



UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E SOCIAIS APLICADAS –
CCBSA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

NATALINA DANTAS

**DESENVOLVIMENTO DE UMA NOVA TÉCNICA DE OBTENÇÃO DE
NANO/MICROCRISTAIS PARA INCREMENTO DE SOLUBILIDADE
DE FÁRMACOS E ANÁLISE CITOTÓXICA EM MODELO DE
*ARTEMIA SALINA***

João Pessoa, PB

2012

NATALINA DANTAS

**DESENVOLVIMENTO DE UMA NOVA TÉCNICA DE OBTENÇÃO DE
NANO/MICROCRISTAIS PARA INCREMENTO DE SOLUBILIDADE
DE FÁRMACOS E ANÁLISE CITOTÓXICA EM MODELO DE
*ARTEMIA SALINA***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas
da Universidade Estadual da Paraíba, em
cumprimento as exigências para obtenção do
grau de Bacharel em Ciências Biológicas

Orientador: Dr. Francisco Jaime Bezerra Mendonça Junior

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA SETORIAL CAMPUS V – UEPB

D192d

Dantas, Natalina.

Desenvolvimento de uma nova técnica de obtenção de nano/microcristais para incremento de solubilidade de fármacos e análise citotóxica em modelo de artemia salina / Natalina Dantas. – 2012.

56f. : il. color

Digitado.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e Sociais Aplicadas, Curso de Ciências Biológicas, 2012.

“Orientação: Prof. Dr. Francisco Jaime Bezerra Mendonca Junior, Curso de Ciências Biológicas”.

1. Nanocristais. 2. Nanossuspensões. 3. Derivados tiofênicos.
I. Título.

21. ed. CDD 547.594

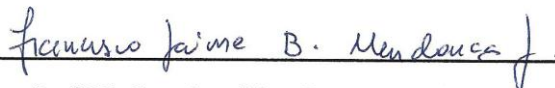
NATALINA DANTAS

DESENVOLVIMENTO DE UMA NOVA TÉCNICA DE OBTENÇÃO
DE NANO/MICROCRISTAIS PARA INCREMENTO DE
SOLUBILIDADE DE FÁRMACOS E ANÁLISE CITOTÓXICA EM
MODELO DE *ARTEMIA SALINA*

Monografia apresentada ao Curso de
Bacharelado em Ciências Biológicas da
Universidade Estadual da Paraíba, em
cumprimento à exigência para obtenção
do grau de bacharel.

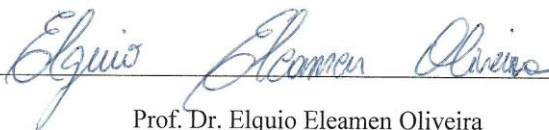
Aprovado em 26 de 11 de 2012

BANCA EXAMINADORA



Prof.DR. Francisco Jaime Bezerra Mendonça Junior

Orientador - UEPB



Prof. Dr. Elquio Eleamen Oliveira

Examinador – UEPB



Prof. Dr. Ricardo Olímpio de Moura

Examinador - UEPB

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho primeiramente a Deus, aquele que me deu toda coragem, perseverança e apoio em todos momentos, nunca me permitindo desistir dos meus objetivos e me fazendo lutar para alcançar meus sonhos. Sei senhor que não sou uma filha como deveria, que lhe agrade em todas as minhas ações, mas compreenda sou falha e nada do que eu faço é por todo mal.

Dedico este trabalho também a todos que acreditaram e acreditam na educação como instrumento transformador da sociedade e principalmente naqueles que possibilitaram a mim a conclusão de todo projeto de vida que vim e venha a desenvolver: Minha família.

AGRADECIMENTOS

*Agradeço a **Deus** pela força que me deste durante esta difícil trajetória, para persistir apesar dos desafios e adversidades, enfrentando-os sem esmorecer, alcançando vitoriosa esta etapa de minha vida.*

Há momentos em nossas vidas, que a única coisa de que precisamos, é poder olhar a nossa volta e ver alguém que realmente se importa conosco e que simplesmente nos diga "estou tão orgulhoso de você... e não importa o que aconteça, sempre estarei ao seu lado te apoiando." E por isso, agradeço à minha família.

*Em especial a minha irmã **Rosa Dantas** que apesar de todos os conflitos a amo e ela é como uma mãe que cuida e se preocupa até demais. Ela é a minha fortaleza e refúgio, dedico e agradeço de todo o meu coração esta conquista tão importante em minha vida. Obrigada pelo amor que me ajudou a trilhar este caminho, compartilhando ideias e ideais por mais distantes e inatingíveis que pareça, lutando comigo e me incentivando a prosseguir, fossem quais fossem os obstáculos, acreditando e confiando na minha capacidade, sacrificando-se muitas vezes em favor da família.*

*À minha irmã, **Damiana Dantas** pessoa muito especial que também nos últimos anos estive ao meu lado, apoiando e compreendendo-me incondicionalmente. Até mesmo nos momentos mais difíceis e delicados. A qualquer hora, estive de braços abertos, acalmando meu coração, fazendo-me sorrir e perceber o lado positivo de cada adversidade. Juntas rimos e sofremos nas incontáveis horas de cansaço, preocupação e incertezas.*

*A meu querido professor e orientador **Dr. Francisco Jaime Bezerra Mendonça Junior** expresso todo meu carinho e sincero agradecimento pelo seu voto de confiança, principalmente por ter acreditado em mim, no meu trabalho e potencial. Sempre estive junto apoiando a cada passo na concretização deste desafio. A palavra desânimo não fez parte do nosso dia-a-dia, muito pelo contrário, houveram muitos momentos de alegria. Agradeço também ao professor **Dr. Elquio Eleamen Oliveira** pela ideia do projeto de nanocristais e por ter me permitido ser sua aluna de iniciação científica. Eu o agradeço por todo o conhecimento a mim transmitido.*

Ao longo deste caminho, encontrei pessoas muito importantes que percorreram ao meu lado, vivendo minha luta, e que de alguma forma, compartilharam dos prazeres e dificuldades ao longo destes 4 anos. Aos colegas e amigos de turma Elisângela, Jander, e Randson obrigada pelo ombro amigo, pelas conversas, pelas trocas de conhecimentos, pela ajuda e apoio. Cada um de vocês deixou um pouco de si, contribuindo para a felicidade de hoje. A família LSVM eu também agradeço por vocês fazerem parte da minha história.

*Um sincero agradecimento a todos os professores que por mim passaram ao longo desta graduação e deixou de alguma forma algum ensinamento. Em especial agradeço aos professores **Ricardo Olímpio de Moura** e **Ênio Wocily Dantas** por contribuir não apenas com seus conhecimentos em sala de aula, mas também com valores morais como, responsabilidade, dedicação, amizade e amor pelo o que faz. Enfim à todos que estiveram ao meu lado compartilhando comigo momentos único, que deixarão saudades.*

*Meu Muito Obrigada ... **“Valeu à pena!!!”***

*Adicione conhecimento como se fosse viver por toda vida e viva como se fosse
morrer amanhã*

Añadi conocimiento como si fueras a vivir toda la vida y vive como si fueras a

morir mañana

(Charlie Chaplin)

RESUMO

Um dos principais problemas relacionados ao desenvolvimento de novos fármacos é a obtenção de parâmetros ADME (Absorção/Distribuição/Metabolismo/Excreção) satisfatórios. A maior parte dos novos fármacos que chegam às fases pré-clínicas e clínicas são rejeitados antes de chegarem ao mercado ou por apresentarem efeitos colaterais incompatíveis ou por não possuir perfil farmacocinético satisfatório. Para essa última possibilidade, a solubilidade do composto no meio aquoso se mostra um parâmetro essencial. Nesse trabalho seis derivados tiofênicos, (codificados: 7CN05, 7CN08, 7CN09, 7CN10, 6CN14 e 6CN10) sintetizados no Laboratório de Síntese e Vetorização de Moléculas da Universidade Estadual da Paraíba que se mostraram ativos em testes preliminares de atividade antifúngica e citotóxica *in vitro*, foram selecionados no intuito da promoção de um incremento de suas solubilidades (visto que os mesmos apresentam como característica comum, uma muito baixa solubilidade) através do desenvolvimento de nanossuspensões contendo micro/nanocristais. Objetivou-se ainda a determinação e comparação da citotoxicidade das formulações e dos produtos em estado bruto através de ensaios de letalidade em *Artemia salina*. Para tanto foram: determinados o comprimento de onda máximo ($\lambda_{MÁX}$); obtidas as curvas de calibração usando espectrofotômetro UV/Vis; e realizados teste de solubilidade em água e metanol para cada um dos compostos na forma bruta. Em seguida foi desenvolvido um processo de produção das nanossuspensões baseado no método da nanoprecipitação. As formulações foram avaliadas quanto ao tamanho das partículas e a solubilidade. A determinação da solubilidade dos fármacos em sua forma bruta demonstrou que os compostos são praticamente insolúveis em água. Em 5 dos 6 compostos não foi possível determinar os valores de solubilidade, sendo atribuído o valor zero. Para o composto 6CN10, o valor da solubilidade foi determinado em 0,5683 μ g/ml. Após preparação das formulações dos nanocristais as solubilidades determinadas tiveram valores variando entre 64,61 μ g/ml (7CN10) e 925,32 μ g/ml (6CN10). A análise microscópica comprovou a redução do tamanho dos cristais dos compostos em algumas centenas de vezes. O incremento na solubilidade obtida com as nanossuspensões resultou também numa alteração do perfil farmacológico dos compostos. Foi observado que alguns fármacos formulados apresentaram valores de citotoxicidade superior (até 500 vezes) quanto comparados com os fármacos em sua forma bruta. Estes resultados comprovam que o processo desenvolvido para obtenção dos micro/nanocristais foi eficiente, induz a um incremento significativo na solubilidade do fármaco e promove alterações do perfil farmacológico (indicativo da possibilidade de diminuição da dose com manutenção da atividade biológica), se apresenta como uma técnica barata, interessante e promissora para a indústria farmacêutica promover o incremento da solubilidade e a melhora do perfil ADME de princípios ativos de baixa solubilidade.

Palavras-Chave: nanocristais, nanossuspensões, solubilidade, derivados tiofênicos.

ABSTRACT

One of the main problems related to the development of new drugs is to obtain satisfactory ADME (Absorption / Distribution / Metabolism / Excretion) parameters. Most new drugs that arrive at the pre-clinical and clinical trials are rejected before they reach the market or due to incompatible collateral effects or do not have suitable pharmacokinetic profile. For this last possibility, the compound solubility in the aqueous medium is an essential parameter. In this work six thiophenics derivatives, (coded: 7CN05, 7CN08, 7CN09, 7CN10, and 6CN14 6CN10) synthesized in the Laboratory of Synthesis and Vectorization of Molecules of State University of Paraíba that were active in early trials of antifungal activity and cytotoxic *in vitro*, were selected in order to promote an increase in their solubilities (since they have a common characteristic, a very low solubility) by developing nanosuspensions containing micro / nanocrystals. Still had as objective the determination and comparison of the cytotoxicity of the formulations and products in the crude state by tests in brine shrimp lethality. For that were determined the maximum wavelength (λ_{MAX}); calibration curves obtained by using a spectrophotometer UV / Vis; and solubility test conducted in water and methanol for each compound in crude form. Then we developed a process of producing nanosuspensions based on the method of nanoprecipitation. The formulations were evaluated for particle size and solubility. The determination of solubility of the drug in crude form demonstrated that the compounds are practically insoluble in water. In 5 of the 6 compounds was not possible to determine the solubility values being assigned the value zero. For compound 6CN10, the value of solubility was determined as 0.5683 $\mu\text{g} / \text{ml}$. After preparation of nanocrystals formulations the solubilities determined had values ranging from 64.61 $\mu\text{g} / \text{ml}$ (7CN10) and 925.32 $\mu\text{g} / \text{ml}$ (6CN10). Microscopic analysis confirmed the reduction of the size of the crystals of compounds in few hundred times. The increase in solubility obtained with nanosuspensions also resulted in a change of the pharmacological profile of the compounds. It was observed that some drugs formulated showed higher cytotoxicity values (up to 500 times) as compared with the drug in its crude form. These results prove that the developed process for obtaining micro / nanocrystals was efficient, induces a significant increase in drug solubility and promotes changes in the pharmacological profile (indicative of the possibility of dose reduction while maintaining the biological activity), presents as an inexpensive technique, interesting and promising for the pharmaceutical industry to promote the increased solubility and improved ADME profile of active ingredients of low solubility.

Keywords: nanocrystals, nanosuspensions, solubility, derived thiophenic

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Estruturas químicas dos compostos em estudo.....	16
FIGURA 2. Tabela de conversão do percentual da média de náuplius mortos probit Extraído de Finney(1952).....	30
FIGURA 3 a. Cristal bruto de 6CN10. Objetiva 100x	34
FIGURA 3 b. Micro/nanocristal de 6CN10. Objetiva de 100x	34
FIGURA 4 a. Cristal bruto de 7CN05. Objetiva 100x	35
FIGURA 4b Micro/nanocristal de 7CN05. Objetiva de 100x.....	35
FIGURA 5 a. Cristal bruto 7CN10. Objetiva 100x	36
FIGURA 5 b. Micro/nanocristal 7CN10. Objetiva de 100x	36
FIGURA 6 a. Formulação 7CN10 sem liofilização. Objetiva 100x	37
FIGURA 6 b. 7CN10 liofilizado. Objetiva 100x	37

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Termos descritivos de solubilidade e seus significados.....	19
TABELA 2. Tabela construída utilizando os dados do composto 6CN10 para obtenção do gráfico de regressão linear	30
TABELA 3. Dados obtidos a partir de testes de varredura, curva de calibração e solubilidade.....	32
TABELA 4. Tabela construída com os dados do composto 7CN10 para realização do cálculo da CL50.....	39

LISTA DE GRÁFICOS

- GRÁFICO 1.** Curva 6CN14 em metanol (concentração ($\mu\text{g/mL}$) x absorbância) 31
- GRÁFICO 2.** Gráfico de regressão linear PROBIT para o composto 7CN 10..... 39

SUMÁRIO

1. Introdução.....	14
2. Revisão da Literatura	17
2.1. A nanotecnologia na ciência farmacêutica.....	17
2.2. Solubilidade de fármacos pouco solúveis	18
2.3. Fatores que afetam a solubilidade	20
2.4. Técnicas para aumento da solubilidade de fármacos baseados na redução do tamanho da partícula.....	21
2.4.1 Nanosuspensão	21
2.5. Importância dos Tiofênicos.....	23
2.6. Teste de citotoxicidade de fármacos	25
3. Objetivos	25
3.1 Objetivo Geral.....	25
3.2 Objetivos específicos	25
4. Metodologia	25
4.1 Determinação do comprimento de onda máximo ($\lambda_{MÁX}$) de cada um dos compostos	25
4.2 Obtenção da curva de calibração.....	26
4.3 Teste de solubilidade em metanol	26
4.4 Teste de solubilidade em água	27
4.5 Preparação das nanosuspensões	27
4.6 Caracterização das nanosuspensões	28

4.6.1	Determinação dos tamanhos dos cristais.....	28
4.7	Comportamento das nanosuspensões quanto ao processo de liofilização	28
4.8	Teste de citotoxicidade das nanosuspensões dos fármacos 6CN10, 6CN14, 7CN05, 7CN08, 7CN09, 7CN10.....	28
4.8.1	Preparo das amostras.....	29
4.8.2	Obtenção dos dados.....	29
4.8.3	Análise dos dados.....	29
5.	Resultados e discussão	31
5.1	Parte experimental.....	31
5.2	Parte Biológica	38
5.2.1	Teste de citotoxicidade das nanosuspensões.....	39
6.	Conclusão	41
7.	Perspectivas	42
8.	Referências	43
9.	Anexos.....	48
9.1	Anexo I: Espectros de varredura dos compostos estudados	48
9.2	Anexo II: Gráficos da curva de calibração dos compostos estudados.....	51
9.3	Anexo III: Gráfico de regressão linear PROBIT dos compostos	53
9.4	Figuras dos micro/nanocristais	55

1. Introdução

Os últimos 20 anos têm sido marcados por um intenso avanço tecnológico em muitos campos do conhecimento, e o domínio da nanociência e da nanotecnologia é um dos mais promissores campos de pesquisa da ciência, prometendo uma verdadeira revolução tecnológica (KASAMA, *et al.*, 2008).

A infinidade de benefícios e perspectivas oferecidas a todas as áreas de atuação pela nanociência deve-se à interdisciplinaridade desta tecnologia inovadora. A comunidade científica brasileira tem acompanhado a tendência mundial e vem aumentando sua produção intelectual em nanociência e nanotecnologia, em todas suas linhas de pesquisa. Devido à versatilidade e funcionalidade dos materiais gerados, a nanotecnologia está sendo empregada nos mais diversos segmentos, destacando-se os setores farmacêutico, alimentício e cosmético (ARAKI, 2007). No que se refere ao mercado farmacêutico e cosmético, a principal vantagem está na capacidade de desenvolver sistemas para veiculação de fármacos e ativos, possibilitando a produção de formulações mais eficazes e estáveis. (GRANADA, *et al.*, 2007).

Dentre essas novas tecnologias desenvolvidas, inclui-se a produção de nanocristais que envolve a redução do tamanho da partícula do fármaco, geralmente para menos de 1.000 nanômetros. A nanocristalização pode ser aplicada tecnicamente a qualquer fármaco. Existem dois métodos distintos para a produção de nanocristais: desenvolvimento “*bottom-up*” e “*top-down*”. Redução de tamanho de partícula de cristais maiores, formando os nanocristais “*top-down*” ou através da construção de partículas por precipitação de moléculas dissolvidas “*bottom-up*” (MÜLLER & KECK, 2004). A produção pela tecnologia *top-down* baseia-se no processo de homogeneização por alta pressão preferencialmente em meio aquoso. O princípio básico da técnica *bottom-up* é que a droga dissolvida em um solvente é precipitada pela adição de um não solvente.

Os nanocristais obtidos apresentam enorme interesse científico, pois promovem o aumento da superfície exposta da droga, assim como sua taxa de absorção e eficiência como fármaco, isso favorece na redução da sua dose terapêutica e no aumento de sua biodisponibilidade (DURÁN, *et al.*, 2010). Os compostos cuja solubilidade aquosa é baixa são aqueles que geralmente são escolhidos para serem processados em nanocristais (RABINOW, 2004).

Estima-se que mais de 40% dos fármacos em desenvolvimento apresentam baixa solubilidade, gerando um número significativo de protótipos que são descartados por não

serem aprovados nos testes clínicos devido sua baixa absorção (MARQUES *et al.*, 2009). Sendo assim, um dos maiores desafios com que a indústria farmacêutica atualmente se depara, consiste em desenvolver estratégias para melhorar a solubilidade destes fármacos em água, melhorando assim a sua biodisponibilidade (VIPAGUNTA, *et al.*, 2006) e perfil farmacológico .

Os derivados 2-amino-tiofênicos já são conhecidos na literatura pelo seu extenso espectro de atividades biológicas associadas. Dentro desse grupo já existem compostos com diversas aplicações na indústria farmacêutica e síntese orgânica (PUTEROVÁ; KRUTOSIKOVA; VÉGH, 2009), como o metafenileno (anti-histamínico), ácido tiaprofênico (antiinflamatório), olanzapina (tratamento de esquizofrenia) e o siltiofan (ação fungicida) (STEFANI, 2009).

Devido a este potencial farmacológico o Laboratório de Síntese e Vetorização de Moléculas (LSVM) da Universidade Estadual da Paraíba investiu na síntese de novas moléculas derivadas do núcleo 2-amino-tiofeno como por exemplo: 2-[(2,4-dicloro-benzilideno)-amino]-5,6,7,8-tetraidro-4*H*-ciclohepta[*b*]tiofeno-3 carbonitrila (**7CN05**), 2-[(3,4-dicloro-benzilideno)-amino]-5,6,7,8-tetraidro-4*H*-ciclohepta[*b*]tiofeno-3-carbonitrila (**7CN08**), 2-[(5-bromo-2-metóxi-benzilideno)-amino]-5,6,7,8-tetraidro-4*H*-ciclohepta[*b*]tiofeno-3-carbonitrila (**7CN09**), 2-[(4-nitro-benzilideno)-amino]-5,6,7,8-tetraidro-4*H*-ciclohepta[*b*]tiofeno-3-carbonitrila (**7CN10**), 2-[(4-flúor-benzilideno)amino]-4,5,6,7-tetraidro-4*H*-benzo[*b*]tiofeno-3-carbonitrila (**6CN14**) e 2-[(4-nitrobenzilideno)amino]-4,5,6,7-tetraidro-4*H*-benzo[*b*]tiofeno-3-carbonitrila, (**6CN10**) (figura 1), tendo este último comprovada atividade antifúngica (MENDONÇA- JUNIOR *et al.*, 2011).

Além do grande potencial biológico, esses compostos apresentam como característica comum uma baixa solubilidade em água. De forma a resolver esta característica indesejada e com isso permitir um incremento da atividade biológica desses derivados, o objetivo deste trabalho é melhorar o perfil de solubilidade destas moléculas sintetizadas no LSVM através do desenvolvimento de micro/nanocristais a partir de uma nova metodologia de obtenção de nanosuspensão e avaliar sua citotoxicidade frente ao modelo de *Artemia salina* através da determinação dos valores da CL₅₀ antes e após procedimento nanotecnológico.

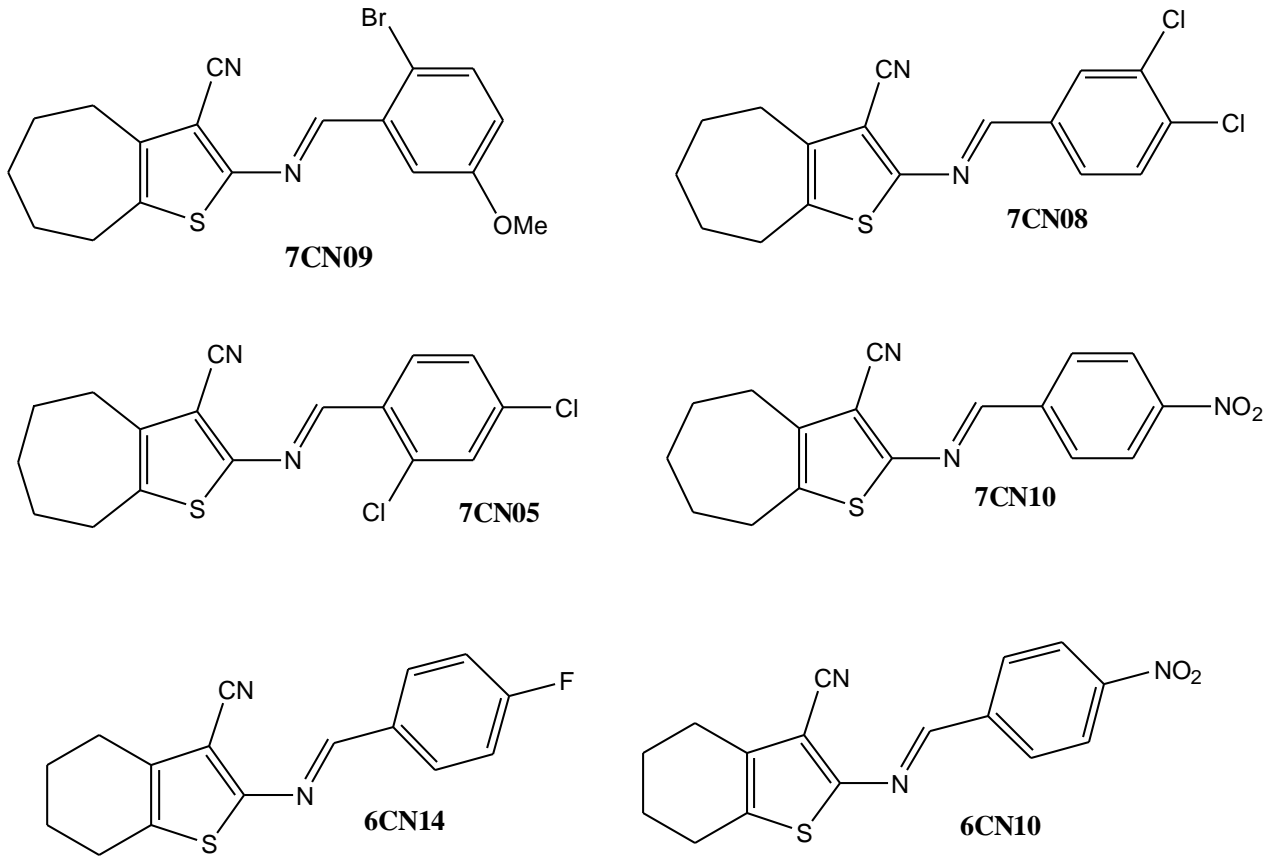


Figura 1. Estruturas químicas dos compostos em estudo.

2. Revisão da Literatura

2.1. A nanotecnologia na ciência farmacêutica

A nanotecnologia é um ramo recente da ciência que se aplica a praticamente todos os setores da pesquisa, da engenharia de materiais e de mercado. A habilidade de caracterizar, manipular e organizar materiais em escala nonométrica está promovendo uma revolução científica e tecnológica de proporções ainda não identificadas (LEE, 2004). A nanotecnologia tornou-se um dos temas promissores na indústria de pesquisas farmacêutica e com isso também a necessidade de adequadas técnicas de análise de tais sistemas (CARL ENGLERT, 2007).

Na área farmacêutica, os sistemas nanométricos ainda não são amplamente difundidos como as emulsões, suspensões e demais formas farmacêuticas sólidos, semi-sólidos e líquidos, porém possuem grande potencial de serem usados como sistemas sofisticados de liberação de drogas (LEE, 2004).

A tecnologia de liberação controlada caracteriza o sistema capaz de prover algum controle terapêutico, seja de natureza temporal, espacial ou ambos. Quando o veículo empregado promove apenas uma liberação em tempo prolongado podemos denominar como liberação sustentada (DURÁN, 2010). Tal tecnologia envolve diferentes aspectos multidisciplinares e pode contribuir muito para o avanço da saúde humana, como por exemplo, melhoria da sua biodisponibilidade, redução da dose terapêutica e toxicidade.

Para alcançar este objetivo, tem sido desenvolvidos diversos sistemas nanométricos mais sofisticados, revestidos por polímeros hidrófilos, denominados de tecnologia Stealth que permite um tempo de circulação maior no organismo (MARQUES, et al., 2009) . Isso é permitido devido ao desenvolvimento de técnicas de nanoemulsões e nanosuspensões as quais trabalham na redução do tamanho das partículas, melhorando a solubilidade e biodisponibilidade de drogas pouco solúveis em água.

As emulsões são amplamente empregadas como veículos nas indústrias cosméticas e farmacêuticas por apresentarem vantagens como veiculação de fármacos ativos hidrofílicos e lipofílicos na mesma formulação, além de possibilitarem o controle de aspectos sensoriais adaptados às necessidades da via de administração para os quais se destinam (CAMARGO, 2008). Em geral as emulsões são compostas por três fases: aquosa, oleosa e tensoativo. São estabilizados cineticamente pela adição de agentes tensoativos capazes de diminuir a tensão

superficial do sistema e de formar um filme interfacial com propriedades estéricas e eletrostáticas em torno dos glóbulos da fase interna (MORRISON & ROSS, 2002).

Os nanocristais apresentam grandes vantagens tecnológicas, uma vez que muitas das suas propriedades elétricas e termodinâmicas dependem do tamanho das partículas, podendo, com isso ser controlado através de cuidadosos processos de produção. Entre as vantagens que os nanocristais podem oferecer destacam-se: **i.** Aumento da eficácia terapêutica; **ii.** Diminuição da dose terapêutica e do número de administrações **iii.** Incremento de solubilidade (MARQUES *et al.*, 2009).

Pela nanobiotecnologia está previsto o provimento de meios para diagnósticos prematuros e melhora no diagnóstico de doenças, permitindo tratamentos em fases iniciais das doenças.

2.2. Solubilidade de fármacos pouco solúveis

A maioria das novas moléculas em desenvolvimento tem por finalidade serem incorporadas em formas farmacêuticas sólidas orais que lhes permitam uma dissolução e absorção reprodutíveis e adequadas à obtenção das concentrações plasmáticas necessárias para a obtenção do efeito terapêutico pretendido (CHARMAN & CHARMAN, 2003). No entanto, muitas destas novas moléculas, são pouco solúveis em água, apresentando uma baixa absorção após sua administração oral. O efeito terapêutico de um fármaco depende da sua biodisponibilidade e da solubilidade das suas moléculas.

A solubilidade de um soluto é a quantidade máxima de soluto que se pode dissolver numa determinada quantidade de solvente ou de solução a uma determinada temperatura. Por outras palavras, a solubilidade pode também ser definida como a capacidade de uma substância formar uma solução (MULLER & PITERS, 1998).

A solubilidade é um dos parâmetros mais importantes para alcançar a concentração desejada do fármaco na circulação sistêmica, para se obter uma resposta farmacológica. Atualmente, apenas 8% dos novos fármacos possuem igualmente elevada solubilidade e permeabilidade (MARQUES *et al.*, 2009).

Dependendo da sua solubilidade em água, cada fármaco possui um perfil diferente e único de liberação e de ação no alvo. Os fármacos pouco solúveis em água, assim como os que apresentam sérios efeitos colaterais, requerem uma tecnologia para a sua liberação em um alvo-específico. Outros problemas como lenta absorção e a aplicação de volumes excessivos

em administrações intravenosas podem ser melhorados através do uso de sistemas de liberação sustentada (sistemas inteligentes), (SHAH, 2006). Isto ampliaria o uso de vários fármacos, alguns deles biotecnológicos, tais como a afidicolina .

A solubilidade de um fármaco é um parâmetro chave nos estudos de pré-formulação. De acordo com a Farmacopeia Brasileira II (2011) as substâncias podem ser classificadas quanto à sua solubilidade (tabela 1).

Solvente	Quantidades aproximadas do solvente, em mililitros, para um grama da substância
Muito solúvel	Menos de 1 parte
Facilmente solúvel	De 1 a 10 partes
Solúvel	De 10 a 30 partes
Ligeiramente solúvel	De 30 a 100 partes
Pouco solúvel	De 100 a 1 000 partes
Muito pouco solúvel	De 1 000 a 10 000 partes

Tabela 1. Termos descritivos de solubilidade e seus significados.

Outro problema de fármacos pouco solúveis em meio aquoso é a sua baixa biodisponibilidade quando administrados oralmente. Este fato pode ser atribuído a dois fatores, além da sua possível degradação no aparelho digestivo: baixa velocidade de dissolução e, baixa permeabilidade do fármaco nas paredes do aparelho digestivo (DURÁN *et. al.*, 2010). Em geral, fármacos que possuem baixa solubilidade apresentam também uma baixa velocidade de dissolução (MULLER *et.al.* , 2004).

A absorção oral de fármacos pouco solúveis em água pode ser melhorada pelo aumento da velocidade de dissolução do fármaco através do aumento da sua área superficial e, aumento da solubilidade de saturação do fármaco. O primeiro aspecto pode ser atingido por micronização, entretanto para a maioria dos produtos biotecnológicos este procedimento não é suficiente, devido à solubilidade muito baixa destes produtos. Desta forma, o aumento da área superficial não possibilita a obtenção de uma rápida velocidade de dissolução para atingir níveis plasmáticos terapêuticos. Porém, a transformação de cristais do fármaco em

nanocristais poderia aumentar sua absorção oral. Isto porque a redução para nanocristais, além de aumentar a velocidade de dissolução do fármaco (aumento da área superficial) aumenta simultaneamente a sua “solubilidade de saturação”. Deste modo, as partículas de nanocristais podem ser administradas por via oral e por via intravenosa em suspensões aquosas (MULLER *et.al.*, 2004).

2.3. Fatores que afetam a solubilidade

O tamanho das partículas de sólido influencia a solubilidade, porque à medida que a partícula vai ficando menor, a relação área de superfície/volume aumenta. A grande área de superfície permite uma grande interação com o solvente. A temperatura também afeta a solubilidade por que, se o processo de dissolução absorve energia, a solubilidade aumenta à medida que aumenta a temperatura. Se o processo de dissolução liberta energia, a solubilidade diminui com o aumento da temperatura. Geralmente, um aumento na temperatura de dissolução aumenta a solubilidade de um soluto sólido (ALMEIDA, 2009).

O tamanho molecular também influencia na solubilidade do fármaco. Quanto maior for a molécula, ou maior for o seu peso molecular, menos solúvel é a substância. Moléculas grandes são geralmente mais difíceis de serem envolvidas por moléculas de solvente.

Outro aspecto importante no estudo de nanonização dos fármacos é a forma dos nanocristais formados, visto que a estrutura cristalina (forma) destes pode modificar vários aspectos da sua ação, assim como suas estabilidade e biodisponibilidade (FANTIN *et al.*, 2003). O polimorfismo (existência de diferentes formas cristalinas de um mesmo fármaco) pode causar variações no ponto de fusão, estabilidade, densidade e na solubilidade do fármaco, já que estas propriedades dependem da tendência de escape da molécula de uma estrutura cristalina particular. Além disto, a forma polimórfica influencia na concentração de saturação (cs) sendo que a solubilidade é maior para as modificações polimórficas que apresentam alta energia interna e baixo ponto de fusão (RABINOW, 2004)

2.4. Técnicas para aumento da solubilidade de fármacos baseados na redução do tamanho da partícula

A redução do tamanho de partícula pode ser alcançada por nanoemulsão e nanosuspensão. Cada uma das técnicas utiliza diferentes equipamentos para reduzir o tamanho de partícula (PINNAMANENI, 2002).

2.4.1. Nanosuspensão

Recentemente, foi observado que a maioria das drogas insolúveis em água pertencem aos grupos de agentes: anticancerígeno, anti-infeccioso, sistema nervoso central (SNC) e anti-viral. Com o aumento da incidência de tais doenças, tem havido um forte interesse em formas de dosagem para aplicações de nanosuspensões injetáveis (WONG *et al.*, 2008).

Uma importante vantagem das drogas em nanosuspensões é a sua possibilidade de administração por vias diferentes, tais como a oral (LIVERSIDGE & CUNDY, 1995), parenteral (PETERS *et al.*, 2000) e ocular (ROSÁRIO *et al.*, 2002). Além disso, nanosuspensões tem demonstrado resultados farmacológicos e farmacocinéticos superiores às tradicionais formas farmacêuticas para cada via de administração.

Para nanosuspensões, de acordo com equação de Noyes-Whitney e Ostwald-Freundlich, o tamanho da partícula em escala nanométrica pode levar a um aumento de velocidade de dissolução e a solubilidade de saturação (JACOBS & MULLER, 2002), de modo que a absorção oral de drogas pouco solúveis, juntamente com maior biodisponibilidade pode ser obtida quando comparada com a formulação tradicional (BERNHARD & MULLER, 1999). Para além disso, devido ao seu tamanho pequeno, nanosuspensões podem ser injetadas por via intravenosa podendo alcançar uma biodisponibilidade de 100% (MULLER & KECK, 2004).

A alta biodisponibilidade (até 100%) de um fármaco pode ser obtida com nanocristais com diâmetro médio inferior a 400 nm. Nesta faixa de diâmetro é possível a aplicação destes fármacos por via intravenosa, já que seu tamanho é muito menor que o diâmetro dos vasos capilares (5-6 μm). Uma vantagem da nanocristalização é o aumento da biodisponibilidade oral do fármaco nanocristalino. Esta biodisponibilidade pode ser aumentada através da incorporação do nanocristais em nanoestruturas como, por exemplo, em nanopartículas lipídicas sólidas (NLS), carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) ou transformado em conjugado fármaco-lipídio (CFL), (SHAH, 2006)

Vários métodos de nanocristalização são conhecidos, mas o mais simples é a homogeneização à alta pressão. Em 1999, Müller e colaboradores desenvolveram um novo método para produção de nanosuspensões de fármacos utilizando como solvente a água. Este método utiliza um homogeneizador de alta pressão que contém um pistão cilíndrico que pode gerar uma pressão de até 2000 bar. A suspensão é pressionada através de um orifício de 3-5 mm a uma pressão entre 150-1500 bar. Nestas condições o líquido começa a ferver formando

bolhas de gás que explodem quando a suspensão deixa o orifício. Em seguida, a pressão volta ao normal (cavitação). A formação de bolhas de gás seguida por suas explosões gera ondas de choque que causam a diminuição das partículas (MULLER ; JACOBS & KAYSER, 2000).

A nanonização também pode ser realizada pelo método denominado NanoCrystal® (MERISKO-LIVERSIDG & LIVERSIDGE, 2008). Esse método se baseia na moagem de suspensões aquosas de cristais micrométricos do fármaco estabilizados por tensoativos.

Este processo, aprovado em vários países, é versátil, pode ser aplicado em diferentes compostos aumentando sua solubilidade em água e permitindo a obtenção de formulações de nanocristais para administração oral e intravenosa (MERISKO-LIVERSIDG & LIVERSIDGE, 2008). Através deste processo, nanocristais de diferentes fármacos foram preparados como o cilostazol , que apresentou um aumento na sua biodisponibilidade quando aplicado em cachorros Beagle (JINNO *et al.*, 2006)

As nanossuspensões podem ser estabilizadas por lecitina ou por outros tensoativos, tais como Tween 80 ou o Poloxamero 188 (MULLER & JUNGHANN, 2006).

Os tensoativos são moléculas com distintas regiões polares e não polares. Quando pequenas moléculas apolares são adicionadas elas podem-se acumular no núcleo hidrofóbico das micelas. Este processo de solubilização é muito importante em processos biológicos e industriais. A presença de tensoativos pode reduzir a tensão superficial e aumentar a solubilidade do fármaco no solvente orgânico (SWARBRICK & BOYLAN, 2002)

KECK & MÜLLER, (2006) afirmam que independentemente da maneira da produção, os fármacos nanocristalinos têm grandes vantagens como, por exemplo, a utilização de sistemas simples de produção. Isto é de suma importância já que quanto mais complicado é o sistema de produção, mais tempo este produto ficará longe do mercado e dos pacientes. Sistemas simples podem chegar, rapidamente, a ser uma realidade.

2.5. Importância dos derivados tiofênicos

Com o aumento da resistência a antibióticos, por parte principalmente em populações bacterianas, tem-se evoluído a procura por fármacos mais eficazes e seguros, que causem menos efeitos colaterais possíveis, proporcionando aos seus usuários menor rejeição e maior sucesso nos tratamentos. Nesse contexto, a química orgânica medicinal através dos planejamentos e modificações moleculares tem contribuído para a maior parte das novas descobertas, observando-se um crescimento considerável de compostos sintéticos para uso medicinal, os quais têm sido empregados no combate às diversas doenças, entre eles estão os

heterociclos tiofênicos que são amplamente descritos na literatura como possuidores de relevantes propriedades farmacológicas (VERÇOZA, et AL, 2009).

O tiofeno consiste em um heterocíclico aromático pentagonal, onde um carbono metilênico é substituído por um átomo de enxofre e um par de ligações duplas (ZHONGHAI, 2005). Uma das características importantes dessa molécula é a possibilidade de sofrer modificações estruturais em todos os carbonos da molécula (posições 2, 3, 4, e 5) o que viabiliza uma gama de opções reacionais no processo de síntese de seus derivados (ZHONGHAI, 2005).

Os derivados do tiofeno apresentam grande potencial em inibir o crescimento de microrganismos, através de suas significativas atividades biológicas, tais como antifúngicos (GOVINDASWAMY & MOHAN, 1998), analgésico (SHAFEEQUE & MOHAN, 1999), antibacteriano (DZHURAVERY, et al., 1992), antioxidante e anti-inflamatórios (DALBIR. S; MOHAN; SHARMA, 1992), anticancerígena (FERREIRA, et al., 2006) antimetabólica (ROMAGNOLI et al., 2007) dentre outras.

Simão e colaboradores, (2009), demonstraram atividade anti-*T. cruzi* do 2-[(4-Benziloxibenzilideno)-amino]-5-metil-tiofeno-3-carbonitrila, frente à forma tripomastigota do parasita, e verificou também significativa atividade antifúngica in vitro com valores de Concentração Mínima Inibitória (CMI) inferiores à droga padrão fluconazol em duas linhagens celulares de fungos *C. albicans* e *C. krusei* que foi utilizada como cepa de referência.

Os derivados do tiofeno apresentam também um extenso número de moléculas com atividade antibacteriana, dentre elas pode-se encontrar o fenil-(2,3,5-trimetil-benzo[*b*]tiofeno-6-il)-amino (**I**) comprovado por Ferreira et al., (2004), e o 3-fenilamino-benzo[*b*]tiofeno-2-ácido carboxílico-etil-éster (**II**), Pinto et al., (2008).

Então devido a todas estas propriedades farmacológicas apresentadas pelo os derivados tiofênicos, é importante empregar novos métodos para melhorar suas propriedades físico-químicas, dentre elas a solubilidade, a fim de aumentar suas atividades biológicas.

2.6. Teste de citotoxicidade de fármacos

Atualmente, milhares de novas moléculas químicas são sintetizadas e isoladas de diferentes fontes naturais, contudo a maior parte de suas atividades biológicas/farmacológicas

e aspectos de toxicidade, ainda são muito pouco estudadas ou desconhecidas para aqueles que as isolaram ou produziram.

A síntese de novas substâncias bioativas requer ensaios preliminares de determinação da toxicidade, antes de serem pensados quaisquer outros testes biológicos *in vivo*, pois fornecem importantes indicativos da viabilidade da condução dos testes *in vivo*, como por exemplo: indicação da dose máxima tolerável, DL50, dose terapêutica, efeitos adversos, entre outros.

Dentro desse contexto, *A. salina* Leach vem sendo utilizada com frequência em bioensaios de determinação de toxicidade, que utilizam a CL50 (concentração letal para 50% da população) para a avaliação de atividades biológicas (NUNES et al., 2008). Esses testes tem se mostrado uteis tanto para avaliar a toxicidade de compostos orgânicos químicos sintéticos, quanto de compostos ou extratos advindos de fontes naturais. Assim os testes com artêmias são uma opção de ensaiar a citotoxicidade de diversos compostos, de maneira mais barata e mais acessível aos pesquisadores, já que dispensa equipamento sofisticado e treinamento especializado.

Muitos pesquisadores já utilizaram do uso dos testes de toxicidade com artêmia para determinação da CL50. Por exemplo, HOQUE & ISLAM (2008), fizeram o uso de artêmias frente a indofeninas sintetizadas a partir de derivados tiofênicos, tiazóis e isatina obtendo CL50 que variaram 0,99 a 1,77 µg/mL, demonstrando-se tóxicos para as artêmias. Dentro desse contexto, resolvemos avaliar e comparar a toxicidade das nanosuspensões e dos fármacos não formulados em teste de citotoxicidade usando o modelo de *Artemia salina*, de acordo com a metodologia desenvolvida por MEYER *et al.*, (1982) e adaptada por RIBEIRO, (2011).

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

- Melhorar o perfil de solubilidade de moléculas sintéticas derivadas de tiofenos 6CN10, 6CN14, 7 CN05, 7 CN08, 7CN09, 7 CN10 produzidas no Laboratório de Síntese e Vetorização de Moléculas da UEPB, através do desenvolvimento de uma nova técnica de obtenção de micro/nanocristais, determinar e comparar a citotoxicidade dessas moléculas nanoprecipitada e na sua forma bruta (natural) através do teste de letalidade, usando *Artemia salina*.

3.2. Objetivos específicos

- Determinar a solubilidade das moléculas em água e em solvente orgânico.
- Desenvolver uma tecnologia para obtenção de nanosuspensões.
- Caracterizar as nanosuspensões quanto ao tamanho dos seus cristais e determinar a concentração dos fármacos após a nanosuspensão
- Verificar o comportamento das nanosuspensão quando submetido ao processo de liofilização.
- Determinar a citotoxicidade dos compostos frente ao modelo de *Artemia salina* após melhoramento da solubilidade e comparar os resultados com os testes de citotoxicidade dos mesmos na forma bruta.

4. Metodologia

4.1. Determinação do comprimento de onda máximo ($\lambda_{MÁX}$) de cada um dos compostos

O primeiro teste a ser realizado foi o de Varredura feito na Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN) no espectrofotômetro (Shimadzu) com os solventes acetona, clorofórmio, etanol e metanol para obter o comprimento de onda máximo ($\lambda_{MÁX}$) e a absorvância nas seguintes concentrações 1, 2, 5, 10 e 20 $\mu\text{g/ml}$. No teste utilizou-se 10 mg do 6CN10 adicionados em um balão de 50 ml e solubilizado com os respectivos solventes, exceto para o metanol que foi 10 mg/100 ml formando a solução mãe . E então feitas as leituras no espectrofotômetro.

Para a varredura das moléculas 6CN14, 7CN05, 7CN08, 7CN09 e 7CN10, o solvente utilizado foi apenas o metanol na concentração de 10 $\mu\text{g/ml}$ e foram aferidos o comprimento de onda máximo ($\lambda_{MÁX}$).

4.2. Obtenção da curva de calibração

Com os resultados do teste de varredura foi possível obter a curva de calibração no espectrofotômetro tipo UV-Spectrophotometer SP-2000 UV da Universidade Estadual da Paraíba. Esta curva foi usada para obter o valor da solubilidade da concentração de substâncias cuja concentração se desconhece. Ela estabelece uma relação entre a absorvância da solução padrão em diferentes concentrações. Esta análise foi feita em triplicata utilizando

as concentrações padrão de 100 µg/mL para 6CN14, 7CN05, 7CN08, 7CN09 e 7CN10 e 200µg/ ml para 6CN10 e $\lambda_{MÁX}$.

Destas soluções mães foram realizadas diluições para concentrações de 2,5 µg/ml, 5 µg/ml, 7,5 µg/ml, 10 µg/ml, 12,5 µg/ml e 15 µg/ml em todos os compostos com exceção do 6CN10 cujas concentrações foram 0,2 µg/ml, 0,4 µg/ml, 1 µg/ml, 2 µg/ml, 3 µg/ml, 4 µg/ml, 5 µg/ml, 6 µg/ml, 7 µg/ml, 8 µg/ml, 10 µg/ml, 12 µg/ml. Com a média dos resultados, foi obtido a equação da reta através da regressão linear no programa Microsoft Office Excel 97/2003.

4.3. Teste de solubilidade em metanol

Os testes de solubilidade em metanol foram realizados em triplicatas, em frascos fechados para cada um dos fármacos analisados. Neste experimento foram pesados em balança analítica com precisão de quatro decimais (OHAUS, modelo Adventurer) 20 mg de cada um dos fármacos, em seguida foram adicionados 20 ml de metanol e deixado sob agitação por 72 horas à temperatura ambiente numa rotação de 500 rpm em placa agitadora (Ika color Squid (IKA)). Para o composto 6CN10 o tempo de agitação foi de 96 horas.

Depois de 72 horas, foram retiradas alíquotas de 500 µl, postos em balões volumétricos de 10 ml e os volumes completados com metanol.

Para as soluções dos compostos 6CN10 e 7CN05 foi necessário fazer diluições adicionais. Para o composto 7CN05 do balão de 10 ml foram retirados 1000 µl colocados em um novo balão de 5ml completando-se novamente com metanol. Para o 6CN10 foi necessário retirar também 1000 µl adicionado em um novo balão de 10 ml. As soluções foram então lidas em espectrofotômetro, de onde foi possível obter os valores de absorbância.

Através dos resultados obtidos foram feitos cálculos para determinação da concentração e solubilidade dos fármacos. Para isso utilizou-se a equação da reta encontrada na curva de calibração. Os cálculos das concentrações de solubilidade encontrados foram avaliados e classificados de acordo com os dados da Farmacopeia brasileira IV edição (2011).

4.4. Teste de solubilidade em água

O teste de solubilidade em água foi feito em triplicata para cada um dos fármacos analisados. No experimento 20 mg dos fármacos foram adicionados em 20 ml de água destilada em um frasco fechado e colocado sob agitação em agitador magnético a 500 rpm e temperatura ambiente por 72 horas. Passado este tempo foram coletadas 3 ml, que foram

filtrado em filtro Millipore de 0,2 μm (para retenção do fármaco não solubilizado). Deste filtrado, foi pipetado 1 ml, transferido para um balão volumétrico de 5 ml e o volume foi completado com 4 ml de metanol. Em seguida foi feita a leitura da absorbância no espectrofotômetro.

Com os valores de absorbância lidas nas três triplicatas foi feita uma média e com ela calculada o valor da solubilidade em água para cada um dos compostos.

4.5 Preparação das nanosuspensões

A fim de otimizar as condições de micro/nanocristalização para incorporação do fármaco na formulação e assim incrementar sua solubilidade em meio aquoso, a partir da redução do tamanho dos cristais dos compostos testados, um novo método de preparação das nanosuspensões foi desenvolvido e este foi realizado em todas as formulações.

O processo para produção das nanosuspensões encontra-se em fase de patenteamento. Resumidamente, os fármacos foram solubilizados em solvente orgânico, homogeneizados através de técnica de baixa energia e depois precipitado rapidamente com redução de volume para obtenção dos nanocristais.

4.6. Caracterização das nanosuspensões

4.6.1. Determinação dos tamanhos dos cristais

Para determinação do tamanho dos micro/nanocristais das formulações foram preparadas lâminas, imediatamente após a obtenção das formulações finais e visualizadas em microscópio óptico Olympus Bx 41 com sistema de captura de imagem Bell na objetiva de 100 x e os tamanhos de alguns cristais foram determinados.

Também foram avaliados os tamanhos dos cristais dos fármacos na sua forma natural (bruta), preparando-se lâminas e visualizadas no microscópio óptico, para poder desta forma avaliar se houve ou não redução no tamanho dos cristais.

4.7. Comportamento das nanosuspensões quanto ao processo de liofilização

Foram separados 4mL de cada uma das nanosuspensões, e colocadas em frascos de penicilina e congelados em freezer comum (-10 °C), em seguida congeladas em freezer -80 °C para serem liofilizados.

Lâminas foram preparadas utilizando as nanossuspensões liofilizadas e os tamanhos dos cristais foram observados, e tiveram seus tamanhos determinados e comparados com as nanossuspensões recém preparadas.

A liofilização foi realizada com o intuito de evitar um provável crescimento dos tamanhos dos cristais através do processo de agregação dos micro/nanocristais. Também é importante para evitar o crescimento de fungos e bactérias, visto que se trata de uma formulação em meio aquoso sem o uso de agentes bactericidas.

4.8. Teste de citotoxicidade das nanosuspensões dos fármacos 6CN10, 6CN14, 7CN05, 7CN 08, 7CN 09, 7CN10.

Os testes de citotoxicidade frente à *Artemia salina* foram baseados na metodologia proposta por MEYER et al.; (1982), com adaptações feitas por RIBEIRO, (2011).

4.8.1. Preparo das amostras

Para o preparo das amostras foram feitos cálculos de soluções a partir das concentrações mães das formulações que eram de 1000 µg/ml para os compostos 6CN10, 6CN14, 7CN08, 7CN09 e 2500 µg/ml para os compostos 7CN05 e 7CN10. Testadas nas seguintes concentrações 500, 100, 50, 25, 10 e 1 µg/ml. Em tubos de ensaio com volume final de 2 ml e 10 náuplios de artêmias cada.

Após adicionar os volumes das formulações correspondentes as suas respectivas concentrações, o volume do tubo foi completado com água salina até atingir 2 ml.

Foi também testado uma solução branca (controle negativo), composta exclusivamente por Tween 80 a 5 % em solução salina e com isso identificar se a causa das possíveis mortes dos náuplius foi devido ao fármaco ou ao tensoativo presente na formulação.

4.8.2. Obtenção dos dados

Após 24 horas de exposição dos náuplius às formulações dos compostos, o número de náuplius vivos e mortos em cada tubo foi determinada por controle visual Posteriormente foi calculada a média do número de náuplius mortos para cada concentração de cada composto.

4.8.3. Análise dos dados

A partir dos dados obtidos, foi determinado a CL_{50} po análise de regressão linear através do método estatístico PROBIT.

Utilizando o software Microsoft Excel 2003, foi criada uma tabela com quatro colunas (tabela 3), na primeira foi colocado as concentrações usadas no experimento, na segunda o logaritmo das concentrações na base 10, seguida pelo percentual de náuplius mortos e o valor do PROBIT referente ao percentual de náuplius mortos obtido a partir da tabela proposta por Finney (1952) (figura 2).

Concentração ($\mu\text{g/ml}$)	Log da concentração	% náuplius mortos	PROBIT
500	2,69897	96	6,75
100	2	23,33	4,26
50	1,69897	26,66	4,36
10	1	13,33	3,87
1	0	10	3,72

Tabela 2. Tabela construída utilizando os dados do composto 6CN10 para obtenção do gráfico de regressão linear.

%	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	—	2.67	2.95	3.12	3.25	3.30	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
99	7.33	7.37	7.41	7.46	7.51	7.58	7.65	7.75	7.88	8.09

Figura 2. Tabela de conversão do percentual da média de náuplius mortos para o probit.

Extraído de Finney (1952)

Com estes dados foi criado um gráfico de regressão linear, onde “y” se refere ao valor do PROBIT e “x” ao log das concentrações. O R^2 representa o coeficiente de linearidade e nos fornece indiretamente a confiabilidade dos valores, quanto mais próximo de 1 mais linear é a reta e mais confiáveis são os dados.

Para saber a concentração que mata 50% dos indivíduos (CL_{50}), substitui o “y” da equação da reta pelo valor 5 e obtêm-se o valor “x”, que será o log da CL_{50} , obtendo assim o valor da CL_{50} .

5. Resultados e discussão

5.1. Parte experimental

A espectroscopia é um dos métodos de análise mais usado nas investigações biológicas e físico-químicas de fármacos. Através desta análise foi possível obter o comprimento de onda máximo (λ_{MAX}) para cada um dos compostos em metanol numa concentração 100 $\mu\text{g/ml}$ para 7CN05, 7CN08, 7CN09, 7CN10, 6CN14 e 200 $\mu\text{g/ml}$ para o 6CN10 (Tabela 3).

Através destes dados retirou-se a curva analítica para cada fármaco. Dentre todos os testes realizados em triplicata, quem apresentou os melhores coeficiente de correlação (R^2) com valores satisfatório (mais próximo de 1) para utilização da equação da reta nos cálculos do teste de solubilidade foram 6CN14, 6CN10, 7CN08, 7CN09, 7CN10 e 7CN05 respectivamente como por exemplo mostra os gráficos 1.

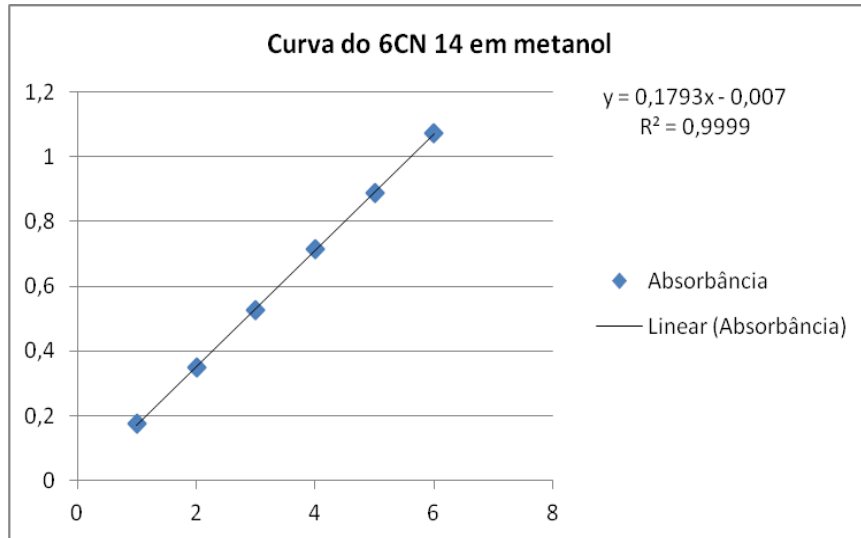


Gráfico 1. Curva analítica do 6CN14 em metanol (eixo X é a concentração ($\mu\text{g/mL}$) x eixo Y (absorbância)).

Tabela 3. Dados obtidos a partir de testes de varredura, curva de calibração, solubilidade e valores de CL₅₀ dos derivados tiofênicos em forma bruta e micro/nanocristalizado

Fármaco	$\lambda_{MÁX}$ (nm)	Curva Analítica/ R ²	Concentração MEOH (µg/mL)	Sol/Fármaco em Água (µg/mL)	Concentração nano/micro cristais (µg/mL)	Solubilidade nano/microcristais filtrado (µg/mL)	CL ₅₀ fármaco bruto (µg/mL)	CL ₅₀ fármaco formulado (µg/mL)
6CN10	400	y = 0,0695x - 0,0021 R ² = 0,9998	768,63	0,5683	925,32	26,92	>1000	1,9
6CN14	377	y = 0,1793x - 0,007 R ² = 0,9999	48,52	*	355,5	82,96	679	2,98
7CN05	389	y = 0,166x - 0,0005 R ² = 0,999	175,68	*	671,08	7,259	>1000	2,05
7CN08	383	y = 0,1517x - 0,0017 R ² = 0,9998	51,38	*	361,48	8,76	>1000	2,33
7CN09	398	y = 0,1514x - 0,0124 R ² = 0,9996	41,35	*	393,6	13,23	>1000	3,01
7CN10		y = 0,1524x - 0,0079						

	401	$R^2 = 0,9996$	46,83	*	64,615	26,3	71,03	2,01
--	-----	----------------	-------	---	--------	------	-------	------

* Valor não detectado no equipamento utilizado

A solubilidade dos fármacos é uma propriedade que influencia diferentes aspectos relativos à farmacocinética e estabilidade química da molécula. Auxilia também na escolha do solvente mais adequado para utilizações analíticas, assim como na eleição do veículo mais idôneo para uso em ensaios *in vivo* ou para uma possível formulação líquida do fármaco (MULLER, *et al.*, 1999).

Dos solventes testados o que apresentou maior capacidade para solubilizar o 6CN10 e, portanto, utilizados nos testes de solubilidade dos compostos 6CN14, 7CN05, 7CN08, 7CN09, 7CN10 foi o metanol, o qual após 72 horas apresentaram os maiores valores de absorvância usados na equação da reta (tabela 3). Foi observado para o 6CN10 que após 72 horas o fármaco começou a recrystalizar no meio. Podendo-se dizer assim que o tempo máximo de saturação do 6CN10 foi de 72 horas. Os outros compostos não passaram pela mesma observação após 72 horas.

Em geral, fármacos que possuem baixa solubilidade apresentam também uma baixa velocidade de dissolução (MULLER, *et al.*, 1999). Dentre os compostos avaliados o que apresentou melhor solubilidade em metanol foi o 6CN10, seguido pelo 7CN05 e 7CN08 com concentrações de 768,63, 175,68 e 51,38 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente. Os outros compostos apresentaram valores de concentração entre 40 e 50 $\mu\text{g/mL}$ (tabela 3).

O teste de solubilidade em água indicou a insolubilidade de todos os fármacos testados em meio aquoso, apresentando valor muito baixo, porém mensurável (0,5683 $\mu\text{g/mL}$) apenas para o 6CN10.

Problemas de solubilidade em drogas recém desenvolvidas com alto potencial farmacológico é um grave obstáculo no desenvolvimento de formulações, especialmente quando eles mostram baixa solubilidade aquosa e simultaneamente em meios orgânicos (MULLER & PITERS, 1998). Uma alternativa bastante utilizada atualmente para estas drogas pouco solúveis em meio aquoso é a preparação de nanossuspensão, onde se tem uma nítida redução de tamanho das partículas de fármacos e com isso se abre uma grande possibilidade de que este fármaco tenha sua administração por via intravenosa, entretanto para isso o tamanho das partículas devem ser inferior a 5 μm (KRAUSE & MULLER, 2001).

Para incrementar a solubilidade dos fármacos ativos 6CN10, 6CN14, 7CN05, 7CN08, 7CN09 e 7CN10 a nanoprecipitação foi a técnica escolhida com o propósito de reduzir o tamanho dos cristais.

Todos os compostos tiveram um excelente incremento de solubilidade, saindo de uma concentração mínima de 0,5683 $\mu\text{g/mL}$, para uma concentração máxima de 925,32 $\mu\text{g/mL}$ para o composto 6CN10 (tabela 3).

Das formulações realizadas a que apresentou melhor solubilidade com relevante redução do tamanho dos cristais foi 6CN10 apresentando concentração equivalente a 925,32 $\mu\text{g/mL}$ com 1% de Tween 80 (tabela 3). Nessa formulação partiu-se do fármaco com cristais de tamanho 3,83 μm (cristal bruto) e na formulação final os cristais apresentaram 0,06 μm ou 60 nm. (nanocrystal) (figura 6a e 6b). O fármaco 7CN05 foi o segundo a apresentar melhor solubilidade com concentração 671,08 $\mu\text{g/mL}$, e também uma relevante redução no tamanho de seus cristais de 1,28 μm (cristal bruto) para 0,17 μm cristal formulado (figura 7a e 7b). Os micro/nanocristais dos compostos 6CN14 e 7CN08 ficaram na faixa de 0,3 μm e 7CN09 0,2 μm .

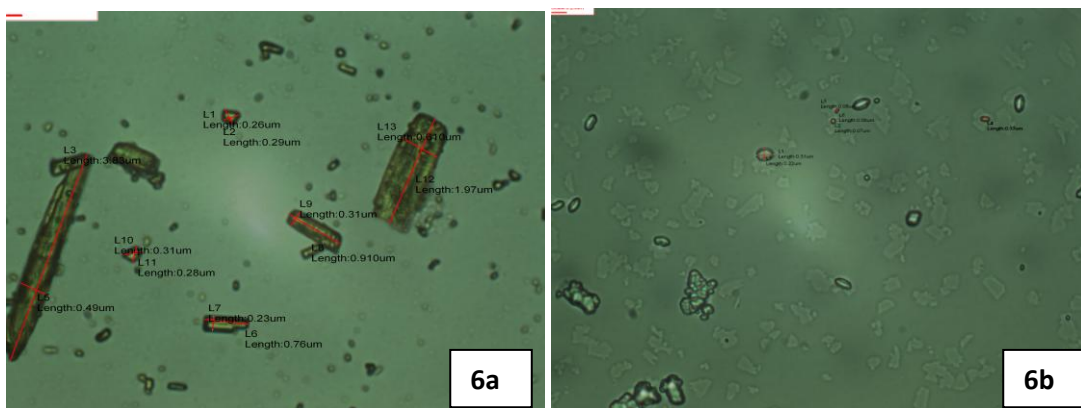


Figura 3a) cristal bruto de 6CN10; 3b) micro/nanocristal de 6CN10. Objetiva de 100x.

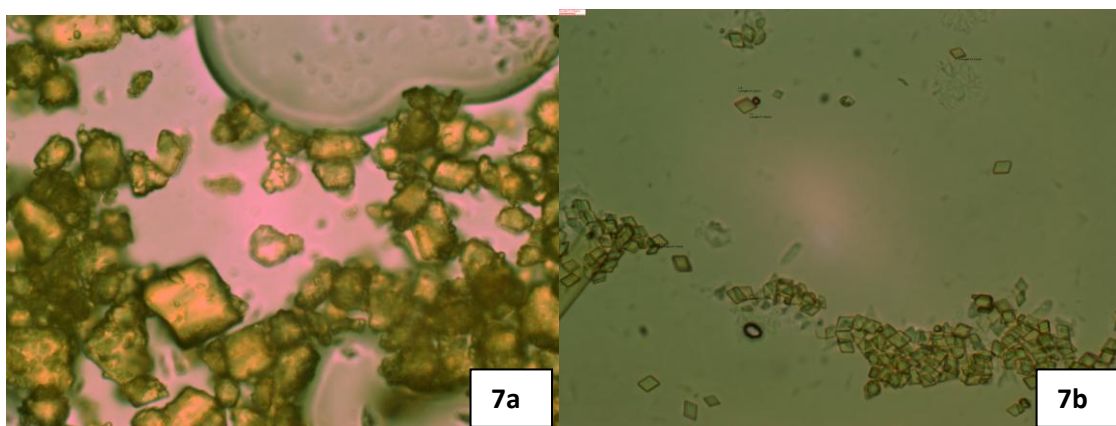


Figura 4a) cristal bruto de 7CN05; 4b) micro/nanocristal de 7CN05. Objetiva de 100x.

Analisando os dados de acordo com o tradicional sistema de classificação biofarmacêutica, (2011) (tabela 1), os compostos passaram da classificação experimental de insolúvel, para muito pouco solúvel, com exceção do 7CN10 que continua como insolúvel ou seja para solubilizar cada grama de soluto ele precisa de aproximadamente 100.000 partes de solvente.

Este resultado pode está relacionado com a proporção de tensoativo, a qual necessita de mais testes para encontrar a concentração ideal para este composto, assim também como o tamanho do cristal pode está influenciando.

Através de visualização em microscópio óptico foi observado uma relevante redução de tamanho em escala micrométrica ou até mesmo nanométrica do 7CN 10, não sendo possível medir o tamanho dos cristais devido sua dimensão, quando comparado com o fármaco em sua forma natural (bruta) (figura 8a e 8b). A hipótese levantada para esta baixa solubilidade nesta formulação pode está relacionada com a formação de uma população maior nanocristais que são refletidos no espectrofotômetro, não apresentando assim sua absorbância real e por tanto causando um erro no cálculo de sua solubilidade.

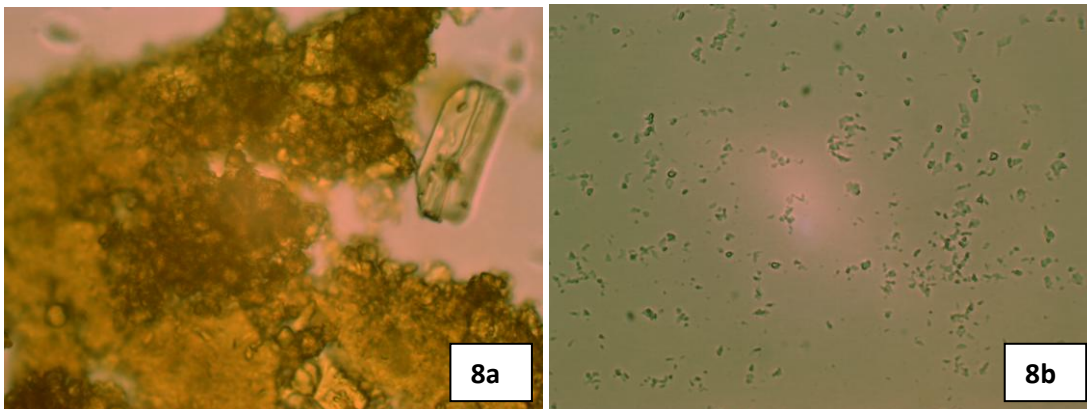


Figura 5a) cristal bruto 7CN10; 5b) micro/nanocrystal 7CN10. Objetiva de 100x.

A escolha do tensoativo e da sua concentração são fatores que influenciam diretamente as características das nanosuspensões, designadamente as suas dimensões, a retenção do princípio. Ele forma uma barreira mecânica e/ou elétrica que impede a coalescência das partículas durante a sua formação, e também a sua agregação durante o armazenamento. (BUNJES *et al.*, 2003).

As características físico-químicas dos nanocristais obtidos pelo método de nanosuspensão podem ser afetadas por um conjunto de parâmetros tecnológicos, que incluem

a solubilidade do princípio ativo, o polimorfismo do fármaco, a natureza e concentração do tensoativo, a temperatura, a força de cisalhamento e o número de ciclos de homogeneização efetuados (SOUTO *et al.*, 2011). O que pode explicar um fármaco apresentar uma melhora de solubilidade superior, utilizando-se do mesmo procedimento.

A solubilidade do filtrado das nano suspensões também foram baixas apresentando o 6CN14 a melhor solubilidade com concentração 82,96 µg/mL (tabela 3). Isso pode ter ocorrido devido às filtragens de algumas formulações terem sido efetuadas após um período de tempo. Como estas não possuem estabilizantes na sua formulação, isso favoreceu a aglomeração dos micro/nanocristais ocorrendo precipitação dos fármacos, diminuindo sua solubilidade.

Para a observação do comportamento das nanosuspensões quanto ao processo de liofilização, as amostras após este procedimento foram visualizadas em microscópio óptico de forma a obter aspectos relacionados à estabilidade das formulações, analisando a interferência do tamanho e coalescência dos cristais. A figura 9a e 9b mostra um exemplo utilizando o composto 7CN10 antes e depois da liofilização. Foi observado que ocorreu uma aglomeração dos cristais, favorecendo desta forma um aumento no tamanho dos micro/nanocristais. Isso pode ter ocorrido devido ao tamanho nanométrico para o fármaco 7CN10, a presença do tensoativo que não é eliminado durante a liofilização ou ainda a falta de estabilizantes mais eficiente nas nanosuspensões, sendo a presença destes, essencial para a estabilidade e durabilidade das mesmas. Macroscopicamente foi observado também que os fármacos não se apresentam em pó seco.

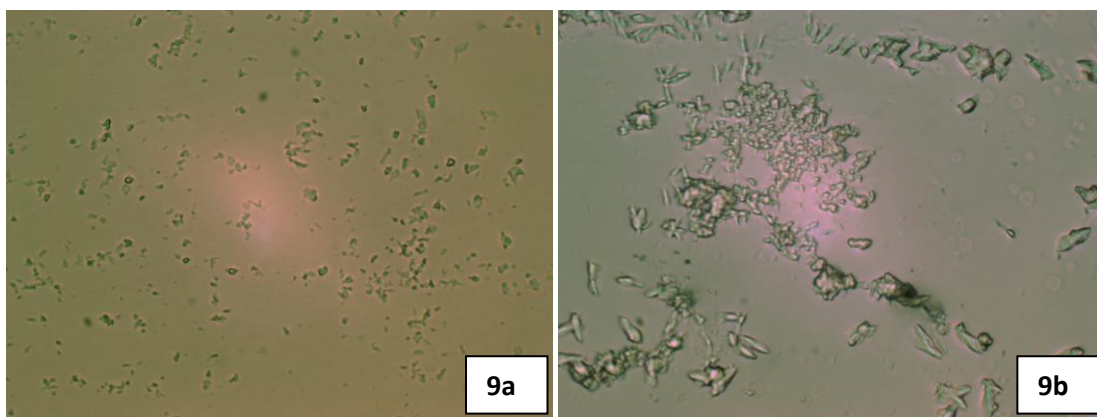


Figura 6a) Formulação 7CN10 sem liofilização; 6b) 7CN10 liofilizado. Objetiva 100x.

Para se obter uma máxima estabilidade física e evitar o efeito de Ostwald ripening as nano-suspensões deverão ser tão homogênea quanto possível, o que significa redução do número de partículas micrométricas. Um parâmetro crítico para a produção de micro partículas é a necessidade de parar o crescimento das nanopartículas precipitadas por adição controlada de tensoativos e assim evitar a formação de partículas micrométricas. O controle das condições de precipitação e a necessidade de tomar medidas contra o crescimento de partículas podem afetar a reprodutibilidade do tamanho das partículas (GRAU; KAYSER; MULLER, 2000). Sabe-se que uma das características da tecnologia nano é a grande instabilidade associada com o alto nível de tensão localizada na superfície do fármaco. Essa instabilidade facilita o agregamento dos nanocristais formando aglomerados com dimensões micrométricas (MAZALI, 2001). Portanto é importante desenvolver métodos que possam prevenir ou controlar o aumento na taxa de agregação durante seu crescimento ou fenômeno Ostwald ripening.

Elevadas concentrações de tensoativos, inviabiliza a aplicação cosmética e/ou farmacêuticas destes sistemas, e as nanosuspensões podem ser preparadas utilizando-se concentrações de tensoativos entre 3,0 e 5,0 %. Acima destes valores as avaliações das atividades biológicas se tornam inviáveis, devido à toxicidade do tensoativo (BULHÕES & ROSANI, 2009).

A tecnologia nas formulações com nanocristais fornece novas estratégias para resolver aspectos associados com moléculas pouco solúveis em água. Além disto, esta tecnologia possibilitou o desenvolvimento de novos produtos através de processos escalonáveis e com grande possibilidade de atingir o mercado. Estratégias de formulação de fármacos nanoparticulados são necessidade eminente na indústria farmacêutica. Isto permitiria abrir novos caminhos ou alternativas para abordar necessidades médicas ainda não satisfeitas (MERISKO-LIVERSIDGE E LIVERSIDGE, 2008).

As tentativas para solubilizar as drogas em micelas ou com ciclodextrinas são de sucesso limitado para muitos fármacos. Uma abordagem alternativa é a preparação de nanosuspensões (MULLER *et al.*, 1999).

5.2. Parte biológica

5.2.1. Teste de citotoxicidade das nanosuspensões

A pesquisa e o desenvolvimento de medicamentos inovadores têm sido uma empreitada cada vez mais cara e complexa, o que torna mais escassa a introdução de novas moléculas no mercado (JOSHI, 2007). Estima-se que de cada 30.000 compostos sintetizados, apenas 0,003% chegam a se tornar fármacos disponíveis no comércio (FEDERSEN, 2003). Dentre as causas que explicam estes inúmeros fracassos estão problemas derivados de sua biodisponibilidade e toxicidade, que podem estar relacionados ao escasso conhecimento acerca de parâmetros como solubilidade da molécula em estudo (WANG & URBAN, 2004). Então para dar viabilidade aos estudos das moléculas 6CN10, 6CN14, 7CN05, 7CN08, 7CN09 e 7CN10 após melhoramento de suas solubilidades, o teste de citotoxicidade *in vitro* através do modelo de *Artemia salina* se faz necessário para futuramente poder dar continuidade *in vivo* com mais segurança.

Após a realização dos ensaios, que em suma caracterizam-se pela exposição dos animais as diferentes concentrações dos compostos, com posterior contagem no número de animais vivos e mortos em cada tubo após 24 horas, os dados obtidos foram agrupados em tabelas, como exemplificado na tabela 4 (composto 7CN10). Estes dados foram utilizados para a identificação da concentração letal para 50% da população de náuplius (CL₅₀).

Concentração (µg/mL)	Log da concentração	% náuplios mortos	PROBIT
500	2,69897	96	6,75
100	2	33,33	4,56
50	1,69897	30	4,48
10	1	0	0
1	0	3,33	3,12

Tabela 4. Tabela construída com os dados do composto 7CN10 para realização do cálculo da CL₅₀.

Correlacionando os valores do PROBIT com o logaritmo das concentrações, tivemos como resultado um gráfico de regressão linear para cada composto testado. Como mostra os gráficos 3 e 4 para os compostos 7CN10 e 6 CN14 respectivamente.

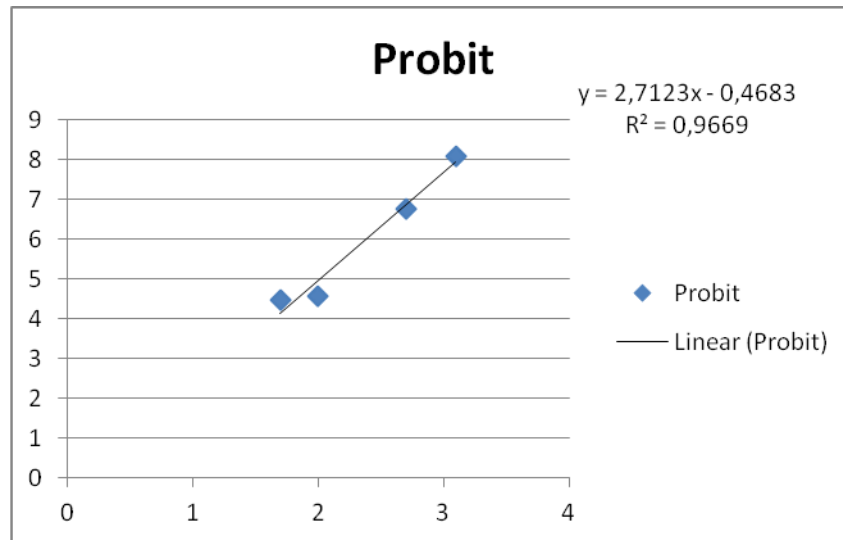


Gráfico 2. Gráfico de regressão linear PROBIT para o composto 7CN 10

Analisando as CL_{50} obtidas com as nanosuspensões, observamos que houve um aumento da toxicidade para todos os fármacos formulados, chegando a ser até 500 vezes mais tóxico que na sua forma natural (bruta) como visto para o composto 6 CN10, que também apresentou a maior solubilidade (tabela 3). E verdade que não houve uma correlação positiva para todos os compostos, entre a toxicidade e solubilidade, ou seja, quanto maior a solubilidade, maior também sua toxicidade, visto que o 7CN10 apresenta a menor solubilidade e é o segundo mais tóxico. Este resultado pode ser reflexo do que já foi discutido anteriormente quanto a problemas no diagnóstico de sua real solubilidade. Isso se torna mais forte ao perceber que este composto foi o mais tóxico na sua forma bruta. Quanto aos outros compostos como não há uma diferença discrepante na CL_{50} pode-se dizer que há uma boa correlação entre o ganho de solubilidade e toxicidade das formulações.

De acordo com Ferraz *et al.*, (2009), estudos com *A. salina* demonstram que as drogas com os valores de CL_{50} inferiores a 1000 $\mu\text{g/mL}$ tem potencial para apresentar ação antineoplásicas.

A citotoxicidade do branco também foi avaliada, e verificou-se que o percentual de 5% de tensoativo Tween 80 utilizada nas formulações não chegaram a ser extremamente letal para os náuplius de *Artemia salina*, resultando em apenas 20% de mortalidade dos mesmos. Como a maior concentração de 500 $\mu\text{g/mL}$ dos fármacos testados por exemplo 6CN10, 7CN10 mataram 100% das artêmias e estas consequentemente continham a maior concentração de Tween, constatou-se que suas mortes foram devido a ação tóxica do fármaco e não do tensoativo.

Apesar de os compostos 2-[(4-nitrobenzilideno)amino]-4,5,6,7-tetraidro-4*H*-benzo[*b*]tiofeno-3-carbonitrila (**6CN10**), 2-[(2,4-dicloro-benzilideno)-amino]-5,6,7,8-tetraidro-4*H*-ciclohepta[*b*]tiofeno-3-carbonitrila (**7CN05**), 2-[(3,4-dicloro-benzilideno)-amino]-5,6,7,8-tetraidro-4*H*-ciclohepta[*b*]tiofeno-3-carbonitrila (**7CN08**), 2-[(5-bromo-2-metóxi-benzilideno)-amino]-5,6,7,8-tetraidro-4*H*-ciclohepta[*b*]tiofeno-3-carbonitrila (**7CN09**), 2-[(4-nitro-benzilideno)-amino]-5,6,7,8-tetraidro-4*H*-ciclohepta[*b*]tiofeno-3-carbonitrila (**7CN10**) e 2-[(4-flúor-benzilideno)amino]-4,5,6,7-tetraidro-4*H*-benzo[*b*]tiofeno-3-carbonitrila (**6CN14**) já apresentarem comprovadas atividades biológicas, estudos complementares sobre suas propriedades físico-químicas se fazem ainda necessárias, para auxiliar nos processos de incorporação dessas moléculas em sistemas de transporte de fármacos, o que podem resultar em alterações nos parâmetros farmacocinéticos, e por sua vez no incremento da ação biológica/farmacológica.

Estudos de pré-formulação poderiam propiciar uma maior compreensão das suas características biofarmacêuticas e permitir vislumbrar alternativas para melhorar sua ação terapêutica através do incremento de sua solubilidade por uma metodologia simples e sem altos custos.

6. Conclusão

Os efeitos associados com o tamanho nanométrico das partículas são por si só muito interessantes e abrem oportunidades únicas para novas aplicações e também para o aprimoramento da tecnologia atual.

A nova técnica de nanosuspensão desenvolvida, demonstrou ser altamente eficiente favorecendo um incremento de solubilidade em meio aquoso a partir da redução do tamanho dos cristais para a escala micro/nanométrica, passando de uma concentração mínima de 0,5683 µg/mL para um máximo de 925,32 µg/mL, observada para o composto 6CN10 sem procedimento de filtração, e também passou de zero para uma concentração máxima 82,96 µg/mL com filtração no composto 6CN14, entretanto mais estudos precisam ser realizados e a técnica aprimorada quanto a proporções de tensoativo, e estabilidade para as formulações.

Quanto a caracterização do tamanho dos cristais, a visualização microscópica conseguiu atender as expectativas de poder verificar a redução do tamanho dos cristais com formação dos nanocristais dos fármacos formulados. Sendo possível observar uma diminuição de 3,83 µm (cristal bruto) para 0,06 µm ou 60 nm (nanocristal) no composto 6CN10 e de 1,28

μm (cristal bruto) para 0,17 μm no composto 7CN05.). Os micro/nanocristais dos compostos 6CN14 e 7CN08 ficaram na faixa de 0,3 μm e 0,2 μm para 7CN09. O 7CN10 apresentou os menores cristais não sendo possível sua medição.

O incremento de solubilidade foi muito eficaz para o aumento da citotoxicidade avaliada a partir dos valores da CL_{50} , ocorrendo um aumento de citotoxicidade de até 500 vezes maior para os micro/nanocristais com CL_{50} igual a 1,9 $\mu\text{g/mL}$, 2,05 $\mu\text{g/mL}$, 3,01 $\mu\text{g/mL}$, 2,33 $\mu\text{g/mL}$, 2,98 $\mu\text{g/mL}$ e 2,01 $\mu\text{g/mL}$ para os compostos 6CN10, 7CN05, 7CN09, 7CN08, 6CN14 e 7CN10 respectivamente em relação aos mesmos na forma natural (bruta), com CL_{50} maiores que 1000 $\mu\text{g/mL}$ para os compostos 6CN10, 7CN05, 7CN09, 7CN08, 679 $\mu\text{g/mL}$ para o 6CN14 e 71,03 $\mu\text{g/mL}$ o 7CN10..

Pode-se então concluir que esta nova técnica de produção de nanosuspensões desenvolvida em nosso laboratório foi capaz de melhorar a solubilidade dos fármacos de estudo, através da redução do tamanho dos cristais e se apresenta como uma técnica promissora para a indústria farmacêutica para o incremento da solubilidade de fármacos pouco solúveis em meio aquoso.

7. Perspectivas

- Realizar testes de caracterização dos nanocristais mais elaborados como Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) afim verificar através de uma imagem espacial a distribuição atômica e a morfologia do nanocristal.
- Potencial zeta para observar a distribuição do diâmetro médio das partículas, para se obter resultados muito mais seguros.
- Encaminhar as formulações de todos os compostos para se realizar testes antitumorais e antimicrobianos.

8. Referências

ALMEIDA, H. Métodos para incremento da solubilidade de substâncias ativas pouco solúveis (BCS-Classe II). **Dissertação**. Departamento de Farmacotecnia avançada. Universidade de Lisboa, 2009.

ARAKI, K. Estratégia supramolecular para a nanotecnologia. **Química Nova**, v. 30, n. 6, p. 1484 – 1490, 2007.

BERNHARD. H.L; MULLER B.R.H. Lab-scale production unit design for nanosuspensions of sparingly soluble cytotoxic drugs. **Pharm Sci Tech Today**. 1999.

BOUCHEMAL, K.; BRIANÇON, S.; PERRIER, E.; FESSI, H.; Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimisation. **Int. J. Pharm.** Vol..280, p. 241, 2004.

BULHÕES, L.O.S. ; ROSANI, L. Caracterização e estabilidade de nanoemulsões do tipo óleo/água (o/a) contendo o óleo de castanha do brasil (*bertholletia excelsa* h.b.k.). **61ª Reunião Anual da SBPC. A. Ciências Exatas e da Terra - 4. Química - 1. Físico-Química**. 2009.

BUNJES, H.; KOCH, M. H.; WESTESEN, K.; Influence of emulsifiers on the crystallization of solid lipid nanoparticles. **J. Pharm. Sci.** **2003**, 92, 1509

CAMARGO, M. F.P. Desenvolvimento de nanoemulsões a base de óleos de maracujá (*Passiflora edulis*) e óleo essencial de lavanda (*Lavanda officinalis*) e avaliação da atividade antiinflamatória tópica. **Dissertação**. Departamento de Ciência farmacêutica. Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto- SP, 2008

CAPEK, I. Degradation of kinetically stable O/W emulsions. **Advances in colloid interfacial. Science, Amsterdam**. Vol.107, P.125-155, 2004.

CARL ENGLERT, B. Nanomaterials and the environment: uses, methods and measurement. **J. Environ. Monit.** 2007.

CHARMAN S.A.; CHARMAN W.N. Oral modified-release delivery systems. Modified-Release drug delivery technology (Rathbone, M.J. et al., eds), 1-10 . 2003

DALBIR, S.; MOHAN. S.; SHAMA, P. C.; SARAVANAN, J. Synthesis and evaluation of some novel piperidino thiophenes as potential antioxidant and anti-inflammatory agents. **Acta pharmaceutica scientia.** Vol. No. 49. p.29-38, 2007.

DURÁN, N. ; DURÁN, M.; TACSIC, L.; MARCATO, P. D. Tecnologia de nanocristais em fármacos. **Quim. Nova**, Vol. 33, No. 1, p.151-158, 2010.

DZHURAVEY , A.D.; KARIMKULOV , K. M.; MAKHSUMOV, A. G. Antibacterial activity of new thiophenes derivatives. **Khim-farm.Zh** . Vol.26(11012, p.73-75, 199.

FANTIN, G.; FOGAGNOLO, M.; BORTOLINI, O.; MASCIOCCHI, N.; GALLI, S.; SIRONI, A.; **New J. Chem.** Vol..27, P. 1794, 2003.

FERREIRA, I. C. F. R. et al. Screening of antimicrobial activity of diarylamines in the 2,3,5-trimethylbenzo[b]thiophenes series: a structure-activity evaluation study. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.** Vol. 14, p. 5831-3, 2004

FERREIRA, I. C.F.R.; MARIA, J. R. P.; VILAS, B. M.; ESTEVINHO, L.M.; BEGOUIN, A.; GILBERT, K. Evaluation of the antioxidant properties of diarylamines in the benzo[b]thiophene series by free radical scavenging activity and reducing power. **Bioorg.Med.Lett.** vol. 16. 2006.

FORMULÁRIO NACIONAL DA FARMACOPÉIA BARSILEIRA.. **2º edição.** 2011.

FERNANDEZ, P.; ANDRÉ, V.; RIEGER, J.; KUHNLE, A.. Nanoemulsions formation by emulsions phase inversion. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering aspects.* **Amsterdam**, Vol. 251, p. 53-58, 2004.

FERRAZ, K. O. ; WARDELL, S. M. S. V. ; WARDELL, J. L. ; LOUROC, S. R. W ; BERALDO, H. Copper(II) complexes with 2-pyridineformamide-derived thiosemicarbazones: Spectral studies and toxicity against *Artemia salina*. *Spectrochimica. Acta Part A.* Vol.73, p. 140-145, 2009.

FINNEY, D. J. Ed. **Probit Analysis.** Cambridge, England, Cambridge University Press.1952.

GOVINDASWAMY P.; MOHAN S. **Synthesis of 2-substituted 5,6-dimethyl thieno (2,3-d)3,1-oxazin-4-one for antifungal activity.** *Ind.J.Heterocyclic Chem.* Vol. 7. P. 205- 208. 1998.

GRANADA, A.; NEMEN, D. ; DORA, C. L. ; NECKEL, G. L.; LEMOS-SENNA, E. O emprego de sistemas de liberação como estratégia para melhorar as propriedades terapêuticas de fármacos de origem natural: o exemplo da camptotecina e seus derivados. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, Vol. 28. n. 2, p. 129-139, 2007.

GRAU, M.J.; KAYSER, R.H.; MULLER, R.H. Nanosuspensions of poorly soluble drugs — reproducibility of small scale production. **International Journal of Pharmaceutics**. Vol. 196, p. 155–157. 2000.

JOSHI, H. N. Drug Development and Imperfect Design. **Int. J. Pharm.** Vol. 343, p.1-3, 2007.

HOQUE, M.; ISLAM, R. Cytotoxicity study of some indophenines and isatin derivates. Bangladesh **journal of pharmacology**, Bangladesh, Vol.3, n.1, p. 21-6, 2008.

JINNO, J. I.; KAMADA, N.; MIYAKE, M.; YAMADA, K.; TADASHI, M. T.; ODOMI, M.; TOGUCHI, H.; LIVERSIDGE, G. G.; HIGAKI, K.; KIMURA, T. Effect of particle size reduction on dissolution oral absorption of a poorly water-soluble drug, cilostazol in beagle dogs. **J. Control. Release** . Vol .111, p. 56, 2006.

KASAMA, D. Y.; ALMEIDA, G. M. B.; ZAVAGLIA, C. A influência das novas tecnologias no léxico: processos de formação neológica no domínio da nanociência e nanotecnologia. Debate Terminológico. ISSN: 1813-1867, n. 4, 2008. Disponível em: <http://riterm.net/revista/ojs/index.php/debateterminologico/article/viewArticle/63>. Acessado em: 13/04/2012.

KECK, C.M.; MULLER, R. H. Drug nanocrystals of poorly soluble drugs produced by high pressure homogenisation. **Eur J Pharm Biopharm** .Vol. 62, p.3-16, 2006.

KRAUSE, K.K; MULLER, R.H. Production and characterisation of highly concentrated nanosuspensions by high pressure homogenization. **International Journal of Pharmaceutics** Vol. 214, p. 21–24, 2001.

LEE, V.H. L. Nanotechnology: Challenging the limit of creativity in targeted drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Vol. 56, p. 1527-1528, 2004.

LIVERSIDGE. G.G, CUNDY. K.C. Particle size reduction for improvement of oral bioavailability of hydrophobic drugs: Absolute oral bioavailability of nanocrystalline danazol in beagle dogs. **Int J Pharm.** 1995

MARQUES, I. R. Novos sistemas terapêuticos nanotecnológicos. **Monografia**. Universidade Fernando Pessoa. Porto- Portugal. p. 1-50. 2009.

MAYER, B.N. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. *Journal of Medicinal Plant Research*, Vol.45, p.31-4, 1982

MAZALI, I.O. Sistema químicos integrados: Óxidossemi-condutores (SnO₂, TiO₂, NbO₅) obtidos pelo processo MOD nos poros de matrizes com esqueleto niobofosfato e de sílica (VYCOR). **Tese- Instituto de Química – Unicamp**, Campinas, SP, 2001.

MENDONÇA-JUNIOR, F.J.B.; LIMA-NETO, R. G.; OLIVEIRA, T. B.; LIMA, M. C. A.; PITTA, I. R.; GALDINO, S. L.; CRUZ, R.M.D.; ARAÚJO, R.S. A.; NEVES, R. P. Synthesis and Evaluation of the Antifungal Activity of 2-(Substituted-Amino)-4,5-Dialkyl-Thiophene-3-Carbonitrile Derivatives. **Lat. Am. J. Pharm.** Vol. 30 (8), p. 1492-9. 2011.

MERISKO-LIVERSIDGE E. M.; LIVERSIDGE G. G: Drug nanoparticles: formulating poorly water-soluble compounds. **Toxicol Pathol** . Vol.36, p. 43-48,2008

MORRISSON, I.; ROSS, S. Emulsions, In: Colloidal dispersions – suspensions, emulsions and foams. New York, **Jonh Wiley & Sons**, p. 420-455, 2002.

MÜLLER, R.H.; PETERS . K. Nanosuspensions for the formulation of poorly soluble drugs: I. Preparation by a size-reduction technique. **Int J Pharm.** V.160, P. 229-237, 1998.

MÜLLER, R. H; BECKER, R.; KRUSS, B.; PETERS, K. Pharmaceutical nanosuspensions for medicament administration as systems with increased saturation solubility and rate of solution. **United States Patent** 5,858,410, USA.1999.

MÜLLER, R.H. ; KECK, C. M. Challenges and solutions for the delivery of biotech drugs a review of drug nanocrystal technology and lipid nanoparticles. In: **Journal of biotechnology.** Vol. 113. Pp. 151-170. 2004

MÜLLER, R. H.; SCHMIDT, S.; BUTTLE, I.; AKKAR, A.; SCHMITT, J.; BRÖMER, S.; **Int. J. Pharm.** Vol..269, p. 293, 2004.

MULLER, R. H.; JACOBS, C.; KAYSER, O. Em Pharmaceutical Emulsions and suspensions; Nielloud, F.; Marti-Mestres, G., eds; **Marcel Decker Press: Basel**, p. 383, 2000.

MULLER, R. H.; JUNGHANNS, J-U. A. H. Em Nanoparticulates as Drug Carriers. Torchilin ed.; **Imperial College Press: Covent Garden**, Vol. p.307, 2006.

NUNES, X. P.; MESQUITA, R. F ; SILVA, D. A.; LIRA, D. P. ; COSTA, V. C. O.; SILVA, M. V. B. ; XAVIER, A. L. ; DINIZ, M. F. F. M. ; AGRA, M. F. Constituintes quimicos, avaliacao das atividades citotoxica e antioxidante de *Mimosa paraibana* Barneby(Mimosaceae). **Rev. bras. farmacogn.** Vol. 18, p. 718-723, 2008

PETERS ,K.; LEITZKE S.; DIEDERICHS, J.E.; BORNER, K.; HAHN, H.; MÜLLER, R.H.; EHLERS, S. Preparation of a clofazimine nanosuspension for intravenous use and evaluation of its therapeutic efficacy in murine Mycobacterium avium infection. **J Antimicrob Chemoth.** 2000.

PINNAMANENI S.; DAS N. G. Formulation approaches for orally administered poorly soluble drugs. **Pharmazie . Vol.. 57**, p. 291-300 , 2002.

PINTO, E. et al. Antifungal activity of synthetic di(hetero)arylamines based on the benzo[b]thiophene moiety. **Bioorganic & Medicinal Chemistry.** Vol.16, p. 8172-8177, 2008.

PUTEROVÁ, Z.; KRUTOSIKOVÁ, A.; VÉGH , D. Applications substitutes 2-aminothiophenes in drug design. **Nova Biotechnologica**, Vol. 9, no. 167. 2009.

RABINOW, B. E. Nanosuspensions in drug delivery. **Nat. Rev. Drug Discov.** Vol. 3, p. 785–796, 2004.

RIBEIRO, F.F. Síntese, caracterização e avaliação da citotoxicidade de novos derivados sintéticos 2-[(Benzilideno) Amino] -2,4,5,6,7- Tetraidro-4H-Benzo [b] Tiofeno-3-

carbonitrila frente a *Artemia salina*. **Monografia**. Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), PB, 2011.

ROMAGNOLI, R.; BARALDI, G.; CARRION, M. Synthesis and biological evaluation of 2- and 3-aminobenzo[b]thiophene derivatives as M antimitotic agents and inhibitors of tubulin polymerization. **Journal. Med Chem**. Vol.50, n.3, 2007.

ROSARIO. P, CLAUDIO. B, PIERA, F, ADRIANA. M., ANTONINA. P, GIOVANNI P.EUDRAGIT. Nanosuspensions for the ophthalmic controlled delivery of ibuprofen.. **Eur J Pharm Sci**. 2002

SAJJADI, S. Effect of mixing protocol on formation of emulsion. **Chemical Engineering Science**, Vol. 61, 2006.

SIMÃO, J. J.L.; CRUZ, R. M.D.; ARAÚJO, R.S.A.; OLIVEIRA, J.G.B.; RIBEIRO, F.F.; JUNIOR, F. J. B. M. Síntese do 2-[(4-Benziloxi-benzilideno)-amino]-5-metil-tiofeno-3-carbonitrila. Um novo agente antifúngico e anti-tripanosômico. **Resumo da 32ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**. Fortaleza-CE. Brasil. 2009

SHAFEEQUE. S.; MOHAN . S.; MANJUNATHA K.S. Synthesis, analgesic and anti-inflammatory activity of some 2-substituted amino-3-(N-p-tolyl carboxamido)-4, 5-dimethyl thiophenes. **Ind.J.Heterocyclic chem**, Vol. 8(4): p . 297-300, 1999.

SHAH, P.; *MRS BULL*. Vol.31, p.894, 2006.

STEFANI , H. A. Introdução à Química dos Compostos Heterocíclicos, **Guanabara Koogan**, 2009.

SWARBRICK J., BOYLAN J.C. **Encyclopedia of Pharmaceutical Technology**, 2 ed., Vol. 3, p. 2458-2479 , 2002.

VERÇOZA, L. V.; FEITOZA, D.D. ; ALVES, J.A. ; AQUINO, M. T. ; LIMA, G. J. ; ARAÚJO, M. J. ; CUNHA, B. G. I. ; GÓES, S. J. A. Síntese e avaliação da atividade antimicrobiana de novas 4-tiazolidinonas obtidas a partir de formilpiridina tiossemicarbazonas. **Quím. Nova**. Vol. 32 no.6 São Paulo , 2009.

VIPPAGUNTA S.R. WANG Z., HORNUNG S., KRILL S.L. Factors affecting the formation of eutectic solid dispersions and their dissolution behavior. **J. Pharm. Sci**. 2006.

WANG, J.; URBAN, L. The impact of early ADME profiling on drug discovery and development strategy. **Drug Discovery World** , Vol.4, p.73-86,2004.

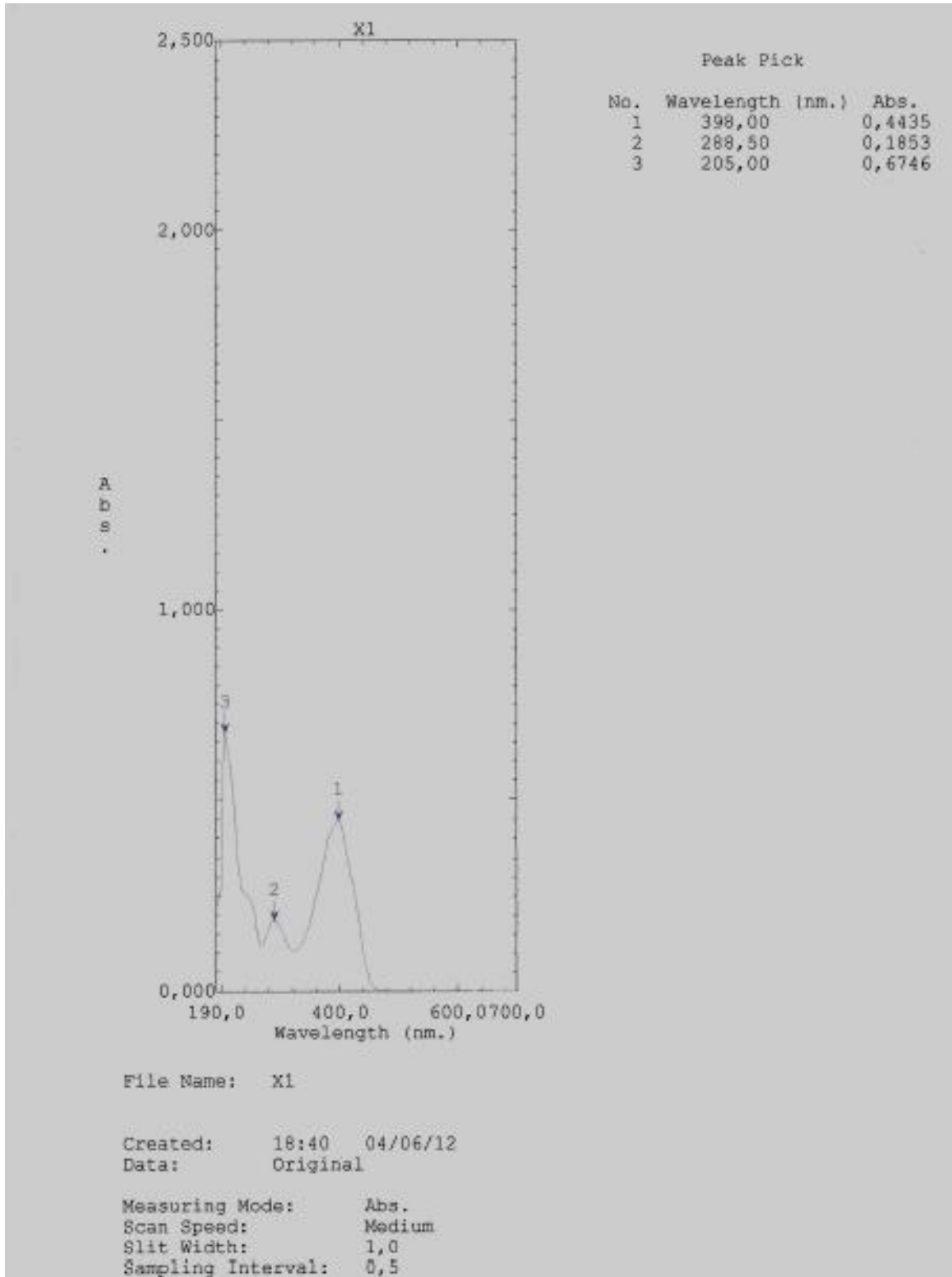
WONG. J.; BRUGGER. A.; KHARE A.; CHAUBAL.; PAPADOPOULOS P.; RABINOW B.; KIPP J.; NING J. Suspensions for intravenous (IV) injection: A review of development, preclinical and clinical aspects. **Adv Drug Delivery Rev**. 2008.

ZHONGHAI, W. Experimental and theoretical studies and organic attachment to silicon surfaces. 2005. 203 p. **Tese** (Doutorado em filosofia). Departamento de química, Universidade de Singapura.

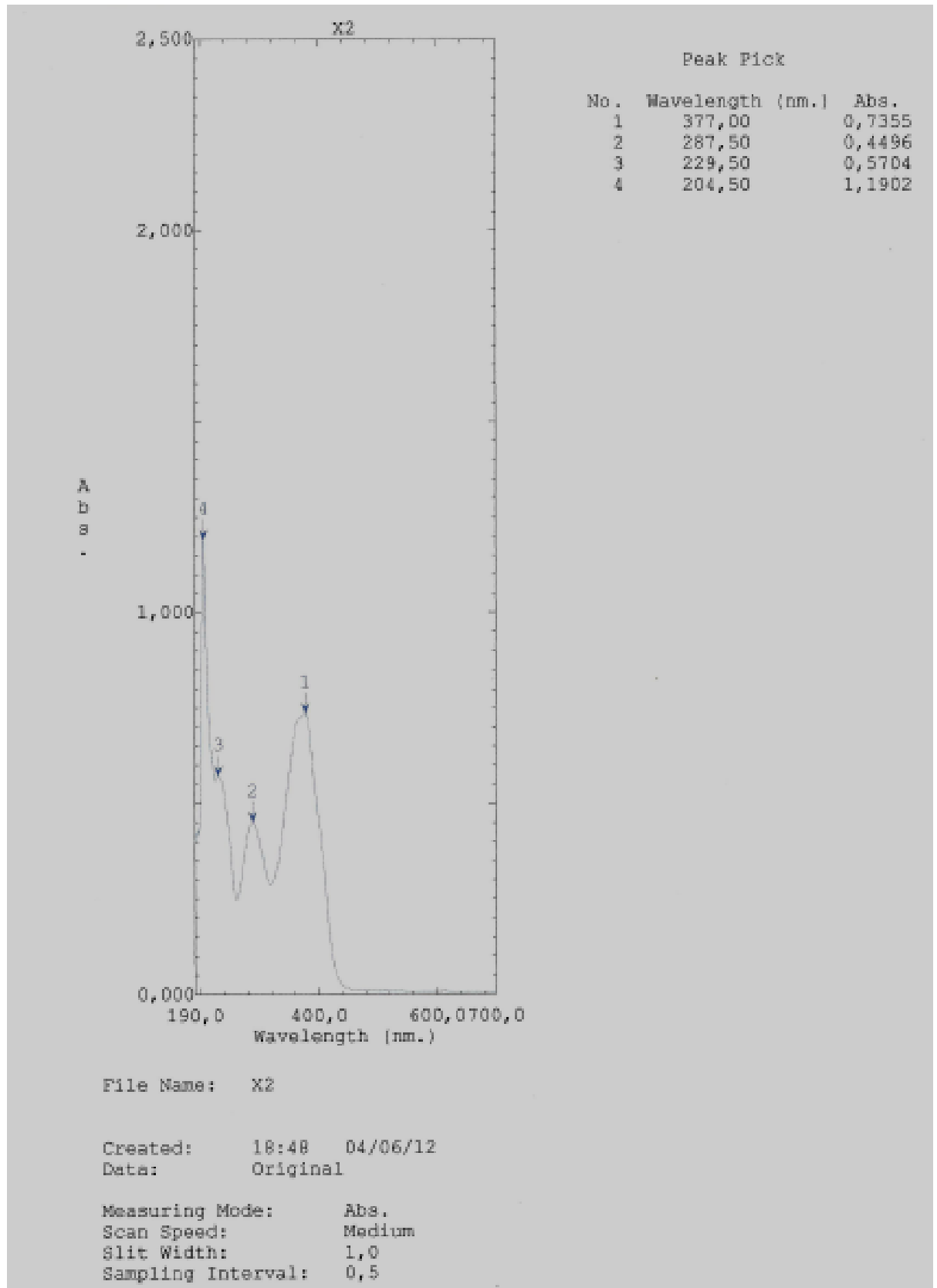
9. Anexos

9.1. Anexos I

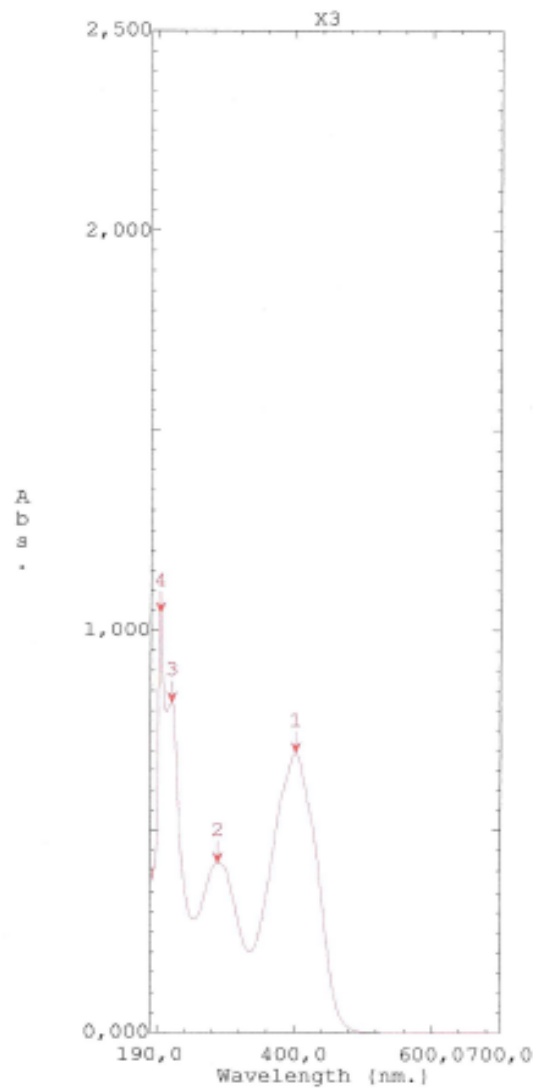
- Espectros de varredura do composto 7CN09



- Espectros de varredura do composto 6CN14



- Espectros de varredura do composto 7CN10



Peak Pick		
No.	Wavelength (nm.)	Abs.
1	401,50	0,6921
2	288,00	0,4172
3	221,00	0,8180
4	204,00	1,0421

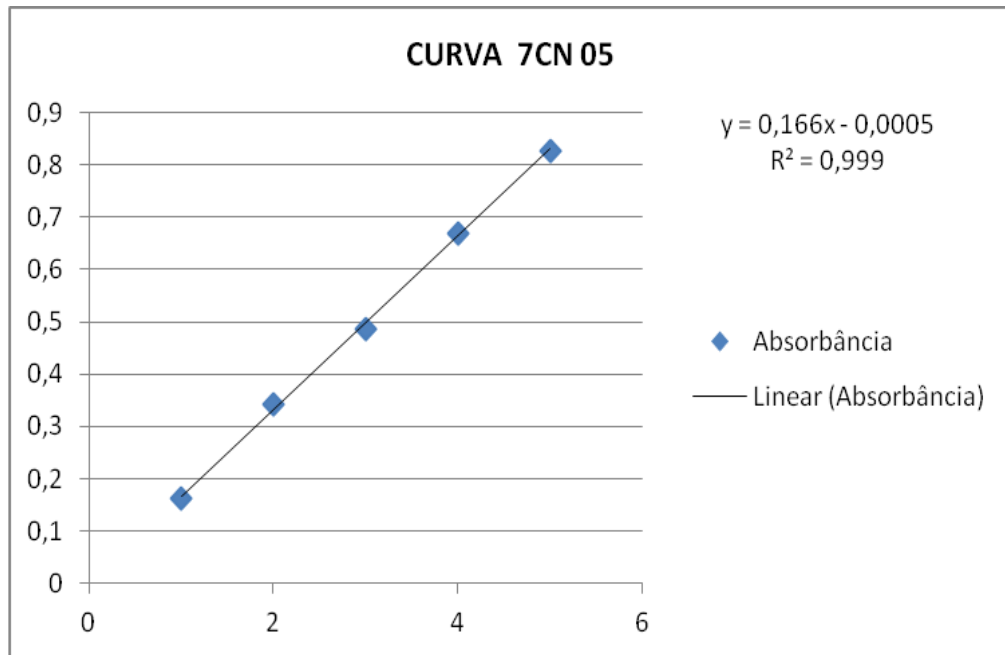
File Name: X3

Created: 18:57 04/06/12
Data: Original

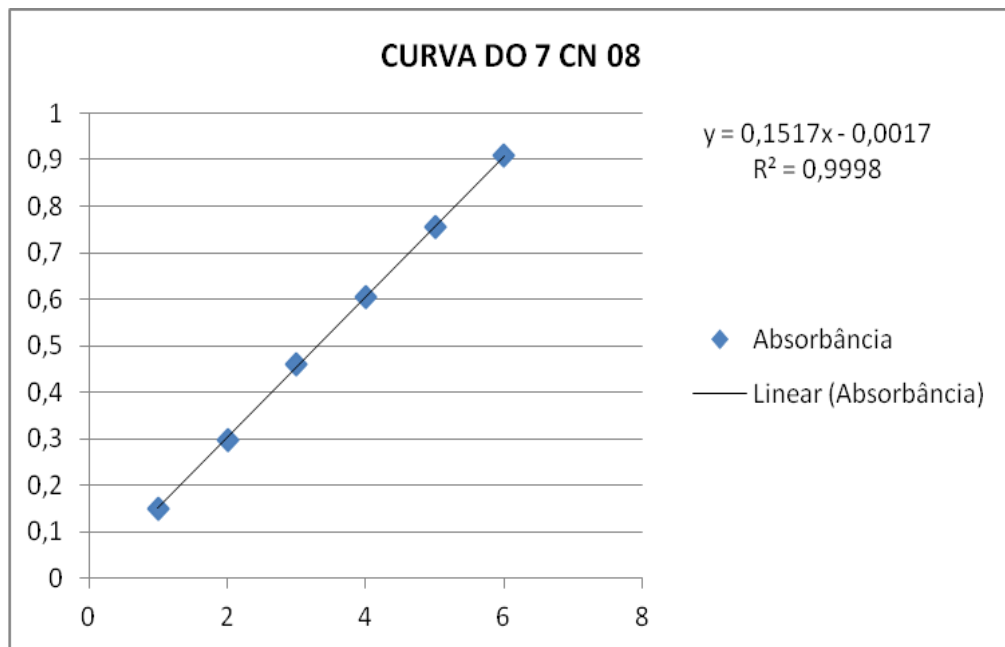
Measuring Mode: Abs.
Scan Speed: Medium
Slit Width: 1,0
Sampling Interval: 0,5

9.2 Anexo II

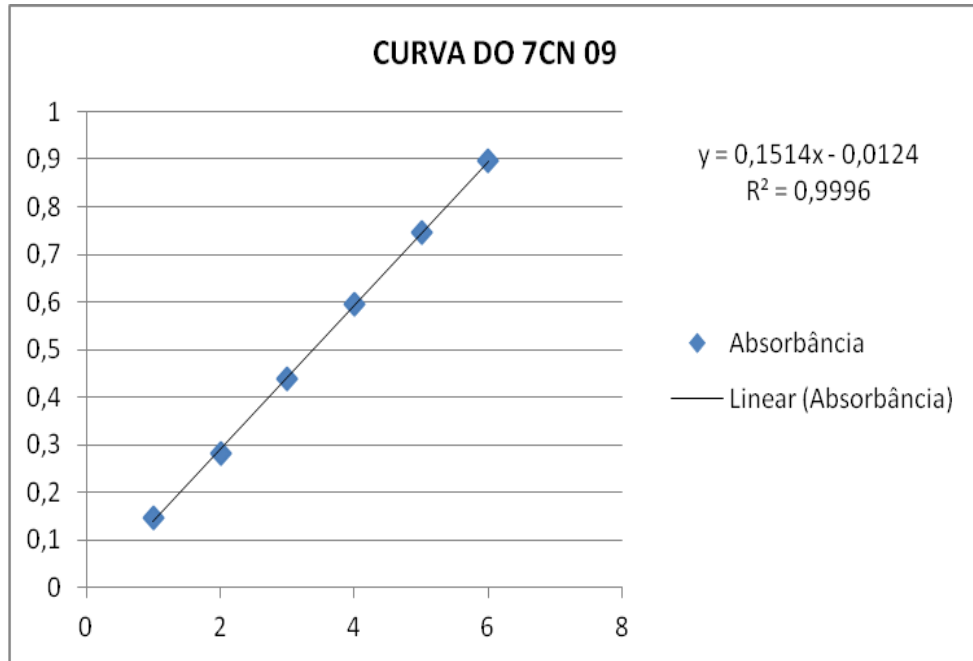
- Curva de calibração do como 2-[(2,4-dicloro-benzilideno)-amino]-5,6,7,8-tetraidro-4*H*-ciclohepta[*b*]tiofeno-3 carbonitrila (7CN 05)



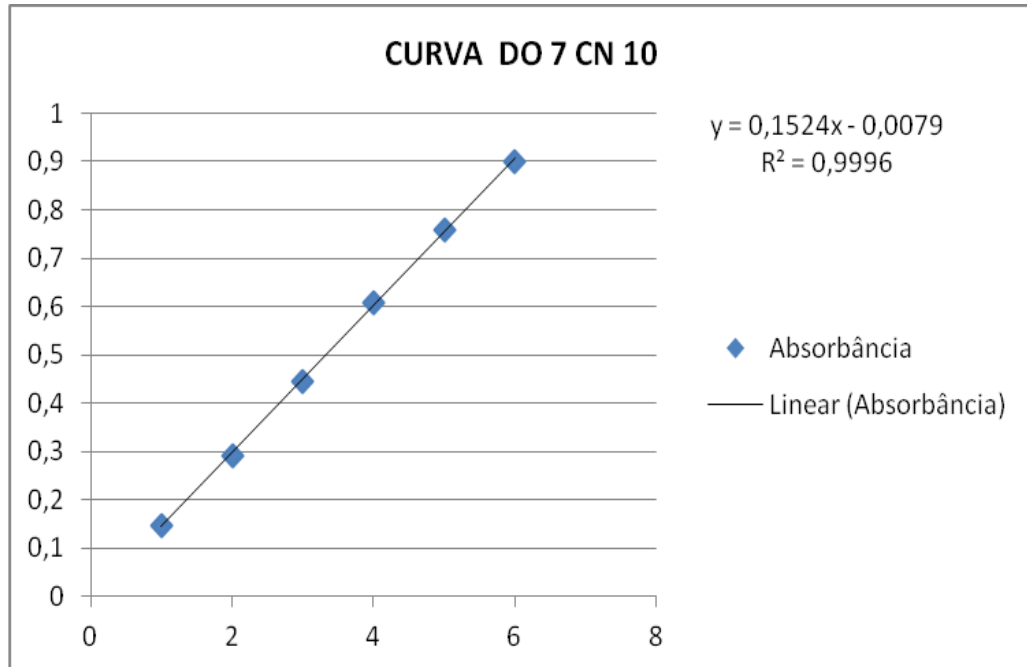
- Curva de calibração do 2-[(3,4-dicloro-benzilideno)-amino]-5,6,7,8-tetraidro-4*H*-ciclohepta[*b*]tiofeno-3-carbonitrila (**7CN 08**)



- Curva de calibração do 2-[(5-bromo-2-metóxi-benzilideno)-amino]-5,6,7,8-tetraidro-4*H*-ciclohepta[*b*]tiofeno-3-carbonitrila (**7CN 09**)

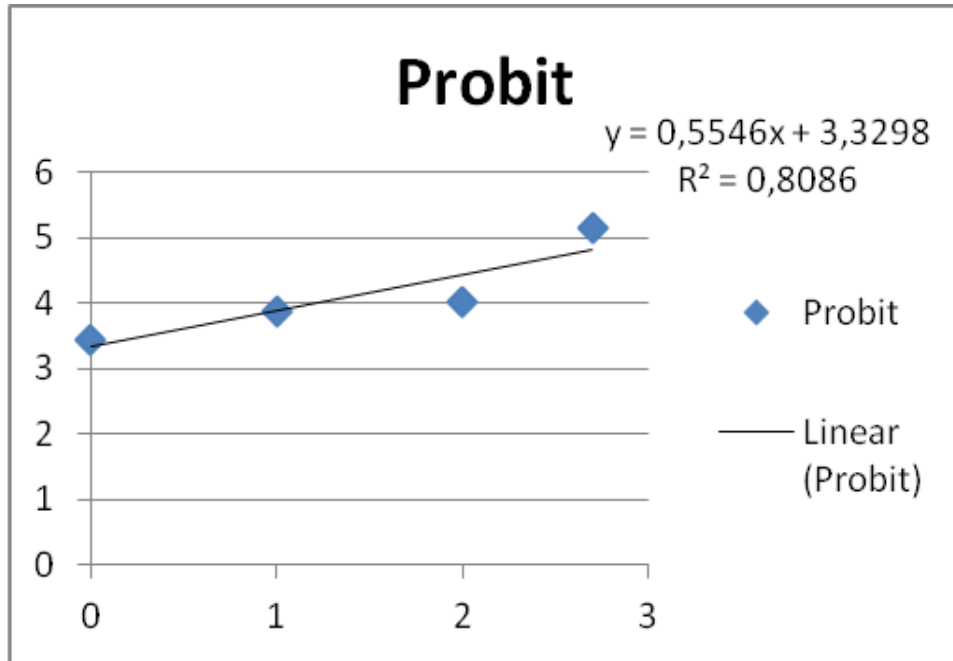


- Curva de calibração do 2-[(4-nitro-benzilideno)-amino]-5,6,7,8-tetraidro-4*H*-ciclohepta[*b*]tiofeno-3-carbonitrila

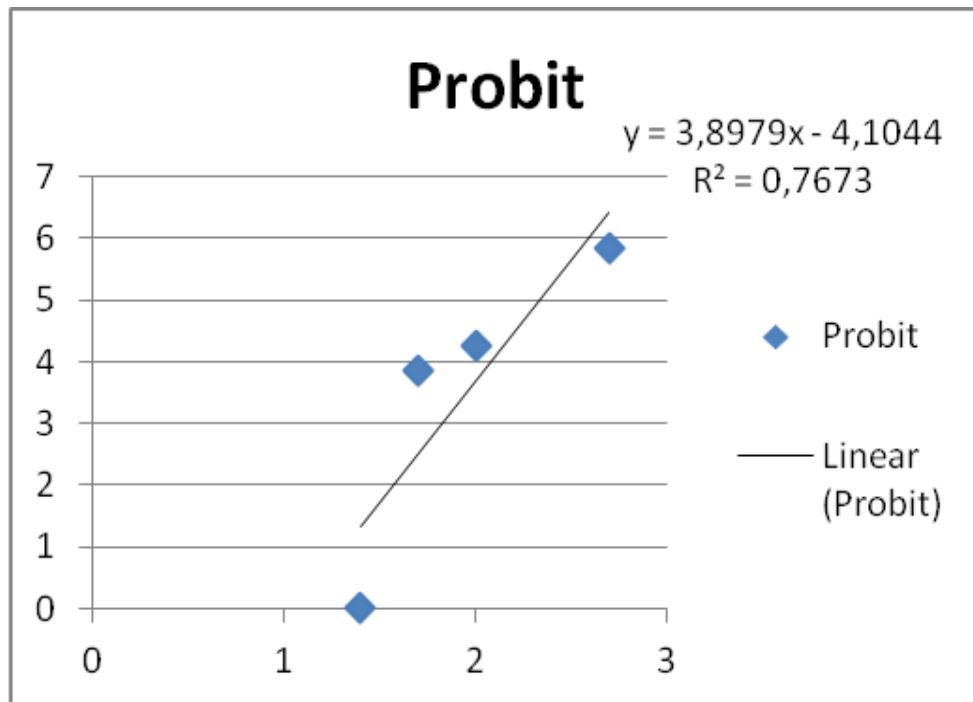


9.3 Anexo III

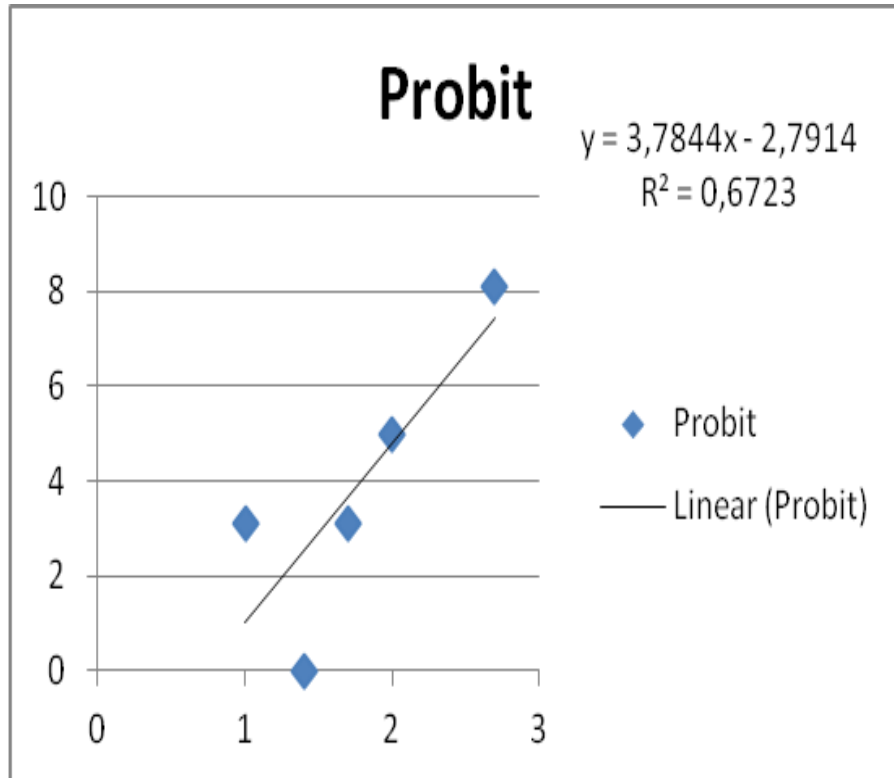
- Gráfico de regressão linear PROBIT para o composto 7CN09



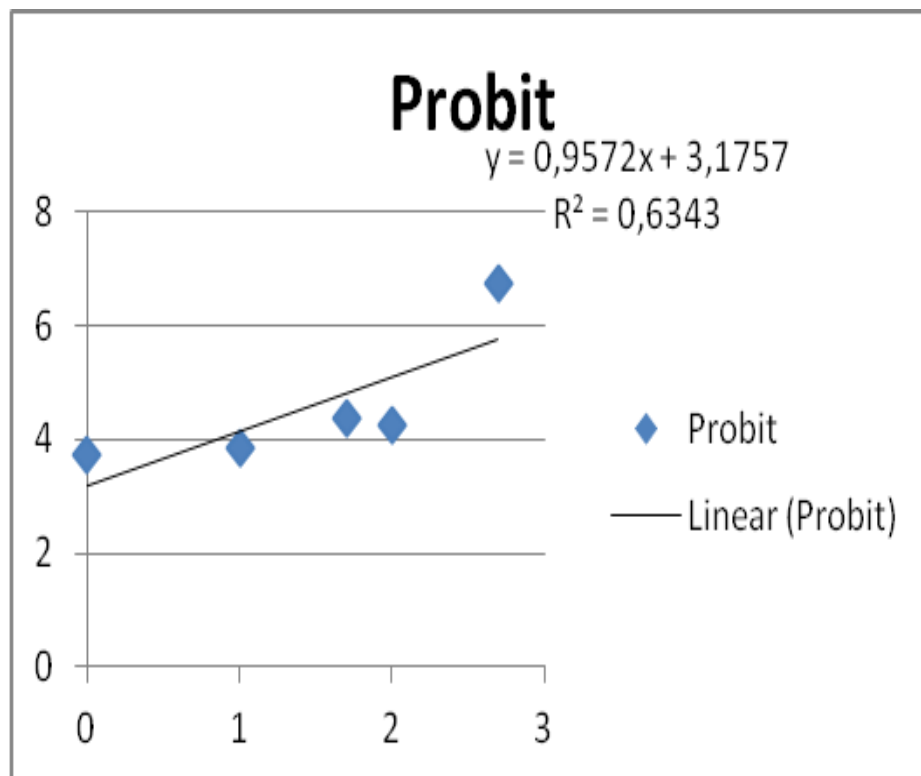
- Gráfico de regressão linear PROBIT para o composto 7CN08



- Gráfico de regressão linear PROBIT para o composto 7CN05

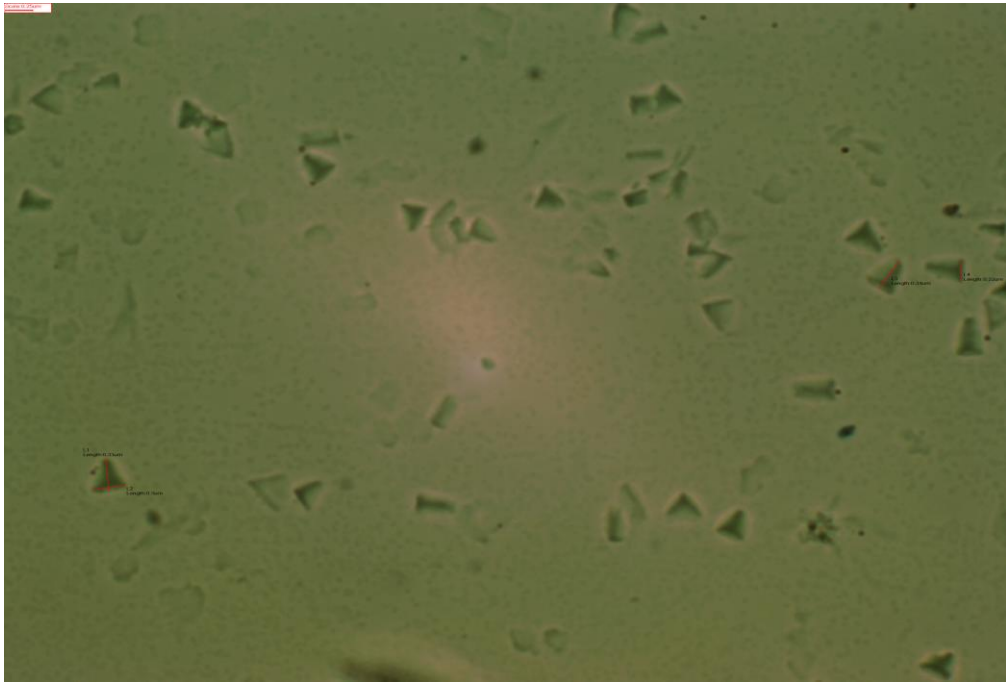


- Gráfico de regressão linear PROBIT para o composto 6CN10

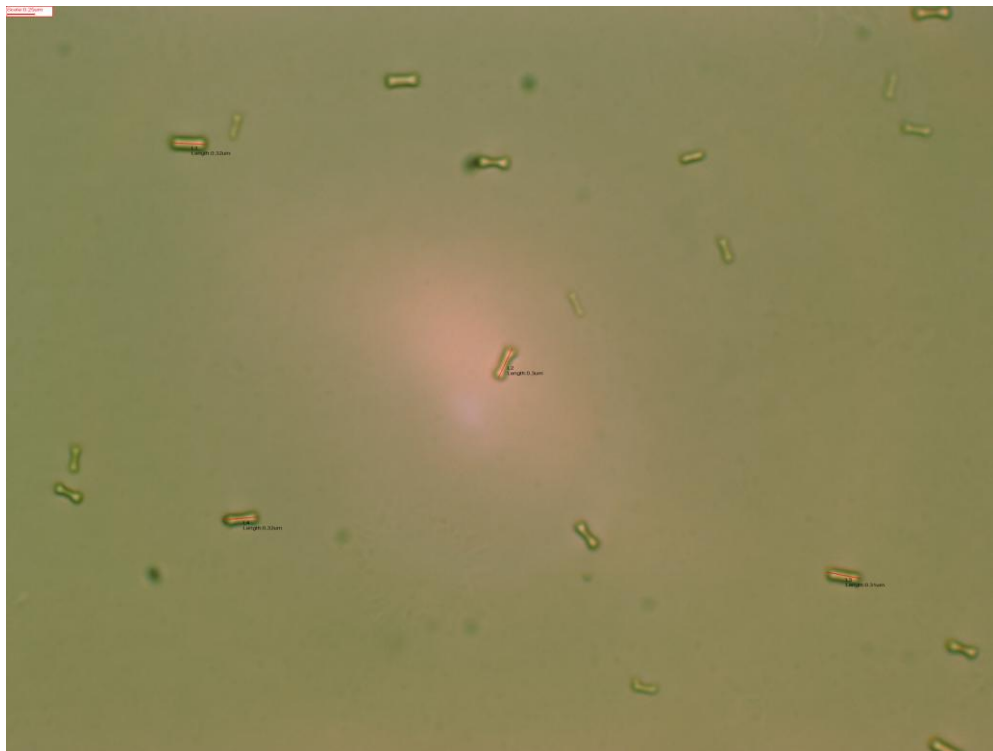


9.4. Anexo IV- Figuras dos micro/nanocristais

- **Micro/nanocristais do composto 6CN14**



- **Micro/nanocristais do composto 7CN08**



- **Micro/nanocristais do composto 7CN09**

