



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

DESENVOLVIMENTO DE SISTEMA DE VETORIZAÇÃO A BASE DE NOVO
DERIVADO TIOFÊNICO

ELIAMARA BARROSO SABINO

TERESINA
2011

ELIAMARA BARROSO SABINO

DESENVOLVIMENTO DE SISTEMA DE VETORIZAÇÃO A BASE DE NOVO
DERIVADO TIOFÊNICO

Dissertação, como requisito complementar, para obter o grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Piauí.

Orientador: Prof. Dr. José Lamartine Soares Sobrinho

Coorientador: Prof. Dr. Rivelilson Mendes de Freitas

TERESINA

2011

ELIAMARA BARROSO SABINO

DESENVOLVIMENTO DE SISTEMA DE VETORIZAÇÃO A BASE DE NOVO
DERIVADO TIOFÊNICO

BANCA EXAMINADORA:

Presidente e Primeiro Examinador Interno

Prof. Dr. José Lamartine Soares Sobrinho

(Diretor do NTF)

Primeiro Examinador Externo

Prof. Dr. Pedro José Rolim Neto

(Dptº Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE)

Segundo Examinador Externo

Profa. Dra. Adriana da Rocha Tomé

(Universidade Estadual do Ceará – UECE)

TERESINA

2011

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, neste momento tão importante em minha vida, pois sei que, se cheguei até aqui, foi porque tuas mãos me sustentaram, por cada vitória dessa caminhada e por hoje me proporcionar a concretização deste sonho.

Ao Prof. Dr. **José Lamartine Soares Sobrinho**, Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas e Orientador, agradeço por seu grande incentivo à pesquisa e apoio na realização desta, sempre apresentando ensinamentos que contribuíram para o meu crescimento científico.

Ao Prof. Dr. **Rivelilson Mendes Freitas**, professor co-orientador, agradeço por seus conselhos, sua amizade, sua disponibilidade, e grande auxílio em todas as etapas de produção desta pesquisa.

À professora Dra. **Mônica Felts de La Roca Soares**, por todo apoio e ajuda, nesse período de escrita científica e patentes.

Aos demais colaboradores, por dedicarem tempo e cederem seus laboratórios para realização desta pesquisa, em especial Prof. Dra. **Ana Amélia de C. M. Cavalcante** e Prof. Dr. **Fernando Aécio**.

Agradeço às parcerias, com Universidade Estadual da Paraíba, na pessoa do **Dr. Francisco Jaime Bezerra Mendonça Junior**, por doar a molécula objeto deste estudo, e por sempre auxiliar nas dificuldades encontradas. Ao **Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos (LTM)**, na pessoa do Dr. Pedro Rolim e Msc. Lariza Alves, por colaborar com os ensaios. À **Dra. Adriana da Rocha Tomé** por colaborar com ensaios na Universidade Estadual do Ceará.

Agradeço aos **professores do PPGCF** e aos demais colegas por todo incentivo e ensinamentos. Ao corpo de funcionários do Núcleo de Tecnologia Farmacêutica (NTF), por simplesmente abrirem as portas desta instituição, facilitando o nosso acesso a todas as informações necessárias.

A **Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP)** e **Capes** pelo financiamento deste projeto.

Ao meus amados pais, **Raimundo Sabino Neto e Antônia Barroso de Carvalho Sabino**, por serem incansáveis em minha educação e felicidade. A vocês todo o meu amor e gratidão. Às minhas irmãs, **Carla Kelly e Soraia Barroso Sabino**, pela cumplicidade e amor incondicional.

Agradeço especialmente a todas as vidas que foram sacrificadas para tornarem possível a realização deste estudo. A todos os animais utilizados, o meu respeitoso e sincero “Muito Obrigada”!

REITOR

Prof. Dr. Luiz de Sousa Santos Júnior

VICE-REITOR

Prof. Dr. Edwar de Alencar Castelo Branco

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Saulo Cunha de Serpa Brandão

**COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

Prof. Dr. José Lamartine Soares Sobrinho

**VICE-COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Prof. Dr. Lívio César Cunha Nunes

“Talvez não tenhamos conseguido fazer o melhor, mas lutamos para que o melhor fosse feito... Não somos o que deveríamos ser, não somos o que iremos ser. Mas, graças a Deus, não somos o que éramos.”

Martin Luther King

"Não, a ciência não é uma ilusão. Ilusão seria imaginar que aquilo que a ciência não nos pode ensinar, podemos conseguir em outro lugar"

Sigmund Freud (1856-1939).

Dedico esta dissertação aos meus pais e irmãs, por me incentivarem sempre na busca por conhecimentos. Ao Eduardo por todo carinho, incentivo e paciência. E à todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste estudo.

SUMÁRIO

RESUMO	xiv
ABSTRACT	xv
ABREVIATURAS	xvi
1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVOS	19
2.1 Objetivo Geral	19
2.2 Objetivos Específicos	19
3 JUSTIFICATIVA	20
Capítulo 1	22
4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
Desafios na Pesquisa & Desenvolvimento de novos Medicamentos	23
Capítulo 2	44
5 AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL DE 5TIO1 E SEU COMPLEXO DE INCLUSÃO	44
Efeito sedativo e ansiolítico de uma nova molécula tiofênica em camundongos	45
Efeito sedativo e ansiolítico de complexo de inclusão (5TIO1-SB β CD) em camundongos	64
Capítulo 3	87
6 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA	87
Avaliação da toxicidade aguda e Histopatológica de novo composto tiofênico	88
7 CONCLUSÃO	113
8 PERSPECTIVAS	114
REFERÊNCIAS	115
APÊNDICE A	118
APÊNDICE B	120
APÊNDICE C	121
APÊNDICE D	122
ANEXO A	123
ANEXO B	124
ANEXO C	125

LISTA DE FIGURAS

Artigo I

Figura 1 - Vários estágios de pesquisas de novas fármacos.....	25
Figura 2 – Mudança morfológica de partículas de BNZ quando complexadas com ciclodextrinas.....	30
Figura 3 – Sistema LADMER, obstáculos biofarmacêuticos no desenvolvimento de fármacos.....	34
Figura 4 – Complexo de inclusão BNZ-RMbCD otimizado por MM2 com grupo metil introduzido pela cavidade larga da ciclodextrina.....	36

Artigo II

Figura 1 - Estrutura química de 2-[(2,6-diclorobenzilideno)amino]-5,6-diidro-4H-ciclopenta[b]tiofeno-3- carbonitrila (5TIO1).....	47
Figura 2 – Espectro de Infravermelho com transformador de Fourier (IV-TF) de 5TIO1.....	52
Figura 3 – Curva de DSC do 5TIO1 obtida a 10 °C.min ⁻¹ sob atmosfera de nitrogênio com fluxo de 50 mL.min ⁻¹	53
Figura 4 - Efeitos produzidos por diferentes doses de 5TIO1 (0,1, 0,5 e 1,0 mg/kg, i.p.) sobre o tempo gasto pelos camundongos no compartimento iluminado no teste claro-escuro. Os dados são apresentados com média ± SEM. n=8 camundongos por grupo. *p<0.05 (ANOVA e <i>t</i> -Student-Newman-Keuls como teste <i>post hoc</i>).....	55
Figura 5 - Efeito produzido por diferentes doses de 5TIO1 (0,1, 0,5 e 1,0 mg/kg, i.p.) no tempo de sono total induzido por pentobarbital (40 mg/kg) em camundongo. Os dados são apresentados com média ± SEM. n=8 camundongos por grupo. *p<0.05 (ANOVA e <i>t</i> -Student-Newman-Keuls como teste <i>post hoc</i>). ..	56

Artigo III

Figura 1 - Estrutura espacial do 5TIO1.....	66
---	----

Figura 2 – Curvas do diagrama de solubilidade do 5TIO1 sob a influência de concentrações crescentes de β CD e SB β CD em solução.....	72
Figura 3 – Espectros de IV-TF: (A) 5TIO1; (B) SB β CD; (C) MF S β CD: 5TIO1; (D) EV S β CD: 5TIO1.....	74
Figura 4 - Curvas de DTA obtidas na razão de 10°C/min e fluxo de N ₂ 50 mL/min: (A) 5TIO1; (B) SB β CD; (C) MF S β CD: 5TIO1; (D) CI EV S β CD: 5TIO1.....	74
Figura 5 - Curvas de TG obtidas na razão de 10°C/min e fluxo de N ₂ 50 mL/min: (A) 5TIO1; (B) SB β CD; (C) MF S β CD: 5TIO1; (D) CI EV S β CD: 5TIO1.....	75
Figura 6 - Efeitos produzidos por diferentes doses do complexo de inclusão (0,1, 0,5 e 1,0 mg/kg, i.p.) sobre o tempo gasto pelos camundongos no compartimento iluminado no teste claro-escuro. Os dados são apresentados com média \pm SEM. n=8 camundongos por grupo. *p<0.05 (ANOVA e <i>t</i> -Student-Newman-Keuls como teste <i>post hoc</i>). CD= ciclodextrina; CI= complexo de inclusão (5TIO1-SB β CD); DZP= diazepam.....	77
Figura 7 - Efeito produzido por diferentes doses do complexo de inclusão (0,1, 0,5 e 1,0 mg/kg, i.p.) no tempo de sono total induzido por pentobarbital (40 mg/kg) em camundongo. Os dados são apresentados com média \pm SEM. n=8 camundongos por grupo. *p<0.05 (ANOVA e <i>t</i> -Student-Newman-Keuls como teste <i>post hoc</i>).CD= ciclodextrina; CI= complexo de inclusão (5TIO1-SB β CD); DZP= diazepam.....	80

Artigo IV

Figura 1 - Curvas do diagrama de solubilidade do 5TIO1 sob a influência de concentrações crescentes de β CD e SB β CD em solução.....	94
Figura 2 – Hipocampo de camundongos adultos tratados com doses de 5TIO1.....	103
Figura 3 - Hipocampo de camundongos adultos tratados com doses do complexo de inclusão (5TIO1-SB β CD).....	105

LISTA DE TABELAS

Artigo II

Tabela 1 – Efeito de 5TIO1 no teste de Campo Aberto em camundongo.....	53
Tabela 2 - Efeitos de 5TIO1 no teste Labirinto em cruz elevado em camundongos.....	55

Artigo III

Tabela 1 - Inclinação, coeficiente de correlação (R^2) e constante de associação ($K_{1:1}$) obtidas a partir do diagrama de solubilidade.....	73
Tabela 2 - Resultados obtidos através da caracterização por DTA e TG.....	76
Tabela 3 - Efeito do complexo de inclusão no teste de campo aberto em camundongo	78
Tabela 4 - Efeitos do complexo de inclusão no teste labirinto em cruz elevado em camundongos.....	79

Artigo IV

Tabela 1 - Inclinação, coeficiente de correlação (R^2) e constante de associação ($K_{1:1}$) obtidas a partir do diagrama de solubilidade.....	94
Tabela 2 - Toxicidade aguda do 5TIO1 de acordo com a via de administração e o número de mortes a partir da administração intraperitoneal em doses crescentes da respectiva amostra.....	95
Tabela 3 - Toxicidade aguda do complexo de inclusão 5TIO1-SB β CD de acordo com o número de mortes a partir da administração intraperitoneal em doses crescentes da respectiva amostra.....	95
Tabela 4 - Parâmetros relativos ao “Screening Hipocrático”, após administração intraperitoneal de 5TIO1 em dose única.....	97
Tabela 5 - Parâmetros relativos ao “Screening Hipocrático”, após administração intraperitoneal de complexo de inclusão de 5TIO1-SB β CD em dose única.....	98

Tabela 6 - Parâmetros bioquímicos obtidos do soro de camundongos <i>Swiss</i> , tratados com 5TIO1.....	99
Tabela 7 - Parâmetros bioquímicos obtidos do soro de camundongos <i>Swiss</i> , tratados com complexo de inclusão (5TIO1-SB β CD).....	100
Tabela 8 - Parâmetros hematológicos de camundongos <i>Swiss</i> , tratados com 5TIO1.....	101
Tabela 9 - Parâmetros hematológicos de camundongos <i>Swiss</i> , tratados com complexo de inclusão (5TIO1-SB β CD).....	102
Tabela 10 - Análise histopatológica em hipocampo de camundongo tratados oralmente com 5TIO1.....	104
Tabela 11 - Análise histopatológica em hipocampo de camundongo tratados por via intraperitoneal com 5TIO-SB β CD (CI).....	104

Desenvolvimento de sistema de vetorização a base de novo derivado tiofênico. ELIAMARA BARROSO SABINO. Orientadora: José Lamartine Soares Sobrinho. Co-orientador: Rivelilson Mendes de Freitas. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, UFPI, 2011.

RESUMO

A pesquisa científica e o desenvolvimento tecnológico de um novo medicamento compreendem diversas fases entrelaçadas entre si, que por sua vez culminam na obtenção de um produto farmacêutico devidamente seguro e eficaz. Estas fases compreendem um longo caminho, desde a síntese e/ou isolamento de moléculas químicas, caracterização físico-química, realização de ensaios pré-clínicos em modelos *in vitro* e *in vivo*, desenvolvimento tecnológico da forma farmacêutica e definição das especificações de qualidade, até os ensaios clínicos em seres humanos, um passo anterior ao lançamento do produto e a sua comercialização. Entretanto, durante as etapas, pontos críticos são observados e se não solucionados comprometem a obtenção do produto farmacêutico. A solubilidade, definida dentro da caracterização físico-química da molécula, geralmente é um entrave para este desenvolvimento, pois a biodisponibilidade é dependente da solubilidade, e conseqüentemente, a ação farmacológica é dependente destes. O 2-[(2,6-diclorobenzilideno) amino]-5,6-diidro-4H-ciclopenta [b] tiofeno-3-carbonitrila (5TIO1) é uma molécula sintética derivada do 2-amino tiofeno. Apresenta ação farmacológica no sistema nervoso central, contudo baixa solubilidade, e por conseqüência precisa ser vetorizada para garantir esta ação farmacológica de interesse. A molécula foi caracterizada através de Infravermelho com transformada de Fourier e Calorimetria exploratória diferencial. O complexo de inclusão (CI) 5TIO1-SB β CD, promoveu comprovado aumento de solubilidade aquosa da molécula, com o incremento de 9,66 $\mu\text{g/mL}$ para 30 $\mu\text{g/mL}$, possibilitando dessa forma a administração de uma menor quantidade do fármaco para a obtenção da ação farmacológica desejada. A toxicidade foi determinada por DL₅₀, *Screening Hipocrático*, análise do perfil bioquímico e hematológico de camundongos adultos, além de análise histopatológica do hipocampo. O CI apresentou redução da toxicidade inicial e não apresentou alterações nos perfis histológicos. Tanto a molécula quanto o seu CI apresentaram atividade ansiolítica e sedativa em ensaios neurofarmacológicos. Outros ensaios ainda devem ser realizados objetivando compreender o mecanismo de ação de 5TIO1 e seu CI sobre os receptores, contudo já se pode afirmar que a vetorização do fármaco aumentou a sua solubilidade, reduzindo a quantidade de fármaco administrado, com redução da toxicidade, sem alterar o efeito neurofarmacológico.

Development of system vectorization based new thiophene derivative. ELIAMARA BARROSO SABINO. Advisor: José Lamartine Soares Sobrinho. Co-advisor: Rivelilson Mendes de Freitas. Master thesis. Graduate Program in Pharmaceutical Sciences, UFPI, 2011.

ABSTRACT

The scientific research and technological development of new medicines include several phases intertwined with each other, which in turn culminate in the obtaining of a pharmaceutical product appropriately safe and effective. These phases include a long way, from the synthesis and/or isolation of chemical molecules, physical-chemical characterization, testing preclinical in models *in vitro* and *in vivo*, technological development of the pharmaceutical form and definition of quality specifications, until clinical trials in humans, a step prior to the product launch and marketing. However, during the stages, critical points are observed and if not resolved, undertake the obtaining of the pharmaceutical product. The solubility, defined in the molecule physicochemical characterization, is usually an obstacle to this development, since the bioavailability is dependent on the solubility, and consequently, the pharmacological effect is dependent on these. The 2-[(2,6-diclorobenzilideno) amino]-5,6-diidro-4H-ciclopenta [b] tiofeno-3-carbonitrila (5TIO1) is a synthetic molecule derived from 2-amino thiophene. Presents pharmacological action in the central nervous system, however low solubility, and therefore needs to be vectored to ensure the pharmacological action of interest. The molecule was characterized by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and differential scanning calorimetry (DSC). The inclusion complex (IC) 5TIO1-SB β CD proven to promoted a significant increased aqueous solubility of the molecule, with the increase of 9.66 $\mu\text{g/mL}$ to 30 $\mu\text{g/mL}$, thus enabling the administration of a smaller drug amount to obtain the desired pharmacological action. Toxicity was determined by LD₅₀, *Hippocratic Screening*, analysis of biochemical and haematological adult mice status, and histopathological analysis of the hippocampus. The CI decreased the initial toxicity and showed no histological changes in the profiles. Both the molecule and the CI had presented its anxiolytic and sedative activity in neuropharmacological tests. Further tests must still be carried out to understand the mechanism of action of CI on 5TIO1 and its receptors, but already can say that drug vectorization increased its solubility, reducing the amount of drug administered, reducing the drug toxicity, without changing the neuropharmacological effect.

LISTA DE TERMOS E SIGLAS

ALE	Atividade locomotora espontânea
ALP	Fosfatase alcalina
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
ATR	Reflectância total atenuada
CD	Ciclodextrina
CI	Complexo de inclusão
CHCM	Concentração de hemoglobina corpuscular média
CT	Colesterol total
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
DL ₅₀	Concentração de uma substância química capaz de matar 50% da população de animais testados
DZP	Diazepam
HCM	Hemoglobina corpuscular média
HE	Hematoxilina-eosina
Kc	Constante de complexação
IV	Infravermelho
IV-TF	Infravermelho com transformador de Fourier
ND	Não determinado
NEOA	Número de entradas em braços abertos
PEOA	Porcentagem de entradas em braços abertos
PTOA	Porcentagem de tempo de permanência em braços abertos
RDW	Índice de anisocitose
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
So	Solubilidade intrínseca
TPOA	Tempo de permanência em braços abertos
Tween	Solvente orgânico
VCM	Volume corpuscular médio
UV-vis	Ultravioleta visível
5TIO1	2-[(2,6-dichlorobenzylidene)amino]-5,6-diidro-4H-ciclopenta[b]tiofeno-3-carbonitrila)
βCD	β-ciclodextrina
SBβCD	Sulfa-butil-β-ciclodextrina

1 INTRODUÇÃO

A descoberta e o desenvolvimento de novos medicamentos ainda é um processo que envolve várias etapas que requerem muitos estudos. Em geral, apenas 20% dos projetos de produção de medicamentos resultam em um potencial agente clínico e apenas 10% desses compostos em desenvolvimento clínico obtêm o registro para comercialização (Pauwes, 2006). Em média cada molécula nova requer 12-15 anos para chegar ao paciente, e os custos de P e D podem chegar nos Estados Unidos a uma margem de aproximadamente 65,3 bilhões (PhRMA, 2009).

A introdução de novos fármacos na terapêutica é necessária para o aperfeiçoamento do tratamento mais seguro e eficaz. A busca por medicamentos menos tóxicos resultou na introdução de substâncias sintéticas. Cerca de 85% dos fármacos disponíveis na terapêutica moderna são de origem sintética e/ou obtidos de processo de semi-síntese (OLIVEIRA e SILVA, 2008).

Baseado nesses argumentos, foi sintetizado um novo composto derivado do 2-amino tiofeno, 2-[(2,6-diclorobenzilideno)amino]-5,6-diidro-4H- ciclopenta[b]tiofeno-3-carbonitrila (5TIO1), em estudos prévios demonstraram que 5TIO1 possui atividade anti fúngica contra *Candida krusei* e *Criptococcus neoformans* (OLIVEIRA e LIMA, 2010). A estratégia utilizada para sintetizar o 5TIO1 foi a modificação molecular, que consiste na utilização de uma substância protótipo, no caso o 2-amino-tiofeno, com comprovada ação farmacológica tais como: metafenileno (anti-histamínico), ácido tiaprofênico(antiinflamatório), ziprexa (tratamento da esquizofrenia) e o siltiofan (ação fungicida) (STEFANI, 2009). Entretanto a molécula apresenta baixa solubilidade, sendo necessária a utilização da nanotecnologia para sua vetorização com finalidade de melhorar a solubilidade.

Para uma boa biodisponibilidade, a molécula ideal deve ser rapidamente absorvida e distribuída no organismo, deve ser altamente seletiva em relação ao seu alvo, deve ter uma potência elevada e um alto grau de eficácia terapêutica, para que seja eficaz em doses baixas. A baixa solubilidade é um fator importante a ser considerado e muitas vezes pode ser um entrave para que uma nova molécula possa ser comercializada (CHUNG e FERREIRA, 1999).

Técnicas inovadoras estão sendo aplicadas na obtenção de novas formas farmacêuticas de liberação controlada capazes de manter ou ampliar a ação de agentes promissores. Nanodispositivos permitem o uso de fármacos potencialmente tóxicos e pouco solúveis, bem

como o aumento na duração e eficácia da resposta. Dentre estes destacam-se lipossomas, nanopartículas, microcápsulas e complexo de inclusão (fármaco-ciclodextrina) (PIMENTEL et al., 2007; TSAY et al., 2010).

Este ultimo são matrizes hidrofílicas que tem superfície externa hidrofílica e cavidade interna hidrofóbica, agem como moléculas de acolhimento ou recipientes na formação de complexo de inclusão (CI) com moléculas hóspedes em solução aquosa (JULLIAN et al., 2008; PESCIPELLI et al., 2010; SOARES SOBRINHO et al., 2011).

Os compostos sintéticos são usados atualmente no tratamento de várias doenças, inclusive em doenças neurodegenerativas. Dentre essas patologias podemos observar que os distúrbios do sono e a ansiedade que acometem um grande número de indivíduos da população mundial. Estudos demonstram que 9-18% dos brasileiros desenvolveram em algum momento de sua vida um transtorno ansioso (ANDREOLI et al., 2000).

Nos últimos 45 anos, o tratamento farmacológico de primeira linha dos transtornos de ansiedade consistia no uso dos benzodiazepínicos, exemplificados por drogas como o diazepam. No entanto, apesar da eficácia clínica, a maioria dos fármacos desta classe apresenta muitos problemas, como sedação, relaxamento muscular, amnésia anterógrada e dependência física (MITTE, 2005; RABBANI et al., 2007).

Este trabalho visou melhorar a solubilidade do composto 5TIO1 por meio de CI (fármaco-ciclodextrina) viabilizando sua solubilização, além de avaliar os efeitos nos parâmetros bioquímicos, hematológicos, histopatológico, e avaliar o efeito ansiolítico e sedativo da molécula e seu complexo de inclusão em camundongos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Caracterizar o composto tiofênico 5TIO1 e seu complexo de inclusão com sulfobutil- β -ciclodextrina, com finalidade de aumentar a solubilidade e biodistribuição, além de avaliar a toxicidade e seus efeitos sobre o sistema nervoso central.

2.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar o 5TIO1 e seu complexo de inclusão (5TIO1-CD);
- Investigar a ação farmacológica do produto 5TIO1 e do complexo 5TIO1-SB β CD de forma aguda nas alterações comportamentais em camundongos, em modelos neurofarmacológicos;
 - Avaliar a neurotoxicidade de 5TIO1 e 5TIO1-SB β CD, perfil bioquímico e hematológico;
 - Identificar efeito farmacológico sobre o sistema nervoso central de 5TIO1 e 5TIO1-SB β CD.

3. JUSTIFICATIVA

A busca por drogas menos tóxicas e que trate as doenças humanas, tem sido objeto de vários estudos. Entre as diversas estratégias utilizadas para a introdução de novos fármacos na terapêutica, as modificações moleculares mostram-se promissoras. Estas consistem na transformação química de moléculas conhecidas, com o objetivo de aumentar a potência e segurança, garantindo assim um melhor perfil farmacocinético e farmacodinâmico (WERMUTH, 2004).

Neste panorama, o 5TIO1, (2-[(2,6-diclorobenzilideno)amino]-5,6-diidro-4H-ciclopenta[b]tiofeno-3- carbonitrila), apresenta-se como um fármaco sintético derivado do 2-amino tiofeno, com comprovada ação farmacológica, possui atividade anti histamínica e anti inflamatória, utilizado no tratamento da esquizofrenia, e ação fungicida (STEFANI, 2009). O 5TIO1 vem demonstrando diversas atividades em estudos preliminares recentes, como atividade antifúngica (OLIVEIRA e LIMA, 2010), atividade antichagásica e atividades diversas sobre o sistema nervoso central, o que indica o potencial uso deste fármaco na saúde humana.

Esta última atividade mostra-se relevante e objeto de investigação, uma vez que, os compostos sintéticos são usados atualmente no tratamento de várias doenças, inclusive em doenças neurodegenerativas. Dentre essas patologias podemos observar que os distúrbios do sono e a ansiedade acometem um grande número de indivíduos da população mundial.

O medicamento olanzapina que é um tiobenzopiazepínico, de origem sintética, é o anti psicótico mais prescrito no Brasil e um dos mais prescritos no mundo (VAN DER ZWAAL et al., 2010). Como o 5TIO1, a olanzapina também deriva do núcleo tiofênico, demonstrando a importância do estudo desta molécula sobre o SNC.

A molécula 5TIO1, apresenta baixa solubilidade aquosa e o delineamento de formas de vetorização deste fármaco, é um passo promissor para solubilização e biodisponibilidade. Neste sentido, para otimizar a atividade farmacológica dos medicamentos, muitos sistemas de vetorização têm sido desenvolvidos. A tecnologia associada à modificação de condicionar a velocidade e liberação de fármacos tem sido objeto de investigação na área da indústria farmacêutica (LOPES et al., 2005; PEZZINI et al., 2007).

Dados publicados por Pretis et al. (1988), demonstraram que aproximadamente 40% dos fármacos em desenvolvimento eram retirados da pesquisa devido à problemas com a característica biofarmacêutica, ocasionados por deficiência de solubilidade. Neste panorama

justifica-se à vetorização com sulfo-butil- β -ciclodextrina, visando melhorar os problemas de biodisponibilidade deste fármaco sintético, promovendo um perfil terapêutico desejável.

Contudo, já se pode afirmar que esta molécula vem, de alguma forma, ampliar o arsenal terapêutico disponível contra as doenças que acometem a população humana, uma vez que em triagens farmacológicas, mostrou-se uma molécula promissora para tratamento de doenças, em que muitas vezes a terapêutica é tóxica, sendo objeto de interesse de diversos estudos.

Capítulo 1

4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Desafios na Pesquisa & Desenvolvimento de novos Medicamentos

Artigo submetido à Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada

Desafios na Pesquisa & Desenvolvimento de novos Medicamentos

SABINO, E.B.¹; SOARES SOBRINHO, J.L.¹

¹Post-Graduation Program in Pharmaceutics Science, Federal University of Piauí, Teresina, Piauí, Brazil.

Resumo

Milhões de compostos estão sendo sintetizados, devido a uma série de avanços tecnológicos como as interações sinérgicas e o desenho racional de medicamentos, a utilização da química combinatória e seleção de alto rendimento. No entanto, o desenvolvimento desses candidatos a “novos fármacos” tem sido muitas vezes dificultada, devido a restrições biofarmacêuticas e/ou farmacocinéticas. Isso resultou em atrasos no tempo de desenvolvimento e aumento na escalada de custos nos programas de investigação de fármacos. Embora uma variedade crescente de tecnologias empregadas na descoberta de novos fármacos tornar-se disponível, a pesquisa e desenvolvimento dos mesmos (P & D) em geral ainda é baixa. O estabelecimento de estreitas relações funcionais entre os especialistas ativos na descoberta precoce, o desenvolvimento e ensaios clínicos podem, assim, contribuir para a eficiência global e o sucesso dos candidatos a novos fármacos. Um dos desafios é a descoberta qualitativa, para melhorar a previsibilidade dos modelos de pesquisa em fase inicial no prazo de eficácia do fármaco em modelos *in vivo*. Os sistemas de liberação de fármacos são parte integrante da investigação farmacêutica. Nas duas décadas passadas, as matrizes hidrofílicas tornaram-se muito populares na formulação de formas farmacêuticas de liberação modificada.

Palavras-chave: Pesquisa e desenvolvimento; Vetorização; Formulação de fármacos; Ensaio clínico.

Abstract

Millions of compounds are being synthesized due to a series of technological advances such as the synergistic interactions and rational drug design, the use of combinatorial chemistry and high-throughput screening. However, the development of these candidates for "new drugs" has often been hampered due to restrictions biopharmaceutical and/or pharmacokinetics. This resulted in delays in development time and increase in cost escalation in drug research programs. Although an increasing variety of technologies used in the

discovery of new fármacos become available, research and development of drug (R & D) in general is still low. The establishment of functional relations between the specialists active in the early discovery, development and clinical trials may contribute to the overall efficiency and success of new drug candidates. One challenge is the discovery qualitative, to improve the predictability of research models in the early stages within the period of drug efficacy *in vivo* models. The drug delivery systems are an integral part of pharmaceutical research. In the past two decades, the hydrophilic matrices have become very popular in the formulation of modified release dosage forms.

Keyword: Vectorization; formulation of drugs; clinical trial

1. Introdução

Desde os primórdios da civilização, a procura pelo tratamento das principais doenças que acometem a humanidade tem sido uma preocupação constante da população. Basicamente, os recursos terapêuticos utilizados pelos nossos ancestrais concentravam-se nos recursos da natureza, notadamente nas plantas, animais e minerais. A partir do ácido salicílico, Felix Hoffman sintetizou a aspirina (ácido acetil salicílico) em 1897. Nasce então, e se consolida, a famosa e poderosa indústria farmacêutica da Alemanha e também a primeira patente que se tem conhecimento na área de medicamento (CALIXTO & SIQUEIRA JR, 2008).

Um outro grande marco para o surgimento da indústria farmacêutica moderna foi o entendimento de que o sucesso nesta área dependia de um trabalho conjunto entre vários profissionais, incluindo biólogos, médicos, químicos, etc. No intervalo entre a primeira e a segunda guerra mundial esse conceito foi estabelecido, surgindo a necessidade de realizar estudos pré-clínicos em animais para analisar o mecanismo de ação de um novo composto e principalmente o seu possível efeito tóxico, determinando assim sua segurança (STURM et al., 2010).

O processo de descoberta e desenvolvimento de medicamentos ainda é um processo longo, onde as chances de sucesso, são baixas. Para os medicamentos em geral, apenas 20% dos projetos de descoberta de medicamentos levam a um candidato clínico e apenas 10% dos compostos que entram em desenvolvimento clínico obtém o registro (PAUWES, 2006).

A pesquisa de novos fármacos podem ser divididas funcionalmente em duas fases: concepção e desenvolvimento. A descoberta de medicamentos consiste na identificação e caracterização de novos alvos, enzimas ou receptores, síntese de moléculas, seleção de

moléculas novas para implementar testes *in vitro* e *in vivo*, atividade biológica, e caracterização físico-química das ligações (Figura 1) (PATERSON et al., 2011).

O desenvolvimento de fármacos centra-se na avaliação da segurança, toxicidade e eficácia de moléculas de novos fármacos. O objetivo fundamental é a geração de um banco de dados científicos que suporte o perfil, eficácia e segurança, do regime de dosagem destinados à comercialização. Em média cada molécula nova requer 12-15 anos para chegar ao paciente, e os custos de P e D podem chegar no Estados Unidos a uma margem de aproximadamente 65,3 bilhões (PhRMA, 2009).

O trabalho teve por objetivo analisar os desafios da pesquisa e desenvolvimento de novos medicamentos a partir de fármacos de origem sintética. A metodologia empregada foi levantamento sistemático nas bases de dados Pubmed, Scielo, ScienceDirect, LILACs na qual utilizou-se como palavras chave: pesquisa e desenvolvimento, fármacos, medicamentos, forma farmacêutica, ensaios pré-clínicos, ensaios clínicos, vetorização de fármacos.

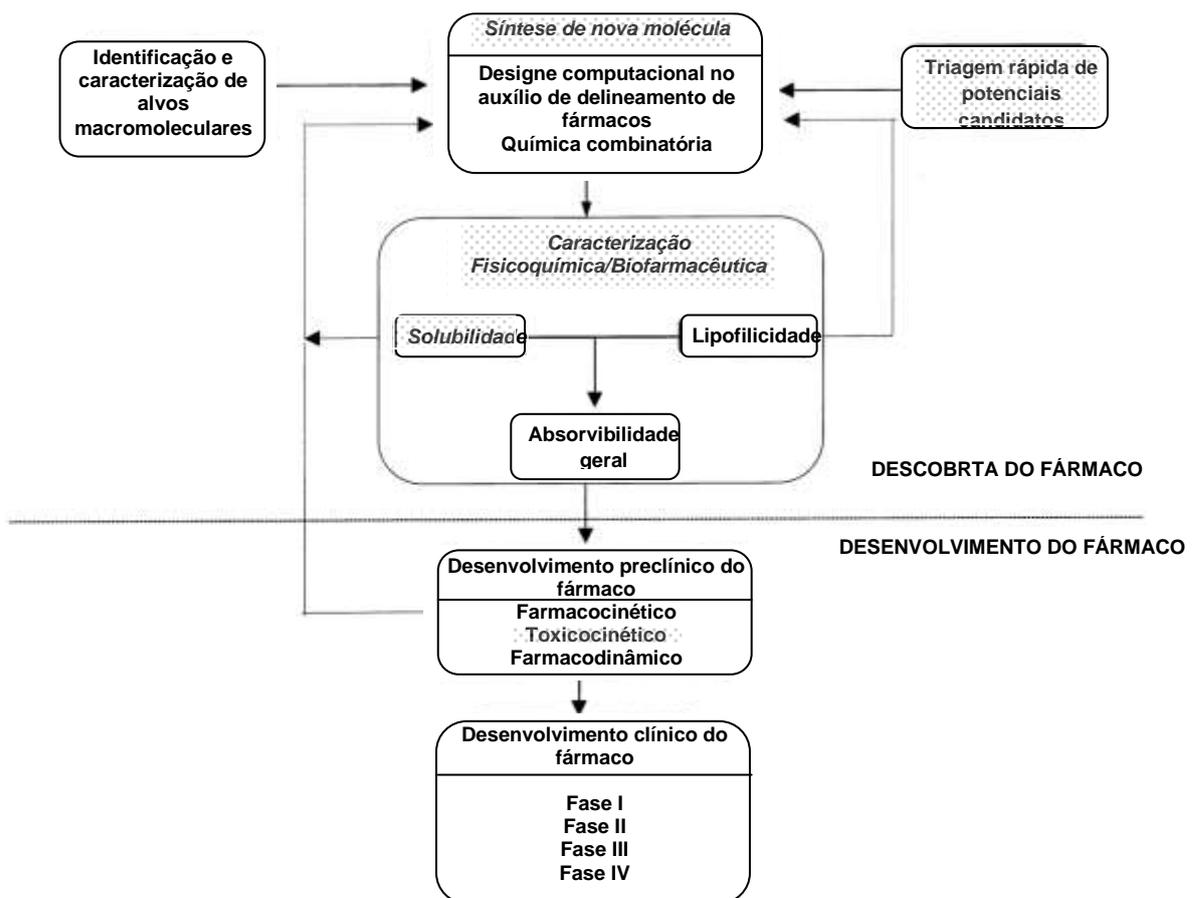


FIGURA 1. Vários estágios de pesquisas de novas fármacos (PANCHAGNULA e THOMAS, 2000).

2. Obtenção do princípio ativo (P.A)

O desenvolvimento de um fármaco pode surgir através de experimentos com produtos naturais ou sintéticos, que tenham similaridade com compostos com reconhecida atividade para outras doenças ou através de alvos metabólicos específicos para uma determinada célula ou órgão (FIOCRUZ, 2009).

A introdução de novos fármacos na terapêutica é necessária para o aperfeiçoamento do tratamento mais seguro e eficaz. A busca por medicamentos menos tóxicos resultou na introdução de substâncias sintéticas e seu uso foi amplamente disseminado no século XX. Cerca de 85% dos fármacos disponíveis na terapêutica moderna são de origem sintética, isto sem considerar aqueles oriundos de processos de semi-síntese (OLIVEIRA et al., 2008).

Dentre os fatores que têm contribuído para um aumento nas pesquisas, está a eficácia de substâncias de origem vegetal participarem no processo de obtenção de novos princípios ativos por serem matéria-prima para a síntese de fármacos. Um exemplo de derivado de produtos naturais é a cloroquina e mefloquina, que possuem em sua estrutura um sistema aza-heterocíclico imitando o produto natural, um alcalóide conhecido como quinina, através de sua síntese deu origem a um anti-malárico eficaz. Outro exemplo são as penicilinas, produzida pelo fungo *Penicillium notatum*, que constituiu um marco da antibioticoterapia. Em 1976, Beecham descobriu um intermediário biossintético, útil para a produção de penicilina e análogos, o que determinou que sua obtenção passou a obedecer uma rota semi-sintética (VIEGAS JR et al., 2006; STURM et al., 2010).

3. Caracterização físico-química do ativo (screening)

A triagem ou screening de moléculas é um passo fundamental para o delineamento de novos candidatos em potencial. A caracterização físico/química dessas substâncias é de extrema relevância, pois terá forte impacto nos próximos passos do desenvolvimento do produto farmacêutico, e a aplicação de ferramentas analíticas se faz necessário. Esses ensaios podem ser realizados tanto no estado sólido como no líquido, trazendo subsídios para possíveis formas de vetorização dessas moléculas e respectivas vias de administração. Destacando-se a espectroscopia de ultravioleta visível, espectroscopia de ressonância magnética, determinação por Cromatografia líquida de alta precisão (CLAE) e modelagem computacional. Para o estado sólido destacam-se os métodos térmicos (DSC/TG/DTA), técnicas de cristalografia de raio X, espectroscopia de infravermelho com transformador de

Fourier e microscopia eletrônica de varredura (LYRA et al., 2010; SOARES SOBRINHO et al., 2010b).

3.1. Espectroscopia de ultravioleta visível

A espectrofotometria de absorção molecular no ultravioleta/visível (UV/VIS) é um método analítico baseado na propriedade das espécies iônicas ou moleculares de absorver determinados comprimentos de onda de radiação UV/VIS (LIMA et al., 2008; LYRA et al., 2010).

Brescansi & Pessine (2006), em seus ensaios, caracterizaram lipossomas contendo nistatina através de espectroscopia de absorção na região UV/VIS, observando espectros nas regiões de 250nm e 380nm. É utilizado também para quantificar substância, como o medicamento efavirez e sistemas multicomponentes (fármaco-ciclodextrina-polímero) á base de benznidazol (ALVES et al., 2010; SOARES SOBRINHO et al., 2011).

3.2. Espectroscopia de Ressonância Magnética

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) é uma das técnicas mais utilizadas na investigação da estabilidade, estequiometria, polimorfismo, energia do processo de ligação e complexos de inclusão com ciclodextrina. Estas informações podem ser obtidas principalmente usando a espectroscopia monodimensional (RMN H^1 e C^{13}), baseadas nas alterações de deslocamento químico (BOUQUET et al., 2007).

Tal técnica é empregada para analisar a energia de complexação de complexos de inclusão com ciclodextrinas (CD) e geometria desses complexos em solução e no estado sólido, permitindo obter de forma direta as interações que ocorrem entre as moléculas hóspedes e a ciclodextrina. Estas informações podem ser obtidas principalmente usando a espectroscopia monodimensional (H^1 RMN), baseadas nas alterações de deslocamento químico, quando ocorre a formação do complexo de inclusão da CD e o fármaco (FIGUEIRAS et al., 2007; VEIGA et al., 2006). Também é empregada para análise de estabilidade de moléculas, como observado em polímeros híbridos de poli-éter-éter-cetona (PEEK) e poli-fenil-sulfa (PPSU) (VONA et al., 2008). Em estudos de Rondeau-Mouro et al. (2008), caracterizaram por RMN os biopolímeros de origem vegetal, determinando a estrutura, seu polimorfismo e sua cristalinidade.

3.3. Modelagem Molecular

As estruturas moleculares dos fármacos podem ser construídas através de programas computacionais ou utilizando base de dados estruturais como o *Cambridge Crystallographic Data Centre* (CUNHA et al., 2010).

A estrutura molecular com a mínima energia conformacional pode ser encontrada através de métodos funcionais da teoria da densidade (DFT) e método semi-empírico, e os cálculos do estado de excitação eletrônica podem ser executados através de programas específicos. A predição computacional de espectros vibracionais, também pode ser usada para compreender melhor a estrutura intra e intermolecular, incluindo a conformação molecular, e a ligação intermolecular nos sólidos e soluções (ALTONEN, 2008; CUNHA et al., 2010).

Tal técnica foi aplicada no estudo da ligação fenantrolina-Mn-imidazol, na qual foi observado a ligação química natural e as interações eletrônicas, através de análise de cristalografia de raio X e estudos teórico. As variações observadas nas energias geometria e vínculo com um estado de oxidação crescente do íon metálico central são interpretados em termos de mudanças nos estados vibracionais das interações de ligação do metal-ligante (AGUIAR et al., 2011).

3.4. Métodos térmicos

Os métodos térmicos são amplamente utilizados na caracterização de moléculas, principalmente pela rapidez das análises. Dentre os mais utilizados, tem-se a calorimetria diferencial de varredura (DSC), que permite a detecção quantitativa de todos os processos que envolvem variação de entalpia, além de TG e DTA (FIGUEIRAS et al., 2007; SOARES SOBRINHO et al., 2011).

Em estudos realizados por Santos et al. (2005a), caracterizaram um pó de hidroxiapatita sintetizado pelo método sol-gel. Em estudos Soares et al. (2011) fizeram a caracterização por métodos térmicos do antimicrobiano ornidazol bem como sua compatibilidade em matriz sólida.

3.5. Cristalografia de raio X

Dentre as várias técnicas de caracterização de materiais, a técnica de difração de raios X é a mais indicada na determinação das fases cristalinas. Dentre as vantagens da técnica destacam-se a simplicidade e rapidez do método, a confiabilidade dos resultados obtidos (pois o perfil de difração obtido é característico para cada fase cristalina), a possibilidade de análise

de materiais compostos por uma mistura de fases e uma análise quantitativa destas fases (SOARES SOBRINHO et al., 2010a).

Tal técnica foi empregada para caracterização do estado físico de indometacina associada a nanocápsulas e a nanoesferas de PCL. Em outro estudo através de cristalografia de raios X, demonstrou que o fármaco diidropiridínico, com ação anti-hipertensiva, dispersa-se molecularmente na matriz de nanoesferas, preparadas com PCL, PLA ou PLGA (SCHAFFAZICK e GUTERRES, 2003). Tal técnica foi utilizada por Soares Sobrinho et al. (2010c), em ensaios de estudo de obtenção e caracterização de dispersões sólidas á base de benznidazol, medicamento anti-chagásico.

3.6. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura é utilizada em várias áreas do conhecimento, permite o conhecimento detalhado da microestrutura dos materiais permitindo a previsão das propriedades e do comportamento dos mesmos. O uso desta técnica fornece informações com detalhes, com aumento de até 300.000 vezes, do estado de cristalização de produtos obtidos por diferentes técnicas (RIBEIRO et al., 2008; SOARES SOBRINHO et al., 2010b).

Santos et al. (2005a) observaram através de análise por MEV a presença de poros que são importantes para aplicações biomédicas, favorecendo a adesão entre o tecido ósseo neoformado e a apatita sintética, promovendo a osseointegração .

Através de microscopia eletrônica de varredura (MEV), pode-se observar e caracterizar o perfil de cristalização de partículas de benznidazol, quando complexadas com várias ciclodextrinas, através de mudanças morfológicas nas partículas, observando um impacto importante no perfil de dissolução (Figura 2) (SOARES SOBRINHO et al., 2010b).

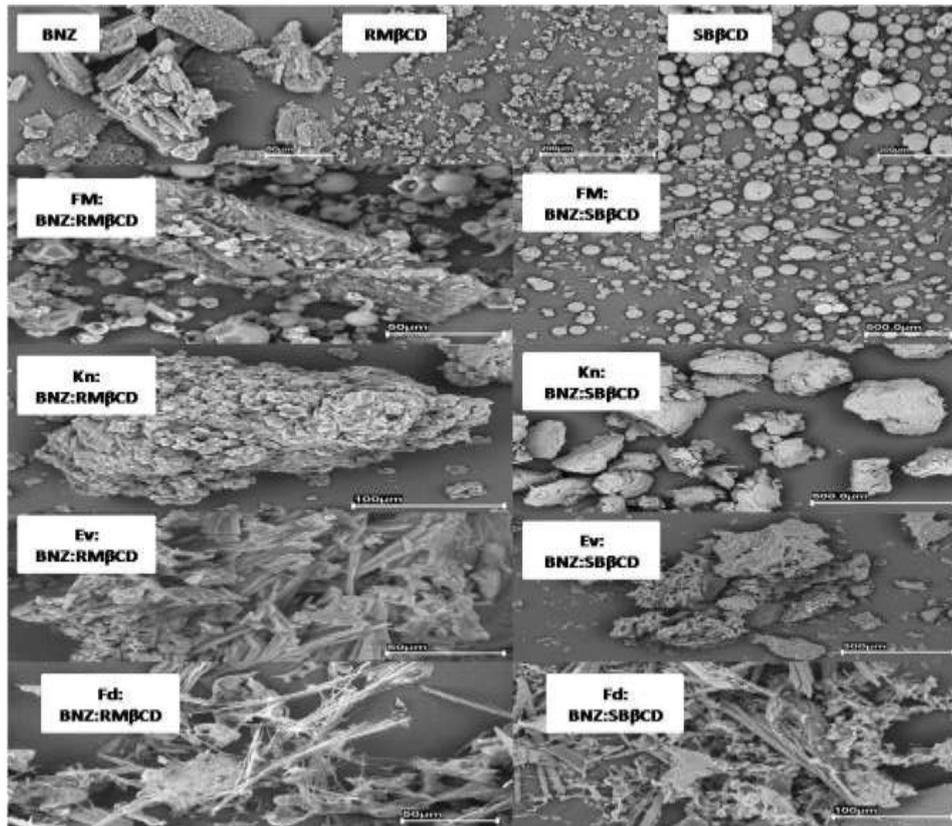


FIGURA 2. Mudança morfológica de partículas de BNZ quando complexadas com ciclodextrinas (SOARES SOBRINHO et al., 2010b).

4. Estudos pré-clínico

Ao tempo que a caracterização do novo candidato a fármaco é de fundamental importância, os estudos pré-clínicos também assumem igual relevância. O programa de desenvolvimento de um novo fármaco depende fortemente de estudos farmacocinéticos em animais como uma ferramenta para prever o comportamento no homem. Os estudos farmacocinéticos em animais são, no entanto, ainda de importância crucial, pois eles constituem os estudos para validar a exposição de animais em experimentos toxicológicos, e destes resultados projeta-se as reações em seres humanos (SILVA et al., 2009).

Ficou estabelecido que antes de ser administrada no ser humano, qualquer novo fármaco deveria apresentar as seguintes características: composição química, método de preparação e o grau de pureza bem estabelecidos, testes de toxicidade aguda e prolongada por doses repetidas em diferentes espécies animais, com determinação de DL_{50} , *screening hipocrático* e estudos comportamentais, e também realização análise histopatológica em diversos órgãos animais. Conhecimentos acerca da sua absorção, excreção e concentração nos

tecidos é importante para prever possíveis interações com outros fármacos e alimentos (SANTOS et al. 2010; PATERSON et al., 2011).

Os estudos pré-clínicos para avaliação de efeitos potenciais e riscos para o ser humano podem ser divididos em três grandes grupos. O primeiro grupo compreende os ensaios farmacológicos, que fornecem as primeiras informações sobre o potencial terapêutico do medicamento e o seu modo de ação, bem como sobre possíveis efeitos secundários, efeitos adversos sobre os sistemas vitais, como o sistema nervoso central, através de ensaios comportamentais e doseamento de substâncias, cardiovascular e respiratório, e interações com outros medicamentos em termos de ação farmacológica. O segundo grupo compreende os estudos de farmacocinética, fornecem informações sobre a absorção, distribuição, metabolismo, excreção, inibição ou indução enzimática, e interações em termos de farmacocinética com outros medicamentos. O último grupo compreende os estudos toxicológicos, incluem estudos para avaliação de toxicidade geral, aguda a crônica, mutagenicidade e carcinogenicidade (FREITAS et al., 2009; SILVA et al., 2011;).

5. Ensaio Clínicos

Os estudos clínicos conhecidos hoje como de fase 1, 2 e 3 e farmacovigilância são necessários para a avaliação da segurança e da eficácia de um novo medicamento. Paralelamente, foi criado nos Estados Unidos em 1906, o “*Food and drug act*”, que mais tarde foi transformado na Agência Americana para o Controle de Alimentos e Medicamentos (FDA), que nesta ocasião analisava os medicamentos somente quanto ao seu grau de pureza e o padrão de qualidade. Em 1951 o FDA passou a definir que algumas fármacos não atendiam a necessária segurança para uso humano, e estabeleceu que os medicamentos deveriam ser usados somente sob prescrição médica (BALANT & FABRY, 2000).

No Brasil, o principal órgão responsável pela regulamentação de medicamentos é a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), uma de suas ações realizadas é o registro de medicamentos, etapa na qual os mesmos são avaliados quanto a sua segurança, eficácia e qualidade antes de serem expostos a venda para utilização pela população. Dentre as regulamentações para registro de medicamentos destacam-se: normas sobre publicidade de medicamentos, RDC 102/2000; o regulamento para certificação de Boas Práticas de Fabricação e Controle (CBPFC), RDC 210/2003 (CARVALHO et al., 2008).

Estudos de fase 1 são conduzidos a caracterizar as propriedades básicas de um novo medicamento em seres humanos no intervalo de dose terapêutica esperado, ou seja, para determinar a sua impressão digital. Estudos iniciais são realizados com um pequeno grupo de

voluntários, tais ensaios devem examinar a segurança e tolerabilidade da fármacos após administração múltipla, e a interação de alimentos e outros fármacos. O objetivo destes estudos é oferecer a primeira oportunidade para o estudo de marcadores de ação de fármacos em seres humanos (ABBAS et al., 2007; ZHANG et al., 2011).

Os primeiros estudos em doentes, chamados de fase 2, são executadas de forma a confirmar o efeito terapêutico esperado, visando a eficácia e segurança de novos fármacos. Devem ser realizados a fim de “preparar o terreno” para a ensaios em grande escala, como ocorre na fase 3. Tais enaios visam avaliar a eficácia do novo medicamento em tratar uma determinada doença, além de avaliar melhor a toxicidade do medicamento. São estudos mais longos com mais de um ano de duração e um número maior de voluntários (RAMIREZ et al., 2008; ZHANG et al., 2011).

Na fase 3 o novo tratamento é comparado com o melhor tratamento existente. O número de pacientes aumenta de 100 para 1.000. A partir da fase 3, os estudos são randomizados. É nesta fase que se faz os estudos de cinética da população, na qual, complementa-se as informações fornecidas para avaliação aprofundada da cinética de fármacos, metabolismo e dinâmica. Também pode-se avaliar se a combinação de dois medicamentos é melhor do que a utilização de um único medicamento. Todos estes estudos são necessários para o delineamento de um novo medicamento e seu posterior registro (VERIECK et al., 2009).

Os estudos de farmacovigilância ou de fase 4, são realizados para se confirmar que os resultados obtidos na fase anterior (fase 3) são aplicáveis em uma grande parte da população doente. Nesta fase, o medicamento já foi aprovado para ser comercializado. Os estudos fase 4 são realizados em um número maior de indivíduos acompanhados por um período maior de tempo. A sua principal característica é o momento de verificar o quanto de fato o medicamento é seguro e, efetivo. Explica-se que somente nesse momento há o teste do medicamento no mundo real, sem qualquer tipo de inclusão ou exclusão por parte do pesquisador (RICHARDS, 2003).

6. Tecnologia Farmacêutica aplicada a P e D de medicamentos

A tecnologia farmacêutica faz parte de um conjunto de métodos científicos aplicados para o desenvolvimento de novas fórmulas com objetivo de produzir novos medicamentos ou melhorar os já existentes. Para otimizar a atividade farmacológica dos fármacos, muitos sistemas de vetorização têm sido desenvolvidos (PEZZINI et al., 2007).

A tecnologia associada à modificação da liberação de fármacos, ou outras substâncias bioativas, a partir de preparações farmacêuticas sofreu um incremento notório nas últimas décadas na tentativa de maximizar as vantagens inerentes às formas farmacêuticas de liberação controlada. Ampla variedade de sistemas, visando condicionar a velocidade e o local de liberação dos fármacos, tem sido objeto de investigação na área da indústria farmacêutica. Entre estes sistemas estão incluídos os lipossomas, as bombas osmóticas, os revestimentos entéricos, os sistemas transdérmicos, os pró-fármacos, os sistemas matriciais poliméricos, complexos de inclusão com ciclodextrinas, entre outros. Proporcionando estabilidade, solubilidade e biodistribuição (LOPES et al., 2005).

7. Solubilidade e possíveis vetorizações

A determinação da classe biofarmacêutica dos fármacos assume importância no contexto atual da política de medicamentos, já que as características de solubilidade e permeabilidade de um fármaco, conforme definidas pelo Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB), constituem critério essencial para bioisenção na obtenção de registro de medicamentos genéricos e similares. De acordo com a classificação biofarmacêutica de fármacos, vários fatores podem interferir em tais propriedades como dissolução, absorção e bioatividade (Figura 3) (DAHAN et al., 2009).

A baixa solubilidade é o aspecto mais frequente a ser considerado no desenvolvimento de um grande número de potenciais candidatos a medicamentos. A maioria das novas entidades químicas promissoras são fármacos pouco solúveis em água, que podem apresentar reduzido efeito terapêutico devido à sua baixa biodisponibilidade (LIMA et al., 2008).

A solubilidade em água de compostos sólidos é regido por interações entre as moléculas na estrutura cristalina, interações intermoleculares em solução, e as mudanças de entropia que acompanha a fusão e dissolução (ZAKERI-MILANI et al., 2009).

A solubilidade deve ser um parâmetro importante na seleção de candidatos a novos fármacos. A taxa de solubilidade e dissolução dos ingredientes ativos são de grande importância em estudos de preformulação das formas farmacêuticas. As características de formulação, incluem a vida de prateleira, o comportamento farmacológico e até mesmo a biodisponibilidade são afetados por propriedades físico-químicas da fármacos (SOARES SOBRINHO et al., 2010b).

Se determinado fármaco é insolúvel ou muito pouco solúvel tal propriedade coloca um problema na dissolução e absorção. Para que um medicamento seja absorvido, deve estar

presente na forma de uma solução aquosa no local da absorção. Assim, a solubilidade aquosa de fármacos é de importância central no processo de descoberta e desenvolvimento de medicamentos, desde a concepção molecular para a formulação farmacêutica (FENICAL et al., 2009).

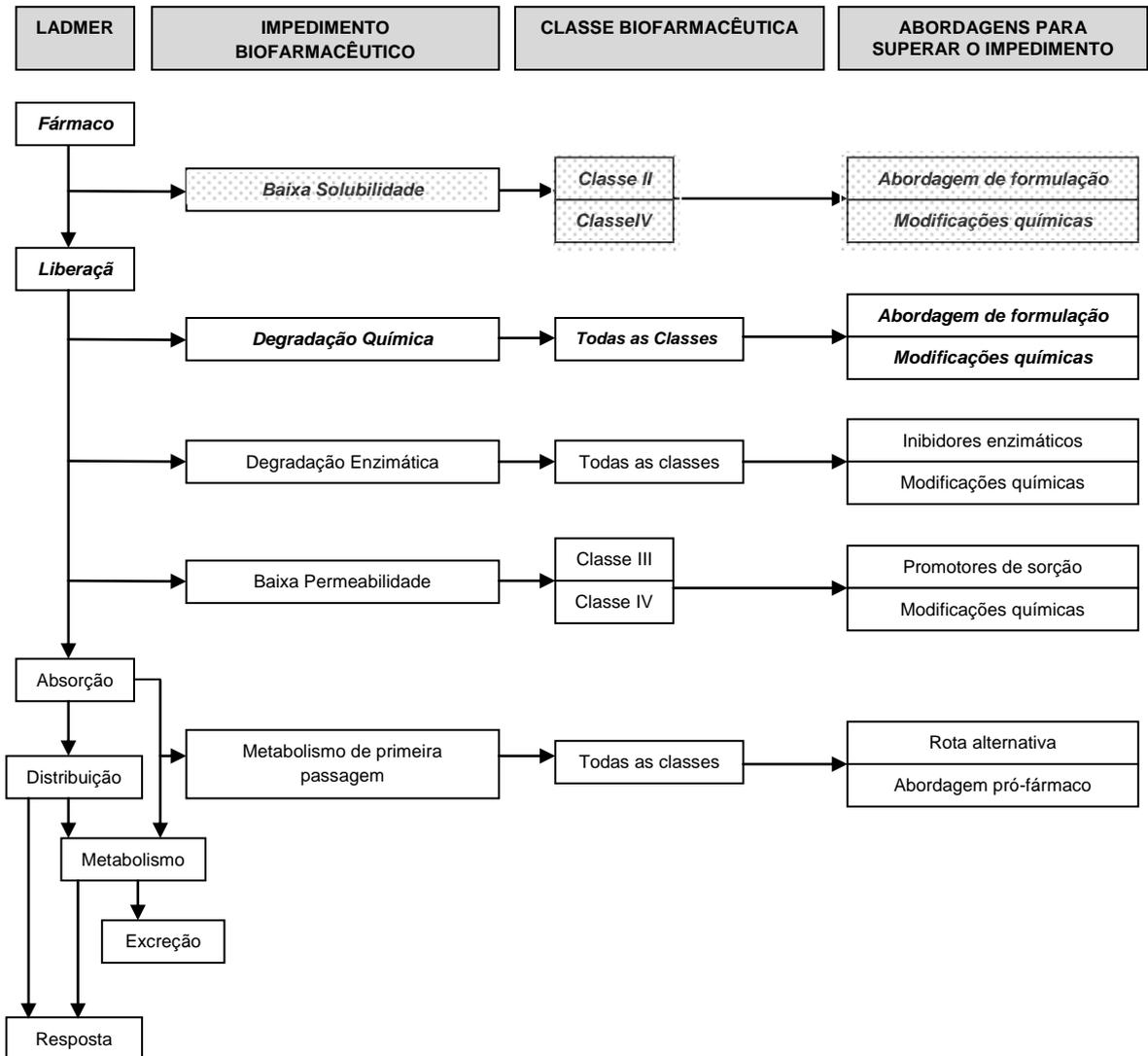


FIGURA 3. Sistema LADMER, obstáculos biofarmacêuticos no desenvolvimento de fármacos (PANCHAGNULA e THOMAS, 2000; FENICAL et al., 2009).

Diversas pesquisas vêm demonstrando o grande potencial da nanotecnologia na solubilização e permeabilidade de fármacos, promovendo eficácia no tratamento, prevenção e diagnóstico de inúmeras patologias. Nesse contexto, técnicas inovadoras estão sendo aplicadas na obtenção de novas formas farmacêuticas de liberação controlada capazes de manter ou ampliar a ação de agentes promissores. Nanodispositivos permitem o uso de

fármacos potencialmente tóxicos e pouco utilizados devido a estas características, bem como o aumento na duração e eficácia da resposta. Dentre estes destacam-se lipossomas, nanopartículas, microcápsulas e complexo de inclusão (fármaco-ciclodextrina) (PIMENTEL et al., 2007; TSAI et al., 2010).

Estudos demonstram uma boa biodistribuição e diminuição de efeitos adversos em vetorização por lipossomas revestidos por quitosana de baixo peso molecular contendo medicamentos oculares (LI et al., 2009). Shimanouchi et al. (2009), mostram em seus estudos o poder solubilizante e protetor de lipossomas, tal vetorização protegeu e permeou calceína através de bicamadas lipídicas, foi também estabelecido que o coeficiente de permeação é diretamente proporcional ao tamanho dos lipossomas.

O processo de microencapsulação possui larga aplicação industrial e para desenvolvimento de novas formas farmacêuticas devido às suas características de biocompatibilidade e biodegradabilidade (SANTOS et al., 2005b). Quispe-Condori et al. (2011), utilizaram tal técnica para encapsular óleo de linhaça usando spray de zeína e liofilização, onde retardaram e diminuíram a oxidação, atraindo considerável atenção da indústria de alimentos. Estudos demonstraram que nanocápsulas lipídicas (LNC) podem transportar fármacos lipofílicos como o ibuprofeno, fármaco anti inflamatório, em várias vias de administração (ABDEL-MONTALEB et al., 2010). Nos últimos anos, nanocápsula com quitosana tem mostrado resultados promissores de drogas por via oral, mantém-se estável em pH ácido do estômago e em fluidos intestinais (SANTANDER-ORTEGA et al., 2011).

Na indústria farmacêutica, as ciclodextrinas têm sido particularmente usadas devido às suas propriedades complexantes, por aumentar a solubilidade, dissolução dos fármacos pouco solúveis, diminuir a irritação gástrica, dérmica ou ocular causada por determinados fármacos, diminuir ou eliminar odores ou sabores desagradáveis, além de prevenir interações entre diferentes fármacos ou entre fármacos e excipientes (GUEDES et al., 2008).

Segundo Venturini et al. (2008), expõem que o mecanismo completo da formação de complexos de inclusão pode ser dividido em várias etapas as quais envolvem a dessolvatação do substrato e a dessolvatação interna da CD, mudanças conformacionais do receptor e do substrato, interação receptor-substrato. Em relação à solvatação das espécies envolvidas, dois tipos de estrutura da água devem ser consideradas: (1) moléculas de água ligadas firmemente a sítios eletricamente carregados com capacidade para formar ligações de hidrogênio e (2) moléculas de água ao redor de grupos hidrofóbicos. A desestruturação dos agregados de água do tipo (1) é determinante para a formação do complexo.

Benzonidazol (BZN) não é só a droga de escolha para o tratamento da doença de Chagas, mas hoje também é o único disponível no mercado mundial (SOARES SOBRINHO

et al., 2008). Para análise da estrutura química do benznidazol é possível distinguir duas regiões que podem interagir com a cavidade da ciclodextrina, a porção imidazólica e seu grupamento benzênico. A conformação mais estável foi obtida em presença de solvente, na qual observou-se o grupo metil introduzido na cavidade larga da ciclodextrina (Figura 4) (SOARES SOBRINHO et al., 2011).

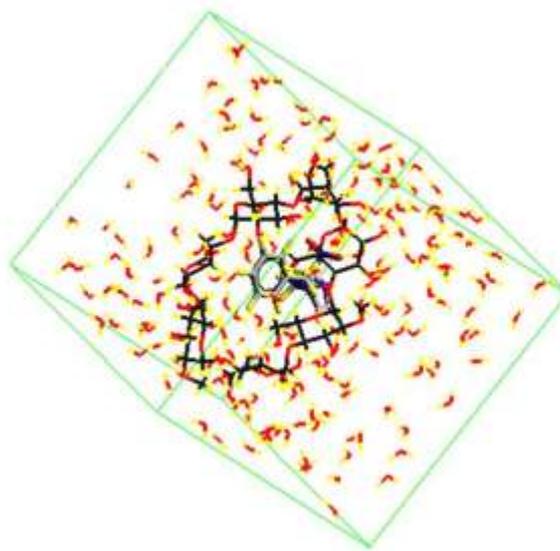


FIGURA 4. Complexo de inclusão BNZ-RM β CD otimizado por MM2 com grupo metil introduzido pela cavidade larga da ciclodextrina (SOARES SOBRINHO et al., 2011).

Tais mecanismos de vetorização possuem particularidades, todos promovem proteção, solubilização e liberação controlada dos fármacos em sítios específicos de células e órgãos, promovendo a biodisponibilidade e diminuindo o perfil tóxico.

8. Considerações Finais

Para o desenvolvimento de novos fármacos é necessário a identificação de potenciais moléculas com atividade entre as centenas de substâncias, para obter uma substância segura e mais eficaz para a terapêutica. Estudos de caracterização auxiliam na triagem de novos fármacos promissores, mas um fator determinante na sua comercialização é a solubilidade. Tal fator é determinante para a biodisponibilidade e perfil terapêutico do novo produto. Existem várias estratégias para delinear uma forma farmacêutica de liberação modificada. Tais tecnologias são de vital importância para o delineamento de possíveis fármacos, além de contribuir com futuras formulações destes candidatos a medicamento.

Referências

ABBAS, I.; ROVIRA, J.; CASANOVAS, J. Clinical trial optimization: Monte Carlo simulation Markov model for planning clinical trials recruitment. **Contemp Clin Trials**. v. 8, n. 3, p. 220-231, 2007.

ABDEL-MOTTALEB, M.M.A.; NEUMANN, D.; LAMPRECHT, A. In vitro drug release mechanism from lipid nanocapsules (LNC). **Int J Pharmaceutics**. v. 390, p. 208–213, 2010.

AGUIAR, I.; LIMA, F.C.A.; ELLENA, J.; MALTA, V.R.S.; CARLOS, R.M. Study of the phenanthroline-Mn-imidazole bonding in Mn(II) triscarbonyl complex: A X-ray and DFT computational analysis. **Comput and Theoret Chemistry**. v. 965, n. 1, p.7-14, 2011.

ALTONEN, J.; GORDON, K.C.; STRACHAN, C.J., RADES, T. Perspectives in the use of spectroscopy to characterize pharmaceutical solids. **Int J Pharmaceutics**. v. 34, p.159-169, 2008.

ALVES, L.D.S.; ROLIM, L.A.; FONTES, D.A.F.; ROLIM NETO, P.J.; ROCA, M.F.L.; SOARES SOBRINHO, J.L. Desenvolvimento de método analítico para quantificação do Efavirenz por espectrofotometria no UV-Vis. **Quím Nova (Online)**. v. 33, p. 1967-1972, 2010.

BALANT, L.P.; FABRY, M.G. Modelling during drug development. **Eur J of Pharm Biopharmaceutics**. v. 50, p.13-26, 2000.

BRESCANSI, E.G.; PESSINE, F.B.T. Desenvolvimento e caracterização de lipossomas contendo o fármaco nistatina. [Tese]. Campinas: Instituto de química, Universidade Estadual de Campinas, 2006.

BOUQUET, W.I.; CEELLEN, W.; FRITZINGER, B.; PATTYN, P.; PEETERS M.; REMON, J.P.; VERVAET, C. Paclitaxel/ β -ciclodextrin complexes for hyperthermic peritoneal perfusion – Formulation an stability. **Eur J of Pharm and Biopharm**. v. 66, p. 391-397, 2007.

CALIXTO, J.B.; SIQUEIRA JR, J.M. Desenvolvimento de Medicamentos no Brasil. **Gaz med Bahia**. v. 78, n. 1, p. 98-106, 2008.

CUNHA, S.; SANTOS, L.F.P.; ROCHA, Z.N.; RIVELINO, R.; FERRARI, J.; VENCATP, I.; LARIUCCI, C. Structural and reactivity analyses of 2-benzylamino-1,4-naphthoquinone by X-ray characterization, electrochemical measurements, and dft single-molecule calculations. **Quím Nova**. v. 33, n.10, p. 2108-2112, 2010.

DAHAN, A.; WEST, B.T.; AMIDON, G.L. Segmental-dependent membrane permeability along the intestine following oral drug administration: Evaluation of a triple single-pass intestinal perfusion (TSPiP) approach in the rat. **Eur J Pharm Sciences**. v. 36, n. 3, p. 320-329, 2009.

FENICAL, W.; JENSEN, P.R.; PALLADINO, M.A.; LAM, K.S.; LLOYD, G.K.; Potts BC. Discovery and development of the anticancer agent salinosporamide A (NPI-0052). **Bioorg Med Chem**. v.17, p. 2175–2180, 2009.

FIGUEIRAS, A.; CARVALHO, R.A.; RIBEIRO, L.; TORRES-labandeira, J.J.; VEIGA, F.J.B. Solid-state characterization and dissolution profiles of the inclusion complexes of omeprazole with native and chemically modified β -cyclodextrin. **Eur J Pharm Biopharm**. v. 67, p.531-539, 2007.

FIOCRUZ (Fundação Oswaldo Cruz). A história da terapêutica da doença de chagas, 2009. Acessado em: 21 de abril de 2001. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=126>.

FREITAS, R.M. Investigation of oxidative stress involvement in hippocampus in epilepsy model induced by pilocarpine. **Neurosc Lett**. v.462, p.225-229, 2009.

GUEDES, F.L.; ALVES, G.M.C.; SANTOS, F.L.A.; LIMA, L.F.; ROLIM, L.A.; ROLIM NETO, P.J. Ciclodextrinas: como adjuvante tecnológico para melhorar a biodisponibilidade de fármacos. **Rev Bras Farm**. v.89, n.3, p.220-225, 2008.

JULLIAN, C.; MORALES-MONTECINOS, J.; ZAPATA-TORRES, G.; AGUILERA, B.; RODRIGUEZ, J.; ARÁN, V.; OLEA-AZAR C. Characterization, phase-solubility, and molecular modeling of inclusion complex of 5-nitroindazole derivative with cyclodextrins. **Bioorg Med Chem.** V.16, n.9, p.5078–5084, 2008.

LI, N.; ZHUNANG, C.; WANG, M.; SUN, X.; NIE, S.; PAN, W. Liposome coated with low molecular weight chitosan and its potential use in ocular drug delivery. **Int J Pharm.** v. 379, p.131–138, 2009.

LIMA, A.A.N.; SOARES SOBRINHO, J.L.; CORREA JUNIOR, R.A.C.; ROLIM NETO P.J. Technologies alternatives to improve solubility of poorly water soluble drugs. **Acta Farm Bonaerense.** v.27, p.789-797, 2008.

LYRA, M.A.M.; ALVES, L.D.S.; FONTES, D.A.F.; SOARES SOBRINHO J.L.; ROLIM NETO P.J. Ferramentas analíticas aplicadas à caracterização de complexos de inclusão fármaco-ciclodextrina. **Rev Ciênc Farm Básica Apl.** v.31, p.117-124, 2010.

LOPES, C.M.; LOBO, J.M.S.; COSTA, P. Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos. **Rev Bras Cienc Farm.** v.41, n.2, p.143-154, 2005.

OLIVEIRA, S.M.; SILVA, J.B.P. Estrutura, reatividade e propriedades biológicas de hidantoínas. **Quím Nova.** v.31, n.3, p.614-622, 2008.

PANCHAGNULA, R.; THOMAS, N.S. Biopharmaceutics and pharmacokinetics in drug research. **Int J Pharm.** v. 201, p.131–150, 2000.

PATERSON, N.E. Translational research in addiction: Toward a framework for the development of novel therapeutics. **Biochemi Pharmacol.** v.81, p.1388–1307, 2011.

PAUWELS, R. Aspects of successful drug discovery and development. **Antiviral Res.** v.7, p.77–89, 2006.

PhRMA. Research and Development continue to grow, 2009. Acessado em: 07/09/2001, às 12:01 horário de Brasília. Disponível em: <http://www.phrma.org/about/key-industry-facts-about-phrma>.

PESCITELLI, G.; BILI, A.R.; BERGONZI, M.C.; VINCIERI, F.F.; DI BARI, L. Cyclodextrins as carriers for kavalactones in aqueous media: Spectroscopic characterization of (S)-7,8-dihydrokavain and β -cyclodextrin inclusion complex. **J Pharm Biomed Anal.** p. 479–483, 2010.

PEZZINI, B.R.; SILVA, M.A.S.; FERRAZ, H.G. Formas farmacêuticas sólidas orais de liberação prolongada: sistemas monolíticos e multiparticulados. **Rev Bras Cienc Farm.** V.43, n.4, p.491-502, 2007.

PIMENTEL, L.F.; JACOME JUNIOR, A.T.; MOSQUEIRA, V.C.F.; SANTOS-MAGALHAES, N.S. Nanotecnologia farmacêutica aplicada ao tratamento da malária. **Rev Bras Cienc Farm.** v.43, n.4, p.503-514, 2007.

QUISPE-CONDRI, S.; SALDANA, M.D.A.; TEMELLI, F. Microencapsulation of flax oil with zein using spray and freeze drying. **Food Sci Techn.** p.1-8, 2011.

RAMIREZ, A.G.; WILDES, K.; TALAVERA, G.; NAPOLES-SPRINGER A.; GALLION, K.; PEREZ-STABLE, E.J. Clinical trials attitudes and practices of Latino physicians. **Contemp Clinic Trials.** v.29, n.4, p.482-492, 2008.

RIBEIRO, A.; FIGUEIRAS, A.; SANTOS, D.; VEIGA, F. Preparation and solid-state characterization of inclusion complexes formed between miconazole and methyl- β -cyclodextrin. **AAPS Pharma Sci Tech.** v.47, n.2, p.326-332, 2008.

RICHARDS, D. Drug Development and Regulation. **Med Publis.** 2003.

RONDEAU-MOURO, C.; BULEON, A.; LAHAYE, M. Caractérisation par RMN des biopolymères d'origine végétale, de la molécule à l'organisation supramoléculaire. **C R Chimie.** v.11, p.370-379, 2008.

SANTEANDER-ORTEGA, M.J.; PEULA-GARCIA, J.M.; GOYCOOLEA, F.M.; ORTEGA-VINUESA, J.L. Chitosan nanocapsules: Effect of chitosan molecular weight and acetylation degree on electrokinetic behaviour and colloidal stability. **Colloid Surf B: Biointerfaces**. v.82, n.2, p.571-580, 2011.

SANTOS, N.P.; NASCIMENTO, S.C.A.; SILVA, J.F.; PEREIRA, E.C.G.; SILVA, N.H.; HONDA, N.K.; SANTOS-MAGALHAES, N.S. Usnic acid-loaded nanocapsules: an evaluation of cytotoxicity. **J Drug Del Sci Tech**. v.15, p.355-361, 2005a.

SANTOS, M.L.; FLORENTINO, A.O.; SAEKI, M.J.; APARECIDA, A.H.; LIA FOOK, M.V.; GUASTALDI, A.C. Síntese de hidroxiapatita pelo método sol-gel utilizando precursores alternativos: nitrato de cálcio e ácido fosfórico. **Eclet Quím**. v.30, n.3, p.29-35, 2005b.

SANTOS, I.M.S.; TOMÉ, A.R.; FREITAS, R.M. Estudos histopatológicos dos efeitos do ácido lipóico nas convulsões induzidas pela pilocarpina. **Rev Neuroc**. v.18, p.308-313, 2010.

SCHAFFAZICK, S.R.; GUTERRES, S.S. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Quim Nova**. v.26, n.5, p.726-737, 2003.

SILVA, E.P.; FREITAS, R.M. Vigabatrin: mechanisms of action, pharmacological effects, clinical studies and adverse reactions. **Rev Eletrônica Farmácia**. v.6, p.23-35, 2009.

SILVA, F.O.; CERQUEIRA, G.S.; SABINO, E.B.; FEITOSA, C.M.; FREITAS, R.M. Central nervous system effects of iso-6-spectraline (SPEC) isolated from *Senna spectabilis* var. *excelsa* (Schrad). **J Y Pharm**. 2011.

SHIMANOUCI, T.; ISHII, H.; YOSHIMOTO, N.; UMAKISHI, H.; KUBOI, R. Calcein permeation across phosphatidylcholine bilayer membrane: Effects of membrane fluidity, liposome size, and immobilization. **Colloid Surf B: Biointerfaces**. v.73, n.1, p.156-160, 2009.

SOARES SOBRINHO, J.L.; LIMA, L.N.A.; PERRELLI, D.C.; SILVA, J.L.; MEDEIROS, F.P.M.; SOARES, M.F.R.; ROLIM NETO, P.J. Development and in vitro evaluation of tablets based on the antichagasic Benznidazole. **Braz J Pharm Sci.** v.44, n.3, 2008.

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

SOARES SOBRINHO, J.L.; LYRA, M.A.M.; ALVES, L.D.S.; ROLIM NETO, P.J. Caracterização físico-química do tripanomicida benznidazol para o desenvolvimento de medicamentos. **Acta Farm Bonaer.** v.29, p.803-807, 2010a.

SOARES SOBRINHO, J.L.; SOARES, M.F.L.R.; ROLIM NETO, P.J.; LABANDEIRA, J.J.T. Physicochemical Study of Solid State Benznidazole-Cyclodextrin Complexes. **J Therm Anal and Calorim.** v.10, p.10973-010, 2010b.

SOARES SOBRINHO, J.L.; ROCA SOARES M.F.; 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. **AAPS Pharm Sci Tech.** v.11, p.1391-1396, 2010c.

SOARES SOBRINHO, J.L.; SOARES, M.F.L.R.; ALVES, L.D.S.; LABANDEIRA, J.J.T.; ROLIM NETO, P.J. Improving the solubility of the antichagasic drug benznidazole through formation of inclusion complex. **Quím Nova.** 2011.

STURM, S.; HAMMANN, F.; DREWE, J.; MAURER, H.H.; SCHOLER, A. An automated screening method for drugs and toxic compounds in human serum and urine using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **J Chromat B.** v.878, n.28, p.:2726-2732, 2010.

TSAI, Y.; TSAI, H.; WU, C.; TSAI, F. Preparation, characterisation and activity of the inclusion complex of paeonol with b-cyclodextrin. **Food Chem.** p.837–841, 2010.

VEIGA, F.J.B.; PECORELLI, C.C.M.F.; RIBEIRO, S.S.L. As ciclodextrinas em tecnologia farmacêutica. **Rev Coimb.** v.21, p.140-143, 2006.

VENTURINI, C.G.; NICOLINI, J.; MACHADO, C.; MACHADO, V.G. Propriedades e aplicações das ciclodextrinas. **Quim Nova.** v.31, n.2, p.360-368, 2008.

VIEGAS JR, C.; BOLZANI, V.S.; BARREIRO, E.J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Quim Nova.** v.29, n.2, p.326-337, 2006.

VIERECK, C.; BOUDES, P. An analysis of current pharmaceutical industry practices for making clinical trial results publicly accessible. **Contemp Clinic Trials.** v.30, n.4, p.293-299, 2009.

VONA, M.L.D.; LUCHETTI, L.; SPERA, G.P.; SGRECCIA, E.; KNAUTH, P. Synthetic strategies for the preparation of proton-conducting hybrid polymers based on PEEK and PPSU for PEM fuel cells. **Comptes Rendus Chimie.** v.11, n.9, p.1074-1081, 2008.

ZHANG, J.; ZHANG, H.; YU, C.; LI, J.; JIANG, Y. The attitudes of oncology physicians and nurses toward phase I, II, and III cancer clinical trials. **Contemp Clinic Trials.** 2011.

ZAKERI-MILANI, P.; BARZAGAR-JALALI, M.; AZIMI, M.; VALIZADEH, H. Biopharmaceutical classification of drugs using intrinsic dissolution rate (IDR) and rat intestinal permeability. **Eur J Pharm Biopharm.** v.73, p. 102–106, 2009.

Capítulo 2

5 AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL DE 5TIO1 E SEU COMPLEXO DE INCLUSÃO

Efeito sedativo e ansiolítico de um novo derivado do 2-amino tiofeno em camundongos

Artigo submetido à Life Science

Efeito sedativo e ansiolítico de complexo de inclusão (5TIO1-SB β CD) em camundongos

Artigo será submetido à European Journal Pharmacology

Efeito sedativo e ansiolítico de um novo derivado do 2-amino tiofeno em camundongos

SABINO, E.B.¹; SOARES SOBRINHO, J.L.¹; ALVES, L.D.S.²; VIEIRA, A.C.C.²; ROLIM NETO, P.J.²; MENDONÇA JUNIOR, F.J.B.³; FREITAS, R.M.¹

¹Post-Graduation Program in Pharmaceutics Science, Federal University of Piauí, Teresina, Piauí, Brazil.

²Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos - LTM, Universidade Federal de Pernambuco – UFPE.

³Laboratório de Síntese e Vetorização de Moléculas – LSVM, Universidade Estadual da Paraíba – UEPB, João Pessoa, Paraíba, CEP 58020-540Brazil.

Resumo

No presente trabalho examinamos a atividade ansiolítica e sedativa de 2-[(2,6-dichlorobenzilideno) amino]-5,6-dihidro-4H-ciclopentana[b]tiofeno-3-carbonitrila (5TIO1), uma molécula de origem sintética, derivada do 2-amino tiofeno. Os efeitos de 5TIO1 foram avaliados em campo aberto, labirinto em cruz elevado, campo claro e escuro e tempo de sono induzido por pentobarbital em camundongos. A caracterização físico-química da molécula foi obtida através de IV-TF e DSC. O método térmico demonstrou uma faixa endotérmica de 174,2-176,2 °C, caracterizando a faixa fusão, e um pico exotérmico demonstrando degradação da molécula. No teste de campo aberto, 5TIO1 nas doses de 0,1, 0,5 e 1,0 mg/kg, após administração intraperitoneal, produziu uma diminuição significativa no número de cruzamentos, *grooming* e *rearings*, demonstrando uma possível atividade ansiolítica e miorelaxante. No teste de labirinto em cruz elevado houve um aumento do número de entrada nos braços abertos em todas as doses, bem como foi visto uma diminuição no tempo de permanência e no número de entradas no braço fechado, sugerindo um provável efeito ansiolítico. Um efeito similar foi observado no teste de campo claro e escuro, o tempo de permanência em campo claro apresentou-se aumentado nos animais tratados. No ensaio de tempo de sono induzido por pentobarbital, 5TIO1 em todas as doses produziu um aumento significativo na duração do tempo de sono, o que pode sugerir uma potencial atividade hipnótica e sedativa. A molécula 5TIO1 nas doses de 0,1, 0,5 e 1,0 mg/kg apresentaram efeito sedativo significativo, semelhante ao DZP. Em conclusão, os resultados do presente trabalho sugerem um possível efeito sedativo e ansiolítico para 5TIO1, que pode envolver uma

interação direta com receptores do tipo benzodiazepínicos. Entretanto, novos estudos devem ser realizados para esclarecer seu mecanismo de ação e avaliar sua eficácia e segurança em testes pré-clínicos.

Palavras-chave: 5TIO1; Campo aberto; Labirinto em cruz elevado; Campo claro e escuro; Tempo de sono induzido por pentobarbital.

Abstract

Aims: In this study we examined the anxiolytic and sedative activity of 2-[(2,6-dichlorobenzylidene)amino]-5,6-dihydro-4H-cyclopenta-[b]-thiophene-3-carbonitrile(5TIO1), a synthetic molecule origin, derived from 2-amino thiophene nucleus. **Main methods:**5TIO1 effects were evaluated on open field, elevated plus maze, light-dark and barbiturate-induced sleeping time tests in mice. **Key findings:** In the open field, 5TIO1 at 0,1, 0,5 and 1,0 mg/kg doses after intraperitoneal administration, produced a significant decrease in number of crossings, rearings and grooming, showing a possible anxiolytic and muscle relaxant activity. In the elevated plus maze test there was an increase in the number of open arm entries into the at all doses, but there was a decrease in length of stay and the number of closed arm entries, suggesting a anxiolytic potential. A similar effect was observed in the light-dark test paradigm, as the time spent in the light box was increased in treated mice. In barbiturate-induced sleeping time test, 5TIO1 at all doses produced a significant increase in sleeping time, which may suggest a potential sedative and hypnotic activity. 5TIO1 at doses of 0,1, 0,5 and 1,0 mg/kg showed significant sedative effect, similar to DZP. **Significance:** In conclusion, the results of this study suggest a possible sedative and anxiolytic effect of 5TIO1, which may involve a direct interaction with receptors for benzodiazepines. However, further studies should be carried out in order to clarify its mechanism of action and evaluate its safety and efficacy in preclinical tests.

Keywords: 5TIO1; Open field; Elevated plus maze test; Light-dark; Barbiturate-induced sleeping time.

1. Introdução

Uma nova classe de compostos tiofênicos com potenciais farmacológicos tem sido estudada. Os derivados tiofenos obtidos foram selecionados para a atividade anti-inflamatória, anti esquistossomicida, antinociceptiva e antioxidante em ratos (MEOTTI et al, 2003;.. GONÇALES et al, 2004; OLIVEIRA e SILVA, 2008). O 3,4-di(substituído)oxy-N²,N⁵-bis(substituído) tiofeno-2,5-dicarbohidrazidas possui atividade anticonvulsivante e na

triagem no sistema nervoso central não foi evidenciado neurotoxicidade (KULANDASAMY et al., 2009). Estudos sugerem que os derivados tiofênicos isolados possuem ação analgésica, antibacteriana e antitumoral (SCHATZ et al, 2008;. MANSUNARI e TAVARES, 2006).

Neste panorama, o 5TIO1, (2-[(2,6-diclorobenzilideno)amino]-5,6-diidro-4H-ciclopenta[b]tiofeno-3- carbonitrila) (Figura 1), apresenta-se como um fármaco sintético, derivada do 2-amino tiofeno, este possui comprovada ação farmacológica e é utilizado no tratamento da esquizofrenia (STEFANI, 2009). O 5TIO1 vem demonstrando diversas atividades em estudos preliminares recentes, como atividade antifúngica (OLIVEIRA e LIMA, 2010), atividade antichagásica e atividades diversas sobre o sistema nervoso central, o que indica o potencial uso deste fármaco na saúde humana.

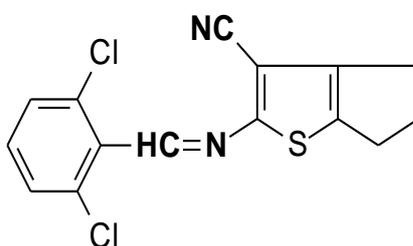


FIGURA 1. Estrutura química de 2-[(2,6-diclorobenzilideno)amino]-5,6-diidro-4H-ciclopenta[b]tiofeno-3- carbonitrila (5TIO1).

Esta última atividade mostra-se relevante e objeto de investigação, uma vez que, os compostos sintéticos são usados atualmente no tratamento de várias doenças, inclusive em doenças neurodegenerativas. Dentre essas patologias podemos observar que os distúrbios do sono e a ansiedade acometem um grande número de indivíduos da população mundial. Estudos demonstram que aproximadamente de 9 a 18% dos brasileiros apresentam em algum momento de sua vida um transtorno de ansiedade (ANDREOLI et al., 2000). Estima-se que a prevalência da ansiedade no mundo é de 28,8% e uma prevalência estimada em 12 meses em 18,1% na população em geral. Estudos também apontam uma maior prevalência de ansiedade em mulheres, podendo representar 6,6% contra apenas 3,6% em homens (KINRYS et al., 2005). Transtornos de ansiedade e humor representam os transtornos que acometem a grande maioria dos indivíduos que sofrem de problemas de saúde mental. Sensibilidade à ansiedade é uma variável individual que representa a tendência de ter sintomas corporais associadas com excitação ansiosa devido à crença de que essas sensações terão efeitos somáticos negativos, cognitivos, ou consequências sociais (SCHOFIELD et al., 2009; TULL e GRATZ, 2008).

O medicamento olanzapina que é um tiobenzopiazepínico, de origem sintética, é o anti psicótico mais prescrito no Brasil e um dos mais prescritos no mundo (VAN DER ZWAAL et

al., 2010). Como o 5TIO1, a olanzapina também deriva do núcleo tiofênico, demonstrando a importância do estudo desta molécula sobre o SNC.

O tratamento dos transtornos de ansiedade durante muito tempo foi feito com vários medicamentos com mecanismo de ação pouco conhecido (KENT et al., 2002). Esses transtornos são síndromes definidas por grupos de sinais e sintomas relacionados e, portanto, as intervenções terapêuticas para todos esses tipos de ansiedade são similares (CANNISTRO et al., 2003). Nos últimos 45 anos, o tratamento farmacológico de primeira linha dos transtornos de ansiedade consistia nos casos dos benzodiazepínicos. No entanto, apesar da eficácia clínica, a maioria dos fármacos desta classe apresenta muitos problemas, como sedação, relaxamento muscular, amnésia anterógrada e dependência física (MITTE et al., 2005; RABBANI et al., 2007).

Em nosso laboratório também estudamos a toxicidade aguda desse composto em camundongos e verificamos uma baixa toxicidade sugerindo que o mesmo pode ser avaliado no futuro em testes clínicos em humanos para possivelmente ser usado no tratamento clínico de patologias. O presente estudo foi realizado para investigar se a molécula 5TIO1 tem atividades potencial no SNC e se ele é capaz de induzir alterações comportamentais em camundongos. Respostas motoras espontâneas foram monitorados e os efeitos sedativos e ansiolíticos foram avaliados nos ensaios de campo aberto, labirinto em cruz elevado, campo claro e escuro e tempo de sono induzido por pentobarbital.

2. Materiais e Métodos

2.1. Fármacos e Reagentes

A molécula 5TIO1 foi emulsionada com polyoxyethylenesorbitan Monooleato Tween 80 0,05% dissolvido em solução salina a 0,9% (Synth, Brasil) em água destilada. Diazepam (DZP) foi adquirido na (União Química, Brasil) e usado como padrão. Pentobarbital sódico foi adquirido da Sigma Chem. Co. (St. Louis, MO, EUA). Todas os reagentes foram de grau analítico.

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

O espectro de infravermelho foi obtido utilizando o equipamento PerkinElmer® (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. As

micrografias foram obtidas de 650 a 4000 cm^{-1} e resolução de 4 cm^{-1} (Soares-Sobrinho et al., 2010).

2.3. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

As curvas de DSC foram obtidos em Calorímetro de Varredura Shimadzu® DSC-60 interligado ao software Shimadzu® TA-60WS com atmosfera de nitrogênio de 50 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e razão de aquecimento de 10°C/min, na faixa de temperatura de 30-600°C. As amostras foram colocadas em porta amostra de alumínio hermeticamente fechados com o equivalente a 2 mg \pm 0,2 de fármaco. Índio e Zinco foram utilizados para calibrar a escala de temperatura e a resposta de entalpia (Soares-Sobrinho et al., 2011).

2.4. Animais e Ensaio comportamentais

Foram utilizados, por experimento, camundongos *Swiss* machos com 2 meses de idade e com peso de 25 a 30 g, provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí. Os animais receberam água e dieta (Labina®) *ad libitum* e foram mantidos sob condições controladas de iluminação (ciclo 12h claro/escuro) e temperatura (23 \pm 2°C). O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação com Animais da Universidade Federal do Piauí, protocolo n°. 093/2010.

Todos os testes comportamentais foram conduzidos em quartos tranquilos nas mesmas condições acima referidas controlada e isolada de ruídos externos. Diferentes grupos de camundongos foram usados para cada tarefa comportamental. Para cada experimento, os camundongos foram divididos aleatoriamente em cinco grupos (8 camundongos por grupo): um grupo controle tratado com o veículo, três grupos tratados com 5TIO1 em 0,1, 0,5 e 1,0 mg/kg, respectivamente, e um quinto grupo de referência tratado com drogas pentobarbital sódico 40 mg/kg (i.p.) (pentobarbital induzida por teste de tempo de sono) e DZP 2 mg/kg (i.p.) (campo aberto, labirinto plus e claro-escuro testes). Tratamento com 5TIO1 ou veículo foi dado intraperitonealmente (i.p.) 30 minutos antes dos testes comportamentais.

2.5. Protocolo experimental e Triagem comportamental

Após o tratamento, cada animal foi submetido a uma série de testes na forma descrita abaixo. Em primeiro lugar, o animal foi observado em uma sala fechada, em temperatura constante ($23 \pm 1^\circ\text{C}$). O animal foi então colocado dentro de um labirinto e observado por 5 min. Imediatamente, após o teste de labirinto, ele foi colocado na área de campo aberto por 5 min. Todos os testes foram realizados 08:00-18:00 pm.

Triagem comportamental dos camundongos foi realizada seguintes parâmetros descritos por Almeida et al. (1999) e os animais foram observados durante 24 horas após o tratamento com 5TIO1 (0,1, 0,5 e 1,0 mg/kg, ip). Durante estes 24 h foram observados a ocorrência dos seguintes sinais gerais de toxicidade: piloereção, prostração, contorcendo-se de evacuação, aumentou, *grooming*, grupos distintos, dispnéia, sedação, analgesia e ptose palpebral.

2.5.1. Teste do Claro e Escuro

Para este experimento os camundongos foram divididos em cinco grupos e tratados conforme os protocolos experimentais e diazepam (2 mg/kg, i.p., controle positivo). Após 30 minutos dos tratamentos, os animais foram colocados, um por vez, no equipamento abaixo descrito. O aparato usado é feito de acrílico dividido em 2 compartimentos (*box* claro e *box* escuro) que se comunicam por meio de uma pequena porta (CRAWLEY e GOODWIN, 1980). 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 pela luz do ambiente. O animal foi observado por 5 minutos o parâmetro utilizado foi o tempo de permanência no *box* claro onde o tempo avaliado foi em segundos.

2.5.2. Teste do Campo Aberto

Para este experimento os camundongos serão divididos em cinco grupos e tratados conforme os protocolos experimentais e com diazepam (2 mg/kg, i.p., controle positivo). A atividade motora dos animais será verificada por meio de um campo aberto feito de acrílico (paredes transparentes e piso preto, 30 x 30 x 15 cm) e dividido em 9 quadrantes iguais, baseado no modelo descrito por Archer (1973). Após 30 minutos dos tratamentos, os animais, um por vez, serão colocados no centro do campo aberto onde o número de cruzamentos com as quatro patas (atividade locomotora espontânea - ALE), número de comportamento de autolimpeza (*grooming*) e o número de levantamentos (*rearing*), sem encostar-se à parede, serão observados durante o tempo de 5 minutos.

2.5.3. Teste do Labirinto em Cruz Elevado

Este modelo consiste de dois braços abertos opostos (30 x 5 cm) e dois fechados (30 x 5 x 25 cm), também opostos, em forma de cruz, conectados por uma plataforma central (5 x 5 cm) (LISTER, 1987). A plataforma e as paredes laterais dos braços fechados são confeccionadas em acrílico transparente e o chão em acrílico preto. O aparelho está elevado a uma altura de 45 cm do nível do chão. Após 30 minutos dos tratamentos, os animais serão colocados no centro do aparelho com a cabeça voltada para um dos braços fechados e o seu comportamento será observado por 5 minutos. As medidas comportamentais observadas serão: número de entradas e o tempo de permanência nos braços abertos e fechados, respectivamente. O tempo de permanência mede o tempo gasto pelo animal nos braços abertos e fechados. Compostos ansiolíticos reduzem a aversão do animal natural para os braços abertos e promove a exploração dos mesmos. Por outro lado, as passagens forçada ou voluntária dos animais nos braços abertos da EPM estão associados a alterações hormonais e comportamentais indicativos de aumento da ansiedade (HOGG, 1996). Estes testes foram feitos em lugares diferentes, justificando o uso deste aparelho.

2.5.4. Teste do Tempo de sono induzido por Pentobarbital

Este teste foi realizado de acordo com o método de Ferrini et al. (1974), o sono do camundongo foi induzida por uma administração de 40 mg/kg (i.p.) por peso do corpo de pentobarbital, e a duração do sono em minutos de cada animal foi observado. O tempo de sono foi registrado como o período para a recuperação do reflexo de endireitamento.

2.5.5. Análise Estatística

Os dados obtidos foram avaliados por meio da análise de variância (ANOVA) seguida do teste t-Student-Neuman-Keuls. Diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

3. Resultados

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

Utilizando esta técnica, obteve-se o espectro do 5TIO1, foi observado a presença de algumas bandas principais tais como: 2220 cm^{-1} (estiramento $\text{C}\equiv\text{N}$); 778 cm^{-1} (estiramento $\text{C}-\text{Cl}$); 719 cm^{-1} , as demais bandas secundárias apresentaram uma diminuição da intensidade (Figura 2), colaborando com a identificação da molécula obtida.

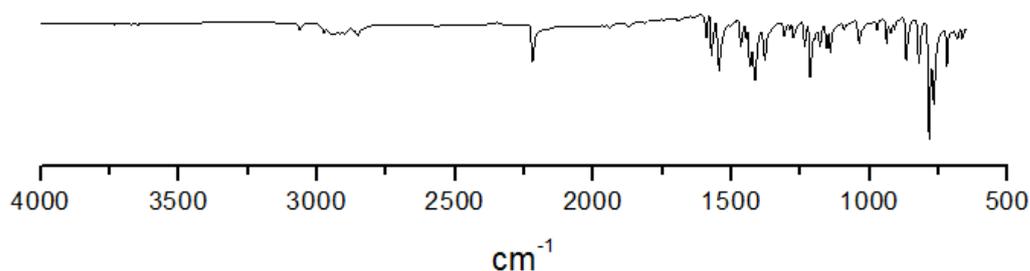


FIGURA 2. Espectro de Infravermelho com transformador de Fourier (IV-TF) de 5TIO1.

3.2. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

Através da curva de DSC realizada para a verificação da faixa de fusão do 5TIO1 na razão de $10\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, pode-se evidenciar um pico endotérmico na faixa de temperatura entre $174,2\text{-}176,2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\Delta H=24,9\text{ J/g}$) característico do processo de fusão do fármaco (Figura 3), com estreita faixa de fusão e pico simétrico, ratificando os resultados obtidos na identificação da molécula dos ensaios de infravermelho. Além de um evento exotérmico na faixa de $260\text{-}300\text{ }^{\circ}\text{C}$ relativo ao processo de decomposição térmica do fármaco.

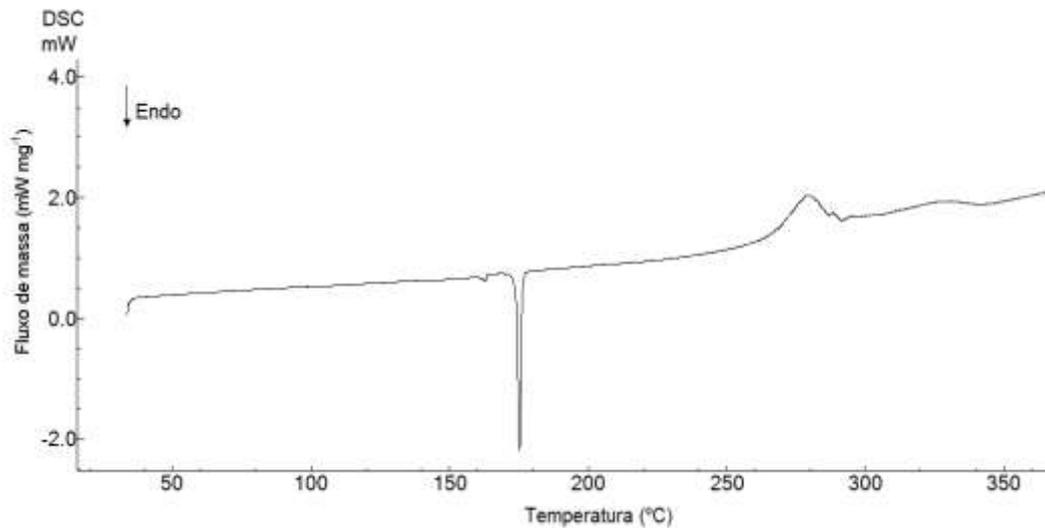


FIGURA 3. Curva de DSC do 5TIO1 obtida a $10\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ sob atmosfera de nitrogênio com fluxo de $50\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

3.3. Teste do Campo Aberto

Doses mais baixas de 5TIO1 (0,1, 0,5 e 1,0 mg/kg), não produziram qualquer alteração perceptível no sistema motor ou comportamental, e não causaram mortes dentro de 72 h de sua administração.

Como pode ser visto na Tabela 1, quando administrada 5TIO1 (0,1, 0,5 e 1,0 mg/kg i.p.) reduziu o número de cruzamentos ($p < 0,01$), e *rearings* ($p < 0,01$), quando comparado grupo controle. Em 5TIO1 (0,1, 0,5 e 1,0 mg/kg) foram observados um aumento no número de *groomings* ($p < 0,01$), quando comparado grupo controle. Diferentemente, quando administrado 5TIO1 (0,1, 0,5 e 1,0 mg/kg i.p.) aumentou o número de cruzamentos ($p < 0,01$), *groomings* ($p < 0,01$), e *rearings* ($p < 0,01$) no teste de campo aberto, quando comparado grupo DZP. Diazepam, como esperado, mostrou efeito sedativo na dose utilizada (2 mg/kg, ip).

TABELA 1 - Efeito de 5TIO1 no teste de Campo Aberto em camundongo.

Grupos	Número de cruzamentos	<i>Rearing</i>	<i>Grooming</i>
Control	$91,38 \pm 10,41$	$38,00 \pm 7,59$	$4,75 \pm 2,18$
DZP 2.0	$29,00 \pm 1,79^*$	$18,20 \pm 5,26^*$	$2,28 \pm 0,52^*$
5TIO1 0.1	$41,80 \pm 6,55^{*,**}$	$25,40 \pm 2,40^*$	$5,40 \pm 1,32^{*,**}$
5TIO1 0.5	$41,20 \pm 10,40^{*,**}$	$18,60 \pm 5,77^*$	$5,60 \pm 1,88^{*,**}$
5TIO1 1.0	$44,00 \pm 14,63^{*,**}$	$14,80 \pm 2,38^{*,**}$	$9,80 \pm 2,70^{*,**}$

Os valores são as médias \pm S.E.M. do número de cruzamentos, *rearing* e *grooming* de 7 camundongos (por grupo) usados nos experimentos. * $p < 0.01$ (ANOVA seguida por Student-Neuman-Keuls *t*-test), significativamente diferente do veículo. ** $p < 0.001$ (ANOVA seguida por Student-Neuman-Keuls *t*-test), significativamente diferente do DZP.

5TIO1 = 2-[(2,6-diclorobenzilideno) amino]-5,6-diidro-4H-ciclopenta[b]tiofeno-3-carbonitrila; DZP = diazepam.

3.4. Teste do Labirinto em Cruz Elevado

Para NEBA em todos os grupos tratados com diferentes doses de 5TIO1 produziu uma diminuição significativa em comparação aos grupos controle ($8,71 \pm 0,63$) e DZP ($8,00 \pm 0,61$) ($p < 0,05$). Em PEBA um aumento significativo em doses de 0,1 ($37,11 \pm 5,14$) e 0,5 mg/kg ($37,27 \pm 5,00\%$) foi verificada quando comparado ao grupo controle ($34,86 \pm 1,51\%$, $p < 0,001$). No entanto, houve uma diminuição significativa na dose mais elevada, em comparação ao grupo controle ($34,86 \pm 1,51\%$). Em comparação com DZP ($62,86 \pm 3,02$), diminuiu significativamente todos os parâmetros observados em animais tratados com as três doses de 5TIO1 ($p < 0,05$). Houve uma diminuição significativa no grupo de 1,0 mg/kg ($31,72 \pm 4,14$) em comparação à dose de 0,1 mg/kg ($37,11 \pm 5,14$) e 0,5 mg/kg ($37,27 \pm 5,00$) ($p < 0,001$). Para TPBA redução significativa nos grupos tratados com doses de 0,1 ($23,80 \pm 1,25$ s), 0,5 ($20,20 \pm 1,63$ s) e 1 mg/kg ($14,40 \pm 1,26$ s) de 5TIO1, quando comparado ao grupo controle ($115,00 \pm 1,50$) ($p < 0,05$), mas uma diferença significativa foi detectada apenas no grupo tratado com 1,0 mg/kg, quando comparado ao grupo controle DZP. PTOA foi visto dose dependente quando comparado com os grupos DZP e controle ($25,43 \pm 1,54$). Observamos uma diminuição significativa no grupo tratado com doses de 0,5 ($13,40 \pm 1,12\%$) e 1,0 mg/kg ($8,72 \pm 1,45\%$) quando comparado a 0,1 mg/kg ($13,46 \pm 1,03\%$), e uma diminuição significativa no grupo tratado com a dose mais elevada ($8,72 \pm 1,45\%$) quando comparada com a dose mais baixa ($13,40 \pm 1,12\%$, $p < 0,001$) (Tabela 2).

TABELA 2 - Efeitos de 5TIO1 no teste Labirinto em cruz elevado em camundongos.

Grupos	NEBA	PEBA	TPBA	PTBA
Controle	8,71 ± 0,63	34,86 ± 1,51	115,00 ± 1,50	38,90 ± 1,18
DZP 2.0	8,00 ± 0,61*	62,86 ± 3,02*	25,43 ± 1,54*	68,95 ± 2,38*
5TIO1 0.1	4,20 ± 1,24*,**	37,11 ± 3,14*,**	23,80 ± 1,25*	13,46 ± 1,03*,**
5TIO1 0.5	2,20 ± 1,15*,**	37,27 ± 3,00*,**	20,20 ± 1,63*	13,40 ± 1,12*,**
5TIO1 1.0	2,40 ± 1,24*,**	31,72 ± 3,14*,**	14,40 ± 1,26*,**	8,72 ± 1,45*,**

Cada valor representa a média ± S.E.M. de NEBA, número de entradas em braços abertos; PEBA, porcentagem de entradas em braços abertos; TPBA, tempo de permanência em braços abertos; PTBA, porcentagem do tempo de permanência nos braços abertos. Os valores são a média ± S.E.M. de 7 camundongos (por grupo) usados nos experimentos. * p<0.01 (ANOVA seguido por Student-Neuman-Keuls *t*-test), significativamente diferente do veículo. ** p<0.001 (ANOVA seguido por Student-Neuman-Keuls *t*-test), significativamente diferente do DZP.

5TIO1 = 2-[(2,6-diclorobenzilideno) amino]-5,6-diidro-4H-ciclopenta[b]tiofeno-3-carbonitrila; DZP = diazepam.

3.5. Teste do Claro e Escuro

A administração de DZP aumentou significativamente (p < 0,001) o tempo gasto pelos camundongos no espaço iluminado. No entanto, não foram encontradas alterações no número de entradas para este lugar (p < 0,05). Neste modelo, a administração de 5TIO1 aumentou significativamente o tempo gasto pelos camundongos no compartimento iluminado quando comparado com o grupo controle. Este efeito não foi dose dependente e estatisticamente diferente quando comparado com o grupo DZP, conforme apresentado na Figura 4 (0,1 mg/kg: p < 0,001; 0,5 mg/kg: p < 0,001 e 1,0 mg/kg: p < 0,001).

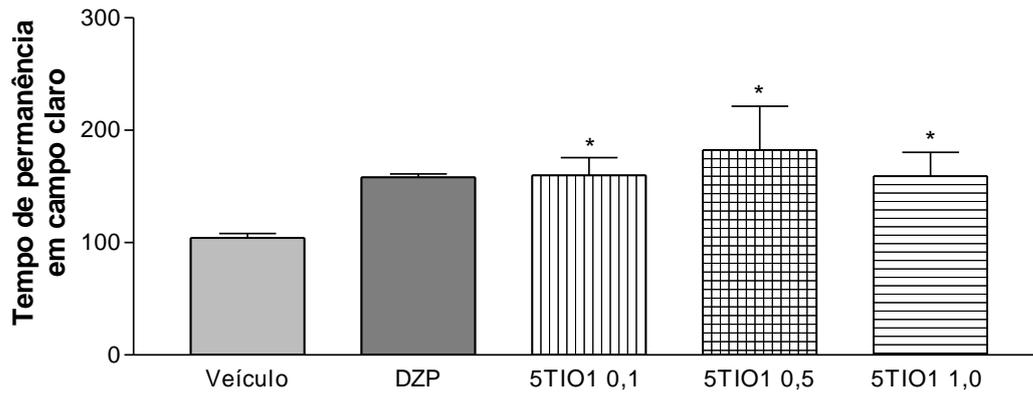


FIGURA 4. Efeitos produzidos por diferentes doses de 5TIO1 (0,1, 0,5 e 1,0 mg/kg, i.p.) sobre o tempo gasto pelos camundongos no compartimento iluminado no teste claro-escuro. Os dados são apresentados com média \pm SEM. $n=8$ camundongos por grupo. $*p<0.05$ (ANOVA e *t*-Student-Newman-Keuls como teste *post hoc*).

3.6. Teste do Tempo de sono induzido por Pentobarbital

Como pode ser observado na Figura 5, o pré-tratamento com 5TIO1 (0,1, 0,5 e 1,0 mg/kg, i.p.) reduziu a latência do sono ($p<0,01$), além de aumentar significativamente em 81,3 e 87,2% o tempo total de sono induzido pelo pentobarbital observado nas doses de 5TIO1 (0,5 e 1,0 mg/kg), quando comparado ao grupo controle, respectivamente.

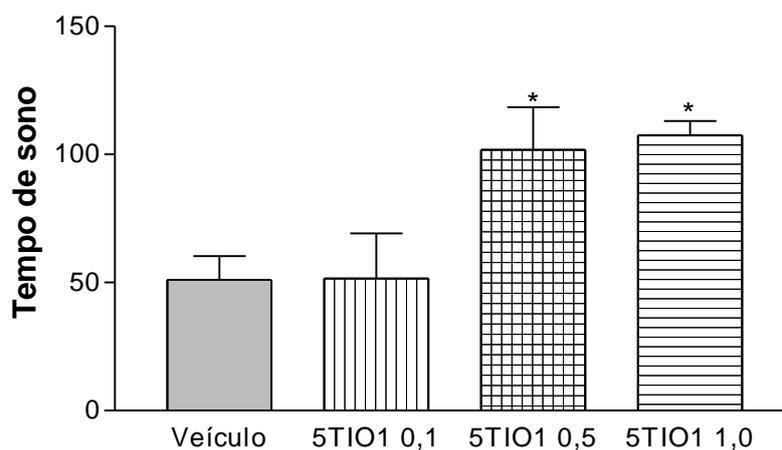


FIGURA 5. Efeito produzido por diferentes doses de 5TIO1 (0,1, 0,5 e 1,0 mg/kg, i.p.) no tempo de sono total induzido por pentobarbital (40 mg/kg) em camundongo. Os dados são apresentados com média \pm SEM. $n=8$ camundongos por grupo. $*p<0.05$ (ANOVA e *t*-Student-Newman-Keuls como teste *post hoc*).

4. Discussão

Em ensaios de caracterização, a pureza de 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. Logo, a pureza de 5TIO1 mostrou-se em torno de 99,9%, com um fator de correção calculado para as impurezas de 11,5%. Através de DSC, foi demonstrado que na faixa entre 287,9-288,3 °C ($\Delta H = -46,9$ J/g), obteve-se um pico exotérmico referente ao processo de degradação térmica do fármaco.

Assim, além dos experimentos já realizados em nosso laboratório de pesquisa, pretendemos investigar a toxicidade geral em modelos animais de roedores para determinar a toxicidade potencial e sua atividade biológica benéfica ou prejudicial no SNC. O desenvolvimento de novos medicamentos a partir de componentes do 5TIO1 precisam de modelos adequados para identificar alvos moleculares que são críticas no cérebro *in vitro* ou *in vivo*. Entre o grande número de possibilidades de testes realizados para obter a atividade de 5TIO1, selecionamos alguns testes *in vivo* para avaliação da atividade central, que constituem importantes alvos terapêuticos para doenças neurodegenerativas.

A ansiedade pode causar vários sintomas como insônia, tremores incontrolláveis, tonturas e irritabilidade. A metodologia proposta tem como objetivo avaliar estes sintomas por meio de testes comportamentais como um tempo de sono induzido por barbitúrico, labirinto em cruz elevado, campo aberto e tempo de permanência em claro, as mudanças visam investigar a atividade sedativos, ansiolíticos e motora, respectivamente.

No presente trabalho, os efeitos centrais da molécula isolada derivada do núcleo tiofênico, foram estudados. O teste de campo aberto foi utilizado para avaliar a atividade exploratória do animal, atividade locomotora espontâneo, *rearing* e *grooming* são parâmetros de comportamento mais comumente usados para descrever as influências dos acontecimentos da vida ou a administração de drogas (REX et al., 1996). 5TIO1 foi primeiramente avaliados no teste de campo aberto, que dá uma boa indicação do estado emocional do animal, uma vez que se admite que o *rearing* é uma função do nível de excitabilidade do sistema nervoso central. Alguns autores relataram que o *rearing* reflete o comportamento exploratório de um animal e, portanto, substâncias ansiolíticas induzem um aumento na atividade ou não altera este parâmetro, e sugerem que os agentes ansiolíticos e sedativos diminuem este parâmetro, demonstrando apresentar atividade miorrelaxante (MASUR et al., 1971).

Quase todos os animais gastam uma parcela significativa do tempo realizando o *grooming*, que consiste em lambar a pata e limpar a cabeça e focinho com o movimento repetitivo usando as patas dianteira (KRUK et al., 1998). Na literatura, o aumento do *grooming* é observado em roedores que estão apreensivos, os pesquisadores descobriram que as drogas ansiolíticas reduzem este parâmetro no campo aberto (BARROS et al., 1994). Estudos mostram que o número de cruzamentos dá uma indicação do nível de excitabilidade do sistema nervoso central, portanto, substâncias psicoestimulantes aumentam este parâmetro (MUELLER et al., 1989). Os resultados têm mostrado que 5TIO1 foi capaz de diminuir significativamente o número de cruzamentos, *groomings* e *rearing*, reduzindo a atividade locomotora, o que poderia ser um indicativo de efeito sedativo e relaxante muscular.

5TIO1 também mostrou efeitos ansiolítico, quando avaliados no labirinto em cruz elevado e teste de claro e escuro. Ansiedade, um sintoma que acompanha diversos distúrbios do sistema nervoso e por si só é uma doença, caracteriza-se em seres humanos por um estado de tensão e alerta físico exaustivo (JACKSON e TURKINGTON, 2005). Outras espécies exibem uma variedade de reações defensivas em resposta a predadores, alguns entendem como estados de ansiedade correlacionados (RODGERS et al., 1995). Roedores demonstram ansiedade, medo e curiosidade, quando colocado em um novo ambiente, e uma avaliação global do comportamento pode ser determinado através da observação de congelamento, *grooming*, *rearing*, balar da cabeça e o número de bolos fecais (NIC et al, 2003.; COSTA-CAMPOS et al., 2004). O labirinto em cruz elevado tem sido freqüentemente usado para detectar e avaliar propriedades ansiolíticas /ansiogênicas de drogas (TAKEDA et al., 1998). A freqüência e o tempo gasto nos braços abertos é o maior índice da ansiedade no modelo de labirinto em cruz, dado o fato de que a área aberta é extremamente aversivo para roedores (PELLOW e FILE, 1986).

Os resultados demonstraram que 5TIO1 também foi capaz de aumentar significativamente o número percentagem de permanência, bem como o número de entradas nos braços abertos, o que indica uma resposta positiva. No teste de tempo de permanência no campo claro e escuro, as doses testadas assemelham grupo DZP, sugerindo uma atividade ansiolítica provável. Nossos resultados apontam que o efeito sedativo, assim como efeito ansiolítico de 5TIO1 possivelmente envolvem o complexo do receptor GABA_A no cérebro de camundongos. Assim, os efeitos ansiolíticos e hipnóticos de 5TIO1 podem ser causados por sua ação combinada de vários sistemas de neurotransmissores e receptores, incluindo os receptores GABA_A. O efeito ansiolítico pode ser também entendida pelo sistema serotoninérgico, derivados da atividade núcleo tiofeno mostraram que atuam seletivamente sobre os receptores 5HT (ARM et al., 2010). Barbitúricos, que induzem tempo de sono,

medem a atividade hipnótica e sedativa de 5TIO1, aumentando o tempo de duração do sono, sugerindo um efeito maior que o pentobarbital.

Benzodiazepínicos como o diazepam estão em amplo uso clínico como ansiolíticos, hipnóticos e anticonvulsivantes. Essas atividades são baseadas no aumento da transmissão gabaérgica que são sensíveis aos GABA receptores que são compostas de subunidade variantes α ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, ou $\alpha 5$) em combinação com uma subunidade β ($\beta 1$ - $\beta 2$) e subunidade γ . A atividade ansiolítica dos benzodiazepínicos deve residir em um ou vários dos restantes de receptores GABA sensíveis aos benzodiazepínicos. Benzodiazepínicos ligam a um sítio na subunidade α do complexo receptor GABA_A e assim aumentar a afinidade da subunidade β de GABA. Por outro lado, a amígdala está relacionada com a generalização do medo de responder, uma característica dos transtornos de ansiedade (BENSON et al., 1998).

Nossos resultados dão suporte à idéia de que 5TIO1 interage com o receptor GABA_A, provavelmente no subtipos de receptores que mediam os efeitos benzodiazepínicos, para produzir atividades sedativa e hipnótica. Estudos adicionais, no entanto, devem ser realizados para esclarecer totalmente o mecanismo dos efeitos ansiolíticos e sedativos em doses de 5TIO1. Além disso, 5TIO1 poderia manifestar esses efeitos em algumas doses, sem demonstrar tanto atividades sedativas ou hipnóticas, sendo, portanto, potencialmente útil na prática clínica.

Declaração de conflito de interesse

Os autores deste manuscrito declarar que não há conflitos de interesse.

Agradecimentos

Gostaríamos de agradecer ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq / Brasil) e a Fundação de Apoio Pesquisa do Estado do Piauí (FAPEPI / Brasil) pelo apoio financeiro.

Referências

ALMEIDA, R.N.; FALCÃO, A.C.G.M.; DINIZ, R.S.T.; QUINTANS-JÚNIOR L.J.; POLARI, R.M.; BARBOSA-FILHO, J.M.; AGRA, M.F.; DUARTE, J.C.; FERREIRA, C.D.; ANTONIOLLI, A.R.; ARAÚJO, C.C. Metodologia para avaliação de plantas com atividade

no Sistema Nervoso Central e alguns dados experimentais. **Rev Bras Farmacogn.** v.80, p. 72-76, 1999.

ARCHER, J. Tests for emotionality in rats and mice: a review. **Anim Behav.** v.21, p.205-235, 1973.

ARM, A.E.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-phenylbenzo[b] thiophene-3-carboxamide. **Eur J Medic Chem.** v.45, n.12, p.5935-5942, 2010.

ANDREOLI, S.B.; ALMEIDA FILHO, N.; COUTINHO, E.S.F.; MARI, J.J. Identificação de casos psiquiátricos em estudos epidemiológicos multifásicos: métodos, problemas e aplicabilidade. **Rev Sau Pub.** v.34, n.5, p.475-483, 2000.

BARROS, H.M.; TANNHAUSER, S.L.; TANNHAUSER, A.L.; TANNHAUSER, M. The effects of GABAergic drugs on grooming behavior in the open field. **Pharmacol Toxicol.** v.74, p.339-344, 1994.

BENSON, J.A.; LOW, K.; KEIST, R.; MOHLER, H.; RUDOLPH, U. Pharmacology of recombinant γ -aminobutyric acidA receptors rendered diazepam-insensitive by point-mutation α -subunit. **FEBS Lett.** v.431, p.400–404, 1998.

BULLER, R.; LEGRAND, V. Novel treatments for anxiety and depression: Hurdles in bringing them to the market. **Drug Discov.** v.6, p.1220-1230, 2001.

CANNISTRATO, P.A. Neural Circuitry of Anxiety: Evidence from Structural and Functional Neuroimaging Studies. **Psychopharm Bul.** v.37, n.4, p.8-25, 2003.

COSTA-CAMPOS, L.; DASSOLER, S.C.; RIGO, A.P.; IWU, M.; ELISABETSKY, E. Anxiolytic properties of the antipsychotic alkaloid alstonine. **Pharmacol Biochem Behav.** v.77, p.481–489, 2004.

CRAWLEY, J.N. Neuropharmacologic specificity of a simple model for the behavioural actions of benzodiazepines. **Pharmacol Biochem Behav.** v.15, p.695-699, 1981.

FERRINI, R.; MIRAGOLI, G.; TACCARDI, B. Neuropharmacological studies on SB 5833, a new psychotherapeutic agent of the benzodiazepine class. **Arzneimittelforschung**. v.24, p. 2029-2032, 1974.

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 Sci**. v.76, n.19, p.2221-2234, 2005.

HOGG, S. A review of the validity and variability of the elevated plus-maze as an animal model of anxiety. **Pharmacol Biochem Behav**. v.54, p.21-30, 1996.

JACKSON, M.J.; TURKINGTON, D. Depression and anxiety in epilepsy. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**. v.76, p.45-47, 2005.

KENT, J.M.; MATHEW, S.J.; GORMAN, J.M. Molecular targets in the treatment of anxiety. **Biol Psychiatry**. V.52, n.10, p.1008-1030, 2002.

KINRYS, G.; WYGANT, L.E. Anxiety disorders in women: does gender matter to treatment? **Rev Bras Psiq**. V.27, p.43-50, 2005.

KRUK, M.R.; WESTPHAL, K.G.; VANERP, A.M.; VAN ASPERN, J.; CAVE, B.J.; SLATER, E.; DE KONING, J.; HALLER, J. The hypothalamus: cross-roads of endocrine and behavioural regulation in grooming and aggression. **Neurosci Biobehav Rev**. v.23, p.163-177, 1998.

KULANDASAMY, R.; ADHIKARI, A.V.; STABABLES, J.P. A new class of anticonvulsants possessing 6 Hz activity: 3,4-Dialkyloxy thiophene bishydrazones. **Eur J Medic Chem**. v.44, n.11, p.4376-4384, 2009.

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

MANOS, D.S.D.; MATOS, M.G. Depression, anxiety and substance use in adolescents. **Rev Bras Ter Cogn**. v.2, n.1, 2006.

MANSUNARI, A.; TAVARES, L.C. Aplicação de estudos de QSAR-2D em derivados 5-nitro-2-tiofilidênicos com atividade antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* multiresistente (MRSA). **Braz J Pharm Sci.** v.42, n.2, p.203-214, 2006.

MASUR, J.; MARTZ, R.M.W.; CARLINI, E.A. Effects of acute and chronic administration of *Cannabis sativa* and (–) α 9-trans-tetrahydrocannabinol on the behavior of rats in an open field arena. **Psychopharmacol.** v.19, p.338–397, 1971.

MEOTTI, F.C.; SILVA, D.O.; SANTOS, A.R.S.; ZENI, G.; ROCHA, J.B.T.; NOGUEIRA, C.W. Thiophenes and furans derivatives: a new class of potential pharmacological agents. **Environ Toxic Pharmacol.** v.15, n.1, p.:37-44, 2003.

MITTE, K. A meta-analysis of the efficacy of psycho- and pharmacotherapy in panic disorder with and without agoraphobia. **J Affect Disord.** v.88, n.1, p.27-45, 2005.

MUELLER, K.; KUNKO, P.M.; WHITESIDE, D.; HASKETT, C. Time course of amphetamine-induced locomotor stereotypy in an open field. **Psychopharmacology.** v.99, n.4, p.501-507, 1989.

NIC, D.B.A.; BOURIN, M.; HASCOET, M. Anxiolytic-like effects of 5-HT₂ ligands on three mouse models of anxiety. **Behav Brain Res.** v.140, p.203–214, 2003.

OLIVEIRA, T.B.; LIMA, M.C.A. Síntese, elucidação estrutural e avaliação biológica de novos derivados tiazolidínicos e cicloalquil-tiofênicos. [Dissertação] Recife: Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, 2010.

PELLOW, S.; FILE, S.E. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. **Pharmacol Biochem Behav.** v.24, p.525–529, 1986.

RABBANI, M.; SAJJADI, S.E.; MOHAMMADI, A. Evaluation of the anxiolytic effect of *Nepeta persica* Boiss in mice. **Adv Access Public.** v.5.;p.181-186, 2007.

REX, A.; STEPHENS, D.N.; FINK, H. "Anxiolytic" action of diazepam and abecarnil in a modified open field test. **Pharmacol Biochem Behav.** v.53, p.1005-1012, 1996.

RODGERS, R.J.; COLE, J.C.; ABOUALFA, K.; STEPHENSON, L.H. Ethopharmacological analysis of the effects of putative 'anxiogenic' agents in the mouse elevated plus-maze. **Pharmacol Biochem Behav.** v.52, p.805–813, 1995.

SCHATZ. Thiophenes and their Benzo Derivatives: Applications. **Compr Heteroc Chem III.** v.3, p.931-974, 2008.

SCHOFIELD, C.A.; COLES, M.E.; GIBB, B.E. Retrospective reports of behavioral inhibition and young adults' current symptoms of social anxiety, depression, and anxious arousal. **J Anxiety Disord.** v.23, p.884–890, 2009.

SRIDHAR, M.; RAO, R.M.; BABA, N.H.K.; KUMBHARE, R.M. Stereoselective synthesis of tarchonanthuslactone via the Prins cyclisation. **Tetrahedron Lett.** v.48, p.2689-2694, 2007.

TAKEDA, H.; TSUJI, M.; MATSUMIYA, T. Changes in head-dipping behavior in the holeboard test reflect the anxiogenic and/or anxiolytic state in mice. **Eur J Pharmacol.** v.350, p.21–29, 1998.

TULL, M.T.; GRATZ, K.L. Further examination of the relationship between anxiety sensitivity and depression: The mediating role of experiential avoidance and difficulties engaging in goal-directed behavior when distressed. **Anxiety Disord.** v.22, p.199–210, 2008.

Efeito sedativo e ansiolítico de complexo de inclusão (5TIO1-SB β CD) em camundongos

SABINO, E.B.¹, Silva, A.P.S.¹, MARQUES, T.H.C.¹; SOARES SOBRINHO, J.L.¹; MENDONÇA JUNIOR, F.J.B.²; FREITAS, R.M.¹

¹Post-Graduation Program in Pharmaceutics Science, Federal University of Piauí, Teresina, Piauí, Brazil.

²Synthesis Laboratory of Molecular and Vectorization, Centre for Applied Social and Biological Sciences, State University of Paraíba, Brazil.

Resumo

No presente trabalho examinamos a atividade ansiolítica do complexo de inclusão fármaco (5TIO1)-ciclodextrina (CI), com finalidade de aumentar a solubilidade e diminuir a toxicidade da molécula. Os efeitos do CI foram avaliados em campo aberto, labirinto em cruz elevado, campo claro e escuro e tempo de sono induzido por pentobarbital em camundongos. A solubilidade da molécula e do CI foram determinados, demonstrando que o complexo fármaco-ciclodextrina proporcionou um incremento de solubilidade. No teste de campo aberto, 5TIO1 nas doses de 0,1, 0,5 e 1,0 mg/kg, após administração intraperitoneal, produziu uma diminuição significativa no número de cruzamentos, movimentos de auto-limpeza (*grooming*) e levantamentos (*rearings*), demonstrando uma possível atividade ansiolítica e miorelaxante. No teste de labirinto em cruz elevado houve um aumento do número de entrada nos braços abertos em todas as doses, bem como foi visto uma diminuição no tempo de permanência e no número de entradas no braço fechado, sugerindo um provável efeito ansiolítico. Um efeito similar foi observado no teste de campo claro e escuro, o tempo de permanência em campo claro apresentou-se aumentado nos animais tratados. No ensaio de tempo de sono induzido por pentobarbital, CI na dose de 0,5 mg/kg produziu um aumento significativo na duração do tempo de sono. O complexo de inclusão nas doses de 0,1, 0,5 e 1,0 mg/kg apresentaram efeito sedativo significante, semelhante ao DZP. O grupo tratado com sulfobutil- β -ciclodextrina não apresentou diferença significativa em relação ao controle negativo. Diante do exposto, sugere-se que o CI teria um possível efeito sedativo e ansiolítico, que pode envolver uma interação direta com receptores do tipo benzodiazepínicos. Entretanto, novos estudos devem ser realizados para esclarecer seu mecanismo de ação e avaliar sua eficácia e segurança em testes pré-clínicos.

Palavras-chave: Ciclodextrina; Campo aberto; Labirinto em cruz elevado; Campo claro e escuro; Tempo de sono induzido por pentobarbital; 5TIO1.

Abstract

In the present work it was examined the activity anxiolytic and activity sedative of the inclusion complex drug-cyclodextrin (IC), with the purpose to increase the solubility and decrease the toxicity. The IC effects were evaluated on the open field, the tests were elevated plus maze, light-dark and barbiturate-induced sleeping time in the mice. On the open field test, the IC doses used were from 0.1, 0.5 and 1.0 mg/kg, after the intraperitoneal administration, it has produced a significant decrease in the number of crosses, grooming and rearing, showing a possible anxiolytic and myorelaxant activity. In the elevated plus test it was observed an increase in the number of entries in the open arms in all doses, as well as was seen the decrease in the length of stay and the number of entries in the closed arm, suggesting a likely anxiolytic effect. A similar effect was observed in the light-dark from the paradigm test, the time spent in the light box was increased in the treated mice. In barbiturate-induced sleeping time test, IC in 0.5mg/kg produced a significant increase in the duration of sleep time, which can suggest a potential hypnotic and sedative activity. The IC doses in 0.1, 0.5 and 1.0 mg/kg showed significant sedative effect, similar to DZP. In conclusion, the results of this present work suggests a possible sedative and anxiolytic effect for a new synthesized compound in our laboratory, which may involve a direct interaction with benzodiazepines receptors type. However, new studies should be performed to clarify this mechanism of action and evaluate their effectiveness and safety in pre-clinical tests.

Key words: 5TIO1; Inclusion complex; *Open field*; Elevated plus maze test; Light-dark; Barbiturate-induced sleeping time.

1. Introdução

O 5TIO1 2-[(2,6-diclorobenzilideno) amino]-5,6-diidro-4H-ciclopenta [b] tiofeno-3-carbonitrila, é uma molécula sintética que deriva do 2-amino tiofeno, e em estudos prévios demonstrou atividade antifúngica contra *Candida krusei* e *Criptococcus neoformans* (OLIVEIRA e LIMA, 2010). Porém esta molécula possui baixa solubilidade, necessitando de vetorização para aumentar sua disponibilidade e diminuir a toxicidade. Em ensaios preliminares demonstrou atividade ansiolítica e sedativa (Figura 1).



FIGURA 1. Estrutura espacial do 5TIO1.

Os compostos de origem sintética são usados atualmente no tratamento de várias doenças, inclusive em doenças neurodegenerativas. Dentre essas patologias podemos observar que os distúrbios do sono e a ansiedade que acometem um grande número de indivíduos da população mundial. Estudos demonstram que aproximadamente de 9 a 18% dos brasileiros apresentam em algum momento de sua vida um transtorno de ansiedade (ANDREOLI et al., 2000). Um exemplo de fármaco sintético, destaca-se o medicamento olazapina que é um tiobenzopiazepínico e o anti psicótico mais prescrito no Brasil e um dos mais prescritos no mundo (VAN DER ZWAAL et al., 2010). Como o 5TIO1, a olazapina também deriva do núcleo tiofênico, demonstrando a importância do estudo desta molécula sobre o SNC.

A baixa solubilidade é o aspecto mais frequente a ser considerado no desenvolvimento de um grande número de potenciais candidatos a medicamentos. A maioria das novas entidades químicas promissoras são fármacos pouco solúveis em água, que podem apresentar reduzido efeito terapêutico devido à sua baixa biodisponibilidade (LIMA et al., 2008). Diversas pesquisas vêm demonstrando o grande potencial da nanotecnologia na solubilização e permeabilidade de fármacos. Nanodispositivos permitem o uso de fármacos potencialmente tóxicos e promovem aumento na duração e eficácia da resposta, como demonstrado em vetorizações fármaco-ciclodextrina (PIMENTEL et al., 2009; TSAI et al., 2010).

Para aplicação farmacêutica, 5TIO1 deve possuir boa solubilização em solução aquosa. Por outro lado, é sabido que ciclodextrinas (CDs) pode formar complexos de inclusão (CI) com uma variedade de moléculas hóspedes e que a inclusão no CD é uma alternativa conveniente para resolver o problema encontrado na administração de fármacos hidrofóbicos em termos da biodisponibilidade e solubilidade, e também estabilidade (LOFTSSON et al., 2007).

O desenvolvimento de novos medicamentos bem como sua vetorização através de complexos de inclusão fármaco-ciclodextrina, precisam de modelos adequados para identificar alvos moleculares. Entre o grande número de possibilidades de testes realizados para verificar o perfil de biodisponibilidade e atividade do 5TIO1 em complexos de inclusão com sulfobutil- β -ciclodextrina, selecionamos alguns testes *in vivo* para avaliação da atividade central, que constituem importantes alvos terapêuticos para doenças neurodegenerativas. O

presente estudo foi realizado para investigar a atividade do complexo de inclusão fármaco-ciclodextrina sobre o SNC, bem como, as alterações comportamentais em camundongos induzida pela forma farmacêutica. Respostas motoras espontâneas foram monitorados e os efeitos sedativos e ansiolíticos foram avaliados nos ensaios de campo aberto, labirinto em cruz elevado, campo claro e escuro e tempo de sono induzido por pentobarbital.

2. Material e Métodos

2.1. Fármacos e Reagentes

O 5TIO1 foi cedido pelo Laboratório da Universidade Estadual da Paraíba, um cristal amarelo, com rendimento de 89% m.p, 159-160°C; R_f : 0,54 (*n*-Hex./AcOEt. 8,5:1,5). A ciclodextrina utilizada foi a sulfobutil- β -ciclodextrina (com grau de substituição molar de 0,57) foi doada pela indústria Roquette® (Espanha). Para a preparação das soluções utilizou-se água destilada e membranas filtrantes de porosidade de 0,22 μ m Millipore® (Millipore Corp, Billerica, MA). Todos os solventes utilizados foram de grau analítico. Diazepam (DZP) foi adquirido na (União Química, Brasil) e usado como padrão. Pentobarbital sódico foi adquirido da Sigma Chem. Co. (St. Louis, MO, EUA). Todas os outros reagentes foram de grau analítico.

2.2. Diagrama de solubilidade de fases

Devido ser uma nova molécula que apresentou baixa solubilidade 0,12 mmol e pouco se estudou, utilizou-se dois tipos de ciclodextrinas para realização do diagrama de solubilidade (β CD e SB β CD).

Quantidades em excesso de 5TIO1 foram adicionadas em soluções com concentrações crescentes de β CD (0,25%; 0,5%; 1%; 1,25%; 1,5%) e SB β CD (1%; 4%; 6%; 10%; 15%; 20%) sendo o volume final de 5 mL. Paralelamente foram preparadas amostras do fármaco apenas em água (AHUJA et al., 2005). 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 através do método por espectrofotometria UV (Modelo B582, Micronal®), no comprimento de onda de 301 nm, utilizando água como branco. Verificou-se a especificidade do método utilizado e os experimentos foram realizados em triplicata.

A parte desse estudo, analisou os efeitos da adição do agente complexante sobre o composto a ser solubilizado permitindo obter a constante de complexação (K_c) e estimar uma possível estequiometria de formação do complexo, a partir da solubilidade intrínseca do substrato (S_0) e a inclinação da reta resultante do diagrama de solubilidade (Equação 1) (Lyra et al., 2010).

$$K_{1:1} = \frac{\text{Inclinação}}{S_0 \times (1 - \text{Inclinação})} \quad \text{Eq. 1}$$

2.3. Caracterização do complexo de inclusão no estado sólido

2.3.1. Preparação dos complexos de inclusão no estado sólido

Os complexos 5TIO1: β CD e 5TIO1:SB β CD foi preparado na razão molar 1:1, utilizando o método de evaporação. Inicialmente para a solubilização do 5TIO1 utilizou-se acetona e água. Para tal, foram utilizadas quantidades mínimas dos solventes. Enquanto que para a β CD e a SB β CD utilizou-se apenas água na solubilização. Após a dissolução completa de cada componente individualmente, verteu-se a solução de 5TIO1 na solução da CD, realizando-se em seguida vigorosa homogeneização. O solvente orgânico foi retirado inicialmente em rotaevaporador (Evaporador rotativo Marconi®), sob temperatura controlada ($50 \text{ }^\circ\text{C} \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$) e pressão reduzida ($-900 \text{ mbar} \pm 20 \text{ mbar}$) com agitação contínua de $90 \pm 3 \text{ rpm}$. Posteriormente, as amostras resultantes foram congeladas a $-40 \text{ }^\circ\text{C}$ por 4 dias, e posteriormente foram liofilizadas (pressão de 80 a 150 μHg ; vácuo $220 \pm 2 \text{ Vca}$). Após a secagem os complexos foram pulverizados, misturados em gral de porcelana com auxílio de pistilo e tamisados em malha de 250 μm . Os produtos foram acondicionados em frascos ampola hermeticamente fechados e armazenados em dessecador de vidro sob vácuo.

2.3.2. Preparação de Mistura Física (MF)

A MF foi obtida por homogeneização durante 20 min em grau de porcelana com auxílio de pistilo na proporção 1:1 (mol:mol). Posteriormente os produtos foram tamisados em malha de 250 μm e acondicionados em frascos ampola hermeticamente fechados e armazenados em dessecador de vidro sob vácuo.

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

O espectro de infravermelho foi obtido utilizando o equipamento PerkinElmer® (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. As micrografias foram obtidas de 650 a 4000 cm^{-1} e resolução de 4 cm^{-1} .

2.5. Análise Térmica

A caracterização termoanalítica através de TG e DTA foi realizada em duplicata por meio de termobalança, modelo TGA Q50, em atmosfera de nitrogênio em fluxo de 50 mL/min, utilizando massa de cerca de 2,0 mg ($\pm 0,2$), acondicionadas em cadinho de alumina e analisadas na faixa de temperatura entre 25°C e 500°C na razão de aquecimento de 10 °C/min. Antes dos ensaios, verificou-se a calibração do instrumento empregando-se uma amostra de alumínio e zinco.

2.6. Animais e Ensaio comportamentais

Foram utilizados, por experimento, camundongos *Swiss* machos com 2 meses de idade e com peso de 25 a 30 g, provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí. Os animais receberam água e dieta (Labina®) *ad libitum* e foram mantidos sob condições controladas de iluminação (ciclo 12h claro/escuro) e temperatura ($23 \pm 2^\circ\text{C}$). O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação com Animais da Universidade Federal do Piauí, protocolo n°. 093/2010.

Todos os testes comportamentais foram conduzidos em quartos tranquilos nas mesmas condições acima referidas controlada e isolada de ruídos externos. Diferentes grupos de camundongos foram usados para cada tarefa comportamental. Para cada experimento, os camundongos foram divididos aleatoriamente em cinco grupos (8 camundongos por grupo): um grupo controle tratado com o veículo, três grupos tratados com complexo de inclusão (CI) 5TIO1-SB β CD em 0,1, 0,5 e 1,0 mg/kg, respectivamente, e um grupo de referência quinta tratados com drogas pentobarbital sódico 40 mg/kg (i.p.) (pentobarbital induzida por teste de tempo de sono) e DZP 2 mg/kg (i.p.) (campo aberto, labirinto pluz e claro-escuro testes).

Tratamento com complexo de inclusão (CI) ou veículo foi dado intraperitonealmente (i.p.) 30 minutos antes dos testes comportamentais.

2.7. Protocolo experimental e Triagem comportamental

Após o tratamento, cada animal foi submetido a uma série de testes na forma descrita abaixo. Em primeiro lugar, o animal foi observado em uma sala fechada, em temperatura constante ($23 \pm 1^\circ\text{C}$). O animal foi então colocado dentro de um labirinto e observado por 5 min. Imediatamente, após o teste de labirinto, ele foi colocado na área de campo aberto por 5 min. Todos os testes foram realizados 08:00-18:00 pm.

Triagem comportamental dos camundongos foi realizada seguintes parâmetros descritos por Almeida et al. (1999) e os animais foram observados durante 24 horas após o tratamento com CI (0,1, 0,5 e 1,0 mg/kg, i.p.). Durante estes 24 h foram observados a ocorrência dos seguintes sinais gerais de toxicidade: piloereção, prostração, contorcendo-se de evacuação, aumentou, *grooming*, grupos distintos, dispnéia, sedação, analgesia e ptose palpebral.

2.8. Teste do Claro e Escuro

Para este experimento os camundongos foram divididos em cinco grupos e tratados conforme os protocolos experimentais e diazepam (2 mg/kg, i.p., controle positivo). Após 30 minutos dos tratamentos, os animais foram colocados, um por vez, no equipamento abaixo descrito. O aparato usado é feito de acrílico dividido em 2 compartimentos (*box* claro e *box* escuro) que se comunicam por meio de uma pequena porta (CRAWLEY e GOODWIN, 1980). 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 pela luz do ambiente. O animal foi observado por 5 minutos o parâmetro utilizado foi o tempo de permanência no *box* claro onde o tempo avaliado foi em segundos.

2.9. Teste do Campo Aberto

Para este experimento os camundongos serão divididos em cinco grupos e tratados conforme os protocolos experimentais e com diazepam (2 mg/Kg, i.p., controle positivo). A atividade motora dos animais será verificada por meio de um campo aberto feito de acrílico (paredes transparentes e piso preto, 30 x 30 x 15 cm) e dividido em 9 quadrantes iguais,

baseado no modelo descrito por Archer (1973). Após 30 minutos dos tratamentos, os animais, um por vez, serão colocados no centro do campo aberto onde o número de cruzamentos com as quatro patas (atividade locomotora espontânea - ALE), número de comportamento de autolimpeza (*grooming*) e o número de levantamentos (*rearing*), sem encostar-se à parede, serão observados durante o tempo de 5 minutos.

2.10. Teste do Labirinto em Cruz Elevado

Este modelo consiste de dois braços abertos opostos (30 x 5 cm) e dois fechados (30 x 5 x 25 cm), também opostos, em forma de cruz, conectados por uma plataforma central (5 x 5 cm) (LISTER, 1987). A plataforma e as paredes laterais dos braços fechados são confeccionadas em acrílico transparente e o chão em acrílico preto. O aparelho está elevado a uma altura de 45 cm do nível do chão. Após 30 minutos dos tratamentos, os animais serão colocados no centro do aparelho com a cabeça voltada para um dos braços fechados e o seu comportamento será observado por 5 minutos. As medidas comportamentais observadas serão: número de entradas e o tempo de permanência nos braços abertos e fechados, respectivamente. O tempo de permanência mede o tempo gasto pelo animal nos braços abertos e fechados. Compostos ansiolíticos reduzir a aversão do animal natural para os braços abertos e promove a exploração dos mesmos. Por outro lado, as passagens forçada ou voluntária dos animais nos braços abertos da EPM estão associados a alterações hormonais e comportamentais indicativos de aumento da ansiedade (HOGG, 1996). Estes testes foram feitos em lugares diferentes, justificando o uso deste aparelho.

2.11. Teste do Tempo de sono induzido por Pentobarbital

Este teste foi realizado de acordo com o método de Ferrini et al. (1974), o sono do camundongo foi induzida por um administração de 40 mg/kg (i.p.) por peso do corpo de pentobarbital, e a duração do sono em minutos de cada animal foi observado. O tempo de sono foi registrado como o período para a recuperação do reflexo de endireitamento.

2.12. Análise Estatística

Os dados obtidos foram avaliados por meio da análise de variância (ANOVA) seguida do teste t-Student-Neuman-Keuls. Diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

3. Resultados

3.1. Diagrama de solubilidade

De acordo com os resultados obtidos com as curvas do diagrama de solubilidade (Figura 2), pode-se observar que a solubilidade do 5TIO1 em água é de $3,19 \mu\text{g/mL}$. Na presença da βCD , o incremento de solubilidade máximo proporcionado foi de $5,89 \mu\text{g/mL}$, representando um incremento de $84,64\%$ na concentração de $1,5\%$ de βCD . Devido a solubilidade limitada da βCD , não foi possível avaliar a influência desta em concentrações superiores. Paralelamente, com a SB βCD foi possível avaliar concentrações maiores, sendo observado um incremento de solubilidade de $11,52 \mu\text{g/mL}$, correspondendo a um incremento de $238,87\%$ em água utilizando 20% de SB βCD .

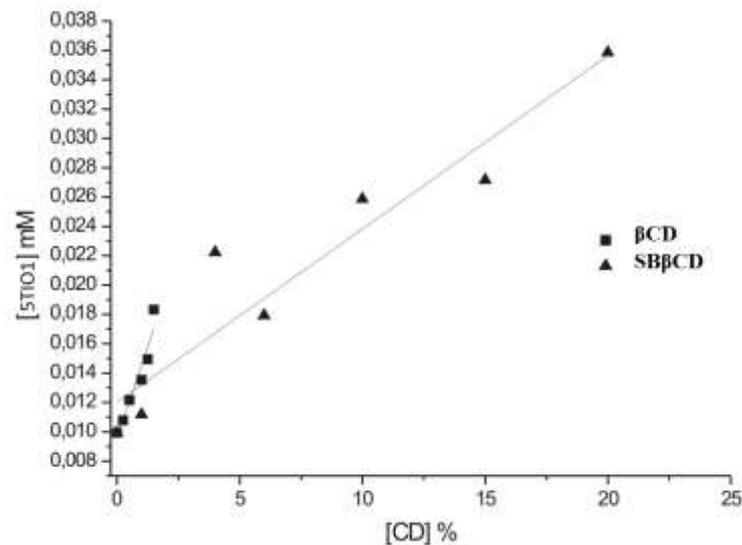


FIGURA 2. Curvas do diagrama de solubilidade do 5TIO1 sob a influência de concentrações crescentes de βCD e SB βCD em solução.

Em relação a constante de complexação (Tabela 1), a βCD apresentou uma maior constante em relação a SB βCD , indicando ser mais estável, apesar de proporcionar um menor incremento de solubilidade. Adicionalmente, o complexo $\beta\text{CD}:5\text{TIO1}$ também apresentou um maior coeficiente de correlação linear, demonstrando que o incremento de solubilidade foi proporcional a aumento da concentração da CD, apesar da SB βCD também ter obtido um resultado semelhante. Em ambos os casos, os CIs apresentaram um perfil de A_L ,

levando a indícios que a estequiometria dos CIs é de 1:1, sendo necessário outras provas como simulação computacional e RMN.

TABELA 1 - Inclinação, coeficiente de correlação (R^2) e constante de associação ($K_{1:1}$) obtidas a partir do diagrama de solubilidade.

CDs	Slope	$K_{1:1}$ (M^{-1})	R^2
βCD	0,005	505,85	0,9246
SBβCD	0,0012	120,94	0,9005

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

Utilizando esta técnica, obteve-se o espectro do 5TIO1, representado na Figura 3A. Observou-se a presença de algumas bandas principais do 5TIO1 que também são observadas na MF (Figura 3C) e no CI (Figura 3D), tais como: 2220 cm^{-1} (estiramento $C\equiv N$); 778 cm^{-1} (estiramento $C-Cl$); 719 cm^{-1} . Essas e as demais bandas secundárias apresentaram uma diminuição da intensidade, sendo que na faixa entre 900 e 1300 cm^{-1} há uma sobreposição com as bandas da SB β CD com a do 5TIO1 e, portanto, não é possível determinar se estes se encontram ausentes ou em menor intensidade. De forma geral, não houve diferenças significativas entre os espectros da MF e do CI e através dessa técnica não é possível afirmar com precisão a forma que ocorre a complexação entre o fármaco e a SB β CD.

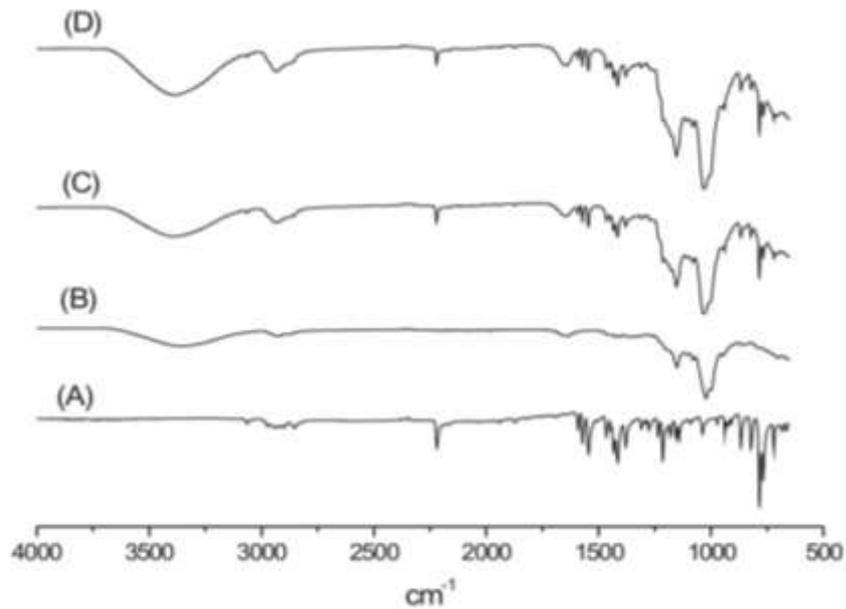


FIGURA 3. Espectros de IV-TF: (A) 5TIO1; (B) SB β CD; (C) MF S β CD: 5TIO1; (D) EV S β CD: 5TIO1.

3.3. Análise Térmica

Em relação ao DTA, observou-se que a fusão do 5TIO1 foi antecipada em aproximadamente 10°C, havendo também uma diminuição significativa da entalpia envolvida no processo, indicando uma possível diminuição da cristalinidade do fármaco na presença da SB β CD. Adicionalmente, também houve um deslocamento da degradação do fármaco para faixas de temperaturas superiores e a uma diminuição do percentual de fármaco degradado.

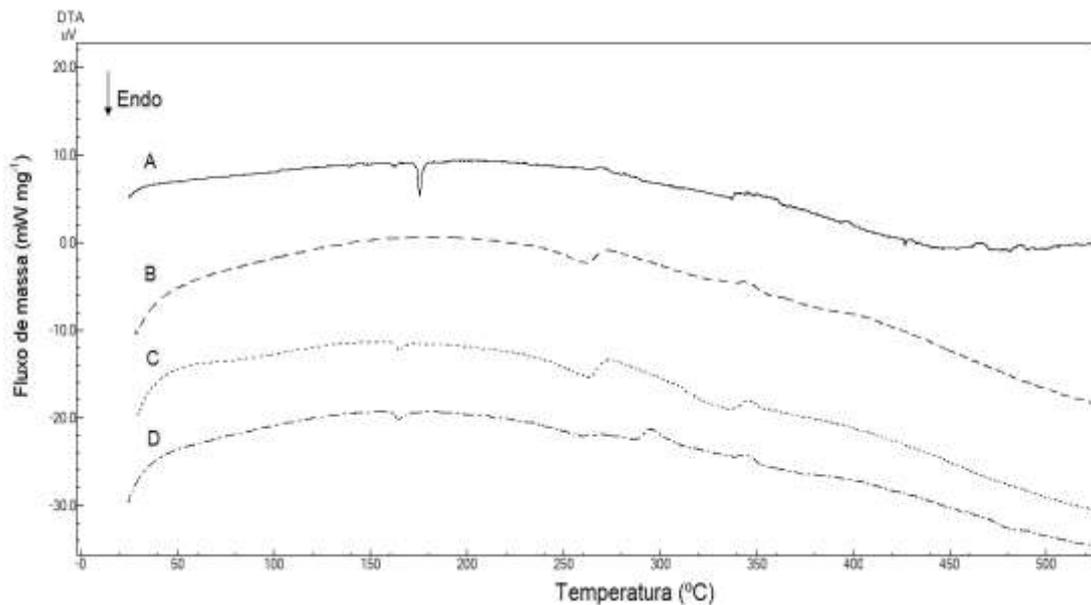


FIGURA 4. Curvas de DTA obtidas na razão de 10°C/min e fluxo de N₂ 50 mL/min: (A) 5TIO1; (B) SBβCD; (C) MF SβCD: 5TIO1; (D) CI EV SβCD: 5TIO1.

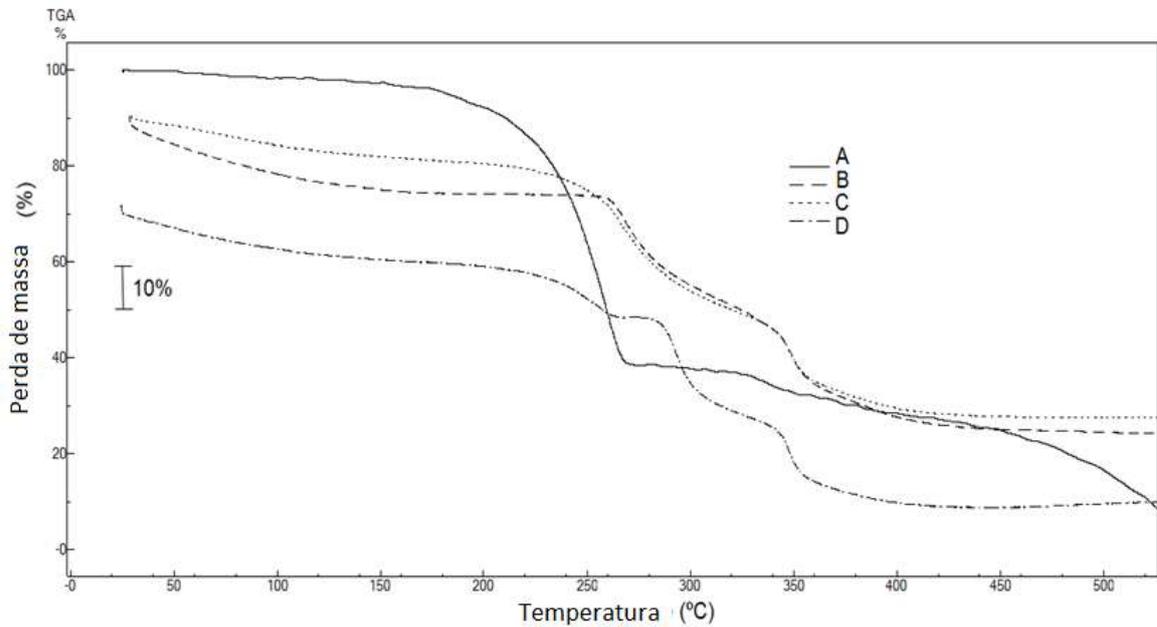


FIGURA 5. Curvas de TG obtidas na razão de 10°C/min e fluxo de N₂ 50 mL/min: (A) 5TIO1; (B) SBβCD; (C) MF SβCD: 5TIO1; (D) CI EV SβCD: 5TIO1.

TABELA 2 - Resultados obtidos através da caracterização por DTA e TG.

Amostras	Fusão (°C)	ΔH (J/g)	Decomposição (°C) 1ª etapa	Δm %	Decomposição (°C) 2ª etapa	Δm %	Decomposição (°C) 3ª etapa	Δm %
5TIO1	173,9-177,1	101,6	239,5-266,2	57,5	-	-	-	-
SBβCD	-	-	-	-	261,7-281,5	21,5	342,2-356,6	22,1
MF SBβCD: 5TIO1	161,8-170,1	8,41	251,4-282,1	30,5	-	-	342,9-360,6	22,4
CI SBβCD: 5TIO1	160,9-169,4	13,4	243,1-263,3	10,2	287,5-300,9	20,7	342,7-358,4	18,6

3.4. Teste do Claro e Escuro

Doses mais baixas de complexo de inclusão (0,1, 0,5 e 1,0 mg/kg), não produziram qualquer alteração perceptível no sistema motor ou comportamental, e não causaram mortes dentro de 72 h de sua administração.

A administração de DZP aumentou significativamente ($p < 0,001$) o tempo gasto pelos ratos no espaço iluminado. No entanto, não foram encontradas alterações no número de entradas para este lugar ($p < 0,05$). Neste modelo, a administração de CI aumentou significativamente o tempo gasto pelos ratos no compartimento iluminado quando comparado com o grupo controle. Este efeito não foi dose dependente e estatisticamente diferente quando comparado com o grupo DZP, conforme ilustrado na Figura 6 (0,5 mg/kg: $p < 0,001$ e 1,0 mg/kg: $p < 0,001$).

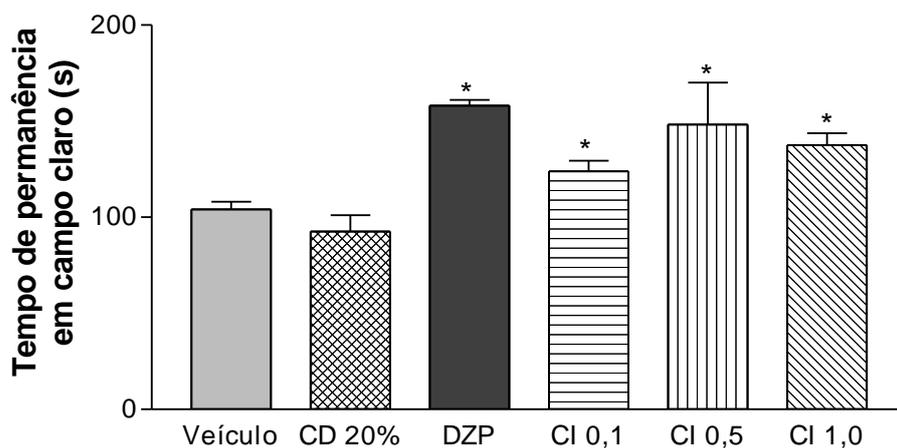


FIGURA 6. Efeitos produzidos por diferentes doses do complexo de inclusão (0,1, 0,5 e 1,0 mg/kg, i.p.) sobre o tempo gasto pelos camundongos no compartimento iluminado no teste claro-escuro. Os dados são apresentados com média \pm SEM. $n=8$ camundongos por grupo. * $p < 0,05$ (ANOVA e *t*-Student-Newman-Keuls como teste *post hoc*).

CD= ciclodextrina; CI= complexo de inclusão (5TIO1-SB β CD); DZP= diazepam.

3.5. Campo Aberto

Como pode ser visto na Tabela 3, quando administrada CI (0,1, 0,5 e 1,0 mg/kg i.p.) reduziu o número de cruzamentos ($p < 0,01$), e *rearings* ($p < 0,01$) no teste de campo aberto, quando comparados ao grupo veículo. No CI (0,1, 0,5 e 1,0 mg/kg) foram observados um aumento no número de *groomings* ($p < 0,01$), quando comparados os grupos de controle. Diferentemente, quando administrado CI (0,1, 0,5 e 1,0 mg/kg i.p.) aumentou-se o número de

cruzamentos ($p < 0,01$) e *groomings* ($p < 0,01$) no teste de campo aberto, quando comparado grupo DZP. Diazepam, como esperado, mostrou efeito sedativo na dose utilizada (2 mg/kg, ip).

TABELA 3 - Efeito do complexo de inclusão no teste de campo aberto em camundongo.

Grupos	Número de cruzamentos	Rearing	Grooming
Veículo	91,38 ± 10,41	38,00 ± 7,59	4,75 ± 2,18
DZP 2.0	29,00 ± 1,79*	18,20 ± 5,26*	2,28 ± 0,52*
CI 0.1	71,40 ± 3,64*,**	13,83 ± 2,89*	5,83 ± 2,41**
CI 0.5	60,00 ± 1,22*,**	18,33 ± 2,83*	8,16 ± 1,90*,**
CI 1.0	51,20 ± 3,80*,**	6,33 ± 2,08*,**	9,16 ± 0,40*,**

Os valores são as médias ± S.E.M. do número de cruzamentos, *rearing* e *grooming* de 7 camundongos (por grupo) usados nos experimentos. * $p < 0,01$ (ANOVA seguida por Student-Neuman-Keuls *t*-test), significativamente diferente do veículo. ** $p < 0,001$ (ANOVA seguida por Student-Neuman-Keuls *t*-test), significativamente diferente do DZP.

CI= 5TIO1-SB β CD; DZP = diazepam.

3.6.Labirinto em cruz elevado

Para NEOA em todos os grupos tratados com diferentes doses de CI tiveram uma diminuição significativa em comparação aos grupos controle (8,71 ± 0,63) e DZP (8,00 ± 0,61) ($p < 0,05$). Em PEBA foi verificado um aumento significativo nas doses de CI 0,1 mg/kg (50,26 ± 2,98%), 0,5 mg/kg (44,75 ± 3,91%) 1,0 mg/kg (42,42 ± 1,87) quando comparado ao grupo controle (34,86 ± 1,51 %, $p < 0,001$). Em comparação com DZP (62,86 ± 3,02), diminuindo significativamente todos os parâmetros observados em animais tratados com as três doses do CI ($p < 0,05$). Houve uma diminuição significativa no grupo de 1,0 mg/kg (42,42 ± 1,87) em comparação à dose de 0,1 mg/kg (50,26 ± 2,98) e 0,5 mg/kg (44,75 ± 3,91) ($p < 0,05$). Para TPBA ocorreu uma significativa redução no grupo tratado com a dose CI 1 mg/kg (75,17 ± 4,61s), quando comparado ao grupo controle (115,00 ± 1,50) ($p < 0,05$), mas uma diferença significativa foi detectada nos grupos tratados com CI 0,1 mg/kg (88,67 ± 5,82 s), 0,5 mg/kg (86,67 ± 4,27 s), e 1,0 mg/kg (75,17 ± 4,61s), quando comparado com DZP (25,43 ± 1,54) ($p < 0,05$). PTBA foi visto em uma dose-dependente quando comparado com os grupos tratados com DZP e controle (25,43 ± 1,54). Observamos uma diminuição

significativa no grupo tratado com a dose mais elevada ($29,55 \pm 5,27\%$) quando comparada com a dose mais baixa ($23,78 \pm 2,39\%$, $p < 0,001$) (Tabela 4).

TABELA 4 - Efeitos do complexo de inclusão no teste labirinto em cruz elevado em camundongos.

Grupos	NEBA	PEBA	TPBA	PTBA
Veículo	$8,71 \pm 0,63$	$34,86 \pm 1,51$	$115,00 \pm 1,50$	$38,90 \pm 1,18$
DZP 2.0	$8,00 \pm 0,61^*$	$62,86 \pm 3,02^*$	$25,43 \pm 1,54^*$	$68,95 \pm 2,38^*$
CI 0.1	$6,33 \pm 1,02^*$	$50,26 \pm 2,98^{*,**}$	$88,67 \pm 5,82^{**}$	$29,55 \pm 5,27^{*,**}$
CI 0.5	$6,16 \pm 0,87^*$	$44,75 \pm 3,91^{*,**}$	$86,67 \pm 4,27^{**}$	$28,89 \pm 1,42^{*,**}$
CI 1.0	$6,66 \pm 0,61^*$	$42,42 \pm 1,87^{*,**}$	$75,17 \pm 4,61^{*,**}$	$23,78 \pm 2,39^{*,**}$

Cada valor representa a média \pm S.E.M. de NEBA, número de entradas em braços abertos; PEBA, porcentagem de entradas em braços abertos; TPBA, tempo de permanência em braços abertos; PTBA, porcentagem do tempo de permanência nos braços abertos. Os valores são a média \pm S.E.M. de 7 camundongos (por grupo) usados nos experimentos. * $p < 0,01$ (ANOVA seguido por Student-Neuman-Keuls *t*-test), significativamente diferente do veículo. ** $p < 0,001$ (ANOVA seguido por Student-Neuman-Keuls *t*-test), significativamente diferente do DZP. CI= 5TIO1-SB β CD; DZP = diazepam.

3.7. Tempo de sono induzido por Pentobarbital

Como pode ser observado na Figura 7, pré-tratamento com CI (0,1, 0,5 e 1,0 mg/kg, ip) reduziu a latência do sono ($p < 0,01$), além de aumentar significativamente a 37,25% no tempo total de sono induzido pelo pentobarbital foi observada em CI 0,5 mg/kg, quando comparado ao grupo controle, respectivamente.

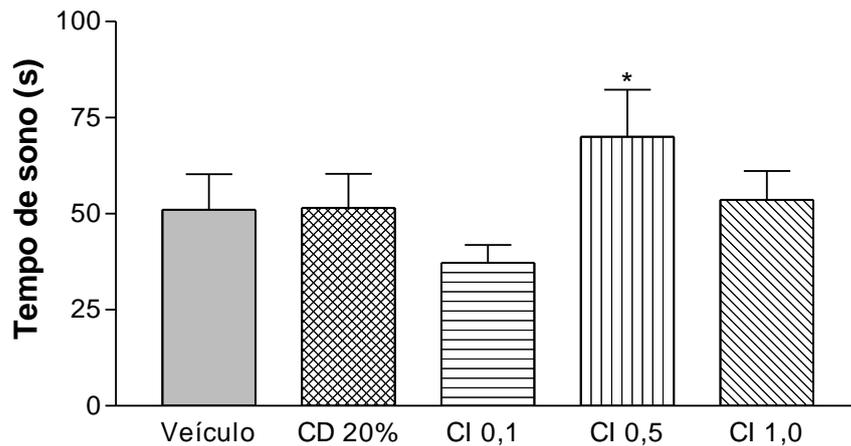


FIGURA 7. Efeito produzido por diferentes doses do complexo de inclusão (0,1, 0,5 e 1,0 mg/kg, i.p.) no tempo de sono total induzido por pentobarbital (40 mg/kg) em camundongo. Os dados são apresentados com média \pm SEM. $n=8$ camundongos por grupo. $*p<0.05$ (ANOVA e *t*-Student-Newman-Keuls como teste *post hoc*).

CD= ciclodextrina; CI= complexo de inclusão (5TIO1-SB β CD); DZP= diazepam.

4. Discussão

Um das abordagens promissoras é encapsular a molécula na cavidade hidrofóbica da ciclodextrina e com ela tentar aumentar a biodisponibilidade, que pode produzir melhor atividade biológica. Assim, a CD podem potencializar a solubilidade em água, reatividade química e as propriedades espectrais de vários fármacos lipofílicos, sem alterar a sua capacidade intrínseca de permear membranas lipofílicas, além de melhorar propriedades das moléculas como taxa de dissolução, biodisponibilidade, bem como reduzir a sua irritação e toxicidade (JULLIAN et al., 2008; TSAI et al., 2010; PESCIPELLI et al., 2010).

A literatura aponta em vários estudos a utilização das ciclodextrinas para solubilizar e promover estabilidade de substâncias com importância central, como os benzodiazepínicos alozapam, midazolam e triazolam, sem no entanto as ciclodextrinas possuem atividade farmacológica, funcionando apenas como molécula de acolhimento (LOFTOSSON et al., 2001). As ciclodextrinas são utilizadas para formulações de benzodiazepínicos como midazolam, diazepam e zolpidem, com finalidade de melhorar a solubilidade e estabilidade do medicamento (AMORIM et al., 2008; TRAPANI et al., 2003).

A ansiedade pode causar vários sintomas como insônia, tremores incontroláveis, tonturas e irritabilidade. A metodologia proposta tem como objetivo avaliar estes sintomas por meio de testes comportamentais como um tempo de sono induzido por barbitúrico, labirinto em cruz elevado, campo aberto e tempo de permanência em claro, as mudanças

visam investigar a atividade sedativos, ansiolíticos e motora, respectivamente. Assim, além dos experimentos já realizados em nosso laboratório de pesquisa, pretendemos investigar a toxicidade geral em modelos animais de roedores para determinar a toxicidade potencial e sua atividade biológica benéfica ou prejudicial no SNC.

No presente trabalho, os efeitos centrais do 5TIO1-SB β CD foram estudados. O teste de campo aberto foi utilizado para avaliar a atividade exploratória do animal, atividade locomotora espontâneo, *rearing* e *grooming* são parâmetros de comportamento mais comumente usados para descrever as influências dos acontecimentos da vida ou a administração de drogas (REX et al., 1996). O complexo de inclusão foi primeiramente avaliados no teste de campo aberto, que dá uma boa indicação do estado emocional do animal, uma vez que se admite que o *rearing* é uma função do nível de excitabilidade do sistema nervoso central. Alguns autores relataram que o *rearing* reflete o comportamento exploratório de um animal e, portanto, substâncias ansiolíticas induzem um aumento na atividade ou não altera este parâmetro, sugerem também que os agentes ansiolíticos e sedativos podem diminuir este parâmetro, demonstrando apresentar atividade miorrelaxante (MASUR et al., 1971).

Quase todos os animais gastam uma parcela significativa do tempo realizando o *grooming*, que consiste em lambar a pata e limpar a cabeça e focinho com o movimento repetitivo usando as patas dianteira (KRIK et al., 1998). Na literatura, o aumento do *grooming* é observado em roedores que estão apreensivos, os pesquisadores descobriram que as drogas ansiolíticas reduzem este parâmetro no campo aberto (BARROS et al., 1994). Estudos mostram que o número de cruzamentos dá uma indicação do nível de excitabilidade do sistema nervoso central, portanto, substâncias psicoestimulantes aumentar este parâmetro (MUELLER et al., 1989). Os resultados têm mostrado que CI foi capaz de diminuir significativamente o número de cruzamentos, *groomings* e *rearing*, reduzindo a atividade locomotora, o que poderia ser um indicativo de efeito sedativo e relaxante muscular.

O CI também mostrou efeitos ansiolítico, quando avaliados no labirinto em cruz elevado e teste de claro e escuro. Ansiedade, um sintoma que acompanha diversos distúrbios do sistema nervoso e por sí só é uma doença, caracteriza-se em seres humanos por um estado de tensão e alerta físico exaustivo (JACKSON e TURKINGTON, 2005). Outras espécies exibem uma variedade de reações defensivas em resposta a predadores, alguns entendem como estados de ansiedade correlacionados (RODGERS et al., 1995). O labirinto em cruz elevado tem sido freqüentemente usado para detectar e avaliar propriedades ansiolíticas /ansio gênicas de drogas (TAKEDA et al., 1998). A freqüência e o tempo gasto nos braços

abertos é o maior índice da ansiedade no modelo de labirinto em cruz, dado o fato de que a área aberta é extremamente aversivo para roedores (PELLOW e FILE, 1986).

Os resultados demonstraram que o complexo de inclusão também foi capaz de aumentar significativamente o número percentagem de permanência, bem como o número de entradas nos braços abertos, o que indica uma resposta positiva. No teste de tempo de permanência no campo claro e escuro, as doses testadas assemelham grupo DZP, sugerindo uma atividade ansiolítica provável. Nossos resultados apontam que o efeito sedativo, assim como efeito ansiolítico de 5TIO1 possivelmente envolvem o complexo do receptor $GABA_A$ no cérebro de camundongos. Assim, os efeitos ansiolíticos e hipnóticos de 5TIO1 podem ser causados por sua ação combinada de vários sistemas de neurotransmissores e receptores, incluindo os receptores $GABA_A$. O efeito ansiolítico pode ser também entendida pelo sistema serotoninérgico, derivados da atividade núcleo tiofeno mostrar que atuam seletivamente sobre os receptores 5HT (ARM et al., 2010). Barbitúricos, que induzidem tempo de sono, medem a atividade hipnótica e sedativa do CI, aumentando o tempo de duração do sono, sugerindo um efeito maior que o pentobarbital.

Como comprovado na literatura, não houve diferença significativa entre o controle negativo e a ciclodextrina a 20% (FOREMAN et al., 2009). Como observado nos testes de tempo de sono e tempo de permanência em campo claro, demonstrando que a sulfobutil- β -ciclodextrina não possui atividade farmacológica, funcionando apenas como molécula de vetorização, promovendo assim uma melhor biodisponibilidade de 5TIO1.

Nossos resultados dão suporte à idéia de que o complexo de inclusão interage com o receptor $GABA_A$, provavelmente no subtipos de receptores que mediam os efeitos benzodiazepínicos, para produzir atividades sedativa e hipnótica. Estudos adicionais, no entanto, devem ser realizados para esclarecer totalmente o mecanismo dos efeitos ansiolíticos e sedativos em doses do CI. Além disso, o complexo 5TIO1-SB β CD poderia manifestar esses efeitos em algumas doses, sem demonstrar tanto atividades sedativas ou hipnóticas, sendo, portanto, potencialmente útil na prática clínica.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq e FAPPEPI pelo apoio financeiro. Agradecem também a colaboração do Laboratório de Tecnologia de Medicamentos da UFPE e Universidade Estadual da Paraíba.

Referências

AHUJA, C.R.A.; KHARL, A.J.R.K. Cyclodextrins in drug delivery: an updated review, **AAPS. Pharm Sci Tech.** v.6, p. 329–357, 2005.

ALMEIDA, R.N.; FALCÃO, A.C.G.M.; DINIZ, R.S.T.; QUINTANS-JÚNIOR, L.J.; POLARI, R.M.; BARBOSA-FILHO, J.M., AGRA, M.F.; DUARTE, J.C.; FERREIRA, C.D.; ANTONIOLLI, A.R.; ARAÚJO, C.C. Metodologia para avaliação de plantas com atividade no Sistema Nervoso Central e alguns dados experimentais. **Rev Bras Farmacogn.** v.80, p.72-76, 1999.

AMORIM, C.G.; ARAÚJO, A.N.; MONTENEGRO, M.C.B.S.M.; SILVA, V.L. Cyclodextrin-based potentiometric sensors for midazolam and diazepam. **J Pharm Biomed Anal.** v.48, p.1064–1069, 2008.

ANDREOLI, S.B.; ALMEIDA FILHO, N.; COUTINHO, E.S.F.; MARI, J.J. Identificação de casos psiquiátricos em estudos epidemiológicos multifásicos: métodos, problemas e aplicabilidade. **Rev. Sau. Pub.**, v. 5, n. 34, p. 475-483, 2000.

ARCHER, J. Tests for emotionality in rats and mice: a review. **Anim Behav.** v.21, p.205-235, 1973.

ARM, A.E.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-phenylbenzo[b] thiophene-3-carboxamide. **Eur J Medic Chem.** v.45, n.12, p.5935-5942, 2010.

BARROS, H.M.; TANNHAUSER, S.L.; TANNHAUSER, A.L.; TANNHAUSER, M. The effects of GABAergic drugs on grooming behavior in the open field. **Pharmacol Toxicol.** v.74, p.339-344, 1994.

BULLER, R.; LEGRAND, V. Novel treatments for anxiety and depression: Hurdles in bringing them to the market. **Drug Discov.** v.6, p.1220-1230, 2001.

CRAWLEY, J.N. Neuropharmacologic specificity of a simple model for the behavioural actions of benzodiazepines. **Pharmacol Biochem Behav.** v.15, p.695-699, 1981.

FERRINI, R.; MIRAGOLI, G.; TACCARDI, B. Neuropharmacological studies on SB 5833, a new psychotherapeutic agent of the benzodiazepine class. **Arzneimittelforschung.** v.24, p. 2029-2032, 1974.

FOREMAN, M.M.; HANANIA, T.; ELLER, M. Anxiolytic effects of lamotrigine and JZP-4 in the elevated plus maze and in the four plate conflict test. **Eur J Pharmacol.** v.602, p. 316-320, 2009.

HOGG, S. A review of the validity and variability of the elevated plus-maze as an animal model of anxiety. **Pharmacol Biochem Behav.** v.54, p.21-30, 1996.

JACKSON, M.J.; TURKINGTON, D. Depression and anxiety in epilepsy. **J Neurol Neurosurg Psychiatry.** v.76, p.45-47, 2005.

KINRYS, G.; WYGANT, L.E. Anxiety disorders in women: does gender matter to treatment? **Rev Bras Psiq.** V.27, p.43-50, 2005.

KRUK, M.R.; WESTPHAL, K.G.; VANERP, A.M.; VAN ASPERN, J.; CAVE, B.J.; SLATER, E.; DE KONING, J.; HALLER, J. The hypothalamus: cross-roads of endocrine and behavioural regulation in grooming and aggression. **Neurosci Biobehav Rev.** v.23, p.163-177, 1998.

JULLIAN, C.; MORALES-MONTECINOS, J.; ZAPATA-TORRES, G.; AGUILERA, B.; RODRIGUEZ, J.; ARÁN, V.; OLEA-AZAR, C. Characterization, phase-solubility, and molecular modeling of inclusion complex of 5-nitroindazole derivative with cyclodextrins. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 9, n. 16, p. 5078-84, 2008.

LIMA, A.A.N.; SOARES SOBRINHO, J.L.; CORREA JUNIOR, R.A.C.; ROLIM NETO P.J. Technologies alternatives to improve solubility of poorly water soluble drugs. *Acta Farm Bonaerense.* v.27, p.789-797, 2008.

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

LYRA, M.A.M.; ALVES, L.D.S.; FONTES, D.A.F.; SOARES SOBRINHO, J.L.; ROLIM NETO, P.J. Ferramentas analíticas aplicadas à caracterização de complexos de inclusão fármaco-ciclodextrina. **Rev Ciênc Farm Básica Apl.** v. 31, p. 117-124, 2010.

LOFTSSON, T.; GUDMUNSDÓTTIR, H.; SIGURJÓNSDÓTTIR, J.F.; SIGURDSSON, H.H.; SIGFÚSSON, S.D.; MÁSSON, M.; STEFÁNSSON, E. Cyclodextrin solubilization of benzodiazepines: formulation of midazolam nasal spray. **Int J Pharm.** v.212, p.29–40, 2001.

LOFTSSON, T.; VOGENSEN, S.B.; BREWSTER, M.E.; KONÁDSDÓTTIR, F. Effects of cyclodextrins on drug delivery through biological membranes. **J Pharm Sci.** v.96, p. 2532–2546, 2007.

MASUR, J.; MARTZ, R.M.W.; CCARLINI, E.A. Effects of acute and chronic administration of *Cannabis sativa* and (–) α -9-trans-tetrahydrocannabinol on the behavior of rats in an open field arena. **Psychopharmacol.** v.19, p.338–397, 1971.

MUELLER, K.; KUNKO, P.M.; WHITESIDE, D.; HASKETT, C. Time course of amphetamine-induced locomotor stereotypy in an open field. **Psychopharmacology.** v.99, n.4, p.501-507, 1989.

OLIVEIRA, T.B.; LIMA, M.C.A. **Síntese, elucidação estrutural e avaliação biológica de novos derivados tiazolidínicos e cicloalquil-tiofênicos.** Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, 121 p. 2010.

PATERSON, N.E. Translational research in addiction: Toward a framework for the development of novel therapeutics. **Biochem. Pharmacol.**, v. 12, n. 81, p. 1388-1407, 2011.

PAUWELS, R. Aspects of successful drug discovery and development. **Antiviral Res.** v.7, p.77–89, 2006.

PELLOW, S.; FILE, S.E. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. **Pharmacol Biochem Behav.** v.24, p.525–529, 1986.

PESCITELLI, G.; BILI, A.R.; BERGONZI, M.C.; VINCIERI, F.F.; DI BARI, L. Cyclodextrins as carriers for kavalactones in aqueous media: Spectroscopic characterization of (S)-7,8-dihydrokavain and β -cyclodextrin inclusion complex. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, p. 479–483, 2010.

PIMENTEL, L.F.; JACOME JUNIOR, A.T.; MOSQUEIRA, V.C.F.; SANTOS-MAGALHAES, N.S. Nanotecnologia farmacêutica aplicada ao tratamento da malária. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, v. 4, n. 43, p. 503-514, 2007.

REX, A.; STEPHENS, D.N.; FINK, H. “Anxiolytic” action of diazepam and abecarnil in a modified open field test. **Pharmacol Biochem Behav.** v.53, p.1005-1012, 1996.

RODGERS, R.J.; COLE, J.C.; ABOUALFA, K.; STEPHENSON, L.H. Ethopharmacological analysis of the effects of putative ‘anxiogenic’ agents in the mouse elevated plus-maze. **Pharmacol Biochem Behav.** v.52, p.805–813, 1995.

TAKEDA, H.; TSUJI, M.; MATSUMIYA, T. Changes in head-dipping behavior in the holeboard test reflect the anxiogenic and/or anxiolytic state in mice. **Eur J Pharmacol.** v.350, p.21–29, 1998.

TRAPANI, G.; LOPEDOTA, A.; BOGJETICH, G.; LATROFA, A.; FRANCO, M.; SANNA, E.; LISO, G. Encapsulation and release of the hypnotic agent zolpidem from biodegradable polymer microparticles containing hydroxypropyl- β -cyclodextrin. **Int. J. Pharm.** v.268, p.47–57, 2003.

TSAI, Y.; TSAI, H.; WU, C.; TSAI, F. Preparation, characterisation and activity of the inclusion complex of paeonol with β -cyclodextrin. **Food. Chem.**, p. 837–841, 2010.

TULL, M.T.; GRATZ, K.L. Further examination of the relationship between anxiety sensitivity and depression: The mediating role of experiential avoidance and difficulties engaging in goal-directed behavior when distressed. **Anxiety Disord.** v.22, p.199–210, 2008.

VAN DER ZWAAL, E.M.; LUIJENDIJK, M.C.M.; EVERS, S.S.; LA FLEUR, S.E.; ADAN, R.A.H. Olanzapine affects locomotor activity and meal size in male rats. **Pharm. Biochem. Behav.**, n. 97, p. 130-137, 2010.

Capítulo 3

6 AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA

Avaliação da toxicidade aguda e Histopatológica de novo composto tiofênico

Artigo Submetido à Revista Brasileira de Toxicologia

Avaliação da toxicidade aguda e Histopatológica de novo composto tiofênico

**SABINO, E.B.¹; SOUSA, G.F.³; DA SILVA, J.S.¹; MENDONÇA JUNIOR, F.J.B.²;
FREITAS, R.M.¹; SOARES SOBRINHO, J.L.¹**

¹Núcleo de Tecnologia Farmacêutica, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, *Campus* Ministro Petrônio Portela, CEP: 64.049-550, Teresina - Brasil. *joselamartine@hotmail.com

²Laboratório de Síntese e Vetorização de Moléculas, Centro de Ciências Biológicas e Sociais Aplicadas, Universidade Estadual da Paraíba, R. Monsenhor Walfredo Leal, n.487, Tambiá, João Pessoa/PB 58.020-540, Brasil.

³ Universidade Federal do Ceará, Av. da Universidade, 2853 - Benfica - Fortaleza - CE CEP 60020-181.

Resumo

A molécula 5TIO1 é de origem sintética, deriva do núcleo tiofeno e possui baixa solubilidade. O presente estudo objetivou a vetorização da molécula, bem como avaliar sua toxicidade aguda. A molécula foi complexada com sulfobutil β -ciclodextrina (SB β CD), formando o complexo de inclusão (CI) 5TIO1- SB β CD, e quantificado em UV-VIS $\lambda=301\text{nm}$. A toxicidade aguda foi avaliada por meio de estudos de *Screening Hipocrático*, DL_{50} , análise histopatológica do hipocampo, avaliação de parâmetros bioquímicos e hematológicos em camundongos *Swiss* adultos, nas doses de 1, 2, e 3 g/kgde 5TIO1(v.o) e 0,1, 0,5 e 1 mg/kg (i.p) para CI. Observou-se que a molécula 5TIO1 nas doses 2 e 3 g/kg apresentaram índice de mortalidade de 70 e 100%, respectivamente. Nos grupos tratados com CI não foi observado mortes. Com relação aos parâmetros estudados do 5TIO1, apresentou diminuição da ALT e AST, e aumento de glicose e uréia. A administração aguda do CI provocou aumento dos níveis de triglicerídeos e diminuição de ALT, AST e creatinina. No cérebro observou-se lesões dos neurônios com necrose, em todas as doses do 5TIO1. Os grupos tratados com CI não foram observados lesões cerebrais. Pode-se sugerir a vetorização (CI) diminui a toxicidade produzida pelo 5TIO1, além de melhorar sua atividade farmacológica, passo importante para o desenvolvimento de medicamentos seguros e eficazes.

Palavras-chave: solubilidade, ciclodextrina, tratamento agudo, hematologia, bioquímica

Abstract

The molecule is 5TIO1 synthetic origin, derives from the core thiophene and has low solubility. This study aimed to vectorization of the molecule, and to evaluate its acute toxicity. The molecule was complexed with sulfabutyl β -cyclodextrin (SB β CD), forming the inclusion complex (IC) 5TIO1-SB β CD, and quantified by UV-VIS $\lambda = 301\text{nm}$. Acute toxicity was assessed through the *Hippocratic screening* studies, DL_{50} , histopathology of the hippocampus, evaluation of biochemical and hematological parameters in adult mice at doses of 1, 2, e 3 g kg^{-1} of 5TIO1(v.o) and 0,1, 0,5 e 1 mg kg^{-1} (i.p) for IC. It was observed that the molecule 5TIO1 doses 2 and 3 g kg^{-1} showed a mortality rate of 70 and 100%, respectively. In groups treated with CI was not observed deaths. With respect to the parameters of 5TIO1, showed decreased ALT and AST, and increased glucose and urea. Acute administration of CI caused increased levels of triglycerides and decreased ALT, AST and creatinine. In the brain lesions were observed necrosis of neurons, at all doses of 5TIO1. The group treated with IC were not observed brain damage. One may suggest the vectorization (IC) decreases the toxicity produced by 5TIO1, and improve its pharmacological activity, an important step for the development of safe and effective medicines.

Key words: solubility, cyclodextrin, acute treatment, hematology, biochemistry

1. Introdução

Os fármacos são substâncias usadas para impedir ou curar doenças em homens e animais. A introdução de novos fármacos na terapêutica é necessária para o aperfeiçoamento do tratamento mais seguro e eficaz. A busca por medicamentos menos tóxicos resultou na introdução de substâncias sintéticas na terapêutica e seu uso foi amplamente disseminado no século XX. Cerca de 85% dos fármacos disponíveis na terapêutica moderna são de origem sintética, isto sem considerar aqueles oriundos de processos de semi-síntese (OLIVEIRA e SILVA, 2008).

O fármaco ideal deve ser rapidamente absorvido e distribuído no organismo, deve ser altamente seletivo em relação ao seu alvo, deve ter uma potência elevada e um alto grau de eficácia terapêutica, para que seja eficaz em doses baixas. Um número considerável de barreiras pode limitar a utilização clínica dos fármacos. Estas limitações estão envolvidas com biodisponibilidade sistêmica incompleta do fármaco, ocasionado muitas vezes pela dissolução insuficiente, e toxicidade relacionada à irritação local ou à distribuição em outros tecidos (CHIN e FERREIRA, 2009). Os fármacos de classe II (baixa solubilidade e alta

permeabilidade) estão sujeitos a problemas relacionados à biodisponibilidade, devido a baixa solubilidade, necessitando alternativas para incrementar a solubilização (BONAMICI e SERRA, 2009; LIMA et al., 2008).

Diversas pesquisas vêm demonstrando o grande potencial da nanotecnologia farmacêutica no tratamento, prevenção e diagnóstico de inúmeras patologias. Nesse contexto, técnicas inovadoras estão sendo aplicadas na obtenção de novas formas farmacêuticas de liberação controlada capazes de manter ou ampliar a ação de agentes promissores. Nanodispositivos permitem o uso de fármacos potencialmente tóxicos e pouco utilizados devido a estas características, bem como o aumento na duração e eficácia da resposta. Dentre estes destacam-se lipossomas, nanopartículas, microcápsulas e complexo de inclusão (fármaco-ciclodextrina) (PIMENTEL et al, 2007; TSAI et al., 2010). Este último é uma matriz hidrofílica que tem superfície externa hidrofílica e cavidade interna hidrofóbica, age como molécula de acolhimento ou recipientes na formação de compostos de inclusão com moléculas hóspedes em solução aquosa (JULIAN et al., 2008; PESCIPELLI et al., 2010; SOARES SOBRINHO et al., 2011).

O composto 2-[(2,6- diclorobenzilideno) amino]-5,6-diidro-4H-ciclopenta [b]tiofeno-3-carbonitrila (5TIO1), uma molécula sintética derivada do núcleo tiofeno, com atividade anti fúngica já comprovada, possui baixa solubilidade, necessitando de vetorização para aumentar sua disponibilidade e diminuir sua toxicidade (OLIVEIRA e LIMA, 2010).

Este trabalho visou melhorar a solubilidade do composto 5TIO1 por meio de CI (fármaco-ciclodextrina), além de avaliar os efeitos após administração aguda dos parâmetros bioquímicos, hematológicos e histopatológico em camundongos.

2. Material e Métodos

2.1. Diagrama de solubilidade de fases

Devido ser uma nova molécula que apresentou baixa solubilidade 0,12 mmol e pouco se estudou, utilizou-se dois tipos de ciclodextrinas para realização do diagrama de solubilidade (β CD e SB β CD).

Quantidades em excesso de 5TIO1 foram adicionadas em soluções com concentrações crescentes de β CD (0,25%; 0,5%; 1%; 1,25%; 1,5%) e SB β CD (1%; 4%; 6%; 10%; 15%; 20%) sendo o volume final de 5 mL. Paralelamente foram preparadas amostras do fármaco apenas em água (CHALLA et al., 2005). 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 0,45 μ m. A

quantificação do 5TIO1 foi através do método por espectrofotometria UV visível (Modelo B582, Micronal[®]), no comprimento de onda de 301 nm, utilizando água como branco. Verificou-se a especificidade do método utilizado e os experimentos foram realizados em triplicata.

A parte desse estudo, analisou os efeitos da adição do agente complexante sobre o composto a ser solubilizado permitindo obter a constante de complexação (K_c) e estimar uma possível estequiometria de formação do complexo, a partir da solubilidade intrínseca do substrato (S_0) e a inclinação da reta resultante do diagrama de solubilidade (Equação 1) (Lyra et al., 2010).

$$K_{cl} = \frac{\text{Inclinação}}{S_0 \times (1 - \text{Inclinação})} \quad \text{Eq. 1}$$

2.2. Animais e Tratamento

Foram utilizados, por experimento, camundongos *Swiss* machos com 2 meses de idade e com peso de 25 a 30 g, provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí. Os animais receberam água e dieta (Labina[®]) *ad libitum* e foram mantidos sob condições controladas de iluminação (ciclo 12h claro/escuro) e temperatura ($23 \pm 2^\circ\text{C}$). O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação com Animais da Universidade Federal do Piauí, n°. 093/2010.

Oitenta camundongos correspondendo a oito grupos ($n= 10/\text{grupo}$) foram tratados durante 24 horas. Três grupo foram tratados com 5TIO1 solubilizado em Tween 80 nas doses de 1, 2 e 3 g/kg(v.o). Três grupos foram tratados com CI (5TIO1-SB β CD) nas doses de 0,1, 0,5 e 1 mg/kg(i.p). Foram utilizados dois grupos tratados com solução de SB β CD a 20% (grupo ciclodextrina), e com tween 80 0,05% dissolvido em solução salina 0,9% (i.p).

Após o tratamento agudo, procedeu-se à coleta de sangue por rompimento do plexo retro-orbital com auxílio de capilar de vidro (ARRIAGA e RUMBERO, 1990). O sangue foi acondicionado em dois tipos de tubo, um com anticoagulante HB (Laborlab[®]) para determinação dos parâmetros hematológicos e o outro, sem anticoagulante, para obtenção do soro para avaliação dos parâmetros bioquímicos.

2.3. Determinação da Dose Letal 50% (DL50)

Para este teste, os animais foram submetidos ao tratamento com doses crescentes da molécula 5TIO1 (1, 2 e 3 g/kg), intraperitoneal e por via oral foi administrado a dose de 3 g/kg. O complexo de inclusão (CI) foi administrado por via intraperitoneal nas doses de 0,1, 0,5 e 1 mg/kg. Após os tratamentos, os animais foram observados por um período de 24 h. (ARRIAGA e RUMBERO, 1990; SILVA et al., 2005) A mortalidade para cada uma das doses foi anotada e, por regressão linear, o valor de DL50 (WAYNFORTH, 1980).

2.4. Avaliação dos efeitos farmacológicos gerais e determinação da toxicidade aguda (Screening Hipocrático)

Na avaliação dos efeitos comportamentais e determinação da toxicidade aguda (ALHABORI et al., 2002) do composto 5TIO1 e do CI (SB β CD-5TIO1), foram utilizados camundongos Swiss (25-30 g), machos, separados em grupos de 6 animais cada. O CI e o 5TIO1 foram administrados em doses crescentes (0,1, 0,5 e 1 mg/kg; 1, 2 e 3 g/kg (i.p) respectivamente). Os animais foram observados 0 min, 10 min, 15 min, 30 min, 60 min, 2 h, 3 h, 24 h (1º dia), 48 h (2º dia) e 72 h (3º dia) após a administração do CI e 5TIO1 diluído em Tween 80 a 0,05%. O tempo de observação, para cada grupo foi em torno de 30 s a 1 min.

Os parâmetros observados, relacionados às ações estimulantes, foram: coçar o focinho, convulsão crônica e tônica, exoftalmia, aumento da frequência respiratória, lambe patas, morder cauda, aumento da motilidade, movimentos estereotipados, piloereção, tremores finos e grosseiros. Os parâmetros considerados para avaliar a ação depressora foram: alienação do meio, analgesia (ausência de sensibilidade a dor quando a cauda do animal é comprimida por pressão manual), anestesia (ausência de sensibilidade a dor quando o animal tem seu pêlo puxado por suspensão), ataxia, diminuição da apreensão da pata, catatonía, dispnéia, exoftalmia, diminuição da frequência respiratória, diminuição da motilidade, diminuição do reflexo corneano, tônus dorsal e ptose palpebral, sedação. Ainda foram observados parâmetros como: agressividade, contorção, coloração da urina, diâmetro da pupila, presença de diarreia, ereção da cauda, fasciculações, grunhidos, aumento ou diminuição da micção, midríase, aspectos colorimétrico da orelha (cianótica, hiperemiada ou pálida), passividade, reação de fuga, sialorréia (salivação excessiva), tremor da cauda, lacrimejamento, sudorese, coma e morte.

2.5. Análise dos parâmetros bioquímicos e hematológicos

Para análise bioquímica, o material foi centrifugado a 3500 rpm durante 10 minutos e, em seguida, determinados os parâmetros glicose, uréia, creatinina, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) colesterol total, triglicerídeos, fosfatase alcalina (ALP), bilirrubinas total e direta, proteínas totais e ácido úrico. Os ensaios foram realizados em aparelho automático Labmax 240 com sistemas comerciais da LABTEST®.

Os valores para eritrócitos, leucócitos, plaquetas, hemoglobina, hematócrito e os índices hematimétricos volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) foram determinados imediatamente após a coleta através do analisador automático de células hematológicas Advia 120/hematology (Siemens). A contagem diferencial de leucócitos foi realizada em extensões coradas com *May-Grünwald-Giemsa*. Em cada ensaio, 100 células foram analisadas e contadas (AL-HABORI et al., 2002).

2.6. Análise Histológica

Os animais foram divididos em oito grupos. O primeiro grupo foi tratado com solução salina 0.9% (v.o., $n=6$, grupo controle). Os outros sete grupos foram tratados com 5TIO1 na dose de 1, 2 e 3 g/kg(v.o.), $n=6$; solução de SB β CD (i.p), e complexo de inclusão de 5TIO1-SB β CD nas doses de 0,1, 0,5 e 1,0 mg/kg (i.p), respectivamente. Após os tratamentos os grupos foram colocados em gaiolas para observação dos parâmetros de toxicidade.

Após o período de observação de 24 h, todos os grupos foram sacrificados por decapitação. Seus cérebros foram removidos e fixados em formalina a 10% por 72 h para a realização das análises histopatológicas. Cortes sagitais, feitos em intervalos de 1 mm, foram obtidos a partir de um corte inicial próximo aos corpos mamilares, submetidos a desidratação com posterior inclusão em parafina. Foram feitos cortes em micrótomo na espessura de 6 μ m, e após montar o material na lâmina, o mesmo foi submetido à coloração com em hematoxilina - eosina (HE), e analisadas com auxílio de um microscópio óptico. As áreas cerebrais foram observadas e classificadas de acordo com as descrições do Atlas de Paxinos & Watson (PAXINOS e WATSON, 1986). O grau de lesão foi expresso através de uma escala percentual de 0 (nenhum) a 100 (total) para cada hipocampo analisado de acordo com o método descrito anteriormente (AL-HABORI et al., 2002). A lesão cerebral foi definida pela presença de pelo menos 50% de alteração histopatológica em área analisada.

2.7. Análises Estatísticas

Os valores serão expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.). As diferenças entre os grupos serão determinadas através da Análise de Variância (ANOVA), seguida, quando detectada diferença, pelo teste t de Student-Newman-Keuls. O nível de significância para rejeição da hipótese de nulidade foi sempre de $p < 0.05$.

3. Resultados

3.1. Diagrama de solubilidade

De acordo com os resultados obtidos com as curvas do diagrama de solubilidade (Figura 1), pode-se observar que a solubilidade do 5TIO1 em água é de 3,19 $\mu\text{g/mL}$. Na presença da βCD , o incremento de solubilidade máximo proporcionado foi de 5,89 $\mu\text{g/mL}$, representando um incremento de 84,64% na concentração de 1,5% de βCD . Devido a solubilidade limitada da βCD , não foi possível avaliar a influência desta em concentrações superiores. Paralelamente, com a SB βCD foi possível avaliar concentrações maiores, sendo observado um incremento de solubilidade de 11,52 $\mu\text{g/mL}$, correspondendo a um incremento de 238,87% em água utilizando 20% de SB βCD .

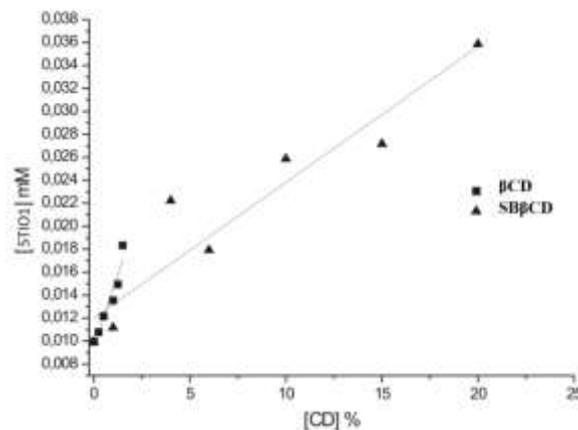


FIGURA 1. Curvas do diagrama de solubilidade do 5TIO1 sob a influência de concentrações crescentes de βCD e SB βCD em solução.

TABELA 1 - Inclinação, coeficiente de correlação (R^2) e constante de associação ($K_{1:1}$) obtidas a partir do diagrama de solubilidade.

CDs	Slope	$K_{1:1}$ (M^{-1})	R^2
βCD	0,005	505,85	0,9246
SB βCD	0,0012	120,94	0,9005

3.2.Determinação da Dose Letal 50% (DL₅₀)

Os resultados revelaram valores de DL₅₀ para 5TIO1 de 1240 mg/kg, pois as doses de 2 e 3 g/kg houve um perfil de mortalidade superior a 70% (Tabela 2). Os grupos tratados com 5TIO1-SBβCD (CI) nas doses de 0,1, 0,5 e 1 mg/kg, não produziram mortes entre os animais (Tabela 3).

TABELA 2 - Toxicidade aguda do 5TIO1 de acordo com a via de administração e o número de mortes a partir da administração intraperitoneal em doses crescentes da respectiva amostra.

Dose (g/kg)	Via de administração	Número de animais por grupo	Número de Mortes	% Mortalidade
1	i.p.	10	03	30%
2	i.p.	10	07	70%
3	i.p.	10	10	100%
3	v.o.	10	06	60%

TABELA 3 - Toxicidade aguda do complexo de inclusão 5TIO1-SBβCD de acordo com o número de mortes a partir da administração intraperitoneal em doses crescentes da respectiva amostra.

Dose (mg/kg)	Via de administração	Número de animais por grupo	Número de Mortes	% Mortalidade
0,1	i.p.	10	00	00
0,5	i.p.	10	00	00
1,0	i.p.	10	00	00

3.3.Avaliação dos efeitos farmacológicos gerais e determinação da toxicidade aguda (Screening Hipocrático)

Na análise do “*Screening Hipocrático*” durante e as primeiras 24 h da administração intraperitoneal de 5TIO1 (2 g/kg) foram observadas alterações nos parâmetros; estado de consciência e disposição, sistema motor e muscular, que revelaram-se diminuídos (Tabela 4).

Essas manifestações não foram alteradas durante as 24 h de observação. Quando comparado aos grupos controle e tratados com o complexo de inclusão nas doses de 0,1, 0,5 e

1 mg/kg, não apresentaram alterações significativas nos parâmetros avaliados, igual ao grupo controle, e grupo tratado com solução SB β CD (20% p/v), não mostrando perfil toxicológico. Também não se observaram diferenças significativas entre o grupo controle e animais tratados com 5TIO1-SB β CD, onde é possível constatar a ausência de toxicidade dos compostos (Tabela 5).

TABELA 4 - Parâmetros relativos ao “Screening Hipocrático”, após administração intraperitoneal de 5TIO1 em dose única.

Parâmetros Avaliados		Grupos	Tempo (h)							N	
			0	1/2	1	2	4	8	12		24
Estado de Consciência e Disposição	Atividade geral	Controle	4	4	4	4	4	4	4	4	6
		1000	3	3	3	4	4	4	4	4	6
		2000	3	3	3	3	3	4	4	4	6
		3000	3	2	3	2	2	2	2	2	6
Sistema Motor e Muscular	Resposta ao toque	Controle	4	4	4	4	4	4	4	4	6
		1000	3	3	3	4	4	4	4	4	6
		2000	3	3	3	3	3	4	4	4	6
		3000	2	2	3	2	1	1	2	2	6
	Reflexo de reorganização postural	Controle	4	4	4	4	4	4	4	4	6
		1000	3	3	3	4	4	4	4	4	6
		2000	3	1	1	1	1	3	3	3	6
		3000	1	1	1	2	2	2	2	2	6
	Tônus do corpo	Controle	4	4	4	4	4	4	4	4	6
		1000	3	3	3	4	4	4	4	4	6
		2000	2	2	3	3	3	4	4	4	6
		3000	2	2	2	2	2	3	3	3	6

“Score” numérico da tabela: **4**: normal; **3**: levemente reduzido; **2**: moderadamente reduzido; **1**: intensamente reduzido; **0**: ausente. N - Número de animais por grupo.

TABELA 5 - Parâmetros relativos ao “Screening Hipocrático”, após administração intraperitoneal de complexo de inclusão de 5TIO1-SB β CD em dose única.

Parâmetros Avaliados		Grupos	Tempo (h)							N	
			0	1/2	1	2	4	8	12		24
Estado de Consciência e Disposição	Atividade geral	Controle	4	4	4	4	4	4	4	4	6
		0,1	4	4	4	4	4	4	4	4	6
		0,5	4	4	4	4	4	4	4	4	6
		1,0	3	2	4	4	4	4	4	4	6
Sistema Motor e Muscular	Resposta ao toque	Controle	4	4	4	4	4	4	4	4	6
		0,1	4	4	4	4	4	4	4	4	6
		0,5	4	4	4	4	4	4	4	4	6
		1,0	4	4	4	4	4	4	4	4	6
	Reflexo de reorganização postural	Controle	4	4	4	4	4	4	4	4	6
		0,1	4	4	4	4	4	4	4	4	6
		0,5	4	4	4	4	4	4	4	4	6
		1,0	3	3	4	4	4	4	4	4	6
	Tônus do corpo	Controle	4	4	4	4	4	4	4	4	6
		0,1	4	4	4	4	4	4	4	4	6
		0,5	4	4	4	4	4	4	4	4	6
		1,0	3	3	4	4	4	4	4	4	6

“Score” numérico da tabela: **4**: normal; **3**: levemente reduzido; **2**: moderadamente reduzido; **1**: intensamente reduzido; **0**: ausente. **N** - Número de animais por grupo.

3.4. Análise dos parâmetros hematológicos e bioquímicos de camundongos tratados com 5TIO1 e CI (5TIO1-SB β CD)

Os resultados mostram que a administração intraperitoneal após 24 horas, do complexo de inclusão, não produziu efeitos tóxicos em camundongos *Swiss* adultos, uma vez que durante o tratamento, nenhum sinal clínico visível de toxicidade foi observado. A atividade geral dos camundongos não foi alterada, apresentando um bom estado geral. Os resultados mostram que o composto 5TIO1 nas doses de até 3 g/kg por via intraperitoneal ocasionaram morte em camundongos de ambos os sexos, por um período de observação de até 24 horas.

O tratamento agudo com o composto 5TIO1 em camundongos nas doses de 1, 2 e 3 g/kg (i.p), não induziu modificações no perfil bioquímico (Tabela 6). Os camundongos tratados com a dose de 1, 2 e 3 g/kg (i.p.), do composto 5TIO1 apresentaram a maioria dos parâmetros dentro da faixa de referência (VIJAYALAKSHMI et al, 2000). Exceto para o valor de glicose que aumentou de forma significativa em 33,5% na dose de 3 g/kg quando comparados ao grupo controle, respectivamente ($p < 0,05$), assim, como a ALT, AST e uréia, os quais reduziram, respectivamente, em 30,6, 48% e 14,5%, respectivamente, ($p < 0,05$), no grupo tratado com 5TIO1, para a maior dose, em relação ao grupo controle (Tabela 6).

TABELA 6 - Parâmetros bioquímicos obtidos do soro de camundongos *Swiss*, tratados com 5TIO1.

Parâmetros	Veículo * (n=10)	5TIO1 (1 g kg ⁻¹) (n=10)	5TIO1 (2 g kg ⁻¹) (n=10)	5TIO1 (3 g kg ⁻¹) (n=10)
Glicose (mg dL ⁻¹)	88,74 ± 8,10	91,71 ± 2,86	93,43 ± 2,94	101,6 ± 9,95 ^a
Uréia (mg dL ⁻¹)	54,67 ± 0,22	36,29 ± 4,98 ^a	29,71 ± 3,23 ^a	29,29 ± 3,77 ^a
Creatinina (mg dL ⁻¹)	0,36 ± 0,01	1,01 ± 0,13	0,91 ± 0,07	0,95 ± 0,05
Ácido úrico (mg dL ⁻¹)	2,61 ± 0,04	8,00 ± 0,81	4,14 ± 0,34	4,73 ± 0,38
Triglicerídeos (mg dL ⁻¹)	106,7 ± 0,05	126,4 ± 14,52	133,0 ± 13,96	129,3 ± 15,48
CT (mg dL ⁻¹)	86,07 ± 0,57	171,3 ± 11,26	177,3 ± 17,4	190,4 ± 28,27
AST (U mL ⁻¹)	91,40 ± 1,81	39,14 ± 3,44 ^a	37,29 ± 3,55 ^a	47,43 ± 3,54 ^a
ALT (U mL ⁻¹)	57,83 ± 0,81	20,57 ± 2,02 ^{a,b}	25,43 ± 2,35 ^{a,b}	40,14 ± 7,81 ^{a,b}
Bilirrubina total (mg dL ⁻¹)	0,16 ± 0,02	0,40 ± 0,05	0,18 ± 0,00	0,58 ± 0,02
Bilirrubina direta (mg dL ⁻¹)	0,12 ± 0,02	0,24 ± 0,06	0,10 ± 0,00	0,30 ± 0,02

*Tween 80 0,05% - Dissolvido em solução salina 0,9%

Parâmetros bioquímicos obtidos do soro de camundongos machos *Swiss*, com 5TIO1 nas doses 1 mg/kg, 2,0 mg/kg e 3,0 mg/kg durante 24 horas. Os valores representam a média \pm E.P.M. do número de animais usados nos experimentos. n – representa o número de animais em cada grupo. ^ap<0,05, quando comparado ao grupo controle. ^bp<0,05, quando comparado ao grupo tratado com 5TIO1 na dose de 3 g/kg (ANOVA e teste *t* de Student–Newman–Keuls como *post hoc teste*).

Com relação aos níveis séricos de glicose foi detectada um aumento significativo nos camundongos tratados com a maior dose (3 g/kg) do 5TIO1 (Tabela 6).

Os camundongos tratados com a dose de 0,1, 0,5 e 1 mg/kg (i.p.), do CI apresentaram a maioria dos parâmetros dentro da faixa de referência (VIJAYALAKSHMI et al, 2000). Exceto para o valor da uréia, que aumentou de forma significativa em 43%, na maior dose (1 mg/kg) quando comparados ao grupo controle (SB β CD) (p<0,05), entretanto na menor dose houve redução de aproximadamente 40%, em relação ao grupo de maior dose. Para triglicerídeos houve um aumento de até 400%, na maior dose quando comparados ao grupo controle (SB β CD) (20% p/v). Assim, como a ALT e AST e creatinina, os quais reduziram, respectivamente, em 73, 60 e 29% (p<0,05), no grupo tratado com complexo de inclusão na dose intermediária, em relação ao grupo controle. Também foi observado redução de 48% de bilirrubina total, para maior dose, quando comparada ao grupo controle (Tabela 7).

TABELA 7 - Parâmetros bioquímicos obtidos do soro de camundongos *Swiss*, tratados com complexo de inclusão (5TIO1-SB β CD).

Parâmetros	SB β CD (60 mg/kg) (n = 10)	5TIO1-SB β CD (1 mg/kg) (n=10)	5TIO1-SB β CD (0,5 mg/kg) (n=10)	5TIO1-SB β CD (0,1 mg/kg) (n=10)
Glicose (mg dL ⁻¹)	98,33 \pm 0,52	89,75 \pm 6,33	82,60 \pm 13,99	103,8 \pm 9,27
Uréia (mg dL ⁻¹)	20,83 \pm 1,036	29,80 \pm 1,28 ^a	25,60 \pm 2,97	17,67 \pm 4,41 ^b
Creatinina (mg dL ⁻¹)	1,007 \pm 0,01	0,78 \pm 0,09 ^a	0,71 \pm 0,08 ^a	0,72 \pm 0,09 ^a
Ácido úrico (mg dL ⁻¹)	2,56 \pm 0,03	2,69 \pm 0,0	2,84 \pm 0,51	3,69 \pm 0,0
Triglicerídeos (mg dL ⁻¹)	31,25 \pm 3,69	172,8 \pm 39,89 ^a	126,2 \pm 27,99 ^a	124,0 \pm 24,04 ^a
CT (mg dL ⁻¹)	ND*	216,0 \pm 11,24	202,0 \pm 32,40	191,6 \pm 16,7
AST (U mL ⁻¹)	115,0 \pm 10,7	46,67 \pm 6,88 ^a	30,60 \pm 2,15 ^a	38,20 \pm 7,17 ^a
ALT (U mL ⁻¹)	69,42 \pm 3,95	35,33 \pm 3,71 ^a	27,20 \pm 3,00 ^a	31,60 \pm 3,61 ^a

Bilirrubina total (mg dL⁻¹)	0,35 ± 0,03	0,17 ± 0,08 ^a	0,18 ± 0,0 ^a	0,17 ± 0,0 ^a
Bilirrubina direta (mg dL⁻¹)	0,1933 ± 0,03	0,14 ± 0,08	0,15 ± 0,0	0,12 ± 0,0

*ND – não determinado

Parâmetros bioquímicos obtidos do soro de camundongos machos *Swiss* tratados por via intraperitoneal com SBβCD 20% (Controle, $n = 10$) e com complexo 5TIO1 e SBβCD nas doses 1 mg/kg, 0,5 mg/kg e 0,1 mg/kg durante 24 horas. Os valores representam a média ± E.P.M. do número de animais usados nos experimentos. n – representa o número de animais em cada grupo. ^a $p < 0,05$, quando comparados ao grupo controle (SBβCD). ^b $p < 0,05$, quando comparados ao grupo tratado com CI na dose de 1,0 mg/kg. ^c $p < 0,05$, quando comparados ao grupo tratado com CI na dose de 0,5 mg/kg. (ANOVA e teste t de Student–Newman–Keuls como *post hoc teste*).

O aumento plasmático de ALT e AST é um indicador de lesão hepática e coração. No entanto, neste estudo, foi observado que esses níveis reduziram e estão de acordo com o padrão de referência (MITRUKA e RAMSLEY, 1977; ANTUNES NETO et al., 2008), indicando que o complexo de inclusão pode não ter causado nenhum efeito tóxico no fígado e tecidos cardíaco.

De maneira semelhante, observou-se que o tratamento intraperitoneal dos animais com 5TIO1 alterou significativamente o perfil hematológico, apenas quanto ao número de neutrófilos. Detectaou-se neutrofilia nas doses de 1 e 3 g/kg (Tabela 8). A contagem diferencial de linfócitos, eosinófilos e monócitos revelou pequenas flutuações, embora, dentro dos limites de referência e sem indicativo de importância clínica (HASAN et al., 2001; HARKNES e WAGNER, 1993).

TABELA 8 - Parâmetros hematológicos de camundongos *Swiss*, tratados com 5TIO1.

Parâmetros	Veículo (n=10)	5TIO1 (1 g/ kg) (n=10)	5TIO1 (2 g/ kg) (n=10)	5TIO1 (3 g/ kg) (n=10)
Hemácias (mm³)	8,64 ± 0,03	8,87 ± 0,15	8,90 ± 0,14	8,93 ± 0,21
Hemoglobina (g dL⁻¹)	14,37 ± 0,15	14,09 ± 0,51	14,79 ± 0,44	14,39 ± 0,30
Hematócrito (%)	44,15 ± 0,30	42,80 ± 1,33	44,01 ± 1,47	37,83 ± 5,72
VCM (fL)	51,09 ± 0,04	48,22 ± 1,77	49,55 ± 2,05	42,36 ± 2,54
HCM (pg)	16,64 ± 0,03	15,88 ± 0,50	16,61 ± 0,52	16,11 ± 0,77
CHCM (g dL⁻¹)	32,60 ± 0,14	32,92 ± 0,42	33,62 ± 0,29	38,02 ± 0,16
RDW (%)	13,67 ± 0,04	13,23 ± 0,30	13,07 ± 0,21	13,39 ± 0,13
Neutrófilos (%)	18,66 ± 0,04	52,95 ± 5,44 ^{ab}	39,29 ± 3,3 ^a	51,13 ± 7,00 ^a
Eosinófilos (%)	0,36 ± 0,02	0,29 ± 0,05	0,17 ± 0,03	0,52 ± 0,53

Linfócitos (%)	78,12 ± 0,31	2,152 ± 0,25	1,81 ± 0,12	1,51 ± 0,30
-----------------------	--------------	--------------	-------------	-------------

Parâmetros hematológicos obtidos de camundongos machos *Swiss*, tratados por via intraperitoneal com 5TIO1 nas doses 1 mg/kg, 2 mg/kg e 3 mg/kg em 24 horas. Os valores representam a média ± E.P.M. do número de animais usados nos experimentos. n – representa o número de animais em cada grupo. ^ap<0,05, quando comparados ao grupo controle. ^bp<0,05, quando comparado ao grupo tratado com mg/kg de 5TIO1 (ANOVA e teste *t* de Student–Newman–Keuls como *post hoc teste*).

A administração intraperitoneal do CI, não alterou de forma significativa, parâmetros hematológicos como hemoglobina e índices hemantimétricos. Entretanto houve redução de linfócitos em todas as doses do complexo de inclusão (Tabela 9).

TABELA 9 - Parâmetros hematológicos de camundongos *Swiss*, tratados com complexo de inclusão (5TIO1-SBβCD).

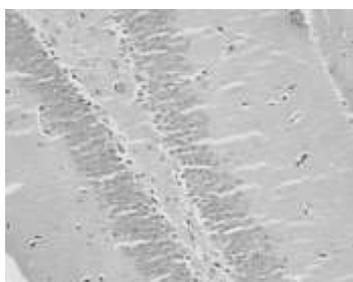
Parâmetros	SBβCD	5TIO1-SBβCD	5TIO1-SBβCD	5TIO1-SBβCD
	(60 mg/kg)	(1 mg/kg)	(0,5 mg/kg)	(0,1 mg/kg)
	(n=10)	(n=10)	(n=10)	(n=10)
Hemácias (mm³)	8,72 ± 0,06	8,82 ± 0,09	8,16 ± 0,22	8,71 ± 0,30
Hemoglobina (g dL⁻¹)	14,06 ± 0,08	13,58 ± 0,41 ^a	12,42 ± 0,65 ^a	13,12 ± 0,51 ^a
Hematócrito (%)	42,02 ± 0,04	41,97 ± 1,11	38,95 ± 1,74	40,47 ± 1,56
VCM (fL)	51,67 ± 0,89	48,00 ± 1,83	47,73 ± 1,89	46,50 ± 4,10
HCM (pg)	18,00 ± 0,56	15,39 ± 0,69	15,25 ± 0,55	15,10 ± 1,19
CHCM (g dL⁻¹)	33,40 ± 0,29	32,23 ± 0,29	32,00 ± 0,30	32,42 ± 0,39
RDW (%)	15,58 ± 0,75	14,47 ± 0,18	14,08 ± 0,4	13,95 ± 0,45
Neutrófilos (%)	6,72 ± 0,60	4,49 ± 0,68	4,98 ± 0,73	5,66 ± 1,09
Eosinófilos (%)	ND*	2,21 ± 0,38	2,46 ± 0,68	1,90 ± 0,98
Linfócitos (%)	87,08 ± 2,12	2,48 ± 0,31 ^a	2,65 ± 0,59 ^a	2,52 ± 0,47 ^a

*ND – Não determinado

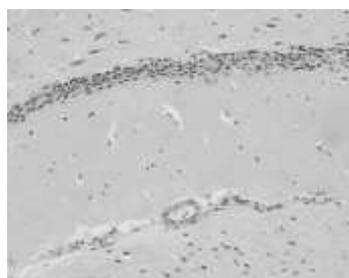
Parâmetros hematológicos obtidos de camundongos machos *Swiss*, tratados por via intraperitoneal com SBβCD 20% (Controle, n = 10) e com complexo 5TIO1 e SBβCD nas doses 1 mg/kg, 0,5 mg/kg e 0,1 mg/kg durante 24 horas. Os valores representam a média ± E.P.M. do número de animais usados nos experimentos. n – representa o número de animais em cada grupo ^ap<0,05, quando comparados ao grupo controle (SBβCD). ^bp<0,05, quando comparados ao grupo 1,0 mg/kg. ^cp<0,05, quando comparados ao grupo 0,5 mg/kg (ANOVA e teste *t* de Student–Newman–Keuls como *post hoc teste*).

3.5. Análise Histopatológica

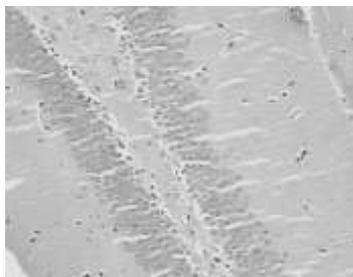
A Tabela 10 mostra uma alta percentagem de animais com lesão cerebral, 33, 50 e 66% nos grupos tratados com 5TIO1 nas doses de 1, 2 e 3 g/kg, em comparação ao grupo controle. Também foi detectada um aumento de 17 e 33% no grau de comprometimento do hipocampo nos grupos tratados com 5TIO1 nas doses de 2 e 3 g/kg, quando comparado ao grupo tratado com 1 g/kg. Nos grupos tratados com 5TIO1, o grupo que apresentou maior comprometimento hipocampal foi o grupo tratado com maior dose (3 g/kg) (Figura 2).



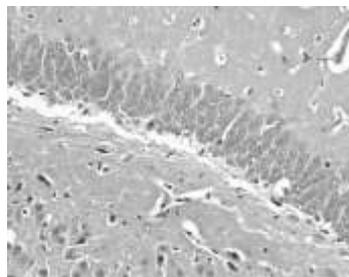
Grupo tratado com 5TIO1 1,0



Grupo tratado com 5TIO1 2,0



Grupo tratado com 5TIO1 3,0



Grupo controle

FIGURA 2. Hipocampo de camundongos adultos tratados com doses de 5TIO1.

No cérebro observamos lesões dos neurônios do hipocampo com evidente necrose, vacuolização e com múltiplos nucléolos demonstrando um processo de lesão em todas as doses, mas de forma mais acentuada na maior dose de 3 g kg⁻¹. A tabela 10 as alterações histopatológica de camundongo tratados oralmente com 5TIO1, demonstrando que o dano cerebral e a percentagem da severidade da lesão é dose dependente.

TABELA 10 - Análise histopatológica em hipocampo de camundongo tratados oralmente com 5TIO1.

Grupos	Alteração histopatológica no hipocampo			
	(%)Camundongos com lesão cerebral	(%) Severidade da lesão	Número de animais com dano cerebral	Número total de animais
Controle	00	00	00	06
1,0 g kg⁻¹	33	32,00 ± 0,32	02	06
2,0 g kg⁻¹	50	57,66 ± 0,33	03	06
3,0 g kg⁻¹	66	67,66 ± 0,33	04	06

A gravidade da lesão foi expressa como média ± EPM dos escores de dano com base em uma escala de zero (nenhum) a 100 percentuais (total) de envolvimento estrutural. Os animais foram tratados por via intraperitoneal. A lesão cerebral foi definida como presente se não houvesse pelo menos a participação de 50% do hipocampo. Resultados para ratos% com lesão cerebral e gravidade da lesão% são expressos em porcentagem do número de animais. p <0,05 comparado ao grupo controle (teste χ^2); ^Pb <0,05 comparado com o grupo 1,0 g/kg(teste χ^2); ^cp <0,05 comparado com o grupo 2,0 g/kg(teste χ^2); ^dp <0,05 comparado ao grupo 3,0 mg/kg (ANOVA e Student-Newman-Keuls); ^ep <0,05 comparado com o grupo 1,0 g/kg(ANOVA e teste de Student-Newman-Keuls); ^fp <0,05 comparado com o grupo 2,0 g/kg(ANOVA e teste de Student-Newman-Keuls);

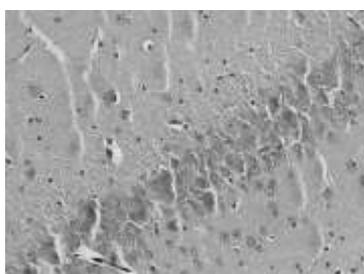
A Tabela 11 mostram que não houve lesão cerebral em nenhum dos animais tratados com ciclodextrina e com o CI (5TIO1-SB β CD) nas doses de 0,1, 0,5 e 1,0 mg/kg, em comparação ao grupo controle, e aos tratados com ciclodextrina.

TABELA 11 - Análise histopatológica em hipocampo de camundongo tratados por via intraperitoneal com 5TIO-SB β CD (CI).

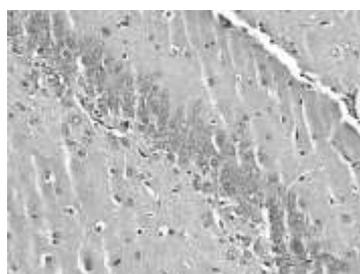
Grupos	Alteração histopatológica no hipocampo			
	(%)Camundongos com lesão cerebral	(%) Severidade da lesão	Número de animais com dano cerebral	Número total de animais
Controle	00	00	00	06
1,0 mg/kg	00	00	00	06
0,5 mg/kg	00	00	00	06
0,1 mg/kg	00	00	00	06

A gravidade da lesão foi expressa como média \pm EPM dos escores de dano com base em uma escala de zero (nenhum) a 100 percentuais (total) de envolvimento estrutural. Os animais foram tratados por via intraperitoneal. A lesão cerebral foi definida como presente se não houvesse pelo menos a participação de 50% do hipocampo. Resultados para ratos% com lesão cerebral e gravidade da lesão% são expressos em porcentagem do número de animais. Complexo de inclusão de 5TIO1-SB β CD (CI) nas doses de 0,1, 0,5 e 1,0 mg/kg. $p < 0,05$ comparado ao grupo controle (teste χ^2); $^b p < 0,05$ comparado com o grupo 1,0 mg/kg (teste χ^2); $^c p < 0,05$ comparado com o grupo 0,5 mg/kg (teste χ^2); $^d p < 0,05$ comparado ao grupo controle (ANOVA e Student-Newman-Keuls); $^e p < 0,05$ comparado com o grupo 1,0 mg/kg (ANOVA e teste de Student-Newman-Keuls); $^f p < 0,05$ comparado com o grupo 0,5 mg/kg (ANOVA e teste de Student-Newman-Keuls);

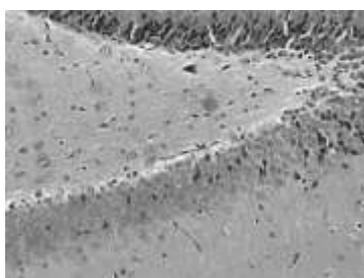
Também não foi detectado nenhum grau de comprometimento do hipocampo nos grupos tratados com o complexo de inclusão nas doses de 0,1, 0,5 e 1,0 mg/kg, quando comparado ao grupo tratado com SB β CD a 20%. Podemos sugerir a partir dos achados uma diminuição do grau e da alteração histopatológica e do número de animais com lesão após tratamento com 5TIO1-SB β CD nas doses de 0,1, 0,5 e 1,0 mg/kg (Figura 3).



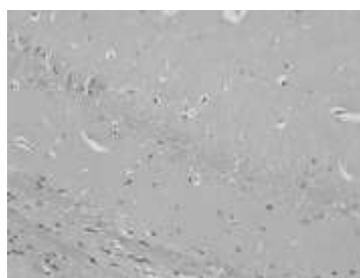
Grupo tratado com CI 0,1



Grupo tratado com CI 0,5



Grupo tratado com CI 1,0



Grupo tratado com SB β CD 20%

FIGURA 3. Hipocampo de camundongos adultos tratados com doses do complexo de inclusão (5TIO1-SB β CD).

4. Discussão

O acompanhamento da massa corporal do animal é importante indicador para a avaliação da toxicidade de uma substância (GRACA et al., 2007). No entanto, não foi possível em nossos experimentos detectar se 5TIO1 e o CI alteram o ganho de massa corporal dos camundongos, uma vez que os animais foram tratados de forma aguda e observados somente por 24 horas.

Em análise histológica de hipocampo de camundongos adultos tratados com 5TIO1 foi observado lesão cerebral em todas as doses, mas de forma significativa na maior dose (3 g kg^{-1}), na qual se observou necrose, vacuolização e lesão de neurônios. Podemos sugerir a partir dos achados um aumento da alteração histopatológica em função da dose do composto investigado, possivelmente por essa molécula aumentar o estresse oxidativo.

O estresse oxidativo cerebral pode ser produzido pelo desequilíbrio entre a produção de espécies reativas do oxigênio (EROS) e a atividade antioxidante neuronal (HARKNESS e WAGNER, 1993). Esse estresse oxidativo associado às lesões histopatológicas no hipocampo, provavelmente, ocorre por causa das mudanças neuroquímicas que comprometem a remoção das EROS (ALTERBUNG et al., 2000). O estresse oxidativo e as lesões cerebrais também podem estar associados a vários outros fatores, incluindo peroxidação lipídica e produção de nitrito (SMYTHE et al., 1971).

Os grupos tratados com complexo de inclusão, em todas as doses, não apresentaram lesões cerebrais nem perfil tóxico. No grupo tratado apenas com ciclodextrina, não foi observado lesões, corroborando com a literatura, na qual aponta que ciclodextrinas não desempenham papel farmacológico, além de diminuir o perfil tóxico de alguns fármacos (PESCITELLI et al., 2010; TSAI et al., 2010).

Embora de um modo geral o perfil bioquímico dos animais estivesse dentro dos valores de referência, houve exceções para a glicose, uréia, ALT e AST, na qual o primeiro parâmetro aumentou significativamente e os demais reduziram. Os dados da literatura para os valores de glicose são superiores aos encontrados (FOSTER et al., 1982; ALMEIDA et al., 2008). Sugerindo que a molécula pode interferir no perfil glicêmico, podendo à longo prazo, provocar diabetes mellito e doenças cardiovasculares.

Para o complexo de inclusão, houve aumento da uréia e triglicerídeos, entretanto houve redução de creatinina, ALT e AST. Um grande aumento de triglicerídeos nesse estudo pode indicar lesão celular no fígado com prejuízo da função hepática (KANEKO, 1997; WRINGTH e PLUMMER, 1974). Os valores de colesterol total não puderam ser determinados. A alteração significativa verificada nos níveis plasmáticos de uréia para todos os grupos tratados com 5TIO1, com redução nos níveis plasmáticos, na qual fornece indícios de uma melhora da função renal, sugerindo o seu uso no tratamento da insuficiência renal aguda ou, ainda, pode indicar uma diminuição do catabolismo protéico (ALMEIDA et al., 2008).

As análises das enzimas aminotransferase sérica (ALT) e da fosfatase alcalina são importantes indicadores de lesões nas células hepáticas (ANTUNES NETO et al., 2008). Uma substância não provoca lesão hepática sem interferir com a atividade normal dessas enzimas (VIJAYALAKSHMI et al, 2000). A diminuição nos níveis plasmáticos de AST observado neste estudo, além de ser estatisticamente significativa em relação ao grupo controle, foi maior que os níveis de referência para roedores (ANTUNES NETO et al., 2008). Estes dados não fornecem indícios de alterações na função hepática (WRINGTH e PLUMMER, 1974). Os níveis séricos de ALT também diminuíram, propondo que não promove alterações na permeabilidade ou dano nos hepatócitos. A AST tem uma isoenzima mitocondrial e não é liberada tão rapidamente quanto a ALT, que é essencialmente citoplasmática. Além disso, a ALT é um indicador mais sensível de hepatotoxicidade aguda do que a AST, uma vez que, a primeira é essencialmente hepática, a segunda também pode ser encontrada em concentrações elevadas em outros órgãos, como rins, pulmões e coração dificultando a interpretação dos resultados (AL-HABORI et al., 2002; WASAN et al., 2001).

Apesar da redução de creatinina, houve um aumento dos níveis séricos de uréia, ambos importantes marcadores da função renal. A uréia é o principal produto do metabolismo protéico, circula no sangue e é filtrada nos rins, a maior parte excretada na urina. Não é tão específica para avaliação da função renal como a creatinina. Mesmo a uréia não tendo a boa especificidade para diagnosticar mudanças da função renal geral, ela é mais sensível a alterações primárias das condições renais (HARKNES e WAGNER, 1993). A redução dos níveis de creatinina sugere que o complexo não provoque lesão renal, principalmente no mecanismo de filtração (ALTERBUG et al., 2000). Entretanto, diante disso, sugere-se que o complexo de inclusão gere estresse

oxidativo, alterando a taxa primária de filtração glomerular, apesar dos níveis plasmáticos de creatinina estarem dentro dos valores de referência.

Provavelmente o mecanismo de neutrofilia provocado pela molécula (5TIO1), está relacionado com o tráfico de neutrófilos semelhante a resposta inflamatória induzida por lipopolissacarídeo (LPS), na qual parece ser controlado pela interação de diversos mediadores endógenos, tais como leucotrienos, TNF- α , interleucina-1 e interleucina-8 (SMYTHE et al., 1971).

O CI em todas as doses provocou diminuição no número de linfócitos, que constituem a base do sistema imunitário, protegem o organismo da infecção viral, ajudam outras células a proteger o corpo de infecções bacterianas e fúngicas. Essa diminuição é caracterizada como linfocitopenia. Normalmente, os linfócitos constituem de 15 % a 40 % dos glóbulos brancos que se encontram no sangue. A quantidade de linfócitos pode diminuir durante um breve período por causa de um *stress* agudo e devido a tratamentos. A própria linfocitopenia pode ser assintomática e habitualmente detecta-se numa análise de sangue completa realizada para diagnosticar outras doenças (HAYES et al., 1980). Essa condição pode deixar o animal imunocomprometido, podendo adquirir infecções.

Podemos sugerir a partir dos achados um aumento da alteração histopatológica em função da dose do composto investigado. Podemos sugerir também, a partir dos resultados, que a complexação (fármaco-CD) diminui a toxicidade produzida pelo 5TIO1, bem como potencializou sua atividade farmacológica, demonstrando dessa maneira que sua complexação é uma poderosa ferramenta, de rápida e fácil obtenção, com aplicação direta, para o desenvolvimento de formas farmacêuticas seguras e eficazes. Diante do exposto, os efeitos toxicológicos do CI e 5TIO1 precisam ser investigados para o delineamento de um potencial fármaco com ação central.

Agradecimento

Os autores agradecem ao CNPq e FAPEPI pelo apoio financeiro.

Referências

AL-HABORI, M.; AL-AGHBARI, A.; AL-MAMARY, M.; BAKER, M. Toxicological evaluation of *Catha edulis* leaves: a long term feeding experiment in animals. **J. Ethnopharmacol.** v.83, p.209-217, 2002.

ALMEIDA, A.S.; FALEIROS, A.C.G.; TEIXEIRA, D.N.S.; COTA, U.A.; Chica, J.E.L. Valores de referência de parâmetros bioquímicos no sangue de duas linhagens de camundongos. **J. Bras. Patol. Med. Lab.** v. 44, n.6, p. 429-432, 2008.

ALTERBUNG, S.P.; PAIXÃO e SILVA S.; VENTURA, D.G.; GOMES, R.N.; BOZZA, P.T.; CASTRO-FARIA-NETO, H.C. A role for adrenoceptors in the regulation of pleural neutrophilia induced by LPS. **J. Neuroimmunology.** v. 111, p. 15–22, 2000.

ANTUNES NETO, J.M.F.; RIVERA, R.J.B.; CALVI, R.G.; RAFFA, M.F.; DONADON, C.C.; PEREIRA, A.G.; MELO, P.S. Níveis comparativos de estresse oxidativo em camundongos em duas situações do limite orgânico: *overreaching* induzido por treinamento de natação e câncer. **Rev. Bras. Med. Esporte.** v.14, n.6, p.548-552, 2008.

ARRIGA, E.J.; RUMBEROP, A. Naringin, hesperidin and neohesperidin content in juices from thirteen *Citrus* spp. **Fito.** v.51, p.31-60, 1990.

BONAMICI, D.; SERRA, C.H.R. Sistema de classificação Biofarmacêutica e Bioisencões. [Dissertação]. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo. 2009.

CHIN, C.M.; FERREIRA, E.I. O PROCESSO DE LATENCIAÇÃO NO PLANEJAMENTO DE FÁRMACOS. **Quím. Nova.** v.22,n.1, 1999.

SILVA, E.J.R.; AGUIAR, F.J.S.; GONÇALES, E.S.; SOUSA, I.M.V.; DIMECH, G.S.; FRAGA, M.C.C.A.; COELHO, M.C.O.C.; WANDERLEY, A.G.. Avaliação do tratamento subcrônico com o extrato hidroalcoólico de *Calendula officinalis* L. sobre os parâmetros bioquímicos e hematológicos em ratas Wistar. **Rev. bras. farmacogn.** v.15, n.2, p. 88-93, 2005.

FOSTER, H.L.; SMALL, J.D.; FOC, J.G. *The mouse in biomedical research.* New York, NY: Academic Press, 1982.

GRACA, C.; FREITAS, C.S.; BAQGGIO, C.H.; DALSENTAR, P.R.; MARQUES, M.C.A. Mikania laevigata syrup doesnot induce side effects on reproductive system of male Wistar rats. **J. Ethnopharmac.** v.11, p. 29–32, 2007.

HAYES, M.A.; BELLAMY, J.E.C.; SCHIEFER, H.B. Subacute Toxicity of Dietary T-2 Toxin in Mice: Morphological and Hematological Effects. **Can. J. comp. Med.** v.44, p. 203-218, 1980.

HARKNESS, S.E.; WAGNER, J.E. Biologia e clínica de coelhos roedores. São Paulo: Livraria Roca, 1993. 238p.

JULLIAN, C.; MORALES-MONTECINOS, J.; ZAPATA-TORRES, G.; AGUILERA, B.; RODRIGUEZ, J.; ARÁN, V.; OLEA-AZAR, C. Characterization, phase-solubility, and molecular modeling of inclusion complex of 5-nitroindazole derivative with cyclodextrins. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 9, n. 16, p. 5078–84, 2008.

KANEKO, J.J. Clinical biochemistry of domestic animals. San Diego: Academic Press, 1997. 293-294p.

LIMA, A.A.N.; SOARES SOBRINHO, J.L.; CORREA JUNIOR, R.A.C.; ROLIM NETO P.J. Technologies alternatives to improve solubility of poorly water soluble drugs. **Acta. Farm. Bonaerense.** v.27, p.789-797, 2008.

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.; ARAUJO, R.S.A.; NEVES, R.P. Synthesis and Evaluation of the Antifungal Activity of 2-(Substituted-Amino)-4,5-Dialkyl-Thiophene-3-Carbonitrile Derivatives. **Lat. Am. J. Pharm.** v. 30, n. 8, 2011.

MITRUKA, B.M.; RAMSLEY, H.M. Clinical biochemical and hematological reference values in normal experimental animals. New York: Masson Publishing, 1977. 96p.

OLIVEIRA, S.M.; SILVA, J.B.P. Estrutura, reatividade e propriedades biológicas de hidantoínas. **Quím. Nova.** 2008; 31, n.3, 614-622.

OLIVEIRA, T.B.; LIMA, M.C.A. Síntese, elucidação estrutural e avaliação biológica de novos derivados tiazolidínicos e cicloalquil-tiofênicos. [Dissertação] Recife: Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, 2010.

PAXINOS, G.; WATSON, C. The brain in stereotaxic coordinates. Academic Press, New York, 1986.

PESCITELLI, G.; BILI, A.R.; BERGONZI, M.C.; VINCIERI, F.F.; DI BARI, L. Cyclodextrins as carriers for kavalactones in aqueous media: Spectroscopic characterization of (S)-7,8-dihydrokavain and β -cyclodextrin inclusion complex. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, p. 479–483, 2010.

PIMENTEL, L.F.; JACOME JUNIOR, A.T.; MOSQUEIRA, V.C.F.; SANTOS-MAGALHAES, N.S. Nanotecnologia farmacêutica aplicada ao tratamento da malária. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, v. 4, n. 43, p. 503-514, 2007.

SMYTHE, P.M.; BRERETON, G.G.; STILES, H.J.; GRACE, A.; MAFOYANE, M.; SCHONLAND, H.M.; COOVADIA, W.E.K.; LOENIG, M.A.; PARENT, G. H. Thymolymphatic deficiency and depression of cell-mediated immunity in protein-calorie malnutrition. **Lancet. ii.** p.939-944, 1971.

SOARES SOBRINHO, J.L.; SOARES, M.F.L.R.; ALVES, L.D.S.; LABANDEIRA, J.J.T.; ROLIM NETO, P.J. Improving the solubility of the antichagasic drug benznidazole through formation of inclusion complex. **Quím. Nova.** v. 102, p. 323-329, 2011.

TSAI, Y.; TSAI, H.; WU, C.; TSAI, F. Preparation, characterisation and activity of the inclusion complex of paeonol with β -cyclodextrin. **Food. Chem.**, p. 837–841, 2010.

VIJAYALAKSDMI, T.; MUTHULAKSHMI, V.; SACHDANANDAM, P. Toxic studies on biochemical parameters carried out in rats with serankottai nei, a siddha drug-milk extract of *Semecarpus anacardium* nut. **J. Ethnopharmacol.** v.69, p.9-15, 2000.

WASAN, K.M.; NAJAFI, S.; WONG, J.; KWONG, M. Assessing plasma lipid levels, body weight, and hepatic and renal toxicity following chronic oral administration of a water soluble phytosterol compound FM VP4, to gerbils. **J. Pharm. Sci.** v.4, n.3, p. 228- 234, 2001.

WRINGHT, P.J.; PLUMMER, D.T. The use of urinary enzyme measurement of direct renal damage caused by nephrotoxic compound. **Biochem. Pharm.** v. 23, p.65-73, 1974.

7. CONCLUSÃO

- O 5TIO1 possui baixa solubilidade aquosa, que pode ser um entrave para uma futura forma farmacêutica. Neste panorama foi complexado com sulfobutil- β -ciclodextrina (5TIO1-SB β CD) proporcionando uma maior solubilidade á molécula tiofênica.
- Os resultados revelaram valores de DL₅₀ para 5TIO1 é de 1240 mg/kg, pois as doses de 2 e 3 g/kg houve um perfil de mortalidade superior a 70%. Os grupos tratados com 5TIO1-SB β CD (CI) nas doses de 0,1, 0,5 e 1 mg/kg, não produziram mortes entre os animais.
- Na análise do “*Screening Hipocrático*” durante e as primeiras 24 h da administração intraperitoneal de 5TIO1 foram observadas alterações nos parâmetros estado de consciência e disposição, sistema motor e muscular, que revelaram-se diminuídos. Essas manifestações não foram alteradas durante 24 h de observação. Quando comparado aos grupos tratados com o complexo de inclusão. Não mostrando perfil toxicológico.
- Em estudos histopatológicos de hipocampo de camundongos, observou-se que quando administrado apenas 5TIO1 (v.o.) provocou lesões e danos cerebrais. Quando administrado CI (i.p.) os animais não apresentam lesões em lâminas histológica.
- Em análise do perfil bioquímico e hematológico de camundongos, observou-se que tanto o 5TIO1 quando o CI não promovem comprometimento hepático, devido à diminuição de ALT e AST, e a redução de creatinina por parte do CI e uréia por parte do 5TIO1 mostram que não são tóxicos sobre o sistema renal.
- Em estudos comportamentais observou-se que a molécula 5TIO1 possui atividade ansiolítica e sedativa.
- Quando complexada com sulfobutil- β -ciclodextrina, a atividade sobre o sistema nervoso central foram potencializados, comprovando que o CI incrementa a solubulidade e possivelmente aumentará a biodisponibilidade do 5TIO1.

8. PERSPECTIVAS

- Realizar estudos complementares da estabilidade da molécula e seu complexo de inclusão, com finalidade de entender possíveis interações.
- Aprofundar os ensaios neurofarmacológicos, com doseamento de enzimas e substâncias cerebrais, para determinar se a molécula tiofênica e seu complexo podem provocar estresse oxidativo ou se promovem efeito neuroprotetor.
- Realizar ensaios comportamentais, com associação de drogas a fim de se determinar o mecanismo de ação da molécula com o neurorreceptor específico.
- Realizar ensaios genotóxicos, com finalidade de progredir para ensaios clínicos, com finalidade de entender a interação da molécula tiofênica com o DNA, com intuito de diminuir possíveis efeitos colaterais. Devem ser investigados a presença de micronúcleo, aberrações cromossômicas e mutações.
- Realizar estudo e análise computacional de 5TIO1 e seu complexo de inclusão.
- Desenvolvimento de forma farmacêutica a base de 5TIO1 e CI (5TIO1-SBCD).
- Entrar com pedido de patente para várias atividades.
- Investigar os efeitos vasculares de 5TIO1 e seu complexo de inclusão.
- Realizar microscopia eletrônica para analisar mitocôndrias e retículo endoplasmático rugoso de hepatócitos, a fim de se investigar o aumento de triglicerídeos.
- Realizar estudo de complexos de inclusão com outras ciclodextrinas.
- realizar ensaios de dissolução com desenvolvimento e validação do método.

REFERÊNCIAS

ANDREOLI, S.B.; ALMEIDA FILHO, N.; COUTINHO, E.S.F.; MARI, J.J. Identificação de casos psiquiátricos em estudos epidemiológicos multifásicos: métodos, problemas e aplicabilidade. **Rev. Sau. Pub.**, v. 5, n. 34, p. 475-483, 2000.

CHUNG, M.C.; FERREIRA, E.I. O processo de latenciação do planejamento de fármacos. **Quím. Nova.**, v. 1, n. 22, p. 75-84, 1999.

JULLIAN, C.; MORALES-MONTECINOS, J.; ZAPATA-TORRES, G.; AGUILERA, B.; RODRIGUEZ, J.; ARÁN, V.; OLEA-AZAR, C. Characterization, phase-solubility, and molecular modeling of inclusion complex of 5-nitroindazole derivative with cyclodextrins. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 9, n. 16, p. 5078–84, 2008.

LOPES, C.M.; LOBO, J.M.S.; COSTA, P. Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, v. 2, n. 41, p. 143-154, 2005.

MITTE, K. A meta-analysis of the efficacy of psycho- and pharmacotherapy in panic disorder with and without agoraphobia. **J. Affect. Disord.**, v. 1, n. 88, p. 27-45, 2005.

OLIVEIRA, S.M.; SILVA, J.B.P. Estrutura, reatividade e propriedades biológicas de hidantoínas. **Quím. Nova.**, v. 31, n.3, p. 614-622, 2008.

OLIVEIRA, T.B.; LIMA, M.C.A. **Síntese, elucidação estrutural e avaliação biológica de novos derivados tiazolidínicos e cicloalquil-tiofênicos**. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, 121 p. 2010.

PAUWES, R. Aspects of successful drug discovery and development. **Antiviral. Res.**, v. 7, p. 77–89, 2007.

PhRMA. Research and Development continue to grow, 2009. Acessado em: 07/09/2001, às 12:01 horário de Brasília. Disponível em: <http://www.phrma.org/about/key-industry-facts-about-phrma>.

PESCITELLI, G.; BILI, A.R.; BERGONZI, M.C.; VINCIERI, F.F.; DI BARI, L. Cyclodextrins as carriers for kavalactones in aqueous media: Spectroscopic characterization of (S)-7,8-dihydrokavain and β -cyclodextrin inclusion complex. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, p. 479–483, 2010.

PEZZINI, B.R.; SILVA, M.A.S.; FERRAZ, H.G. Formas farmacêuticas sólidas orais de liberação prolongada: sistemas monolíticos e multiparticulados. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, v. 4, n. 43, p. 491-502, 2007.

PRETIS, R.A.; LIS, Y.; WALKER, S.R. Pharmaceutical innovation by the seven UK-owned pharmaceutical companies (1964-1985). **Br. J. Clin. Pharmacol.**, v. 25, p. 387-396, 1988.

PIMENTEL, L.F.; JACOME JUNIOR, A.T.; MOSQUEIRA, V.C.F.; SANTOS-MAGALHAES, N.S. Nanotecnologia farmacêutica aplicada ao tratamento da malária. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, v. 4, n. 43, p. 503-514, 2007.

RABBANI, M.; SAJJADI, S.E.; MOHAMMADI, A. Evaluation of the anxiolytic effect of *Nepeta persica* Boiss in mice. **Adv. Access. Public.**, n. 5, p. 181-186, 2007.

SOARES SOBRINHO, J.L.; SOARES, M.F.L.R.; ALVES, L.D.S.; LABANDEIRA, J.J.T.; ROLIM NETO, P.J. Improving the solubility of the antichagasic drug benznidazole through formation of inclusion complex. **Quím. Nova.**, v. 102, p. 323-329, 2011.

STEFANI, H. A. Introdução à Química dos Compostos Heterocíclicos. 1 ed. Guanabara Koogan, 2009, 286p.

TSAI, Y.; TSAI, H.; WU, C.; TSAI, F. Preparation, characterisation and activity of the inclusion complex of paeonol with β -cyclodextrin. **Food. Chem.**, p. 837–841, 2010.

WERMUTH, C. Selective optimization of side activities: another way for drug discovery. **J. Med. Chem.**, v. 6, n. 47, p. 1303-1314, 2004.

VAN DER ZWAAL, E.M.; LUIJENDIJK, M.C.M.; EVERS, S.S.; LA FLEUR, S.E.; ADAN, R.A.H. Olanzapine affects locomotor activity and meal size in male rats. **Pharm. Biochem. Behav.**, n. 97, p. 130-137, 2010.

APÊNDICE A - AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA DE NOVO COMPOSTO E SEU COMPLEXO DE INCLUSÃO COM SB β CD: AÇÃO CENTRAL

Eliamara B. Sabino*¹; Geane F. Sousa¹; Francisco J.B. Mendonça Junior²; Rivelilson M. Freitas^{1*}; Dayane A. Costa¹; Lina Clara G.A.I. Moreno¹; José L. Soares-Sobrinho¹

¹Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas/UFPI. *eliamarabs@hotmail.com.

²Laboratório de Síntese e Vetorização de Moléculas, Universidade Estadual da Paraíba.

A introdução de novos fármacos na terapêutica é de forma geral necessária para o aperfeiçoamento do tratamento mais seguro e eficaz. A molécula 5TIO1, com ação anti fúngica, é sintética e deriva do núcleo tiofeno, de baixa solubilidade. Dessa forma pode ser necessária a utilização formas de vetorização da molécula para potencializar sua eficácia e segurança. O objetivo geral do trabalho é promover a solubilização de fármaco através de complexação com ciclodextrina, bem como avaliar a ação central do composto. A molécula foi complexada com sulfobutil β -ciclodextrina (SB β CD), o complexo de inclusão (CI) 5TIO1- SB β CD foi obtido utilizando solução de ciclodextrina a 20%, sob agitação por 72 horas e posterior filtração e quantificação em espectrômetro uv-vis, $\lambda=301\text{nm}$. Os animais foram divididos em oito grupos (n= 10/grupo) e tratados durante 24 horas (i.p), com complexo de inclusão 5TIO1 e SB β CD nas doses de 0,1, 0,5 e 1 mg/kg. O composto 5TIO1 foi administrado (i.p) nas doses de 1, 2 e 3 g kg⁻¹. Os controles foram tratados com Tween 80 0,05% dissolvido em solução salina 0,9%. A toxicidade aguda foi avaliada com *Screening Hipocrático*, determinação da DL₅₀, e análise de parâmetros bioquímicos e hematológicos em camundongos *Swiss* adultos. Em estudos hipocráticos e de DL₅₀, observou-se que o composto 5TIO1 nas doses 2 e 3 g/kg(i.p) apresentaram alteração nos parâmetros avaliados com perfil de toxicidade, houve um índice de mortalidade de 70 e 100%, respectivamente. Os grupos tratados com CI nas doses de 0,1, 0,5 e 1 mg/kg (i.p), não apresentaram mortes. Baseados nos resultados obtidos a partir dos estudos hematológicos e bioquímicos do sangue dos camundongos adultos, a administração aguda do complexo de inclusão não produziu efeitos tóxicos sobre a maioria destes parâmetros. Com relação aos parâmetros estudados o composto 5TIO1, apresentou aumento da ALT, glicose e uréia. Dessa forma, os efeitos toxicológicos do complexo de inclusão e 5TIO1 precisam ser investigados para o delineamento de um potencial fármaco com ação central.

APÊNDICE B - AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA CEREBRAL DE NOVO COMPOSTO E COMPLEXO DE INCLUSÃO FÁRMACO-CICLODEXTRINA

Eliamara B. Sabino*¹; Dayane A. Costa¹; Lina Clara G.A.I. Moreno¹; Geane F. Sousa¹; Francisco J.B. Mendonça Junior²; Adriana da R. Tomé³; Rivelilson M. Freitas^{1,*}; José L. Soares-Sobrinho¹

¹Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas/UFPI. *eliamarabs@hotmail.com. ²Laboratório de Síntese e Vetorização de Moléculas, Universidade Estadual da Paraíba. ³Universidade Estadual do Ceará.

A solubilização de fármacos ainda representa um desafio para o delineamento de um novo composto. A molécula 5TIO1, com ação anti fúngica, é sintética e deriva do núcleo tiofeno, apresenta baixa solubilidade, dessa forma faz-se necessária a obtenção de nanocompostos para aumentar sua biodisponibilidade e otimizar sua vetorização. O presente estudo avaliou as lesões cerebrais e determinou a toxicidade do complexo de inclusão (CI) e do 5TIO1. A molécula foi complexada com sulfobutil β -ciclodextrina (SB β CD), o CI (5TIO1- SB β CD) foi obtido utilizando solução de SB β CD a 20%, sob agitação por 72 h e posterior filtração e quantificação em espectrômetro UV-VIS, $\lambda=301\text{nm}$. Foi realizado análise histopatológica, no hipocampo de camundongos *Swiss* adultos. Os animais foram divididos em oito grupos ($n= 10/\text{grupo}$) e tratados durante 24 horas (i.p), com CI nas doses de 0,1, 0,5 e 1mg/kg. O composto 5TIO1 foi administrado (i.p) nas doses de 1, 2 e 3 g kg⁻¹. Os controles foram tratados com Tween 80 0,05% dissolvido em solução salina 0,9%. Os resultados apresentaram alta percentagem de animais com lesão cerebral de 33, 50 e 66% nos grupos 1, 2 e 3 g kg⁻¹, quando tratados com 5TIO1, em comparação ao grupo controle. No cérebro observamos lesões dos neurônios do hipocampo com evidente necrose demonstrando um processo de danos da célula em todas as doses, mas de forma mais acentuada na maior dose de 3 g/kgdo 5TIO1. Analisando a área cerebral nos animais tratados com CI nas doses de 0,1, 0,5 e 1 mg/kg, não houve lesão cerebral em nenhum grupo, em comparação ao grupo controle, ao grupo tratado com 5TIO1, e ao grupo tratado com ciclodextrina. Podemos sugerir a partir dos resultados, uma diminuição do grau e da alteração histopatológica e do número de animais com lesão após tratamento com as várias doses do CI, dessa forma a hipótese de que a vetorização diminui a toxicidade produzida pelo 5TIO1, bem como melhorou sua atividade farmacológica.

APÊNDICE C - MUTAGENIC EVALUATION OF A NEW DRUG-CYCLODEXTRIN COMPOUND WITH ANTIFUNGAL ACTION BY *Allium Cepa* SYSTEM

Gomes Junior AL*³, Sabino E.B¹, Carvalho SCS³, Neto M.P.L¹, Mendonça Junior F.J.B², Freitas R.M¹, Soares-Sobrinho J.L¹ and Cavalcante A.M.C.M¹

¹Nucleus of pharmaceutical technology, graduate program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Piauí - UFPI, Teresina-PI.

²Synthesis Laboratory of Molecular and Vectorization, State University of Paraíba.

³Faculty Novafapi, Teresina-PI.

*email: junior-gonzaga01@hotmail.com

The solubilization of drugs still represents a challenge to the design of a new compound. The 5TIO1 molecule, with antifungal action, is synthetic and derived from the thiophene nucleus. It presents low solubility, making it necessary to obtain nanocomposites to increase its bioavailability and to enhance its vectorization by obtaining inclusion complexes of drug-cyclodextrin. The mutagenic effects should be studied so that the safety, dosage and effective treatment can be defined. These studies take part in the triage of new drugs. The present study evaluated the cytotoxicity and mutagenicity of the inclusion complex (IC). The molecule was complexed with β -cyclodextrin sulfobutyl (SB β CD). The IC (5TIO1-SB β CD) was obtained using 20% of SB β CD solution by 72 hours stirring and subsequent filtration and quantification in UV-VIS spectrometer, $\lambda = 301\text{nm}$. Two bulbs of *Allium cepa* were exposed to each treatment and after 48 hours the roots were measured, fixed in carnoi, subjected to acid hydrolysis and schiff reactive, and stained with 2% acetic carmine. Two million cells per treatment were observed with mitotic index and chromosomal aberrations. It was used for analysis and processing of results, the Dunnett test for multiple comparisons. The mutagenicity was assessed according to the concentration of IC at doses of 0.1 mg / kg, 0.5 mg / kg and 1 mg / kg. The drug inhibits cell division in dose-dependent with cytotoxicity $p < 0.05$ and $p < 0.01$. However, no mutagenicity was observed by the frequency of chromosomal aberrations and micronuclei in a concentration of 0.1 mg / kg. At higher concentrations due to cytotoxicity was not observed mutagenicity at all. The data recommends the completion of new genotoxicity tests in mammals, aiming the therapeutic use of the drug without risk of DNA damage.

Key-words: *Allium cepa*, cyclodextrin, inclusion complex

APÊNDICE D - ANXIOLYTIC-LIKE EFFECTS OF THE 5TIO1 IN MICE: OPEN FIELD AND ELEVATED PLUS MAZE TESTS

1Sabino, E.B., 1Campelo, L.M.L., 1Costa, J.P., 1Freitas, R.M., 1Soares-Sobrinho, J.L., 2Mendonça Júnior, F.J.B.

1Pharmaceutical Technology Center, UFPI, Teresina, Piauí.

2 State University of Paraíba, João Pessoa, Paraíba.

Aim: The introduction of new drugs in therapy is needed to improve the treatment of existing disease to implement effective and safer treatments. The synthetic molecule 2-[(2,6-dichlorobenzylidene) amino]-5,6-dihydro-4H-cyclopenta[b]thiopheno-3-carbonitrile (5TIO1) is derived from thiophene nucleus and low solubility. This study evaluated the anxiolytic activity of molecule 5TIO1 in adult mice in tests of open field and elevated plus maze. **Methods:** Plus maze and open field tests were performed in adult Swiss mice (2 months; 25-30 g) the animals were divided into five groups (n=10) and treated with compound 5TIO1 at doses of 1, 2 and 3 mg/kg. Controls were treated with 0.05% Tween 80 dissolved in 0.9% saline. The positive control was treated with DZP (ip) 0.75 mg/kg. Differences between groups were determined by analysis of variance (ANOVA) followed, when no differences by *t* Student-Newman-Keuls as post hoc test. The significance level was considered when $p < 0.05$. **Results:** The locomotor activity in the first trial was used as an index of sedative/excitatory effect, whereas the activity in the second trial was used as index of habituation, a model of non-associative memory. The results of open field to evaluate locomotor activity, show that all doses of 5TIO1 showed significant reduction in the number of crossings and rearings in the control group and higher than the group treated with diazepam did not alter the locomotor activity of animal. However there was an increased frequency of groomings in relation to DZP and significant increase in the treated group 3g/kg relative to vehicle. Diazepam was used as reference in all tests always showed anxiolytic activity, since the time spent in the maze plus was significantly higher at the open show mutual reduction of locomotor activity. In the maze test plus the time spent in open arms and number of entries in open arm are similar to the control group, at all doses. All doses showed significant difference in the group treated with DZP. **Conclusion:** These tests are classical models for screening Central Nervous System actions providing information about psychomotor performance, anxiety and locomotor activity to be investigated. It is well known that benzodiazepines act as anxiolytics effect at higher doses. These results demonstrate that the isolated molecule did not alter the locomotor activity and showed no anxiolytic

activity. 5TIO1 probably not act on receptors benzodiazepines. Thus, the effects of anxiolytic and locomotor 5TIO1 need to be investigated for the design of a potential drug with central action. **Support:** CNPq and FAPEPI for financial support.

ANEXO A – CONFIRMAÇÃO DE SUBMISSÃO À REVISTA LIFE SCIENCE

FW: Submission Confirmation Voltar para mensagens |  

Para ver mensagens relacionadas a esta, [agrupar mensagens por conversa](#).

 **Rivelilson Freitas** [Adicionar a contatos](#) 18:06 
Para Eliamara Mestrado, Jose Lamartine UFPI Responder 

> From: lifesci@elsevier.com
> To: rivmendes@bol.com.br
> Date: Tue, 19 Jul 2011 16:04:07 +0100
> Subject: Submission Confirmation
>
> Dear Mr Freitas,
>
> Your submission entitled "Sedative-like and anxiolytic-like effects of 2 amino thiophene derivate in mice" has been received by Life Sciences
>
> You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Elsevier Editorial Systems as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/lfs/>.
>
> Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.
>
> Thank you for submitting your work to this journal.
>
> Kind regards,
>
> Life Sciences
>

ANEXO B – CONFIRMAÇÃO DE SUBMISSÃO À REVISTA BRASILEIRA DE TOXICOLOGIA

RES: Aceite do Artigo

[Voltar para mensagens](#) |  

Secretaria_SBTIX [Adicionar a contatos](#)
Para 'Eliamara Barroso Sabino'

04/08/2011
[Responder](#)

Prezada Eliamara,

Acusamos o recebimento de seu manuscrito intitulado: **AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA E HISTOPATOLÓGICA DE NOVO COMPOSTO TIOFÊNICO COM POTENCIAL TERAPÊUTICO**, artigo n. 02/2011. Informamos que o artigo se encontra em revisão e após parecer dos relatores, entraremos em contato.

Solicitamos que sempre que entrar em contato conosco, mencione o número do Registro de manuscrito.

Sentimo-nos gratos por ter submetido o seu artigo para apreciação de nossa revista.

Atenciosamente,

Nancy Yuri Kawakosi de Amo
Secretária
Revista Brasileira de Toxicologia
Sociedade Brasileira de Toxicologia-SBTIX
Av. Prof. Lineu Prestes, 580 - BI 13B - Cidade Universitária
05508-000 - São Paulo - SP - Brasil

ANEXO C – DECLARAÇÃO DE DEPÓSITO DA PATENTE “DERIVADOS 2-[(BENZILIDENO) AMINO]-5,6-DIIDRO-4H-CICLOPENTA [b] TIOFENO-3-CARBONITRILA CLORO SUBSTITUÍDOS E SEUS SAIS FARMACOLOGICAMENTE ACEITÁVEIS, DESTINADOS A SAÚDE HUMANA E/OU ANIMAL”


MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
NÚCLEO DE INOVAÇÃO E TRANSFERÊNCIA DE TECNOLOGIA
Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Setor de Convivência L09 e L10
Bairro Ininga CEP: 64049-550 - Teresina-PI Fone/Fax (86)3237-1638

DECLARAÇÃO

Requerente: Eliamara Barros Sabino, CPF: 025.437.263-57
Vínculo: Aluna do Programa de Mestrado em Ciências Farmacêuticas da UFPI.
Título do Projeto: Derivados 2-[(benzilideno)amino]-5,6-diidro-4H-ciclopenta(b)tiofeno-3-carbonitrila cloro substituídos e seus sais farmacologicamente aceitáveis, destinados a saúde humana e/ou animal.
Data de Entrada no NINTEC: 22/Jul/2011

O Núcleo de Inovação e Transferência de Tecnologia – NINTEC -, órgão à Universidade Federal do Piauí, através deste instrumento, declara para as finalidades de direito, a pedido do interessado, que se encontra em nosso poder solicitação para registro de PATENTE de autoria do(a) Requerente supra nominado(a) e seu respectivo título, também cima descrito, o(a) qual está em fase de análise dos requisitos necessários à sua formalização junto ao INPI – Instituto Nacional de Propriedade Industrial.

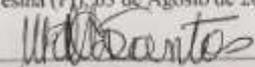
Informamos ainda que para a consecução da postulação pretendida, o objeto deste pleito deve, necessariamente atender às seguintes fases:

- a) pré-análise à patenteabilidade da criação;
- b) busca de anterioridade para verificação do estado da técnica;
- c) envio do resultado da busca de anterioridade, juntamente com cópias de pedido já requerido no Brasil e em outros países, bem como orientações para a redação do pedido de patente (AN 127/1997 – INPI);
- d) solicitação de pagamento das taxas de depósito e abertura de processo no Protocolo Geral para depósito de pedido;
- e) apreciação e assinatura da Reitoria da UFPI;
- f) encaminhamento da documentação ao INPI para depósito.

Salientamos ainda que, para cada fase acima descrita, é necessário tempo hábil para as respostas, a fim de cumprir com fidelidade e segurança a pretensão perquerida.

Por ser verdade, firmo a presente.

Teresina (PI), 03 de Agosto de 2011.



Prof.ª Dr.ª Maria Rita de Moraes Chaves Santos
Coordenadora do Núcleo de Inovação e Transferência de Tecnologia da UFPI