correlaciona com a repulsão eletrostática entre elas e com a estabilidade da suspensão. Uma vez que as partículas carregadas se repelem umas às outras e essa força de repulsão supera a tendência natural à agregação das vesículas ou gotículas coloidais.

As nanoesferas preparadas em nosso laboratório, utilizam o polímero PCL que possui ácidos carboxílicos terminais em sua estrutura, devido a isso apresentam um potencial zeta negativo (MORA-HUERTAS E COLS., 2010). E este parâmetro físico-químico é considerado uma característica importante, porque este valor de carga não só permite a previsão da estabilidade da formulação, mas também é responsável pela interação das nanopartículas ao alvo biológico.

**Tabela 6** - Características físico-químicas de nanoesfera branca e com fármaco.

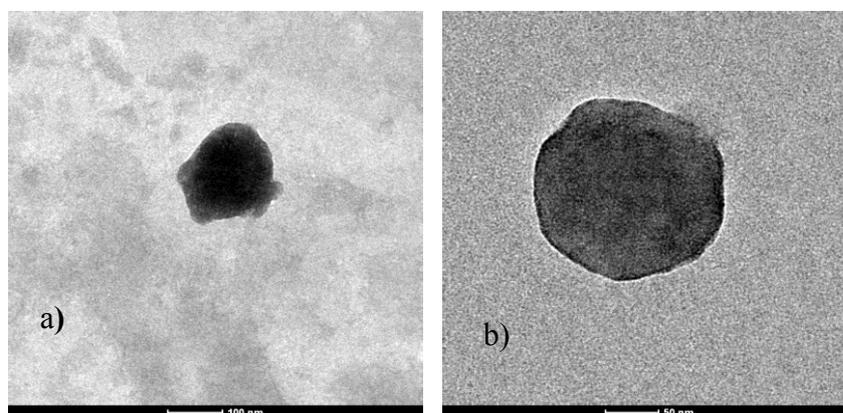
		<b>Tamanho (nm)</b>	<b>PDI</b>	<b>Zeta</b>
<b>D0</b>	<b>Branca</b>	152,87 ± 1,3	0,11 ± 0,01	-23,93 ± 2,11
	<b>NS-SB83 2,5</b>	152,23 ± 1,6	0,12 ± 0,01	-26,03 ± 0,72
	<b>NS-SB83 5,0</b>	156,10 ± 2,08	0,10 ± 0,02	-21,47 ± 0,91
	<b>NS-SB83 7,5</b>	174,50 ± 1,7	0,12 ± 0,01	-28,27 ± 0,21
<b>D20</b>	<b>Branca</b>	185,03 ± 3,17	0,24 ± 0,01	-18,47 ± 1,46
	<b>NS-SB83 2,5</b>	155,50 ± 1,37	0,14 ± 0,01	-20,20 ± 0,52
	<b>NS-SB83 5,0</b>	155,77 ± 0,55	0,11 ± 0,008	-24,03 ± 0,68
	<b>NS-SB83 7,5</b>	181,93 ± 1,61	0,17 ± 0,00	-16,77 ± 0,23

<b>D40</b>	<b>Branca</b>	153,97 ± 0,46	0,11 ± 0,003	-14,27 ± 0,64
	<b>NS-SB83 2,5</b>	156,03 ± 1,76	0,13 ± 0,01	-8,20 ± 0,59
	<b>NS-SB83 5,0</b>	155,60 ± 0,81	0,11 ± 0,02	-20,53 ± 0,66
	<b>NS-SB83 7,5</b>	177,80 ± 1,73	0,16 ± 0,01	-10,42 ± 1,28
<b>D60</b>	<b>Branca</b>	151,73 ± 0,85	0,11 ± 0,008	-17,83 ± 0,15
	<b>NS-SB83 2,5</b>	149,53 ± 0,66	0,13 ± 0,006	-17,17 ± 0,68
	<b>NS-SB83 5,0</b>	149,97 ± 0,47	0,11 ± 0,016	-18,87 ± 1,51
	<b>NS-SB83 7,5</b>	170,23 ± 1,34	0,12 ± 0,002	-15,43 ± 0,20
<b>D90</b>	<b>Branca</b>	160,27 ± 1,4	0,15 ± 0,005	-18,93 ± 0,87
	<b>NS-SB83 2,5</b>	155,80 ± 0,87	0,14 ± 0,01	-21,23 ± 1,42
	<b>NS-SB83 5,0</b>	170,13 ± 0,7	0,20 ± 0,013	-16,93 ± 0,75
	<b>NS-SB83 7,5</b>	184,73 ± 0,4	0,19 ± 0,11	-20,07 ± 0,56

(SILVA,2016)

A microscopia eletrônica de transmissão (MET) (fig.5) tem sido muito empregada na obtenção de informações relativas à forma e ao tamanho das nanopartículas. A MET pode permitir também a diferenciação entre nanocápsulas e nanoesferas, possibilitando, inclusive, a determinação da espessura da parede das nanocápsulas (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). A microscopia realizada mostrou claramente a morfologia das nanoesferas que variou da forma oblonga, nas nanopartículas sem fármaco a esférica nas nanopartículas com o fármaco, as nanoesferas não possuem óleo em sua composição, e é formada apenas por uma matriz polimérica, onde o fármaco pode ficar adsorvido ou retido.

**Figura 5.** Microscopia eletrônica de transmissão a) nanopartículas sem fármaco b) nanopartículas com fármaco (7,5 mg de SB-83).



(SILVA, 2016)

### 3.3 Determinação da solubilidade do SB-83

Fármacos pouco solúveis em água apresentam, em geral, problemas de biodisponibilidade, sendo a dissolução o fator limitante para a absorção dos mesmos. A solubilidade de um fármaco e seu comportamento em água é uma importante característica, porque a água é o principal constituinte de toda matéria viva (MELO, 2007).

O estudo solubilidade do SB-83 foi realizado em água e tampão fosfato. De acordo com os termos descritivos de solubilidade e seus significados da Farmacopeia Brasileira. Os resultados demonstram que o SB-83 é um candidato a fármaco é “Muito pouco solúvel” em água e tampão fosfato (Tabela 7). Dessa maneira, a problemática relacionada à baixa solubilidade do SB-83 estimula a pesquisa e o desenvolvimento de novos carreadores, como é o caso das nanopartículas, que representam eficientes sistemas de liberação controlada, além de melhorarem a farmacocinética do fármaco e a sua distribuição nos alvos biológicos. (DE MATTOS, A.C *et al*, 2016; PARVEEN, S. *et al*, 2012).

**Tabela 7.** Solubilidade do SB-83 em tampão fosfato.

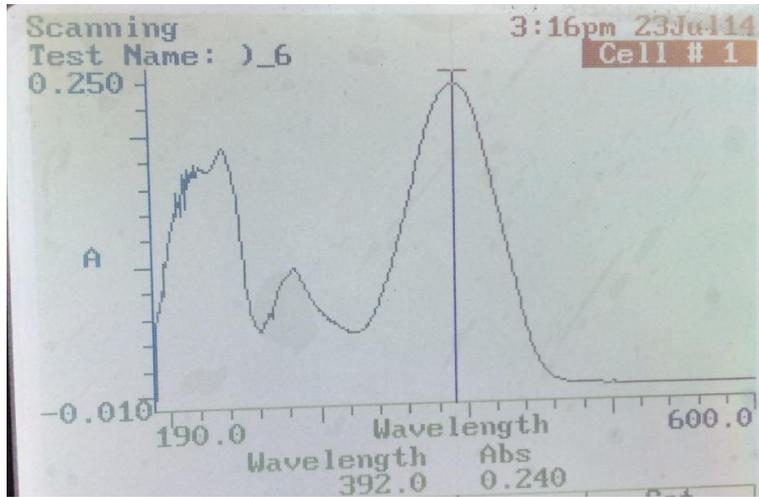
Meio	Solubilidade µg/mL a 37°C
<b>Tampão fosfato</b>	5,63

(SILVA,2016)

### 3.4 Curva de Calibração

Para a determinação do comprimento de onda foi realizado uma varredura de uma solução de SB83 que foi feita em metanol 190 a 600 nm, no (Espectrofotômetro G 10S UV-VIS, Thermo Scientific), onde o comprimento de onda em que houve maior afinidade de absorção foi em 392nm. (Figura 6 ).

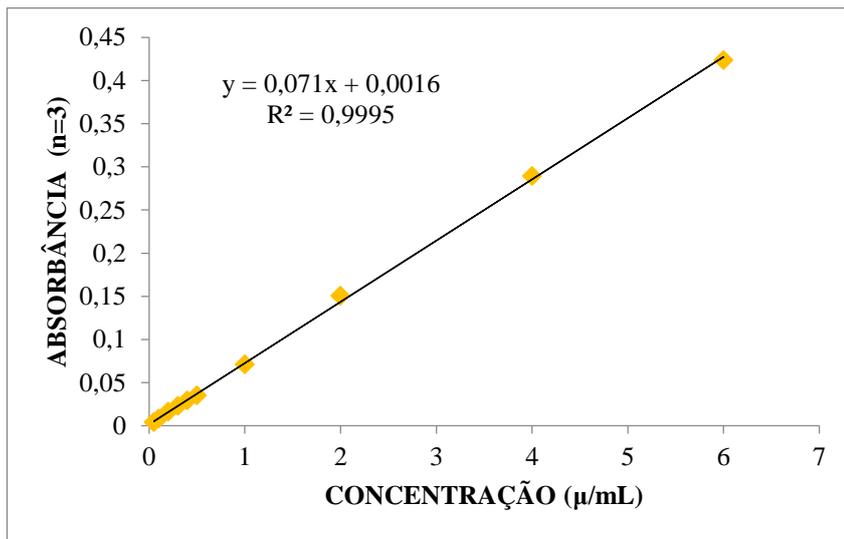
**Figura 6 .** Varredura de uma solução de SB83 em metanol 190 a 600 nm (Espectrofotômetro G 10S UV-VIS, Thermo Scientific).



(SILVA, 2016)

A linearidade é a capacidade de uma metodologia analítica demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analíto na amostra, dentro de um intervalo especificado. A curva analítica construída apresentou coeficiente de correlação linear significativo,  $y = 0,071x + 0,0016$ , e  $R^2 = 0,9995$  (Gráfico 2). Após análise de regressão linear dos 10 pontos analisados, estando em conformidade com o especificado pela Resolução RE 899 (BRASIL, 2003). Portanto, o método analítico mostrou ótima linearidade.

**Gráfico 2.** Curva analítica SB-83

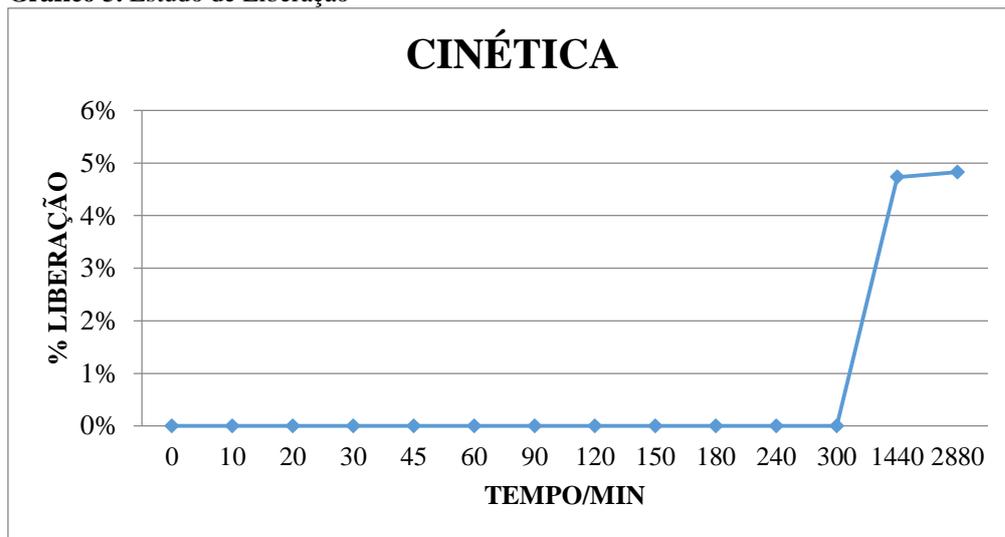


(SILVA, 2016)

### 3.5 Estudo de liberação *in vitro* das formulações

O estudo de liberação *in vitro* das formulações foi realizada em um intervalo de 48 horas (2880 minutos), onde em cada análise eram retirados 2 mL do meio receptor, e feito a reposição dos 2 mL com o solvente utilizado. Os resultados mostraram que o fármaco só foi liberado após as primeiras 24 horas (1440 minutos), como visto no gráfico 3.

Gráfico 3. Estudo de Liberação



(SILVA,2016)

### 3.6 Toxicidade

O teste de toxicidade com artemias salinas foi realizado com o fármaco livre, nanoesfera sem fármaco e com as nanoesferas contendo 7,5 mg de fármaco, também foi utilizado o controle negativo (água destilada), para certificarmos que a mortalidade dos náuplios foi resultante da toxicidade dos compostos e não devido à falta de alimentação ou outros fatores (CARBALLO *et al.*, 2002). A partir dos dados obtidos, foi determinado a CL<sub>50</sub> dos compostos pela análise de regressão linear através do método estatístico Probit.

Como o fármaco possui baixa solubilidade em meio aquoso, não houve nenhuma morte nas artemias decorrente da análise com o fármaco livre, foi visto grumos do fármaco na superfície dos tubos ensaio, ficando claro a não dissolução do SB-83 no solvente utilizado. Os valores obtidos do teste das nanopartículas com fármaco foram CL<sub>50</sub> de 204,14 µg/ml, estando assim na faixa moderadamente tóxica e em nanopartículas sem o fármaco CL<sub>50</sub> de 44,90 µg/ml, estando na faixa muito tóxica. As faixas de toxicidade são fornecidas pelo programa estatístico onde são: atóxicos (CL<sub>50</sub> > 1000 µg/ml), moderadamente tóxico (CL<sub>50</sub>

entre 100 e 800 µg/ml), muito tóxicos (CL<sub>50</sub> entre 0,1 e 100 µg/ml). As nanopartículas se mostraram como um meio inviável de acordo com esses testes preliminares em artemias salinas visto que as nanopartículas sem o fármaco está se apresentado como muito tóxico, sendo necessário testes posteriores para confirmação destes resultados obtidos.

### **3.7 Atividade antileishmania**

#### **3.7.1 Avaliação da atividade antipromastigota e determinação da concentração que inibe 50% do crescimento dos parasitos (CI<sub>50</sub>).**

A avaliação da atividade antipromastigota e determinação da concentração que inibe 50% do crescimento dos parasitos (IC<sub>50</sub>) foram realizadas com intuito de observamos se o fármaco associado às nanopartículas estariam sendo eficazes agentes leishmanicidas, ou se a presença das nanopartículas estariam sendo um fator indutor de toxicidade, com isso nessa avaliação com nanopartículas sem fármaco, e com fármaco SB-83 nas concentrações de (2,5 mg ou 250µg/mL, 5 mg ou 500 µg/mL, e com 7,5 mg 750µg/mL), igualamos a concentração do fármaco em todos os ensaios por meio da fórmula  $C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$ , variando apenas o volume das amostras, fator em decorrência de formulações preparadas inicialmente com menor e maior quantidade de fármaco, onde nos ensaios com as formulações preparadas com 7,5 mg do SB- (750 µg/mL) necessitou-se de um menor volume (conseqüentemente menos nanopartículas) para chegar a concentração igualada entre as formulações, e as nanopartículas preparadas com 250µg/mL, necessitou-se de um maior volume (conseqüentemente mais nanopartículas) para se chegar a concentração igulada.

O resultado do SB-83, em sua forma livre, mostrou sua eficácia leishmanicida nas formas promastigotas, onde o valor de IC<sub>50</sub> foi de 3,37 µM (RODRIGUES, *et al*, 2015). O resultado com as nanopartículas (Tabela 8) mostrou que o IC<sub>50</sub> foi menor onde havia uma maior quantidade de nanopartículas, onde o fármaco estaria pouco influenciando nas mortes das formas promastigotas. Como o teste teve duração de 72 horas, os resultados podem ser explicados pela não liberação total do fármaco, visto que no estudo de liberação *in vitro* das formulações só a partir de 24 horas o fármaco começou a ser liberado pelos nanossistemas.

**Tabela 8** – IC<sub>50</sub> das nanopartículas (brancas, 2,5 mg, 5 mg, 7,5 mg).

<b>Substância</b>	<b>IC<sub>50</sub> (<math>\mu</math>M)</b>
<b>Np SB-83 (750 <math>\mu</math>g/mL)</b>	43,61
<b>Np SB-83 (500 <math>\mu</math>g/mL)</b>	39,4
<b>Np SB-83 (250<math>\mu</math>g/mL)</b>	36,2
<b>Np branca*</b>	31,79
<b>SB-83</b>	3,37

\* Testada com o mesmo volume usado em Np SB-83 (250 $\mu$ g/mL)

(SILVA,2016)

## 4 CONCLUSÕES

As atualizações bibliográficas aconteceram de acordo com a necessidade de melhorar as metodologias de vetorização e melhorar as informações sobre a vetorização de fármacos lipofílicos associados à nanoesferas, bem como de aprofundar e atualizar os assuntos abordados pelo projeto. O método de deposição interfacial de polímeros pré-formados se mostrou adequado para obtenção de sistema nanoestruturado contendo o derivado 2-amino-tiofeno (SB-83). O estudo a associação de nanopartículas com o candidato a fármaco apresentou ótimos resultados em relação a sua estabilidade.

A caracterização físico-química das formulações mostrou resultados satisfatórios, conforme vários estudos da literatura usando mesmo método de preparação e polímero. A solubilidade do SB-83 permite concluir que pode ser classificado como fármaco muito pouco solúvel em meio aquoso.

No estudo da liberação do fármaco os resultados demonstram a ação dos sistemas nanoparticulados, onde só após 24 horas os resultados de liberação foram captados. Porém na análise da toxicidade as nanoesferas sem fármaco apresentaram-se como sendo muito tóxicos no método de estudo utilizado.

A avaliação antipromastigota mostrou que o sistema nanométrico utilizado não melhorou a forma de ação do fármaco, que pode estar relacionado ao tempo do estudo de 72 horas, visto que as nanopartículas retardam a liberação do fármaco os liberam gradualmente, Como os tratamentos atuais para leishmaniose são bastante limitados, esses resultados encorajam para progressão dos estudos destes compostos no desenvolvimento de novos agentes leishmanicidas, associados a outros sistemas nanoestruturados que possam aumentar o potencial do fármaco.

**PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF NANOPARTICLES CONTAINING ANTI-LEISHMANIA DRUG CANDIDATE DERIVED FROM-2-[(1H-5 BROMINE-INDOL-2-IL) METHYLENEAMINE]-5,6,7,8-TETRAHYDRO-4H-CYCLOHEPTA [B] TIOPHENE-3-CARBONITRILE**

SILVA, Jonas Emanuel Guimarães \*

**ABSTRACT**

This study aimed to develop and characterize the nanoparticles formulation containing the derivative of 2-amino-thiophene (SB-83), a promising anti-leishmania drug. Nanoparticles were prepared by the nanoprecipitation method being produced no drug and SB-83 with 2.5, 5 and 7.5 mg. Thereafter it was calculated encapsulation efficiency rate, and the systems were evaluated for morphology, pH, particle size, polydispersity index and zeta potential. It was also a study of the toxicity of systems across the *Artemias salt*, study drug release *in vitro* and evaluation of antipromastigota activity. The results show that the formulations have precipitated only on day 90 and the Tyndall effect was observed, confirming the nanometer particle size. The formulations had developed form of oblong spherical, and values of characteristics were satisfactory and ranged from  $149.97 \pm 0.4$   $185.03 \pm 3.1$  and in size;  $0.11 \pm 0.01$  and  $0.24 \pm 0.01$  polydispersity;  $-8.20 \pm 0.59$  and  $-28.27 \pm 0.21$  zeta potential, and 4.04 to 5.22 pH, the best result of the encapsulation efficiency was 94.94%, the release of the results were only raised 24 hours, the toxicity tests showed that the nanoparticles no drug have high toxicity, and also cause interference in front of drug action as the promastigote forms, with IC<sub>50</sub> 31.79. These results demonstrate the feasibility of the formulation in its technological aspect, however, further studies are needed as to their therapeutic benefits, including further study of toxicity.

Keywords: 2-amine-thiophene. Leishmaniasis. Nanoparticles.

---

\* Aluno de Graduação em Ciências Biológicas na Universidade Estadual da Paraíba – CampusV.  
E-mail: jonas.8@hotmail.com

## 5 REFERÊNCIAS

- AKYUREK, Y.K.; GURCAY, A.G.; OKTAY GURCAN, O.; TURKOGLU, O.F.; CIFTCI, S.Y.; EROGLU, H.; SARGON, M.F.; BILENSOY, E.; ONER, L.; Localized delivery of methylprednisolone sodium succinate with polymeric nanoparticles in experimental injured spinal cord model, *Pharmaceutical Development and Technology*, ISSN: 1083-7450 (print), 1097-9867 (electronic), 2016.
- ALVAR J, VÉLEZ I, BERN C, *et al.* leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *plos one*,; v.7; issue 5; e35671, 2012.
- BAWARSKI, W. E.; CHIDLOWSKY, E.; BHARALI, D. J.; MOUSA, S. A. Emerging nanopharmaceuticals. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, v. 4, n. 4, p. 273-282, 2008.
- BRASIL, Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos. Diretoria Colegiada da Agência Nacional da Vigilância Sanitária, Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 02 jun. 2003.
- BRASIL. Farmacopeia Brasileira, volume 2 / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 546p., 1v/il.1,2010.
- BROWN D. Unfinished business: target-based drug discovery. *Drug Discov Today*; 12: 1007–12, 2007.
- CARBALLO, J. L. *et al.* A comparison between two brine shrimp assays to detect in vitro cytotoxicity in marine natural products. *BMC Biotechnology*. v. 2, n. 17, p 1-5, 2002.
- CARLETO, B.; BERTON, J.; FERREIRA, T.M.; DAMOLIN, L.F.; PALUDO, S.; MAINARDES, R.M.; FAROGO, P.V.; FAVERO, G.M.; Resveratrol-loaded nanocapsules inhibit murine melanoma tumor growth. *Colloids and Surfaces B:Biointerfaces* 144, 65-72, 2016.
- CHAPPUIS, F. *et al.* Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nat Rev Microbiol*; 5: 873–82, 2007.
- CLAUDIA, E.M.; OLIVER, G.; FESSI, H. Nanocapsules prepared via nanoprecipitation and emulsification-diffusion methods: Comparative study; *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. v 80, 235-239, 2012.
- DE MATTOS, A.C; ALTMAYER, C ; TOMINAGA, T.T. ; KHALIL, N.M.; MAINARDES, R.M.; Polymeric nanoparticles for oral delivery of 5-fluorouracil: formulation optimization, cytotoxicity assay and pre-clinical pharmacokinetics study, *Eur.J. Pharm. Sci* 84, 2016.
- DUTRA L.A, DE ALMEIDA L, PASSALACQUA T.G, *et al.* Leishmanicidal Activities of Novel Synthetic Furoxan and Benzofuroxan Derivatives. *Antimicrob Agents Chemother*; 58: 4837–47, 2014.
- FINNEY, D.J. Probit analysis: A statistical treatment of the sigmoid response curve, Cambridge: Cambridge University Press, p.318, 1952.

GARG, N. J. Global health: neglected diseases and access to medicines. *Infectious Disease Clinics of North America*, v.25, p.639-651, 2011.

GERPE, A; ÁLVAREZ, G; BENÍTEZ, D. *et al.* 5-Nitrofuranes and 5-nitrothiophenes with anti-*Trypanosoma cruzi* activity and ability to accumulate squalene. *Bioorganic Med Chem*; 17: 7500–9, 2009.

GONZALEZ, J.L, Stephens CE, Wenzler T, *et al.* Synthesis and antiparasitic evaluation of bis-2,5-[4-guanidinophenyl]thiophenes. *Eur J Med Chem*; 42: 552–7, 2007.

GUIMARÃES-COSTA A.B, NASCIMENTO M.T.C, FROMENT G.S, *et al.* Leishmania amazonensis promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 106: 6748–53, 2009.

JESUS, J.R. Avaliação Sorológica de anticorpos para Leishmania spp. Através da reação de imunofluorescência indireta em população canina da região da Lomba do Pinheiro, cidade de Porto Alegre, RS, Brasil, a partir de casos autóctones humanos de leishmaniose tegumentar. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de pós-graduação em Ciências Veterinárias. Dissertação de mestrado, 2006.

JUNIOR, F.J.B.M, AQUINO, T.M . Doenças Negligenciadas sob a ótica da química medicinal. Editora CRV, 1.ed. ISBN:978-85-444-0508-6, p.381, 2015.

KAYE, P. SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. *Nat Rev Microbiol*; 9: 604–15, 2011.

KULANDASAMY, R; ADHIKARI, A.V; STABLES, J.P. Synthesis and anticonvulsant activity of some new bishydrazones derived from 3,4-dipropoxythiophene. *Eur J Med Chem*; 44: 3672–9, 2009.

LIMA, B; *et al.* Antimicrobial activity of extracts, essential oil and metabolites obtained from *Tagetes mendocina*. *J Chil Chem Soc*; 54: 68–72, 2009.

LIU, H.; CHEN, J. Indomethacin-loaded poly (butylcyanoacrylate) nanoparticles: preparation and characterization. PDA. *Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, n 63, 0207-216, 2009.

MARGL, L; EISENREICH, W; ADAM, P; BACHER, A; ZENK, M.H. Biosynthesis of thiophenes in *Tagetes patula*. *Phytochemistry*; 58: 875–81, 2001.

MELO, N.F.S. *et al.* Preparação e caracterização inicial de complexode inclusão entre nitrofurazona e 2-hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina. *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.*, v. 28, n.1, p.35-44, 2007.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS). **Assistencia farmaceutica na atencao basica**: instruções técnicas para a sua organização. 2. ed. Brasília, 2006a.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS). Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS). **Manual de Vigilancia da Leishmaniose Tegumentar Americana**. 2. ed. Brasília, 2007.

MOHANRAJ, V.J.; Y CHEN, Y.; Nanoparticles – A Review. Orchid Chemicals & Pharmaceuticals Limited, Chennai, India 2 School of Pharmacy, Curtin University of Technology, Perth, Australia. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, June 561-573, 2006.

MOLVI, K.I, *et al.* Synthesis, anti-inflammatory, analgesic and antioxidant activities of some tetrasubstituted thiophenes. *J Enzyme Inhib Med Chem*; 23: 829–38, 2008.

MONTEIRO, L. M. Sistema nanoestruturado polimérico contendo hidroximetilnitrofural: preparação, caracterização físico-química e avaliação in vitro da atividade leishmanicida potencial. 2013. 138p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2013.

MORA-HUERTAS, C.E., FESSI,H., ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *Int. J. Pharm.*, v. 385, p. 113-142, 2010.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases: first WHO report on neglected tropical diseases. Geneva: WHO, 172p, 2010.

PAESE, K. - Desenvolvimento tecnológico, estudo da fotoestabilidade e avaliação da permeação cutânea in vitro da benzofenona-3 a partir de nanocápsulas poliméricas incorporadas em diferentes veículos semi-sólidos, Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil, 2008.

PARVEEN, S. MISRA, R. SAHOO, S.K. Nanoparticles: a boon to drug delivery,therapeutics, diagnostics and imaging, *Nanomedicine* 8, 147, 2012.

PIMENTEL, L.F, *et al.* Nanotecnologia farmacêutica aplicada ao tratamento da malária.Rev BrasCienc Farm. v.43, n.4, p.503-514, 2007.

POHLMANN AR, F. FN, Paese K, D. CB,Poly( $\epsilon$ -caprolactone) microcapsules and nanocapsules in drug delivery.**Expert Opin Drug Deliv.** 2013 May;10(5):623-38. doi: 10.1517/17425247, 2013.

RODRIGUES, K. A. F, *et al.* 2-Amino-thiophene derivatives presents antileishmania activity mediated by apoptosis and immunomodulation in vitro. *European Journal of Medicinal Chemistry*, V. 106, Pg 1–14, 2015.

RYU, C.; CHOI, K. U.; SHIM, J.; *et al.* Synthesis and antifungal activity of 6-arylthio-/6-arylamino-4,7-dioxobenzothiazoles. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. v. 11, p. 4003-4008, 2003.

SÁNCHEZ, M.M, *et al.* In vitro leishmanicidal activity of imidazole- or pyrazole-based benzo[g]phthalazine derivatives against *Leishmania infantum* and *Leishmania braziliensis* species. *J Antimicrob Chemother*; 67: 387–97, 2012.

SANTOS, D.O, COUTINHO, C.E.R, MADEIRA, M.F, *et al.* Leishmaniasis treatment-a challenge that remains: a review. *Parasitol Res*; 103: 1–10, 2008.

SCHAFFAZICK, R.S. GUTERRES, S.S. FREITAS, L.L; POHLMANN, R.A. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. *Química Nova*, v.26, p.726-737, 2003.

SOUZA B.C.C, DE OLIVEIRA T.B, AQUINO T.M, *et al.* Preliminary antifungal and cytotoxic evaluation of synthetic cycloalkyl[b]thiophene derivatives with PLS-DA analysis. *Acta Pharm*; 62: 221–36, 2012.

TAKAHASHI HT, *et al.* Thiophene derivatives with antileishmanial activity isolated from aerial parts of *Porophyllum ruderale* (Jacq.) Cass. *Molecules*; 16: 3469–78, 2011.

TALLEY, J.J.; *et al.* 3,4-Diaril thiophenes and analogs thereof having use as anti-inflammatory agents. US Patent n° 7,030,153 B2; 18 de abril de 2006.

TORCHILIN, V. P; Multifunctional nanocarriers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v.58, pp.1532-55, 2006.

WERMUTH, C.G. Selective optimization of side activities: another way for drug discovery. *J Med Chem*; 47: 1303–14, 2004.

WONGSAGONSUP, R; *et al.* Zeta potential ( $\zeta$ ) analysis for the determination of protein content in rice flour. *Starch/Starke*, v. 57,p. 25-21.2005.

WOODRUFF, M.A., HUTMACHER, D.W. The return of a forgotten polymer – Polycaprolactone in the 21st century. *Prog. Polym. Sci.*, v. 35, p. 1217-1256, 2010.