



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**Avaliação psicofarmacológica e estudo de pré-formulação do protótipo a fármaco
ansiolítico 2-[(2,6-diclorobenzilideno) amino]-5,6-diidro-4H-ciclopenta[b]tiofeno-3-
carbonitrila, 5TIO1**

AMANDA CAMPOS FORTES

TERESINA

2012

AMANDA CAMPOS FORTES

**Avaliação psicofarmacológica e estudo de pré-formulação do protótipo a fármaco
ansiolítico 2-[(2,6-diclorobenzilideno) amino]-5,6-diidro-4H-ciclopenta[b]tiofeno-3-
carbonitrila, 5TIO1**

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Piauí, como um dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Monica Felts de La Roca Soares

Co-orientador: Prof. Dr. José Lamartine Soares Sobrinho

TERESINA

2012

AMANDA CAMPOS FORTES

**Avaliação psicofarmacológica e estudo de pré-formulação do protótipo a fármaco
ansiolítico 2-[(2,6-diclorobenzilideno) amino]-5,6-diidro-4H-ciclopenta[b]tiofeno-3-
carbonitrila, 5TIO1**

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Piauí, como um dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em ____ de _____ de _____.

BANCA EXAMINADORA:

Prof^a. Dr^a. Monica Felts de La Roca Soares
Universidade Federal de Pernambuco (Orientadora)

Prof. Dr. José Lamartine Soares Sobrinho
Universidade Federal de Pernambuco (Co-orientador)

Prof. Dr. Edson Cavalcanti da Silva Filho
Universidade Federal do Piauí (Examinador Externo)

Prof^a. Dr^a. Danielle Silveira Macêdo
Universidade Federal do Ceará (Examinador Externo)

TERESINA

2012

“Universities play a critical and growing role in early-stage drug discovery. The work of academic researchers who are identifying and testing promising new targets and compounds is an important step in developing new breakthrough drugs for serious diseases. Collaborations between academic groups and biotech companies are increasingly important in discovering the next generation of transformational medicines”

Dr. Jeff Leiden (2012) – diretor executivo da Vertex Pharmaceuticals

Dedico este trabalho aos meus pais, Ana e Luiz, pelo amor incondicional e pelo empenho na minha formação; aos meus irmãos, Danilo, Virgínia e Ana Vitória, pela alegria incalculável; aos meus avós; à Tia Virgínia (in memoriam), à Vó Virgínia e à Ana Karina por serem as minhas inspirações constantes. Em especial ao, meu amor, Leon e ao Vô Felipe por serem o meu referencial de carinho e respeito.

AGRADECIMENTOS

- A Deus, por “colocar” pessoas maravilhosas na minha vida.
- À minha orientadora, Prof^a. Dra. Mônica Felts de La Roca Soares, exemplo de entusiasmo, pelos ensinamentos transmitidos, pela infindável paciência, pelo incentivo, pela ajuda constante e pela atenção a mim dedicada.
- Ao meu co-orientador, Prof. Dr. José Lamartine Soares Sobrinho, pelos ensinamentos transmitidos, por sua presteza ao orientar, pelo incentivo e pela atenção a mim dedicada.
- Ao Prof. Dr. Rivelilson Mendes de Freitas, pelos ensinamentos transmitidos, pelas orientações, pela amizade e por me integrar em várias atividades do seu grupo de pesquisa.
- Ao Prof. Dr. Lívio por sempre impulsionar o potencial inventivo dos seus alunos.
- À Prof^a. Dra. Graça Citó exemplo de amor, dedicação e honestidade à vida acadêmica.
- Ao NTF (Núcleo de Tecnologia Farmacêutica) da UFPI, coordenado pelo Prof. Dr. Stanley Juan Gutierrez, agradeço em nome do meu amigo Márcio pela ajuda e ao Sr. Orlando por zelar pelo nosso ambiente de trabalho.
- Ao LAPCOM (Laboratório de Pesquisa em Cosmético e Medicamentos) da UFPI, coordenado pela Prof^a. Dr^a. Monica Felts de La Roca Soares, agradeço em nome de Mirna, Ana Cristina e Mayara pela ajuda constante e amizade.
- Ao LIMAV (Laboratório Interdisciplinar de Materiais Avançados) da UFPI, coordenado pela Prof^a. Dr^a. Maria Rita de Moraes Chaves Santos, pelas análises, agradeço em nome de Edgar e André.
- Ao LAPNEX (Laboratório de Pesquisa em Neuroquímica Experimental) da UFPI, coordenado pelo Prof. Dr. Rivelilson Freitas, pelas análises farmacológicas, agradeço a toda sua equipe, em especial, à mestranda Amanda, à Pauline e ao Guilherme.
- Ao LQQC (Laboratório de Química Quântica Computacional) da UESPI, coordenado pelo Prof. Dr. Francisco das Chagas Alves Lima, pelas análises computacionais.
- Ao LTM (Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos) da UFPE, coordenado pelo Prof. Pedro Rolim, pelas análises e tempo a mim dedicado. Agradeço a oportunidade de estágio e à

troca de conhecimentos com os membros de sua equipe. Em especial, agradeço a doutoranda Larissa Rolim e ao Prof. Dr. Pedro Rolim.

- Ao LSVM (Laboratório de Síntese e Vetorização de Moléculas) da UEPB, coordenado pelo Prof. Dr. Francisco Jaime Bezerra Mendonça Júnior, pela criação e síntese do 5TIO1. Obrigada também pela ajuda constante.

- Ao DEINFAR (Laboratório de Desenvolvimento e Inovação Farmacotécnica) da USP, coordenado pelo Prof. Dr. Humberto Gomes Ferraz, pelo estágio, agradeço a todos por ajudar na minha evolução acadêmica, técnico-científica e humana.

- Ao Bruno Quirino, Everton França e Lucas Maciel pelos ensinamentos e suporte científico.

- Aos alunos da graduação do Estágio à Docência. Obrigada por me proporcionar uma das melhores experiências do meu mestrado.

- Ao meu pai por nunca medir esforços para minha felicidade e educação, pelos seus ensinamentos, pelos seus conselhos e, principalmente, pelo seu amor.

- À mamãe por preocupar-se constantemente comigo, sempre ajudando e cuidando de mim; obrigada por sua proteção, pelo seu amor e carinho.

- Aos meus irmãos Danilo, Virgínia e Ana Vitória - fonte de alegria e amor incalculável.

- À Ana Karina por me ajudar sempre e pelos conhecimentos transmitidos. Obrigada pelo carinho e por cuidar de mim.

- À vovó Virgínia que também me educou e educa. Obrigada, vovó, pelo amor e por ser meu exemplo de mulher forte. E ao vovô José Carlos (*in memoriam*), meu exemplo de ética e honestidade.

- Em especial, à minha Tia Virgínia (*in memoriam*) que me encantava com seu entusiasmo e seu amor pela Farmácia; obrigada pelo exemplo de ética e honestidade; obrigada pelas aventuras; obrigada pelo amor e carinho.

- À vovó Eliza pelo carinho e por me ensinar que os detalhes sempre são importantes para o sucesso. Ao vovô Felipe por ter me ensinado o que basta para viver: “faça o bem e respeite ao próximo”.

- Ao meu amor, Leon, pelo seu amor imensurável, por ser meu suporte nos momentos difíceis, pela preocupação constante, por me ajudar sempre e em tudo.

- **A TODOS vocês, minha eterna gratidão!**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ

REITOR

Prof. Dr. José Arimatéia Dantas Lopes

VICE-REITOR

Prof^a. Dr^a. Nadir do Nascimento Nogueira

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Saulo Cunha de Serpa Brandão

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof. MSc. Antonio dos Santos Rocha Filho

VICE-DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof. Dr. José Guilherme Ferre Pompeu

COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS

FARMACÊUTICAS

Prof. Dr. Rivelilson Mendes de Freitas

VICE-COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS

FARMACÊUTICAS

Prof. Dr. Lívio Cesar Cunha Nunes

LABORATÓRIOS E INSTITUIÇÕES ENVOLVIDAS

Núcleo de Tecnologia Farmacêutica (NTF) – UFPI

Responsável: Prof. Dr. Stanley Juan Gutierrez

Campus Universitário Ministro Petrônio Portella

Centro de Ciências da Saúde – CCS

Laboratório de Pesquisa em Cosméticos e Medicamentos (LAPCOM) – UFPI

Responsável: Prof^a Dr^a Monica Felts de La Roca Soares

Campus Universitário Ministro Petrônio Portella

Centro de Ciências da Saúde – CCS

Laboratório de Pesquisa em Neuroquímica Experimental (LAPNEX) - UFPI

Responsável: Prof. Dr. Rivelilson Mendes de Freitas

Campus Universitário Ministro Petrônio Portella

Centro de Ciências da Saúde – CCS

Laboratório Interdisciplinar de Materiais Avançados (LIMAV) – UFPI

Responsável: Prof^a. Dr^a. Maria Rita de Moraes Chaves Santos

Campus Universitário Ministro Petrônio Portella

Centro de Ciências da Natureza – CCN

Laboratório de Química Quântica Computacional (LQQC) – UESPI

Responsável: Prof. Dr. Francisco das Chagas Alves Lima

Campus Poeta Torquato Neto

Centro de Ciências da Natureza – CCN

Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos (LTM) - UFPE

Responsável: Prof. Dr. Pedro José Rolim Neto

Campus Recife

Centro de Ciências da Saúde – CCS

Laboratório de Síntese e Vetorização de Moléculas (LSVM) - UEPB

Responsável: Prof. Dr. Francisco Jaime Bezerra Mendonça Júnior

Campus V – João Pessoa

Centro de Ciências Biológicas e Sociais Aplicadas – CCBSA

FORTES, Amanda Campos, **Avaliação psicofarmacológica e estudo de pré-formulação do protótipo à fármaco ansiolítico 2-[(2,6-diclorobenzilideno) amino]-5,6-diidro-4H-ciclopenta[b]tiofeno-3- carbonitrila, 5TIO1**, 2012, Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Piauí, Teresina.

RESUMO

A inovação é a principal ferramenta competitiva da indústria farmacêutica, a qual, recentemente, enfrenta desafios na sua produtividade. No sentido de reverter essa dificuldade, os investimentos em síntese química são essenciais na pesquisa e desenvolvimento de novos medicamentos. Nesse contexto, o 2-[(2,6-diclorobenzilideno) amino]-5,6-diidro-4H-ciclopenta[b]tiofeno-3- carbonitrila (5TIO1) é uma nova entidade química, que demonstrou em estudos prévios, um potencial uso para o desenvolvimento de um novo fármaco ansiolítico; entretanto possui baixa solubilidade em água podendo comprometer seu desempenho farmacológico. Diante do exposto, o objetivo desse trabalho foi avaliar as atividades psicofarmacológicas e realizar estudos de pré-formulação do 5TIO1, enfocando a melhoria da solubilidade e a análise da estabilidade/compatibilidade com ciclodextrinas. Em modelos animais através do teste do labirinto em cruz elevado e do teste claro-escuro, o 5TIO1 na dose de 0,1 mg kg⁻¹ apresentou efeito ansiolítico, de forma similar ao diazepam na dose de 2,0 mg kg⁻¹, mediado, possivelmente, por transmissão GABAérgica. O 5TIO1 também foi capaz de diminuir a peroxidação lipídica e o conteúdo de nitrito e de aumentar a atividade das enzimas antioxidantes (catalase e superóxido dismutase) em diferentes áreas cerebrais de camundongos; esses dados sugerem que o 5TIO1 pode proteger o cérebro contra danos neuronais causados pelo estresse oxidativo, regularmente, observados durante neuropatologias. Nos estudos de pré formulação, a fase inicial consistiu na caracterização das propriedades físico-químicas do 5TIO1 através de ressonância magnética nuclear (RMN), espectroscopia de infravermelho (IV), análise térmica, difração de raio-X (DRX) e microscopia eletrônica de varredura (MEV). A autenticidade do 5TIO1, com pureza de 98,96%, foi analisada por RMN e IV. A MEV e a DRX indicaram um perfil cristalino para o 5TIO1. A calorimetria exploratória diferencial sugeriu a presença de polimorfos e a termogravimetria (TG) evidenciou um perfil degradativo de fase única, iniciando em 227 °C. No âmbito farmacotécnico, avaliou-se a melhoria da solubilidade através da complexação do 5TIO1 com as ciclodextrinas naturais (α , β e γ) e a sulfobutil éter β -ciclodextrina; além disso, analisou-se diferentes métodos de obtenção – malaxagem, evaporação/liofilização e *spray drying*. As técnicas analíticas sugeriram a formação dos complexos de inclusão do 5TIO1 com todas as ciclodextrinas. A análise termogravimétrica não evidenciou incompatibilidades entre o 5TIO1 e as ciclodextrinas estudadas e nem indicou aumento de estabilidade dos complexos de inclusão. A melhoria da solubilidade foi comprovada pelo teste de dissolução, onde todos os complexos de inclusão obtidos apresentaram bom incremento na velocidade de dissolução frente ao 5TIO1 isolado. Conclui-se que o 5TIO1 é um candidato promissor para o tratamento da ansiedade e que é viável para o seu desenvolvimento farmacotécnico, a obtenção de complexos de inclusão com a β -ciclodextrina por meio da técnica de malaxagem.

Palavras-chave: Tiofeno; Solubilidade; Ciclodextrina; Estudos de pré-formulação

FORTES, Amanda Campos, **Psychopharmacological evaluation and preformulation study of a prototype to anxiolytic drug 2-[(2,6-dichlorobenzylidene) amino]-5,6-dihydro-4H-cyclopenta[b]thiophene-3-carbonitrile, 5TIO1**, 2012, Dissertation (Master Degree in Pharmaceutical Sciences) – Post-graduation Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Piauí, Teresina.

ABSTRACT

Innovation is the main competitive tool in the pharmaceutical industry which has, recently, been facing challenges in its productivity. In the sense of reverting this difficulty, investments in chemical synthesis are essential in research and development of new drugs. In this context, 2-[(2,6-dichlorobenzylidene) amino]-5,6-dihydro-4H-cyclopenta[b]thiophene-3-carbonitrile (5TIO1) is a new chemical entity that showed, in previous studies, a potential use in the development of a new anxiolytic drug; however it has poor water solubility which can compromise its pharmacological performance. Given the above, the aim of this study was to evaluate the psychopharmacological activities and perform preformulation studies of 5TIO1 focusing on solubility improvement and analysis of the stability/compatibility with cyclodextrins. In animal models through elevated plus-maze and light/dark box assays, 5TIO1 at the dose of 0.1 mg kg⁻¹ shows anxiolytic-like effect, similar to diazepam at the dose of 2.0 mg kg⁻¹, possibly mediated by GABAergic transmission. 5TIO1 was also able to decrease lipid peroxidation and nitrite content and increase the activity of antioxidant enzymes (catalase and superoxide dismutase) in different mice brain areas; these data suggest that 5TIO1 can protect the brain against neuronal damage caused by oxidative stress regularly observed during neuropathologies. In the preformulation studies, the initial phase consisted on the characterization of 5TIO1's physicochemical properties through nuclear resonance magnetic (NMR), infrared spectroscopy (IR), thermal analysis, x-ray diffraction (XRD) and scanning electron microscopy (SEM). The 5TIO1's authenticity, with purity of 98.96%, was analyzed by NMR and IR. The SEM and XRD indicated a crystalline profile for 5TIO1. The differential scanning calorimetry suggested the presence of polymorphs and the thermogravimetry (TG) showed a single phase degradative profile, starting at 226.95 ° C. In the pharmacotechnical field, the solubility improvement was evaluated by 5TIO1's complexation with the natural cyclodextrins (α , β and γ) and with the sulfobutyl-ether- β -cyclodextrin; besides, it was analyzed different obtention methods - kneading, evaporation/lyophilization and spray drying. The analytical techniques suggested the formation of inclusion complexes of 5TIO1 with all cyclodextrins. The thermogravimetric analysis showed no incompatibilities between the 5TIO1 and the cyclodextrins studied and did not indicate stability increase of inclusion complexes. The solubility improvement was confirmed by the dissolution test where all inclusion complexes obtained showed good increase in dissolution rate compared with the isolated 5TIO1. It can be concluded that 5TIO1 is a promising candidate for the treatment of anxiety and the obtention of inclusion complexes with β -cyclodextrin using kneading technique is feasible for its pharmaceutical development.

Keywords: Thiophene; Solubility; Cyclodextrin; Preformulation studies

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

Figura 1. Estrutura molecular do 5TIO1.....	20
---	----

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Figura 1. Via sintética do 5TIO1.....	28
Figura 2. Representação do processo de seleção de formulação para compostos com potencial problema de absorção.....	38
Figura 3. (a) Estrutura geral das ciclodextrinas. Os derivados α , β e γ -CD são definidos por $n=1, 2$ e 3 , respectivamente. (b) Representação esquemática da estrutura tridimensional das CDs, mostrando as características estruturais definidas pelo arranjo das unidades de glicose.....	41
Figura 4. Perfis de solubilidade pela teoria de Higuchi e Connors. <i>S₀</i> é a solubilidade intrínseca do fármaco na ausência de ciclodextrina.....	42

CAPÍTULO I

Figura 1. Estrutura molecular do 5TIO1.....	46
---	----

CAPÍTULO II

Figura 1. Estrutura molecular do 5TIO1.....	61
Figura 2. Expressão da catalase e superóxido dismutase no hipocampo, corpo estriado, córtex frontal e cerebelo de camundongos adultos tratados com 5TIO1 nas doses de 0,1; 1,0 e 10,0 mg kg ⁻¹	69

CAPÍTULO III

Figura 1. Estrutura molecular do 5TIO1.....	78
Figura 2. Espectro de RMN de ¹ H da molécula 5TIO1 (300 MHz) em CDCl ₃	83

Figura 3. Espectro de RMN de ^{13}C da molécula 5TIO1 (75 MHz) em CDCl_3	83
Figura 4. Espectro na região do infravermelho com transformada de Fourier do 5TIO1.....	84
Figura 5. Eletromicrografias do 5TIO1.....	84
Figura 6. Curva de DSC do 5TIO1 obtida na razão de $3\text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$	85
Figura 7. Curva de TG e DTA do 5TIO1 obtida na razão de $10\text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$	86
Figura 8. Curvas do diagrama de solubilidade do 5TIO1 sob a influência de concentrações crescentes de α (■), β (●) e γ (▲) ciclodextrinas em solução.....	87
Figura 9. Curvas de DTA das substâncias isoladas, das misturas físicas e dos complexos de inclusão na razão de $10^\circ\text{C min}^{-1}$	89
Figura 10. Curvas de TG e derivadas (DTG) das substâncias isoladas, da mistura física e dos complexos de inclusão para α (a), β (b) e γ (c) ciclodextrinas na razão de $10\text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$	90
Figura 11. Padrões de difração de raio X das substâncias isoladas, das misturas físicas e dos complexos de inclusão.....	92
Figura 12. Espectro de Infravermelho com transformador de Fourier (IV-TF) das substâncias isoladas, das misturas físicas e dos complexos de inclusão.....	93
Figura 13. Perfis de dissolução do 5TIO1, das misturas físicas e dos complexos de inclusão.....	95

CAPÍTULO IV

Figura 1. Estrutura molecular do 5TIO1.....	102
Figura 2. Curvas de DTA das substâncias isoladas, da mistura física e dos complexos de inclusão na razão de $10^\circ\text{C min}^{-1}$	106
Figura 3. Curvas de TG e derivadas (DTG) das substâncias isoladas, da mistura física e dos complexos de inclusão na razão de $10\text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$	107
Figura 4. Padrões de difração de raio X das substâncias isoladas, da mistura física e dos complexos de inclusão.....	109
Figura 5. Espectro de Infravermelho com transformador de Fourier (IV-TF) das substâncias isoladas, da mistura física e dos complexos de inclusão.....	110
Figura 6. Perfis de dissolução do 5TIO1, da mistura física e dos complexos de inclusão.....	111

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1. Efeitos do 5TIO1 em camundongos no teste do labirinto em cruz elevado.....	50
Tabela 2. Efeitos do 5TIO1 em camundongos no teste claro-escuro.....	50
Tabela 3. Efeitos do 5TIO1 em camundongos no teste de campo aberto.....	53
Tabela 4. Efeitos do 5TIO1 em camundongos no teste do <i>rota rod</i>	53

CAPÍTULO II

Tabela 1. Determinação dos níveis de peroxidação lipídica no hipocampo, corpo estriado, cortex frontal e cerebelo de camundongos adultos tratados com 5TIO1 nas doses de 0,1; 1,0 e 10,0 mg kg ⁻¹	64
Tabela 2. Determinação do conteúdo de nitrito no hipocampo, corpo estriado, cortex frontal e cerebelo de camundongos adultos tratados com 5TIO1 nas doses de 0,1; 1,0 e 10,0 mg kg ⁻¹	64
Tabela 3. Atividade da enzima catalase no hipocampo, corpo estriado, córtex frontal e cerebelo de camundongos adultos tratados com 5TIO1 nas doses de 0,1; 1,0 e 10,0 mg kg ⁻¹	67
Tabela 4. Atividade da enzima superóxido dismutase no hipocampo, corpo estriado, córtex frontal e cerebelo de camundongos adultos tratados com 5TIO1 nas doses de 0,1; 1,0 e 10,0 mg kg ⁻¹	67

CAPÍTULO III

Tabela 1. Perda de massas das substâncias isoladas, das misturas físicas (MF) e dos complexos de inclusão (CI).....	91
Tabela 2. Eficiência de dissolução nos tempos 15 e 20 min do 5TIO1, das misturas físicas e dos complexos de inclusão.....	96

CAPÍTULO IV

Tabela 1. Perda de massas das substâncias isoladas, da mistura física e dos complexos de inclusão.....108

Tabela 2. Eficiência de dissolução nos tempos 15 e 20 min do 5TIO1, da mistura física e dos complexos de inclusão.....112

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5TIO1	2-[(2,6-diclorobenzilideno)amino]-5,6-diidro-4H-ciclopenta[b]tiofeno-3-carbonitrila)
ANOVA	análise de variância
ATR	reflectância total atenuada
CAT	catalase
CD	ciclodextrina
CDCl ₃	clorofórmio deuterado
DSC	calorimetria exploratória diferencial
DRX	difração de raios-X
DTA	análise térmica diferencial
DZP	diazepam
EL	evaporação/liofilização
ERNS	espécies reativas de nitrogênio
EROS	espécies reativas de oxigênio
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FLU	flumazenil
GABA	ácido gama-aminobutírico
HTS	<i>high throughput screening</i>
IFA	ingrediente farmacêutico ativo
i.p.	via intraperitoneal
IV-TF	espectroscopia na região de infravermelho com transformada de Fourier
MA	malaxagem
MEV	microscopia eletrônica de varredura
MF	mistura física
Mn-SOD	superóxido dismutase
NEBA	número de entradas nos braços abertos
P&D	pesquisa e desenvolvimento
PEBA	porcentagens de entradas para os braços abertos
PTBA	porcentagem de tempo de permanência nos braços abertos
RMN	Ressonância Magnética Nuclear

RMN ¹³ C	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de carbono treze
RMN ¹ H	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de próton
RNAm	ácido ribonucleico mensageiro
SBCD	sulfobutil éter β-ciclodextrina
SCB	Sistema de Classificação Biofarmacêutica
SD	<i>spray drying</i>
SNC	sistema nervoso central
TBARS	substâncias ácidas reativas com o ácido tiobarbitúrico
TG	termogravimetria
TG/DTG	termogravimetria/derivada termogravimétrica
TPBA	tempo de permanência nos braços abertos

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	20
2. OBJETIVOS	23
2.1. Objetivo Geral.....	23
2.2. Objetivos específicos.....	23
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	24
3.1. Crise na indústria farmacêutica.....	24
3.1.1. Síntese química e a produção de medicamentos.....	26
3.1.1.1. Síntese de derivados tiofênicos através da reação de Gewald.....	27
3.2. Pesquisa e desenvolvimento para transtornos psiquiátricos.....	28
3.2.1. Transtornos de ansiedade.....	29
3.2.2. Estresse oxidativo e os transtornos psiquiátricos.....	30
3.3. Estudos de pré-formulação.....	31
3.3.1. Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	32
3.3.2. Difração de raios-X (DRX).....	32
3.3.3. Infravermelho com Transformada de Fourier (IV-TF).....	33
3.3.4. Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	34
3.3.5. Análise térmica.....	35
3.4. Solubilidade – o principal entrave biofarmacêutico.....	36
3.4.1. Ensaios de dissolução.....	39
3.4.2. Ciclodextrinas para o aumento da solubilidade de fármacos.....	40
3.4.2.1. Diagrama de solubilidade de fases.....	42
4. CAPÍTULO I - Propriedades ansiolíticas de uma nova entidade química, 5TIO1	44
Resumo.....	44
Abstract.....	45
Introdução.....	45
Material e Métodos.....	47
Resultados e discussão.....	49
Conclusão.....	54
Referências.....	55

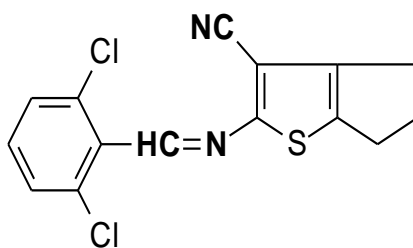
5. CAPÍTULO II - O estresse oxidativo em áreas cerebrais de camundongos é diminuído pelo 2-[(2,6-diclorobenzilideno) amino]-5,6-diidro-4H-ciclopenta [b] tiofeno-3-carbonitrila?	58
Resumo.....	58
Abstract.....	59
Introdução.....	59
Material e Métodos.....	61
Resultados e discussão.....	63
Conclusão.....	70
Referências.....	71
6. CAPÍTULO III - Estudo de pré-formulação de uma nova entidade química para o tratamento da ansiedade: caracterização físico-química, análise térmica e estudo compatibilidade	76
Resumo.....	76
Abstract.....	77
Introdução.....	77
Material e Métodos.....	79
Resultados e discussão.....	82
Conclusão.....	96
Referências.....	97
7. CAPÍTULO IV - Caracterização do complexo de inclusão 5TIO1/sulfobutil-éter-β-ciclodextrina	101
Resumo.....	101
Abstract.....	102
Introdução.....	102
Material e Métodos.....	103
Resultados e discussão.....	105
Conclusão.....	112
Referências.....	113
8. CONCLUSÃO	117
9. PERSPECTIVAS	118
10. REFERÊNCIAS	119
11. PRODUÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA	133

1. INTRODUÇÃO

A dinâmica operacional da indústria farmacêutica tem evoluído e se tornado cada vez mais desafiadora (MUNOS, 2009). A maturidade das agências reguladoras e do mercado consumidor levou a um aumento dos custos e do tempo para desenvolver novos medicamentos, diminuindo a produtividade da pesquisa e desenvolvimento (P&D), encurtando assim o prazo de vigência das patentes de novas moléculas farmacologicamente ativas (SOUSA et al., 2011). Atualmente, muitos pesquisadores discutem as múltiplas causas para esta crise e propõem possíveis soluções ao problema (GIORDANETTO, BOSTRÖM, TYRCHAN, 2011). No entanto, o objetivo a ser alcançado é singular – a inovação (PAUL et al., 2010); e um dos caminhos promissores para isto, trata-se em investir na síntese química, a qual atinge níveis de sofisticação e de execução sem precedentes (BENNANI, 2011).

Neste contexto, o 2-[(2,6-diclorobenzilideno) amino]-5,6-diidro-4H-ciclopenta[b]tiofeno-3- carbonitrila, denominado informalmente de 5TIO1 (Figura 1), é uma nova entidade química sintetizada por uma reação de duas etapas, partindo da reação de Gewald, seguida pela condensação com 2,6-diclorobenzaldeído (MENDONÇA-JÚNIOR et al., 2011). Atualmente, derivados tiofênicos como este tem atraído o interesse da indústria farmacêutica devido ao seu amplo espectro farmacológico como agentes antimicrobianos (ISLOOR, KALLURAYA, PAI, 2010), antivirais (RASHAD et al., 2010), antioxidantes (ABU-HANSEN, EL-SHEHRY, BADRIA, 2010), anti-inflamatórios (FAKHR et al., 2009), antinociceptivos (GONCALES et al., 2005), antipsicóticos (CALLIGARO et al., 1997), anticonvulsivantes (GHOGARE et al., 2010) e ansiolíticos (AMR et al., 2010).

Figura 1. Estrutura molecular do 5TIO1.



Fonte: Arquivo pessoal.

Em estudos preliminares, o 5TIO1 apresentou baixa toxicidade (dose letal mediana de 1240 mg.kg⁻¹) e atividade ansiolítica em ensaios neurofarmacológicos (SABINO, 2011), sendo este um efeito farmacológico relevante, visto que os transtornos de ansiedade são a classe de transtorno mental mais prevalente na população (KESSLER et al., 2009). Além disso, as opções farmacoterapêuticas disponíveis atualmente para essa patologia apresentam muitos efeitos adversos (RUDOLPH, KNOFLACH, 2011), justificando, assim, o desenvolvimento de pesquisas em busca de agentes mais seguros e eficazes para o tratamento da ansiedade (GOES, ANTUNES, TEXEIRA-SILVA, 2009).

No âmbito farmacotécnico, a principal característica do 5TIO1 é a baixa solubilidade em água (SABINO, 2011). Nesse caso, tal propriedade é interessante, já que, por ser hidrofóbico, pode aumentar as chances do 5TIO1 atravessar a barreira hematoencefálica (LIU, CHEN & SMITH, 2008) e, portanto, agir no seu sítio de ação. Entretanto, do ponto de vista biofarmacêutico, fármacos pouco solúveis destinados a formas farmacêuticas orais podem apresentar absorção limitada pela taxa de dissolução, comprometendo a sua biodisponibilidade e, conseqüentemente, a sua eficácia terapêutica (AMIDON et al., 1995; KAWAKAMI, 2012).

Logo, a eficácia farmacológica não é, por si só, a etapa decisiva na concepção de um fármaco. A transição da descoberta de uma NEQ para um novo produto farmacêutico começa com a investigação das propriedades físico-químicas do ingrediente farmacêutico ativo (IFA). Esta primeira fase é conhecida como pré-formulação (LAU, 2011). E tratando-se de moléculas com baixa solubilidade, essa etapa torna-se ainda mais crítica (STEGEMANN et al., 2007), visto que os parâmetros físico-químicos, em especial a solubilidade, ditam o sucesso de um candidato à fármaco (DI, FISH, MANO, 2012). Assim, a determinação do perfil de solubilidade de um fármaco e dos possíveis mecanismos de solubilização é a base para uma boa formulação (KAWABATA et al., 2011).

O desenvolvimento farmacotécnico dessas moléculas pouco solúveis em água acarreta significativos riscos tecnológicos e econômicos, apesar disso, a maioria dos candidatos a fármacos que demonstram atividades biológicas possuem este entrave biofarmacêutico (SAAL, PETEREIT, 2012). E, para garantir uma forma farmacêutica eficaz, existem várias estratégias para aumentar a taxa de dissolução de compostos lipofílicos sem diminuir seu potencial, por exemplo: micronização, formação de sais, solubilização com co-solventes, dispersões sólidas, extrusão por fusão, microemulsões, nanopartículas (MERISKO-

LIVERSIDGE, LIVERSIDGE, 2011). Uma ferramenta útil nesses casos é a complexação dessas moléculas com ciclodextrinas (CDs) (DAVIS, BREWSTER, 2004).

As ciclodextrinas constituem uma classe de excipientes farmacêuticos compostas por unidades de D-glucopirranose, que unidas originam estruturas cíclicas troncocônicas. A estrutura espacial cônica e a orientação dos grupos hidroxílicos para o exterior conferem a estes açúcares cíclicos propriedades físico-químicas únicas, sendo capazes de solubilizar-se em meio aquoso e ao mesmo tempo encapsular no interior da sua cavidade moléculas hidrofóbicas, formando, assim, os complexos de inclusão (LOFTSSON, DUCHÊNE, 2007; KURKOV, LOFTSSON, 2012). Dessa forma, a complexação do 5TIO1 com ciclodextrina pode ser uma excelente alternativa farmacotécnica para aumentar a solubilidade e, conseqüentemente, a biodisponibilidade deste, como já observado para diversos fármacos com baixa solubilidade em água.

Este trabalho visa, portanto, investigar os mecanismos farmacológicos do 5TIO1 como um candidato a fármaco ansiolítico e buscar estratégias para o seu desenvolvimento farmacotécnico. Para isso, essa pesquisa tem como objetivo avaliar as atividades psicofarmacológicas e realizar estudos de pré-formulação do 5TIO1, estes enfocando a melhoria da solubilidade e a análise da estabilidade/compatibilidade com ciclodextrinas. Dessa forma, esses estudos embasarão a fase inicial do desenvolvimento de um medicamento genuinamente nacional, seguro e eficaz para o tratamento da ansiedade.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar as atividades psicofarmacológicas e realizar estudos de pré-formulação do 5TIO1, estes enfocando a melhoria da solubilidade e a análise da estabilidade/compatibilidade com ciclodextrinas.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar o possível efeito ansiolítico do 5TIO1 em modelos experimentais em camundongos adultos e esclarecer o mecanismo de ação responsável pela ação ansiolítica utilizando os seguintes modelos: labirinto em cruz elevado (*plus maze*) e claro-escuro;
- Examinar a atividade antioxidante *in vitro* do 5TIO1 no hipocampo, corpo estriado, córtex frontal e cerebelo de camundongos adultos;
- Caracterizar físico-quimicamente o 5TIO1 e as ciclodextrinas naturais (α , β e γ), obter os complexos de inclusão 5TIO1-ciclodextrina no estado sólido e caracterizar compostos obtidos por meio diversas técnicas analíticas como o infravermelho, calorimetria exploratória diferencial, difração de Raios-X, microscopia eletrônica de varredura e perfil de dissolução.
- Caracterizar físico-quimicamente o 5TIO1 e a sulfobutil éter β -ciclodextrina (SBCD), obter os complexos de inclusão 5TIO1-SBCD no estado sólido por diferentes métodos e caracterizar compostos obtidos por meio diversas técnicas analíticas como o infravermelho, calorimetria exploratória diferencial, difração de Raios-X, microscopia eletrônica de varredura e perfil de dissolução.

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1. CRISE NA INDÚSTRIA FARMACÊUTICA

Na década de 70, o economista e sociólogo austríaco Joseph Alois Schumpeter, através do termo “*creative destruction*”, descreveu os efeitos da introdução e difusão das maiores descobertas e invenções tecnológicas na indústria e na economia. Este pensador passou a ter atenção mundial, quando conseguiu racionalizar que a inovação tecnológica era responsável pela alteração da paisagem industrial e pelo modo como o homem reproduz sua vida material (ACHILLADELIS, ANTONAKIS, 2001). Portanto, não é surpresa constatar que o fio de condutor de transformação da indústria farmacêutica é o setor de Pesquisa e Desenvolvimento (P&D), o qual também é seu fator de competitividade (BROWN, PETERSEN, 2010).

Atualmente o cenário desta indústria não é nada promissor, e alguns observadores já chegaram a dizer que o modo atual de descoberta e desenvolvimento de medicamentos está falido. Parece haver um entendimento de que os custos ascendentes para levar novos produtos ao estágio final de desenvolvimento, valor geralmente superior a US\$ 1 bilhão de dólares por produto, estão atingindo níveis insustentáveis para que se tenha um negócio lucrativo. Além disso, através de suas ações e orientação, organizações privadas e agências governamentais estão exercendo um controle cada vez maior sobre as prescrições e demandando maiores valores e benefícios em troca do dinheiro gasto em medicamentos. As expectativas dos pacientes em avanços terapêuticos também estão em ascensão, assim como sua influencia através de grupos de interesses dos pacientes. Nesse contexto, a indústria farmacêutica é desafiada a produzir produtos mais inovadores, que precisam ser entregues a um custo mais baixo que hoje (JOHNSTONE, PAIRAUDEAU, PETERSSON 2011).

Em suma, sem uma mudança na dinâmica no processo de descoberta e desenvolvimento de novos fármacos, a indústria farmacêutica de hoje não pode sustentar inovações suficientes para repor a perda de lucros devido a expirações de patentes dos seus produtos bem sucedidos – os chamados *blockbusters* (CAVALLA, MINHAS, 2010). Um aspecto chave que caracteriza esse problema é a diminuição de novas entidades químicas aprovados pelos órgãos reguladores por todo o mundo nos últimos 5 anos. A baixa produtividade da P&D e a enorme perda de lucros devido à competição dos genéricos na próxima década sugerem, portanto, que podemos estar perto de uma “era do gelo”

farmacêutica e de uma potencial extinção da indústria, pelo menos da indústria que existe hoje (PAUL et al., 2010).

Uma recente pesquisa internacional das 25 companhias mais inovadoras, abrangendo todos os tipos de empresas, não incluiu nenhuma companhia farmacêutica ou de biotecnologia. Entretanto, uma pesquisa das 20 companhias farmacêuticas ou de equipamentos médicos, endossada por Wall Street, mostrou uma forte correlação entre o valor de criação de um produto, medida pela capitalização de mercado, e sua inovação, medida pela superioridade clínica e mercadológica. Esses rankings são ditos como sendo uma demonstração clara do fim do modelo de negócios de sucesso, como é praticado atualmente por grandes companhias farmacêuticas, visto quão escassamente essas empresas são listadas como uma das 20 mais inovadoras. A partir desses relatórios, é evidente que as companhias mais inovadoras, e, assim, as que tem maior valor de criação, são aquelas que dominam a arte (e a ciência) de entender a necessidade em vez de criá-la. Mas, apesar da situação ser descrita como um verdadeiro caos, não podemos subestimar o potencial de reinvenção do mercado farmacêutico (BENNANI, 2011).

O foco principal da indústria farmacêutica é a aplicação do conhecimento científico e tecnológico proveniente da pesquisa básica até o descobrimento de novos medicamentos. Para isso, é necessário conhecimentos que abrangem as áreas médica, tecnológica e científica. Atualmente esse processo de inovação do setor de P&D mudou de sistemas fechados, internos à indústria, para um novo modo de sistemas abertos envolvendo uma gama de jogadores por toda cadeia produtiva (LOWMAN et al., 2012). E, nesse novo sistema, ressalta-se a contribuição do meio acadêmico que, através da transferência de tecnologia, impulsiona a produtividade da indústria farmacêutica (KHANNA, 2012).

Portanto, a estratégia e políticas industriais devem ser analisadas na dinâmica do processo de inovação (PERKMANN, WALSH, 2007). No caso do Brasil, embora com uma infraestrutura científica razoavelmente consolidada, o desenvolvimento tecnológico realizado é mínimo, restrito a algumas poucas empresas privadas nacionais e a algumas organizações públicas, chamando a atenção para a desproporção do esforço de desenvolvimento tecnológico realizado em relação ao tamanho do mercado. Apesar dos bons resultados apresentados pela indústria farmacêutica em termos de margem de lucro, as empresas instaladas no país, estrangeiras ou nacionais, não realizam atividades de P&D tecnológico. Na maior parte das vezes, nem sequer produzem o fármaco, limitando-se a formular e embalar medicamentos. Assim sendo, numa indústria caracteristicamente intensiva em P&D como a

farmacêutica, os gastos com essas atividades ficam, no Brasil, abaixo da média observada para a indústria como um todo (GADELHA, QUENTAL, FIALHO, 2003).

3.1.1. Síntese química e a produção de medicamentos

A síntese química está posicionada de maneira estratégica no coração da química, a ciência central, e sua importância está intimamente relacionada à nossa vida e à sociedade. Por exemplo, muitos dos medicamentos hoje em dia em uso são sintéticos e muitos dos de amanhã serão concebidos e produzidos por químicos sintéticos. Assim, a síntese química está associada a um conjunto de encargos cruciais ao futuro da humanidade, não só com respeito a saúde, necessidades materiais e econômicas de nossa sociedade, mas também ao entendimento da matéria, a suas transformações químicas e a vida, ao nível mais elevado de que é capaz a mente humana (COMASSETO, SANTOS, 2008).

Combinando elementos e componentes, químicos orgânicos da indústria farmacêutica sintetizam fármacos que preservam, prolongam e melhoram vidas. Assim, sem esse trabalho revolucionário de síntese química, nossas vidas seriam hobbesianas: desagradável, bruta e curta. Somente hoje, a ciência e medicina se deram conta da introspecção de Paracelso de que produtos químicos curam doenças. Dessa forma, diferentes substâncias, se desenvolvidos como fármacos, tratam diversas doenças; visto que a estrutura química determina as propriedades responsáveis pela atividade biológica e, desse modo, pela utilidade médica. Propriedades físicas e químicas definem a natureza, âmbito e o começo das ações biológicas dos fármacos. Eles também governam a duração, intensidade, mecanismo e reversibilidade do comportamento do fármaco (FRIARY, 2000).

Dessa forma, o papel desempenhado pela química orgânica na indústria farmacêutica continua a ser um dos principais fatores no processo de descoberta de medicamentos (MACCOSS, BAILLIE, 2004). Essas moléculas “desenhadas” e sintetizadas em laboratórios de química tem se mostrado valiosas no tratamento de doenças e constituem muitos medicamentos comercializados hoje. Consequentemente, seus efeitos na pesquisa biomédica durante a última década foram dramáticos, provendo tanto novas ferramentas para o entendimento de sistemas fisiológicos como também permitindo uma transição didática da biologia para a medicina. Logo, a relação sinérgica entre o planejamento e a metodologia da síntese orgânica é ainda mais significante, quando os químicos sintéticos enfrentam esses novos desafios (PORS et al., 2009).

O desenvolvimento de fármacos eficazes, no âmbito da síntese química, implicam pelo menos três estágios: 1) a descoberta, usualmente requerendo a síntese e o *screening* de compostos candidatos, 2) a otimização, que requer a análise de variantes estruturais, 3) e a manufatura, que requer uma produção em larga escala de forma eficiente. Pesquisas nessa área também revelaram a importância de utilizar compostos para serem modificados durante os estudos de identificação do alvo farmacológico. Após essas etapas, procede-se a manufatura desse componente para distribuição nas investigações pré-clínicas e clínicas. Coletivamente, esses pontos constituem um desafio substancial para o campo de síntese orgânica (NIELSEN, SCHREIBER, 2008).

3.1.1.1. *Síntese de derivados tiofênicos através da reação de Gewald*

O tiofeno é um composto heterocíclico aromático de cinco membros onde o heteroátomo é o enxofre. O alemão Victor Meyer, em 1883, após uma falha no teste para identificação de benzeno descobriu esse composto com sua fórmula molecular confirmada como C_4H_4S . Em seguida, Carl Paal e Jacob Volhard (1885) realizaram simultaneamente a síntese de derivados de tiofeno, o que contribuiu muito para o estudo desse novo composto (CAMERON, 1949). Atualmente, estes heterocíclicos altamente substituídos que contêm enxofre são bastante utilizados em estruturas de fármacos (PUTEROVÁ, KRUTOŠÍKOVA, VÉGH, 2009).

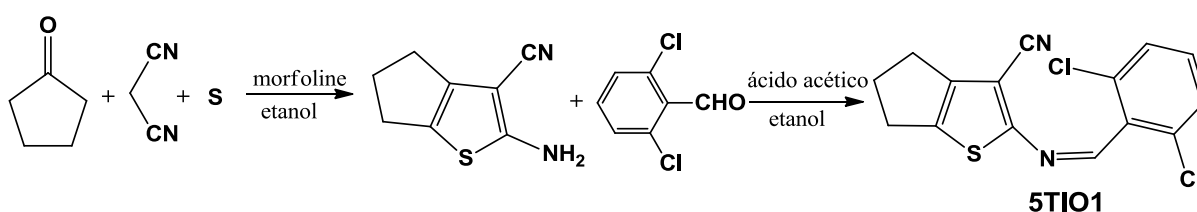
Os derivados tiofênicos têm atraído a atenção durante muitas décadas, principalmente por suas diferentes aplicações na indústria farmacêutica, na agricultura e no setor de corantes (BARNES et al., 2006). Para indústria farmacêutica podemos destacar o uso desses derivados como agentes antimicrobianos (ISLOOR, KALLURAYA, PAI, 2010), antivirais (RASHAD et al., 2010), antioxidantes (ABU-HANSEN, EL-SHEHRY, BADRIA, 2010), anti-inflamatórios (FAKHR et al., 2009), antinociceptivos (GONCALES et al., 2005), antipsicóticos (CALLIGARO et al., 1997), anticonvulsivantes (GHOGARE et al., 2010) e ansiolíticos (AMR et al., 2010).

Em especial, os 2-amino-tiofenos substituídos podem ser obtidos através da reação de Gewald, que consiste na condensação de multicomponentes de uma cetona ou aldeído acíclico com um composto metilênico ativo em meio básico e enxofre elementar na presença de uma base (SRIDHAR et al., 2007). Muitas modificações desta reação foram desenvolvidas recentemente, incluindo o uso de suporte sólido, irradiação de micro-ondas combinada com

suporte de polímero insolúvel, ácido de Lewis como catalisador, líquido iônico, L-prolina, entre outros (HUANG et al., 2011).

Neste contexto, o 5TIO1 é uma nova entidade química derivada do 2-aminotiofeno, sintetizada por uma reação de duas etapas (Figura 1), partindo da reação de Gewald, seguida pela condensação com 2,6-diclorobenzaldeído (MENDONÇA-JÚNIOR et al., 2011). Análogos do 5TIO1 mostraram atividade antifúngica (SCOTTI et al., 2012) e antiproliferativa (SOUZA et al., 2012). E, em estudos recentes, o 5TIO1 mostrou atividade ansiolítica em modelos animais (SABINO, 2011), indicando o potencial uso dessa substância em prol da saúde humana.

Figura 1. Via sintética do 5TIO1.



Fonte: Arquivo pessoal.

3.2. PESQUISA E DESENVOLVIMENTO PARA TRANSTORNOS PSIQUIÁTRICOS

Transtornos psiquiátricos, como depressão, ansiedade e esquizofrenia são patologias devastadoras e difundidas mundialmente. Apesar da necessidade de melhores medicamentos psiquiátricos, as taxas de sucesso na descoberta de fármacos para distúrbios no Sistema Nervoso Central (SNC) são menores que as outras áreas terapêuticas (KOKEL, PETERSON, 2008). A P&D de novos medicamentos para transtornos psiquiátricos encontra-se, portanto, em um estado de declínio. Mesmo com a crescente prevalência e o aumento nos custos na saúde pública, o processo de desenvolvimento imprevisível e caro desses fármacos, levou a uma diminuição nos investimentos públicos e privados para esta área (CHANDLER, 2012). Isso se traduz em mais de 30 anos sem uma nova entidade química com um novo mecanismo de ação no mercado (FIGIBER, 2012).

Historicamente, a maioria dos compostos com utilidade para o SNC foi notada por pesquisadores que observaram seu efeito em modelos animais ou durante estudos clínicos com outros propósitos. Portanto, muitos agentes do SNC foram descobertos com pouco ou

nenhum entendimento sobre seus receptores, e os modelos em animais, apesar de suas limitações, continuam sendo um componente essencial na descoberta de novos fármacos. Na verdade, a interação entre a abordagem no alvo e a farmacometria irá aumentar o universo de compostos com perfil para atuarem no SNC. Essa estratégia tira proveito dos avanços em curso da biologia molecular, e ao mesmo tempo incentiva uma descoberta casual (*serendipity*) de novos agentes, que tem sido a força motriz para a descoberta de fármacos para o SNC (ENNA, WILLIAMS, 2009).

O principal fator para a redução nos investimentos em pesquisa de novos fármacos para transtornos psiquiátricos trata-se da incerteza na predição da eficácia clínica desses candidatos durante os estudos pré-clínicos (SCHOEPP, 2011; SARTER, TRICKLEBANK, 2012). Para transpor tal dificuldade, Mei e colaboradores (2012) sugerem o uso de estratégias *in silico* para auxiliar na descoberta de novos alvos terapêuticos, decifrando o mecanismo da doença, e para facilitar a triagem de novos compostos para o SNC. No entanto, os modelos animais continuam sendo uma ferramenta formidável para investigar a etiologia, o curso e o potencial tratamento de uma doença (REMINGTON, 2009; PRETI, 2011). Assim, os modelos em animais proporcionam informações valiosas em todos os estágios da P&D, sem as quais seria muito improvável identificar qualquer progresso terapêutico para tratar transtornos psiquiátricos (MCARTHUR, 2010).

3.2.1. Transtornos de ansiedade

A ansiedade consiste em um estado de tensão provocado em antecipação a uma ameaça ou a uma potencial ameaça. As sensações de ansiedade são uma parte normal da experiência humana, mas a ansiedade excessiva ou inadequada pode se tornar uma doença (GROSS, HEN, 2004; WU, KIM, ZHUO, 2008). A ansiedade normal é uma resposta vivenciada diante de uma ameaça conhecida, externa, definida ou de origem não conflituosa. Já a patológica, é uma resposta a uma ameaça desconhecida, interna, vaga ou de origem conflituosa. Essa desordem é caracterizada por um sentimento difuso, desagradável e vago de apreensão, frequentemente, acompanhado por sintomas autonômicos, como cefaleia, perspiração, palpitações, aperto no peito e leve desconforto abdominal (KEELEY, STORCH, 2009). No âmbito social, os sintomas dos transtornos da ansiedade sobrecarregam o sistema de saúde e inabilita a produtividade do trabalhador (GONÇALVES, BYRNE, 2012).

Segundo o Instituto Nacional de Saúde Mental (NATIONAL INSTITUTE OF MENTAL HEALTH, 2009) dos Estados Unidos da América, os transtornos de ansiedade

atingem 40 milhões de americanos acima de 18 anos (cerca de 18%) em um ano. O custo total anual com esse distúrbio foi estimado entre 43,3 a 46,6 bilhões de dólares, dos quais mais de 75% pode ser atribuído à morbidade, mortalidade e perda da capacidade produtiva (KESSLER et al., 2005; OLATUNJI, CISLER, DEACON, 2010). Na Europa, dados epidemiológicos revelam 6,6% para prevalência média de vida relativo a essa patologia (STEIN, 2009). No Brasil, um estudo populacional encontrou índices de prevalência dessa patologia de 4,6% em crianças e 5,8% entre os adolescentes (FLEITLICH-BILYK, GOODMAN, 2004).

Existem tratamentos eficazes para os transtornos de ansiedade, como os fármacos ansiolíticos e terapia cognitivo comportamental, mas muitos pacientes permanecem sem tratamento, devido à experiência de efeitos adversos ou por não obterem o controle de todos os sintomas da ansiedade. Logo, justifica-se a busca por novos fármacos ansiolíticos (ERNST, 2006; GOES, ANTUNES, TEXEIRA-SILVA, 2009). Para ilustrar os inconvenientes dos fármacos já existentes, há alguns exemplos: (1) os benzodiazepínicos, como diazepam e clonazepam, provocam sedação, amnésia, podem causar abuso e/ou dependência, síndrome de abstinência e interações com agentes depressores; (2) a buspirona pode se mostrar ineficaz em algumas situações, além da possível demora para o início da ação e baixa satisfação por parte dos pacientes; (3) os antidepressivos, como venlafaxina, paroxetina e imipramina, têm alta incidência de não-adesão ao tratamento, além de causarem disfunção sexual; (4) os antipsicóticos, podem promover o desenvolvimento de parkinsonismo e hiperprolactinemia, além de apresentar riscos em longo prazo, como discinesia tardia e síndromes metabólicas (FAUSTINO, ALMEIDA & ANDREATINI, 2010).

3.2.2. Estresse oxidativo e os transtornos psiquiátricos

As células do corpo humano estão constantemente expostas a ataques de natureza oxidativa (BOUAYED, BOHN, 2010). Há provas irrefutáveis de que o estresse oxidativo está envolvido na patogênese de muitas doenças, incluindo os transtornos psiquiátricos, bem como câncer (SANTOS et al., 2009). Estas patologias têm sido associadas a alterações nas espécies reativas de oxigênio (EROS) (SEDELNIKOVA et al., 2010), espécies reativas de nitrogênio (ERNS) e óxido nítrico (NO) (AGUIAR et al., 2012).

Em condições normais, existe um equilíbrio entre o estresse oxidativo e nitrosativo, e o mecanismo de defesa antioxidante. O efeito nocivo dos radicais livres ao organismo induz vários mecanismos de defesa (VALKO et al., 2007; NOBRE-JÚNIOR, FONTELES,

FREITAS, 2009; AGUIAR et al., 2012), dentre eles a remoção catalítica através das enzimas catalase, superóxido dismutase, peroxidases e proteínas antioxidantes tiol-específicas (LIMÓN-PACHECO, GONSEBATT, 2009).

O estresse oxidativo tem sido um mecanismo patogênico comum associado a muitos dos principais transtornos psiquiátricos, como a ansiedade, devido à vulnerabilidade oxidativa intrínseca do cérebro, visto que o Sistema Nervoso Central exerce elevada atividade energética mitocondrial dependente de oxigênio, sendo que essa atividade está relacionada à alta concentração de ferro livre e lipídios poli-insaturados e ao baixo nível de enzima antioxidantes (NG et al., 2008). Crescentes evidências sugerem correlação entre o desequilíbrio do mecanismo de defesa antioxidante e a ansiedade (SOUZA et al., 2007; RAMMAL et al., 2008; BOUAYED, RAMMAL, SOULIMANI, 2009; SALIM et al., 2010a; SALIM et al., 2010b; SALIM et al., 2011; VOLLERT et al., 2011). Portanto, os efeitos benéficos dos antioxidantes contra vários transtornos e doenças induzidas pelo estresse oxidativo têm recebido muita atenção (NIKI, 2010), impulsionando o desenvolvimento de novos fármacos que podem, eventualmente, exercer ações neuroprotetoras (MILITÃO, FERREIRA, FREITAS, 2010; VAUZOUR, 2012).

3.3. ESTUDOS DE PRÉ-FORMULAÇÃO

Os estudos de pré-formulação começam assim que uma nova entidade química demonstra uma potencial atividade farmacológica em modelos animais, que justificam uma futura avaliação em humanos (SWAMIVELMANICKAM et al., 2009; GOPINATH, NAIDU, 2011). Esses estudos, realizados nas etapas de pesquisa pré-clínica e clínica de fármacos inovadores, e que visam acumular o máximo de informação sobre o comportamento das novas entidades químicas, constituem um valioso instrumento para traçar estratégias de desenvolvimento racional de formulações mais eficazes e seguras e, portanto, com maiores possibilidades de êxito. Diversos aspectos concernentes à substância ativa, como a biodisponibilidade a partir da forma farmacêutica, ou ao medicamento, como seu prazo de validade, e até mesmo seu processamento industrial são afetados pelas propriedades físico-químicas dos fármacos (MAXIMIANO et al., 2010).

Assim, a capacidade de entregar o medicamento ao paciente de uma maneira segura e eficaz depende significativamente da caracterização do fármaco no seu estado sólido. Isso porque dependendo da natureza química e estrutura tridimensional da molécula, um composto

pode existir no estado amorfo ou em diversos estados cristalinos. E essas propriedades do estado sólido, por sua vez, influenciam na solubilidade e na estabilidade do fármaco e ditam a melhor abordagem farmacotécnica a ser tomada para cada tipo de forma farmacêutica (GARDNER, WASH, ALMARSSON, 2004).

A caracterização físico-química do princípio ativo é, portanto, o foco principal dos estudos de pré-formulação (LAU, 2011). Além disso, a avaliação de possíveis incompatibilidades entre o fármaco e os excipientes é uma parte importante desses estudos, visto que os excipientes devem fornecer propriedades farmacotécnicas úteis e podem também influenciar na estabilidade da formulação (BHARATE, BHARATE, BAJAJ, 2010). Portanto para proceder tais investigações, o analista dispõe de várias técnicas analíticas, como por exemplo: ressonância magnética nuclear, difração de raios-X, análise térmica, infravermelho e microscopia eletrônica de varredura.

3.3.1. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A RMN é uma técnica analítica que permite obter informação estrutural e dinâmica sobre a matéria, e que se baseia na detecção das propriedades magnéticas dos núcleos. Dentre as técnicas de caracterização de fármacos, a RMN destaca-se notadamente em estudos para elucidação estrutural, determinação de quiralidade, correlações estrutura-atividade ou estudos conformacionais de proteínas (HOLZGRABE, DIEHL, WAWER, 1998; AGUIAR, GEMAL, GIL, 1999). Para o estado sólido, as espectroscopias de RMN no estado sólido é extremamente útil na caracterização da forma cristalina (NEWMAN, BYRN, 2003).

3.3.2. Difração de raios-X (DRX)

Entre as várias técnicas experimentais disponíveis para a identificação de formas sólidas, incluindo polimorfos, solvatos, sais, co-cristais e formas amorfas, a DRX se destaca e é geralmente aceita como padrão ouro; embora, isso não signifique que as outras técnicas devam ser ignoradas no estudo de formas sólidas. A DRX tem aplicações por todo o processo de desenvolvimento de fármacos, desde os estudos de descoberta até o controle de qualidade dos lotes. A sua utilidade torna-se evidente quando se considera a relação direta entre o padrão medido da difração de raios X e a ordem estrutural e/ou desordem do sólido. Dessa forma, a DRX fornece informação sobre a estrutura do material subjacente, quer ele exiba ordem de amplo alcance como em materiais cristalinos ou baixo alcance como em materiais vítreos ou amorfos. Essa informação é única para cada estrutura - seja cristalina ou amorfa - e

codificada na singularidade do padrão DRX coletado em uma amostra bem preparada do material em análise (IVANISEVIC, MCCLURG, SCHIELDS, 2010).

A técnica consiste na análise de uma amostra em pó com um parâmetro típico que representa a “*plotagem*” da intensidade contra o ângulo da difração (2θ). O valor 2θ é usado baseando-se na configuração do instrumento. Tal gráfico pode ser considerado uma impressão digital da estrutura de cristal e é útil para determinar a similaridade cristalográfica das amostras por padrão de comparação. Um material cristalino exibirá picos indicativos das reflexões dos planos atômicos específicos; estes padrões são representativos da estrutura, mas não dão informação posicional dos átomos na molécula. Um pico será exibido para todos os planos de repetição com o mesmo espaçamento. Ao contrário, uma amostra amorfa exibirá uma protuberância larga no padrão chamada de halo amorfo (NEWMAN, BYRN, 2003).

Portanto, a difratometria de raios X de pós é uma técnica eficaz para a identificação de fármacos sólidos cristalinos (PHADNIS, CAVATUR, SURYANARAYANAN, 1997). Além disso, essa técnica combina especificidade com um alto nível de exatidão para a caracterização dos fármacos sólidos e é um método especialmente útil para descrever o possível comportamento polimórfico de fármacos. Igualmente permite a identificação simultânea de ingredientes ativos múltiplos em formulações farmacêuticas diferentes (KOUNDOURELLIS et al., 2000).

3.3.3. Infravermelho com Transformada de Fourier (IV-TF)

A região do espectro eletromagnético correspondente ao infravermelho se estende de aproximadamente $0,75\mu\text{m}$ até quase 1mm , mas o segmento mais frequentemente utilizado pela indústria farmacêutica está situada entre $2,5$ e $25\mu\text{m}$ (4000 a 400cm^{-1}), conhecido como região fundamental ou infravermelho médio (DRUY, 2004). O espectro infravermelho de uma substância é considerado uma de suas propriedades físico-químicas mais características e, portanto, através das bandas dos grupos funcionais, essa técnica é capaz de identificar compostos. Além disso, pode ser utilizadas na análise quantitativa de misturas de compostos através da intensidade da banda característica de um composto da amostra (BRITTAIN et al., 1991).

A espectroscopia no infravermelho trata das variações de energia molecular associadas às transições vibracionais devido à absorção ou emissão de um fóton, que não é suficientemente energético para causar uma transição eletrônica. Para que ocorra absorção por parte de uma molécula é necessário que a radiação incidente na molécula provoque a

excitação dos modos vibracionais de modo que a sua energia corresponda à diferença de dois níveis energéticos vibracionais. Assim, as absorções ocorrem num determinado comprimento de onda, que corresponda à energia que permite a transição (LIMA et al., 2009).

Estas vibrações são quantizadas e, quando ocorrem, os compostos absorvem energia IV em certas regiões do espectro. Nas vibrações, as ligações covalentes comportam-se como se fossem pequenas molas unindo os átomos. Quando os átomos vibram, só podem oscilar com certas frequências, e as ligações sofrem várias deformações. Quando a ligação absorve energia, ela sofre alterações e, ao retornar ao estado original, libera essa energia, que então é detectada. Portanto, para que uma molécula absorva radiação no infravermelho é necessário que exista alteração do momento de dipolo elétrico como consequência de seu movimento vibracional ou rotacional resultando em absorção da energia radiante (SILVERSTEIN et al., 1979).

A identificação da estrutura do material também é uma qualidade do ensaio IV-TF. Recentemente, a espectroscopia na região do infravermelho médio era pouco usada em análises quantitativas, devido a algumas limitações inerentes. Porém, a utilização da transformada de Fourier, aliada ao desenvolvimento dos microprocessadores digitais e de técnicas computacionais avançadas, permitiu a análise de misturas complexas, como fármacos, sem a necessidade de qualquer separação prévia de seus componentes (SOUZA, FERRÃO, 2006). Uma tecnologia que tem tido grande impacto na preparação de amostra para a análise no infravermelho é o dispositivo de reflectância total atenuada (ATR) que permite uma boa qualidade do espectro num curto espaço de tempo; esta metodologia é, inclusive, indicada pela Farmacopéia Americana (SMITH, SELLORS, 2011).

3.3.4. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A capacidade de visualizar a morfologia de fármacos no estado sólido através de MEV ajuda a dar suporte para o desenvolvimento e a produção de medicamentos (NICHOLS, 2011), constituindo uma ferramenta importante na detecção de mudanças cristalinas em decorrência de variações no processo de síntese ou mesmo do processamento farmacêutico, que podem vir a formar outras formas polimórficas do fármaco (RIBEIRO et al., 2008). Além disso essa é uma técnica versátil, amplamente distribuída e de fácil interpretação (JOY, 1997).

3.3.5 Análise térmica

Análise térmica é um grupo de técnicas em que a propriedade física ou química de uma substância é monitorada em função do tempo ou temperatura, enquanto a temperatura da amostra, sob uma atmosfera específica, é submetida a uma programação controlada. Essas técnicas são bem estabelecidas nos laboratórios de pesquisa das indústrias farmacêuticas, visto que mudanças na temperatura e umidade podem ocorrer durante o ciclo de produção e a armazenagem do produto, logo, mudanças no estado sólido podem ter consideráveis efeitos na atividade, na toxicidade e na estabilidade dos medicamentos (GIRON, 2002).

A calorimetria diferencial de varredura (DSC) é utilizada para várias aplicações na indústria farmacêutica, principalmente, para determinação da pureza. O uso dessa técnica possui várias vantagens: não necessita de um padrão de referência correspondente, o tempo de análise é curto, a quantidade necessária de amostra é mínima (1-5 mg), reprodutibilidade e não é necessário o preparo da amostra. Além disso, a seletividade do método é melhor, porque a detecção das impurezas é baseada no fato das impurezas eutéticas diminuírem o ponto de fusão de sistemas eutéticos. Portanto, com esse princípio termodinâmico, o analista não ficará preocupado em utilizar um detector apropriado para os tipos de impurezas presentes (MATHKAR et al., 2009; GAO, DING, HU, 2011).

Através da DSC pode-se determinar a faixa de fusão de uma substância e, baseando-se na equação de van't Hoff (equação 1) é possível determinar a fração molar de impurezas contidas neste material (VAN DOOREN, MÜLLER, 1984). Dessa forma, quando uma substância é submetida a um aquecimento, o conjunto das impurezas é fundido formando no sistema uma fase líquida; acima desta temperatura, a fase sólida consiste somente em substância pura. Logo, quando a fase eutética das impurezas é formada, a temperatura decresce fazendo com que a fração molar das impurezas na fase líquida seja constantemente diminuída desde que a substância pura dissolva na solução eutética (RODRIGUES et al., 2005).

$$T_f = T_0 - x_2/F \times (RT_0^2/\Delta H_f) \text{ (Equação 1)}$$

onde T_f representa a temperatura de fusão das impurezas no processo de fusão (K); T_0 é o ponto de fusão do maior componente (K); x_2/F é a fração molar das impurezas na fase líquida; R é a constante dos gases ($8,314 \text{ J mol}^{-1}\text{K}^{-1}$); ΔH_f é a fusão do maior componente (J mol^{-1}).

Além do cálculo da pureza, a DSC é relevante para investigar o estado sólido de uma nova entidade química. Esse estudo é essencial na pré-formulação, porque uma substância pode ter mais de uma forma; incluindo desde modificações físicas como formas cristalinas e

amorphas, modificações químicas como a formação de solvatos e modificações estruturais como os polimorfos (SINGH, 1998). Em especial, polimorfismo é muito comum dentre as substâncias farmacêuticas e a instabilidade termodinâmica dos polimorfos podem impactar na processabilidade, estabilidade e biodisponibilidade (LI, KIANG, JONA, 2009).

Polimorfismo pode ser definido como a habilidade de um composto cristalizar em duas ou mais fases cristalinas com arranjos e/ou conformações moleculares diferentes, nas unidades dos cristais (HALEBLIEN, MCCRONE, 1969). Baseado nas diferenças termodinâmicas, os polimorfos são classificados como enantiotrópico ou monotrópico, dependendo se uma forma pode ou não se converter em outra reversível. Em sistemas enantiotrópicos, uma transição reversível entre polimorfos é possível numa temperatura de transição definida abaixo do ponto de fusão. Em sistemas monotrópicos, nenhuma transição é observada entre os polimorfos abaixo do ponto de fusão (VIPPAGUNTA, BRITTAIN, GRANT, 2001).

A termogravimetria (TG) é uma técnica de análise térmica na qual a mudança da massa da amostra é medida em função da temperatura ou tempo. Na derivada termogravimétrica (DTG), a curva resultante é a primeira derivada da curva TG, dando uma série de picos, em vez de uma curva, facilitando a interpretação (ARAÚJO et al., 2003). A literatura relata inúmeros estudos cinéticos baseados em TG com o intuito de elucidar mecanismos de reação no estado sólido, tais como: decomposição térmica, oxidação, redução, cristalização e outros (RODRIGUES et al., 2005). Portanto, a comparação dos registros dos resultados da TG e do DSC, obtidos em condições idênticas, podem ajudar na interpretação dos processos térmicos, norteados as aplicações práticas dessas informações no âmbito farmacotécnico (FIESE; HAGEN, 2001).

3.4. SOLUBILIDADE – O PRINCIPAL ENTRAVE BIOFARMACÊUTICO

A baixa solubilidade das novas entidades químicas emerge como um grande problema na descoberta e desenvolvimento de fármacos. Componentes pouco solúveis não só criam problemas em ensaios *in vivo* e *in vitro* na fase descoberta de fármacos, mas também coloca um fardo farmacotécnico significativo no desenvolvimento de medicamentos. Além disso, moléculas com solubilidade insuficiente tem um maior risco de insucessos e elevam os custos no setor de P&D. Apesar de tantas dificuldades, estudos recentes mostraram que 75% dos candidatos do desenvolvimento de fármacos têm baixa solubilidade e são pertence às classes

II e IV do Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB). Logo, há um aumento significativo em novas entidades químicas insolúveis quando comparado às drogas comercializadas atualmente (DI, FISH, MANO, 2012). Por isso, a determinação do perfil de solubilidade e dos possíveis mecanismos de solubilização são fundamentais nos estudos de pré-formulação (KAWABATA et al., 2011).

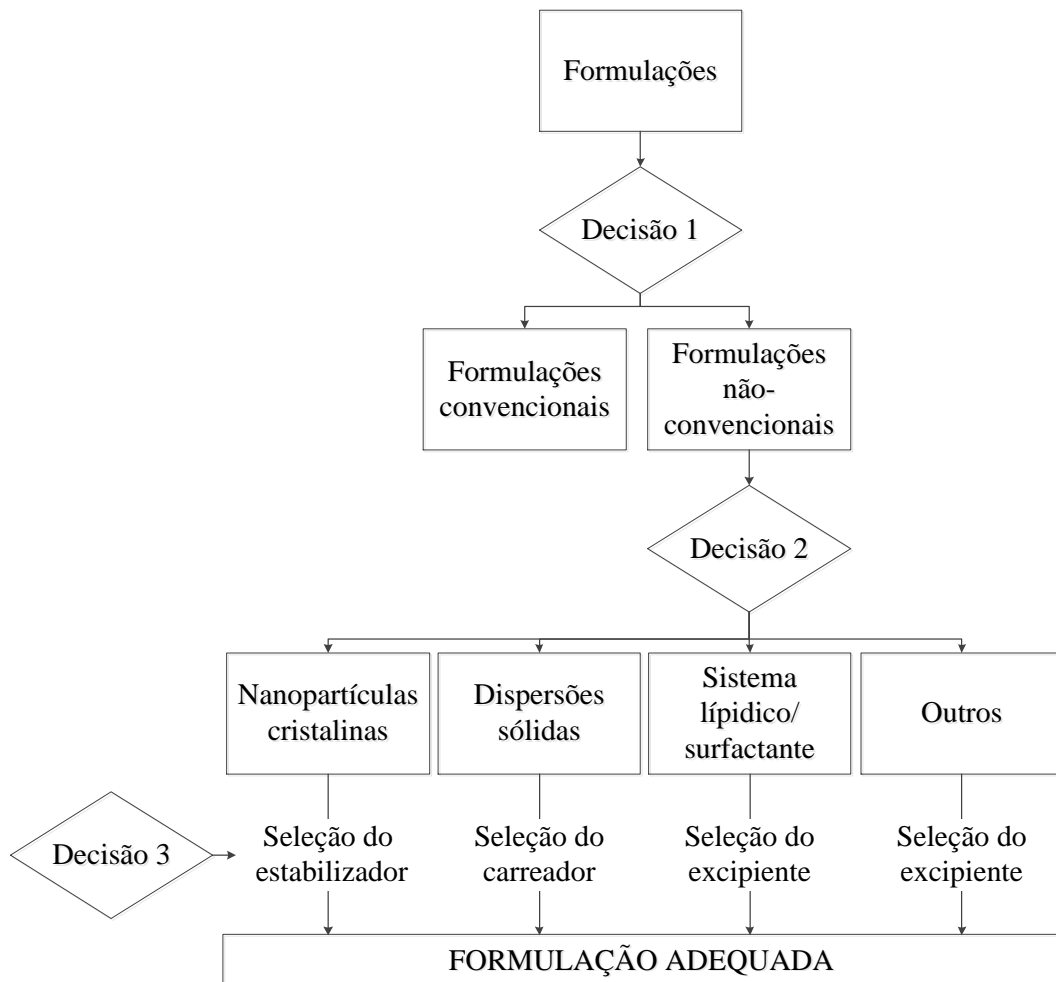
O aumento de componentes de baixa solubilidade em portfólios de descoberta da indústria farmacêutica está associado a vários fatores. Uma das principais causas deve-se ao fato do setor P&D de várias indústrias utilizarem como triagem dos seus compostos a técnica de *high throughput screening* (HTS). Entretanto, essa técnica possui o viés de selecionar compostos com baixa solubilidade; isso porque os *hits* (termo em inglês para designar um novo ligante ou composto bioativo) desses programas tendem a identificar moléculas com pesos moleculares altos e de maior lipoficidade, no sentido de aumentar a potência e seletividade farmacológica para determinados receptores (LIPINSKI, 2000; LIPINSKI et al., 2001).

Os pesquisadores do setor de P&D, ao prospectarem a via de administração oral para um candidato a fármaco de baixa solubilidade, deparam-se com um parâmetro biofarmacêutico crucial – a absorção. Isso porque a solubilidade aquosa de um fármaco é um determinante crítico de sua taxa de dissolução, que por sua vez, resulta na baixa biodisponibilidade. Nesses casos, o aumento da dose seria necessário até que a concentração do fármaco no sangue atingisse a concentração terapêutica, mas, ao mesmo tempo, essa estratégia pode causar toxicidade tóxica no trato gastrointestinal, diminuindo a aderência terapêutica. Além disso, esse aumento pode resultar em pó com propriedades reológicas inapropriadas, como uma fluidez ruim e tendência a formar grumos durante a granulação e manufatura de comprimidos. Ainda, os custos de manufatura aumentariam já que uma grande quantidade de princípio ativo seria necessária. Portanto, o desenho da formulação com alta dose do fármaco é geralmente difícil e é racional o uso de estratégias farmacotécnicas para a otimização da solubilidade (KAWABATA et al., 2011).

Critérios como área terapêutica, via de administração, dose, tamanho da forma farmacêutica, compatibilidade de excipientes, validade, processo produtivo e situações referentes à propriedade intelectual podem influenciar na seleção da formulação. Uma sequência de passos (Figura 2) pode ser usada para representar o processo de seleção da formulação para componentes que tem uma baixa biodisponibilidade. O primeiro passo está associado à decisão da natureza da formulação (convencional ou não), que dita se o

desenvolvimento produtivo será padrão ou não. Para este passo, considera-se formulação convencional como sendo um conjunto de excipientes e processos produtivos que, geralmente, não pretendem alterar a absorção do princípio ativo. Nesse caso, pode-se citar operações comuns como moagem ou adição de agentes desintegrantes e/ou molhantes, mesmo que possam melhorar a biodisponibilidade do fármaco de forma indireta. Assim, para compostos que requerem uma abordagem não-convencional, uma segunda decisão refere-se a classe de formulação apropriada e, em seguida, a respectiva seleção do excipiente (BRANCHU et al., 2007).

Figura 2. Representação do processo de seleção de formulação para compostos com potencial problema de absorção.



Fonte: Modificado de BRANCHU e col. (2007).

Avanços nas ciências farmacêuticas têm levado ao estabelecimento de um número de abordagens para tratar esses problemas com solubilidade aquosa. Essas estratégias para

melhorar e maximizar a taxa de dissolução incluem micronização para produzir uma área de superfície maior para a dissolução, o uso de formas salinas com perfis de dissolução melhorados, solubilização de fármacos em co-solventes e soluções micelares, complexação com ciclodextrinas e o uso de sistemas lipídicos para a entrega de fármacos lipofílicos. Embora essas técnicas tenham se mostrado efetivas em melhorar a biodisponibilidade oral, o sucesso dessas abordagens algumas vezes dependem da natureza físico-química específica das moléculas em estudo. Algumas vezes, para drogas com solubilidade aquosa muito baixa, o aumento alcançado na taxa de dissolução é insuficiente para prover um aumento adequado no aumento da biodisponibilidade (BLAGDEN et al., 2007).

3.4.1. Ensaio de dissolução

A absorção de fármacos a partir de formas farmacêuticas sólidas administradas por via oral depende da desintegração da forma farmacêutica, da dissolução ou solubilização do fármaco em condições fisiológicas e de sua permeabilidade através das membranas do trato gastrointestinal. Devido à natureza crítica dos dois primeiros, a dissolução *in vitro* pode ser relevante para prever o desempenho *in vivo* (FDA, 1997; BRASIL, 2004). Tratando-se de fármacos pouco solúveis em água, o desenvolvimento de testes de dissolução é um desafio para as indústrias e para as agências que as regulam (GOWTHAMARAJAN, SINGH, 2010).

Há quase um século, a via oral é considerada a principal via de administração de medicamentos. Entretanto, a mais ou menos 50 anos os pesquisadores perceberam a importância do processo de dissolução na biodisponibilidade dos fármacos (DOKOUMETZIDIS, MACHERAS, 2006). Um dos principais estudos nessa área foi realizado por Noyes e Withney, os quais propuseram uma equação que descreve que a velocidade de dissolução de um sólido é proporcional ao seu coeficiente de difusão e à diferença de concentração entre a camada saturada de fármaco e a concentração da solução (NOYES, WITHNEY, 1987).

A dissolução pode ser definida, num sentido restrito, como o processo pelo qual uma substância sólida entra no solvente para formar uma solução. No entanto, no sentido amplo da palavra, é mais do que a simples medida da taxa de solubilidade, podendo ser mais corretamente descrita como um ensaio físico para prever a liberação para uma determinada área numa determinada quantidade e no tempo correto. Esta definição é mais consentânea com a aplicação dos ensaios de dissolução aos estudos biofarmacêuticos e farmacocinéticos. Fundamentalmente, este processo é controlado pela afinidade entre a substância sólida e o

solvente e pelo modo como o sistema farmacêutico o libera. No entanto, podem ser incorporadas substâncias no seio da forma farmacêutica, que permitem alterar a solubilidade do fármaco no meio (MANADAS, PINA, VEIGA, 2002).

A velocidade de dissolução é um parâmetro que expressa a rapidez com que um soluto se dissolve em um líquido solvente, em determinadas condições de agitação e temperatura, dentro outros fatores. Está intimamente relacionada com a solubilidade, embora significando um conceito diferente: a solubilidade é um conceito estático, que se refere a um estado de equilíbrio termodinâmico, representando a quantidade ou concentração de fármaco que se dissolve por unidade de tempo. Assim, através da alteração da velocidade de dissolução de uma substância mediante fatores tecnológicos e de formulação, é possível modular o perfil de liberação de um fármaco, o que resulta em grande importância biofarmacêutica (MARTÍNEZ, NAVARRO, 2001).

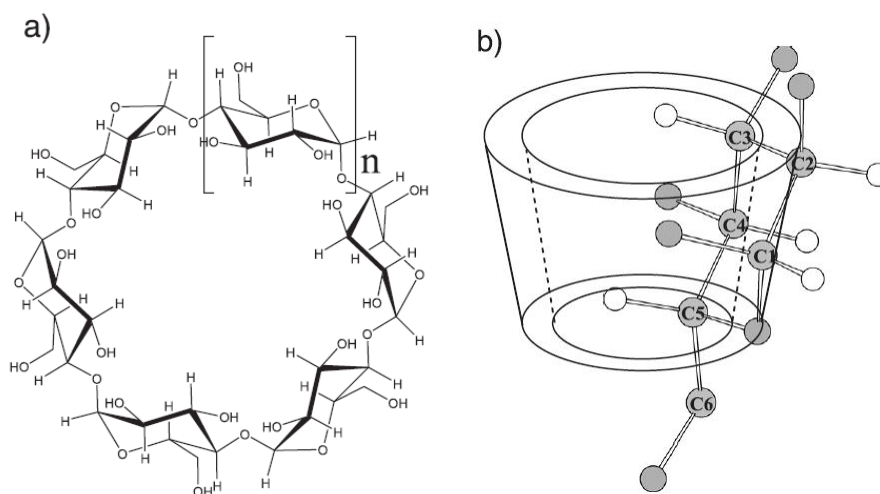
Para se ter conhecimento de como está acontecendo o processo de dissolução dos fármacos analisados realiza-se a avaliação do perfil de dissolução. Neste procedimento determina-se quantitativamente o fármaco dissolvido em intervalos de tempos diferentes. O perfil de dissolução fornece, assim, informações sobre a velocidade de dissolução, a porcentagem máxima dissolvida e, ainda, em que ponto mudanças significativas podem estar ocorrendo (FERRAZ, CONSIGLIERI & STORPIRTIS, 1998). Além disso, pode-se calcular a eficiência de dissolução; este parâmetro, proposto por KHAN e RHODES (1972), é bastante útil quando se deseja comparar formulações e/ou produtos diferentes.

3.4.2. Ciclodextrinas para o aumento da solubilidade de fármacos

Ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos formados por moléculas de D-glicose unidas através de ligações glicosídicas $\alpha(1-4)$ (Figura 3a), obtidas a partir da degradação enzimática do amido (JANSOOK, LOFTSSON, 2009). As CDs mais conhecidas são as α , β e γ -ciclodextrinas, constituídas por 6, 7 e 8 unidades de glicose, respectivamente, que adotam a conformação de cadeira. Do ponto de vista estrutural, as CDs apresentam-se na forma de “cones truncados” com o lado mais largo formado pelas hidroxilas secundárias em C-2 e C-3 e a face mais estreita constituída pelas hidroxilas primárias ligadas em C-6. A dimensão da cavidade é determinada pelo número de unidades de glicose constituintes da CD. Os átomos de oxigênio envolvidos nas ligações glicosídicas (em C-1 e C-4) e os átomos de hidrogênio ligados em C-3 e C-5 determinam o caráter hidrofóbico do interior da cavidade das CDs (Figura 3) (BRITTO, NASCIMENTO, SANTOS, 2004).

A presença das hidroxilas livres na parte externa das CDs confere a essas moléculas um caráter hidrofílico. Esse arranjo estrutural das moléculas de glicose nas CDs possibilita a utilização desses compostos como hospedeiros na formação de complexos de inclusão. A presença de uma cavidade hidrofóbica e de grupos hidroxilas livres na parte externa da molécula permite a “dissolução” em meio aquoso de compostos (hóspedes) de baixa solubilidade. Esse aspecto molecular tem possibilitado a utilização de CDs em diferentes áreas da ciência e tecnologia, sendo o principal domínio de aplicação à indústria farmacêutica, em função da possibilidade de obtenção de medicamentos com propriedades físicas e químicas diferentes e o princípio ativo isolado (CARRIER, MILLER, AHMED, 2007).

Figura 3. (a) Estrutura geral das ciclodextrinas. Os derivados α , β e γ -CD são definidos por $n=1, 2$ e 3 , respectivamente. (b) Representação esquemática da estrutura tridimensional das CDs, mostrando as características estruturais definidas pelo arranjo das unidades de glicose



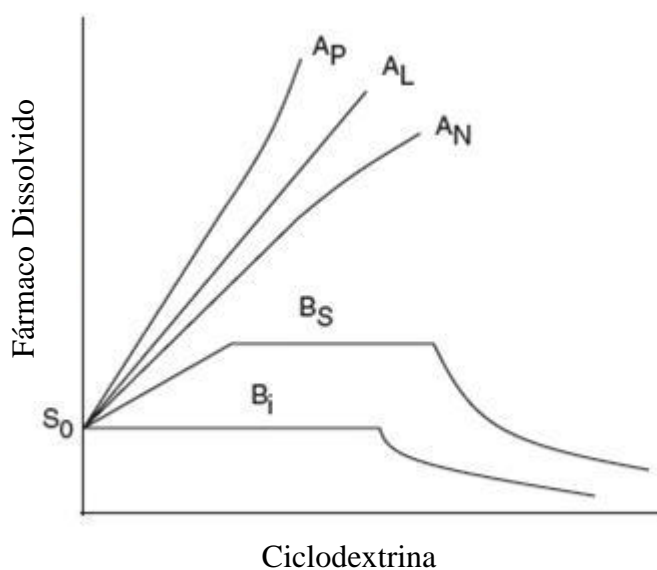
Fonte: BRITTO, NASCIMENTO, SANTOS (2004)

As propriedades físico-químicas do fármaco e da CD livre são relativamente diferentes das que possuem estes compostos quando estão complexados. Partindo deste conceito, qualquer metodologia que tenha sensibilidade suficiente para medir estas diferenças pode ser utilizada para caracterizar estes complexos sob diferentes pontos de vista, possibilitando completar este complexo *quebra-cabeça* e permitindo direcionar os fenômenos de inclusão de acordo com as necessidades (CUNHA-FILHO, SÁ-BARRETO, 2007). Atualmente as técnicas mais comuns são a construção de diagramas de solubilidade, análise térmica, DRX, infravermelho, RMN, MEV e dissolução (TAKAHASHI, VEIGA, FERRAZ, 2011).

3.4.2.1. Diagramas de solubilidade de fases

O diagrama de solubilidade de fases (Figura 4) é uma das ferramentas mais utilizadas na caracterização de complexos de inclusão com CDs, sendo obtido através de resultados de solubilidade da molécula hóspede em soluções com concentrações crescente de CDs (VEIGA, PERCORELLI, RIBEIRO, 2006). A teoria desenvolvida por Higuchi e Connors em 1965 constitui a aproximação mais utilizada na caracterização de complexos de inclusão em solução. Baseia-se na medição do efeito de complexação na solubilidade do substrato e permite fazer inferências sobre a estequiometria de inclusão e estimar uma constante relacionada com o grau de estabilidade do complexo formado (HIGUCHI, CONNORS, 1965).

Figura 4. Perfis de solubilidade pela teoria de Higuchi e Connors. S_0 é a solubilidade intrínseca do fármaco na ausência de ciclodextrina.



Fonte: LIMA e colaboradores (2008)

O diagrama de solubilidade (Figura 4) consiste em um gráfico, onde é representada a solubilidade do substrato em função da concentração de CD, existindo dois tipos de perfis: A e B. Diagramas do tipo A correspondem aos complexos solúveis, portanto observa-se incremento da solubilidade do substrato com o aumento da concentração da CD. Eles podem ser divididos em três tipos: perfil A_L – a solubilidade do substrato aumenta linearmente com o aumento da concentração de CD, resultando em complexos de primeira ordem; perfil A_P – diagrama com desvio positivo de linearidade, o complexo formado é de primeira ordem em

relação ao substrato e de segunda ou superior em relação à CD, neste caso a solubilização é mais efetiva em concentrações elevadas de CD; e perfil A_N – diagrama com desvio negativo, o qual requer uma interpretação mais cuidadosa devido à multiplicidade de fenômenos que podem ocorrer. Os diagramas do tipo B correspondem à formação de complexos com solubilidade limitada. Eles podem ser divididos em dois tipos: perfil B_S – primeiro existe um aumento da solubilidade, depois uma região de platô que é considerada a máxima solubilidade e, em seguida, tem-se a precipitação do complexo insolúvel com o aumento da CD; e o perfil B_i – refere-se a um complexo tão insolúvel que a possibilidade de aumento inicial na concentração do substrato não é detectável (CUNHA-FILHO, SÁ-BARRETO, 2007; TAKAHASHI, VEIGA, FERRAZ, 2011).

4. CAPÍTULO I

Propriedades ansiolíticas de uma nova entidade química, 5TIO1

FORTES, AC^a; ALMEIDA, AAC^b; FREITAS, RM^b; MEDONÇA-JÚNIOR, FJB^c; SOARES-SOBRINHO, JL^d; SOARES, MFLR^d

^a Laboratório de Pesquisa em Cosméticos e Medicamentos do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí, Brasil.

^b Laboratório de Pesquisa em Neuroquímica Experimental do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí, Brasil.

^c Laboratório de Síntese e Vetorização de Moléculas, Universidade Estadual da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brasil.

^d Núcleo de Controle de Qualidade de Medicamentos Correlatos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

RESUMO

2-[(2,6-diclorobenzilideno) amino]-5,6-diidro-4H-ciclopenta [b] tiofeno-3-carbonitrila, 5TIO1, é um novo derivado do 2-aminotifeno com uma promissora atividade farmacológica. O objetivo desse trabalho foi avaliar o potencial efeito ansiolítico do 5TIO1 em modelos animais. No teste do labirinto em cruz elevado (*plus maze*), o 5TIO1 (0,1; 1,0 e 10,0 mg kg⁻¹, via intraperitoneal) aumentou o tempo de permanência e o número de entradas nos braços abertos. No teste claro-escuro, o 5TIO1 na dose de 0,1 mg kg⁻¹ (via intraperitoneal) também mostrou efeito ansiolítico, indicado pelo aumento no tempo de permanência no campo claro, de forma similar ao diazepam (2,0 mg kg⁻¹, via intraperitoneal). Os grupos de 5TIO1 não mudaram a locomoção e coordenação nos testes do campo aberto e *rota rod*, respectivamente, quando comparados ao veículo. Não observou-se processo de dose dependência e os efeitos ansiolíticos demonstrados não foram completamente revertidos pelo flumazenil 25 mg kg⁻¹ (i.p). Nosso resultados sugerem que o 5TIO1 pode se ligar a outros receptores, além do sítio benzodiazepínico do receptor GABA em cérebro de camundongo.

Palavras-chave: tiofeno, ansiedade, labirinto em cruz elevado, campo claro/escuro.

ABSTRACT

2-[(2,6-dichlorobenzylidene)amino]-5,6-dihydro-4*H*-cyclopenta[*b*]thiophene-3-carbonitrile, 5TIO1, is a new 2-aminothiophene derivative with a promising pharmacological activity. The aim of this work was to evaluate the potential anxiolytic effect of 5TIO1 in animal models. In the elevated plus-maze test, 5TIO1 (0.1, 1.0 and 10.0 mg kg⁻¹, i.p) increased the time of permanence and the number of entries in the open arms. In the light/dark box test, 5TIO1 at dose of 0.1 mg kg⁻¹ (i.p) also showed anxiolytic-like effect indicated by an increase in the time spent in the light box, similar to diazepam 2.0 mg kg⁻¹ (i.p). 5TIO1 groups didn't change locomotor and coordination activities in open field and rotarod tests, respectively, when compared to vehicle. Dose dependent process wasn't observed and the anxiolytic effects demonstrated were not completely reversed by flumazenil 25 mg kg⁻¹ (i.p). Our results suggest that 5TIO1 can bind with other receptors, besides the benzodiazepine site of the GABA receptor in mouse's brain.

Key-words : thiophene, anxiety, plus maze, light/dark box.

INTRODUÇÃO

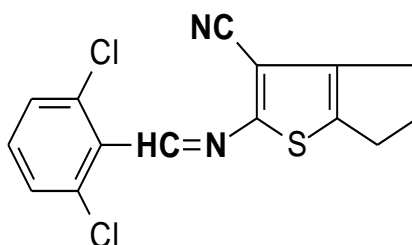
A ansiedade consiste em um estado de tensão provocado em antecipação a uma ameaça ou a uma potencial ameaça. As sensações de ansiedade são uma parte normal da experiência humana, mas a ansiedade excessiva ou inadequada pode se tornar uma doença (GROSS, HEN, 2004; WU, KIM, ZHUO, 2008). De acordo com pesquisas, os transtornos de ansiedade são a classe mais prevalente de transtornos psiquiátricos na população em geral, com prevalência de vida estimada para qualquer tipo de transtorno de ansiedade de 16% e prevalência de 12 meses estimada em 11% (KESSLER et al., 2009).

Um olhar retrospectivo dos últimos 50 anos de pesquisa sobre o estudo pré-clínico da ansiedade mostra que os anos de 60 e 80 podem ser considerados como as décadas do 'comportamento', período em que alguns dos mais importantes testes comportamentais para ansiedade foram concebidos. O teste claro-escuro e o teste do labirinto em cruz elevado, por exemplo, foram desenvolvidos separadamente em 1980, e tornaram-se a base de estudos pré-clínicos de ansiedade (FRASER et al., 2010). Além disso, testes que avaliam a função sensorial e motora são muito importantes no estudo da ansiedade (CRYAN, HOLMES, 2005). Neste contexto, os testes do campo aberto e do *rota rod* são normalmente realizados para avaliar as alterações nas atividades de locomoção e de coordenação (CRAWLEY, 2008).

Embora existam terapias empiricamente suportadas para esses transtornos, muitos pacientes que completam o tratamento são parcialmente responsivos ou mesmo não responsivos. Enquanto outros pacientes têm dificuldade para tolerar e/ou aderir ao tratamento, abandonando prematuramente a farmacoterapia (TAYLOR, ABRAMOWITZ, MACKAY, 2012). Dentre a classe de fármacos usados nesses tratamentos estão os benzodiazepínicos. Entretanto, sua eficácia terapêutica é limitada devido a problemas como: sedação, amnésia retrógrada, relaxamento muscular, tolerância e dependência física (RUDOLPH, KNOFLACH, 2011). Recentemente, outra classe de fármacos, os inibidores seletivos da recaptação de serotonina, estão sendo prescritos, principalmente, devido a seu perfil de efeitos adversos favoráveis. Entretanto, essas terapias estão longe de serem universalmente eficazes (GROSS, HEN, 2004). Assim, justifica-se o desenvolvimento de pesquisas em busca de agentes mais seguros e eficazes para o tratamento da ansiedade (GOES, ANTUNES, TEXEIRA-SILVA, 2009).

Atualmente, derivados tiofênicos têm atraído o interesse da indústria farmacêutica devido ao seu amplo espectro farmacológico, em especial, como agentes ansiolíticos (AMR et al., 2010). Neste contexto, o 2-[(2,6-diclorobenzilideno) amino]-5,6-diidro-4H-ciclopenta [b] tiofeno-3-carbonitrila, também chamado de 5TIO1 (Figura 1), é um novo derivado do 2-aminotiofeno sintetizado por uma reação de duas etapas, partindo da reação de Gewald, seguida pela condensação com 2,6-diclorobenzaldeído (MENDONÇA-JÚNIOR et al., 2011). Assim, o objetivo desse estudo foi avaliar o potencial efeito ansiolítico do 5TIO1 em modelos experimentais na tentativa de esclarecer o seu mecanismo de ação.

Figura 1. Estrutura molecular do 5TIO1.



Fonte: Arquivo pessoal.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) da linhagem *Swiss*, albinos, machos, pesando entre 25 a 30 g, com dois meses de idade, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Piauí. Os animais receberam água e ração tipo *pellets* (Purina®) com livre acesso e foram mantidos com iluminação controlada (12h de ciclo claro/escuro) e temperatura (25 ± 2 °C). Os experimentos comportamentais foram realizados entre 8:00 e 12:00 em ambiente controlado. Os protocolos experimentais e procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação com Animais da Universidade Federal do Piauí (n° 031/12).

Tratamento com fármacos

O 5TIO1 foi fornecido pelo Laboratório de Síntese e Vetorização de Moléculas da Universidade Federal da Paraíba, na forma de um cristal amarelo, com rendimento de 89%, ponto de fusão 159-160°C e R_f 0,54 (*n*-Hex./AcOEt. 8,5:1,5). Este foi emulsificado com o veículo – solução de Tween 80 0,05% (Sigma-EUA) e dissolvido em solução salina 0,9%. Os animais foram tratados com a substância experimental nas doses de 0,1; 1,0 e 10,0 mg kg⁻¹, via intraperitoneal (i.p), 30 minutos antes dos experimentos. O grupo controle recebeu veículo em um volume constante de 10 mL kg⁻¹, administrado pela mesma via dos grupos tratados. Diazepam (DZP) 2,0 mg kg⁻¹ (União Química-Brasil) e flumazenil (FLU) 25,0 mg kg⁻¹ (Sigma-EUA), utilizados como padrões, foram administrados via intraperitoneal após a dissolução no veículo.

Protocolo experimental

Os animais foram testados durante o período de luz e observados em uma sala fechada com temperatura constante (25 ± 2 °C). Todos os testes foram realizados em dias diferentes, com grupos distintos de animais.

Todos os animais dos grupos experimentais foram tratados por via intraperitoneal, 30 minutos antes dos testes. A fim de elucidar os possíveis mecanismos envolvidos no efeito ansiolítico do 5TIO1, o flumazenil foi utilizado como um pré-tratamento, 15 minutos antes dos tratamentos do 5TIO1e do diazepam.

Para os testes do labirinto em cruz elevado, do campo aberto e do *rota rod*, os camundongos foram distribuídos aleatoriamente em oito grupos (11 ratos por grupo): um grupo de controle tratado com o veículo, um grupo tratado com medicamento de referência DZP 2,0 mg kg⁻¹, três grupos tratados com 5TIO1 nas doses de 0,1, 1,0 e 10,0 mg kg⁻¹, respectivamente, um grupo tratado com antagonista GABA FLU 25,0 mg kg⁻¹, e dois grupos pré-tratados com FLU 25,0 mg kg⁻¹ e, em seguida, 15 minutos depois, tratados com DZP 2,0 mg kg⁻¹ e 5TIO1 mg kg⁻¹. O teste claro e escuro seguiu o mesmo protocolo, mas somente a dose o 5TIO1 que apresentou o melhor efeito ansiolítico em relação ao diazepam foi testada.

Teste do Labirinto em Cruz Elevado

O teste de labirinto em cruz elevado (LISTER, 1987) consistiu de dois braços abertos perpendicular (30 x 5 cm) e dois braços fechados (30 x 5 x 25 cm) também na posição perpendicular. Os braços abertos e fechados foram conectados por uma plataforma central (5 x 5 cm). Para este teste foram utilizados cinco grupos de 11 animais cada, todos tratados pela via intraperitoneal. O primeiro grupo foi tratado com veículo, o segundo grupo com DZP 2,0 mg kg⁻¹, e os outros grupos foram tratados com 5TIO1 em doses de 0,1; 1,0 e 10,0 mg kg⁻¹. Trinta minutos após os tratamentos, o animal foi colocado no centro do labirinto com o nariz em direção a um dos braços fechados, e observados por 5 min. Os parâmetros observados foram: número de entradas nos braços abertos (NEBA), porcentagens de entradas para os braços abertos (PEBA), tempo de permanência nos braços abertos (TPBA) e porcentagem de tempo de permanência nos braços abertos (PTBA).

Teste claro-escuro

Complementando a avaliação do efeito ansiolítico, foi realizado o teste claro-escuro. Foram utilizados três grupos com 11 camundongos por grupo, todos tratados pela via intraperitoneal. O primeiro grupo foi tratado com veículo, o segundo grupo com DZP 2,0 mg kg⁻¹, e o terceiro com 5TIO1 em doses de 0,1 mg kg⁻¹. Após 30 minutos dos tratamentos, os animais foram colocados, um por vez, no aparato do teste claro-escuro. O aparato utilizado é feito de acrílico dividido em 2 compartimentos (*box* claro e *box* escuro) que se comunicam por meio de uma pequena porta (CRAWLEY, 1981). O *box* escuro (acrílico preto, 27 x 18 x 29 cm) é pobremente iluminado. O *box* claro (acrílico transparente, 27 x 18 x 29 cm) é iluminado por uma fonte de luz de 60W (400 lx). Os animais foram observados por 5 minutos e depois de cada ensaio, o equipamento foi limpo com solução de etanol 70%. O parâmetro

utilizado foi o tempo de permanência no *box* claro expresso em segundos. Os animais foram observados por 5 minutos e o parâmetro observado foi o número de cruzamento com as quatro patas.

Teste do campo aberto

O campo aberto foi feito de acrílico (paredes transparente e piso preto, 30 x 30 x 15 cm) e dividido em nove quadrantes iguais. Esse aparato foi utilizado para avaliar a atividade exploratória do animal durante 5 minutos, baseado no modelo descrito por Archer (1973). O parâmetro analisado foi o número de cruzamentos com as quatro patas.

Teste do rota rod

O equipamento do *rota rod* foi utilizado para a avaliação da coordenação motora e relaxamento muscular produzido por fármacos em animais (CARLINI, BURGOS, 1979). Os animais foram colocados com as quatro patas sobre uma barra giratória de 2.5 cm de diâmetro, elevada a 25 cm do piso, em uma rotação de 17 rpm, por um período de três minutos. Foram registrados, o tempo de permanência na barra giratória, em segundos (s), e o número de quedas, com três reconduções, no máximo.

Análise estatística

Todos os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão da média (E.P.M.). Os dados obtidos foram avaliados por meio da análise de variância (ANOVA) seguida do teste *t-Student-Neuman-Keuls* como *post hoc* teste. Os dados foram analisados utilizando o software GraphPad Prism (versão 5.0). As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas entre $p < 0,05$ a $p < 0,001$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O estudo mostrou que uma nova entidade química, 5TIO1, tem potencial farmacológico para se tornar um novo medicamento ansiolítico. Dados estes que justificam a realização dos estudos de pré-formulação dessa molécula (SWAMIVELMANICKAM et al., 2009; GOPINATH, NAIDU, 2011). Dois diferentes ensaios comportamentais foram utilizados (labirinto em cruz elevado e claro-escuro) baseados, etologicamente, no desejo inato do animal para a exploração de ambientes desconhecidos *versus* a aversão aos ambientes

Tabela 1. Efeitos do 5TIO1 em camundongos no teste do labirinto em cruz elevado.

Grupos	NEBA	PEBA	TPBA	PTBA
Veículo (controle)	7,09 ± 0,34	42,55 ± 1,1	75,36 ± 2,62	24,85 ± 0,87
DZP 2	13,00 ± 0,40 ^a	64,18 ± 0,82 ^a	110,5 ± 0,82 ^a	37,55 ± 0,87 ^a
5TIO1 0,1	14,91 ± 0,39 ^{a,c}	59,16 ± 1,88 ^a	142,7 ± 2,18 ^{a,b}	43,46 ± 2,18 ^a
5TIO1 1,0	11,55 ± 0,54 ^{a,c}	47,72 ± 1,21 ^{b,c}	127,0 ± 4,25 ^a	38,72 ± 2,40 ^a
5TIO1 10,0	11,64 ± 0,66 ^{a,c}	47,16 ± 1,19 ^{b,c}	123,5 ± 3,81 ^a	38,93 ± 1,92 ^a
FLU 25 + DZP 2	7,54 ± 0,25 ^b	39,64 ± 0,94 ^b	75,64 ± 1,91 ^b	25,03 ± 0,65 ^b
FLU 25	7,27 ± 0,36	40,73 ± 1,99	75,45 ± 2,43	25,09 ± 0,80
FLU 25 + 5TIO1 0,1	4,91 ± 0,31 ^{a,c,d}	36,91 ± 2,42 ^c	118,6 ± 9,16 ^{a,c,d}	39,18 ± 3,12 ^{a,d}

Legenda: Os valores representam a média ± E.P.M. de NEBA, número de entradas nos braços abertos; PEBA, porcentagem de entradas nos braços abertos; TPBA, tempo de permanência nos braços abertos; PTBA, porcentagem de tempo nos braços abertos, dos camundongos usados nos experimentos (n=11 por grupo) utilizados nos experimentos. ^ap<0,001, quando comparados ao grupo controle (ANOVA e teste *t*-Student–Newman–Keuls como *post hoc* teste), ^bp<0,001 quando comparados ao grupo DZP (ANOVA e *t*-Student–Neuman–Keuls como *post hoc* teste), ^cp<0,001 quando comparados ao grupo 5TIO1 0,1 (ANOVA e *t*-Student–Neuman–Keuls como *post hoc* teste), ^dp<0,001 quando comparados ao grupo FLU 25 (ANOVA e *t*-Student–Neuman–Keuls como *post hoc* teste), ^ep<0,01 quando comparados ao grupo DZP (ANOVA e *t*-Student–Neuman–Keuls como *post hoc* teste).

Fonte: Arquivo pessoal.

Tabela 2. Efeitos do 5TIO1 em camundongos no teste claro-escuro.

Grupos	Tempo de permanência no campo claro (s)
Veículo (controle)	78,64 ± 3,14
DZP 2	101,7 ± 1,21 ^a
5TIO1 0,1	97,09 ± 5,75 ^a
FLU 25 + DZP 2	76,00 ± 2,80 ^b
FLU 25	79,45 ± 3,78
FLU 25 + 5TIO1 0,1	37,00 ± 1,54 ^{a,c,d}

Legenda: Os valores são que a média ± S.E.M. do tempo de permanência no campo claro (s) dos camundongos usados nos experimentos (n=11). ^ap<0,001, quando comparados ao grupo controle (ANOVA e teste *t*-Student–Newman–Keuls como *post hoc* teste), ^bp<0,001 quando comparados ao grupo DZP (ANOVA e *t*-Student–Neuman–Keuls como *post hoc* teste), ^cp<0,001 quando comparados ao grupo 5TIO1 0,1 (ANOVA e *t*-Student–Neuman–Keuls como *post hoc* teste), ^dp<0,001 quando comparados ao grupo FLU 25 (ANOVA e *t*-Student–Neuman–Keuls como *post hoc* teste).

Fonte: Arquivo pessoal.

expostos e bem iluminados (CRYAN, HOLMES, 2005). Em ambos os ensaios (Tabela 1 e Tabela 2), a dose mais baixa de 5TIO1 (0,1 mg kg⁻¹) aumentou significativamente (p <0,001)

a exposição do camundongos nos espaços aversivos. Estes ensaios foram escolhidos por serem validados farmacologicamente, simples, baratos, rápidos, por não necessitarem de treinamento preliminar e por não causarem muito desconforto para os animais durante o manuseio (BORA, SHARMA, 2011).

Os resultados dos possíveis efeitos ansiolíticos do 5TIO1 pelo teste de labirinto em cruz elevado em camundongos adultos são mostrados na Tabela 1. Os resultados mostraram que o número de entradas nos braços abertos (NEBA) aumentou, significativamente, 110,3; 62,9 e 64,2% nos grupos tratados com 5TIO1 0,1, 1,0 e 10,0 mg kg⁻¹, respectivamente, quando comparado com o controle (p<0,001); a porcentagem de entradas nos braços abertos (PEBA) aumentou 39,04% para o 5TIO1 na dose de 0,1 mg kg⁻¹ quando comparado ao controle (p<0.001); o tempo de permanência nos braços abertos (TPBA) aumentou 89,36; 68,52 e 63,88% nos grupos tratados com 5TIO1 0,1, 1,0 e 10,0 mg kg⁻¹, respectivamente, quando comparado com o controle (p<0,001); e a porcentagem de tempo nos braços abertos (PTBA) aumentou 74,89, 55,81 e 56,66% nos grupos tratados com 5TIO1 0,1, 1,0 e 10,0 mg kg⁻¹, respectivamente, quando comparado com o controle (p<0,001). No entanto, não foi observado efeito de dose dependência. Na verdade, o NEBA e o PEBA diminuíram, significativamente, nas doses de 1,0 e 10,0 mg kg⁻¹ do 5TIO1 quando comparados com a dose de 0,1 mg kg⁻¹ do 5TIO1 (p<0.001). Além disso, o NEBA aumentou 14,69% para o 5TIO1 na dose de 0,1 mg kg⁻¹ quando comparado com o diazepam (p<0.01) e o TPBA aumentou 29,14% para o 5TIO1 na dose de 0,1 mg kg⁻¹ quando comparado com o diazepam (p<0.001).

O teste do labirinto em cruz elevado é amplamente utilizado para avaliar a eficácia das intervenções de agentes modificadores da ansiedade e para explorar as bases neurológicas da ansiedade (SIDOR, RILETT, FOSTER, 2010). A exposição aos braços abertos no *pluz maze* produz, significativamente, um comportamento relacionado à ansiedade do que a exposição aos braços fechados (ALCALAY et al., 2004). Isso significa que benzodiazepínicos e outros compostos ansiolíticos aumentam o tempo de permanência dos camundongos nos braços abertos, enquanto que os agentes ansiogênicos diminuem (CHACUR, 1999). O 5TIO1 na dose de 0,1 mg kg⁻¹ aumentou todos os parâmetros analisados (Tabela 1), indicando a sua atividade ansiolítica. Entretanto, não foi observado efeito de dose dependência. Na verdade, doses maiores de 5TIO1 diminuem o efeito ansiolítico. Isso sugere uma saturação do *pool* de receptores envolvidos no mecanismo de ação dessa atividade.

Complementando o possível efeito ansiolítico do 5TIO1 no labirinto em cruz elevado, o teste claro-escuro também foi realizado (DHINGRA, CHHILLAR, GUPTA, 2012). Este

teste baseia-se na aversão natural dos roedores a ambientes iluminadas e no comportamento exploratório dos roedores em resposta a fatores de stress moderado (luz e ambiente desconhecido) (CRAWLEY, 1981; BOURIN, HASCOËT, 2003). Logo, quanto mais tempo gasto no ambiente iluminado, “menos ansiedade” tem o roedor (HUANG, LIN, 2010).

Os resultados da atividade ansiolítica do 5TIO1 pelo teste claro-escuro em camundongos adultos são mostrados na Tabela 2. A administração de DZP e 5TIO1 0,1 aumentou, significativamente ($p < 0,001$), o tempo de permanência dos camundongos no *box* iluminado em 29,3 e 23,5%, respectivamente, em comparação com o controle. Portanto, o 5TIO1 aumentou o tempo gasto no ambiente iluminado (Tabela 2), indicando, assim como no labirinto de cruz elevado, a sua atividade ansiolítica.

Muitos estudos reportam que a neurotransmissão GABAérgica desempenha um papel importante na ansiedade (MOHLER et al., 1990). De fato, vários fármacos, como os benzodiazepínicos, são utilizados para essa patologia (ALMEIDA et al., 2012). As evidências de que os transtornos de ansiedade podem ser causados por anormalidades nos receptores GABAérgicos são provenientes de uma série de estudos utilizando um antagonista dos benzodiazepínicos, o flumazenil, tanto em testes desafios como em métodos de imagem (NUTT, MALIZIA, 2001). O flumazenil, portanto, não tem nenhum efeito quando administrado sozinho, mas pode antagonizar o efeito ansiolítico do diazepam (WIEROŃSKA et al., 2004).

Tratando-se do envolvimento GABAérgico na atividade ansiolítica do 5TIO1, foi observado que o flumazenil reverteu, como esperado, os efeitos do diazepam em ambos os testes (*plus maze* e claro-escuro) para todos os parâmetros analisados (Tabela 1 e 2), e o flumazenil sozinho não mostrou nenhum efeito. Em relação ao composto investigado, somente para a PEBA (Tabela 1), o flumazenil aboliu o efeito ansiolítico do 5TIO1 0,1 mg kg⁻¹ semelhante ao controle. No grupo FLU 25 + 5TIO1 0,1, o NEBA (Tabela 1) e o tempo de permanência no campo claro (Tabela 2) diminuíram, significativamente, quando comparados ao grupo FIU 25 ($p < 0,001$). No entanto, a Tabela 1 mostra que no grupo FLU 25 + 5TIO1 0,1, o TPBA e PTBA aumentaram, significativamente, quando comparados ao grupo FIU 25 ($p < 0,001$). Esses resultados sugerem, portanto, que o 5TIO1 pode se ligar a outros receptores além do sítio benzodiazepínico dos receptores GABA em camundongos.

Um dos principais problemas com a utilização de benzodiazepínicos e outras classes de agentes farmacológicos para o tratamento da ansiedade é os efeitos adversos que devem ser evitados, uma vez que diminui a adesão do paciente e aumenta o custo para o sistema de

saúde (TAYLOR, ABRAMOWITZ, MACKAY, 2012). A Tabela 3 mostra que apenas o diazepam diminuiu significativamente o número cruzamentos teste do campo aberto, quando comparado com o controle ($p < 0,001$).

Tabela 3. Efeitos do 5TIO1 em camundongos no teste de campo aberto.

Grupos	Número de cruzamentos
Veículo (controle)	69,17 ± 2,38
DZP 2	30,00 ± 2,43 ^a
5TIO1 0,1	71,92 ± 1,26
5TIO1 1,0	64,25 ± 2,35
5TIO1 10,0	67,75 ± 2,29
FLU 25 + DZP 2	70,83 ± 2,89
FLU 25	64,42 ± 2,54
FLU 25 + 5TIO1 0,1	72,33 ± 1,66

Legenda: Os valores são que a média ± S.E.M. do tempo de permanência no campo claro (s) dos camundongos usados nos experimentos (n=11). ^ap<0,001, quando comparados ao grupo controle (ANOVA e teste *t*-Student–Newman–Keuls como *post hoc* teste).

Fonte: Arquivo pessoal.

Tabela 4. Efeitos do 5TIO1 em camundongos no teste do *rota rod*.

Grupos	Tempo de permanência (s)	Número de quedas
Veículo (controle)	176,8 ± 1,04	1,4 ± 0,31
DZP 2	167,6 ± 0,94 ^a	2,7 ± 0,24 ^b
5TIO1 0,1	178,2 ± 0,46	1,5 ± 0,34
5TIO1 1,0	177,4 ± 0,85	1,7 ± 0,31
5TIO1 10,0	179,5 ± 0,21	2,0 ± 0,23
FLU 25 + DZP 2	178,4 ± 0,58	1,6 ± 0,28
FLU 25	173,0 ± 0,82	1,2 ± 0,24
FLU 25 + 5TIO1 0,1	179,4 ± 0,28	1,5 ± 0,28

Legenda: Os valores são que a média ± S.E.M. do tempo de permanência no campo claro (s) dos camundongos usados nos experimentos (n=11). ^ap<0,001, quando comparados ao grupo controle (ANOVA e teste *t*-Student–Newman–Keuls como *post hoc* teste), ^bp<0,05, quando comparados ao grupo controle (ANOVA e teste *t*-Student–Newman–Keuls como *post hoc* teste).

Fonte: Arquivo pessoal.

Analogamente, a Tabela 4 mostra que o diazepam diminuiu significativamente o tempo de permanência ($p < 0,001$) e o número de quedas ($p < 0,05$) no *rota rod* quando comparado com o controle. No entanto, nenhuma das doses de 5TIO1 alteraram a locomoção e a coordenação dos camundongos, quando comparado com o controle ($p > 0,05$). As Tabelas 3 e 4 também mostram que o pré-tratamento com flumazenil só aboliu o efeito do diazepam.

Dessa forma, 5TIO1 não mostrou efeito adversos, tais como sonolência e deterioração motora, frequentemente observados em pacientes em tratamento com drogas ansiolíticas. Além disso, é importante ter em conta que esta substância pode modular positivamente os outros sistemas neurotransmissores envolvidos nos transtornos de ansiedade, tais como o serotoninérgico, analogamente aos derivados tiofênicos substituídos recém sintetizados ansiolíticos (AMR et al., 2010). No entanto, como e onde o 5TIO1 atua na via serotoninérgica deve ser investigado, uma vez que se observou seus efeitos ansiolíticos sem efeitos colaterais, mas essa atividade não foi completamente abolida por um antagonista seletivo do sistema GABAérgico, sugerindo que este novo agente farmacológico estudado pode interagir na via serotoninérgica.

CONCLUSÃO

Este trabalho demonstrou o efeito ansiolítico de uma nova entidade química, 5TIO1, a qual tem sua propriedade intelectual garantida por meio de depósito de patente; e dá suporte para a hipótese que esta molécula interaja com o receptor GABA, provavelmente nos subtipos de receptores que medeiam os efeitos dos benzodiazepínicos. Esses resultados impulsionam os estudos de pré-formulação desse novo composto, o qual é uma grande promessa para a indústria farmacêutica, que está enfrentando uma crise de inovação. Estudos adicionais, no entanto, são necessários para esclarecer totalmente o mecanismo do efeito ansiolítico do 5TIO1, uma vez que outros dados interessantes em nossos resultados foi que os efeitos ansiolíticos demonstrados não foram completamente revertidos por flumazenil, sugerindo que pode atuar de forma mais seletiva com menos efeitos adversos.

REFERÊNCIAS

- ARCHER, J. Tests for emotionality in rats and mice – a review. **Animal Behaviour**, v. 21, p. 205-235, 1973.
- ALCALAY, R.N.; GILADI, E.; PICK, C.G.; GOZES, I. Intranasal administration of NAP, a neuroprotective peptide, decreases anxiety-like behavior in aging mice in the elevated plus maze. **Neuroscience Letters**, v. 361, p. 128-131, 2004.
- ALMEIDA, A.A.C.; COSTA, J.P.; CARVALHO, R.B.F.; SOUSA, D.P.; FREITAS, R.M. Evaluation of acute toxicity of a natural compound (+)-limonene epoxide and its anxiolytic-like action. **Brain Research**, v. 1448, p. 56-62, 2012.
- AMR, A.E-G.E.; SHERIF, M.H.; ASSY, M.G.; AL-OMAR, M.A.; RAGAB, I. Antiarrhythmic, serotonin antagonist and antianxiety activities of novel substituted thiophene derivatives synthesized from 2-amino-4,5,6,7-tetrahydro-N-phenylbenzol[b]thiophene-3-carbozamide. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.45, p. 5935-5942, 2010.
- BORA, K.S.; SHARMA, A. Bioactivity-directed separation of an anxiolytic fraction from *Medicago sativa* Linn. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Sciences**, v. 8, n. 8, p. 1-4, 2011.
- BOURIN, M.; HASCOËT, M. The mouse light/dark box test. **European Journal Pharmacology**, v. 463, p. 55-65, 2003.
- CHACUR, C.; RAYMOND, R.; HIPÓLIDE, D.C.; GIUGLIANO, E.B.; LEITE, J.R.; NOBREGA, J.N. Immediate increase in benzodiazepine binding in rat brain after a single brief experience in the plus maze: a paradoxical effect. **Neuroscience Letters**, v. 269, p. 29-32, 1999.
- CRAWLEY, J.N. Neuropharmacologic specificity of a simple model for the behavioural actions of benzodiazepines. **Pharmacology Biochemistry & Behavior**, v. 15, p. 695-699, 1981.
- CRAWLEY, N.C. Behavioral phenotyping strategies for mutant mice. **Neuron**, v. 27, p. 809-818, 2008.

CRYAN, J.F.; HOLMES, A. The ascent of mouse: advances in modeling human depression and anxiety. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 4, p. 775-790, 2005.

DHINGRA, D.; CHHILLAR, R.; GUPTA, A. Antianxiety-like activity of gallic acid in unstressed and stressed mice: possible involvement of nitriergic system. **Neurochemical Research**, v. 37, p. 487-494, 2012.

FRASER, L.M.; BROWN, R.E.; HUSSIN, A.; FONTANA, M.; WHITTAKER, A.; O'LEARY, T.P.; LERDELE, L.; HOLMES, A.; RAMOS, A. Measuring anxiety- and locomotion-related behaviours in mice: a new way of using old tests. **Psychopharmacology**, v. 211, p.99-112, 2010.

GOES, T.C.; ANTUNES, F.D.; TEXEIRA-SILVA, F. Trait and state anxiety in animal models: is there correlation?. **Neurosciences Letters**, v. 450, p. 266-269, 2009.

GOPINATH, R.; NAIDU, R.A.S. Pharmaceutical preformulation studies – current review. **International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives**, v. 2, n. 5, p. 1391-1400, 2011.

GROSS, C; HEN, R. The developmental origins of anxiety. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 5, p.545-552, 2004.

HUANG, T-Y.; LIN C-H. A comparison between chronic exercise training and desipramine as treatments for the depression-like behavior of early-life maternal deprivation rats. **Neuroscience Letters**, v. 480, p. 201-205, 2010.

KESSLER, R.C.; AGUILAR-GAXIOLA, S.; ALONSO, J.; CHATTERJI, S.; LEE, S.; ORMEL, J.; ÜSTÜN, T.B.; WANG, P.S. The global burden of mental disorders: an update from the WHO World Mental Health (WMH) Surveys. **Epidemiologia e Psichiatria Sociale**, v. 18, n. 1, p. 23-33, 2009.

LISTER, R.G. The use of a plus maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology**, v. 92, p. 180-185, 1987.

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. **Latin American Journal of Pharmacy**, v.30, p.1492-1499, 2011.

MOHLER, H.; MALHERBE, P.; DRAGUHN, A.; RICHARDS, J.G. GABA_A-receptors: structural requirement and sites of gene expression in mammalian brain. **Neurochemical Research**, v. 15, n. 15, p. 199-207, 1990.

NUTT, D.J.; MALIZIA, A.L. New insights into the role of the GABA_A-benzodiazepine receptor in psychiatric disorder. **The British Journal of Psychiatry**, v. 179, p. 390-396, 2001.

RUDOLPH, U.; KNOFLACH, F. Beyond classical benzodiazepines: novel therapeutic potential of GABA_A receptor subtypes. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 10, p. 685-697, 2011.

SIDOR, M.M.; RILETT, K.; FOSTER, J.A. Validation of an automated system measuring anxiety-related behaviours in the elevated plus maze. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 188, p. 7-13, 2010.

SWAMIVELMANICKAM, M.; VALLIAPPAN, K.; REDDY, P.G.; MADHUKAR, A.; MANAVALAN, R. Preformulation studies for amoxicillin trihydrate and dicloxacillin sodium as mouth dissolve tablets. **International Journal of ChemTech Research**, v. 1, n.4., p. 1032-1035, 2009.

TAYLOR, S.; ABRAMOWITZ, J.S.; MACKAY, D. Non-adherence and non-response in the treatment of anxiety disorders. **Journal of Anxiety Disorders**, v. 26, p. 583-589, 2012.

WIEROŃSKA, J.M.; ŚMIAŁOWSKA, M.; BRAŃSKI, P.; GASPARINI, F.; KŁODZIŃSKA, A.; SZEWCZYK, B.; PAŁUCHA, A.; CHOJNACKA-WÓJCIK, E.; PILIC, A. In the amygdala anxiolytic action of mGlu5 receptors antagonist MPEP involves neuropeptide Y but not GABA_A signaling. **Neuropsychopharmacology**, v. 29, p. 514-521, 2004.

WU, L-J; KIM, S.S.; ZHUO, M. Molecular targets of anxiety: from membrane to nucleus. **Neurochemical Research**, v. 33, p. 1925-1932, 2008.

5. CAPÍTULO II

O estresse oxidativo em áreas cerebrais de camundongos é diminuído pelo 2-[(2,6-diclorobenzilideno) amino]-5,6-diidro-4H-ciclopenta [b] tiofeno-3-carbonitrila?

FORTES, AC^a; ALMEIDA, AAC^b; SANTOS, PS^c; DE LUCCA JUNIOR, W^d; FREITAS, RM^b; MENDONÇA-JUNIOR, FJB^e; SOARES-SOBRINHO, JL^f; SOARES, MFR^f

^a Laboratório de Pesquisa em Cosméticos e Medicamentos do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí, Brasil.

^b Laboratório de Pesquisa em Neuroquímica Experimental do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí, Brasil.

^c Curso de Farmácia, Universidade Federal do Piauí, Departamento de Bioquímica e Farmacologia, Teresina, Piauí, Brasil.

^d Universidade Federal de Sergipe, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Departamento de Morfologia, Sergipe, Alagoas, Brasil.

^e Laboratório de Síntese e Vetorização de Moléculas, Universidade Estadual da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brasil.

^f Núcleo de Controle de Qualidade de Medicamentos Correlatos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

RESUMO

2-[(2,6-diclorobenzilideno) amino]-5,6-diidro-4H-ciclopenta [b] tiofeno-3-carbonitrila, 5TIO1, é um novo derivado do 2-aminotifeno com uma promissora atividade farmacológica. O objetivo desse estudo foi avaliar a atividade antioxidante do 5TIO1 em diferentes áreas do sistema nervoso central de camundongos. Camundongos *Swiss* adultos foram tratados, via intraperitoneal, com Tween 80 0,05% dissolvido em salina 0,9% (grupo controle) e 5TIO1 nas doses de 0,1; 1,0 e 10,0 mg kg⁻¹. Os homogenatos cerebrais – hipocampo, corpo estriado, córtex frontal e cerebelo – foram obtidos após 24 h de observação. A atividade das enzimas superóxido dismutase e catalase, a peroxidação lipídica e o conteúdo de nitrito foram avaliados utilizando métodos espectrofotométricos. Para esclarecer o mecanismo de ação do 5TIO1 sobre o estresse oxidativo, também foi realizado o teste de *Western blot* para as

enzimas superóxido dismutase e catalase. Os resultados mostraram que o 5TIO1 diminui a peroxidação lipídica e o conteúdo de nitrito em todas as áreas cerebrais, e aumentou a atividade das enzimas antioxidantes, especialmente, no cerebelo. Os dados do teste de *Western blot* não demonstraram evidências na *upregulation* dessas enzimas depois da administração desse composto. Esses dados sugerem que o 5TIO1 pode proteger o cérebro contra danos neuronais, regularmente, observados durante neuropatologias.

Palavras-chave: estresse oxidativo; tiofeno; catalase; superóxido dismutase; western blot.

ABSTRACT

2-[(2,6-dichlorobenzylidene)amino]-5,6-dihydro-4*H*-cyclopenta[*b*]thiophene-3-carbonitrile, 5TIO1, is a new 2-aminothiophene derivative with a promising pharmacological activity. The aim of this study was to evaluate its antioxidant activity in different areas of mice central nervous system. Male Swiss adult mice were intraperitoneally treated with Tween 80 0.05% dissolved in 0.9% saline (control group) and 5TIO1 at doses of 0.1, 1.0 and 10.0 mg kg⁻¹. Brain homogenates - hippocampus, striatum, frontal cortex and cerebellum - were obtained after 24h of observation. The superoxide dismutase and catalase activities, lipid peroxidation and nitrite content were measured using spectrophotometric methods. To clarify the 5TIO1's mechanism on oxidative stress, it was also performed Western blot analysis of superoxide dismutase and catalase. The data showed that the 5TIO1 decreased lipid peroxidation and nitrite content in all brain areas and increased the activity of antioxidant enzymes, specially, in cerebellum. The data of Western blot analysis did not demonstrate evidence of the upregulation of these enzymes after administration of this compound. These data suggest that 5TIO1 can protect the brain against neuronal damage regularly observed during neuropathologies.

Keywords: oxidative stress; thiophene; catalase; superoxide dismutase; western blot.

INTRODUÇÃO

As células do corpo humano estão constantemente expostas a ataques de natureza oxidativa (BOUAYED, BOHN, 2010). Há provas irrefutáveis de que o estresse oxidativo está envolvido na patogênese de muitas doenças, incluindo diabetes, doença cardiovascular, doenças neurodegenerativas, transtornos psiquiátricos, bem como câncer (PALA, GÜRKAN, 2008; SANTOS et al., 2009; MINELLI, GÖGELE, 2011). Estas patologias têm

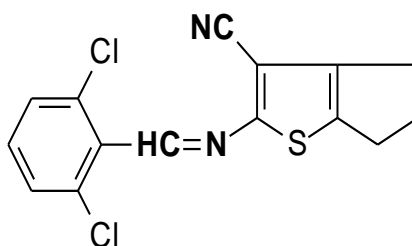
sido associadas a alterações nas espécies reativas de oxigênio (EROS) (SEDELNIKOVA et al., 2010), espécies reativas de nitrogênio (ERNS) e óxido nítrico (NO) (AGUIAR et al., 2012).

O estresse oxidativo tem sido um mecanismo patogênico comum associado a muitos dos principais transtornos psiquiátricos, como a ansiedade, devido à vulnerabilidade oxidativa intrínseca do cérebro (NG et al., 2008). Crescentes evidências sugerem correlação entre o desequilíbrio do mecanismo de defesa antioxidante e a ansiedade (SOUZA et al., 2007; RAMMAL et al., 2008; BOUAYED, RAMMAL, SOULIMANI, 2009; SALIM et al., 2010a; SALIM et al., 2010b; SALIM et al., 2011; VOLLERT et al., 2011). Portanto, os efeitos benéficos dos antioxidantes contra vários transtornos e doenças induzidas pelo estresse oxidativo têm recebido muita atenção (NIKI, 2010), impulsionando o desenvolvimento de novos fármacos que podem, eventualmente, exercer ações neuroprotetoras (MILITÃO, FERREIRA, FREITAS, 2010; VAUZOUR, 2012).

Entre os numerosos antioxidantes utilizados pelas células, os compostos contendo enxofre, incluindo a cisteína, a metionina, e a glutatona e os seus derivados têm sido amplamente estudados devido suas propriedades antioxidantes (BATTIN, BRUMAGHIM, 2008). Assim, compostos heterocíclicos contendo enxofre ganharam relevância na pesquisa ativa da química farmacêutica (EL-SHARKAWY, EL-SAYED, ZAKI, 2012). Atualmente, os derivados do tiofeno têm atraído o interesse da indústria farmacêutica, devido ao seu amplo espectro farmacológico, especialmente, como agentes ansiolíticos (AMR et al., 2010) e antioxidantes (ABU-HASHEM, EL-SHEHRY, BADRIA, 2010).

Neste contexto, o 2-[(2,6-diclorobenzilideno) amino]-5,6-diidro-4H-ciclopenta [b] tiofeno-3-carbonitrila, também chamado de 5TIO1 (Figura 1), é um novo derivado do 2-aminotiofeno sintetizado por uma reação de duas etapas, partindo da reação de Gewald, seguida pela condensação com 2,6-diclorobenzaldeído (MENDONÇA-JÚNIOR, 2011). O objetivo desse estudo foi avaliar a atividade antioxidante do 5TIO1 em diferentes áreas do sistema nervoso central (SNC) de camundongos adultos através da determinação da peroxidação lipídica, do conteúdo de nitrito e da atividade das enzimas catalase (CAT) e superóxido dismutase (Mn-SOD). Para esclarecer o mecanismo do 5TIO1 sobre o estresse oxidativo para o desenvolvimento de novos fármacos neuropsicoativos, também foi realizado o teste de *Western blot* para as enzimas Mn-SOD e CAT nos homogenatos cerebrais de camundongos após 24 horas de observação.

Figura 1. Estrutura molecular do 5TIO1.



Fonte: Arquivo pessoal.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) da linhagem *Swiss*, albinos, machos, pesando entre 25 a 30 g, com dois meses de idade, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Piauí. Os animais receberam água e ração tipo *pellets* (Purina®) com livre acesso e foram mantidos com iluminação controlada (12h de ciclo claro/escuro) e temperatura (25 ± 2 °C). Os experimentos foram realizados entre 8:00 e 12:00 em ambiente controlado. Os protocolos experimentais e procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação com Animais da Universidade Federal do Piauí (n° 031/12).

Tratamento

O 5TIO1 foi fornecido pelo Laboratório de Síntese e Vetorização de Moléculas da Universidade Federal da Paraíba, na forma de um cristal amarelo, com rendimento de 89%, ponto de fusão 159-160°C e R_f 0,54 (*n*-Hex./AcOEt. 8,5:1,5). Este foi emulsificado com o veículo – solução de Tween 80 0,05% (Sigma-EUA) dissolvido em solução salina 0,9%. Os animais foram tratados com a substância experimental nas doses de 0,1; 1,0 e 10,0 mg kg⁻¹, via intraperitoneal (i.p). O grupo controle recebeu veículo em um volume constante de 10 mL kg⁻¹, administrado pela mesma via.

Protocolo experimental

Os animais foram testados durante o período de luz e observados em uma sala fechada com temperatura constante (25 ± 2 °C). Todos os testes foram realizados em dias diferentes, com grupos distintos de animais.

Determinação da peroxidação lipídica e do conteúdo de nitrito

A peroxidação lipídica foi avaliada por meio da determinação dos níveis de TBARS (substâncias ácidas reativas com o ácido tiobarbitúrico), método previamente descrito por Draper e Hadley (1990). Foram preparados homogenatos a 10% (w/v) em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,4 para cada área cerebral investigada, grupo controle (n=7) e 5TIO1 0,1; 1,0 e 10,0 (n=7). Os resultados foram expressos em $\text{mmol min}^{-1} \mu\text{g proteina}^{-1}$. O conteúdo de nitrito nos grupos experimentais, grupo controle (n=7) e 5TIO1 0,1; 1,0 e 10,0 (n=7), foram determinados com base na reação de Griess (GREEN, TANNENBAUM, GOLDMAN, 1981). Os resultados foram expressos em μM .

Método da determinação da atividade da catalase e superóxido dismutase

Os homogenatos a 10% de cada área cerebral foram, separadamente, centrifugados ($800 \times g$, 20 min), e os sobrenadantes utilizados para ensaio de atividades de superóxido dismutase e catalase. A atividade da catalase foi medida nos grupos experimentais 5TIO1 0,1; 1,0 e 10,0 (n=7) e no grupo controle (n=7), utilizando o princípio básico da medida da velocidade de produção de O_2 e H_2O (CHANCE, MAEHLI, 1955). A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Lowry (LOWRY et al., 1951). Os resultados foram expressos em U $\mu\text{g de proteina}^{-1}$ (CHANCE, MAEHLI, 1955). Atividade da Mn-SOD nos grupo controle (n=7) e 5TIO1 0,1; 1,0 e 10,0 (n=7) foi testada por meio da taxa de redução do citocromo C pelos radicais superóxidos, utilizando o sistema xantina - xantina oxidase como fonte geradora de radical ânion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) (ARTHUR, BOYNE, 1985). Os resultados foram expressos em U $\mu\text{g de proteina}^{-1}$. Uma unidade (U) da atividade da Mn-SOD corresponde à inibição de 50% da reação do $\text{O}_2^{\cdot-}$ com o citocromo C. Obteve-se a concentração da proteína (LOWRY et al., 1951).

Western blot

Para o teste de immunoblotting, os homogenatos de cada área cerebral foram misturados com uma solução tampão (roti-Load 1, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Alemanha) de acordo com o procedimento do fabricante e, em seguida, tais soluções foram colocadas em banho-maria (95°C) por 5 min. As proteínas foram separadas utilizando SDS-PAGE (gel de separação de 5 a 25%). A quantidade de proteína foi de 10 μg . Após a separação, as proteínas foram coradas com *Coomassie Brilliant Blue* e transferidas para um papel de nitrocelulose, e, em seguida, os sítios de ligações não específicas são saturados com uma solução de bloqueio

(Chemicon International, Hofheim, Alemanha). As membranas foram incubadas durante a noite com os anticorpos primários contra: 1) CAT (polyclonal, UBI, Lake Placid, NY, EUA, 1:1.500) e 2) Mn-SOD (polyclonal, Assayama, Japão, 1:800), seguida de incubação com peroxidase de rábano conjugada com anticorpo secundário (peroxidase de cabra anti-coelho IgG+, Boehringer Mannheim GmbH, Alemanha, 1:1.000). A imunoreatividade foi visualizada usando o sistema de detecção ECL (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, Reino Unido).

Análise estatística

Os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão da média (E.P.M.). Os dados obtidos foram avaliados por meio da análise de variância (ANOVA) seguida do teste *t*-Student-Neuman-Keuls como *post hoc* teste. Os dados foram analisados utilizando o software GraphPad Prism 5.0 (San Diego, CA, EUA), os grupos experimentais foram comparados com o grupo veículo. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O estresse oxidativo, representado por uma perda de equilíbrio nas reações de oxidação-redução, pode alterar drasticamente a função neuronal e tem sido relacionado com a ansiedade (NG et al., 2008; BOUAYED, RAMMAL, SOULIMANI, 2009). Os resultados obtidos para as alterações neuroquímicas observadas após a administração de um composto ansiolítico, 5TIO1, (SABINO, 2011) apoiam fortemente esta correlação.

O cérebro é particularmente vulnerável ao estresse oxidativo devido os lípidos da membrana neuronal, ricos em ácidos graxos poliinsaturados, serem facilmente submetidos a peroxidação lipídica (ADIBHATLA, HATCHER, 2008; GUPTA, BHATT, MISRA, 2009; REED, 2011; YEOMAN, SCUTT, FARAGHER, 2012). Além disso, esse órgão apresenta menos mecanismos de defesa antioxidante, tais como os baixos níveis de superóxido dismutase e catalase (NG et al., 2008). Portanto, é importante determinar biomarcadores do estresse oxidativo, que mostram mudanças em moléculas biológicas que geram EROS e/ou ERNS (ASTIZ et al., 2011).

A Tabela 1 e a Tabela 2 mostram os efeitos do 5TIO1 na peroxidação lipídica e no teor de nitrito, respectivamente, no hipocampo, corpo estriado, córtex frontal e cerebelo de

camundongos adultos. As médias dos resultados indicaram uma redução superior a 87% na peroxidação lipídica e conteúdo de nitrito em todas as áreas do cérebro para todas as doses em comparação com grupo de controle ($p < 0,05$). Observa-se também que não houve efeito dose-dependente do 5TIO1 e que sua atividade *scavenger* (capacidade de neutralizar os radicais livres formando compostos menos reativos) foi, estatisticamente ($p < 0,05$), a mesma em todas as áreas de ambos os ensaios.

Tabela 1. Determinação dos níveis de peroxidação lipídica no hipocampo, corpo estriado, cortex frontal e cerebelo de camundongos adultos tratados com 5TIO1 nas doses de 0,1; 1,0 e 10,0 mg kg⁻¹.

Grupos	TBARS (mmol min ⁻¹ µg proteína ⁻¹)			
	Hipocampo	Corpo estriado	Córtex frontal	Cerebelo
Veículo	1,36 ± 0,05	1,34 ± 0,02	1,54 ± 0,01	1,43 ± 0,02
5TIO1 0,1	0,13 ± 0,01 ^a	0,13 ± 0,01 ^a	0,12 ± 0,09 ^a	0,13 ± 0,01 ^a
5TIO1 1,0	0,16 ± 0,02 ^a	0,16 ± 0,09 ^a	0,15 ± 0,02 ^a	0,18 ± 0,02 ^{a,b}
5TIO1 10,0	0,15 ± 0,09 ^a	0,15 ± 0,09 ^a	0,15 ± 0,01 ^a	0,17 ± 0,01 ^{a,b}

Os valores representam a média ± E.P.M. do número de animais utilizados nos experimentos (n=7 por grupo). ^ap<0,001, quando comparados ao grupo controle (ANOVA e teste *t*-Student–Newman–Keuls como *post hoc* teste); ^bp<0,001, quando comparados ao grupo 5TIO1 0,1 (ANOVA e teste *t*-Student–Newman–Keuls como *post hoc* teste).

Fonte: Arquivo pessoal.

Tabela 2. Determinação do conteúdo de nitrito no hipocampo, corpo estriado, cortex frontal e cerebelo de camundongos adultos tratados com 5TIO1 nas doses de 0,1; 1,0 e 10,0 mg kg⁻¹.

Grupos	Nitrito (µM)			
	Hipocampo	Corpo estriado	Córtex frontal	Cerebelo
Veículo	95,86 ± 2,89	94,71 ± 1,27	76,57 ± 0,65	82,43 ± 0,75
5TIO1 0,1	5,11 ± 0,44 ^a	6,00 ± 0,69 ^a	6,49 ± 0,75 ^a	6,93 ± 0,85 ^a
5TIO1 1,0	6,36 ± 1,03 ^a	4,98 ± 0,57 ^a	6,19 ± 1,23 ^a	4,81 ± 0,54 ^a
5TIO1 10,0	7,14 ± 0,99 ^a	9,04 ± 2,47 ^a	8,50 ± 1,26 ^a	9,04 ± 1,8 ^a

Os valores representam a média ± E.P.M. do número de animais utilizados nos experimentos (n=7 por grupo). ^ap<0,001, quando comparados ao grupo controle (ANOVA e teste *t*-Student–Newman–Keuls como *post hoc* teste).

Fonte: Arquivo pessoal.

A peroxidação lipídica em um tecido é um índice de dano biológico irreversível aos fosfolípidos da membrana celular, o que por sua vez conduz à inibição da maior parte das enzimas antioxidantes (NOBRE-JÚNIOR, FONTELES, FREITAS, 2009). Como os níveis de TBARS estão intimamente associados com a peroxidação lipídica (MATSUNAMI, SATO, YUKAWA, 2010), os resultados (Tabela 1) demonstraram que 5TIO1 diminuiu a peroxidação lipídica em todas as áreas do cérebro, indicando sua proteção antioxidante.

O conteúdo de nitrito também é um biomarcador fundamental do estresse oxidativo, uma vez que níveis elevados de óxido nítrico e os seus derivados de oxidação, como peroxinitrito, podem ser tóxicos, desempenhando um papel importante em doenças neurodegenerativas (ANDERSEN et al., 2004; CHUNG, DAVID, 2010; SUEISHI et al., 2011). Em condições normais, existe um equilíbrio entre a produção de óxido nítrico e de seus metabolitos (nitrito e nitrato) e a sua “destruição” por sistemas antioxidantes (FREITAS et al., 2005). Os resultados (Tabela 2) mostraram uma diminuição na formação de nitrito após a administração 5TIO1, sugerindo que esta substância pode evitar a formação de ERNS.

Os ensaios da peroxidação lipídica e do conteúdo de nitrito sugerem que o 5TIO1 exerce sua atividade antioxidante neutralizando as EROS e as ERNS, respectivamente. Esta atividade pode estar relacionada com as propriedades físico-químicas do 5TIO1. Pesquisas recentes identificaram os antioxidantes contendo enxofre em sua estrutura como aqueles com maior índice de benefícios terapêuticos (OKUNIEFF et al., 2008). O 5TIO1 contém um anel de cinco membros constituído por um átomo de enxofre como heteroátomo. Trata-se, portanto, de um derivado do tiofeno. Nesse caso, o átomo de enxofre age como um doador de elétrons, contribuindo com dois elétrons para o anel aromático (MISHRA et al., 2011). Dessa forma, os anéis aromáticos, tiofeno e o benzeno, tornam o 5TIO1 um composto rico em elétrons, sugerindo que sua propriedade antioxidante poderia estar ligada com a conversão dos radicais livres para produtos estáveis por meio de doação de elétrons.

Em condições normais, existe um equilíbrio entre o estresse oxidativo e nitrosativo, e o mecanismo de defesa antioxidante. O efeito nocivo dos radicais livres ao organismo induz vários mecanismos de defesa (VALKO et al., 2007; NOBRE-JÚNIOR, FONTELES, FREITAS, 2009; AGUIAR et al., 2012), dentre eles a remoção catalítica através das enzimas catalase, superóxido dismutase, peroxidases e proteínas antioxidantes tiol-específicas (LIMÓN-PACHECO, GONSEBATT, 2009). Protocolos gerais são descritos para avaliar a atividade dessas enzimas antioxidantes. Eletroforese e ensaios espectrofotométricos são amplamente utilizados para determinar a atividade enzimática tanto em células quanto em

tecidos, dependendo da quantidade de proteína requerida para cada ensaio (WEYDERT, CULLEN, 2010). A fim de compreender o efeito do 5TIO1 sobre a atividade das enzimas CAT e Mn-SOD, duas técnicas foram combinadas: o método de Lowry (WATERBORG, 2002) e o teste de Western blot (KOOB et al., 2012).

A superóxido dismutase é uma das principais enzimas utilizadas no combate ao dano oxidativo das EROS e ERNS. O seu substrato é o radical ânion superóxido, normalmente, gerado nos organismos aeróbicos durante o processo de oxidação. Sem a atividade da Mn-SOD, esse radical pode reagir com o óxido nítrico produzindo o peroxinitrito (ONOO^-), um potente agente oxidante e nitrosante, que pode causar danos às proteínas, aos lipídeos e ao DNA. A enzima catalase, um componente de defesa antioxidante, exerce duas funções importantes: a decomposição de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a água e oxigênio ($\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$) e a oxidação de compostos hidrogenados, como metanol, etanol, ácido fórmico, fenóis (NASO et al., 2011).

A Tabela 3 mostra os efeitos do 5TIO1 na atividade da catalase em áreas cerebrais de camundongos adultos. Os resultados indicam um aumento significativo ($p < 0,05$) da atividade dessa enzima no hipocampo (136,43; 152,74 e 145,99% nos grupos tratados com 5TIO1 nas doses de 0,1; 1,0 e 10,0 mg kg^{-1} , respectivamente) e no cerebelo (36,61; 46,04 e 42,14% nos grupos tratados com 5TIO1 nas doses de 0,1; 1,0 e 10,0 mg kg^{-1} , respectivamente) quando comparados com o grupo controle. No corpo estriado, os grupos tratados com o 5TIO1 nas doses de 0,1 e 1,0 mg kg^{-1} aumentaram a atividade da catalase em 5,37 e 36,72%, respectivamente, mas somente a dose de 10,0 mg kg^{-1} aumentou significativamente (57,72%) quando comparado com o grupo controle e com o 5TIO1 na dose de 0,1 mg kg^{-1} ($p < 0,05$). No córtex frontal, a atividade da catalase aumentou significativamente ($p < 0,05$) 32,87 e 51,17% para os grupos tratados com 5TIO1 nas doses de 1,0 e 10,0 mg kg^{-1} , respectivamente, de forma dose-dependente. Somente o 5TIO1 na dose de 0,1 mg kg^{-1} diminuiu em 31,54% a atividade da catalase no córtex frontal quando comparado ao grupo controle ($p < 0,05$).

A Tabela 4 mostra os efeitos do 5TIO1 na atividade da superóxido dismutase em áreas cerebrais de camundongos adultos. O 5TIO1 na dose de 0,1 mg kg^{-1} aumentou, significativamente, a atividade da superóxido dismutase no hipocampo (58,93%), no corpo estriado (8,33%), córtex frontal (14,54%) e cerebelo (22,29%) quando comparado ao grupo controle ($p < 0,05$). Além disso, o 5TIO1 na dose de 1,0 mg kg^{-1} aumentou significativamente ($p < 0,05$) em 40,18 e 8,64% a atividade da Mn-SOD no hipocampo e no córtex frontal,

respectivamente, quando comparado ao controle. Por outro lado, a dose de 10,0 mg kg⁻¹ não apresentou modulação positiva dessa enzima em nenhuma área investigada.

Tabela 3. Atividade da enzima catalase no hipocampo, corpo estriado, córtex frontal e cerebelo de camundongos adultos tratados com 5TIO1 nas doses de 0,1; 1,0 e 10,0 mg kg⁻¹.

Grupos	Catalase (U µg de proteína ⁻¹)			
	Hipocampo	Corpo estriado	Córtex frontal	Cerebelo
Veículo	14,22 ± 0,58	19,35 ± 0,17	22,51 ± 0,14	24,61 ± 0,16
5TIO1 0,1	33,62 ± 0,95 ^a	20,39 ± 1,06	15,41 ± 0,93 ^a	33,62 ± 0,95 ^a
5TIO1 1,0	35,94 ± 0,97 ^a	26,36 ± 1,87	29,91 ± 2,09 ^{a,b}	35,94 ± 0,97 ^a
5TIO1 10,0	34,98 ± 1,22 ^a	30,52 ± 2,69 ^{a,b}	34,03 ± 1,25 ^{a,b,c}	34,98 ± 1,22 ^a

Os valores representam a média ± E.P.M. do número de animais utilizados nos experimentos (n=7 por grupo). ^ap<0,001, quando comparados ao grupo controle (ANOVA e teste *t*-Student–Newman–Keuls como *post hoc* teste); ^bp<0,001, quando comparados ao grupo 5TIO1 0,1 (ANOVA e teste *t*-Student–Newman–Keuls como *post hoc* teste). ^cp<0,001, quando comparados ao grupo 5TIO1 1,0 (ANOVA e teste *t*-Student–Newman–Keuls como *post hoc* teste).

Fonte: Arquivo pessoal.

Tabela 4. Atividade da enzima superóxido dismutase no hipocampo, corpo estriado, córtex frontal e cerebelo de camundongos adultos tratados com 5TIO1 nas doses de 0,1; 1,0 e 10,0 mg kg⁻¹.

Grupos	Superóxido dismutase (U µg de proteína ⁻¹)			
	Hipocampo	Corpo estriado	Córtex frontal	Cerebelo
Veículo	2,24 ± 0,15	2,64 ± 0,19	2,20 ± 0,03	3,23 ± 0,13
5TIO1 0,1	3,56 ± 0,62 ^a	2,86 ± 0,11 ^a	2,52 ± 0,09 ^a	3,95 ± 0,70 ^a
5TIO1 1,0	3,14 ± 0,16 ^a	2,54 ± 0,34	2,39 ± 0,17 ^a	2,81 ± 0,74
5TIO1 10,0	2,16 ± 0,03	2,42 ± 0,14	2,17 ± 0,13	2,70 ± 0,51

Os valores representam a média ± E.P.M. do número de animais utilizados nos experimentos (n=7 por grupo). ^ap<0,001, quando comparados ao grupo controle (ANOVA e teste *t*-Student–Newman–Keuls como *post hoc* teste).

Fonte: Arquivo pessoal.

Os resultados (Tabela 3) sugerem que pode haver um aumento da atividade da catalase no cerebelo, córtex frontal, estriado e hipocampo, em ordem decrescente, indicando que esta enzima pode exercer, mais especificamente, um papel protetor nas duas primeiras regiões em relação as outras áreas investigadas em animais tratados apenas com veículo. Alper e

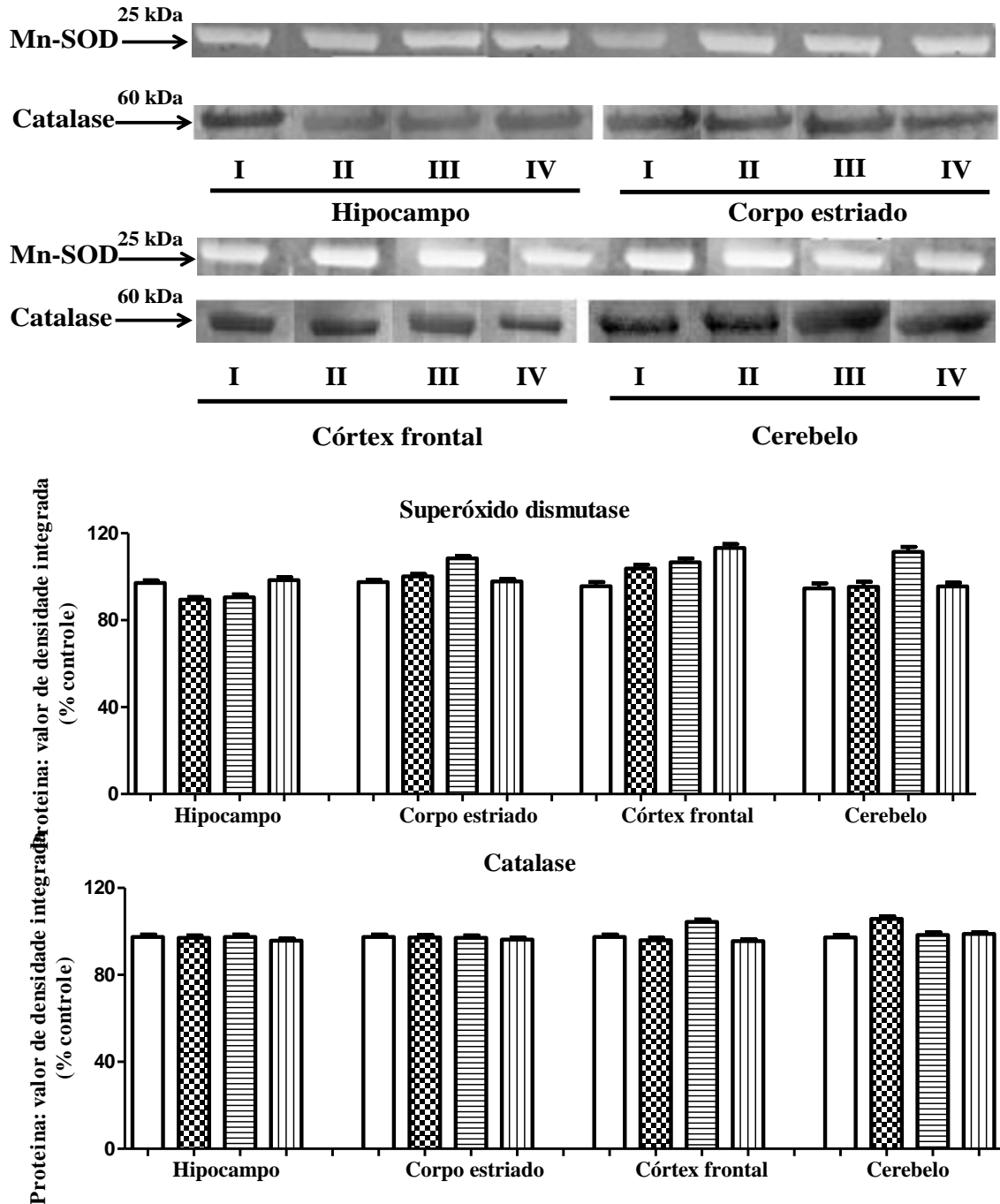
colaboradores (1998) também observaram que a atividade da catalase é maior no cerebelo e no córtex frontal de roedores. Tratando-se da atividade da superóxido dismutase (Tabela 4), esta foi maior no cerebelo e no corpo estriado, indicando uma melhor atividade dessa enzimas nestas áreas. Portanto, a atividade mais elevada de ambas as enzimas foi observada no cerebelo em animais tratados apenas com veículo; este resultado foi semelhante aos dados obtidos com roedores descritos por Fortunato e colaboradores (2006).

Analisando os grupos tratados com 5TIO1, a maior a atividade da catalase (Tabela 3) foi no hipocampo e no cerebelo para a dose de $1,0 \text{ mg kg}^{-1}$; e no corpo estriado e no córtex frontal para a dose de $10,0 \text{ mg kg}^{-1}$. Além disso, o 5TIO1 na dose de $0,1 \text{ mg kg}^{-1}$ aumentou a atividade da catalase em todas as áreas, exceto no córtex frontal. Após revisão da literatura, pode ser verificado que esse estudo apresenta, pela primeira vez, os resultados sobre estresse oxidativo em diferentes áreas cerebrais de camundongos, o que dificulta a comparação com outros estudos, uma vez que esses dados são inéditos para as áreas investigadas por meio da modulação desse novo composto. Assim, esse trabalho motiva a área da Pesquisa & Desenvolvimento de novos fármacos para danos moleculares envolvidos nas neuropatologias.

A atividade da superóxido dismutase (Tabela 4) foi modulada positivamente pelo 5TIO1 na dose de $0,1 \text{ mg kg}^{-1}$ em todas as áreas do cérebro, especialmente, no hipocampo e no cerebelo. No entanto, não houve alteração significativa para a dose de $10,0 \text{ mg kg}^{-1}$ quando comparado com veículo e as outras doses. Portanto, não se observou um efeito dose-dependente, sugerindo que em doses mais elevadas de 5TIO1 pode haver uma saturação desta atividade enzimática. Além disso, deve-se notar que o 5TIO1 na dose de $1,0 \text{ mg kg}^{-1}$ aumentou a atividade da superóxido dismutase apenas no hipocampo e no córtex frontal, indicando que 5TIO1 exerce seu possível efeito antioxidante pela modulação da Mn-SOD nestas áreas. Como foi mencionado anteriormente, estes resultados inéditos contribuirão significativamente para preencher as lacunas sobre as causas e consequências do estresse oxidativo modulados por compostos derivados do tiofeno.

De modo a confirmar os resultados das atividades enzimáticas (Mn-SOD e CAT) em diferentes áreas cerebrais de camundongos, foi também realizada o teste de *Western blot* (Figura 2). Após 24 h de tratamento com 5TIO1 ($0,1$; $1,0$ e $10,0 \text{ mg kg}^{-1}$) a atividade total de Mn-SOD e CAT não foram alteradas em comparação com o grupo de controle. Da mesma forma, o 5TIO1 não afetou o mRNA da Mn-SOD e da CAT, bem como os níveis de proteína, tal como evidenciado pelas análises de imunotransferência no hipocampo, corpo estriado, córtex frontal e cerebelo de camundongos.

Figura 2. Expressão da catalase e superóxido dismutase no hipocampo, corpo estriado, córtex frontal e cerebelo de camundongos adultos tratados com 5TIO1 nas doses de 0,1; 1,0 e 10,0 mg kg⁻¹.



Camundongos machos foram tratados, via intraperitoneal, com 0,25 mL de Tween 80 0,05% dissolvido em salina 0,9% (veículo – grupo controle) e o 5TIO1 emulsionado com o veículo nas doses de 0,1; 1,0 e 10,0 mg kg⁻¹. Os animais foram observados durante 24 h, em seguida, eutanaziados. O conteúdo de proteína foi de 10 Ag. **I** – grupo controle; **II** - 5TIO1 0,1 mg kg⁻¹; **III** - 5TIO1 1,0 mg kg⁻¹; **IV** - 5TIO1 10,0 mg kg⁻¹. Os resultados representam a média ± E.P.M. do número de animais utilizados nos experimentos (n=4 por grupo), convertido em porcentagem em relação ao controle (fixado em 100%). A análise estatística foi feita por análise de variância simples (*one-way* ANOVA) e teste *t*-Student–Newman–Keuls como *post hoc* teste.

Fonte: Arquivo pessoal.

Os resultados expressos em unidades arbitrárias relativas à variação da expressão de RNAm (Figura 2), indicam que os níveis de proteínas da Mn-SOD para o 5TIO1 nas doses de 0,1; 1,0 e 10,0 mg kg⁻¹ foram, respectivamente, 89,42 ± 1,24%, 90,58 ± 1,24% e 98,46 ± 1,24% no hipocampo; 100,2 ± 1,04%, 108,4 ± 1,04% e 97,9 ± 1,04% no corpo estriado; 103,7 ± 1,85%, 106,6 ± 1,85% e 113,2 ± 1,85% no córtex frontal; e 95,36 ± 2,31%, 111,4 ± 2,31% e 95,54 ± 1,71% no cerebelo. De forma análoga, os níveis de proteínas da CAT para o 5TIO1 nas doses de 0,1; 1,0 e 10,0 mg kg⁻¹ foram, respectivamente, 97,07 ± 1,11%, 97,41 ± 1,11% e 95,78 ± 0,83% no hipocampo; 97,23 ± 1,12%, 97,05 ± 1,12% e 96,27 ± 0,83% no corpo estriado; 95,94 ± 1,09%, 104,4 ± 1,09% e 95,52 ± 0,81% no córtex frontal; e 105,7 ± 1,19%, 98,34 ± 1,19% e 98,8 ± 0,88% no cerebelo.

As atividades totais da catalase e da superóxido dismutase não se alteraram após o tratamento com 5TIO1 (Figura 2). Portanto, os dados do teste de *Western blot* não demonstraram evidências para a *upregulation* dessas enzimas antioxidantes (Mn-SOD e CAT) após a administração deste composto. Além disso, estes resultados reforçam a hipótese de que ocorreu apenas um aumento das atividades enzimáticas estudadas, uma vez que não houve alteração no conteúdo de proteína de Mn-SOD e CAT no hipocampo, corpo estriado, córtex frontal e cerebelo após 24 h de tratamento com 5TIO1.

CONCLUSÃO

Este trabalho demonstrou que 5TIO1 diminuiu os níveis de peroxidação lipídica e do conteúdo de nitrito, e aumentou as atividades das enzimas catalase e superóxido dismutase. Em nosso conhecimento, estes efeitos do 5TIO1 sobre o estresse oxidativo observado no cérebro de camundongos não foram relatados antes. Assim, estes achados podem ter implicações importantes para a compreensão do mecanismo de doenças neurodegenerativas, promovendo novos avanços no desenvolvimento de antiepiléticos, antidepressivos e ansiolíticos mais seguros e eficazes. Além disso, o 5TIO1 pode proteger o cérebro contra danos neuronais regularmente observados em neuropatologias. A investigação do 5TIO1 contra a apoptose, necrose e / ou autofagia observados em desordens mentais já está em andamento para confirmar suas propriedades antioxidantes e seus efeitos neuroprotetores.

REFERÊNCIAS

ABU-HASHEM, A.A.; EL-SHEHRY, M.F.; BADRIA, F.A-E. Design and synthesis of novel thiophenecarbohydrazide, thienopyrazole and thienopyrimidine derivatives as antioxidant and antitumor agents. **Acta Pharmaceutica**, v. 60, p. 311-323, 2010.

ADIBHATLA, R.M.; HATCHER, J.F. Altered lipid metabolism in brain and disorders. **Subcellular Biochemistry**, v. 49, p. 241-268, 2008.

AGUIAR, C.C.T.; ALMEIDA, A.B.; ARAÚJO, P.V.P.; ABREU, R.N.D.C.; CHAVES, E.M.C.; VALE, O.C.; MACÊDO, D.S.; WOODS, D.J.; FONTELES, M.M.F.; VASCONCELOS, S.M.M. Oxidative stress and epilepsy: literature review. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2012, p. 1-12, 2012.

ALPER, G.; SÖZMEN, E.Z.; KANIT, L.; MENTES, G.; ERSÖZ, B.; KUTAY, F.Z. Age-related alteration in superoxide dismutase and catalase activities in rat brain. **Turkish Journal of Medical Sciences**, v. 28, p. 491-494, 1998.

AMR, A.E-G.E.; SHERIF, M.H.; ASSY, M.G.; AL-OMAR, M.A.; RAGAB, I. Antiarrhythmic, serotonin antagonist and antianxiety activities of novel substituted thiophene derivatives synthesized from 2-amino-4,5,6,7-tetrahydro-N-phenylbenzol[b]thiophene-3-carbozamide. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.45, p. 5935-5942, 2010.

ANDERSEN, J.K. Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? **Nature Reviews Neuroscience**, v. 5, S18-S25, 2004.

ARTHUR, J.R., BOYNE, R. Superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities in neutrophils from selenium deficient and copper deficient cattle. **Life Sciences**, v. 36, p. 1569-1575, 1985.

ASTIZ, M.; ARNAL, N.; ALANIZ, M.J.T.; MARRA, C.A. Occupational exposure characterization in professional sprayers: clinical utility of oxidative stress biomarkers. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 32, p. 249-258, 2011.

BATTIN, E.E.; BRUMAGHIM, J.L. Metal specificity in DNA damage prevention by sulfur antioxidants. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 102, p. 2036-2042, 2008.

BOUAYED, J.; BOHN, T. Exogenous antioxidants – double-edged swords in cellular redox state. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 3, n. 4, p. 228-237, 2010.

BOUAYED, J.; RAMMAL, H.; SOULIMANI, R. Oxidative stress and anxiety. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2, n. 2, p. 63-67, 2009.

CHANCE, B.; MAEHLY, A.C. Assay of catalases and peroxidases. **Methods in Enzymology**, v. 2, p. 764-768, 1955.

CHUNG, K.K.K.; DAVID, K.K. Emerging roles of nitric oxide in neurodegeneration. **Nitric Oxide**, v. 22, p. 290-295, 2010.

DRAPER, H.H.; HADLEY, M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, v. 186, p. 421-431, 1990.

EL-SHARKAWY, K.A.; EL-SAYED, N.N.E.; ZAKI, M.Y. Uses of 2-amino-5,6-dihydro-4*H*-cyclopenta[*b*]thiophene-3-carbonitrile in the synthesis of heterocyclic compounds with anticonvulsant, behavioral and CNS antidepressant activities. **International Research Journal of Pure & Applied Chemistry**, v. 2, n. 1, p. 91-104, 2012.

FORTUNATO, J.J.; FEIER, G.; VITALI, A.M.; PETRONILHO, F.C.; DAL-PIZZOL, F.; QUEVEDO, J. Malathion-induced oxidative stress in rat brain regions. **Neurochemical Research**, v. 31, p. 671-678, 2006.

FREITAS, R.M.; VASCONCELOS, S.M.M.; SOUZA, F.C.F.; VIANA, G.S.B.; FONTELES, M.M.F. Oxidative stress in the hippocampus after pilocarpine-induced status epilepticus in Wistar rats. **The FEBS Journal**, v. 272, p. 1307-1312, 2005.

GREEN, L.C.; TANNENBAUM, S.R.; GOLDMAN, P. Nitrate synthesis in the germfree and conventional rat. **Science**, v. 212, p. 56-58, 1981.

GUPTA, A.; BHATT, M.L.B.; MISRA, M.K. Lipid peroxidation and antioxidant status in head and neck squamous cell carcinoma patients. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2, n. 2, p. 68-72, 2009.

KOOB, A.O.; BRUNS, L.; PRASSLER, C.; MASLIAH, E.; KLOPSTOCK, T.; BENDER, A. Protein analysis through Western blot of cells excised individually from human brain and muscle tissue. **Analytical Biochemistry**, v. 425, p. 120-124, 2012.

LIMÓN-PACHECO, J.; GONSEBATT, M.E. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. **Mutation Research**, v. 674, p. 137-147, 2009.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurements with the folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, 265–275, 1951.

MATSUNAMI, T.; SATO, Y.; YUKAWA, M. Antioxidant status and lipid peroxidation in diabetic rats under hyperbaric oxygen exposure. **Physiological Research**, v. 59, p. 97-104, 2010.

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. **Latin American Journal of Pharmacy**, v.30, p.1492-1499, 2011.

MILITÃO, G.C.G.; FERREIRA, P.M.P.; FREITAS, R.M. Effects of lipoic acid on oxidative stress in rat striatum after pilocarpine-induced seizures. **Neurochemistry International**, v. 56, p. 16–20, 2010.

MINELLI, C.; GÖGELE, M. The role of antioxidant gene polymorphism in modifying the health effects of environmental exposures causing oxidative stress: a public health perspective. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 51, p. 925-930, 2011.

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

NASO, F.C.; DIAS, A.S.; PORAWSKI, M.; MARRONI, N.A.P. Exogenous superoxide dismutase: action on liver oxidative stress in animals with streptozotocin-induced diabetes. **Experimental Diabetes Research**, v. 2011, p. 1-6, 2011.

NG, F.; BERK, M.; DEAN, O.; BUSH, A.I. Oxidative stress in psychiatric disorders evidence base and therapeutic implications. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 11, p. 851-876, 2008.

NIKI, E. Assessment of antioxidant capacity *in vitro* and *in vivo*. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 49, p. 503-515, 2010.

NOBRE-JÚNIOR, H.V.; FONTELES, M.M.F.; FREITAS, R.M. Acute seizure activity promotes lipid peroxidation, increased nitrite levels and adaptive pathways against oxidative

stress in the frontal cortex and striatum. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2, n. 3, p. 1-8, 2009.

OKUNIEFF, P.; SWARTS, S.; KENG, P.; SUN, W.; WANG, W.; KIM, J.; YANG, S.; ZHANG, H.; LIU, C.; WILLIAMS, J.P.; HUSER, A.K.; ZHANG, L. Antioxidants reduce consequences of radiation exposure. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 614, p. 165-178, 2008.

PALA, F.S.; GÜRKAN, H. The role of free radicals in ethiopathogenesis of diseases. **Advances in Molecular Biology**, v. 1, p. 1-9, 2008.

RAMMAL, H.; BOUAYED, J.; YOUNOS, C.; SOULIMANI, R. Evidence that oxidative stress is linked to anxiety-related behavior in mice. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 22, p. 1156-1159, 2008.

REED, T.T. Lipid peroxidation and neurodegenerative disease. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 51, p. 1302-1319, 2011.

SABINO, E. B. **Desenvolvimento de sistema de vetorização a base de novo derivado tiofênico**. 2011. 122f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2011.

SALIM, S.; SARRAJ, N.; TANEJA, M.; SAHA, K.; TEJADA-SIMON, M.V.; CHUGH, G. Moderate treadmill exercise prevents oxidative stress-induced anxiety-like behavior in rats. **Behavioural Brain Research**, v. 208, p. 545-552, 2010a.

SALIM, S.; ASGHAR, M.; CHUGH, G.; TANEJA, M.; XIA, Z.; SAHA, K. Oxidative stress: a potential recipe for anxiety, hypertension and insulin resistance. **Brain Research**, v. 1359, p. 178-185, 2010b.

SALIM, S.; ASGHAR, M.; TANEJA, M.; HOVATTA, I.; CHUGH, G.; VOLLERT, C.; VU, A. Potential contribution of oxidative stress and inflammation to anxiety and hypertension. **Brain Research**, v. 1404, p. 63-71, 2011.

SANTOS, I.M.S.; TOMÉ, A.R.; SALDANHA, G.B.; FERREIRA, P.M.P.; MILITÃO, G.C.G.; FREITAS, R.M. Oxidative stress in the hippocampus during experimental seizures can be ameliorated with the antioxidant ascorbic acid. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2, n. 4, p. 1-8, 2009.

SEDELNIKOVA, O.A.; REDON, C.E.; DICKEY, J.S.; NAKAMURA, A.J.; GEORGAKILAS, A.G.; BONNER, W.M. Role of oxidatively induced DNA lesions in human pathogenesis. **Mutation Research**, v. 704, p. 152-159, 2010.

SOUZA, C.G.; MOREIRA, J.D.; SIQUEIRA, I.R.; PEREIRA, A.G.; RIEGER, D.K.; SOUZA, D.O.; SOUZA, T.M.; PORTELA, L.V.; PERRY, M.L.S. Highly palatable diet consumption increases oxidation in rat frontal cortex and anxiety-like behavior. **Life Sciences**, v. 81, p. 198-203, 2007.

SUEISHI, Y.; HORI, M.; KITA, M.; KOTAKE, Y. Nitric oxide (NO) scavenging capacity of natural antioxidants. **Food Chemistry**, v. 129, p. 866–870, 2011.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M.T.D.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, p. 44-84, 2007.

VAUZOUR, D. Dietary polyphenols as modulators of brain functions: biological actions and molecular mechanisms underpinning their beneficial effects. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2012, p 1-16, 2012.

VOLLERT, C.; ZAGAAR, M.; HOVATTA, I.; TANEJA, M.; VU, A.; DAO, A.; LEVINE, A.; ALKADHI, K.; SALIM, S. Exercise prevents sleep deprivation-associated anxiety-like behavior in rats: potential role of oxidative stress mechanisms. **Behavioural Brain Research**, v. 224, p. 233-240, 2011.

WATERBORG, J.H. The Lowry method for protein quantification. In: WALKER, J.M. **The protein protocols Handbook**. 2 end. New Jersey: Humana Press, 2002. p. 7-10.

WEYDERT, C.J.; CULLEN, J.J. Measurement of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in cultured cells and tissue. **Nature Protocols**, v. 5, p. 51-66, 2010.

YEOMAN, M.; SCUTT, G.; FARAGHER, R. Insights into CNS ageing from animal models senescence. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 13, p. 435-445, 2012.

6. CAPÍTULO III

Estudo de pré-formulação de uma nova entidade química para o tratamento da ansiedade: caracterização físico-química, análise térmica e estudo compatibilidade

FORTES, AC^a; VILARINHO, ACSG^a; ALVES, LDS^b; ROLIM, LA^b; MEDONÇA-JÚNIOR, FJB^c; ROLIM-NETO, PJ^b; SOARES-SOBRINHO, JL^d; SOARES, MFLR^d

^aLaboratório de Pesquisa em Cosméticos e Medicamentos do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí, Brasil.

^bLaboratório de Tecnologia dos Medicamentos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

^cLaboratório de Síntese e Vetorização de Moléculas, Universidade Estadual da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brasil.

^dNúcleo de Controle de Qualidade de Medicamentos Correlatos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

RESUMO

2-[(2,6-diclorobenzilideno) amino]-5,6-diidro-4H-ciclopenta [b] tiofeno-3-carbonitrila, denominado de 5TIO1, é uma nova entidade química de baixa solubilidade em água com um grande potencial para tornar-se um fármaco ansiolítico. O objetivo desse estudo foi realizar estudos de pré-formulação do 5TIO1, utilizando excipientes consagrados na indústria farmacêutica para a melhoria da solubilidade - as ciclodextrinas naturais α , β e γ . A autenticidade do 5TIO1, com pureza de 98,96%, foi analisada por ressonância magnética nuclear e espectroscopia na região do infravermelho (IV). A microscopia eletrônica de varredura e a difração de raios-X (DRX) indicaram um perfil cristalino para o 5TIO1. A calorimetria exploratória diferencial sugeriu a presença de polimorfos e a termogravimetria (TG) evidenciou um perfil degradativo de fase única, iniciando em 227 °C. O diagrama de solubilidade de fases mostrou um incremento de solubilidade linear do 5TIO1 para todas as ciclodextrinas, sendo que a β -CD apresentou uma melhor constante de associação. A caracterização dos complexos de inclusão no estado sólido foi realizada por TG, DRX e IV, as quais indicaram a complexação do 5TIO1 com todas ciclodextrinas. O estudo de

compatibilidade foi avaliado por TG, o qual não indicou nenhuma incompatibilidade e nem aumento da estabilidade. Por fim, o teste de dissolução comprovou o incremento da solubilidade do 5TIO1 através da complexação com ciclodextrinas. Os resultados sugerem a formação de complexos e indicam que estes podem apresentar uma forma alternativa promissora para o desenvolvimento de formas farmacêuticas sólidas do 5TIO1 com propriedades biofarmacêuticas adequadas.

Palavras-chave: tiofeno; ciclodextrinas; pré-formulação; solubilidade.

ABSTRACT

2-[(2,6-dichlorobenzylidene)amino]-5,6-dihydro-4*H*-cyclopenta[*b*]thiophene-3-carbonitrile, named 5TIO1, is a poorly water-soluble new chemical entity with a great potential to become an anxiolytic drug. The aim of this study was to perform 5TIO1's preformulation studies using consolidated excipients in the pharmaceutical industry devoted to solubility improvement – the natural cyclodextrins α , β e γ . The 5TIO1's authenticity, with purity of 98.96%, was analyzed by nuclear magnetic resonance and infrared spectroscopy (IR). The scanning electron microscopy and X-ray diffraction (XRD) indicated a crystalline profile for 5TIO1. The differential scanning calorimetry suggested the presence of polymorphs and the thermogravimetry (TG) showed a single phase profile degradative, starting at 227 ° C. The phase solubility diagram showed a linear increase in the 5TIO1's solubility for all cyclodextrins, and the β -CD had a better association constant. The characterization of the inclusion complexes in the solid-state was performed by TG, XRD and IR, which indicated the 5TIO1's complexation with all cyclodextrins. The compatibility study was evaluated by TG, which indicated no incompatibility and no increase in stability. Finally, the dissolution test demonstrated the solubility increase of 5TIO1 by complexation with cyclodextrins. These results suggest the formation of complexes and indicate that these may provide a promising alternative way of developing solid dosage forms of 5TIO1 with suitable biopharmaceutical properties.

Keywords: thiophene; cyclodextrins; solubility; preformulation

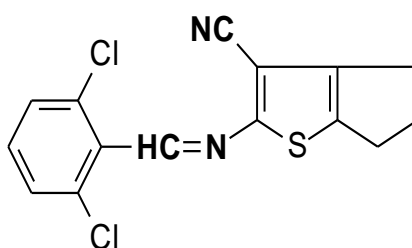
INTRODUÇÃO

A ansiedade consiste em um estado de tensão provocado em antecipação a uma ameaça ou a uma potencial ameaça. As sensações de ansiedade são uma parte normal da

experiência humana, mas a ansiedade excessiva ou inadequada pode se tornar uma doença (GROSS, HEN, 2004; WU, KIM, ZHUO, 2008). De acordo com pesquisas, os transtornos de ansiedade são a classe mais prevalente de transtornos psiquiátricos na população em geral (KESSLER et al., 2009). Dentre a classe de fármacos usados nesses tratamentos estão os benzodiazepínicos, cuja eficácia terapêutica é limitada devido a problemas como: sedação, amnésia retrógrada, relaxamento muscular, tolerância e dependência física (RUDOLPH, KNOFLACH, 2011). Assim, justifica-se a busca de agentes mais seguros e eficazes para o tratamento da ansiedade (GOES, ANTUNES, TEXEIRA-SILVA, 2009).

Atualmente, derivados tiofênicos têm atraído o interesse da indústria farmacêutica, em especial, como agentes ansiolíticos (AMR et al., 2010). Neste contexto, o 2-[(2,6-diclorobenzilideno) amino]-5,6-diidro-4H-ciclopenta [b] tiofeno-3-carbonitrila, também chamado de 5TIO1 (Figura 1), é uma nova entidade química sintetizada por uma reação de duas etapas, partindo da reação de Gewald, seguida pela condensação com 2,6-diclorobenzaldeído (MENDONÇA-JÚNIOR et al., 2011). Em estudos preliminares, o 5TIO1 apresentou atividade ansiolítica em ensaios neurofarmacológicos e uma baixa solubilidade aquosa (SABINO, 2011). Uma ferramenta farmacotécnica muito utilizada para solubilização de fármacos é a complexação com ciclodextrinas (CDs), viabilizando, assim, uma forma farmacêutica eficaz (DAVIS, BREWSTER, 2004).

Figura 1. Estrutura molecular do 5TIO1.



Fonte: Arquivo pessoal.

A transição da descoberta de um candidato à fármaco para um novo produto farmacêutico começa com a investigação das propriedades físico-químicas dessa nova molécula. Esta primeira fase é conhecida como pré-formulação (LAU, 2011). Além disso, a análise da interação entre fármaco e excipientes está incluída nesse estudo, ajudando a racionalizar e otimizar a futura formulação (PANDEY, RATH, DWIVEDI, 2011). Para

realizar a investigação dessas propriedades, as técnicas termoanalíticas estão sendo cada vez mais utilizadas nas indústrias farmacêuticas para diversos fins, incluindo caracterização térmica, estudos de estabilidade e compatibilidade (SOARES-SOBRINHO et al., 2010).

O objetivo desse estudo foi realizar estudos de pré-formulação do 5TIO1, utilizando excipientes consagrados na indústria farmacêutica para a melhoria da solubilidade - as CDs α , β e γ .

MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais

O 5TIO1 foi fornecido pelo Laboratório de Síntese e Vetorização de Moléculas da Universidade Federal da Paraíba, na forma de um cristal amarelo, com rendimento de síntese de 89%, ponto de fusão 159-160°C e R_f 0,54 (*n*-Hex./AcOEt. 8,5:1,5). As ciclodextrinas naturais (α , β e γ) foram adquiridas da ISP Technologies. Para a preparação das soluções utilizou-se água de grau para injetáveis e todos os solventes utilizados foram de grau analítico.

Ressonância Magnética Nuclear

Os espectros foram obtidos com um espectrômetro VARIAN Unity Plus 300, utilizando uma sonda VT-CP/MAS, operando a 299,9 MHz para o núcleo de Hidrogênio – 1 (^1H) e 75,4 MHz para o núcleo de Carbono – 13 (^{13}C).

Espectroscopia na Região de Infravermelho com Transformada de Fourier (IV-TF)

O espectro de infravermelho foi obtido utilizando o equipamento PerkinElmerL® (Spectrum 400) com dispositivo de reflectância total atenuada (ATR) (Miracle ATR, Pike Technologies Spectroscopic Creativity) com cristal de selênio. As amostras foram transferidas diretamente para o compartimento do dispositivo de ATR. Os espectros foram obtidos de 650 a 4000 cm^{-1} e resolução de 4 cm^{-1} .

Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A avaliação da morfologia do 5TIO1 foi realizada através de Microscopia Eletrônica de Varredura utilizando-se um microscópio Jeol® JSM-5900, após fixação em fita de dupla

face de carbono e metalização com ouro por 15 min (Metalizador Baltec[®] SCD 050). As eletromicrografias foram obtidas em uma câmara com tensão de excitação de 15 KV.

Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

Para o cálculo da pureza, amostras de 2 mg (± 0.2) foram colocadas em porta amostra de alumínio hermeticamente fechados submetidas a análise em Calorímetro de Varredura Shimadzu[®] DSC-60 interligado ao software Shimadzu[®] TA-60WS com atmosfera de nitrogênio de 50 mL min⁻¹ e na razão de aquecimento de 3 °C min⁻¹, na faixa de temperatura de 25-300 °C. As determinações foram realizadas em triplicata. Índio e zinco foram utilizados para calibrar a escala de temperatura e a resposta de entalpia.

Diagrama de solubilidade de fases

Os estudos de diagrama de fases foram realizados de acordo com trabalho de Higuchi e Connors (1965). Quantidades em excesso de 5TIO1 foram adicionadas em 10 mL de solução aquosa contendo concentrações crescentes de CDs - β CD (0,25%; 0,5%; 1%; 1,25%; 1,5%), α CD e γ CD (2%; 4%; 6%; 8%; 10%). Paralelamente foram preparadas amostras do fármaco apenas em água. As amostras foram submetidas à agitação mecânica em banho-maria (Banho Dubnoff, Nova Ética[®]), à temperatura de 25 °C por 72 h. Posteriormente, as amostras foram filtradas por meio de membranas filtrantes de poro de 0,45 μ m. A quantificação do 5TIO1 foi por meio de espectrofotometria UV (Varian[®] modelo Cary 30), no comprimento de onda de 301 nm, utilizando água como branco. Os experimentos foram realizados em triplicata. A constante de associação fármaco-ciclodextrina ($K_{1:1}$) foi calculada para a porção linear do diagrama assumindo uma estequiometria 1:1, utilizando a equação abaixo:

$$K_{1:1} = \frac{Slope}{S_0 \times (1 - Slope)} \quad (S_0: \text{solubilidade do 5TIO1 na ausência de CD}).$$

Preparo das misturas físicas

As misturas físicas foram preparadas através da homogeneização do 5TIO1 e da CD (1:1) num recipiente de vidro fechado.

Obtenção dos complexos de inclusão no estado sólido

Os complexos inclusão foram preparados na razão molar 1:1. Uma dispersão 5TIO1 e CD foi preparado numa solução etanol:água (2:8). Os complexos de inclusão foram obtidos por *spray drying*, através da eliminação dos solventes, pulverizando a dispersão num *spray dry* (Mini Spray Dryer B290 – Büchi) com temperatura de entrada de 160 °C, temperatura de saída de 89 °C, pressão de ar de pulverização de 55 mmHg.

Termogravimetria (TG) e Análise Térmica Diferencial (DTA)

A caracterização térmica através de termogravimetria/derivada termogravimétrica (TG/DTG) foi realizada em duplicata por meio de termobalança Shimadzu[®], modelo TGA Q60, em atmosfera de nitrogênio em fluxo de 50 mL min⁻¹, sendo a massa da amostra de cerca de 2,0 mg (\pm 0,2) de 5TIO1, acondicionadas em cadinho de alumina na faixa de temperatura de 25 a 400 °C na razão de aquecimento de 10 °C min⁻¹. Antes dos ensaios, verificou-se a calibração do instrumento empregando-se uma amostra de oxalato de cálcio.

Difração de raios-X (DRX)

O difratograma foi obtido no difratômetro Shimadzu[®] (X-Ray Diffractometer, LabX XRD-6000), equipado com ânodo de cobre, usando uma voltagem de 40 kv e uma corrente de 30 mA. A amostra foi analisada no intervalo de ângulo 2 θ de 5-75° a uma velocidade de digitalização de 2° min⁻¹. A amostra foi feita em suportes de vidro com uma fina camada de material do pó sem solvente.

Estudos de dissolução

Os estudos de dissolução foram realizados seguindo especificações do *Food and Drug Administration* (FDA) (1997) para fármacos pouco solúveis, utilizando pá como aparato, a 50 rpm e temperatura de 37 °C \pm 0,5 °C (USP, 2008). Para assegurar as condições de *sink* do método e aumentar a especificidade do ensaio de dissolução, o meio selecionado foi o suco gástrico simulado (ácido clorídrico mais cloreto de sódio, pH 1,2) com volume final de 900 mL. Amostras dos complexos e mistura física foram colocadas em cápsulas com o equivalente a 6.5 mg de 5TIO1. Os tempos de coleta foram de 5, 10, 15, 20, 30, 45 e 60 minutos onde, após filtração, determinou-se a concentração das amostras por espectrofotometria ($\lambda=301$ nm). Para cada sistema obtido 3 replicatas foram testadas. Os

perfis de dissolução foram avaliados utilizando-se eficiência de dissolução nos intervalos de 15 e 20 minutos (DE15 e DE20) (KHAN, RHODES, 1972).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

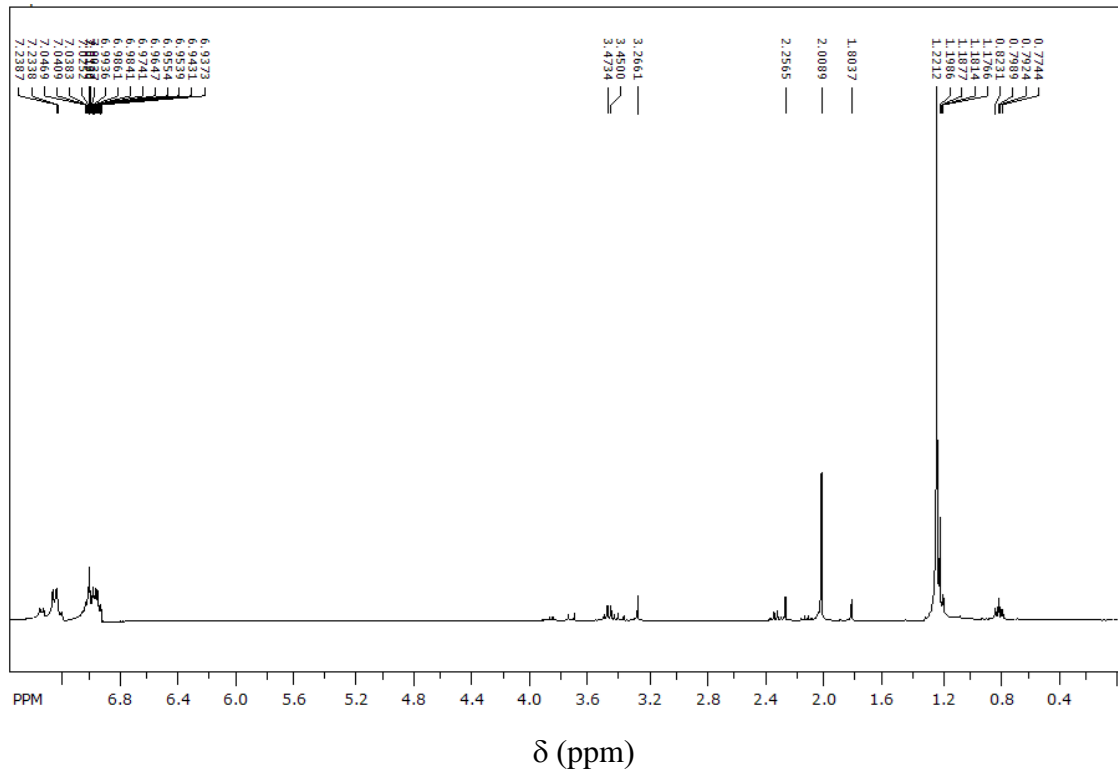
Identificação e caracterização do estado sólido do 5TIO1

Substâncias químicas referência são amplamente utilizadas no controle de qualidade de fármacos em análises quali e quantitativas (GAO, DING, HU, 2011). O 5TIO1 trata-se de uma nova entidade química, portanto não há no mercado uma substância padrão para auxiliar nos testes analíticos. Dessa forma, análises espectroscópicas (RMN e IV) auxiliaram na identificação do composto e sua pureza foi determinada através da calorimetria diferencial de varredura, assegurando, portanto, a autenticidade do 5TIO1. Além disso, procedeu-se a análise da morfologia do 5TIO1 no estado sólido através da microscopia eletrônica de varredura.

O espectro de RMN de ^1H (Figura 2) apresentou multipletos entre δ_{H} 2,00-2,25 relativos a hidrogênios em carbonos metilênicos e sinais entre δ_{H} 6,93-7,23 referentes a hidrogênios aromáticos. O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 3) apresentou três sinais em δ_{C} 27,4, 28,1 e 30,2 referentes a três carbonos CH_2 - região típica para carbonos com hibridização sp^3 . Em particular, o sinal do CH_2 mais próximo do átomo de enxofre encontra-se mais deslocado, em δ_{C} 30,2, devido a desblindagem eletrônica deste átomo eletronegativo. O sinal do carbono imínico ($\text{HC}=\text{N}$) encontra-se em δ_{C} 163,6 e o sinal característico de carbonitrila ($\text{C}\equiv\text{N}$) em δ_{C} 114,3. Os demais sinais entre δ_{C} 129,3-153,4 são referentes a carbonos dos anéis, sendo que de δ_{C} 129,3-136,2 correspondem aos carbonos do anel benzênico e de δ_{C} 139,4-153,4 correspondem aos carbonos do tiofeno.

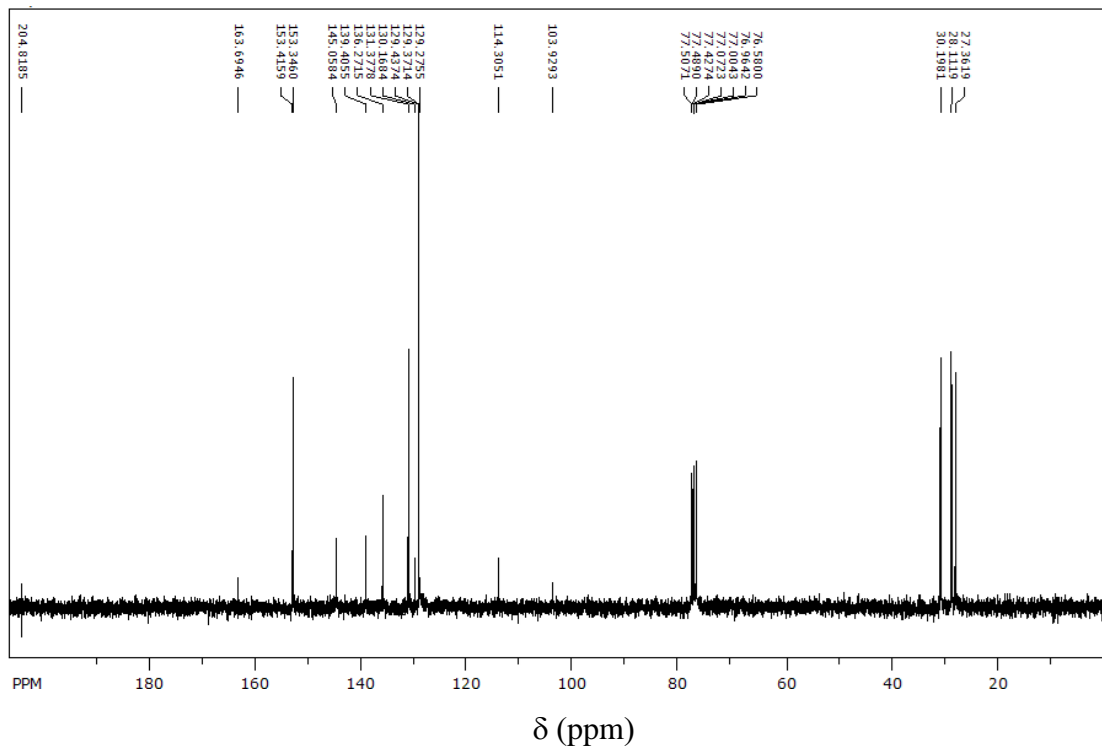
O espectro de infravermelho (Figura 4) apresenta como a principal banda o estiramento $\text{C}\equiv\text{N}$ (2218 cm^{-1}); e na região da impressão digital do infravermelho, as bandas entre 1590 e 1300 cm^{-1} correspondem a estiramentos ($\text{C}=\text{N}$, $\text{C}=\text{C}$, $\text{C}-\text{C}$) e deformações (CH e CH_2) e a região de 900 e 660 cm^{-1} abrangem as bandas correspondentes aos estiramentos $\text{C}-\text{Cl}$ e $\text{C}-\text{S}$.

Figura 2. Espectro de RMN de ^1H da molécula 5TIO1 (300 MHz) em CDCl_3



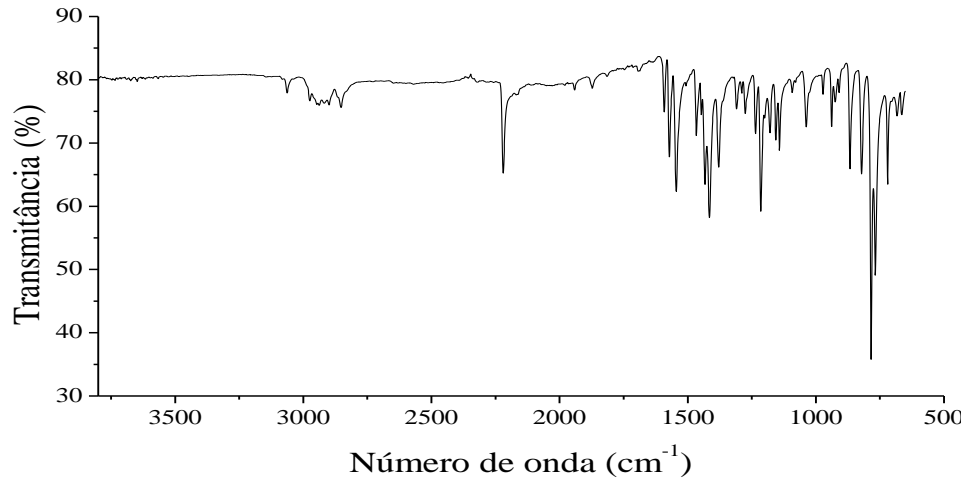
Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 3. Espectro de RMN de ^{13}C da molécula 5TIO1 (75 MHz) em CDCl_3



Fonte: Arquivo pessoal.

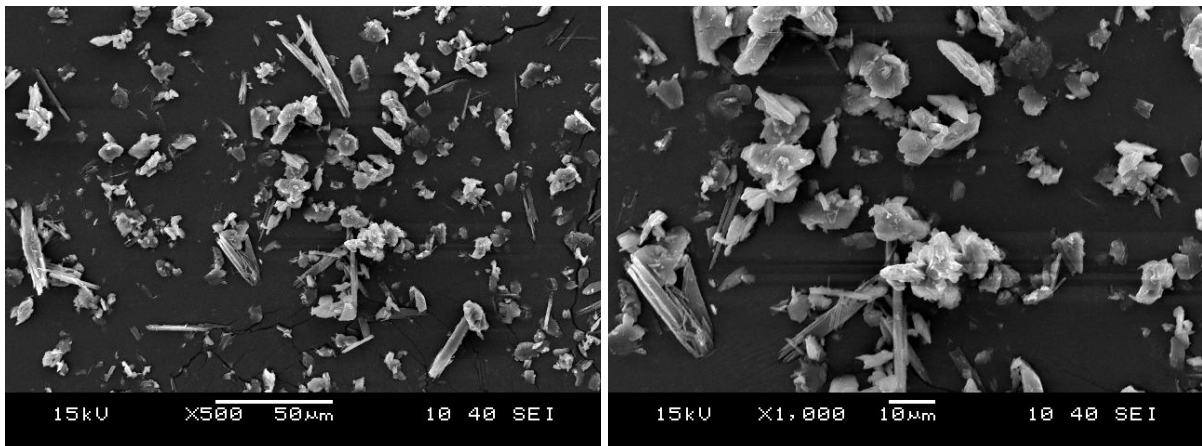
Figura 4. Espectro na região do infravermelho com transformada de Fourier do 5TIO1.



Fonte: Arquivo pessoal.

A eletromicrografia do 5TIO1 (Figura 5) mostra uma morfologia heterogênea, destacando-se estruturas morfológicas na forma de agulha, indicando um hábito cristalino. Um perfil cristalino sugere um composto estável termodinamicamente, entretanto com uma solubilidade menor em relação a um estado sólido amorfo (entropia alta). Do ponto de vista farmacotécnico, para um fármaco cristalino, é preciso avaliar se há fases cristalinas distintas (polimorfos), analisando suas propriedades físico-químicas e caracterização térmica, visto que tais fatores influenciam diretamente na escolha do processo de manufatura, na dissolução e estabilidade do medicamento que, por sua vez, impactam na segurança e eficácia (NEWMAN, BYRN, 2003; SINGHAL, CURATOLO, 2004).

Figura 5. Eletromicrografias do 5TIO1.



Fonte: Arquivo pessoal.

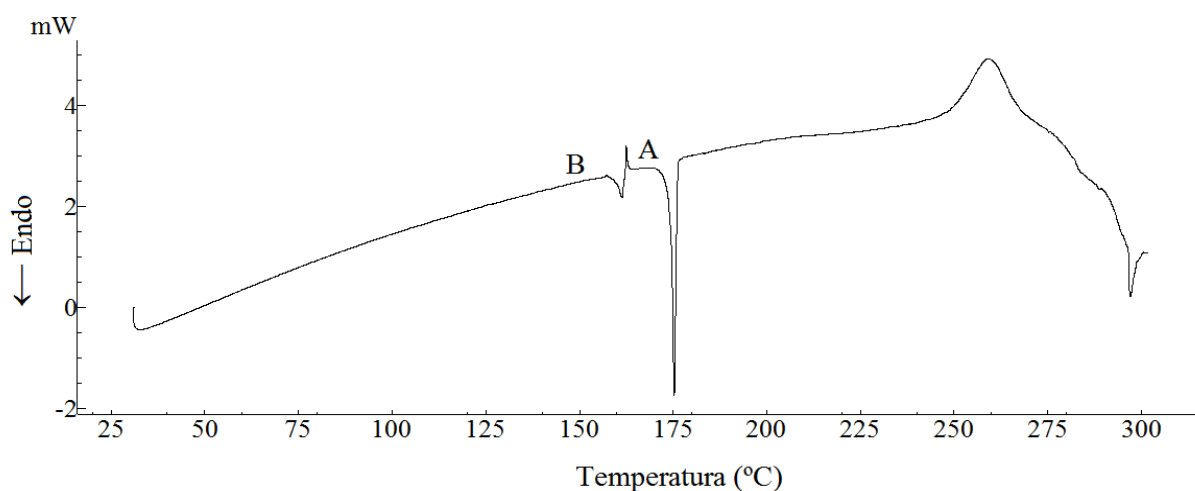
Pureza do 5TIO1

A pureza do 5TIO1 foi calculada através da aplicação da equação de Van't Hoff na linearização do evento de fusão, verificado em triplicata. Neste modelo a pureza é determinada através do desvio da linearidade do evento de fusão, o qual ocorre pela presença de impurezas. Conhecendo-se o desvio da linearidade, pode-se inferir sobre o fator de correção na linearização da reta. Assim, a pureza do 5TIO1 mostrou-se em torno de $98,96\% \pm 0,62\%$. Portanto, o 5TIO1 encontra-se dentro do limite de especificação 98 e 101% (base seca) para ser aprovado para em processos de produção de medicamentos (SOARES et al., 2011).

Caracterização térmica do 5TIO1

Na Figura 6, verifica-se dois eventos endotérmicos associados à fusão, nenhum dos quais associados à perda de massa (Figura 7). Na curva de DSC (Figura 6), observa-se que o 5TIO1 após fundir ($T_{\text{pico}} = 161\text{ }^{\circ}\text{C}$) a forma cristalina de menor ponto de fusão (B), ocorre uma recristalização (pico exotérmico) obtendo-se a forma cristalina estável A que funde numa temperatura maior ($T_{\text{pico}} = 175\text{ }^{\circ}\text{C}$), sugerindo que o 5TIO1 possui duas formas polimórficas monotrópicas (GIRON, 2001). Tal comportamento térmico, representando sistemas monotrópicos dimórficos, é semelhante ao da olanzapina (POLLA et al., 2005), fármaco derivado do tiofeno, semelhante ao 5TIO1 e também com atividade no Sistema Nervoso Central.

Figura 6. Curva de DSC do 5TIO1 obtida na razão de $3\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$

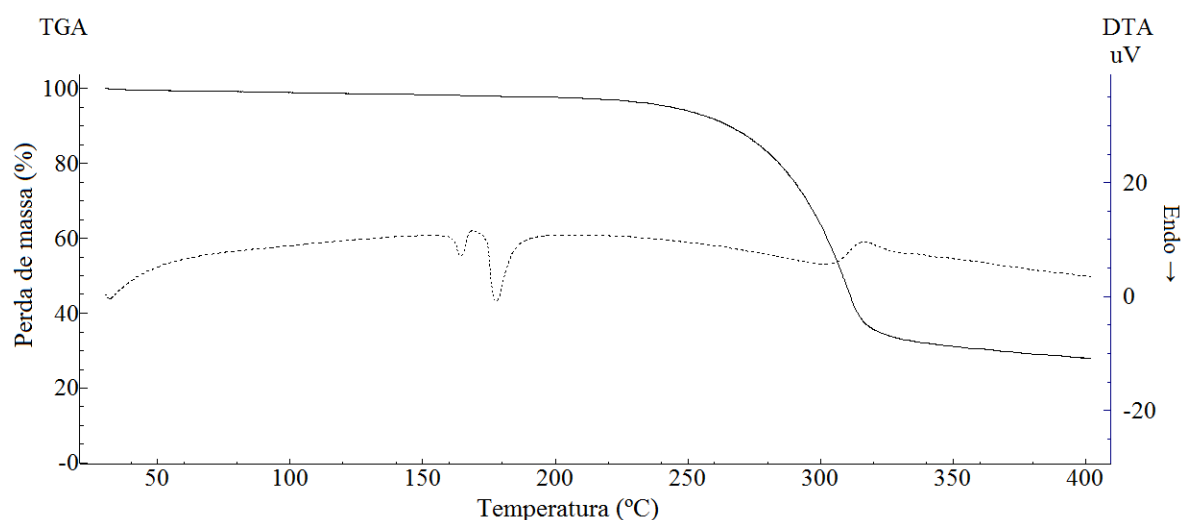


Fonte: Arquivo pessoal.

O conhecimento da natureza dos sistemas polimórficos deve ser parte integrante dos estudos de pré-formulação, de maneira a prever o comportamento da forma cristalina durante as etapas de fabricação. Nos sistemas monotrópicos, o polimorfo de maior ponto de fusão (forma A) é o mais estável, sendo que as transformações espontâneas são irreversíveis e podem ocorrer somente da forma metaestável (forma B) para estável (forma A). Em termos práticos, o formulador não precisa tomar nenhuma precaução caso o 5TIO1 esteja na sua forma mais estável. Entretanto, caso o formulador opte pela forma B que exibe maior energia e, portanto, maior solubilidade; será necessário tomar medidas (temperaturas baixa, condições secas, etc) para reduzir os efeitos cinéticos da transformação para forma mais estável (BERNSTEIN, DAVEY, HENCK, 1999; MAO, PINAL, MORRIS, 2005).

Na análise termogravimétrica (Figura 7), observou-se que a faixa de temperatura de degradação ficou entre 227 °C ($T_{inicial}$) e 338 °C (T_{final}), tendo um perfil degradativo de fase única e perda de massa de 64,46%. Através da análise do DTA observa-se dois picos endotérmicos um menos intenso em 165 °C (T_{pico}) e um mais intenso em 178 °C (T_{pico}), corroborando com a fusão da amostra evidenciada no DSC (Figura 6) e, em seguida, segue o evento da degradação do fármaco em 316 °C (T_{pico}).

Figura 7. Curva de TG e DTA do 5TIO1 obtida na razão de 10 °C.min⁻¹



Fonte: Arquivo pessoal.

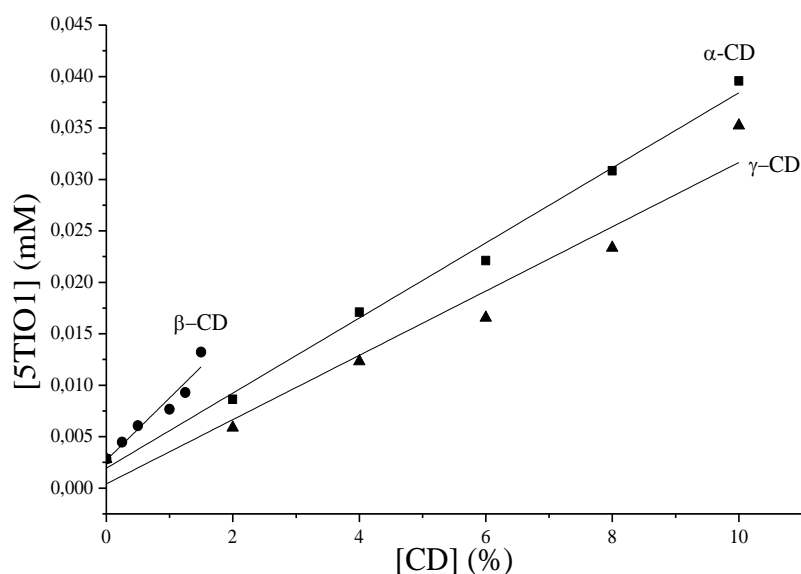
Diagrama de solubilidade de fases

A solubilidade em água (S_0) do 5TIO1 foi de 0,91 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Segundo o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (AMIDON et al., 1995), prospectando-se o 5TIO1 como um

fármaco, este só poderia ser considerado de alta solubilidade caso a sua maior dosagem fosse solúvel em 250 mL de meio aquoso numa faixa de pH de 1,0 a 7,5 sob temperatura de 37 °C. Portanto, sem nenhuma estratégia farmacotécnica para melhorar a solubilidade desse candidato a fármaco, o setor de pesquisa e desenvolvimento estaria limitado a trabalhar com uma dosagem de, no máximo, 0,2 mg de 5TIO1 para garantir que a absorção deste não fosse limitada pela taxa de dissolução. Entretanto, apesar de hipotético, tal cenário é muito precário para garantir uma posologia flexível, sendo necessário incluir, no estudo de pre-formulação dessa molécula, excipientes que aumentem sua solubilização, como as ciclodextrinas, garantindo a sua biodisponibilidade.

De acordo com Higuchi e Connors (1965) a representação gráfica do diagrama de solubilidade, visualizada na Figura 8, apresenta uma curva do tipo A_L para todas as CDs, representando um incremento de solubilidade linear e sugerindo uma estequiometria 1:1 (mol:mol) 5TIO1:CD. O incremento de solubilidade máximo proporcionado foi de 12,70; 4,24 e 11,31 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para as maiores concentrações da α , β e γ CDs, respectivamente. Portanto, a solubilidade do 5TIO1 aumentou 1295, 366 e 1142% quando complexado com α , β e γ CDs, respectivamente. O incremento de solubilidade proporcionado pela β -CD não representa um desempenho inferior em relação às demais CDs. Na verdade, em termos proporcionais, 1,5% da β -CD é mais eficaz na solubilização do 5TIO1 do que a α -CD e γ -CD.

Figura 8. Curvas do diagrama de solubilidade do 5TIO1 sob a influência de concentrações crescentes de α (■), β (●) e γ (▲) ciclodextrinas em solução.



Fonte: Arquivo pessoal.

Além da análise da solubilidade, a constante de associação é um importante índice para avaliar a força da associação entre a molécula hóspede e a ciclodextrina, a estabilidade do complexo e a influência das CD na biodisponibilidade dos fármacos. Para muitos complexos de inclusão fármaco/CD, os valores da constante de associação variam entre $100 - 20000 \text{ M}^{-1}$ (CHALLA et al., 2005; LI et al., 2011). A constante de associação para α , β e γ CDs foram 1294, 2154 e 1105 M^{-1} , respectivamente. Valores entre $1000 - 5000 \text{ M}^{-1}$, como os apresentados, representam uma associação moderada (CARRIER, MILLER, AHMED, 2007). Assim, o complexo 5TIO1/ β -CD teve maior estabilidade.

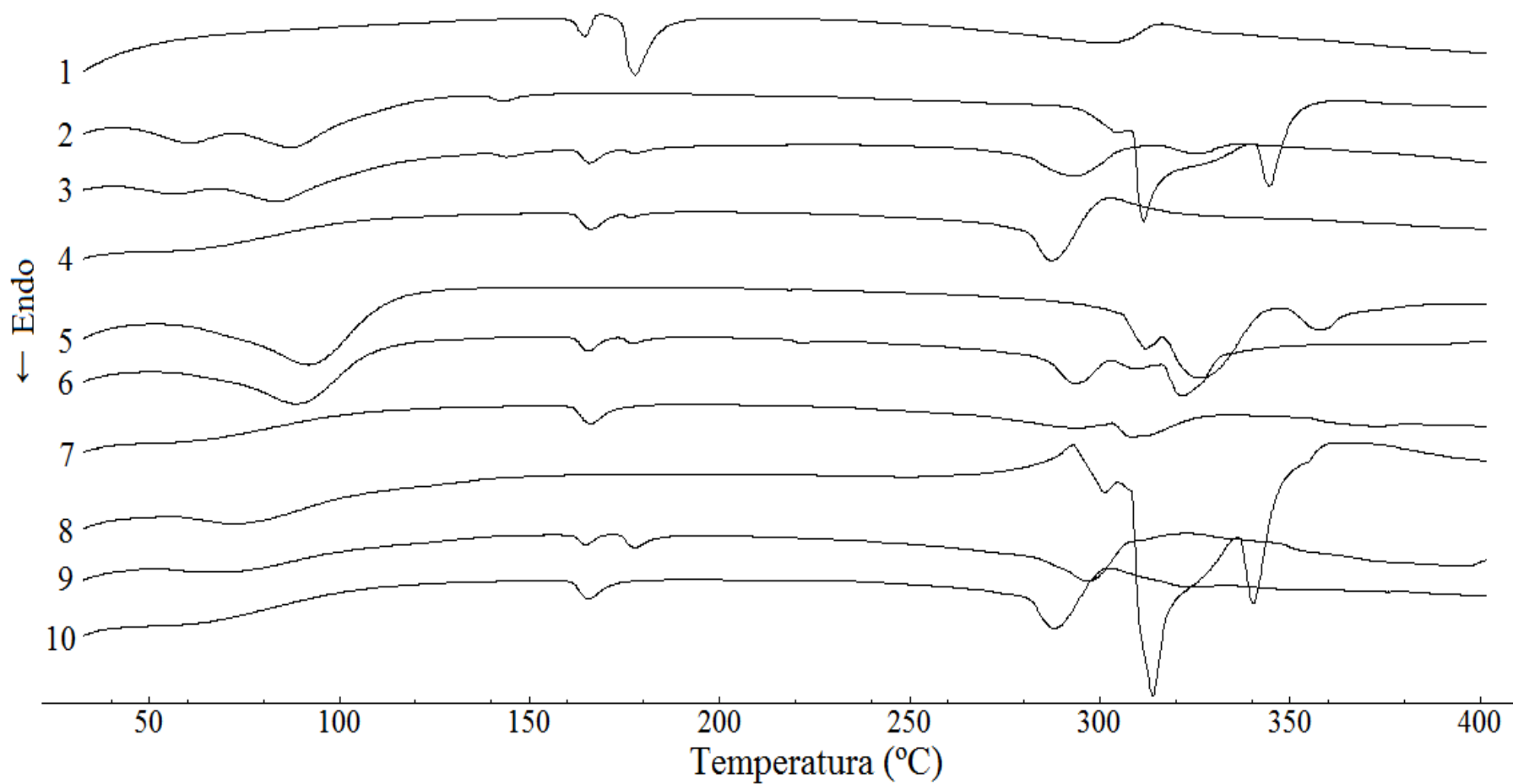
Então, apesar da β -CD ter uma solubilidade aquosa 7,8 e 12,5 vezes menor que a α -CD e β -CD (LOFTSSON, DUCHÊNE, 2007), respectivamente; o seu baixo custo (KURKOV, LOFTSSON, 2012), o incremento de solubilidade proporcionado para o 5TIO1 e a estabilidade do complexo 5TIO1/ β -CD, justificam a escolha desse excipiente numa futura formulação dessa nova entidade química.

Caracterização dos sistemas binários

As análises térmicas são amplamente utilizadas em estudos de pré-formulação (SOARES et al, 2011), podendo indicar a complexação com ciclodextrinas. As curvas de DTA das amostras estão representadas na Figura 9, que evidencia a formação dos complexos de inclusão 5TIO1 com todas as ciclodextrinas devido a ausência ou a redução dos picos relativos à fusão; a ausência nos eventos de evaporação de água das ciclodextrinas (temperaturas inferiores a $100 \text{ }^\circ\text{C}$); e a mudanças no perfil de degradação.

Além disso, as análises térmicas constituem uma boa ferramenta para avaliar a estabilidade e compatibilidade de fármacos e excipientes (SOARES-SOBRINHO et al., 2010). Para tal investigação, a Figura 10 mostra as curvas TG e DTG das amostras analisadas evidenciando que a decomposição térmica dos complexos de inclusão e das misturas físicas ocorrem antes das degradações das substâncias isoladas. Entretanto, a antecipação da decomposição dos complexos de inclusão foi de aproximadamente $10 \text{ }^\circ\text{C}$ em relação a decomposição do 5TIO1 isolado (Tabela 1). De fato, para temperaturas de degradação tão próximas, o ganho de estabilidade térmica através da formação de complexos de inclusão não será tão significativo, visto que, no caso, a molécula hóspede *per si* exibe uma boa estabilidade térmica. Entretanto esse deslocamento na decomposição, do ponto de vista farmacotécnico, não evidencia incompatibilidades entre o 5TIO1 e as ciclodextrinas.

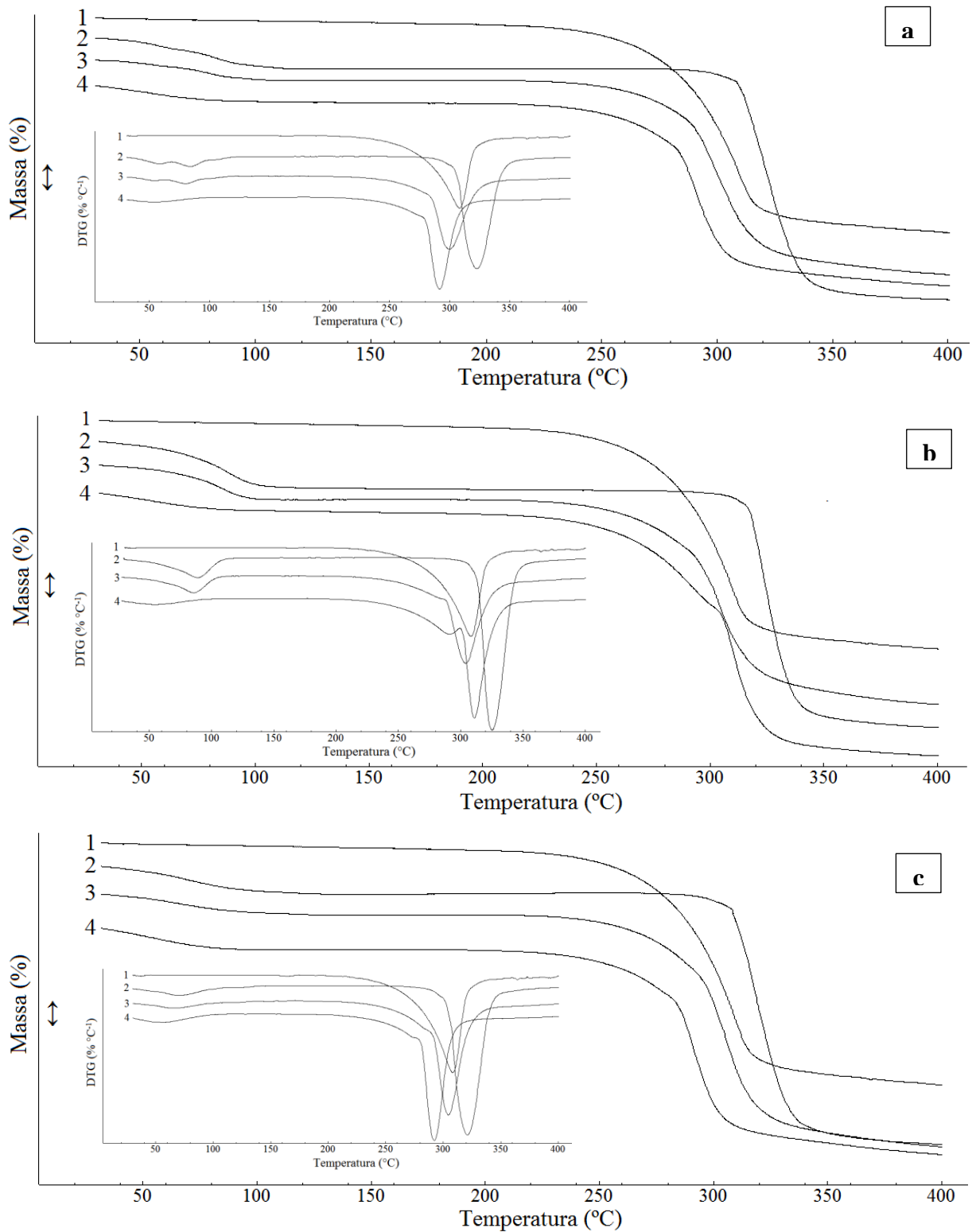
Figura 9. Curvas de DTA das substâncias isoladas, das misturas físicas e dos complexos de inclusão na razão de $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$.



Legenda: (1) 5TIO1; (2) α -CD; (3) mistura física α -CD e 5TIO1; (4) complexo de inclusão α -CD e 5TIO1; (5) β -CD; (6) mistura física β -CD e 5TIO1; (7) complexo de inclusão β -CD e 5TIO1; (8) γ -CD; (9) mistura física γ -CD e 5TIO1; (10) complexo de inclusão γ -CD e 5TIO1

Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 10. Curvas de TG e derivadas (DTG) das substâncias isoladas, da misturas física e dos complexos de inclusão para α (a), β (b) e γ (c) ciclodextrinas na razão de $10\text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$.



Legenda: (1) 5TIO1; (2) ciclodextrina; (3) mistura física; (4) complexo de inclusão.

Fonte: Arquivo pessoal.

Sabendo-se que quanto maior a perda de massa, menor a estabilidade (FREITAS et al., 2012), a Tabela 1 evidencia que a perda de massa relativa à decomposição dos complexos de inclusão com o α -CD e o γ -CD 60,64% e 60,26%, respectivamente, foram menores que o 5TIO1 isolado 64,46%. Além disso, a Tabela 1 indica um menor conteúdo de água nas misturas físicas e nos complexos de inclusão.

Tabela 1. Perda de massas das substâncias isoladas, das misturas físicas (MF) e dos complexos de inclusão (CI)

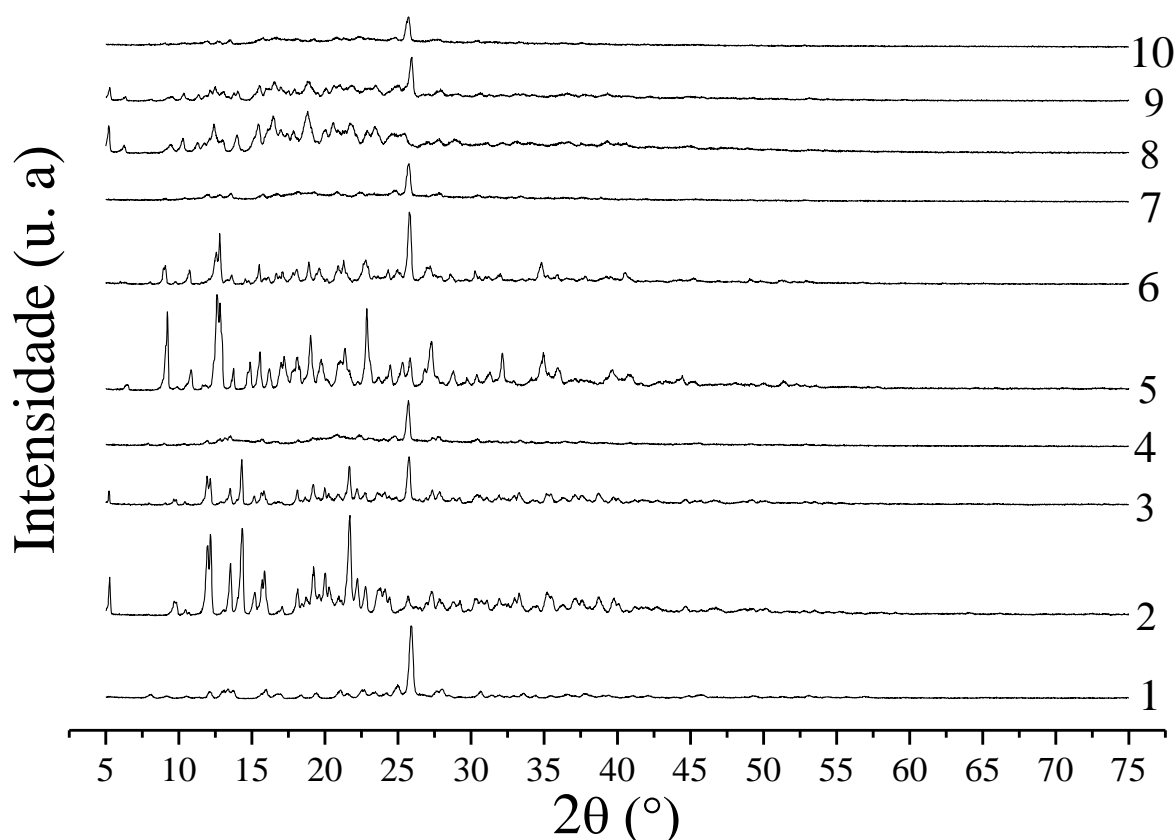
Amostras	Perda de massa (%)	
	1ª etapa	2ª etapa
5TIO1	64,46 ^a	-
α -CD	9,30 ^b	77,01 ^c
MF α -CD + 5TIO1	6,51 ^b	64,71 ^d
CI α -CD/5TIO1	5,85 ^b	60,64 ^e
β -CD	13,90 ^b	74,05 ^f
MF β -CD + 5TIO1	10,86 ^b	63,89 ^g
CI β -CD/5TIO1	6,11 ^b	75,45 ^h
γ -CD	8,10 ^b	74,16 ⁱ
MF γ -CD + 5TIO1	6,26 ^b	68,68 ^j
CI γ -CD/5TIO1	6,69 ^b	60,26 ^l

Legenda: (^a) Porcentagem de 5TIO1 que decompõem acima de 227 °C; (^b) Porcentagem de água e solventes liberados abaixo de 100 °C; (^c) Decomposição da amostra no intervalo de 283 °C a 400 °C; (^d) Decomposição da amostra no intervalo de 222 °C a 400 °C; (^e) Decomposição da amostra no intervalo de 218 °C a 400 °C; (^f) Decomposição da amostra no intervalo de 290 °C a 400 °C; (^g) Decomposição da amostra no intervalo de 221 °C a 400 °C; (^h) Decomposição da amostra no intervalo de 214 °C a 400 °C; (ⁱ) Decomposição da amostra no intervalo de 284 °C a 400 °C; (^j) Decomposição da amostra no intervalo de 216 °C a 400 °C; (^l) Decomposição da amostra no intervalo de 215 °C a 400 °C.

Fonte: Arquivo pessoal.

A difração de raio-X determina a natureza cristalina de sólidos e é uma das melhores técnicas para caracterização de complexos de inclusão. Dependendo da forma cristalina da molécula hóspede, picos característicos serão formados no difratograma. Assim, a complexação é avaliada por mudanças nos picos característicos da molécula e da ciclodextrina em relação ao complexo (TAKAHASHI, VEIGA, FERRAZ, 2012). A Figura 11 mostra o perfil difratométrico das amostras. O perfil do difratograma do 5TIO1 demonstra a presença de um pico intenso em 2θ igual a 25,9 ° e vários picos secundários de baixa intensidade, sugerindo que essa substância apresenta característica cristalina. Todas as ciclodextrinas naturais exibiram um perfil cristalino com múltiplos picos.

Figura 11. Padrões de difração de raio X das substâncias isoladas, das misturas físicas e dos complexos de inclusão.



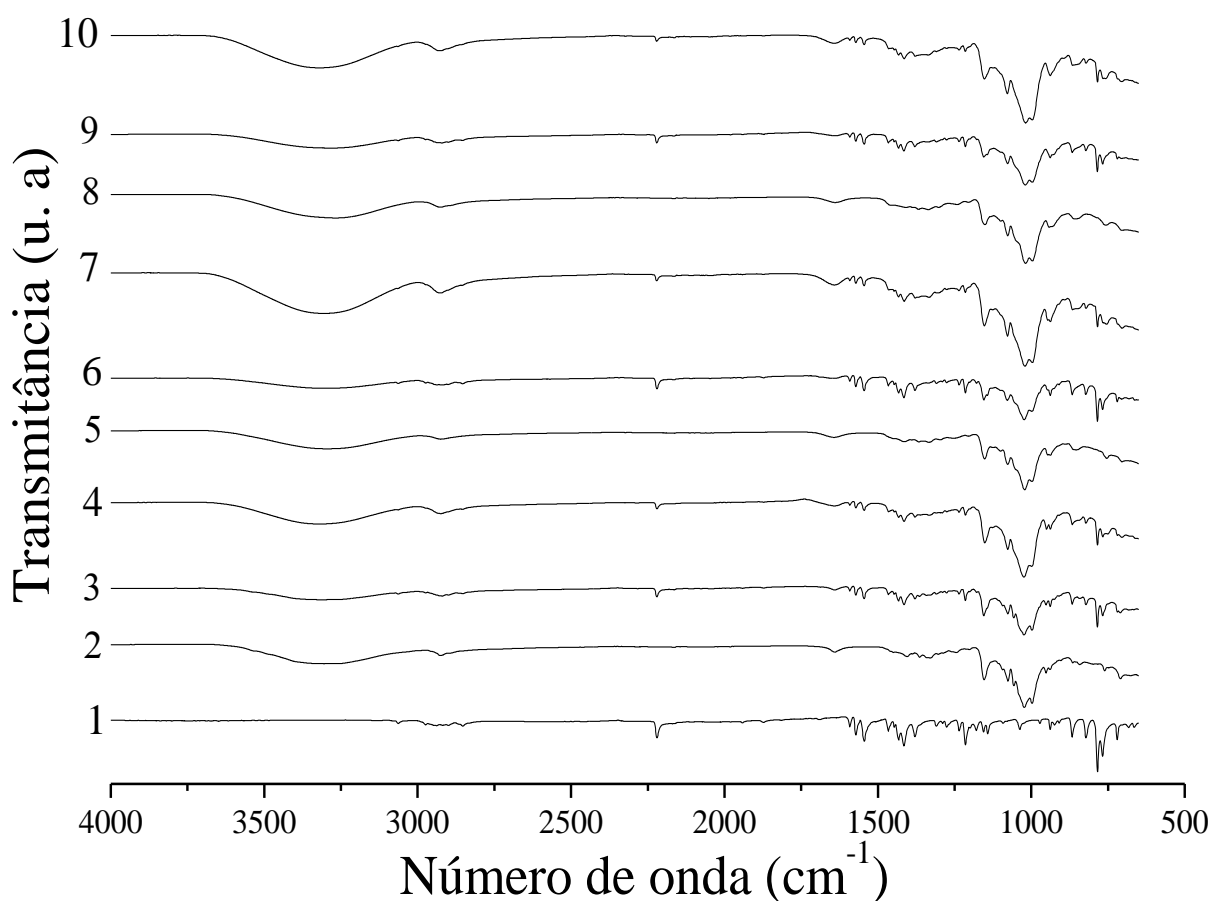
Legenda: (1) 5TIO1; (2) α-CD; (3) mistura física α-CD e 5TIO1; (4) complexo de inclusão α-CD e 5TIO1; (5) β-CD; (6) mistura física β-CD e 5TIO1; (7) complexo de inclusão β-CD e 5TIO1; (8) γ-CD; (9) mistura física γ-CD e 5TIO1; (10) complexo de inclusão γ-CD e 5TIO1

Fonte: Arquivo pessoal.

Sabendo-se que o desaparecimento de picos ou mudanças nas intensidade relativas, constituem indícios de formação de complexos (SOARES-SOBRINHO et al., 2012), a Figura 11 evidencia o desaparecimento dos picos secundários do 5TIO1 e a diminuição do seu pico principal nos complexos de inclusão. Além disso, pode-se concluir que ocorreu um processo perda de cristalinidade da amostra, indicando a formação do complexo de inclusão com todas as ciclodextrinas (LOFTSSON, DUCHÊNE, 2007). A razão para a redução da cristalinidade pode ser atribuída à técnica de *spray drying* que consiste num processo de intensa energia, onde uma solução passa de um estado não saturado para um estado supersaturado numa fração de segundos; a evaporação rápida do solvente a partir das gotículas atomizadas interfere com o processo de construções dos cristais levando a uma perda de cristalinidade da amostra e, conseqüentemente, melhorando sua solubilidade (BHISE, 2011).

A análise dos espectros de infravermelho pode ser feita comparando-se as bandas a molécula hóspede, da CD e da mistura física com a do complexo. Geralmente o espectro da mistura física corresponde à sobreposição dos picos dos espectros da molécula hóspede e da CD, porém com as bandas da molécula hóspede menos evidentes, devido sua menor concentração. Quando ocorre a complexação, as bandas podem mudar de posição, diminuir ou até mesmo desaparecer (TAKAHASHI, VEIGA, FERRAZ, 2012). A Figura 12 mostra os espectros de infravermelho das amostras analisadas.

Figura 12. Espectro de Infravermelho com transformador de Fourier (IV-TF) das substâncias isoladas, das misturas físicas e dos complexos de inclusão.



Legenda: (1) 5TIO1; (2) α -CD; (3) mistura física α -CD e 5TIO1; (4) complexo de inclusão α -CD e 5TIO1; (5) β -CD; (6) mistura física β -CD e 5TIO1; (7) complexo de inclusão β -CD e 5TIO1; (8) γ -CD; (9) mistura física γ -CD e 5TIO1; (10) complexo de inclusão γ -CD e 5TIO1

Fonte: Arquivo pessoal.

Para avaliar os espectros de infravermelho (Figura 12), selecionou-se as principais bandas do 5TIO1 que poderiam indicar a formação do complexo. Observando-se o espectro

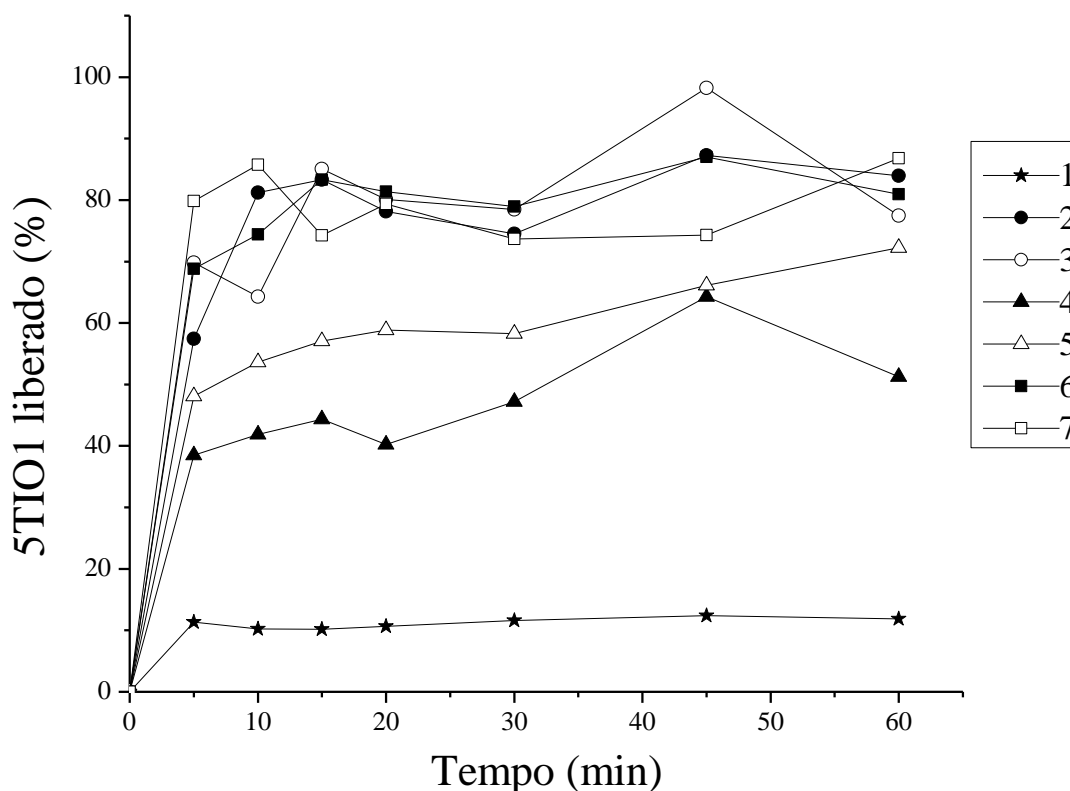
das ciclodextrinas naturais, descartou-se a investigação das bandas entre 900-1300 cm^{-1} , visto que nessa faixa as bandas do 5TIO1 e das CDs se sobrepõe, portanto, não seria conclusivo evidenciar se houve interação. Assim, para a investigação comparativa, selecionou-se os estiramentos $\text{C}\equiv\text{N}$ (2218 cm^{-1}); as bandas entre 1590 e 1300 cm^{-1} corresponde a estiramentos ($\text{C}=\text{N}$, $\text{C}=\text{C}$, $\text{C}-\text{C}$) e deformações (CH e CH_2); e a região entre de 900 e 660 cm^{-1} , abrangendo as bandas correspondentes aos estiramentos $\text{C}-\text{Cl}$ e $\text{C}-\text{S}$.

A Figura 12 mostra que em todos os espectros de misturas binárias nenhum pico novo apareceu, indicando que nenhuma ligação foi criada entre o 5TIO1 e as CDs. Uma significativa redução das bandas citadas acima aconteceram nos complexos de inclusão obtidos, entretanto o mesmo ocorre para as misturas físicas.

A Figura 13 mostra os perfis de dissolução das amostras. Cinco minutos após o início do teste de dissolução, a porcentagem de 5TIO1 dissolvido foi 11,3%, enquanto a porcentagem de 5TIO1 dissolvida a partir do complexo dos complexos de inclusão com a α , β e γ CDs foram 69,8%, 48,11% e 79,83%, respectivamente. Possivelmente, o complexo de inclusão com a β -CD liberou menos 5TIO1, devido ao seu menor incremento de solubilidade e a sua maior constante de associação. Através desse ensaio de dissolução, sugere-se que ocorreu complexação com a β -CD, onde a liberação do 5TIO1 foi superior a da respectiva mistura física. Isso pode ser atribuído a: (a) redução da tensão interfacial entre drogas insolúveis em água e o meio de dissolução e (b) o estado amorfo de alta energia/redução da cristalinidade que segue a complexação (FERNANDES et al., 2001).

As misturas binárias com a α -CD e γ -CD, obtiveram um perfil de dissolução muito semelhantes e, portanto, não discriminativo. Tal fato não significa, necessariamente, que a complexação não ocorreu. Isso porque há uma grande variação na porcentagem dissolvida devido a condições analíticas específicas do aparato 2 (UDDIN, SAFFON, SUTRADHAR, 2011). Esses resultados, sugerem a investigação e comparação do perfil de dissolução através de outros aparatos, como o aparato 4 que tem como uma das principais aplicações avaliar o perfil de dissolução de moléculas de baixa solubilidade (D'ARCY, LIU, CORRIGAN, 2011). Entretanto, esses resultados sugerem que o delineamento de uma forma farmacêutica sólida contendo complexos de inclusão do 5TIO1 com a α -CD ou com a γ -CD aumentará em mais de 6 vezes a liberação do 5TIO1 em relação a este composto isolado.

Figura 13. Perfis de dissolução do 5TIO1, das misturas físicas e dos complexos de inclusão.



Legenda: (1) 5TIO1; (2) mistura física α -CD e 5TIO1; (3) complexo de inclusão α -CD e 5TIO1; (4) mistura física β -CD e 5TIO1; (5) complexo de inclusão β -CD e 5TIO1; (6) mistura física γ -CD e 5TIO1; (7) complexo de inclusão γ -CD e 5TIO1

Fonte: Arquivo pessoal.

Uma maneira também utilizada para fins comparativos de dissolução é a eficiência de dissolução (ED) nos tempos 15 e 20 min (Tabela 2). No caso das misturas físicas, a eficiência de dissolução trouxe uma diferença significativa em comparação ao 5TIO1 isolado. Isso parece ser uma consequência do tratamento mecânico que aumenta o contato entre o fármaco e o carreador. Tal fato pode ser atribuído a melhora da molhabilidade de misturas físicas, devido à presença de ciclodextrinas, da mesma forma que, nos estágios iniciais do processo de dissolução, moléculas CD operando localmente na camada hidrodinâmica que envolve as partículas de 5TIO1. Isso resulta em um processo de inclusão *in situ* e produz um rápido aumento na quantidade de fármaco dissolvido (SOARES-SOBRINHO et al, 2011).

A Tabela 2 também não evidencia qual o melhor complexo de inclusão. Tal discriminação pode ser avaliada mudando-se as condições e o método de dissolução empregado, como foi dito anteriormente. Entretanto, o teste de dissolução cumpriu o seu objetivo ao demonstrar um incremento da solubilidade.

Tabela 2. Eficiência de dissolução nos tempos 15 e 20 min do 5TIO1, das misturas físicas e dos complexos de inclusão.

Amostras	Eficiências de dissolução (%)	
	15 min	20 min
5TIO1	8,87	9,25
MF α-CD + 5TIO1	19,74	28,58
CI α-CD/5TIO1	18,66	27,39
MF β-CD + 5TIO1	17,90	25,28
CI β-CD/5TIO1	18,62	26,90
MF γ-CD + 5TIO1	19,91	28,78
CI γ-CD/5TIO1	22,62	31,19

Fonte: Arquivo pessoal.

CONCLUSÃO

Os estudos de pré-formulação do 5TIO1 indicaram características do estado sólido importantes para escolha do processo de manufatura de uma forma farmacêutica sólida e indicaram estratégias de solubilização desse fármaco com ciclodextrinas. As diversas técnicas analíticas utilizadas indicaram a formação dos complexos de inclusão. E os teste de dissolução comprovaram a performance desses complexos para o aumento da solubilização do 5TIO1. Em termos de custo e benefício, a escolha da β -ciclodextrina como excipiente numa formulação contendo 5TIO1, mostra-se apropriada.

REFERÊNCIAS

AMIDON, G.L.; LANNERNÄS, H.; SHAH, V.P.; CRISON, J.R. A theoretical basis for Biopharmaceutical Drug Classification: the correlation *in vitro* drug product dissolution and *in vivo* bioavailability. **Pharmaceutical Research**, v. 12, n. 3, 1995.

AMR, A.E-G.E.; SHERIF, M.H.; ASSY, M.G.; AL-OMAR, M.A.; RAGAB, I. Antiarrhythmic, serotonin antagonist and antianxiety activities of novel substituted thiophene derivatives synthesized from 2-amino-4,5,6,7-tetrahydro-N-phenylbenzol[b]thiophene-3-carbozamide. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.45, p. 5935-5942, 2010.

BERNSTEIN, J.; DAVEY, R.J.; HENCK, J-O. Concomitant polymorphs. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 38, n. 23, p. 3440-3461, 1999.

BHISE, S.D. Effect of hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complexation on solubility of fenofibrate. **International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences**, v. 21, n. 2, p. 596-604, 2011.

CARRIER, R.L.; MILLER, L.A.; AHMED, I. The utility of cyclodextrins for enhancing oral bioavailability. **Journal of Controlled Release**, v. 123, p. 78-99, 2007.

CHALLA, R.; AHUJA, A.; ALI, J.; KHAR, R.K. Cyclodextrins in drug delivery: an updated review. **American Association of Pharmaceutical Scientist**, v. 6, n. 2, p. 330-357, 2005.

D'ARCY, D.M.; LIU, B.; CORRIGAN, O.I. Investigating the effect of solubility and density gradients on local hydrodynamics and drug dissolution in the USP 4 dissolution apparatus. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 419, p. 175-185, 2011.

DAVIS M.E; BREWSTER, M. E. Cyclodextrin-based pharmaceuticals: past, present and future. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, p. 1023-35, 2004.

FERNANDES, L.P.; OLIVEIRA, W.P.; SZTATISZ, J.; SZILÁGYI, M.; NOVÁK, C. Solid state studies on molecular inclusions of *Lippia sidoides* essential oil obtained by spray drying. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 95, n. 3, p. 855-863, 2009.

FREITAS, M.R.; ROLIM, L.A.; SOARES, M.F.R.; ROLIM-NETO, P.J.; ALBUQUERQUE, M.M.; SOARES-SOBRINHO, J.L Inclusion complexo f methyl- β -cyclodextrin and

olanzapine as potential drug delivery system for schizophrenia. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, p. 1095-1100, 2012.

GAO, J-M.; DING, L-X.; HU, C-Q. A comparative uncertainty study of the purity assessment of chemical reference substances using differential scanning calorimetry (DSC) and mass balance method. **Thermochemica Acta**, v. 525, p. 1-8, 2011.

GIRON, D. Investigations of polymorphism and pseudo-polymorphism in pharmaceuticals by combined thermoanalytical techniques. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 64, p. 37-60, 2001.

GOES, T.C.; ANTUNES, F.D.; TEXEIRA-SILVA, F. Trait and state anxiety in animal models: is there correlation?. **Neurosciences Letters**, v. 450, p. 266-269, 2009.

GROSS, C; HEN, R. The developmental origins of anxiety. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 5, p.545-552, 2004.

HIGUCHI, T.; CONNORS, A.K. Phase-solubility techniques. **Advances in Analytical Chemistry and Instrumentation**, v. 4, p. 117-212, 1965.

KESSLER, R.C.; AGUILAR-GAXIOLA, S.; ALONSO, J.; CHATTERJI, S.; LEE, S.; ORMEL, J.; ÜSTÜN, T.B.; WANG, P.S. The global burden of mental disorders: an update from the WHO World Mental Health (WMH) Surveys. **Epidemiologia e Psichiatria Sociale**, v. 18, n. 1, p. 23-33, 2009.

KHAN, K. A.; RHODES, C. T. Effect of compaction pressure on the dissolution efficiency of some direct compression systems. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, v. 47, p. 594-607, 1972.

KURKOV, S.V.; LOFTSSON, T. Cyclodextrins. **International Journal of Pharmaceutics**. 2012 (*in press*).

LAU, E. Preformulation studies. In: AHUJA, S.; SEYPINSKI, S.(Eds) **Handbook of Modern Pharmaceutical Analysis**. San Diego: Elsevier, 2011. p. 173-233.

LI, H.; SUN, J.; WANG, Y.; SUI, X.; SUN, L.; ZHANG, J.; HE, Z. Structure-based *in silico* model profiles the binding constant of poorly soluble drugs with β -cyclodextrin. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 42, p. 55-64, 2011.

LOFTSSON, T.; DUCHÊNE, D. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 329, p. 1-11, 2007.

MAO, C.; PINAL, R.; MORRIS K.R. A quantitative model to evaluate solubility relationship of polymorphs from their thermal properties. **Pharmaceutical Research**, v. 22, n. 7, p. 1149-1157, 2005.

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. **Latin American Journal of Pharmacy**, v.30, p.1492-1499, 2011.

NEWMAN, A.W.; BYRN, S. Solid-state analysis of the active pharmaceutical ingredient in drug products. **Drug Discovery Today**, v. 8, n. 19, p. 898-905, 2003.

PANDEY, A.; RATH, B.; DWIVEDI, A.K. Pharmaceutical preformulation studies with special emphasis on excipients compatibility. **International Journal of Pharmacy & Technology**, v. 3, n. 2, p. 1029-1048, 2011.

POLLA, G.I.; VEGA, D.R.; LANZA, H.; TOMBARI, D.G.; BAGGIO, R.; AYALA, A.P.; MENDES-FILHO, J.; FERNÁNDEZ, D.; LEYVA, G.; DARTAYET, G. Thermal behavior and stability in olanzapine. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 301, p. 33-40, 2005.

RUDOLPH, U.; KNOFLACH, F. Beyond classical benzodiazepines: novel therapeutic potential of GABA_A receptor subtypes. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 10, p. 685-697, 2011.

SABINO, E. B. **Desenvolvimento de sistema de vetorização a base de novo derivado tiofênico**. 2011. 122f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2011.

SINGHAL, D.; CURATOLO, W. Drug polymorphism and dosage form design: a practical perspective. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, p. 335-347, 2004.

SOARES, M.F.R.; SOARES-SOBRINHO, J.L.; SILVA, K.E.R.; ALVES, L.D.S.; LOPES, P.Q.; CORREIA, L.P.; SOUZA, F.S.; MACÊDO, R.O.; ROLIM-NETO, P.J. Thermal characterization of antimicrobial drug ornidazole and its compatibility in a solid pharmaceutical product. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 104, p. 307-313, 2011.

SOARES-SOBRINHO, J.L.; SOARES, M.F.R.; LOPES, P.Q.; CORREIA, L.P.; SOUZA, F.S.; MACÊDO, R.O.; ROLIM-NETO, P.J. A preformulation study of a new medicine for Chagas disease treatment: physicochemical characterization, thermal stability, and compatibility of benznidazole. **American Association of Pharmaceutical Scientists**, v.11, n. 3, 2010.

SOARES-SOBRINHO, J.L.; SANTOS, F.L.A.; LYRA, M.A.M.; ALVES, L.D.S.; ROLIM, L.A.; LIMA, A.A.N.; NUNES, L.C.C.; SOARES, M.F.R.; ROLIM-NETO, P.J.; TORRES-LABANDEIRA, J.J.T. Benznidazole drug delivery by binary and multicomponent inclusion complexes using cyclodextrins and polymers. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, p. 323-330, 2012.

TAKAHASHI, A.I.; VEIGA, F.J.B.; FERRAZ, H.G. A literature review of cyclodextrins inclusion complexes characterization – part II: X-ray diffraction, infrared spectroscopy and nuclear magnetic resonance. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review Research**, v. 12, n. 1, p. 1-12, 2012.

UDDIN, R.; SAFFON, N.; SUTRADHAR, K.B. Dissolution and dissolution apparatus: a review. **International Journal of Current Biomedical and Pharmaceutical Research**, v. 1, n. 4, p. 201-207, 2011.

WU, L-J; KIM, S.S.; ZHUO, M. Molecular targets of anxiety: from membrane to nucleus. **Neurochemical Research**, v. 33, p. 1925-1932, 2008.

7. CAPÍTULO IV

Caracterização do complexo de inclusão 5TIO1/sulfobutil-éter- β -ciclodextrina

FORTES, AC^a; VILARINHO, ACSG^a; ALVES, LDS^b; ROLIM, LA^b; MEDONÇA-JÚNIOR, FJB^c; ROLIM-NETO, PJ^b; SOARES-SOBRINHO, JL^b; SOARES, MFLR^d

^aLaboratório de Pesquisa em Cosméticos e Medicamentos do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí, Brasil.

^bLaboratório de Tecnologia dos Medicamentos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

^cLaboratório de Síntese e Vetorização de Moléculas, Universidade Estadual da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brasil.

^dNúcleo de Controle de Qualidade de Medicamentos Correlatos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

RESUMO

5TIO1 (2-[(2,6-diclorobenzilideno) amino]-5,6-diidro-4H-ciclopenta [b] tiofeno-3-carbonitrila) é uma nova entidade química de baixa solubilidade em água. A complexação dessa molécula com ciclodextrina pode ser uma alternativa para superar tal entrave. O objetivo deste estudo foi caracterizar complexos de inclusão sólidos 5TIO1/sulfobutil éter β -ciclodextrina (SBCD) obtidos por malaxagem, evaporação/liofilização e *spray drying*. A obtenção de complexos de inclusão 5TIO1-SBCD, não alteraram o comportamento térmico do 5TIO1, porém não houve diferenciação significativa entre os processos. O DRX também não foi conclusivo na determinação do método de complexação mais eficiente. No entanto, os espectros de infravermelho e o perfil de dissolução sugeriram que o melhor método a ser empregado é a malaxagem.

Palavras-chave: tiofeno, sulfobutil éter β -ciclodextrina, solubilidade, análise térmica, DRX, dissolução

ABSTRACT

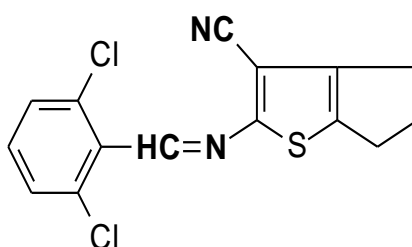
5TIO1 (2-[(2,6-dichlorobenzilidene)amino]-5,6-dihydro-4*H*-cyclopenta[*b*]thiophene-3-carbonitrile) is a poorly water-soluble new chemical entity. The complexation of this molecule with cyclodextrin can be an alternative to overcome such barrier. The objective of this study was to characterize solid inclusion 5TIO1/sulfobutyl ether beta-cyclodextrin (SBCD) obtained by kneading, evaporation/lyophilization and spray drying. The attainment of the 5TIO1/SBCD, did not change the 5TIO1's thermal behavior (5TIO1) but there was no significant differentiation between the used processes. The XRD was also not conclusive in the determination of the most efficient complexation method. However, the infrared spectra and the dissolution profile suggested that the best method to be used is kneading.

Keywords: thiophene, sulfobutyl ether beta-cyclodextrin, solubility, thermal analysis, XRD, dissolution

INTRODUÇÃO

O (2-[(2,6-diclorobenzilideno) amino]-5,6-diidro-4*H*-ciclopenta[*b*]tiofeno-3-carbonitrila), também chamado de 5TIO1 (Figura 1), é uma nova entidade química, sintetizada por uma reação de duas etapas, partindo da reação de Gewald, seguida pela condensação com 2,6-diclorobenzaldeído (MENDONÇA-JÚNIOR et al., 2011). Atualmente, derivados tiofênicos como este tem atraído o interesse da indústria farmacêutica devido ao seu amplo espectro farmacológico como agentes antimicrobianos (ISLOOR, KALLURAYA, PAI, 2010), antivirais (RASHAD et al., 2010), antioxidantes (ABU-HANSEN, EL-SHEHRY, BADRIA, 2010), anti-inflamatórios (FAKHR et al., 2009), antinociceptivos (GONCALES et al., 2005), antipiscicóticos (CALLIGARO et al., 1997), anticonvulsivantes (GHOGARE et al., 2010) e ansiolíticos (AMR et al., 2010).

Figura 1. Estrutura molecular do 5TIO1



Fonte: Arquivo pessoal.

A fim de melhorar a solubilidade e dissolução do 5TIO1, uma substância de baixa solubilidade (SABINO, 2011), ciclodextrinas (CDs) tem sido largamente utilizadas para formar complexos de inclusão com fármacos pouco solúveis (DAVIS, BREWSTER, 2004). CDs são oligossacarídeos cíclicos com superfície exterior hidrofílica e uma cavidade central lipofílica (LOFTSSON, HREINSDÓTTIR, MASSON, 2005). O tratamento do amido com amilase fornece uma mistura de α , β , e γ CDs, conhecidas como CDs naturais (LOFTSSON, DUCHÊNE, 2007). No entanto, a solubilidade aquosa limitada dessas CDs naturais, especialmente a β -CD, tem restringido suas aplicações; logo, para melhorar esse parâmetro, várias modificações estruturais foram feitas nessas moléculas (UEHATA et al., 2011).

Sulfobutil-éter- β -ciclodextrina (SBCD) é uma CD modificada derivada da β -CD que foi desenvolvida como um excipiente eficaz e seguro para a solubilização de fármacos. A sua solubilidade em água (maior que 70 g por 100 mL a 25 °C) (LOCKWOOD, O'MALLEY, MOSHER, 2003) é aproximadamente 38 vezes maior do que a da β -CD. Além disso, foi demonstrado que o complexo de inclusão com SBCD é uma alternativa para proteger o organismo da citotoxicidade induzida por fármacos (NAGASE et al., 2003). Em contrapartida, efeitos nefrotóxicos já foram associados à β -CD (FRANK, GRAY, WEAVER, 1976; IRIE, UEKAMA, 1997). Portanto, baseado nessas vantagens, alta solubilidade e baixa toxicidade, SBCD é um excipiente seguro e eficaz disponível na indústria farmacêutica.

O principal foco desse estudo foi investigar os complexos de inclusão 5TIO1/SBCD obtidos por malaxagem (MA), evaporação/liofilização (EL) e *spray drying* (SD). Para esse objetivo os complexos foram comparados com o 5TIO1, a SBCD e com a mistura física (MF) desses dois componentes. A caracterização das amostras foram feitas por análise térmica diferencial (DTA), termogravimetria/derivada termogravimétrica (TG/DTG), difração de raios-X (DRX), espectroscopia na Região de Infravermelho com Transformada de Fourier (IV-TF) e estudos de dissolução.

MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais

O 5TIO1 foi fornecido pelo Laboratório de Síntese e Vetorização de Moléculas da Universidade Federal da Paraíba, na forma de um cristal amarelo, com rendimento de 89%,

pureza de 98,96%, ponto de fusão 159-160°C e R_f 0,54 (*n*-Hex./AcOEt. 8,5:1,5). A SBCD (Captisol®, grau de pesquisa, lote NC-04A-03-009, com grau de substituição molar de 0,57 e peso molecular 2163 g mol⁻¹) foi doada pela indústria Roquette® (Espanha). Para a preparação das soluções utilizou-se água de grau para injetáveis e todos os solventes utilizados foram de grau analítico.

Obtenção dos complexos de inclusão no estado sólido

Os complexos 5TIO1/SBCD foram preparados na razão molar 1:1, baseado em estudos prévios de solubilidade (SABINO, 2011). A mistura física foi preparada através da homogeneização do 5TIO1 e da SBCD (1:1) num recipiente de vidro fechado. O método de malaxagem consistiu na homogeneização durante 20 min em grau de porcelana com auxílio de pistilo do 5TIO1 e SBCD com adição de 57,76% (m/m) de etanol:água (1:1), em seguida essa pasta foi seca na estufa a 50 °C durante 2 h. Para o método de evaporação, primeiro dissolveu-se o 5TIO1 em uma solução de acetona e água e a SBCD em água; em seguida homogeneizou-se as soluções, evaporou-se a acetona em rotaevaporador (50 °C) e retirou-se a água por liofilização. O complexo de inclusão obtido por *spray drying*, partiu da eliminação dos solventes etanol:água (2:8), pulverizando a solução num *spray dry* (Mini Spray Dryer B290 – Büchi), com temperatura de entrada de 160 °C, temperatura de saída de 89 °C, pressão de ar de pulverização de 55 mmHg.

Termogravimetria (TG) e Análise Térmica Diferencial (DTA)

A caracterização térmica (TG) foi realizada em duplicata por meio de termobalança Shimadzu®, modelo TGA Q60, em atmosfera de nitrogênio em fluxo de 50 mL min⁻¹, sendo a massa da amostra de cerca de 2,0 mg (± 0,2) de 5TIO1, acondicionadas em cadinho de alumina na faixa de temperatura de 25 a 400 °C na razão de aquecimento de 10 °C min⁻¹. Antes dos ensaios, verificou-se a calibração do instrumento empregando-se uma amostra de oxalato de cálcio.

Espectroscopia na Região de Infravermelho com Transformada de Fourier (IV-TF)

Os espectros de infravermelho foram obtidos utilizando o equipamento PerkinElmerL® (Spectrum 400) com dispositivo de reflectância total atenuada (ATR) (Miracle ATR, Pike Technologies Spectroscopic Creativity) com cristal de selênio. As

amostras a serem analisadas foram transferidas diretamente para o compartimento do dispositivo de ATR. Os espectros foram obtidos de 650 a 4000 cm^{-1} e resolução de 4 cm^{-1} .

Difração de raios-X (DRX)

O difratograma foi obtido no difratômetro Shimadzu® (X-Ray Diffractometer, LabX XRD-6000), equipado com ânodo de cobre, usando uma voltagem de 40 kv e uma corrente de 30 mA. A amostra foi analisada no intervalo de ângulo 2θ de 5-75° a uma velocidade de digitalização de 2° min^{-1} . A medida foi realizada em suportes de vidro com uma fina camada de material do pó sem solvente.

Estudos de dissolução

Os estudos de dissolução foram realizados seguindo especificações do *Food and Drug Administration* (FDA) (1997) para fármacos pouco solúveis, utilizando pá como aparato, a 50 rpm e temperatura de 37 °C $\pm 0,5$ °C (USP, 2008). Para assegurar as condições de *sink* do método e aumentar a especificidade do ensaio de dissolução, o meio selecionado foi o suco gástrico simulado (ácido clorídrico mais cloreto de sódio, pH 1,2) com volume final de 900 mL. Amostras dos complexos e mistura física foram colocadas em cápsulas com o equivalente a 6.5 mg de 5TIO1. Os tempos de coleta foram de 5, 10, 15, 20, 30, 45 e 60 minutos onde, após filtração, determinou-se a concentração das amostras por espectrofotometria ($\lambda=301$ nm). Para cada sistema obtido 3 replicatas foram testadas. Os perfis de dissolução foram avaliados utilizando-se eficiência de dissolução nos intervalos de 15 e 20 minutos (DE15 e DE20) (KHAN, RHODES, 1972).

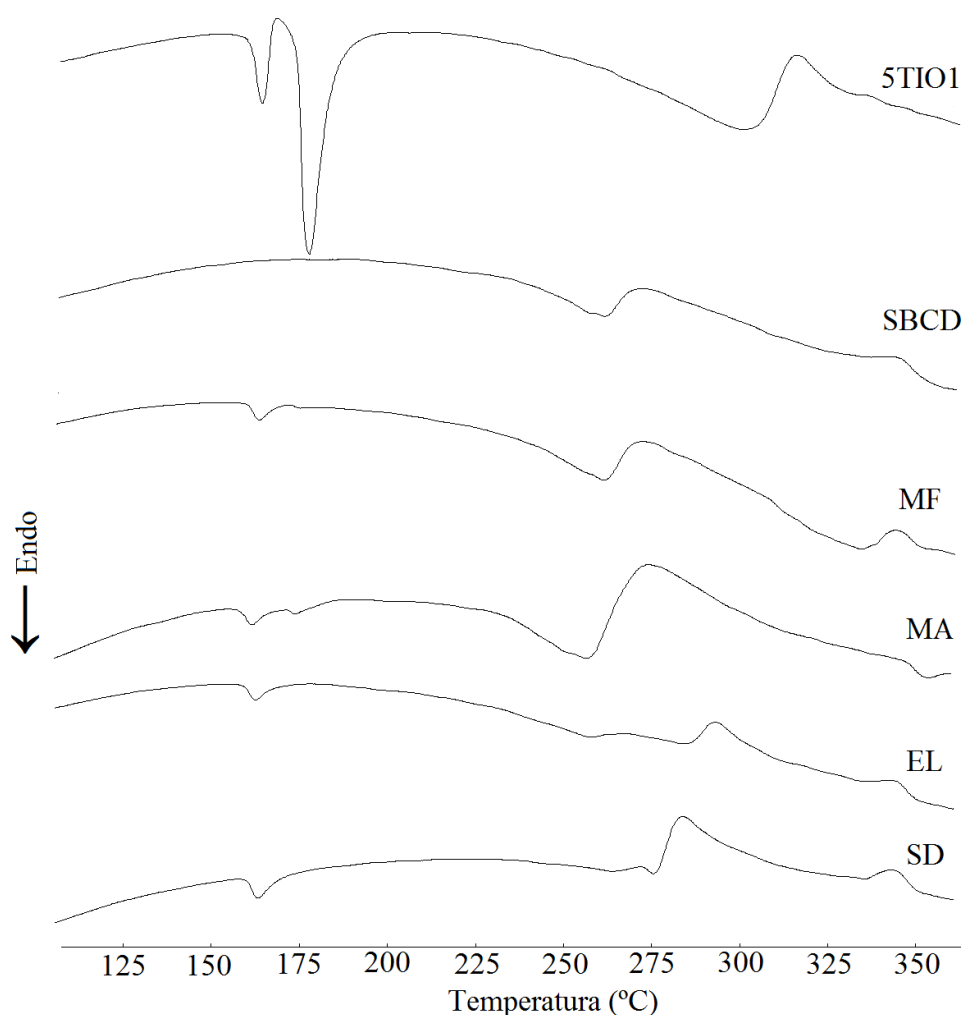
RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análise térmica

As curvas de DTA das amostras estão representadas na Figura 2. A curva do 5TIO1 demonstrou dois picos endotérmicos um menos intenso em 164,71 °C e um mais intenso em 177,63 °C. Esses valores corroboram com resultados obtidos anteriormente (163 °C e 175 °C) com a calorimetria diferencial de varredura (DSC). Na curva de TG/DTG do 5TIO1 (Figura 3), observou-se que a faixa de temperatura de degradação ficou entre 227 °C e 338 °C, tendo um perfil degradativo de fase única e perda de massa de 64,46%.

As análises térmicas são amplamente utilizadas na investigação das propriedades térmicas de CDs e seus complexos de inclusão, visto que a ausência de eventos como fusão, evaporação e sublimação e mudanças no perfil de degradação sugerem que a molécula hóspede complexou-se (ÉHEN et al., 2005; NOVÁK et al., 2006). A Figura 2 evidencia a formação dos complexos de inclusão 5TIO1/SBCD por todos os métodos devido a ausência ou a redução dos picos relativos à fusão. No entanto, o perfil da curva de DTA para a mistura física foi muito semelhante aos demais complexos. Então, sabendo-se que pós obtidos por diferentes métodos não são verdadeiramente complexos de inclusão homogêneos, resultando numa mistura da molécula hospedeira complexada e não complexada (ORGOVÁNYI, 2005), é necessário o uso de diferentes técnicas analíticas, como difração de raios X e infravermelho, para dar suporte a esses resultados (SOARES et al, 2011).

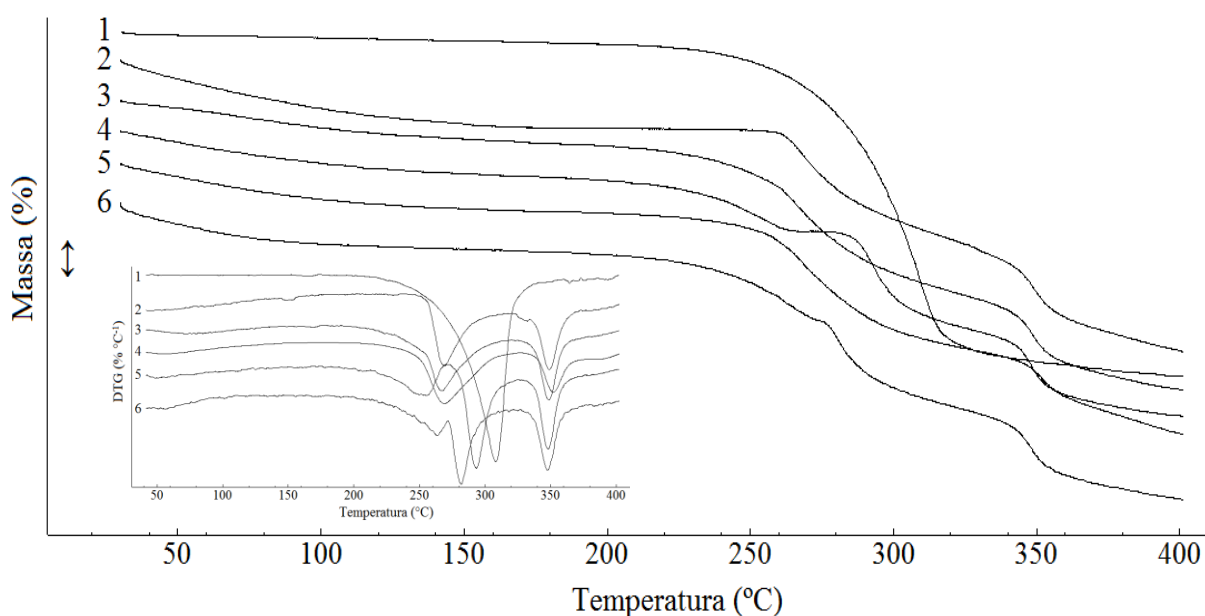
Figura 2. Curvas de DTA das substâncias isoladas, da mistura física e dos complexos de inclusão na razão de $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$.



Fonte: Arquivo pessoal.

Além disso, essas técnicas termoanalíticas constituem uma boa ferramenta para avaliar a estabilidade e compatibilidade durante estudos de pré-formulação (SOARES-SOBRINHO et al., 2010). Para tal investigação, a Figura 3 mostra as curvas TG e DTG das amostras analisadas evidenciando que as primeiras etapas de decomposição térmica dos complexos de inclusão ocorrem em temperaturas intermediárias entre a decomposição das substâncias isoladas, onde a SBCD apresenta a primeira etapa de decomposição na temperatura de 259 °C e a decomposição do 5TIO1 tem início 227 °C. De fato, para temperaturas de degradação tão próximas, o ganho de estabilidade térmica através da formação de complexos de inclusão não será tão significativo, visto que, no caso, a molécula hóspede *per si* exibe uma boa estabilidade térmica. No entanto, é de extrema valia, do ponto de vista farmacotécnico, concluir que não há evidências de incompatibilidades entre o 5TIO1 e a SBCD, visto que nenhuma temperatura de decomposição dos complexos foi antecipada em relação as temperaturas dos compostos isolados.

Figura 3. Curvas de TG e derivadas (DTG) das substâncias isoladas, da mistura física e dos complexos de inclusão na razão de 10 °C min⁻¹.



Legenda: (1) 5TIO1; (2) SBCD; (3) MF; (4) MA; (5) EL; (6) SD.

Fonte: Arquivo pessoal.

Sabendo-se que quanto maior a perda de massa, menor a estabilidade (FREITAS et al., 2012), a Tabela 1 evidencia que a mistura física e complexos de inclusão obtidos por malaxagem, evaporação/liofilização e *spray drying* obtiveram um total de perda de massa de 53,1%, 52,3%, 52,6% e 52,9%, respectivamente; perdas estas menores que as substâncias isoladas 64,46% para o 5TIO1 e 56,12% para a SBCD.

Tabela 1. Perda de massas das substâncias isoladas, da mistura física e dos complexos de inclusão

Amostras	Perda de massa (%)			
	1ª etapa	2ª etapa	3ª etapa	4ª etapa
5TIO1	64,46 ^a	-	-	-
SBCD	10,16 ^b	25,05 ^c	20,91 ^d	-
MF	6,67 ^b	30,10 ^e	16,32 ^f	-
MA	7,82 ^b	28,73 ^g	15,73 ^h	-
EL	7,44 ^b	10,61 ⁱ	19,71 ^j	14,84 ^l
SD	6,71 ^b	12,99 ^m	16,26 ⁿ	16,94 ^o

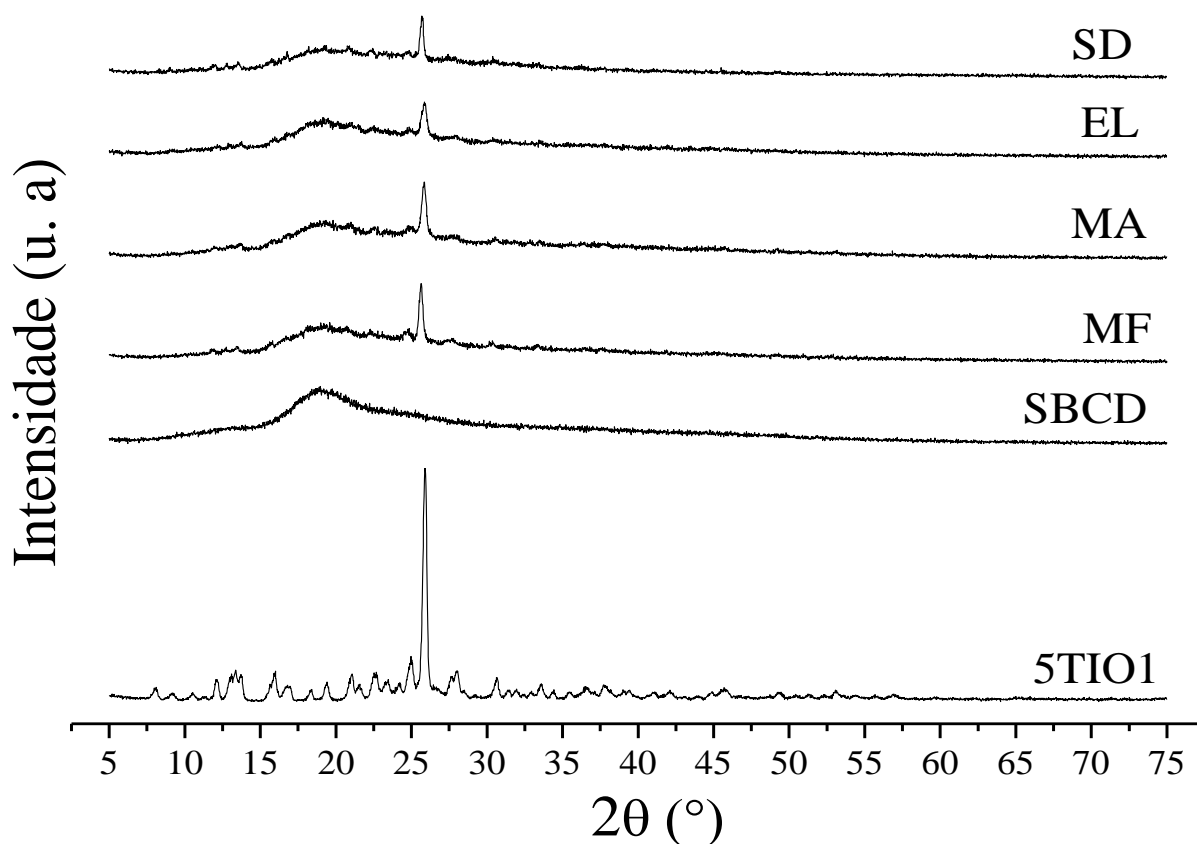
Legenda: (^a) Porcentagem de 5TIO1 que decompõem acima de 227 °C; (^b) Porcentagem de água e solventes liberados abaixo de 100 °C; (^c) Decomposição térmica no intervalo de 259 °C a 330 °C; (^d) Carbonização da amostra no intervalo de 331 °C a 400 °C; (^e) Decomposição térmica no intervalo de 178 °C a 338 °C; (^f) Carbonização da amostra no intervalo de 339 °C a 400 °C; (^g) Decomposição térmica no intervalo de 226 °C a 336 °C; (^h) Carbonização da amostra no intervalo de 341 a 400 °C; (ⁱ) Decomposição térmica no intervalo de 199 °C a 265 °C; (^j) Decomposição térmica no intervalo de 280 °C a 314 °C; (^l) Carbonização da amostra no intervalo de 342 °C a 400 °C; (^m) Decomposição térmica no intervalo de 207 °C a 272 °C; (ⁿ) Decomposição térmica no intervalo de 276 °C a 333 °C; (^o) Carbonização da amostra no intervalo de 334 °C a 400 °C.

Fonte: Arquivo pessoal.

DRX

A difração de raio-X determina a natureza cristalina de sólidos e é uma das melhores técnicas para caracterização de complexos de inclusão. Dependendo da forma cristalina da molécula hóspede, picos característicos serão formados no difratograma. Assim, a complexação é avaliada por mudanças nos picos característicos da molécula e da ciclodextrina em relação ao complexo (TAKAHASHI, VEIGA, FERRAZ, 2012). A Figura 4 mostra o perfil difratométrico das amostras, que demonstra a presença de um pico intenso em 2θ igual a 25,9 ° e vários picos secundários de baixa intensidade, sugerindo que essa substância apresenta característica cristalina. Enquanto o perfil da SBCD mostra-se sem picos, evidenciando seu caráter amorfo.

Figura 4. Padrões de difração de raio X das substâncias isoladas, da mistura física e dos complexos de inclusão.



Fonte: Arquivo pessoal.

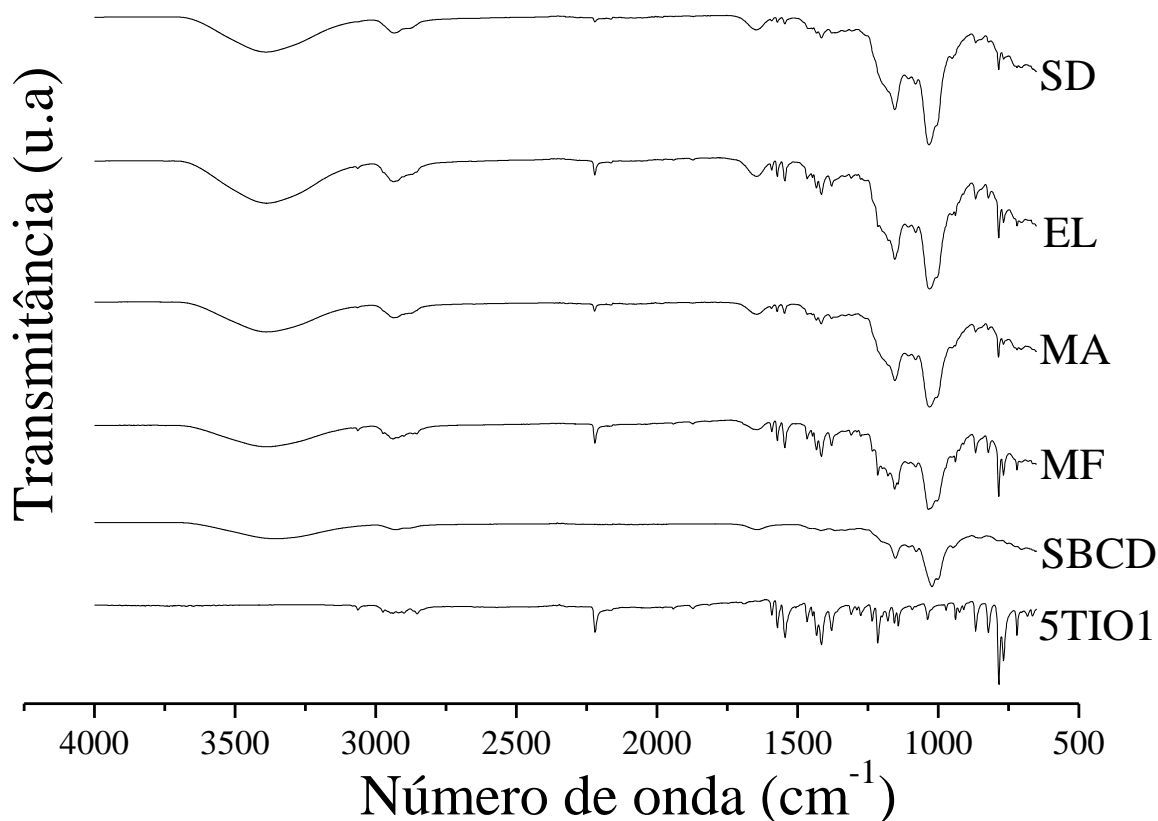
Sabendo-se que o desaparecimento de picos ou mudanças nas intensidade relativas, constituem indícios de formação de complexos (SOARES-SOBRINHO et al., 2012), a Figura 4 evidencia o desaparecimento dos picos secundários do 5TIO1 e a diminuição do seu pico principal nos complexos de inclusão. Para uma comparação mais fidedigna, a intensidade do pico característico do 5TIO1 foi de 1130 (MF), 1116 (MA), 902 (SD) e 820 (EL), indicando, mais uma vez, a necessidade de múltiplas técnicas para a investigação da formação dos complexos de inclusão.

Infravermelho com transformador de Fourier (IV-TF)

A análise dos espectros de infravermelho pode ser feita comparando-se as bandas a molécula hóspede, da CD e da mistura física com a do complexo. Geralmente o espectro da mistura física corresponde à sobreposição dos picos dos espectros da molécula hóspede e da CD, porém com as bandas da molécula hóspede menos evidentes, devido sua menor concentração. Quando ocorre a complexação, as bandas podem mudar de posição, diminuir ou

até mesmo desaparecer (TAKAHASHI, VEIGA, FERRAZ, 2012). A Figura 5 mostra o espectro de infravermelho das amostras.

Figura 5. Espectro de Infravermelho com transformador de Fourier (IV-TF) das substâncias isoladas, da mistura física e dos complexos de inclusão.



Fonte: Arquivo pessoal.

Para avaliar os espectros de infravermelho (Figura 5), selecionou-se as principais bandas do 5TIO1 que poderiam indicar a formação do complexo. Observando-se o espectro da SBCD, descartou-se a investigação das bandas entre $900\text{-}1300\text{ cm}^{-1}$, visto que nessa faixa existem bandas de ambos os compostos e, portanto, não seria conclusivo evidenciar se houve interação. Assim, para a investigação comparativa, selecionou-se os estiramentos $\text{C}\equiv\text{N}$ (2218 cm^{-1}); as bandas entre $1590\text{ e }1300\text{ cm}^{-1}$ corresponde a estiramentos ($\text{C}=\text{N}$, $\text{C}=\text{C}$, $\text{C}-\text{C}$) e deformações (CH e CH_2); e a região entre de $900\text{ e }660\text{ cm}^{-1}$, abrangendo as bandas correspondentes aos estiramentos $\text{C}-\text{Cl}$ e $\text{C}-\text{S}$.

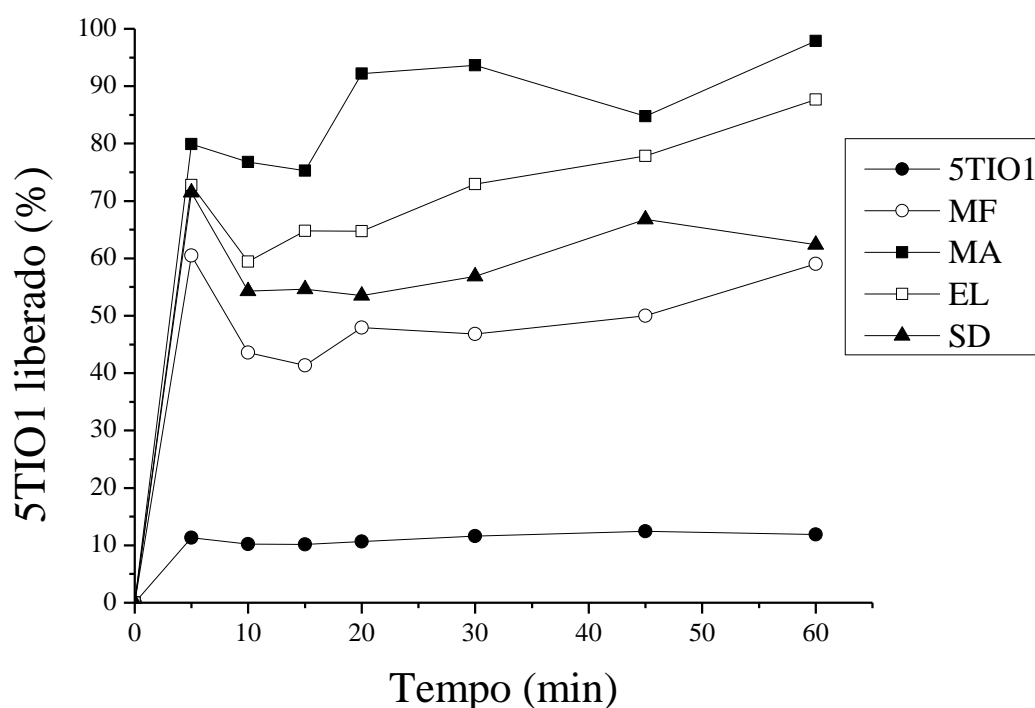
A Figura 5 mostra que em todos os espectros de misturas binárias nenhum pico novo apareceu, indicando que nenhuma ligação foi criada entre o 5TIO1 e a SBCD. Os dados também indicam que os espectros da MF e do complexo de inclusão por EL são o resultado

de uma combinação das bandas do 5TIO1 e SBCD, logo nenhuma interação ocorreu. No entanto, uma significativa redução das bandas citadas acima aconteceram nos complexos obtidos por MA e, principalmente, no SD; indicando que essas técnicas de obtenção foram as mais eficientes e que, possivelmente, o 5TIO1 tenha interagido por completo na cavidade da ciclodextrina. Essa hipótese pode ser sustentada pelo fato, do 5TIO1 possuir grupos doadores de elétrons e elétrons desemparelhados por toda a sua estrutura, facilitando ligações intermoleculares com os grupos aceptores de elétrons na cavidade da ciclodextrina.

Estudo de dissolução

A Figura 6 mostra os perfis de dissolução das amostras. Cinco minutos após o início do teste de dissolução, a porcentagem de 5TIO1 dissolvido foi 11,3%, enquanto a porcentagem de 5TIO1 dissolvida a partir do complexo SBCD foi mais de 60%. Observou-se também que a liberação do 5TIO1 pelos complexos de inclusão foi superior ao 5TIO1 puro e a MF. Isso pode ser atribuído a: (a) redução da tensão interfacial entre drogas insolúveis em água e o meio de dissolução e (b) o estado amorfo de alta energia/redução da cristalinidade que segue a complexação (FERNANDES et al., 2001).

Figura 6. Perfis de dissolução do 5TIO1, da mistura física e dos complexos de inclusão.



Fonte: Arquivo pessoal.

Uma maneira também utilizada para fins comparativos de dissolução é a eficiência de dissolução (ED) nos tempos 15 e 20 min (Tabela 2). No caso da mistura física, a eficiência de dissolução trouxe uma diferença significativa em comparação ao 5TIO1 puro. Isso parece ser uma consequência do tratamento mecânico que aumenta o contato entre o fármaco e o carreador. Tal fato pode ser atribuído a melhora da molhabilidade de misturas físicas, devido à presença de ciclodextrinas, da mesma forma que, nos estágios iniciais do processo de dissolução, moléculas CD operando localmente na camada hidrodinâmica que envolve as partículas de 5TIO1. Isso resulta em um processo de inclusão *in situ* e produz um rápido aumento na quantidade de fármaco dissolvido (SOARES-SOBRINHO et al, 2011).

Tabela 2. Eficiência de dissolução nos tempos 15 e 20 min do 5TIO1, da mistura física e dos complexos de inclusão.

	5TIO1	MF	MA	EL	SD
%DE _{15min}	8,87	41,59	64,79	54,86	51,03
%DE _{20min}	9,25	42,35	69,53	57,34	51,79

Fonte: Arquivo pessoal.

A Figura 6 e a Tabela 2 evidenciam, através da melhoria da dissolução, a formação dos complexos de inclusão e mostram que o processo de obtenção por malaxagem foi o mais eficiente. Do ponto de vista biofarmacêutico, essa é a análise mais relevante, visto que implica na melhoria da biodisponibilidade do 5TIO1.

CONCLUSÃO

Nesse trabalho, o uso de diferentes técnicas analíticas corroboram para investigação da formação dos complexos de inclusão 5TIO1/SBCD. No entanto, somente através do espectro de infravermelho, pode-se discriminar que os métodos mais eficazes na formação dos complexos foram o MA e SD. Entretanto, a MA foi método mais eficiente para o incremento na velocidade de dissolução, cerca de 8 vezes melhor que o 5TIO1 isolado, parâmetro essencial no âmbito biofarmacêutico. A malaxagem, portanto, foi o melhor método para formação do complexo de inclusão o que torna o *scale up* de uma futura formulação mais conveniente, devido ao fato dessa técnica ser barata, simples, com alto rendimento e largamente utilizada pela indústria farmacêutica.

REFERÊNCIAS

ABU-HASHEM, A.A.; EL-SHEHRY, M.F.; BADRIA, F.A-E. Design and synthesis of novel thiophenecarbohydrazide, thienopyrazole and thienopyrimidine derivatives as antioxidant and antitumor agents. **Acta Pharmaceutica**, v. 60, p. 311-323, 2010.

AMR, A.E-G.E.; SHERIF, M.H.; ASSY, M.G.; AL-OMAR, M.A.; RAGAB, I. Antiarrhythmic, serotonin antagonist and antianxiety activities of novel substituted thiophene derivatives synthesized from 2-amino-4,5,6,7-tetrahydro-N-phenylbenzol[b]thiophene-3-carbozamide. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.45, p. 5935-5942, 2010.

CALLIGARO, D.O.; FAIRHURST, J.; HOTTEN, T.M.; MOORE, N.A.; TUPPER, D.E. The synthesis and biological activity of some known and putative metabolites of the atypical antipsychotic agent olanzapine (LY170053). **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 7, n. 1, p. 25-30, 1997.

DAVIS M.E; BREWSTE, M. E. Cyclodextrin-based pharmaceuticals: past, present and future. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, p. 1023-35, 2004.

ÉHEN, Z.; GIORDANO, F.; SZTATISZ, J.; JICSINSZKY, L.; NOVÁK, C. Thermal characterization of natural and modified cyclodextrins using TG-MS combined technique. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 80, n. 2, p. 419-424, 2005.

FAKHR, I.M.I.; RADWAN, M.A.A.; EL-BATRAN, S.; EL-SALAM, O.M.E.A.; EL-SHENAWY, S.M. Synthesis and pharmacological evaluation of 2-substituted benzo[b]thiophenes as anti-inflammatory and analgesic agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.44, p. 1718-1725, 2009.

FDA; **Guidance for Industry - Dissolution Testing of Immediate Release Solid Oral Dosage Forms**. Rockville, 1997.

FERNANDES, L.P.; OLIVEIRA, W.P.; SZTATISZ, J.; SZILÁGYI, M.; NOVÁK, C. Solid state studies on molecular inclusions of *Lippia sidoides* essential oil obtained by spray drying. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 95, n. 3, p. 855-863, 2009.

FRANK, D.W.; GRAY, J.E.; WEAVER, R.N. Cyclodextrin nephrosis in the rat. **American Journal of Pathology**, v. 83, n. 2, p. 367-374, 1976.

FREITAS, M.R.; ROLIM, L.A.; SOARES, M.F.R.; ROLIM-NETO, P.J.; ALBUQUERQUE, M.M.; SOARES-SOBRINHO, J.L. Inclusion complexo f methyl- β -cyclodextrin and olanzapine as potential drug delivery system for schizophrenia. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, p. 1095-1100, 2012.

GHOAGARE, J.G.; BHANDARI, S.V.; BOTHARA, K.G.; MADGULKAR, A.R.; PARASHAR, G.A.; SONAWANE, B.G.; INAMDAR, P.R. Design, synthesis and pharmacological screening of potential anticonvulsant agents using hybrid approach. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, p. 857-863, 2010.

GONCALES, C.E.P.; ARALDI, D.; PANATIERI, R.B.; ROCHA, J.B.T.; ZENI, G.; NOGUEIRA, C.W. Antinociceptive properties of acetylenic thiophene and furan derivatives: evidence for the mechanism of action. **Life Sciences**, v. 76, p. 2221-2234, 2005.

ISLOOR, A.M.; KALLURAYA, B.; PAI, K.S. Synthesis, characterization and biological activities of some new benzo[b]thiophene derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, p. 825-830, 2010.

IRIE, T.; UEKAMA, K. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. III. Toxicological issues and safety evaluation. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 86, n. 2, p. 147-162, 1997.

KHAN, K. A.; RHODES, C. T. Effect of compaction pressure on the dissolution efficiency of some direct compression systems. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, v. 47, p. 594-607, 1972.

LOCKWOOD, S.F.; O'MALLEY, S.; MOSHER, G.L. Improved aqueous solubility of crystalline astaxanthin (3'3'-dihydroxy- β,β -carotene-4,4'-dione) by Captisol® (sulfobutyl ether β -cyclodextrin). **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 92, n. 4, p. 922- 926, 2003.

LOFTSSON, T.; HREINSDÓTTIR, D.; MÁSSON, M. Evaluation of cyclodextrin solubilization of drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 302, p. 18-28, 2005.

LOFTSSON, T.; DUCHÊNE, D. Ciclodextrins and their pharmaceutical applications. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 329, p. 1-11, 2007.

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. **Latin American Journal of Pharmacy**, v.30, p.1492-1499, 2011.

NAGASE, Y.; ARIMA, H.; WADA, K.; SUGAWARA, T.; SATOH, H.; HIRAYAMA, F.; UEKAMA, K. Inhibitory effect of sulfobutyl ether β -cyclodextrin on DY-9760e-induced cellular damage: in vitro and in vivo studies. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 92, n. 12, p. 2466-2474, 2003.

NOVÁK, C.; ÉHEN, Z.; FODOR, M.; JICSINSKY, L.; ORGOVÁNYI, J. Application of combined thermoanalytical techniques in the investigation of cyclodextrin inclusion complexes. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 84, n. 3, p. 693-701, 2006.

ORGOVÁNYI, J.; PÖPPL, L.; OTTA, K.H.; LOVAS, G.A. Thermoanalytical method for studying the guest content in cyclodextrin inclusion complexes. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 81, p. 261-266, 2005.

TAKAHASHI, A.I.; VEIGA, F.J.B.; FERRAZ, H.G. A literature review of cyclodextrins inclusion complexes characterization – part II: X-ray diffraction, infrared spectroscopy and nuclear magnetic resonance. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review Research**, v. 12, n. 1, p. 1-12, 2012.

THE UNITED STATES PHARMACOPEIAL CONVENTION. **USP 31**, Rockville, p. 194-195, 2008.

RASHAD, A.E.; SHAMROUKH, A.H.; ABDEL-MEGEID, R.E.; MOSTAFA, A.; EL-SHESHENY, R.; KANDEIL, A.; ALI, M.A.; BANERT, K. Synthesis and screening of some novel fused thiophene and thienopyrimidine derivatives for anti-avian influenza virus (H5N1) activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, p. 5251-5257, 2010.

SABINO, E. B. **Desenvolvimento de sistema de vetorização a base de novo derivado tiofênico**. 2011. 122f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2011.

SOARES, M.F.R.; SOARES-SOBRINHO, J.L.; SILVA, K.E.R.; ALVES, L.D.S.; LOPES, P.Q.; CORREIA, L.P.; SOUZA, F.S.; MACÊDO, R.O.; ROLIM-NETO, P.J. Thermal characterization of antimicrobial drug ornidazole and its compatibility in a solid pharmaceutical product. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 104, p. 307-313, 2011.

SOARES-SOBRINHO, J.L.; SOARES, M.F.R.; LOPES, P.Q.; CORREIA, L.P.; SOUZA, F.S.; MACÊDO, R.O.; ROLIM-NETO, P.J. A preformulation study of a new medicine for Chagas disease treatment: physicochemical characterization, thermal stability, and compatibility of benznidazole. **American Association of Pharmaceutical Scientists**, v.11, n. 3, 2010.

SOARES-SOBRINHO, J.L.; SOARES, M.F.R.; LABANDEIRA, J.J.T.; ALVES, L.D.S.A.; ROLIM-NETO, P.J. Improving the solubility of the antichagasic drug bensnidazole through formation of inclusion complexes with cyclodextrins. **Química Nova**, v. 34, n. 9, p. 1534-1538, 2011.

SOARES-SOBRINHO, J.L.; SANTOS, F.L.A.; LYRA, M.A.M.; ALVES, L.D.S.; ROLIM, L.A.; LIMA, A.A.N.; NUNES, L.C.C.; SOARES, M.F.R.; ROLIM-NETO, P.J.; TORRES-LABANDEIRA, J.J.T. Benznidazole drug delivery by binary and multicomponent inclusion complexes using cyclodextrins and polymers. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, p. 323-330, 2012.

UEHATA, K.; ANNO, T.; HAYASHIDA, K.; MOTOYAMA, K.; HIRAYAMA, F.; ONO, N.; PIPKIN, J.D.; UEKANA, K.; ARIMA, H. Effect of sulfobutyl ether- β -cyclodextrin on bioavailability of insulin glargine and blood glucose level after subcutaneous injection to rats. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 419, p. 71-76, 2011.

8. CONCLUSÃO

Os estudos psicofarmacológicos do 5TIO1 deram subsídio para os estudos de pré-formulação do 5TIO1. Isso porque, esta nova entidade química, a qual tem sua propriedade intelectual garantida por meio de depósito de patente, apresentou efeito ansiolítico muito similar ao Diazepam, fármaco amplamente utilizado nos transtornos de ansiedade; e, além disso, mostrou proteger o cérebro contra danos neuronais causados pelo estresse oxidativo.

A caracterização físico-química de um novo composto, principalmente para moléculas de baixa solubilidade, é de extrema relevância para subsidiar, racionalmente, as possíveis estratégias farmacotécnicas necessárias para garantir uma formulação farmacêutica segura e eficaz. Os estudos de pré-formulação do 5TIO1 indicaram características do estado sólido importantes para escolha do processo de manufatura de uma forma farmacêutica sólida e indicaram estratégias de solubilização desse fármaco com ciclodextrinas. As diversas técnicas analíticas utilizadas indicaram a formação dos complexos de inclusão. E os teste de dissolução comprovaram a performance desses complexos para o aumento da solubilização do 5TIO1.

Pode-se então afirmar que o 5TIO1 é uma nova entidade química promissora para portfólios da indústria farmacêutica voltados para patologias relativas ao Sistema Nervoso Central; e que obtenção de complexos de inclusão com ciclodextrinas são importantes ferramentas farmacotécnicas para garantir a eficácia farmacológica desse composto, em particular, destaca-se, em termos de custo e benefício, a malaxagem como melhor método de obtenção e a β -ciclodextrina como o melhor excipiente.

9. PERSPECTIVAS

- Avaliar a atividade de locomotora do 5TIO1 nos modelos de campo aberto e *rota rod*;
- Investigar os efeitos do 5TIO1 contra a apoptose, necrose e/ou autofagia;
- Classificar o 5TIO1 baseado no Sistema de Classificação Biofarmacêutica;
- Obter monocristais de 5TIO1 para identificação cristalográfica e análise de polimorfismos;
- Elucidar o mecanismo de degradação do 5TIO1 através de termogravimetria acoplada a espectrometria de massas;
- Comparar as cinéticas de degradação do 5TIO1 isolado e dos complexos de inclusão;
- Investigar a complexação do 5TIO1 com as ciclodextrinas através de cálculos computacionais e RMN.

REFERÊNCIAS

ABU-HASHEM, A.A.; EL-SHEHRY, M.F.; BADRIA, F.A-E. Design and synthesis of novel thiophenecarbohydrazide, thienopyrazole and thienopyrimidine derivatives as antioxidant and antitumor agents. **Acta Pharmaceutica**, v. 60, p. 311-323, 2010.

ACHILLADELIS, B.; ANTONAKIS, N. The dynamics of technological innovation: the case of the pharmaceutical industry. **Research Policy**, v.30, p. 535-588, 2001.

AGUIAR, C.C.T.; ALMEIDA, A.B.; ARAÚJO, P.V.P.; ABREU, R.N.D.C.; CHAVES, E.M.C.; VALE, O.C.; MACÊDO, D.S.; WOODS, D.J.; FONTELES, M.M.F.; VASCONCELOS, S.M.M. Oxidative stress and epilepsy: literature review. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2012, p. 1-12, 2012.

AGUIAR, M.R.M.P.; GEMAL, A.L.; GIL, R.A.S.S. Caracterização de polimorfismo em fármacos por ressonância magnética nuclear no estado sólido. **Química Nova**, v. 22, n. 4, p. 553-564, 1999.

AMIDON, G.L.; LANNERNÄS, H.; SHAH, V.P.; CRISON, J.R. A theoretical basis for Biopharmaceutical Drug Classification: the correlation *in vitro* drug product dissolution and *in vivo* bioavailability. **Pharmaceutical Research**, v. 12, n. 3, 1995.

AMR, A.E-G.E.; SHERIF, M.H.; ASSY, M.G.; AL-OMAR, M.A.; RAGAB, I. Antiarrhythmic, serotonin antagonist and antianxiety activities of novel substituted thiophene derivatives synthesized from 2-amino-4,5,6,7-tetrahydro-N-phenylbenzol[b]thiophene-3-carbozamide. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.45, p. 5935-5942, 2010.

ARAÚJO, A.A.S.; STORPIRTIS, S.; MERCURI, L.P.; CARVALHO, F.M.S.; SANTOS-FILHO, M.; MATOS, J.R. Thermal analysis of the antiretroviral zidovudine (AZT) and evaluation of the compatibility with excipients used in solid dosage forms. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 260, n. 2, p. 303–314, 2003.

BARNES, D.M.; HAIGHT, A.R.; HAMEURY, T.; MCLAUGHLIN, M.A.; MEI, J.; TEDROW, J.S.; TOMA, J.D.R. New conditions for the synthesis of thiophenes via the Knoevenagel/Gewald reaction sequence. Application to the synthesis of multitargeted kinase inhibitor. **Tetrahedron**, v. 62, p. 11311-11319, 2006.

BENNANI, Y.L. Drug discovery in the next decade: innovation needed ASAP. **Drug Discovery Today**, v. 16, n. 17/18, p. 779-792, 2011.

BHARATE, S.S.; BHARATE, S.B.; BAJAJ, A.N. Interactions and incompatibilities of pharmaceutical excipients with active pharmaceutical ingredients: a comprehensive review. **Journal of Excipients and Food Chemicals**, v. 1, n. 3, p. 3-26, 2010.

BLAGDEN, N.; MATAS, M.; GAVAN, P.T.; YORK, P. Crystal engineering of active pharmaceutical ingredients to improve solubility and dissolution rates. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, p. 617-630, 2007.

BOUAYED, J.; BOHN, T. Exogenous antioxidants – double-edged swords in cellular redox state. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 3, n. 4, p. 228-237, 2010.

BOUAYED, J.; RAMMAL, H.; SOULIMANI, R. Oxidative stress and anxiety. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2, n. 2, p. 63-67, 2009.

BRANCHU, S.; ROGUEDA, P.G.; PLUMB, A.P.; COOK, W.G. A decision-support tool for the formulation of orally active, poorly soluble compounds. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 32, p. 128-139, 2007.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 310, de 01 de setembro de 2004. **Guia para realização do estudo e elaboração do relatório de equivalência farmacêutica e perfil de dissolução**. Disponível em URL: <http://www.anvisa.gov.br>.

BRITTAIN, H.G.; BOGDANOWICH, S.J.; BUGAY, D.E.; DEVINCENTIS, J.; LEWEN, G.; NEWMAN, A.W. Physical characterization of pharmaceuticals solids. **Pharmaceutical Research**, v. 8, n. 8, p. 963-973, 1991.

BRITTO, M. A. F. O.; NASCIMENTO JR., C. S.; SANTOS, H. F. Análise estrutural de ciclodextrinas: um estudo comparativo entre métodos teóricos clássicos e quânticos. **Química Nova**, v. 27, n. 6, p. 882-888, 2004.

BROWN, J.R.; PETERSEN, B.C. Public entrants, public equity finance and creative destruction. **Journal of Banking & Finance**, v. 34, p. 1077-1088, 2010.

CALLIGARO, D.O.; FAIRHURST, J.; HOTTEN, T.M.; MOORE, N.A.; TUPPER, D.E. The synthesis and biological activity of some known and putative metabolites of the atypical antipsychotic agent olanzapine (LY170053). **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 7, n. 1, p. 25-30, 1997.

CAMERON, M.D. Victor Meyer and the thiophene compounds. **Journal of Chemical Education**, v. 26, n. 10, p. 521-524, 1949.

CARRIER, R.L.; MILLER, L.A.; AHMED, I. The utility of cyclodextrins for enhancing oral bioavailability. **Journal of Controlled Release**, v. 123, p. 78-99, 2007.

CAVALLA, D.; MINHAS, R. Does R&D pay? **Drug Discovery Today**, v. 15, n. 5/6, p. 231-234, 2010.

CHANDLER, D.J. Something's got to give: psychiatric disease on the rise and novel drug development on the decline. **Drug Discovery Today**, 2012 (*in press*).

COMASSETO, J.V.; SANTOS, A.A. Química fina: sua origem e importância. **Revista USP**, n. 76, p. 68-77, 2008.

CUNHA-FILHO, M.S.S.; SÁ-BARRETO, L.C.L. Utilização de ciclodextrinas na formação de complexos de inclusão de interesse farmacêutico. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, n. 1; p. 1-9, 2007.

DAVIS M.E; BREWSTER, M. E. Cyclodextrin-based pharmaceuticals: past, present and future. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, p. 1023-35, 2004.

DI, L.; FISH, P. V.; MANO, T. Bridging solubility between drug discovery and development. **Drug Discovery Today**, v. 17, n. 9/10, 2012.

DOKOUMETZIDIS, A.; MACHERAS, P. A century of dissolution research: from Noyes and Whitney to the Biopharmaceutics Classification System, v. 321, p. 1-11, 2006.

DRUY, M.A. Applications for mid-IR spectroscopy in the pharmaceutical process environment. **Spectroscopy**, v. 19, n. 2, p. 60-63, 2004.

ENNA, S.J.; WILLIAMS, M. Challenges in the search for drugs to treat Central Nervous Systems disorders. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 329, n. 2, p. 404-411, 2009.

ERNST, E. Herbal remedies for anxiety – a systematic review of controlled clinical trials. **Phytomedicine**, v. 13, p. 205-208, 2006.

FAKHR, I.M.I.; RADWAN, M.A.A.; EL-BATRAN, S.; EL-SALAM, O.M.E.A.; EL-SHENAWY, S.M. Synthesis and pharmacological evaluation of 2-substituted benzo[*b*]thiophenes as anti-inflammatory and analgesic agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.44, p. 1718-1725, 2009.

FAUSTINO, T. T.; ALMEIDA, R. B.; ANDREATINI, R. Plantas medicinais no tratamento do transtorno de ansiedade generalizada: uma revisão dos estudos clínicos controlados. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 32, n. 4, 2010.

FDA (1997) "Guidance for Industry Dissolution Testing of Intermediate Release Solid Oral Dosage Forms", US Department of Health and Human Services (CDER).

FERRAZ, H.G.; CONSIGLIERI, V.O.; STORPIRTIS, S. Avaliação da cinética de dissolução de ampicilina em comprimidos comercializados no Brasil. **Revista Farmácia e Bioquímica**, v. 34 n. 2, p. 93-99, 1998.

FIGESE, E.F.; HAGEN, T.A. Pré-formulação. In: LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H.A.J.; KAMG, J.J. (Ed.) **Teoria e prática na Indústria Farmacêutica**. Lisboa: Calouste Gulbekian, 2001. v. 1, p. 295-339.

FIGIBER, H.C. Psychiatry, the Pharmaceutical Industry, and the road to better therapeutics. **Schizophrenia Bulletin**, v. 38, n. 4, p. 649-650, 2012.

FLEITLICH-BILYK, B.; GOODMAN, R. Prevalence of child and adolescent psychiatric disorders in southeast Brazil. **Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry**, v. 43, n. 6, p. 727-734, 2004.

FRIARY, R. Why organic chemists work in the pharmaceutical industry. In: _____. **Jobs in the drug industry: a career guide for chemists**. San Diego: Academic Press, 2000. p. 1-40.

GADELHA, C.A.; QUENTAL, C.; FIALHO, B.C. Saúde e inovação: uma abordagem sistêmica das indústrias da saúde. **Caderno de Saúde Pública**, v. 19, n. 1, p. 47-59, 2003.

GAO, J-M.; DING, L-X.; HU, C-Q. A comparative uncertainty study of the purity assessment of chemical reference substances using differential scanning calorimetry (DSC) and mass balance method. **Thermochemica Acta**, v. 525, p. 1-8, 2011.

GARDNER, C.R.; WASH, C.T.; ALMARSSON, O. Drugs as materials: valuing physical forms in drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, p. 926-934, 2004.

GHOHARE, J.G.; BHANDARI, S.V.; BOTHARA, K.G.; MADGULKAR, A.R.; PARASHAR, G.A.; SONAWANE, B.G.; INAMDAR, P.R. Design, synthesis and pharmacological screening of potential anticonvulsant agents using hybrid approach. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, p. 857-863, 2010.

GIORDANETTO, F.; BOSTRÖM, J.; TYRCHAN, C. Follow-on drugs: How far should chemists look? **Drug Discovery Today**, v. 16, n. 15/16, p. 722-732, 2011.

GIRON, D. Applications of thermal analysis and coupled techniques in pharmaceutical industry. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 68, p. 335-357, 2002.

GOES, T.C.; ANTUNES, F.D.; TEXEIRA-SILVA, F. Trait and state anxiety in animal models: is there correlation?. **Neurosciences Letters**, v. 450, p. 266-269, 2009.

GONCALES, C.E.P.; ARALDI, D.; PANATIERI, R.B.; ROCHA, J.B.T.; ZENI, G.; NOGUEIRA, C.W. Antinociceptive properties of acetylenic thiophene and furan derivatives: evidence for the mechanism of action. **Life Sciences**, v. 76, p. 2221-2234, 2005.

GONÇALVES, D.C.; BYRNE, G.J. Intervention for generalized anxiety disorder in older adults: systematic review and meta-analysis. **Journal of Anxiety Disorders**, v. 26, p. 1-11, 2012.

GOPINATH, R.; NAIDU, R.A.S. Pharmaceutical preformulation studies – current review. **International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives**, v. 2, n. 5, p. 1391-1400, 2011.

GOWTHAMARAJAN, K.; SINGH, S.K. Dissolution testing for poorly soluble drugs: a continuing perspective. **Dissolution Technologies**, p. 24-32, 2010.

GROSS, C; HEN, R. The developmental origins of anxiety. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 5, p.545-552, 2004.

HALEBLIEN, J.; MCCRONE, W. Pharmaceutical applications of polymorphism. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 58, n. 8, p. 911-929, 1969.

HIGUCHI, T.; CONNORS, A.K. Phase-solubility techniques. **Advances in Analytical Chemistry and Instrumentation**, v. 4, p. 117-212, 1965.

HOLZGRABE, U.; DIEHL, B.W.K.; WAWER, I. NMR spectroscopy in pharmacy. **Journal of Pharmaceutical Biomedical Analysis**, v. 17, p. 557-616, 1998.

HUANG, X-G.; LIU, J.; REN, J.; WANG, T.; CHEN, W.; ZENG, B-B. A facile and practical one-pot synthesis of multisubstituted 2-aminothiophenes via imidazole-catalyzed Gewald reaction. **Tetrahedron**, v. 67, p. 6202-6205, 2011.

ISLOOR, A.M.; KALLURAYA, B.; PAI, K.S. Synthesis, characterization and biological activities of some new benzo[b]thiophene derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, p. 825-830, 2010.

IVANISEVIC, I.; MCCLURG, R.B.; SCHIELDS, P.J. Uses of x-ray powder diffraction in the pharmaceutical industry. In: GAD, S.C. (Ed.) **Pharmaceutical Sciences Encyclopedia: drug discovery, development, and manufacturing**. John Wiley & Sons, Inc., 2010.

JANSOOK, P.; LOFTSSON, T. CDs as solubilizers: effects of excipients and competing drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 379, n. 1; p. 32-40, 2009.

JOHNSTONE, C.; PAIRAUDEAU, G.; PETTERSSON, J.A. Creativity, innovation and lean sigma: a controversial combination? **Drug Discovery Today**, v. 16, n. 1/2, p. 50-57, 2011.

JOY, D.C. Scanning microscopy for materials characterization. **Current Opinion in Solid State and Materials Science**, v. 2, p.465-468, 1997

KAWABATA, Y.; WADA, K.; NAKATANI, M.; YAMADA, S.; ONOUE, S. Formulation design for poorly water-soluble drugs based on biopharmaceutics classification system: basic approaches and practical applications. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 420, p. 1-10, 2011.

KAWAKAMI, K. Modification of physicochemical characteristics of active pharmaceutical ingredients and application of supersaturable dosage forms for improving bioavailability of poorly absorbed drugs. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, p. 480-495, 2012.

KEELEY, M.L.; STORCH, E.A. Anxiety disorders in youth. **Journal of Pediatric Nursing**, v. 24, n. 1, p. 26-40, 2009.

KESSLER, R.C.; BERGLUND, P.; DEMLER, O.; JIN, R.; MERIKANGAS, K.R.; WALTERS, E.E. Lifetime prevalence and age-of-onset distributions of DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication. **Archives of General Psychiatry**, v. 62, p. 593-602, 2005.

KESSLER, R.C.; AGUILAR-GAXIOLA, S.; ALONSO, J.; CHATTERJI, S.; LEE, S.; ORMEL, J.; ÜSTÜN, T.B.; WANG, P.S. The global burden of mental disorders: an update from the WHO World Mental Health (WMH) Surveys. **Epidemiologia e Psichiatria Sociale**, v. 18, n. 1, p. 23-33, 2009.

KHAN, K. A.; RHODES, C. T. Effect of compaction pressure on the dissolution efficiency of some direct compression systems. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, v. 47, p. 594-607, 1972.

KHANNA, I. Drug discovery in pharmaceutical industry: productivity challenges and trends. **Drug Discovery Today**, v. 17, n. 19/20, p. 1088-1102, 2012.

KOUNDOURELLIS, J.E.; MALLIOU, E.T.; SULLIVAN, R.A.L.; CHAPMAN, B. X-ray Powder Diffraction Data for 12 Drugs in Current Use. **Journal of Chemical and Engineering Data**, v. 45, n.6, p. 1001-1006, 2000.

KOKEL, D.; PETERSON, R.T. Chemobehavioural phenomics and behavior-based psychiatric drug discovery in the zebrafish. **Briefings in Functional Genomics and Proteomics**, v. 7, n. 6, p. 483-490, 2008.

KURKOV, S.V.; LOFTSSON, T. Cyclodextrins. **International Journal of Pharmaceutics**. 2012 (*in press*).

LAU, E. Preformulation studies. In: AHUJA, S.; SEYPINSKI, S.(Eds) **Handbook of Modern Pharmaceutical Analysis**. San Diego: Elsevier, 2011. p. 173-233.

LI, H.; KIANG, Y-H.; JONA, J. Multiple approaches to pharmaceutical polymorphism investigation – a case study. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 38, p. 426-432, 2009.

LIMA, A.A.N.; SOARES-SOBRINHO, J.L.; CORRÊA-JÚNIOR, R.A.C.; ROLIM-NETO, P.J. Alternative technologies to improve solubility of poorly water soluble drugs. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 27, n. 5, p. 789-797, 2008.

LIMA, K.M.G.; RAIMUNDO-JR, I.M.; SILVA, A.M.S.; PIMENTEL, M.F. Sensores ópticos com detecção no infravermelho próximo e médio. **Química Nova**, v.32, n. 6, p. 1635-1643, 2009.

LIMÓN-PACHECO, J.; GONSEBATT, M.E. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. **Mutation Research**, v. 674, p. 137-147, 2009.

LIPINSKI, C.A. Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 44, n.1, p. 235-249, 2000.

LIPINSKI, C.A.; LOMBARDO, F.; DOMINY, B.W.; FEENEY, P.J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 46, n.1-3, p. 3-26, 2001.

LIU, X.; CHEN, C.; SMITH, B. J. Progress in brain penetration evaluation in drug discovery and development. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 325, n. 2, p. 349-356, 2008.

LOFTSSON, T.; DUCHÊNE, D. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 329, p. 1-11, 2007.

LOWMAN, M.; TROTT, P.; HOECHT, A.; SELLAM, Z. Innovation risks of outsourcing in pharmaceutical new product development. **Technovation**, v. 32, p. 99-109, 2012.

MACCOSS, M.; BAILLIE, T.A. Organic Chemistry in Drug Discovery. **Science**, v. 303, p. 1810-1813, 2004.

MANADAS, R.; PINA, M.E.; VEIGA, F. A dissolução *in vitro* na previsão oral de fármacos em formas farmacêuticas de liberação modificada. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, n. 4, p. 375-399, 2002.

MATHKAR, S.; KUMAR, S.; BYSTOL, A.; OLAWOORE, K.; MIN, D.; MARKOVICH, R.; RUSTUM, A. The use of differential scanning calorimetry for the purity verification of pharmaceutical reference standards. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 49, n. 3, p. 627-631, 2009.

MARTÍNEZ, P.B.; NAVARRO, M.G. Disoluciones. In: VILA JATO, J.L (ed.). Tecnología Farmacêutica: aspectos fundamentales de los sistemas farmacêuticos y operaciones básicas. v. 1. Madrid: Síntesis, 2001, p. 69-142.

MAXIMIANO, F.P.; COSTA, G.H.Y.; SOUZA, J.; CUNHA-FILHO, M.S.S. Caracterização físico-química do fármaco antichagásico benznidazol. **Química Nova**, v. 33, n. 8, p. 1714-1719, 2010.

MCARTHUR, R.A. Value of animals models for predicting CNS therapeutic action. In: KOOB, G.F.; MOAL, M.; THOMPSON, R.F. (Eds). **Encyclopedia of Behavioral Neuroscience**. Oxford: Academic Press, 2010. p. 436-444.

MEI, H.; XIA, T.; FENG, G.; ZHU, J.; LIN, S.M.; QIU, Y. Opportunities in systems biology to Discovery mechanisms and repurpose drugs for CNS diseases. **Drug Discovery Today**, 2012 (*in press*).

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. **Latin American Journal of Pharmacy**, v.30, p.1492-1499, 2011.

MERISKO-LIVERSIDGE, E.; LIVERSIDGE, G.G. Nanosizing for oral and parenteral drug delivery: a perspective on formulating poorly-water soluble compounds using wet media milling technology. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 63, p. 427-440, 2011.

MILITÃO, G.C.G.; FERREIRA, P.M.P.; FREITAS, R.M. Effects of lipoic acid on oxidative stress in rat striatum after pilocarpine-induced seizures. **Neurochemistry International**, v. 56, p. 16–20, 2010.

MUNOS, B. Lessons from 60 years of pharmaceutical innovation. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 8, p. 959-968, 2009.

NATIONAL INSTITUTE OF MENTAL HEALTH. (2009). **Anxiety disorders**. Disponível em: < <http://www.nimh.nih.gov/health/publications/anxiety-disorders/nimhanxiety.pdf>>. Acessado em: 29 set 2012.

NEWMAN, A.W.; BYRN, S. Solid-state analysis of the active pharmaceutical ingredient in drug products. **Drug Discovery Today**, v. 8, n. 19, p. 898-905, 2003.

NG, F.; BERK, M.; DEAN, O.; BUSH, A.I. Oxidative stress in psychiatric disorders evidence base and therapeutic implications. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 11, p. 851-876, 2008.

NICHOLS, G. Applications of cathodoluminescence spectroscopy and imaging in the characterization of pharmaceutical materials. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, p. 19-42, 2012.

NIELSEN, T.E.; SCHREIBER, S.L. Towards the optimal screening collection: a synthesis strategy. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 47, n. 1, p. 48-56, 2008.

NIKI, E. Assessment of antioxidant capacity *in vitro* and *in vivo*. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 49, p. 503-515, 2010.

NOBRE-JÚNIOR, H.V.; FONTELES, M.M.F.; FREITAS, R.M. Acute seizure activity promotes lipid peroxidation, increased nitrite levels and adaptive pathways against oxidative stress in the frontal cortex and striatum. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2, n. 3, p. 1-8, 2009.

NOYES, A.A.; WITHNEY, W.R. The rate of solution of solid substances in their own solutions. **Journal of The American Chemical Society**, v. 19, p. 930-934, 1987.

OLATUNJI, B.O.; CISLER, J.M.; DEACON, B.J.; Efficacy of cognitive behavioral therapy for anxiety disorders: a review of meta-analytic findings. **Psychiatric Clinics of North America**, v. 33, p. 557-577, 2010.

PAUL, S.M.; MYTELKA, D.S.; DUNWIDDIE, C.T.; PERSINGER, C.C.; MUNOS, B.H.; LINDBORG, S.R.; SCHACHT, A.L. How to improve R&D productivity: the pharmaceutical industry's grand challenge. **Nature Reviews: Drug Discovery**, v. 9, p. 203-214, 2010.

PERKMANN, M.; WALSH, K. University-industry relationships and open innovation: Towards a research agenda. **International Journal of Management Reviews**, v. 9, n.4, p. 259-280, 2007.

PHADNIS, N.V.; CAVATUR, R.K.; SURYANARAYANAN, R. Identification of drugs in pharmaceutical dosage forms by x-ray powder diffractometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 15, p. 929-943, 1997.

PORS, K.; GOLDBERG, F.W.; LEAMON, C.P.; RIGBY, A.C.; SNYDER, S.A.; FALCONER, R.A. The changing landscape of cancer drug discovery: a challenge to the medicinal chemist of tomorrow. **Drug Discovery Today**, v. 14, n. 21/22, p. 1045-1050, 2009.

PRETI, A. Animal model and neurobiology of suicide. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 35, p. 818-830, 2011.

PUTEROVÁ, Z.; KRUTOŠÍKOVÁ, A.; VÉGH, D. Applications of substituted 2-aminothiophenes in drug design. **Nova Biotechnologica**, v.9, n.2, p. 167-173, 2009.

RAMMAL, H.; BOUAYED, J.; YOUNOS, C.; SOULIMANI, R. Evidence that oxidative stress is linked to anxiety-related behavior in mice. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 22, p. 1156-1159, 2008.

RASHAD, A.E.; SHAMROUKH, A.H.; ABDEL-MEGEID, R.E.; MOSTAFA, A.; EL-SHESHENY, R.; KANDEIL, A.; ALI, M.A.; BANERT, K. Synthesis and screening of some

novel fused thiophene and thienopyrimidine derivatives for anti-avian influenza virus (H5N1) activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, p. 5251-5257, 2010.

REMYINGTON, G. From mice to men: what can animal models tell us about the relationship between mental health and physical activity? **Mental Health and Physical Activity**, v. 2, p. 10-15, 2009.

RIBEIRO, A.; FIGUEIRAS, A; SANTOS, D; VEIGA, F. Preparation and solid-state characterization of inclusion complexes formed between miconazole and methyl- β -cyclodextrin. **AAPS PharmSciTech**, v. 9, n. 4, p. 1102-1109, 2008.

RODRIGUES, P.O.; CARDOSO, T.F.M.; SILVA, M.A.S.; MATOS, J.R. Aplicações de técnicas termoanalíticas na caracterização, determinação da pureza e cinética de degradação da zidovudina (AZT). **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 24, n. 3, p. 383-387, 2005.

RUDOLPH, U.; KNOFLACH, F. Beyond classical benzodiazepines: novel therapeutic potential of GABA_A receptor subtypes. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 10, p. 685-697, 2011.

SAAL, C.; PETEREIT, A.C. Optimizing solubility: kinetic versus thermodynamic solubility temptations and risks. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 47, p. 589-595, 2012.

SABINO, E. B. **Desenvolvimento de sistema de vetorização a base de novo derivado tiofênico**. 2011. 122f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2011.

SALIM, S.; SARRAJ, N.; TANEJA, M.; SAHA, K.; TEJADA-SIMON, M.V.; CHUGH, G. Moderate treadmill exercise prevents oxidative stress-induced anxiety-like behavior in rats. **Behavioural Brain Research**, v. 208, p. 545-552, 2010a.

SALIM, S.; ASGHAR, M.; CHUGH, G.; TANEJA, M.; XIA, Z.; SAHA, K. Oxidative stress: a potential recipe for anxiety, hypertension and insulin resistance. **Brain Research**, v. 1359, p. 178-185, 2010b.

SALIM, S.; ASGHAR, M.; TANEJA, M.; HOVATTA, I.; CHUGH, G.; VOLLERT, C.; VU, A. Potential contribution of oxidative stress and inflammation to anxiety and hypertension. **Brain Research**, v. 1404, p. 63-71, 2011.

SANTOS, I.M.S.; TOMÉ, A.R.; SALDANHA, G.B.; FERREIRA, P.M.P.; MILITÃO, G.C.G.; FREITAS, R.M. Oxidative stress in the hippocampus during experimental seizures can be ameliorated with the antioxidant ascorbic acid. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2, n. 4, p. 1-8, 2009.

SARTER, M.; TRICKLEBANK, M. Revitalizing psychiatric drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 11, p. 423-424, 2012.

SCHOEPP, D.D. Where will new neuroscience therapies come from? **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 10, p. 715-716, 2011.

SCOTTI, L.; SCOTTI, M.T.; LIMA, E.O.; SILVA, M.S.; LIMA, M.C.A.; PITTA, I.R.; MOURA, R.O.; OLIVEIRA, J.G.B.; CRUZ, R.M.D.; MENDONÇA-JUNIOR, F.J.B. Experimental methodologies and evaluations of computer-aided drug design methodologies applied to a series of 2-aminothiophene derivatives with antifungal activities. **Molecules**, v. 17, p. 2298-2315, 2012.

SEDELNIKOVA, O.A.; REDON, C.E.; DICKEY, J.S.; NAKAMURA, A.J.; GEORGAKILAS, A.G.; BONNER, W.M. Role of oxidatively induced DNA lesions in human pathogenesis. **Mutation Research**, v. 704, p. 152-159, 2010.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSIER, G. C.; MORRIL, T. C. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos** Trad. de Ricardo Bicca de Alencastro e Roberto de Barros Faria. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Dois S.A., 1979. p. 65-122.

SINGH, D.; MARSHALL, P.V.; SHIELDS, L.; YORK, P. Solid-state characterization of chlordiazepoxide polymorphs. **Journal Pharmaceutical Sciences**, v. 87, n. 5, p. 655-662, 1998.

SMITH, P.; SELLORS, J. FT-IR identification: the expertise required to ensure compliance. **Pharmaceutical Technology Europe**, v. 23, n. 9, p. 85-86, 2011.

SOUSA, R.T.; LIU, S.; PAPAGEORGIU, L.G.; SHAH, N. Global supply chain planning for pharmaceuticals. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 89, p. 2396-2409, 2011.

SOUZA, J.S.; FERRÃO, M.F. Aplicações da espectroscopia no infravermelho no controle de qualidade de medicamentos contendo diclofenaco de potássio. Parte I: Dosagem por regressão multivariada. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 3, p. 437-445, 2006.

SOUZA, C.G.; MOREIRA, J.D.; SIQUEIRA, I.R.; PEREIRA, A.G.; RIEGER, D.K.; SOUZA, D.O.; SOUZA, T.M.; PORTELA, L.V.; PERRY, M.L.S. Highly palatable diet consumption increases oxidation in rat frontal cortex and anxiety-like behavior. **Life Sciences**, v. 81, p. 198-203, 2007.

SOUZA, B.C.C.; OLIVEIRA, T.B.; AQUINO, T.M.; LIMA, M.C.A.; PITTA, I.R.; GALDINO, S.L.; LIMA, E.O.; GONÇALVES-SILVA, T.; MILITÃO, G.C.G.; SCOTTI, L.; SCOTTI, M.T.; MEDONÇA-JUNIOR, F.J.B. Preliminary antifungal and cytotoxic evaluation of synthetic cycloalkyl[b]thiophene derivatives with PLS-DA analysis. **Acta Pharmaceutica**, v. 62, p. 221-236, 2012.

SRIDHAR, M.; RAO, R.M.; BABA, N.H.K.; KUMBHARE, R.M. Microwave accelerated Gewald reaction: synthesis of 2-aminothiophenes. **Tetrahedron Letters**, v. 48, p. 3171-3172, 2007.

STEGEMANN, S.; LEVEILLER, F.; FRANCHI, D.; JONG, H.; LINDÉN, H. When poor solubility becomes an issue: from early stage to proof of concept. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 31, p. 249-261, 2007.

STEIN, D.J. Social anxiety disorder in the West and in the East. **Annals of Clinical Psychiatry**, v. 21, n. 2, p. 109-117, 2009.

SWAMIVELMANICKAM, M.; VALLIAPPAN, K.; REDDY, P.G.; MADHUKAR, A.; MANAVALAN, R. Preformulation studies for amoxicillin trihydrate and dicloxacillin sodium as mouth dissolve tablets. **International Journal of ChemTech Research**, v. 1, n.4., p. 1032-1035, 2009.

TAKAHASHI, A.I.; VEIGA, F.J.B.; FERRAZ, H.G. A literature review of cyclodextrins inclusion complexes characterization – part I: phase solubility diagram, dissolution and scanning electron microscopy. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review Research**, v. 12, n. 1, p. 1-6, 2011.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M.T.D.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, p. 44-84, 2007.

VAN DOOREN, A.A.; MÜLLER, B.W. Purity determinations of drugs with differential scanning calorimetry (DSC) – a critical review. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 20, n.3, p. 217-233, 1984.

VAUZOUR, D. Dietary polyphenols as modulators of brain functions: biological actions and molecular mechanisms underpinning their beneficial effects. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2012, p 1-16, 2012.

VEIGA, F.J.B.; PERCORELLI, C.C.M.F.; RIBEIRO, L.S.S. As ciclodextrinas em tecnologia farmacêutica. 1 ed. Coimbra: Minerva Coimbra, 2006. 228 p.

VIPPAGUNTA, S.R.; BRITAIN, H.G.; GRANT, D.J.W. Crystalline solids. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 48, p. 3-26, 2001.

VOLLERT, C.; ZAGAAR, M.; HOVATTA, I.; TANEJA, M.; VU, A.; DAO, A.; LEVINE, A.; ALKADHI, K.; SALIM, S. Exercise prevents sleep deprivation-associated anxiety-like behavior in rats: potential role of oxidative stress mechanisms. **Behavioural Brain Research**, v. 224, p. 233-240, 2011.

WU, L-J; KIM, S.S.; ZHUO, M. Molecular targets of anxiety: from membrane to nucleus. **Neurochemical Research**, v. 33, p. 1925-1932, 2008.

11. PRODUÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA

○ ARTIGOS SUBMETIDOS

FORTES, A.C.; ALMEIDA, A.A.C.; FREITAS, R.M.; MENDONÇA-JÚNIOR, F.J.B.; SOARES-SOBRINHO, J.L.; SOARES, M.F.R. Anxiolytic properties of new chemical entity, 5TIO1. Submetido à **Neurochemical Research**.

FORTES, A.C.; ALMEIDA, A.A.C.; SANTOS, P.S.; DE LUCCA JUNIOR, W.; FREITAS, R.M.; MENDONÇA-JÚNIOR, F.J.B.; SOARES-SOBRINHO, J.L.; SOARES, M.F.R. Is oxidative stress in mice brain regions diminished by 2-[(2,6-dichlorobenzylidene)amino]-5,6-dihydro-4*H*-cyclopenta[*b*]thiophene-3-carbonitrile? Submetido à **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**.

SILVA, M.L.G.; FORTES, A.C.; FREITAS, R.M.; SILVA-FILHO, E.C.; SOARES, M.F.R.; SOARES-SOBRINHO, J.L.; LEITE, C.M.S. Thermal characterization and dermopharmaceutical application of palygorskite organophilized clay. Submetido ao **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**.

○ DEPÓSITOS DE PEDIDO DE PATENTE

COSTA, J. P.; SANTOS, C.C.M.P. ; SOARES, M. F. L. R. ; FORTES, A. C.; COSTA, D. A. ; ALMEIDA, R. N. ; SOUSA, D. P. ; FREITAS, R. M. . Aplicações do fitol em formulações farmacêuticas com propriedades ansiolítica e antidepressiva - Patente requerida junto ao INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial com número de protocolo: 000170. 2011.

FORTES, A.C.; ANDRADE, L.N.; MORAES, J.; NAKANO, E.; SOUSA, D.P.; FREITAS, R.M. Aplicações do acetato de carvacrol em formulações farmacêuticas para o tratamento da esquistossomose. Patente requerida junto ao INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial com número do processo BR 10 2012 007004 9. 2012.

FORTES, A.C.; MARQUES, T.H.C.; MELO, C.H.S.; LIMA, L.S.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P.L.; FREITAS, R.M. Extrato de *Bellis perennis* L., substâncias isoladas do mesmo e suas aplicações em agentes inseticidas pela inibição da enzima acetilcolinesterase - Patente requerida junto ao INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial com número de protocolo: 000139. 2012.

○ **APRESENTAÇÕES DE TRABALHOS CIENTÍFICOS**

FORTES, A.C.; MENDONÇA-JÚNIOR, F.J.B.; SOARES-SOBRINHO, J.L.; SOARES, M.F.R. **Caracterização térmica do complexo de inclusão 5TIO1-sulfobutil éter β -ciclodextrina**. Apresentação de pôster no VIII Congresso Brasileiro e III Congresso Pan-Americano de Análise Térmica e Calorimetria, realizado em Campos do Jordão, SP, no período de 1 a 4 de abril de 2012.

FORTES, A.C.; SILVA, M.L.G.; FREITAS, R.M.; SOARES, M.F.R.; SOARES-SOBRINHO, J.L.; LEITE, C.M.S. Caracterização térmica e aplicação dermofarmacêutica da argila paligorsquita organofilizada. Apresentação de pôster no VIII Congresso Brasileiro e III Congresso Pan-Americano de Análise Térmica e Calorimetria, realizado em Campos do Jordão, SP, no período de 1 a 4 de abril de 2012.