



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

João Thiers Mendonça Santos

**Estudo da Interação de Fármacos em Sistemas Micelares
Formados por Tween 80 por Espalhamento de Raios X a Baixo
Ângulo**

**Study of Drug Interaction in Tween 80 Formed Micellar Systems
Through Small Angle X-Ray Scattering**





**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

João Thiers Mendonça Santos

**Estudo da Interação de Fármacos em Sistemas Micelares
Formados por Tween 80 por Espalhamento de Raios X a Baixo
Ângulo**

Exame de dissertação de mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Química, da Universidade Federal de Sergipe, para a obtenção do título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Victor Hugo Vitorino Sarmiento



**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

S237e Santos, João Thiers Mendonça
Estudo da interação de fármacos em sistemas micelares formados por tween 80 por espalhamento de raios X a baixo ângulo / João Thiers Mendonça Santos ; orientador Victor Hugo Vitorino Sarmento. – São Cristóvão, 2017.
83 f. : il.

Dissertação (mestrado em Química) – Universidade Federal de Sergipe, 2017.

1. Química. 2. Micelas. 3. Raio X – Espalhamento e baixo ângulo. I. Sarmento, Victor Hugo Vitorino, orient. II. Título.

CDU: 54



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**Study of Drug Interaction in Tween 80 Formed Micellar Systems
by Small Angle X-Ray Scattering**

*Master dissertation presented to the
Graduate Programm in Chemistry of
the Federal University of Sergipe to
obtain MSc. in Chemistry.*





SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SERGIPE

Programa de Pós-graduação em
Química - PPGQ



FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da Comissão Julgadora da Dissertação de Mestrado de João Thiers Mendonça Santos apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Sergipe em 21/08/2017.

Prof. Dr. Victor Hugo Vitorino Sarmento
Departamento de Química do Campus de Itabaiana - UFS

Prof.ª Dr.ª Iara de Fátima Gimenez
Departamento de Química – UFS

Prof. Dr. Leandro Ramos Souza Barbosa
Instituto de Física-Universidade de São Paulo

RESUMO

As micelas são sistemas termodinamicamente estáveis, formadas após atingirem uma concentração mínima de tensoativo na solução, que é chamada de concentração micelar crítica (CMC). Já os tensoativos são substâncias anfifílicas, ou seja, possuem uma região polar (cabeça) e outra apolar (cauda) bem definidas na estrutura molecular, sendo o tween 80 o tensoativo escolhido para este trabalho. A CMC deste tensoativo foi encontrada por meio da espectroscopia no ultravioleta-visível, por meio da absorvância de uma molécula sonda que, neste trabalho, foi o ibuprofeno. O valor da CMC está entre 1.10^{-4} e 2.10^{-4} mM. As micelas apresentam um grande potencial na solubilização de fármacos pouco solúveis em solução aquosa que estão sendo reutilizados para diversos fins, diferentes dos atuais, além de aproveitar drogas que anteriormente foram abandonadas devido a sua falta de solubilidade, por exemplo, no plasma sanguíneo, com isso, conseguem aumentar a biodisponibilidade dos mesmos no organismo, podendo funcionar como nanoreservatórios de fármacos minimizando, desse modo, os efeitos colaterais destes, além de ajudar no direcionamento correto em que essas drogas deverão ser descarregadas. Diante de tal relevância, este trabalho propõe-se a entender como e onde ocorre a interação das micelas formadas por tween 80 com os fármacos, variando o pH e as concentrações destes. Os fármacos utilizados neste trabalho foram o carisoprodol, o ibuprofeno e o ibuprofeno sódico, uma vez que apresentam características distintas em relação à distribuição de polaridade molecular. A técnica utilizada para realizar essas análises foi a de espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS), por meio da qual é possível analisar mudanças de formas e tamanhos da ordem nanométrica. A partir das observações experimentais, foi possível dizer que para ocorrer interação mais efetiva entre as micelas e os fármacos é necessário que estes tenham uma região apolar bem definida e expressiva, em termos de volume, em alguma região da molécula, tendo em vista que o carisoprodol não alterou as curvas de SAXS das micelas, quando estava presente na solução. Já o ibuprofeno e o ibuprofeno sódico conseguiram causar mudanças significativas nas curvas de SAXS, seja em termos de deslocamento para baixo ou alto ângulo ou efeitos de interferências atrativas

ou repulsivas nas micelas. O modelamento das curvas de SAXS revelou as geometrias adquiridas pelas micelas, que em pH 4 e pH 7 alternava-se entre um núcleo e uma casca cilíndrica com seção transversal elíptica ou circular a depender do fármaco ou de sua concentração e em pH 9, a única seção transversal apresentada foi a geometria elíptica. O tamanho do cilindro interno das micelas em pH 4 sem fármaco foi de 33,9 Å, passando para 43,4 Å com 30 mM de ibuprofeno e 53,7 Å com 30 mM de ibuprofeno sódico. Já em pH 7 e 9 houve pouca alteração nesses comprimentos. Foi feito também um estudo teórico para melhor compreender a interação micela-fármaco e, para isso, foram obtidos as cargas atômicas, o raio apolar e polar, além da otimização das estruturas das substâncias utilizadas neste trabalho. O tween 80 foi otimizado pelo método semi-empírico PM3 (Parametric Method Number 3), ao passo que tanto o carisoprodol quanto o ibuprofeno foram otimizados pelo método *ab initio* DFT (Teoria do Funcional de Densidade).

Palavras-chave: Tensoativo. Micela. Fármacos. SAXS. Interação.

ABSTRACT

Micelles are thermodynamically stable systems, formed after reaching a minimum concentration of surfactant in the solution, and is called the critical micellar concentration (CMC). The tensoactives are amphiphilic substances, that is, they have a polar region (head) and another apolar (tail) well defined in the molecular structure, being the tensoactive tween 80 chosen for this work. The CMC of this surfactant was found by ultraviolet-visible spectroscopy, through the absorption of a probe molecule that was ibuprofen at work. The CMC value is between $1 \cdot 10^{-4}$ and $2 \cdot 10^{-4}$ mM. Micelles have a great potential in the solubilization of poorly soluble drugs in aqueous solution that are being reused for different purposes than the current ones, besides taking drugs that have previously been abandoned due to their lack of solubility, for example in blood plasma, with we can increase the bioavailability of the same in the body, and can function as nanoreservoirs of drugs thus minimizing the side effects of these, and help in the correct direction in which these drugs are discharged. Given this relevance, this work aims to understand how and where the interaction of the tween-80 formed micelles with the drugs, varying the pH and the concentrations of these. The drugs used in this study were carisoprodol, ibuprofen and sodium ibuprofen, since they have different characteristics in relation to the molecular polarity distribution. The technique used to perform these analyzes was the low angle X-ray scattering (SAXS), through which it is possible to analyze changes of shapes and sizes of the nanometric order. From the experimental observations, it was possible to say that for more effective interaction between the micelles and the drugs, it is necessary that they have a well defined and expressive apolar region, in terms of volume, in some region of the molecule, since the carisoprodol did not alter the SAXS curves of the micelles when it was present in the solution. Ibuprofen and sodium ibuprofen were able to cause significant changes in the SAXS curves, either in terms of low or high angle displacement or effects of attractive or repulsive interferences on the micelles. The modeling of the SAXS curves revealed the geometries acquired by the micelles, which at pH 4 and pH 7 alternated between a core and a cylindrical shell with an elliptical or circular cross-section depending on the drug or its concentration and at pH 9, The only cross section presented was

elliptical geometry. The internal cylinder size of pH 4 micelles without drug was 33.9 Å, increasing to 43.4 Å with 30 mM ibuprofen and 53.7 Å with 30 mM ibuprofen sodium. At pH 7 and 9, there was little change in these lengths. A theoretical study was also carried out to better understand the micelle-drug interaction and, for this, the atomic charges, the polar and polar light, and the optimization of the structures of the substances used in this work were obtained. Tween 80 was optimized by the semi-empirical method PM3 (Parametric Method Number 3), while both carisoprodol and ibuprofen were optimized by the ab initio DFT (Density Functional Theory) method.

Keywords: *Surfactant. Micelle. Drugs. SAXS. Interaction.*

SUMÁRIO

1. Introdução.....	1
2. Sistemas Micelares e o Ibuprofeno.....	2
2.1. Tensoativos.....	2
2.2. Tipos de tensoativos.....	3
2.3. Formação de Micelas.....	4
2.4. Micelas como Sistema de Solubilização de Fármacos.....	4
2.5. Fármacos.....	5
2.6. Reutilização de drogas conhecidas para outros fins.....	8
3. Caracterização dos Sistemas Micelares.....	9
3.1. Espalhamento de raios X a Baixo Ângulo (SAXS).....	9
3.1.1. Fundamentos do SAXS.....	9
3.1.2. Domínios da função de espalhamento.....	17
3.1.3. Raio de Giro.....	17
3.1.4. Função de Distribuição de Pares de Distância $p(r)$	18
3.1.5. Função de Interferência $S(q)$	19
3.1.6. Modelamento das curvas de SAXS.....	20
3.2. Espectrometria de Absorção na Região do Ultra-violeta e visível.....	21
3.3. Estudo Téorico Computacional.....	23
4. Objetivos.....	26
4.1. Objetivo geral.....	26
4.2. Objetivos específicos.....	26
5. Materiais e métodos.....	27
5.1. Determinação da concentração micelar crítica.....	27
5.2. Medida de UV-vis para o carisoprodol.....	27
5.3. Medidas de SAXS.....	27
6. Resultados e discussões.....	29
6.1. Determinação da concentração micelar crítica.....	29
6.2. Análise computacional.....	31
6.3. Análise das curvas de SAXS.....	35
6.3.1. Escolha da concentração do tensoativo.....	35
6.3.2. Influência da quantidade e da natureza dos fármacos.....	36

6.3.3. Influência do pH.....	54
7. Conclusões.....	55
8. Perspectivas do trabalho.....	56
9. Referências.....	57

Dedico este trabalho ao meu filho Anthony pelo sorriso inspirador, a minha esposa Jackeline pelo companheirismo e amor, aos meus pais João e Maria Ivanilde, pelo incentivo durante toda a vida, ao meu orientador Victor, que é um exemplo de ser humano e profissional e a todos os professores que possibilitaram que eu chegasse até aqui, seja os da Educação Básica ou do Ensino Superior.

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original.”

(Albert Einstein)

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e pelas conquistas alcançadas.

A minha esposa Jackeline de Carvalho Peixoto Mendonça, pelo incentivo, amor e apoio incondicional;

Ao professor Dr. Victor Hugo Vitorino Sarmiento, que me recebeu de braços abertos para orientar-me, orientador que considero também como um grande amigo, devido ao seu respeitoso modo de lidar com o próximo.

Ao professor Dr. Leandro Ramos Souza Barbosa, pelo apoio e conselhos dados durante este trabalho.

Ao aluno de doutorado Deyvisson da Mota Santos, pela colaboração no desenvolvimento do trabalho teórico.

Ao Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, pelo uso de suas instalações.

A CAPES, pela bolsa concedida.

A UFS, pela importância no desenvolvimento acadêmico e social.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

SAXS - Espalhamento de Raios X a Baixo Ângulo

Rg – Raio de Giro

PM3 - Parametric Method Number 3

CMC - Concentração Micelar Crítica

LNLS - Laboratório Nacional de Luz Síncrotron

UV-vis - Ultravioleta e Visível

DFT - Teoria do Funcional de Densidade

IUPAC - International Union of Pure and Applied Chemistry

cylshell2 - Casca cilíndrica orientada aleatoriamente com seção transversal cilíndrica.

elcylshell2 - Casca cilíndrica com orientação aleatória e seção transversal elíptica.

Eta_core - Comprimento da densidade de espalhamento do cilindro interno.

Eta_shell - comprimento da densidade de espalhamento do cilindro externo.

1. INTRODUÇÃO

Os tensoativos recebem este nome por possuírem a capacidade de reduzir a tensão superficial da água, são moléculas anfifílicas devido à existência de duas regiões com polaridades distintas, na mesma estrutura, sendo uma região polar e hidrofílica e outra região apolar e lipofílica [1]. Em solução aquosa, esses tensoativos podem agregar-se em estruturas chamadas micelas, cujo interior desses agregados é lipofílico e a parte externa é hidrofílica. Já em solução oleosa, agregam-se nas chamadas micelas reversas, nas quais a região polar estará direcionada para o seu interior e na camada externa a região lipofílica [2]. É graças a essa versatilidade que as micelas são amplamente utilizadas em vários ramos da indústria como o alimentício [3], o farmacêutico [4], em óleos para automóveis, sabões [5], detergentes, emulsões [6], microemulsões [7], nanocarregadores [8], entre outros.

Atualmente, existem vários fármacos que necessitam melhorar a biodisponibilidade diante da baixa solubilidade em meio aquoso [9]. As micelas podem auxiliar no aumento da solubilidade, melhorar a biodisponibilidade, funcionar como nanocarregadores seletivos em determinados alvos e ainda, como sistema de liberação controlada de fármacos, minimizando os efeitos colaterais indesejáveis [8, 10, 11].

Neste contexto, faz-se necessário compreender melhor como ocorre a dinâmica de formação e os mecanismos de interação entre os fármacos e as micelas. A técnica de espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS) é uma ferramenta muito útil de investigação estrutural destes sistemas, o que possibilita a obtenção de informações sobre as propriedades físicas tais como tamanho (raio de giro, diâmetro máximo), forma e estrutura interna. Neste trabalho, realizamos um estudo sistemático (variação de pH e concentração de fármaco) com o objetivo de entender os mecanismos de interação da micela com fármacos. Para compreensão do mecanismo de formação e interação micelar, fizemos um estudo teórico a partir da modelagem molecular do tensoativo com o método semiempírico PM3 (Parametric Method Number 3) e para os fármacos, utilizamos a teoria do funcional de densidade (DFT), para

determinar a configuração espacial das partículas, distâncias intramoleculares e os vetores dipolos das moléculas, que serão descritas neste trabalho.

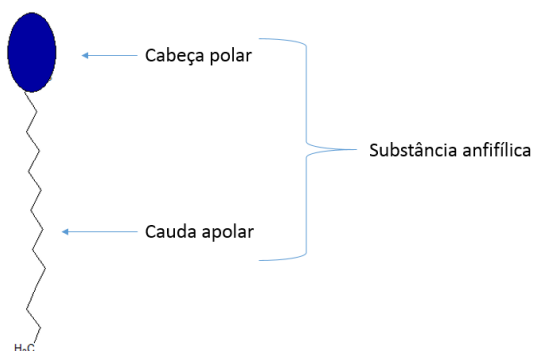
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Tensoativos

A formação das micelas depende fortemente da concentração no meio, do tamanho e da estrutura da molécula de tensoativo [12]. Existem vários tensoativos com diferenças significativas em suas estruturas, porém há um princípio básico em todos eles; a distinção de polaridades intramoleculares (Figura 1). Existem diversos tipos de tensoativos catiônicos, aniônicos e não iônicos disponíveis comercialmente [13] que produzirão micelas distintas e ainda há a possibilidade de misturarmos diferentes tensoativos para melhorar alguma propriedade desejada como, por exemplo, a solubilização de uma determinada substância em solução [14].

A presença de sais inorgânicos e de pequenas moléculas como álcoois de cadeia curta e açúcares foram relatados anteriormente como fatores que podem também influenciar na formação micelar [15, 16] como, por exemplo, o trabalho [17] que realizou um estudo cinético das mudanças ocorridas pelas micelas ao adicionar concentrações diferentes de cloreto de sódio, no qual foi verificado que em baixas concentrações deste sal houve um alongamento das micelas e à medida que a concentração do sal crescia, as micelas ligavam-se em uma estrutura extensa e estreita, semelhante a de uma minhoca.

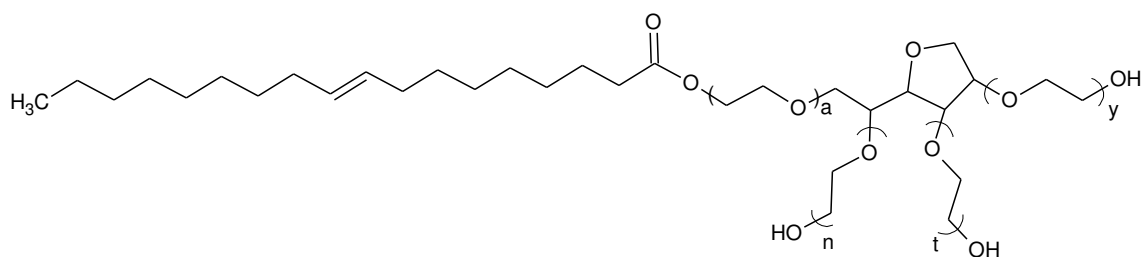
Figura 1: Modelo de tensoativo, em que a elipse em azul representa a região da cabeça polar e o hidrocarboneto a cauda apolar.



A cabeça polar pode conter um ou mais grupos funcionais que realizam ligações intermoleculares dipolo-dipolo ou ligações de hidrogênio como sulfatos, carboxilatos e amidas, por exemplo. E a cauda apolar apresentada é, normalmente, constituída da função hidrocarboneto, que pode ser linear ou ramificada, saturada ou insaturada.

O tensoativo utilizado neste trabalho foi o monooleato de sorbitano etoxilado, conhecido também como Tween[®] 80, o qual é classificado como um tensoativo não iônico, possui uma cadeia apolar de 17 carbonos com uma ligação dupla nesta região e a transição entre a região polar e apolar é feita por meio de uma função éster. A parte polar é basicamente constituída pela função éter e hidroxilas nas extremidades. Sua representação estrutural está representada na Figura 2.

Figura 2: Representação molecular do tween 80, sendo $a+n+t+y=20$



2.2. Tipos de tensoativos

Uma molécula de tensoativo (**Surface Active Agent** ou agente ativo em uma superfície) pode ser classificada de acordo com a carga na molécula. O tensoativo aniônico apresenta uma carga negativa na cabeça polar, e este tipo

de tensoativo é muito utilizado na produção de detergentes, devido ao seu baixo custo de produção. Há também tensoativo catiônico, que apresenta uma carga positiva, a qual, normalmente, está sobre o átomo de nitrogênio, este último tipo de tensoativo é utilizado como condicionadores para cabelo e como agente anticorrosivo em aço [18]. Um terceiro tipo de tensoativo são os zwitteriônicos, que apresentam um dipolo interno, porém, são eletricamente neutos, e um quarto tipo são os tensoativos não iônicos, como o tween 80.

2.3. Formação de Micelas

O termo micela (do latim: pequeno agregado) foi utilizado inicialmente por J.W. McBain, em 1913, que descreveu a formação de agregados coloidais por sabões e detergentes. Hoje, ainda é usado para descrever outros fenômenos em biologia e química coloidal [19, 20].

As micelas são estruturas nanométricas formadas por agregados de tensoativos em solução e podem apresentar diversas formas (elipsoidais, cilíndricas, esféricas, etc) e tamanhos [21]. Para formarem tais sistemas, dependem diretamente de características estruturais do tensoativo que deu origem, tais como tamanho das regiões polares e apolares e se apresentam carácter iônico ou não iônico [19]. Estas micelas formam-se após uma determinada concentração mínima de tensoativo, denominada concentração micelar crítica (CMC) [24].

A CMC pode ser obtida por diversas técnicas como condutimetria, viscosimetria, calorimetria e tensiometria [22,23], sendo que todos esses dependem de alguma variação física direta da solução. Neste trabalho, utilizamos a técnica de absorção da radiação eletromagnética pelo comprimento de onda na região do ultravioleta e visível (UV-vis) por moléculas sondas, a qual é considerada uma técnica de determinação indireta, tendo em vista que utiliza uma molécula sonda, que deve possuir características como baixa solubilidade em água (para que a concentração não seja elevada e desvie da lei de Beer-Lambert) e absorção da radiação eletromagnética (capacidade de realizar transições eletrônicas) no intervalo de 200 a 800 nm [24] e será descrito no item 3.2.

2.4. Micelas como Sistema de Solubilização de Fármacos

As micelas apresentam um grande potencial na solubilização de fármacos pouco solúveis em solução aquosa e, com isso, conseguem aumentar a sua biodisponibilidade no organismo [9].

Nesse sentido, além dos tensoativos já disponíveis no mercado, podemos encontrar também copolímeros que são sintetizados com o objetivo de funcionar como micelas, ou seja, com características anfifílicas e que podem funcionar como nanoreservatórios de fármacos [25], permitindo a diminuição dos efeitos colaterais devido à possibilidade de liberação controlada dentro da faixa terapêutica. Os fármacos nanocarregados têm, assim, a sua biodisponibilidade ampliada e a dose torna-se mais eficaz [25,3].

Podemos citar como exemplo o trabalho de Cabral et al, que prepararam agregados formados por copolímeros, em que o núcleo da micela era formado por poliaminoácido de característica apolar ligada ao polietileno glicol (casca), o que confere uma barreira de acesso ao fármaco (localizado no núcleo da micela) da ação de macrófagos e da interação de proteínas e células contidas no plasma sanguíneo e, assim, prolongar a sua permanência por mais tempo [26].

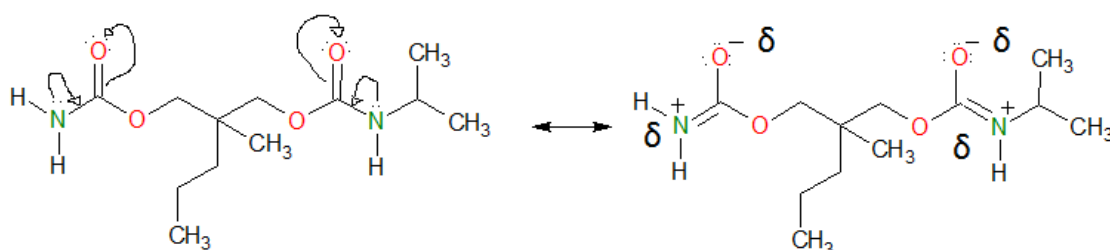
2.5. Fármacos

Os fármacos utilizados neste trabalho, com o objetivo de investigar a interação com as micelas, foram o ibuprofeno, o carisoprodol e o ibuprofeno sódico.

O carisoprodol (N-isopropil-2-metil-2-propil-1,3-propanodioldicarbamato) é um fármaco utilizado como relaxante muscular de ação central [27, 28], aplicado no tratamento dos espasmos musculares agudos associados à desordem craniomandibular, lombalgia e ciática [29]. Possui efeito antipirético e anticolinérgico (substâncias que inibem a ação da acetilcolina, neurotransmissor), incluindo a sedação, confusão e perda de equilíbrio [30]. A solubilidade em água do carisoprodol é de 0,3 mg/mL a 25 °C e aumenta para 1,4 mg/mL a 50 °C, não sendo alterado pelo suco gástrico intestinal. A partir da

Figura 4, podemos observar que ao longo de toda a estrutura da molécula de carisoprodol é possível ver grupos de caráter polar como as funções amida e éster e suas respectivas cargas parciais, não possuindo uma região claramente apolar, com exceção das ramificações metil e propil existentes no centro da molécula.

Figura 4: Molécula de carisoprodol em sua configuração mais estável (à esquerda) e sua estrutura de ressonância (à direita).



Já o ibuprofeno (ácido 2-(4-isobutilfenil) propanoico) é um fármaco que se enquadra no grupo dos anti-inflamatórios não esteroides e também apresenta efeito analgésico e antipirético [31].

Em 2014, H. Endo et al [32] mostraram que a utilização do ibuprofeno com o quimioterápico cisplatina potencializou a indução da morte de células cancerígenas do pulmão do tipo adenocarcinoma *in vitro*, tornando-o um promissor agente terapêutico, uma vez que permitiu a redução das doses de cisplatina e a redução da resistência ao tratamento com este quimioterápico.

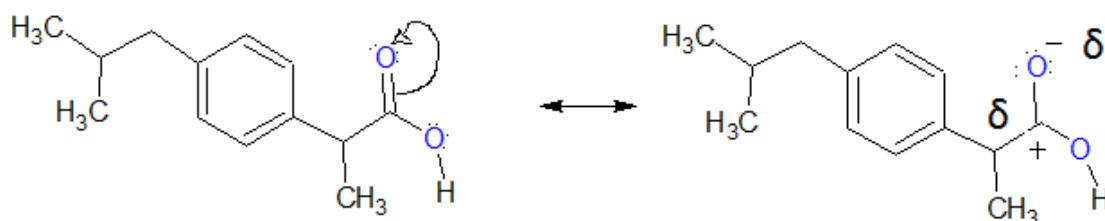
O ibuprofeno foi testado para reduzir os níveis de proteínas HSP 70 (“heat shock proteins”) que são produzidas no organismo a partir de estímulos como estresse ambiental (elevação de temperatura) [33]. A HSP 70 pode apresentar um caráter protetivo em células, entretanto, se estas forem cancerosas, a proteína contribuirá na formação de tumores e dificultará a sua destruição. Os testes com o ibuprofeno *in vitro* mostraram que tal substância reduziu os níveis dessas proteínas protetoras e possibilitou a potencialização dos efeitos da cisplatina contra o câncer de pulmão, uma vez que a combinação destes fármacos, em baixas concentrações, provocou um apoptose mitocondrial (via de morte celular induzida a partir da ativação da enzima caspase, que degrada o DNA nuclear e as proteínas citoplasmáticas).

Outro uso promissor do ibuprofeno é no combate às infecções fúngicas, em que foi testado contra o *Cryptococcus neoformans* e o *Cryptococcus gattii*. O ibuprofeno potencializou a capacidade das células imunitárias em fagocitar células cryptocócicas, agindo em sinergia com os fármacos que já são utilizados no tratamento: fluconazol e anfotericina B [34], mas que possuem semivida plasmática curta e apresentam efeitos colaterais com o uso prolongado, tais como danos gastrointestinais e aumento do risco de acidente vascular cerebral [31].

Quanto à solubilidade, o ibuprofeno é pouco solúvel em água. Yazdanian et al [35] relataram um valor de solubilidade de 11 mM (2,3 mg / mL) e 20 mM em uma solução com tampão fosfato com pH 7,4, e pKa igual a 4,8. Desta forma, a necessidade de criar um meio de aumentar a sua solubilidade em água, possibilitando aumentar a sua biodisponibilidade e, ao mesmo tempo, promover uma liberação controlada com efeitos colaterais reduzidos torna-se relevante.

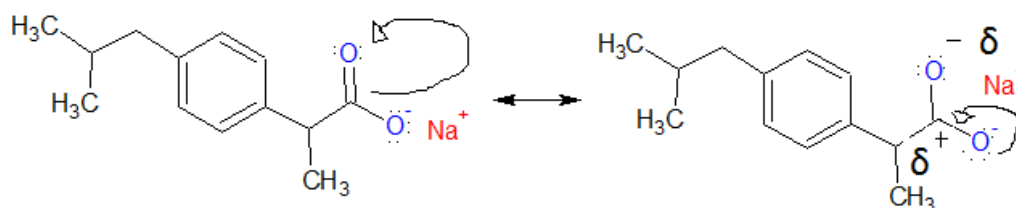
Observa-se a partir da Figura 5 que o ibuprofeno possui uma região polar, (em azul), relacionada à função ácido carboxílico e uma grande área apolar (iniciando a partir do carbono α a carbonila), o que leva a uma baixa solubilidade em água.

Figura 5: O ibuprofeno em sua estrutura mais estável (à esquerda) e a estrutura de ressonância do ibuprofeno (à direita).



O ibuprofeno sódico é uma forma nova e mais solúvel do ibuprofeno, possuindo as mesmas características farmacológicas estudadas até o presente momento [36]. Apresenta um caráter polar mais acentuado, classificando-se como um sal orgânico (Figura 6).

Figura 6: Representação do ibuprofeno sódico (à esquerda) e da sua estrutura de ressonância (à direita).



2.6. Reutilização de drogas conhecidas para novos fins

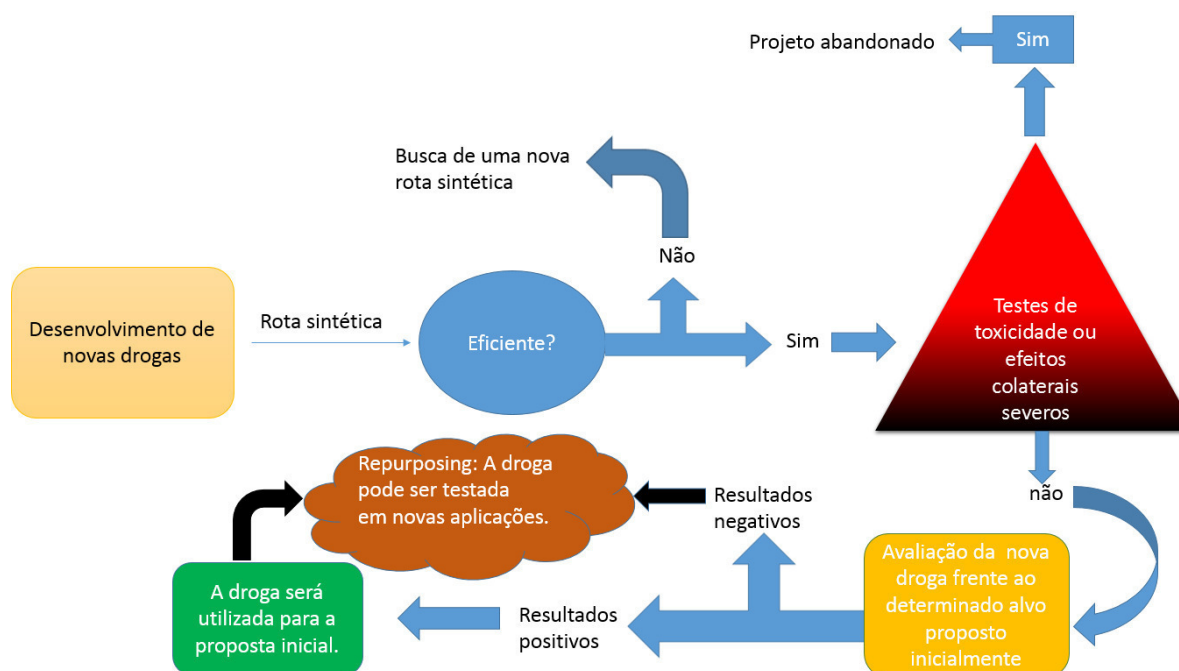
A produção de novas drogas é constituída de grandes desafios, seja em parte devido ao próprio processo de síntese, que muitas vezes torna-se inviável devido ao aumento dos custos provenientes do baixo rendimento das reações, seja pela toxicidade da nova droga, considerando que altos níveis de toxicidade ou de efeitos colaterais favorecem o descarte e perdas de tempo e dinheiro. No caso em que a nova droga consiga ser sintetizada a um custo relativamente baixo e a toxicidade seja aceitável, deve o novo fármaco ser submetido a testes de ação sobre o alvo previamente pretendido. Não havendo resultado satisfatório, o novo fármaco corre o risco de ser abandonado e todos os esforços perdidos [37].

Nesse sentido, surgiu a ideia do “repurposing” (Figura 7), que nada mais é que a reutilização de drogas que estavam descartadas devido ao seu fracasso inicial em combater determinada enfermidade descrita em seus projetos originais e a reutilização de drogas que já estão disponíveis no mercado com outros fins, como é o caso do ibuprofeno.

As grandes vantagens de reutilizar as drogas já existentes são:

- a) possuir rotas sintéticas satisfatórias em termos de produtividade e, conseqüentemente, de custos;
- b) a existência de um estudo relativo a sua toxicidade ou efeitos colaterais; ou seja, a droga será testada somente quanto ao seu uso para determinado fim, o que reduz bastante os riscos de resultados negativos, além do rápido desenvolvimento para a cura de várias doenças
- c) redução dos custos

Figura 7: Esquema de representação da rota de síntese de novas drogas e da sua reutilização para outros fins.



3. Caracterização dos Sistemas Micelares

3.1. Espalhamento de raios X a Baixo Ângulo (SAXS)

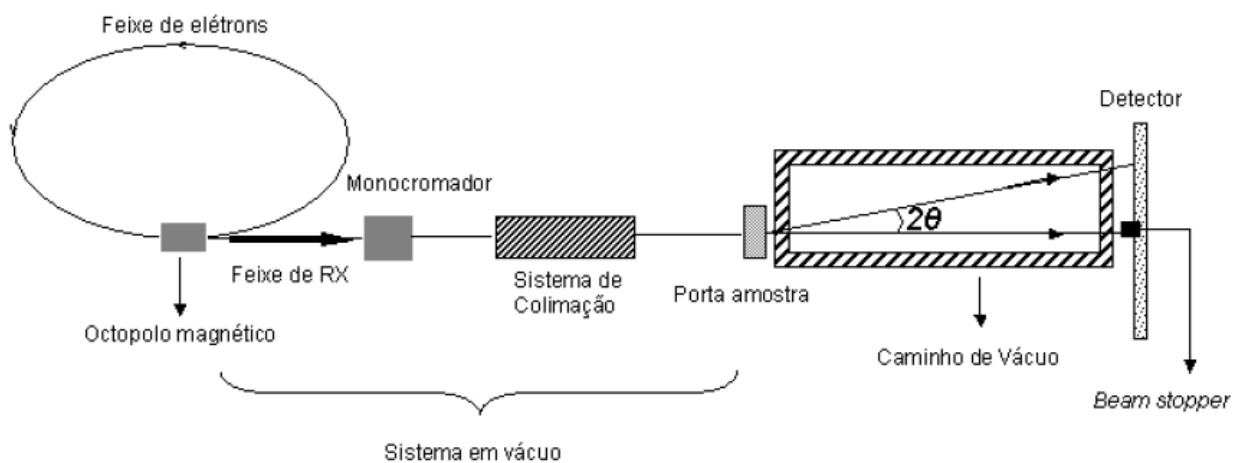
3.1.1. Fundamentos do SAXS

A investigação da interação dos fármacos com as micelas foi realizada por meio da técnica de espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS), cujo esquema é apresentado na Figura 8. As medidas foram realizadas no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), localizado em Campinas-SP. Este produz ondas eletromagnéticas de comprimentos que vão do

infravermelho até os raios X. São utilizados monocromadores para selecionar o comprimento de onda desejado e colimadores, para a obtenção do feixe de radiação eletromagnética o mais paralelo possível. Vale ressaltar que todo o sistema está sobre vácuo.

Na análise feita por SAXS, podemos medir amostras tanto na fase líquida quanto na sólida e o comprimento de onda utilizado varia de 1 a 2 Å.

Figura 8: Esquema de representação da linha de SAXS. **Fonte:** Barbosa (2008) [21].



Os elétrons são partículas muito sensíveis a campos elétricos e magnéticos, ao serem expostos aos raios X (campo elétrico incidente), esses elétrons são submetidos a uma força (\vec{F}):

$$\vec{F} = e\vec{E}_0 \cos 2\pi\omega t \quad (1)$$

Em que e é a carga elétrica, \vec{E}_0 é o campo elétrico e ω é a frequência da radiação.

Como,

$$\vec{a} = \frac{\vec{F}}{m} = e \frac{\vec{E}_0}{m} \cos 2\pi\omega t \quad (2)$$

Com a ação desse campo, o elétron é acelerado e torna-se uma fonte esférica de ondas eletromagnéticas de frequência equivalente à radiação originária da perturbação (espalhamento elástico). A amplitude da onda secundária (espalhada) por um elétron (A_e) pode ser escrita da seguinte forma:

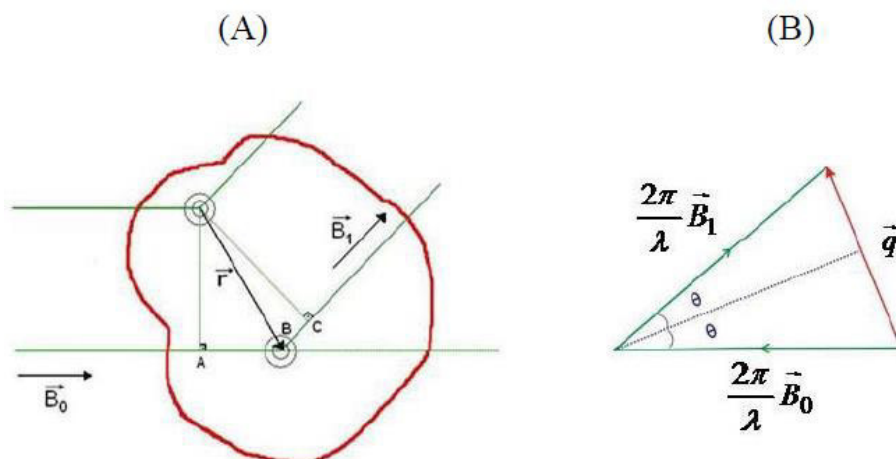
$$A_e = \frac{e^2}{4\pi\epsilon_0 c^2 m} \quad (3)$$

Em que ϵ_0 é a constante dielétrica do vácuo, c é a velocidade da luz, m é massa do elétron e e é a sua carga. É importante ressaltar que a contribuição da amplitude de espalhamento deve-se somente ao elétron, pois mesmo o núcleo tendo carga (pode sofrer ação de um campo eletromagnético), é muito mais pesado e o seu sinal torna-se desprezível, já que a amplitude de espalhamento é inversamente proporcional à massa, como comprovado por meio da equação 3.

Diante da impossibilidade de determinar a posição exata do elétron pelo princípio da incerteza de Heisenberg, e do grande número de elétrons que possa existir nas moléculas ou em seus agregados, o conceito de densidade (número de elétrons por unidade de volume eletrônico) é adotado [38].

Para efeito de ilustração, a Figura 9 (A) representa uma partícula não simétrica que possui dois centros de espalhamento (elétrons), os quais estão distantes por um comprimento r . Eles são atingidos por uma radiação monocromática e paralela e apresentam espalhamento elástico e coerente.

Figura 9: Representação do SAXS por um par de elétrons. **Fonte:** Neto (2008) [39].



Os feixes incidentes e espalhados são, respectivamente, representados por B_0 e B_1 na Figura 9 (B). É importante salientarmos que existe também uma

diferença de caminho óptico ($\Delta\varphi$), que pode ser representado como a soma AB + BC que gera uma diferença de fase:

$$\Delta\varphi = \frac{2\pi(AB + BC)}{\lambda} \quad (4)$$

Sendo λ o comprimento de onda da radiação eletromagnética, a onda secundária (espalhada) que será registrada é convenientemente utilizada como número complexo $e^{i\varphi}$. A amplitude de espalhamento pode ser apresentada da seguinte forma:

$$A(\vec{q}) = \int A_e \rho(\vec{r}) e^{i\Delta\varphi} dV \quad (5)$$

Podemos ainda observar na Figura 9 que a diferença de caminho está somente relacionada com os vetores \vec{r} e \vec{q} e a fase φ é $\frac{2\pi}{\lambda}$ vezes a diferença entre o caminho ótico de referência e algum ponto arbitrário:

$$\Delta\varphi = -\vec{r} \cdot \vec{q} \quad (6)$$

Por causa do grande número de elétrons, a equação 6 pode ser reescrita da seguinte maneira:

$$A(\vec{q}) = \int A_e \rho(\vec{r}) e^{-i\vec{r} \cdot \vec{q}} dV \quad (7)$$

Assim, a amplitude de espalhamento depende da densidade eletrônica $\rho(r)$ em uma determinada região delimitada por uma distância \vec{r} e dV para o volume nessa mesma posição.

Ainda na Figura 9 (B), podemos perceber que o vetor espalhamento (\vec{q}) é perpendicular à bissetriz entre o ângulo incidente e o espalhado:

$$q = \frac{4\pi \text{sen}\theta}{\lambda} \quad (8)$$

Regiões que possuem densidades eletrônicas distintas serão importantes para a formação de um contraste como é o caso de sistemas micelares.

$$\Delta\rho = \rho_{partícula} - \rho_{meio} = \text{contraste} \quad (9)$$

É relevante destacar que se a densidade eletrônica do solvente for igual ou muito próxima a da partícula a ser analisada, não haverá distinção do feixe espalhado e não será possível determinar tal estrutura da partícula de interesse [38].

O SAXS teve origem após a difração de raios X, a qual surgiu inicialmente devido as distâncias entre os planos da amostra existentes na estrutura cristalina e organizada (rede de difração) serem da mesma ordem de grandeza dos raios X [40]. Com o passar do tempo, a técnica foi utilizada para estruturas mais desorganizadas e com falhas (buracos) como é o caso de alguns minerais e complexos moleculares como polímeros e proteínas, nas quais há aumento da distância entre os centros de espalhamento e com um relativo nível de desorganização e inomogeneidade [40].

Para entender como essa mudança foi possível, inicialmente a equação 10 que representa a lei de Bragg deve ser observada:

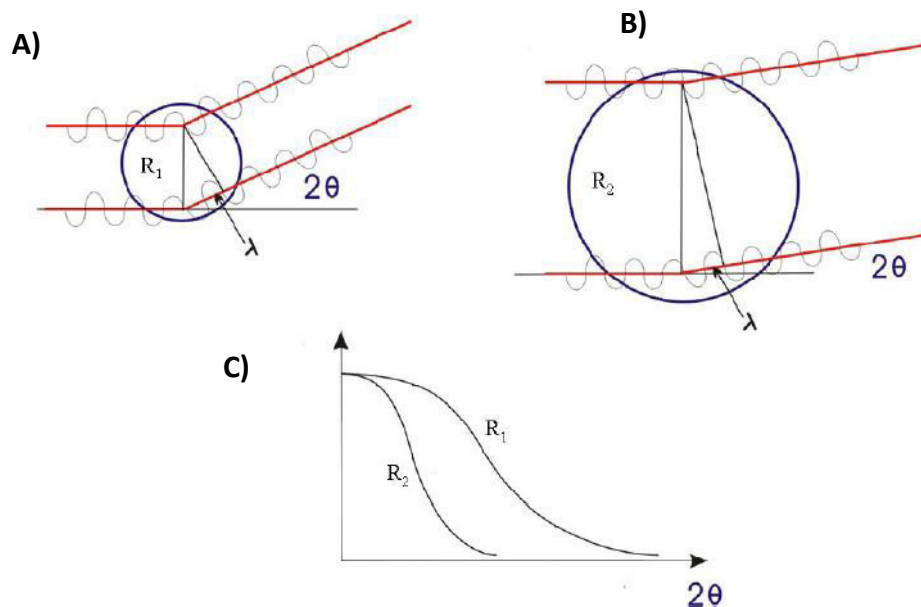
$$n \lambda = 2d \operatorname{sen} \theta \quad (10)$$

Na equação 10, n é o número de fases que normalmente vale 1, λ é o comprimento de onda que é constante. Desse modo, quanto maior for a distância entre os centros espalhadores d , menor será o ângulo θ , conforme a equação 10. Para pequenos ângulos é possível medir distâncias da ordem de 1 a 100 nm [40]. A escolha para o baixo ângulo deve-se às diferenças de fases que existem em ângulos maiores, o que resultaria em maiores números de interferências destrutivas. Portanto, o espalhamento máximo que pode ser observado surgirá quando 2θ tender a zero [38].

O SAXS é, então, uma poderosa técnica não destrutiva de análise de tamanho, forma, massa molecular e interação entre partículas que possuem dimensões de ordem coloidal (dezenas ou centenas de Å) [38]. Em qualquer processo de espalhamento, ocorre a existência de uma lei de reciprocidade, que é dada pela relação inversa entre o tamanho da partícula e o ângulo de espalhamento, isto é, quanto maior for o diâmetro da partícula, menor será o ângulo espalhado [38] como mostra a Figura 10.

No caso do SAXS, a lei de reciprocidade torna-se válida devido ao espalhamento elástico, pois como a energia de um fóton de raios X é muito grande se comparada à ligação de um átomo, todos os elétrons comportam-se como se fossem livres [39] e acabam procedendo como já foi descrito no início deste capítulo. No entanto, há também a existência de muitos átomos pesados, que podem absorver essa radiação para realizar transições eletrônicas podendo gerar a fluorescência de raios X, o que interfere na medida. Essa técnica possui limites, porque se a partícula espalhadora for muito grande, o vetor espalhamento torna-se tão pequeno que fica impossível distingui-lo do feixe transmitido. Já se a partícula for muito pequena, a intensidade do sinal da onda espalhada torna-se bem reduzida, devido às interferências destrutivas durante o percurso do caminho óptico até o detector, o que impossibilita o registro dos fótons.

Figura 10: Lei de reciprocidade em que: A) pequenas distâncias nos centros de espalhamento produzem grandes valores de \vec{q} , B) grandes distâncias produzem pequenos valores do vetor espalhamento e C) curvas geradas a partir de partículas que possuem a mesma densidade eletrônica. **Fonte:** Neto (2008) [39].



Outro fato bastante importante sobre o SAXS é que se a inhomogeneidade de densidade eletrônica da partícula for muito pequena em

relação ao seu tamanho, pode-se considerar que a densidade eletrônica interna será uma constante, pois não resultará diferença nas curvas de SAXS. Mas, se um aumento for observado na intensidade de espalhamento de uma partícula na região de maiores ângulos no gráfico (menores distâncias), é possível atribuir a formação de “buracos” no interior destas partículas.

A intensidade de espalhamento, $I(\vec{q})$, que será registrada no detector é proporcional ao quadrado da amplitude de espalhamento $A(q)$, segue:

$$I(\vec{q}) \propto A(\vec{q}) \cdot A(\vec{q})^* \quad (11)$$

Em que $A(\vec{q})^*$ é o complexo conjugado de $A(\vec{q})$. A transformada inversa de Fourier de $A(\vec{q})$ fornece o $\rho(\vec{r})$, que é por natureza um valor real e positivo, porém não é possível obter a fase. No entanto, podemos substituir a equação 7 na 11 [40] e obter:

$$I(\vec{q}) = \iint dV_1 dV_2 \rho(\vec{r}_1) \rho(\vec{r}_2) e^{-i\vec{q}(\vec{r}_1 - \vec{r}_2)} \quad (12)$$

Considerando um sistema diluído, tem-se que o espalhamento depende somente da forma da partícula, ou melhor, da média da forma das partículas espalhadoras. Nesse sentido, a equação 12 depende apenas dos pares de distâncias relativas da própria partícula, podendo usar ainda uma função de autocorrelação, fazendo $\vec{r} = \vec{r}_2 - \vec{r}_1$ constantes:

$$\tilde{\rho}(\vec{r}) = \rho(\vec{r}_1) \rho(\vec{r}_2) dV \quad (13)$$

Aplicando a consideração 13 na equação 12 obtém-se:

$$I(\vec{q}) = \int dV \tilde{\rho}^2(\vec{r}) e^{-i\vec{r} \cdot \vec{q}} \quad (14)$$

Em um sistema bastante diluído, pode-se entender que a intensidade de espalhamento só compete aos pares de distâncias relativas da partícula e do produto entre as densidades. Nestes sistemas, tem-se apenas a presença do fator de forma da partícula ($P(\vec{q})$). Já para um sistema concentrado das partículas de interesse na solução, a intensidade observada se deve também a um novo componente chamado de fator de estrutura $S(\vec{q})$, o qual está relacionado às correlações entre as partículas do meio. Caso o sistema esteja diluído, o valor de $S(\vec{q})$ será igual a 1 (elemento neutro da multiplicação).

Considerando um sistema isotrópico (em que não há mudança das características físicas com a orientação da partícula) e diluído, podemos

substituir o fator de fase $e^{-i\vec{q}\cdot\vec{r}}$ pelo valor médio em torno de \vec{r} , equação de Debye [38].

$$\langle e^{-i\vec{q}\cdot\vec{r}} \rangle = \frac{\text{sen } qr}{qr} \quad (15)$$

A equação 14 pode ser reescrita da seguinte forma:

$$I(\vec{q}) = \int dV \tilde{\rho}^2(\vec{r}) \frac{\text{sen } qr}{qr} \quad (16)$$

Podemos introduzir também a função de correlação $\gamma(r)$, que está relacionada à média da flutuação de densidade eletrônica, distantes por um r entre duas regiões de densidade eletrônica distinta, pois considerando que o sistema é diluído e as distâncias entre partículas são muito grandes, as densidades tornam-se independentes e são substituídas pelo seu valor médio $\langle \rho \rangle$. Nesse sentido, a função de autocorrelação pode ser redefinida como $\eta = \rho - \langle \rho \rangle$. Com base na equação 13, temos:

$$\tilde{\eta}^2(r) = (\rho(r) - \langle \rho \rangle)^2 = V\gamma(r) \quad (17)$$

Podemos perceber que a existência de poros em uma partícula espalhadora, resulta em uma flutuação η negativa. Assim, integrando a equação 16 de 0 até ∞ e usando dr como variação de integração, obtemos:

$$I(q) = V \int_0^{\infty} 4\pi r^2 dr \gamma(r) \frac{\text{sen } qr}{qr} \quad (18)$$

Usando $q = 0$,

$$I(0) = V \int_0^{\infty} 4\pi r^2 dr \gamma(r) \quad (19)$$

Devido à impossibilidade da distinção entre o feixe incidente e o espalhado, utiliza-se uma extrapolação da curva $I(q)$, com o objetivo de obter o número de elétrons dentro da partícula de volume V .

$\gamma(r)$ é obtido como a transformada inversa de Fourier da equação 18:

$$V\gamma(r) = \frac{1}{2\pi^2} \int_0^{\infty} q^2 dq I(q) \frac{\text{sen } qr}{qr} \quad (20)$$

Para $r = 0$, tem-se:

$$V\gamma(r) = \frac{1}{2\pi^2} \int_0^{\infty} q^2 dq I(q) = V\overline{\eta^2} \quad (21)$$

A equação 21 sugere que se a partícula ficar intacta, mesmo durante a alteração de sua forma, o valor sempre permanecerá constante e igual a $V\overline{\eta^2}$, chamado de invariante (Q).

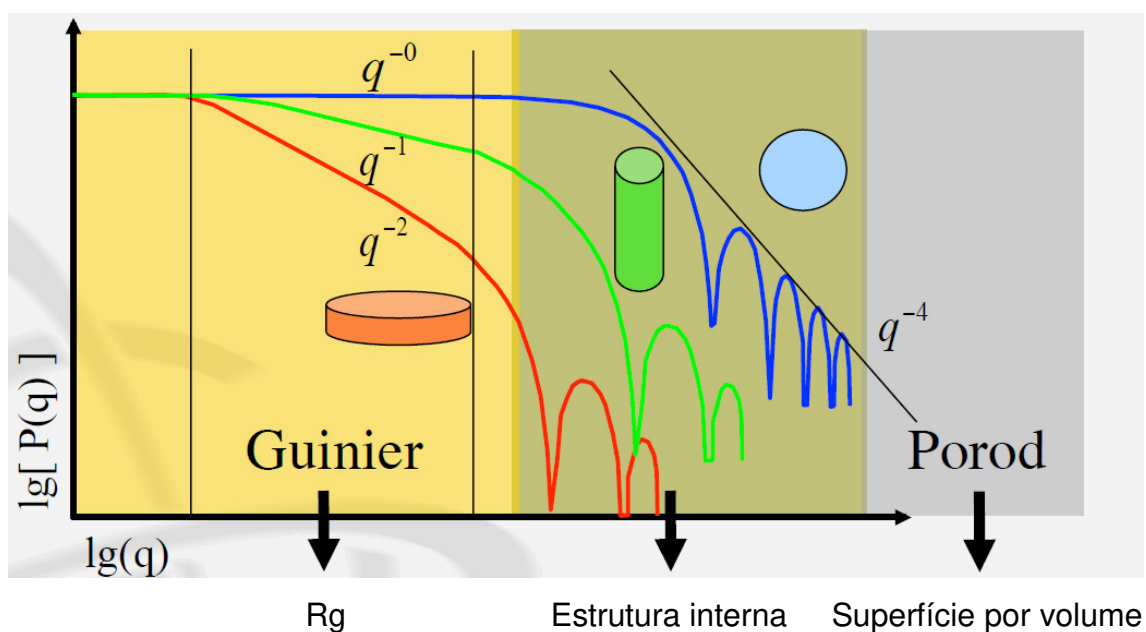
Portanto, o espalhamento das partículas depende da densidade numérica das mesmas (n_p), do fator de forma e este, do quadrado da amplitude de espalhamento, do fator de estrutura e das condições experimentais (k) [21], podendo ser simplificada na equação 22.

$$I(q) = kn_p P(q) S(q) \quad (22)$$

3.1.2. Domínios da função de espalhamento

Por meio da curva de SAXS, pode-se obter três informações distintas, cada uma em determinada região da curva [41], (Figura 11), sendo elas: a região de Guinier, em que se obtém o raio de giro (R_g) da partícula ($q \rightarrow 0$); a região de Fourier, em que a distribuição de função dos pares eletrônicos pode ser obtida com a transformada inversa e, com isso, obter a forma da partícula (região central da curva) [42] e a região de Porod, na obtenção da relação superfície/volume e a superfície para partículas compactas [42].

Figura 11: Domínios da curva de espalhamento. **Fonte:** Boldon et al (2015) [41].



3.1.3. Raio de Giro

Uma das primeiras informações que podem ser extraídas diretamente da curva de SAXS, como visto na Figura 11, é o R_g , definido como a distância média quadrada a partir do centro de gravidade. Porém, ao invés da massa, temos os elétrons. Para o R_g , é necessário haver um sistema no qual as partículas de interesse não estejam interagindo entre si ou esta interação não seja tão significativa, pois para a obtenção do R_g é preciso realizar uma extrapolação para $q \rightarrow 0$, em que serão obtidos os valores de $I(0)$ por meio da lei de Guinier [40]. Esta lei tem validade para valores de $qR_g \leq 1$:

$$I(q \rightarrow 0) = I(0)e^{-\frac{q^2 R_g^2}{3}} \quad (23)$$

Aplicando o \ln de ambos os lados, temos:

$$\ln I(q) = \ln I(0) - \frac{R_g^2}{3} \cdot q^2 \quad (24)$$

Essa equação pode ser representada pela equação do primeiro grau, em que o $\ln I(0)$ é o coeficiente linear e o $-\frac{R_g^2}{3}$ é o coeficiente angular.

O R_g também pode ser obtido a partir da função de distribuição de distâncias [40]:

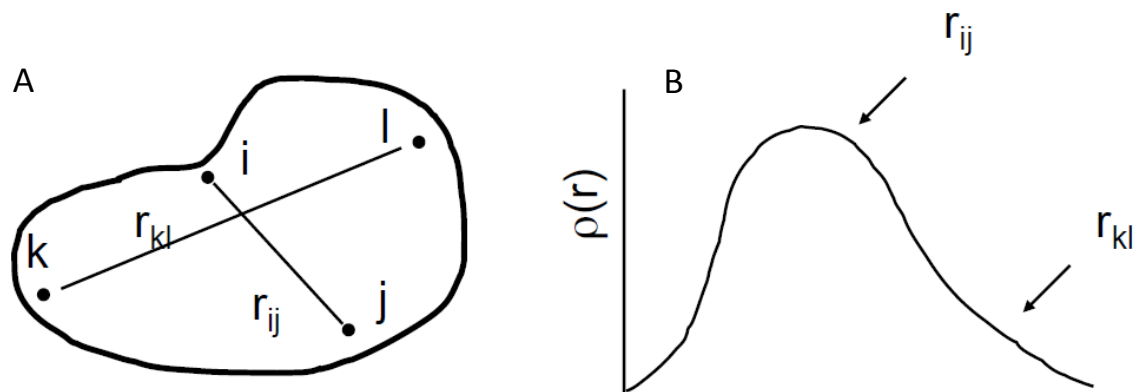
$$R_g^2 = \frac{\int_0^{D_{\text{máx}}} p(r)r^2 dr}{2 \int_0^{D_{\text{máx}}} p(r) dr} \quad (25)$$

3.1.4. Função de Distribuição de Pares de Distância $p(r)$

A partir da curva experimental é possível obter o histograma de todas as distâncias dentro da partícula, uma vez que esta função descreve o conjunto de todas as distâncias pareadas dentro de uma estrutura e pode ser obtido por meio do gráfico de $p(r)$ em função de r , como mostra a Figura 12 [38, 40]. Pode-se calcular a dimensão máxima da partícula quando $p(r)$ aproximar-se de zero e também relacionar à assimetria da mesma, conforme a equação 26, sendo que a função $p(r)$ pode ser obtida diretamente da curva experimental pela transformada inversa de Fourier, por meio do programa Primus.

$$p(r) = \left(\frac{1}{2\pi^2}\right) \int_0^\infty I(q)qr \text{sen}(qr) dq \quad (26)$$

Figura 12: Todas as distâncias contidas na partícula (A) serão representadas conforme a quantidade de cada distância (B).

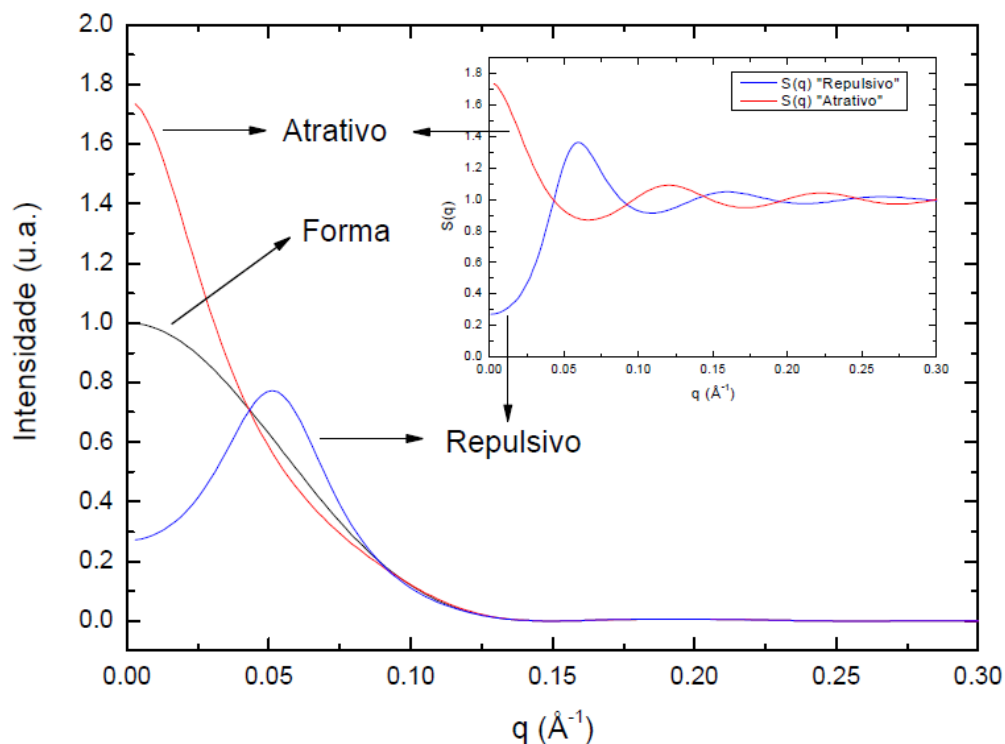


3.1.5. Função de Interferência $S(q)$

A partir da ideia de que existe uma relação inversa entre o vetor espalhamento q e a distância entre regiões espalhadoras, deduzimos que em baixo valores de q as distâncias entre partículas (neste caso, micelas) são observadas. Ressaltamos ainda que a intensidade é o quadrado da amplitude de espalhamento. Assim, quanto maior for essa intensidade, mais partículas estarão espalhando naquela distância específica.

Ao observarmos o gráfico na Figura 13, notamos que quando as partículas apresentarem um caráter atrativo (linha vermelha), ocorrerá um aumento de intensidade em baixo q . Entretanto, quando as partículas em análise sofrerem repulsões (linha azul), ocorrerá uma diminuição da intensidade nesta região da curva. No *inset* do gráfico encontram-se as funções de interferência atrativa e repulsiva [21].

Figura 13: Curva de SAXS de uma esfera ($R = 30 \text{ \AA}$). **Fonte:** Barbosa (2008) [21].



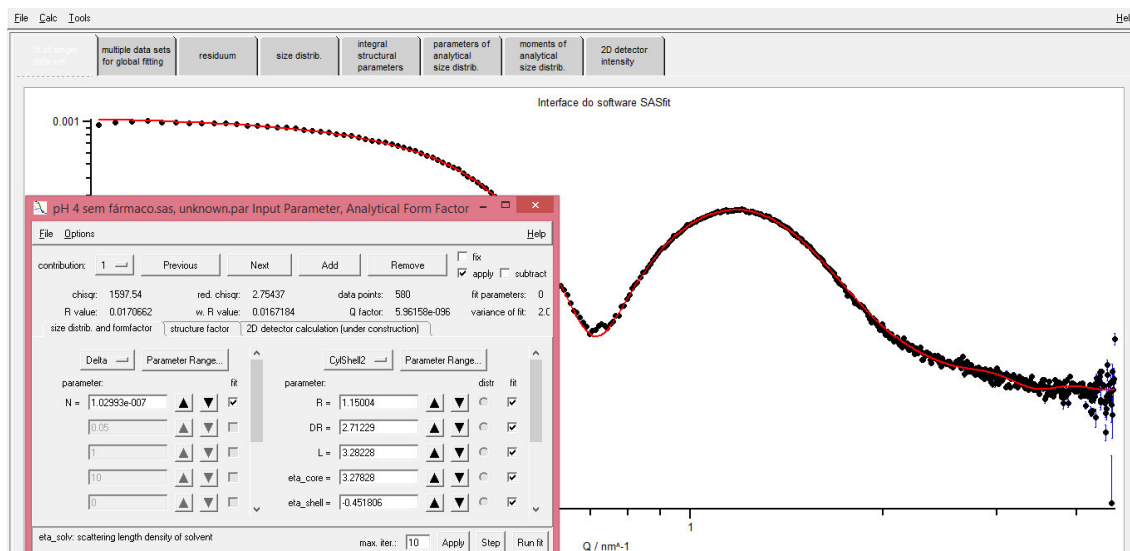
Para valores de q superiores a $0,1 \text{ \AA}^{-1}$, a função de interferência não terá efeitos consideráveis, uma vez que essa região será dominada pela forma da partícula e não pela distância entre elas.

3.1.6. Modelamento das curvas de SAXS

Existem vários programas gratuitos de análises de curvas produzidas a partir do espalhamento a baixo ângulo como o SasView, Genfit, SASfit, dentre outros.

O programa utilizado neste trabalho foi o SASfit, devido a sua fácil interação com o usuário. A Figura 14 mostra a interface do SASfit.

Figura 14: Interface do programa SASfit; A curva em preto são os dados experimentais e em vermelho os dados do modelamento. Na janela à esquerda é possível escolher o modelo (fator de forma) e manipula-lo, bem como, utilizar o fator de estrutura.



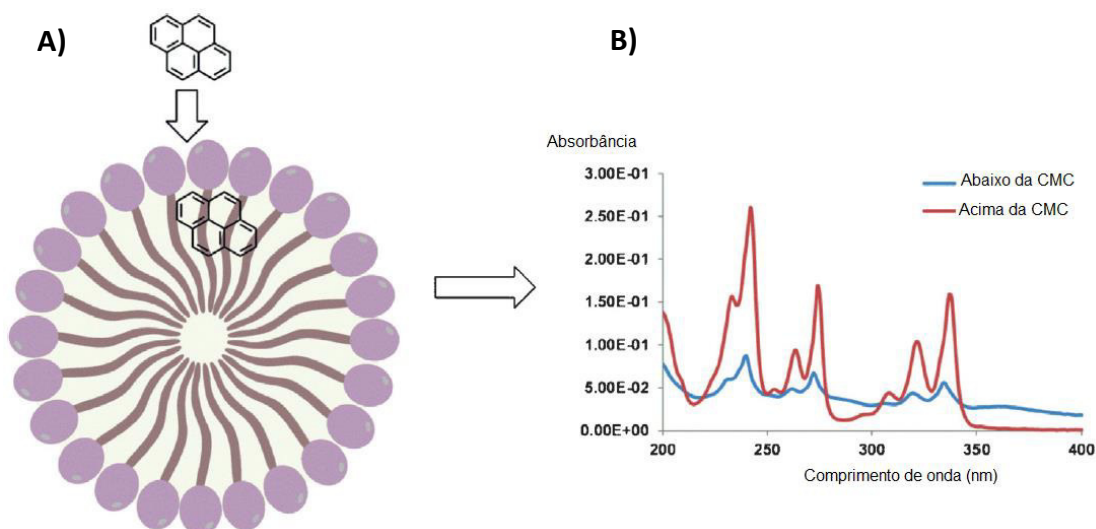
Este programa possui diversos modelos para que o usuário possa escolher o que melhor adequa-se ao seu dado experimental e caso um único modelo não seja suficiente, é possível adicionar mais de um modelo em uma mesma curva.

3.2. Espectrometria de Absorção na Região do Ultravioleta e visível

A determinação da concentração micelar crítica (CMC) por meio desse método foi citada pela primeira vez por Ray et al. [43] em 2006, e consiste em preparar soluções saturadas com corpo de fundo que serão filtradas posteriormente após a agitação com o tensoativo e, se possível, com a mesma massa da molécula sonda na solução. Em seguida, são utilizadas concentrações crescentes de tensoativo nas soluções anteriormente preparadas. Uma dessas soluções, ainda sem a presença do tensoativo, servirá de parâmetro para as demais medidas. Quando a absorbância aumenta, evidencia-se a formação das micelas, pois entende-se que o aumento da absorbância deve-se à solubilização de mais moléculas sonda na solução que, nesse caso, está intimamente relacionado à solubilização no interior das micelas. Na Figura 15 está representado o esquema de determinação da CMC. Esta última técnica é relativamente recente e tem se

mostrado eficiente na determinação de qualquer CMC, seja de tensoativos iônicos ou não iônicos.

Figura 15: (A) Representação da micela antes e depois da solubilização da molécula sonda em seu interior. (B) Espectros de absorvância em função do comprimento de onda, sendo que a curva em azul é o resultado da absorvância de uma solução saturada da molécula sonda sem a presença do tensoativo, e a curva em vermelho é a absorvância após a CMC. **Fonte:** adaptado de Fu et al (2015) [24].



A análise consiste na observação das bandas de absorvância que ocorrem na molécula sonda. À medida que a concentração desta molécula na solução aumenta, aumenta-se também a absorvância e, conseqüentemente, há um aumento nos picos. Portanto, a ideia é produzir uma solução saturada de uma determinada molécula que possua capacidade de realizar transições eletrônicas na região do UV-vis, sem a presença do tensoativo e depois, na presença deste, aumentando a sua concentração de forma progressiva até que ocorra um acréscimo da absorção. Esse aumento de absorção dos picos está relacionado à incorporação (solubilização) desta molécula sonda ao interior das micelas (região lipofílicas), portanto, é necessário que essa molécula de exploração tenha algum caráter apolar.

3.3. Estudo Téorico Computacional

Para um melhor entendimento da interação observada experimentalmente, realizamos um estudo teórico de otimização da estrutura dos fármacos e tensoativos. Nas últimas décadas, houve um rápido avanço na área computacional, seja pela produção de processadores mais rápidos e eficientes, seja pela capacidade de armazenamento de dados. Nesse sentido, surgiu uma área da ciência que utiliza softwares licenciados ou de domínio público e baseiam-se na química quântica [44]. Os estudos teóricos estão de acordo com os dados experimentais e, nesse sentido, são capazes de ajudar a entender os mecanismos de interação físico-químico e conseguem também diminuir o custo e o tempo em laboratório, pois podem haver simulações de interação entre constituintes e alterações de ligantes nos fármacos, caso seja necessário [45].

Modelagem molecular, segundo a IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry), é a investigação das estruturas e das propriedades moleculares pelo uso de química computacional e técnicas de visualização gráfica, visando fornecer uma representação tridimensional, sob um dado conjunto de circunstâncias [46]. Porém, a química teórica não se baseia apenas na mecânica quântica, várias informações relacionadas a sistemas moleculares podem ser obtidas a partir da utilização das leis da física clássica, nos chamados métodos de mecânica molecular. Estes métodos não utilizam explicitamente os elétrons em uma determinada estrutura molecular, pois os cálculos são realizados com base nas interações entre os núcleos [44]. As interações eletrônicas ficam implícitas em campos de força com os núcleos. Sendo assim, ao fazer essa simplificação, os cálculos tornam-se bem mais rápidos, possibilitando que eles sejam utilizados em sistemas que contém um número muito grande de átomos. No entanto, esses cálculos possuem diversas limitações, tornando-se não tão precisos.

Já os métodos *ab initio* são os que possuem as melhores aproximações da realidade e não utilizam dados experimentais. Dentre estes métodos, existem os que tentam achar respostas aproximadas da equação de Schrödinger, baseados em funções de onda, e a teoria do funcional de densidade (DFT), que se baseia na densidade eletrônica [47, 48].

Os métodos baseados na química quântica utilizam a resolução da equação de Schrödinger, independente do tempo:

$$E\psi = \hat{H}\psi \quad (26)$$

Sendo \hat{H} um operador que corresponde à energia total do sistema, ψ é a função de onda e E , a energia total do sistema. Tomando como base uma molécula qualquer, a fim de exemplificarmos, a equação pode ser expandida da seguinte forma:

$$\hat{H} = T_n + T_e + V_{ee} + V_{ne} + V_{nn} \quad (27)$$

Os termos T_n e T_e correspondem, respectivamente, à energia cinética dos núcleos e a dos elétrons. Os demais termos do lado direito da equação representam as energias potenciais coulombianas entre os elétrons, entre os núcleos e entre os elétrons e os núcleos.

A resolução da equação 26 é bastante complexa e somente possui solução exata para átomos hidrogenoides, isto é, átomos que possuem somente um próton e um elétron. Desse modo, há a necessidade do uso de aproximações para a resolução de problemas que exigem o cálculo de sistemas multieletrônicos [44].

Uma das aproximações utilizadas é a de Born-Oppenheimer [48], que se utiliza da relação de massa existente entre os núcleos e os elétrons, sendo o primeiro muito mais massivo do que os elétrons, devem os núcleos moverem-se bem mais lentamente. Portanto, é uma boa aproximação escrever que os núcleos estão fixos em determinadas regiões do espaço e os elétrons movem-se em um campo gerado por esses núcleos. Assim, a parcela que corresponde à energia cinética dos núcleos pode ser desconsiderada e a repulsão existente entre os mesmos pode ser considerada como constante, pois por meio dessa aproximação, as distâncias entre os núcleos permanecem inalteradas. A equação será:

$$\hat{H} = T_e + V_{ee} + V_{cons}$$

Em que $V_{cons} = V_{nn} + V_{ne}$; devido às posições nucleares fixas adotadas. Após adotar a aproximação de Born-Oppenheimer, é possível simplificar o problema e resolvê-lo com alguma metodologia conveniente, como a teoria de Hartree-Fock ou do funcional da densidade.

A DFT surgiu em 1964, por meio dos dois teoremas de Hohenberg e Kohn [49]. Mostrando que a partir da densidade eletrônica do estado fundamental é

possível calcular qualquer propriedade de um sistema e isso pode ser feito para qualquer sistema de muitas partículas interagentes sob a influência de um potencial externo $V_{\text{ext}}(\vec{r})$.

Cálculos computacionais *ab initio* são complexos e extensos para calcular sistemas moleculares com muitos átomos (dependem de computadores com ótima memória e processamento de dados), levando, na maioria das vezes, a longos períodos de cálculo. Para superar essas dificuldades, surgem os chamados métodos semi-empíricos. Estes, de um modo geral, utilizam as teorias dos métodos *ab initio* dos orbitais moleculares. Entretanto, muitos dos cálculos de integrais complicadas são evitados, ao fazer uso de certos dados experimentais, tornando os métodos semi-empíricos extremamente rápidos, se compararmos aos métodos *ab initio* [45]. No entanto, os métodos semi-empíricos possuem diversas limitações inerentes à sua natureza. Esclarecemos, dessa forma, que o método semi-empírico utilizado neste trabalho foi o PM3.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo Geral

Entender a interação entre micelas obtidas pelo tensoativo tween 80 em água e fármacos (carisoprodol e ibuprofeno) utilizando a técnica de SAXS.

4.2. Objetivos Específicos

1. Determinar a CMC do tween 80.
2. Comparar a absorvância do ibuprofeno e do carisoprodol ao variar a concentração de tensoativo.
3. Otimizar a estrutura do carisoprodol e do ibuprofeno por meio do DFT e do tensoativo tween 80 por meio do PM3, para obter os ângulos de ligação e as distâncias interatômicas.
4. Utilizar as técnicas de SAXS na interação de micelas com fármacos.
5. Variar o pH e a concentração dos fármacos.
6. Obter o R_g , $p(r)$, dimensões máximas das partículas e comparar as forças de atração e repulsão das micelas com e sem os fármacos, ao variar o pH.
7. Realizar o modelamento das curvas de SAXS.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. MATERIAL

Ibuprofeno, grau de pureza 98% (Sigma-Aldrich)

Ibuprofeno sódico

Carisoprodol, grau de pureza 98% (Sigma-Aldrich)

Tween 80 (Vetec)

5.2. Determinação da Concentração Micelar Crítica por Espectrofotometria de Absorção na Região do UV-Visível

Para a determinação da CMC dos sistemas micelares, utilizou-se um espectrofotômetro UV 1800 da Shimadzu, do Laboratório de Pesquisa em Materiais Híbridos (LPMH) da UFS, Campus Professor Alberto Carvalho, em Itabaiana-SE.

Os sistemas micelares com os fármacos foram preparados a partir de 0,0025 g de ibuprofeno em 10 mL de água destilada e aproximadamente 0,0050g de carisoprodol em 10 mL de água destilada. Em seguida, acrescentamos concentrações crescentes de tween 80 variando de 0 a $15 \cdot 10^{-2}$ mM. As soluções resultantes foram agitadas por duas horas e, posteriormente, filtradas para eliminar o corpo de fundo. Foi utilizada sempre como referência as soluções com água e tensoativo para a retirada do branco.

5.3. Medidas de SAXS e análise computacional

Os sistemas micelares foram caracterizados por meio da técnica de espalhamento de raios X a baixos ângulos (SAXS), no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) na estação de medida D11-A localizado na cidade de Campinas-SP. A linha utilizada possui um monocromador de silício com comprimento de onda de 1,499 Å com uma câmara ionizante, um detector vertical, e um analisador multicanal para registrar a intensidade de espalhamento. O modelamento das curvas obtidas por SAXS foi feito com auxílio do software sasview 3.0.

Inicialmente, realizamos um estudo sistemático em função da quantidade de tween 80 em solução tampão de pH 4 (ácido acético com acetato de sódio). Foram estudadas as seguintes concentrações: 1, 5, 10, 20, 30, 40 e 50 mM. Após definida a concentração ideal do tensoativo (30 mM), fizemos um estudo sistemático variando a concentração de Ibuprofeno, Ibuprofeno de sódio e Carisoprodol, conforme apresentado na Tabela 1. Soluções sem fármacos foram preparadas e utilizadas como referência. Na preparação de soluções a pH 7 utilizamos água destilada e a pH 9 utilizamos uma solução tampão de amônia com cloreto de amônio.

Tabela 1: Dados que foram variados para fazer medidas de SAXS.

pH	Tween 80 (mM)	Ibuprofeno (mM)	Ibuprofeno sódico (mM)	Carisoprodol (mM)
4	30	5	5	5
		10	10	10
		20	20	-
		30	30	-
7		5	5	5
		10	10	10
		-	20	-
		-	30	-
9		5	5	5
		10	10	10
		20	20	-
		30	30	-

Para a análise computacional, optamos pelo software GAUSSIAN na versão 03 [49]. Os cálculos foram realizados no Laboratório do Departamento de Física da Universidade Federal de Sergipe, Campus Prof. Alberto Carvalho, Itabaiana-SE.

6. Resultados e discussões

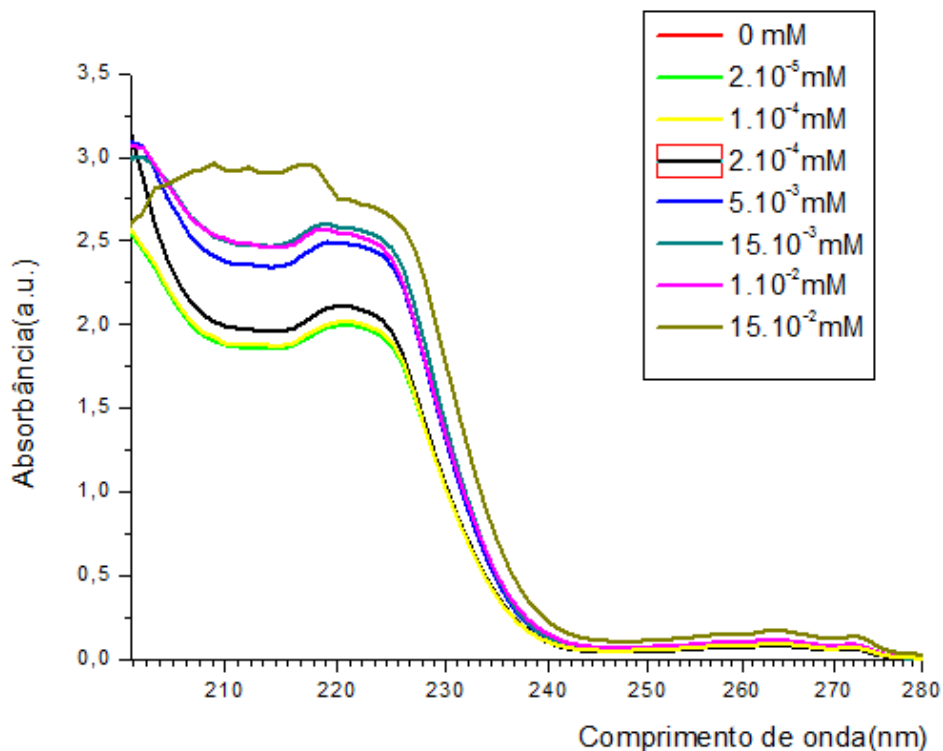
6.1. Determinação da concentração micelar crítica

A Figura 16 apresenta os espectros de absorvância de ibuprofeno em solução aquosa com quantidades crescentes de tween a pH 7. Todas as soluções possuem inicialmente a mesma massa de ibuprofeno.

A curva em vermelho representa a absorvância do ibuprofeno em solução aquosa, sem a presença do tensoativo. Ela está sob as curvas com concentrações de tensoativo iguais a $2 \cdot 10^{-5}$ e $1 \cdot 10^{-4}$ mM. Esta sobreposição evidencia que nessas concentrações ainda não há formação de micelas, pois não ocorreu aumento na intensidade das bandas e, conseqüentemente, não houve aumento da solubilização do fármaco na solução. Porém, entre as concentrações de $1 \cdot 10^{-4}$ e $2 \cdot 10^{-4}$ mM (valor da CMC) houve um aumento da absorvância, isto é, um aumento no número de moléculas de ibuprofeno na solução. Esse fato é atribuído à formação das micelas (CMC), que passaram a solubilizar o fármaco em sua estrutura. Este valor está de acordo com o encontrado por Fu et al [24].

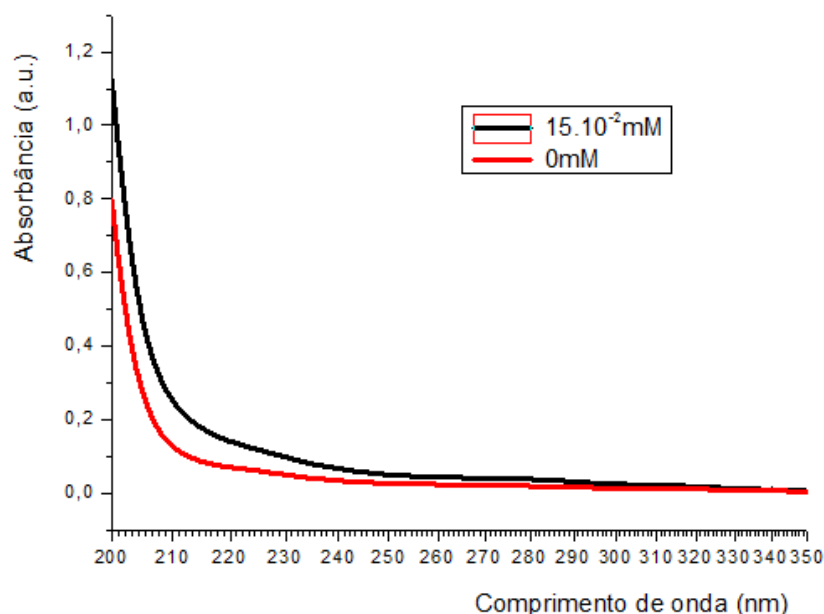
A partir da CMC do tensoativo, houve um aumento progressivo da solubilidade do ibuprofeno, pois quanto mais micelas (maior concentração de tensoativo), mais ibuprofeno dissolvido em seu interior. Desta maneira, podemos utilizar os tensoativos para aumentar a solubilidade de fármacos e, assim, melhorar a sua biodisponibilidade, além das micelas funcionarem como nanocarregadores que podem diminuir os efeitos colaterais com a redução da dose do fármaco. Como o objetivo é determinar a CMC, não foi necessário utilizar o ibuprofeno sódico, diante da possibilidade de realização por meio do ibuprofeno.

Figura 16: Espectro de absorvância do ibuprofeno em função do comprimento de onda com aumento da concentração de Tween 80 em pH 7, partindo da solução concentrada de ibuprofeno, sem a presença do tensoativo (referência) e aumento gradativo da concentração do tensoativo.



O carisoprodol, assim como o ibuprofeno, foi testado quanto à absorvância. A Figura 17 mostra a absorvância do carisoprodol em solução aquosa com e sem tween. Como podemos observar, a maior concentração de tween utilizada com o ibuprofeno ($15 \cdot 10^{-2}$ mM) não favoreceu o aumento da absorvância. Estes resultados sugerem a baixa solubilização do número de moléculas de carisoprodol na solução.

Figura 17: Absorbância do carisoprodol em função do comprimento de onda, variando somente a concentração de tween 80.



Ao analisarmos as estruturas de ambos os fármacos (Figuras 4 e 5), verificamos que o carisoprodol possui grupos polares nas extremidades e a região hidrocarbonada tem apenas cinco átomos de carbonos no centro da molécula. Já o ibuprofeno possui uma região apolar bem expressiva com a presença do anel benzênico, tornando-o mais solúvel no interior das micelas.

6.2. Análise Computacional

A Figura 18 apresenta a imagem da molécula de tween 80 otimizada. O método computacional utilizado para o tween 80 foi o PM3, tendo em vista que esse tensoativo possui um número relativamente grande de átomos, e seria inviável a sua realização por qualquer método *ab initio*.

Os resultados da análise teórica do tensoativo estão descritos na Tabela 2. O carbono α -CH₂ está ligado diretamente ao carbono que possui a carbonila na estrutura do tween 80. Todos os átomos de carbono e de hidrogênio que pertencem ao raio polar possuem cargas de carácter positivo evidenciando a predominância da região polar em relação à apolar em termos de tamanho. Para que haja uma interação mais eficiente entre tensoativo-fármaco, é essencial que o fármaco tenha uma relativa polaridade em alguma região da

molécula (aproximar-se da região polar do tensoativo), pois as interações dipolo-dipolo e/ou ligações de hidrogênio são interações de maior distância, como por exemplo, entre moléculas. Após a aproximação destes, o fármaco deve possuir uma região apolar bem definida, uma vez que, como observado na Figura 18, a região apolar desse tensoativo fica muito distante da superfície da micela e, como as interações de dipolo-induzido são mais fracas, é necessária uma região apolar bem expressiva, para que haja interação entre ambos.

Figura 18: Imagem da molécula de tween 80 otimizado pelo método PM3. Os átomos de carbono estão representados pela cor cinza, os de hidrogênio na cor branca, os átomos de oxigênio na cor vermelha e os de nitrogênio na cor azul

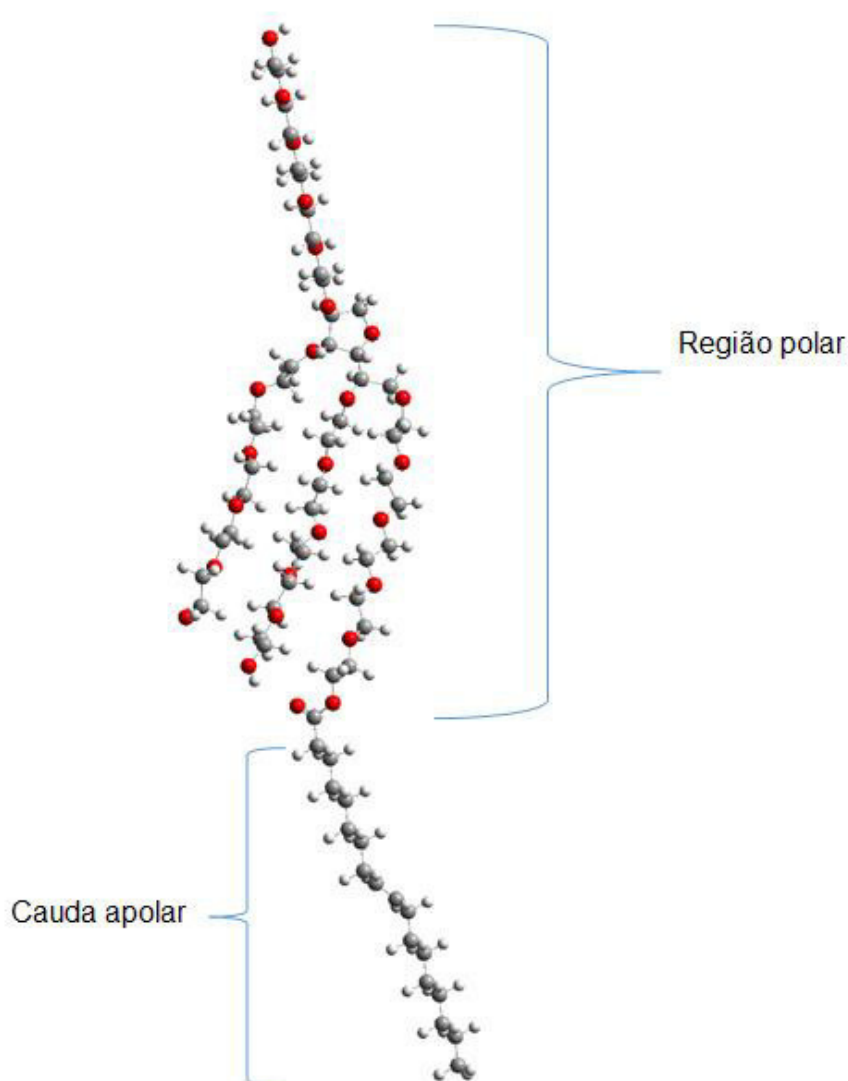
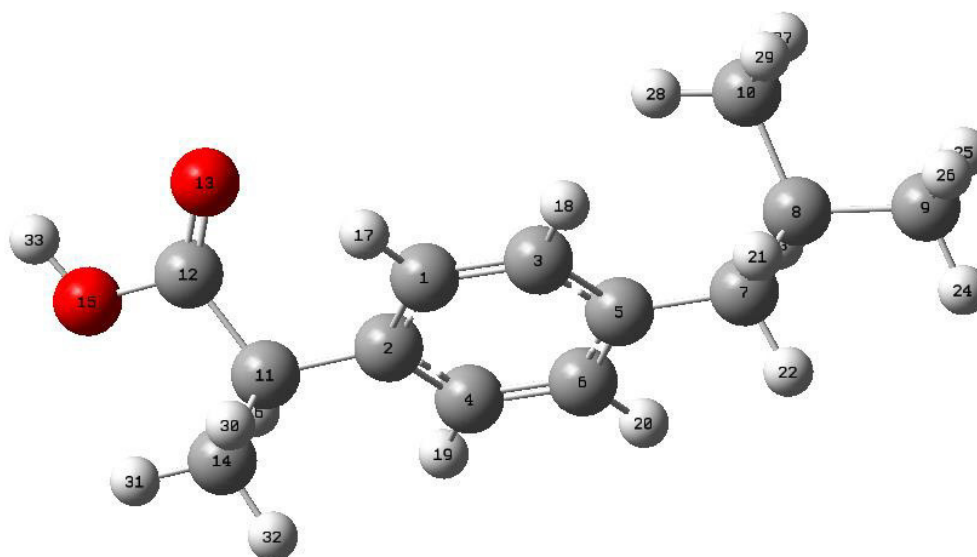


Tabela 2: Resultados da análise teórica do tween 80.

Tween 80	
Comprimento da cauda apolar (C_{ap}) em Å	19,8
Comprimento da cabeça polar (C_{pol}) em Å	30,2
Largura da cabeça polar em Å	9,8
Comprimento do tween 80 em Å	53,87
Carga no α -CH ₂ (e)	-0,104
Carga no carbono da carbonila (e)	+0,382
Carga média dos átomo de oxigênio da função éter (e)	-0,255
Ângulo C _{Alquil} -C _{carbonila} -O _{ligado a cadeia polar} (°)	114,78
Ângulo de torção para o raio apolar (°)	118,3

Além do tensoativo, a otimização das estruturas moleculares do ibuprofeno e do carisoprodo foi realizada pelo método do DFT. Este método é mais preciso que o PM3 e possibilitou a realização do cálculo, graças ao reduzido número de átomos contidos nestas moléculas. A molécula de ibuprofeno é mostrada na Figura 19 e os dados, na Tabela 3.

Figura 19: Imagem da molécula de ibuprofeno otimizada com o método do DFT

Todos os átomos de carbono, com exceção do carbono 12 (+0,63), possuem cargas negativas e os átomos de hidrogênio possuem cargas positivas, devido às suas respectivas eletronegatividades. Vale ressaltar que as cargas sobre os átomos de carbono e hidrogênio da região apolar são bem

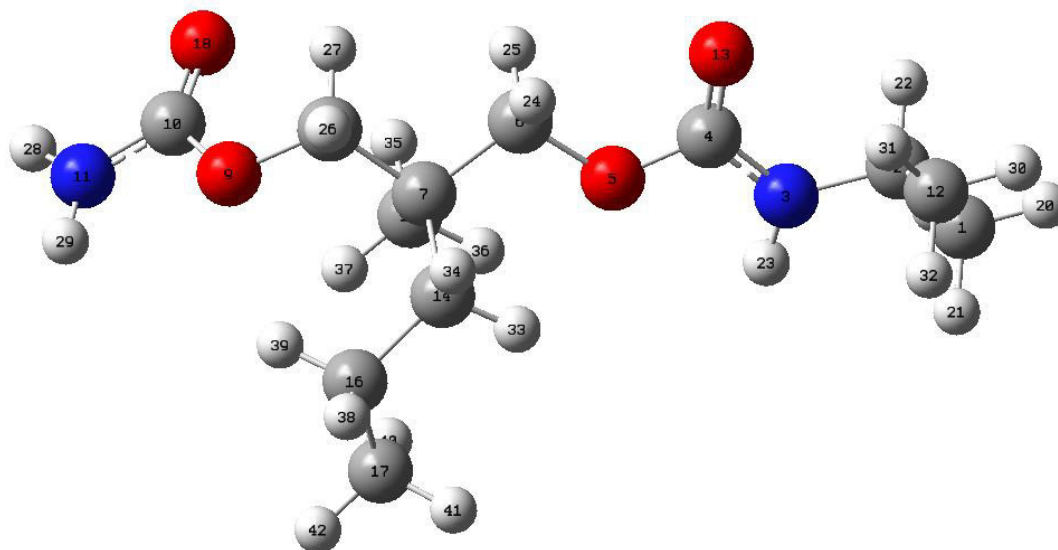
menores (dipolo-induzido) por isso, as interações são de curtas distâncias, como mencionado anteriormente.

Tabela 3: Dados obtidos por meio do método DFT para o ibuprofeno.

Ibuprofeno	
Comprimento apolar (C_{ap}) em Å	8,08
Comprimento polar (C_{pol}) em Å	1,94
Diâmetro em Å	10,02
Carga no α -CH ₂ (e)	-0,471
Carga no carbono da carbonila (e)	+0,922
Carga sobre o oxigênio da carbonila (e)	-0,608
Carga sobre o oxigênio da hidroxila (e)	-0,718

O carisoprodol é mostrado na Figura 20 e possui um comprimento apolar correspondente a 3,55 Å, tomando como referência a distância do carbono 7 ao 17. Estes carbonos foram utilizados como parâmetro devido às suas características como pequenas cargas negativas e positivas em seus respectivos átomos de carbono e hidrogênio (características de ligações intermoleculares do tipo dipolo-induzido). Podemos, então, notar a pouca expressividade da cadeia apolar desse fármaco, o que dificulta a sua interação com o interior das micelas. Esta dificuldade de interação pode ser comprovada com as medidas de UV-vis e reafirmada pelos resultados de SAXS. Além disso, exaltamos o fato de que não houve aumento de solubilidade do carisoprodol com a adição das micelas, o que corrobora com a ideia de que para que um determinado fármaco possa interagir com maior eficácia com alguma micela é necessária a existência de uma região apolar expressiva.

Figura 20: Imagem da molécula de carisoprodol otimizada com o método do DFT.

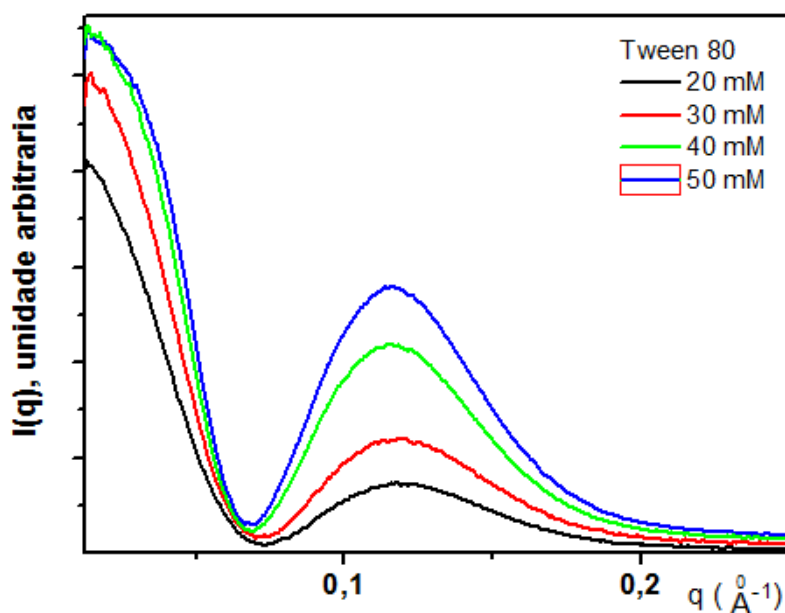


6.3. Análise das curvas de SAXS

6.3.1 Escolha da concentração do tensoativo

Para a realização das medidas de SAXS foi necessário determinar a melhor concentração do tensoativo. A Figura 21 mostra as curvas de espalhamento para soluções com quantidades crescentes de tween 80 a pH 4. É possível verificarmos o aumento da intensidade de espalhamento com a concentração. Entretanto, em concentrações menores que 20 mM (não apresentado), não observamos uma boa resolução nas curvas, pois nessas regiões há uma redução da intensidade devido a menor concentração de micelas em solução. Por meio da Figura 21 também podemos observar um largo pico em torno de 0,12 Å, que está associado à formação de micelas. Devido à boa qualidade da curva na concentração de 30 mM, esta foi utilizada como concentração padrão para realizar as demais medidas.

Figura 21: Curvas de espalhamento das micelas, formadas por tween 80 em concentrações crescentes no pH4.

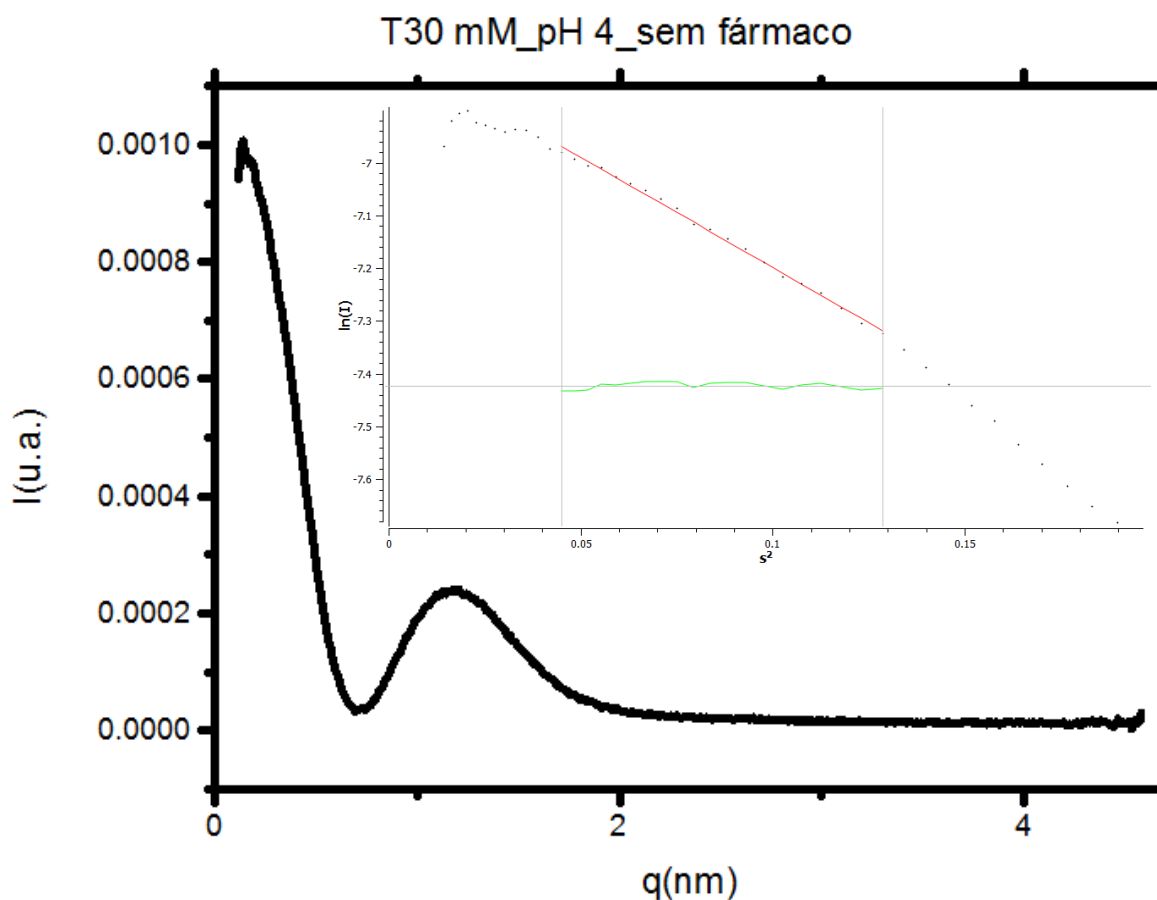


6.3.2. Influência da quantidade e da natureza dos fármacos

Inicialmente, percebemos a relação entre a concentração de ibuprofeno e de ibuprofeno sódico em pH 4 e a alteração no tamanho das micelas. O carisoprodol não alterou a micela, uma vez que as curvas permaneceram sobrepostas e sem alteração, confirmando os resultados de espectroscopia por UV-Vis e análise computacional desta molécula. Dessa forma, a suas curvas não serão mostradas aqui.

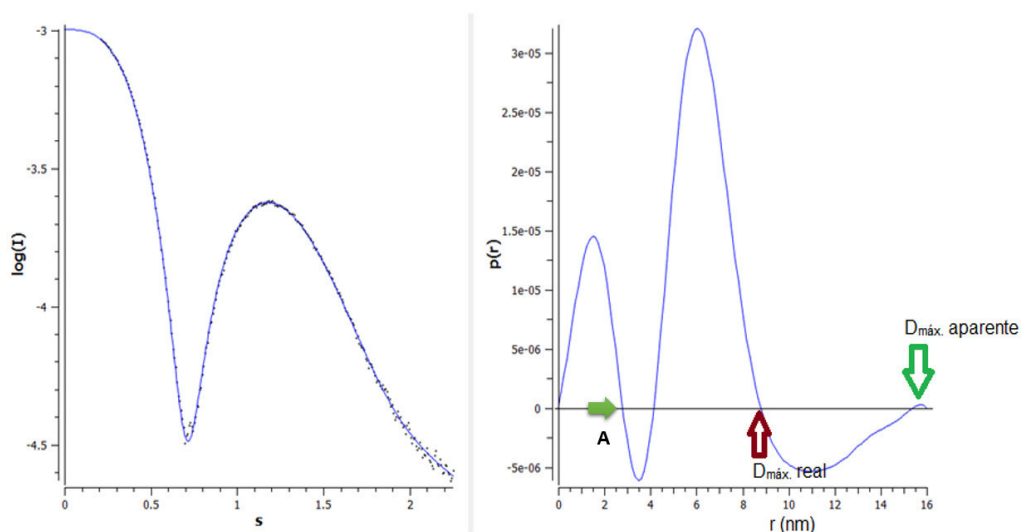
Parâmetros como o Raio de giro (R_g) foram obtidos através do programa Primus, como descrito na Figura 22, em que são selecionados os dados a serem analisados e o programa faz uma extrapolação da reta a baixo ângulo, para determinar o I_0 e o R_g . Existem o modo automático e o manual, em que o usuário seleciona os dados com os quais deseja trabalhar, respeitando $qR_g \leq 1$ para ser válida a lei de Guinier.

Figura 22: Interface do programa Primus na análise do raio de giro. No inset do gráfico está representada a reta por meio do $\ln(I)$ por q^2 .



A função de distribuição de pares de distância também pode ser obtida por meio do programa Primus. A Figura 23 mostra a interface, na qual é possível encontrar o diâmetro máximo da partícula e obter a distância de micelas vizinhas.

Figura 23: Interface do programa Primus na determinação da função $p(r)$. No lado esquerdo estão os dados experimentais obtidos do SAXS e no lado direito está descrito a $p(r)$ por r , em que o diâmetro máximo real e aparente é verificado no $p(r)$ igual a zero.



Os dados de R_g e de diâmetro máximo dos sistemas micelares preparados em pH 4 são apresentados na Tabela 4. A partir dos dados, podemos notar que tanto os valores de R_g quanto o de diâmetro máximo aumentaram devido à inserção de moléculas de ibuprofeno e de ibuprofeno sódico nas micelas.

Nos sistemas formados por micelas sem fármacos, o valor do R_g foi de 35,4 Å e o diâmetro máximo de 88 Å. À medida que a concentração dos fármacos aumenta na solução, há um aumento destes valores, evidenciando que os fármacos agregaram-se dentro da estrutura micelar (interação fármaco-tensoativo), corroborando com a técnica de UV-vis.

Verificamos que na Figura 23 há dois valores de diâmetro máximo, sendo o diâmetro máximo real, a maior distância existente dentro da micela, e a distância real aparente, que está relacionada com a distância entre as micelas (função de interferência) em solução. O valor obtido foi de 72 Å.

Tabela 4: Valores de Raio de giro e do diâmetro máximo da partícula espalhadora em função da concentração do fármaco, mantendo a concentração do tensoativo constante em 30 mM e pH 4.

	Ibuprofeno (mM)	Rg (Å)	D _{máx} (Å)	Ibuprofeno sódico (mM)	Rg (Å)	D _{máx} (Å)
pH 4	0	35,4	88,0	0	35,4	88,0
	5	37,6	93,2	5	37,6	93,0
	10	47,3	116,7	10	56,5	120,8*
	20	53,1	120,0*	20	78	124,8*
	30	56,9	121,4*	30	78,3	126,4*

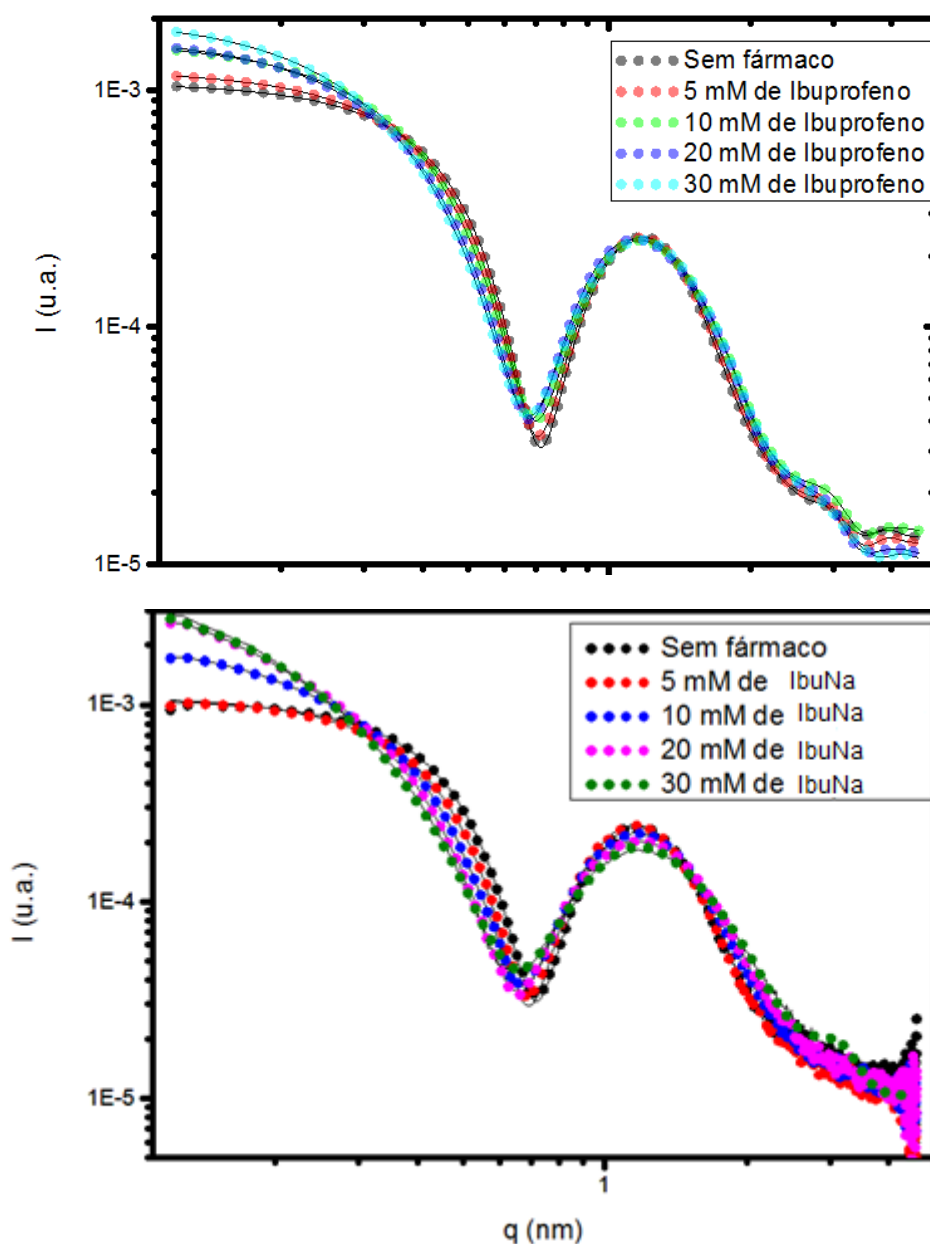
Os dados com asterisco não puderam ser obtidos diretamente do programa Primus, devido à forte função de interferência à medida que aumentamos a concentração de ambos os fármacos. Esses dados foram obtidos com ajuda dos modelamentos das curvas com o programa SASfit.

A Figura 24 apresenta as curvas de intensidade de espalhamento em função do vetor espalhamento para sistemas micelares preparados em função da concentração dos diferentes fármacos a pH 4.

A partir da figura é possível observarmos que com o aumento da concentração do ibuprofeno e do ibuprofeno sódico, a curva é deslocada para menores valores de q , indicando que há um aumento das distâncias entre os centros espalhadores (aumento da partícula). Estes resultados estão em concordância com os dados obtidos pelo programa Primus e o SASfit.

Ainda com relação à Figura 24, podemos verificar que quanto maior a concentração de fármaco à pH 4, mais atrativas tornam-se as micelas entre si, pois ocorre um aumento crescente da intensidade a baixo ângulo à medida que são incorporados os fármacos.

Figura 24: Curvas de SAXS das micelas preparadas com concentração de 30 mM de tween 80 a pH 4, variando a concentração de ibuprofeno e ibuprofeno sódico.



Utilizando como referência as concentrações de 30 mM dos fármacos na Tabela 4, verificamos que tanto o ibuprofeno quanto o ibuprofeno sódico aumentaram o R_g . No caso do primeiro, o R_g foi aumentado em 60% e o segundo em 121%.

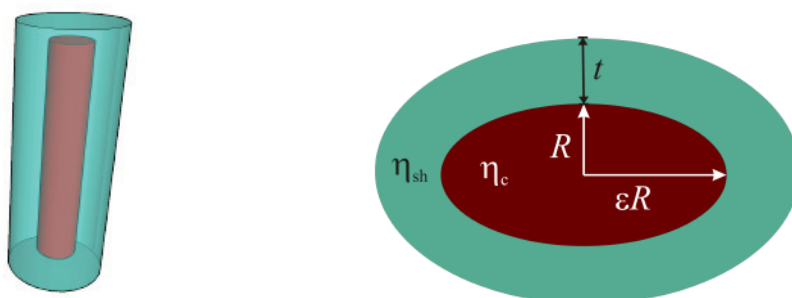
Esses fatos podem ser muito bem entendidos com os dados das tabelas 5 e 6, que contém o modelamento das curvas. Nelas, percebemos um aumento no alongamento interno das micelas, principalmente nas micelas em que há

interação com o ibuprofeno sódico. O pH 4 pode ter contribuído para a protonação dos grupos éteres contidos no tensoativo, bem como o oxigênio com carga negativa ligado à carbonila no sal de ibuprofeno, tornando-os efetivamente mais atraídos para a superfície da micela, após a aproximação da cabeça da micela com o sal, agora protonado.

A região apolar das moléculas de ibuprofeno foi atraída para o interior do agregado de tensoativos. O que ocorre nesse caso é a interação dipolo-induzido (interação de menor intensidade e, portanto, de mais curta distância), confirmando a ideia da importância de uma região de carácter apolar. Com relação ao diâmetro máximo, o ibuprofeno teve um aumento de 40 %, enquanto o ibuprofeno sódico teve um aumento de 43,6 %, ambos tendo como referência as micelas sem fármacos. Verificamos, no que diz respeito ao diâmetro, que ambos os fármacos apresentaram o mesmo aumento em relação à micela de referência (antes da inserção dos fármacos). A pouca ou nenhuma alteração do carisoprodol no Rg e no diâmetro máximo da micela indica que a interação micela-fármaco, neste caso, é apenas de no máximo de superfície (região polar). Este fármaco, como já mostrado na Figura 20, possui cauda apolar muito curta na molécula, ou seja, uma estrutura incapaz de penetrar no interior das micelas de tween 80.

Os dados dos modelamentos realizados por meio do software SASfit estão apresentados nas Tabelas a seguir. O modelo utilizado para a realização do fit foi o de orientação cilíndrica aleatória na casca com elipse interna (ellcylshell2), visível na Figura 25.

Figura 25: Representação do modelo utilizado para modelamento das curvas mostradas nas figuras 24 e 28. Sendo R e L, respectivamente, o raio e o comprimento da região apolar da micela; ΔR a espessura da casca polar e ε é a excentricidade da seção transversal.



Os dados dos modelamentos das curvas em pH 4 estão representados nas Tabelas 5 e 6 e que η_{sh} e η_c são, respectivamente, comprimento da densidade de espalhamento do cilindro interno e externo.

Tabela 5: Modelamento das micelas formadas por tween 80 na concentração de 30 mM e em pH 4 com a adição crescente de ibuprofeno.

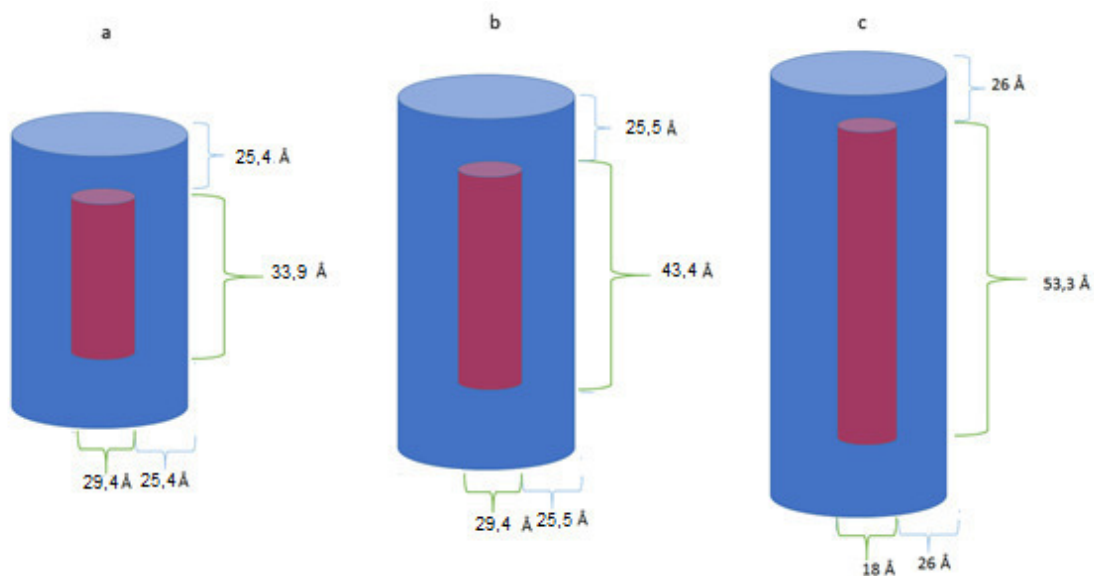
Sistema/Forma elcylshell2 Ibuprofeno	R: Raio do núcleo (Å)	ΔR : Espessura da casca (Å)	L: Comprimento do cilindro (Å)	η_{sh} ($e/\text{Å}^3$)	η_c ($e/\text{Å}^3$)	ϵ
0	15,2	25,4	33,9	0,35	0,20	0,65
5	20,5	18,5	45,2	0,37	0,22	0,62
10	16,0	23,9	42	0,35	0,18	0,54
20	17,2	23,8	40,1	0,35	0,17	0,51
30	14,7	25,5	43,4	0,35	0,17	0,52

Tabela 6: Modelamento das micelas formadas por tween 80 na concentração de 30 mM e em pH 4 com a adição crescente de ibuprofeno sódico.

Sistema/Forma elcylshell2 Ibuprofeno sódico (mM)	R: Raio do núcleo (Å)	ΔR : Espessura da casca (Å)	L: Comprimento do cilindro (Å)	η_{sh} ($e/\text{Å}^3$)	η_c ($e/\text{Å}^3$)	ϵ
0	15,2	25,4	33,9	0,35	0,20	0,65
5	21,0	16,7	48,6	0,38	0,22	0,71
10	19,0	21,0	48,6	0,36	0,21	0,50
20 (cylshell2)	10,1	25,9	50,7	0,34	0,22	-
30 (cylshell2)	9	26,0	53,3	0,34	0,18	-

Sabendo que o SAXS é sensível a diferença de densidade eletrônica, podemos deduzir que o ponto **A**, na Figura 23, indica a maior distância da casca polar da micela. Com base nos dados dos modelamentos, podemos representar o modelo e verificar com mais clareza o que ocorreu com as micelas após a inserção dos fármacos. Observemos a Figura 26, em que mostramos como ocorreu a alteração da micela.

Figura 26: Representação das micelas, em que **a** é o tween 80 na concentração de 30 mM sem a presença de fármacos e **b** e **c** são, respectivamente, as micelas com 30 mM de ibuprofeno e 30 mM de ibuprofeno sódico.



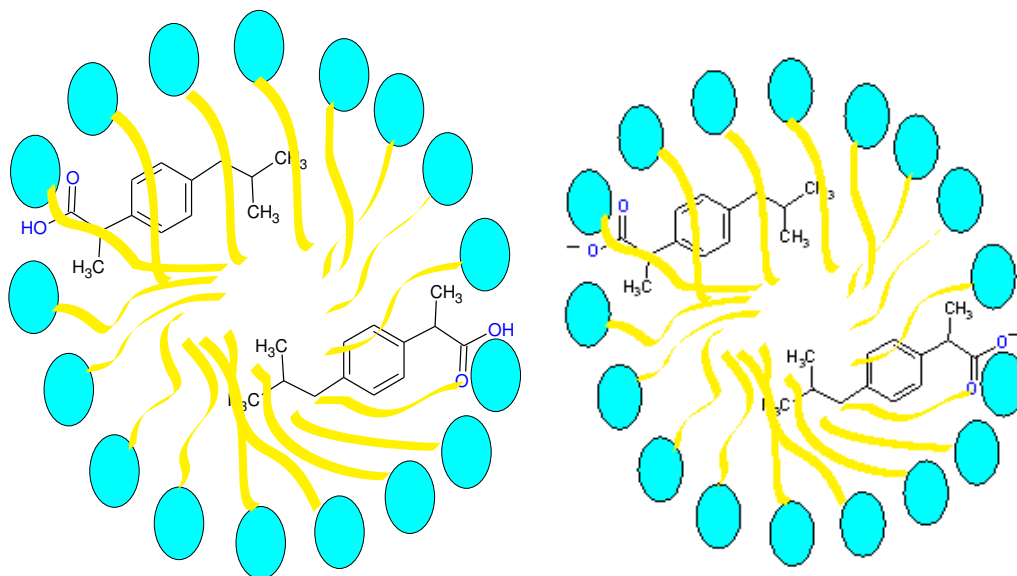
A inserção dos fármacos fez com que as micelas fossem alongadas e não alargadas, ou seja, aumentaram o seu comprimento em um único eixo, corroborando com a ideia de que tanto o ibuprofeno quanto o ibuprofeno sódico solubilizam-se basicamente no interior dessas micelas e não somente na casca, pois caso os fármacos tivessem predominantemente solubilizado na casca, teria ocorrido um aumento do volume destas no sentido horizontal e não vertical, como mostra a figura 26, e isto não aconteceu. A micela funcionou então como um nanoreservatório (mantendo o ibuprofeno e o ibuprofeno sódico agregados no interior de sua estrutura) para estes fármacos em pH 4. Ainda com relação a este pH, destacamos a leve redução da densidade eletrônica do núcleo mostrada nas Tabelas 5 e 6, em decorrência do aumento no comprimento da micela, uma vez que, à medida que os fármacos dissolviam-se no interior desses agregados, estes forçavam os tensoativos que compõem a micela a reorganizarem-se de modo que pudessem abranger uma maior área de contato com o meio externo e isso levou à redução de densidade. Podemos ainda perceber que ambos os fármacos produziram inicialmente aumento no diâmetro do núcleo da micela, porém à medida que a concentração destes

fármacos crescia, ocorria progressivas reduções no raio interno, sendo este efeito de redução mais pronunciado com o ibuprofeno sódico.

As concentrações de 20 e 30 mM de ibuprofeno sódico promoveram alteração na forma da micela, passando para um cilindro interno (cylshell2). Essa alteração ocorreu devido ao aumento na concentração dessas moléculas na interface polar-apolar da micela formada pelo tween 80, pois as moléculas deste fármaco possui um dipolo interno e a atração entre essas moléculas fizeram com que a elipse torna-se um cilindro.

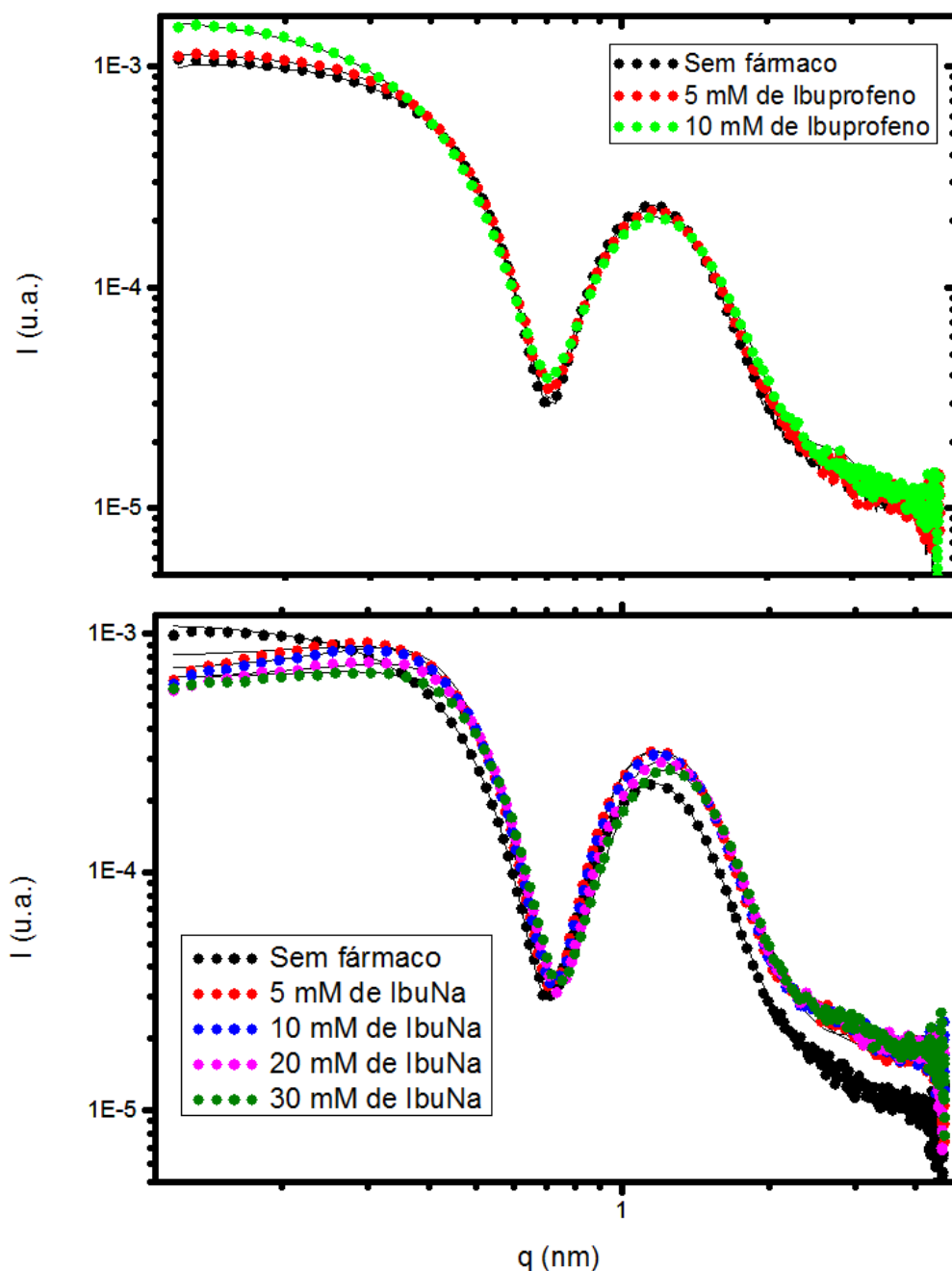
Na presença do pH 7, conforme mostramos na Figura 28, percebemos que a interação das micelas com o ibuprofeno faz com que elas se tornem muito mais atrativas entre si, tendo em vista que é possível observarmos um claro aumento de intensidade a baixo ângulo. Entretanto, a interação das micelas com o ibuprofeno sódico, neste pH, ocasionou uma forte repulsão entre as micelas e isso prejudicou a obtenção do R_g , uma vez que a lei de Guinier é válida para valores na região de $qR_g \leq 1$. No que se refere ao tamanho das micelas, é possível verificarmos que houve um aumento no R_g destas com ibuprofeno, passando de 36,4 para 44,9 Å. Com relação ao seu diâmetro máximo, houve um aumento de 89,2 para 112,2 Å. Vale ressaltar aqui que este último valor é referente à micela de tween 80 com apenas 10 mM de ibuprofeno, tendo em vista que este apresentou problemas de solubilidade nesse pH. O ibuprofeno sódico, como visto na Figura 28, provocou uma redução do diâmetro máximo da micela, devido ao deslocamento das curvas de SAXS para maiores ângulos. A repulsão entre as micelas na interação com o ibuprofeno sódico e a atração, quando interagem com o ibuprofeno, ambos os sistemas no pH 7, podem ser explicadas conforme o modelo de interação fármaco-micela mostrado na Figura 27.

Figura 27: Representação das micelas com ibuprofeno (à esquerda) e ibuprofeno sódico (à direita), em pH 7. As elipses na cor azul representam a cabeça polar do tensoativo (camada polar) e as tiras na cor amarela representam a cauda apolar (meio hidrofóbico).



Inferimos, então, que tanto o ibuprofeno quanto o ibuprofeno sódico estão com os seus respectivos grupos polares na interface casca-núcleo das micelas, ao passo que a região apolar desses fármacos está voltada para o interior hidrofóbico, devido às respectivas ligações intermoleculares. Entretanto, em pH neutro, observamos que o ibuprofeno sódico deixa a camada polar com uma carga negativa (Figura 27 à direita) e isso é o que ocasiona o aumento das repulsões entre as micelas, quando estão interagindo com esse fármaco. Já o ibuprofeno, de acordo com a Tabela 3 (vista anteriormente), apresenta um dipolo por meio do seu grupo funcional ácido carboxílico, tornando as micelas que possuem este fármaco mais atrativas entre si.

Figura 28: Curvas de SAXS das micelas de tween 80 na concentração de 30 mM e pH 7, variando a concentração de ibuprofeno e ibuprofeno sódico.



Os dados das micelas com o ibuprofeno em pH 7 obtidos com os modelamentos das curvas estão apresentados na Tabela 7. Por meio desses dados, entendemos que a interação das micelas com o ibuprofeno provoca um estreitamento no diâmetro apolar, o cilindro paranífcico permanece na mesma ordem de tamanho e como consequência, surge um aumento na densidade eletrônica da região apolar.

Tabela 7: Modelamento das curvas de tween 80 na concentração de 30 mM e em pH 7, interagindo com o ibuprofeno.

Sistema/Forma (ellcylshell2) Micela de tween 80_pH 7	R: Raio do núcleo (Å)	ΔR : Espessura da casca (Å)	L: Comprimento do cilindro (Å)	Eta_core ($e/\text{Å}^3$)	Eta_shell ($e/\text{Å}^3$)	ϵ
Sem fármaco	19,2	22,1	38,0	0,25	0,35	0,60
Ibuprofeno 5 mM	14,7	25,4	38,0	0,26	0,35	0,67
Ibuprofeno 10 mM	11,8	26,9	38,4	0,28	0,34	0,78

As micelas de tween 80 que interagiram com o ibuprofeno sódico também tiveram o raio do núcleo apolar e o cilindro interno reduzido após a inserção deste fármaco. Contudo, a espessura da casca polar sofreu um leve aumento em seu tamanho à medida que se aumentava a concentração do ibuprofeno sódico e como consequência, podemos notar que ocorreu uma redução acentuada na densidade eletrônica desta região. Essas reduções podem ser atribuídas à aproximação dos grupos polares contidos na casca da micela, em direção à interface núcleo-casca, que conterá um dipolo permanente (o carbono da carbonila com carga positiva e os átomos de oxigênio ligados a este com cargas negativas), como pode ser visualizado por meio da Figura 31.

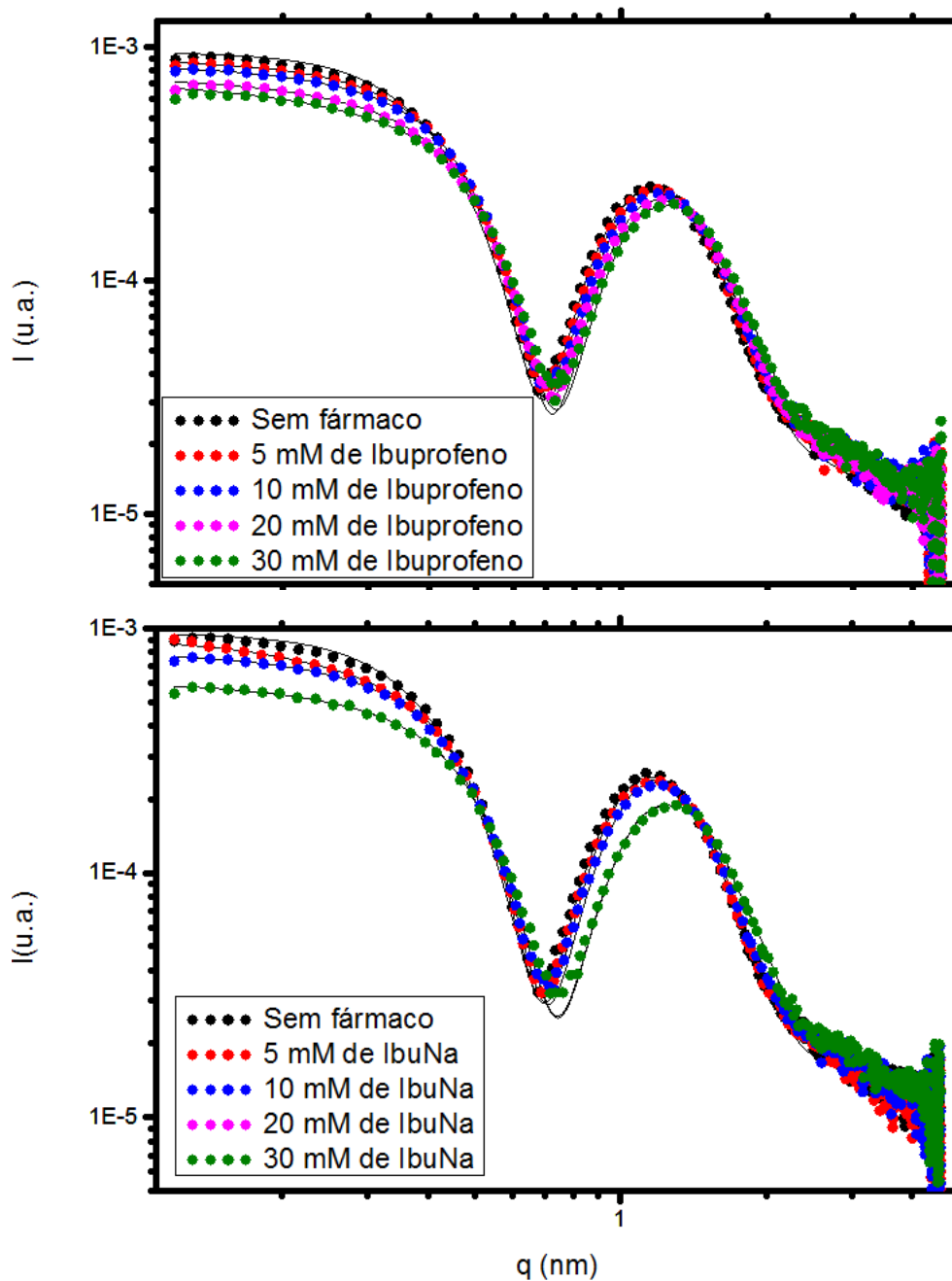
Tabela 8: Modelamento das curvas de tween 80 na concentração de 30 mM e em pH 7, interagindo com o ibuprofeno sódico.

Sistema/Forma (cylshell2) Micela de tween 80_pH 7	R: Raio do núcleo (Å)	ΔR : Espessura da casca (Å)	L: Comprimento do cilindro (Å)	Eta_core ($e/\text{Å}^3$)	Eta_shell ($e/\text{Å}^3$)	ϵ
Sem fármaco	19,2	22,1	38,0	0,25	0,35	0,6
Ibuprofeno sódico 5 mM	11,8	27,4	30,0	0,17	0,35	-
Ibuprofeno sódico 10 mM	12,0	26,0	31,6	0,18	0,35	-
Ibuprofeno sódico 20 mM	12,0	25,1	30,5	0,18	0,35	-
Ibuprofeno sódico 30 mM	11,7	24,6	31,3	0,18	0,35	-

Ainda com relação as análises obtidas em pH 7, com a inserção do ibuprofeno sódico, podemos ver que a inserção deste fármaco provocou alteração no fator de forma da micela, saindo de uma seção elíptica transversal para um cilindro interno, como ocorreu no pH 4 nas concentrações de 20 e 30 mM deste mesmo fármaco.

Continuando com as análises, agora em pH 9, observamos um efeito contrário em relação ao tamanho das micelas, se compararmos com o que ocorreu em pH 4, isto é, à medida que aumentamos a concentração de ibuprofeno e de ibuprofeno sódico, verificamos uma pequena redução no R_g e no diâmetro máximo das partículas (um deslocamento para maiores valores de q) e aumento da repulsão entre as micelas (redução da intensidade a baixo q), como mostrado na Figura 29 e na Tabela 9.

Figura 29: Curvas de SAXS das micelas de tween 80 na concentração de 30 mM e pH 9, variando a concentração de ibuprofeno e ibuprofeno sódico.



Ainda na tentativa de elucidar os mecanismos de interação, fizemos o modelamento com o SASfit das curvas apresentadas na Figura 29 e os dados estão expostos nas Tabelas 10 e 11.

Tabela 9: Observação da redução do raio de giro e do diâmetro máximo da partícula espalhadora, obtidos da curva de SAXS, na Figura 29, com o aumento da concentração dos fármaco, mantendo a concentração do tensoativo constante em 30 mM, porém, agora, em pH 9.

Fármaco		Rg (Å)	D _{máximo} (Å)	Fármaco	Rg (Å)	D _{máximo} (Å)
pH 9	Sem fármaco	35,2	91,1	Sem fármaco	35,2	91,1
	Ibuprofeno 5 mM	36,0	89,9	Ibuprofeno sódico 5 mM	35,3	88,8
	Ibuprofeno 10 mM	33,7	87,0	Ibuprofeno sódico 10 mM	34,7	87,7
	Ibuprofeno 20 mM	33,3	86,0	Ibuprofeno sódico 20 mM	33,3	84,3
	Ibuprofeno 30 mM	32,9	83,1	Ibuprofeno sódico 30 mM	33,1	82,5

Podemos deduzir, à luz dos dados contidos na Tabela 9 que, em pH 9, o ibuprofeno sofreu a desprotonação da função ácido carboxílico e tornou-se equivalente ao ibuprofeno sódico, uma vez que os valores encontrados para ambos os fármacos são muito semelhantes. Além disso, os dois fizeram com que as micelas apresentassem aumento de repulsão, como já foi discutido por meio da Figura 27, o qual se deve ao acúmulo de cargas negativas na camada polar das micelas.

Ao analisarmos ambas as Tabelas obtidas a partir do modelamento das curvas de SAXS, podemos compreender que os valores da interação com ibuprofeno e ibuprofeno sódico praticamente foram os mesmos, o que ratifica a ideia da desprotonação do grupo ácido carboxílico existente no ibuprofeno. Outro fato interessante é que, tanto os valores do raio do núcleo quanto do comprimento do cilindro interno, tiveram os seus valores reduzidos com a inserção de ambos os fármacos à medida que se aumentava a concentração destes, os valores foram reduzindo progressivamente.

A espessura da casca não sofreu mudanças, indicando, assim, que os fármacos concentraram-se na interface polar-apolar, comportando-se como um cotensoativo.

Tabela 10: Modelamento das curvas de tween 80 na concentração de 30 mM e em pH 9, interagindo com o ibuprofeno.

Sistema/Forma Micela de tween 80_pH 9	R: Raio do núcleo (Å)	ΔR : Espessura da casca (Å)	L: Comprimento do cilindro (Å)	η_{sh} ($e/\text{Å}^3$)	η_c ($e/\text{Å}^3$)	ε
Sem fármaco/forma (ellcylshell2)	19,0	24,0	35,6	0,35	0,21	0,50
Ibuprofeno 5 mM (ellcylshell2)	17,0	24,8	34,7	0,35	0,20	0,54
Ibuprofeno 10 mM (ellcylshell2)	16,5	24,5	34,5	0,35	0,21	0,55
Ibuprofeno 20 mM (ellcylshell2)	16,3	24,8	33,7	0,35	0,20	0,55
Ibuprofeno 30 mM	13,7	23,9	33,1	0,35	0,19	0,69

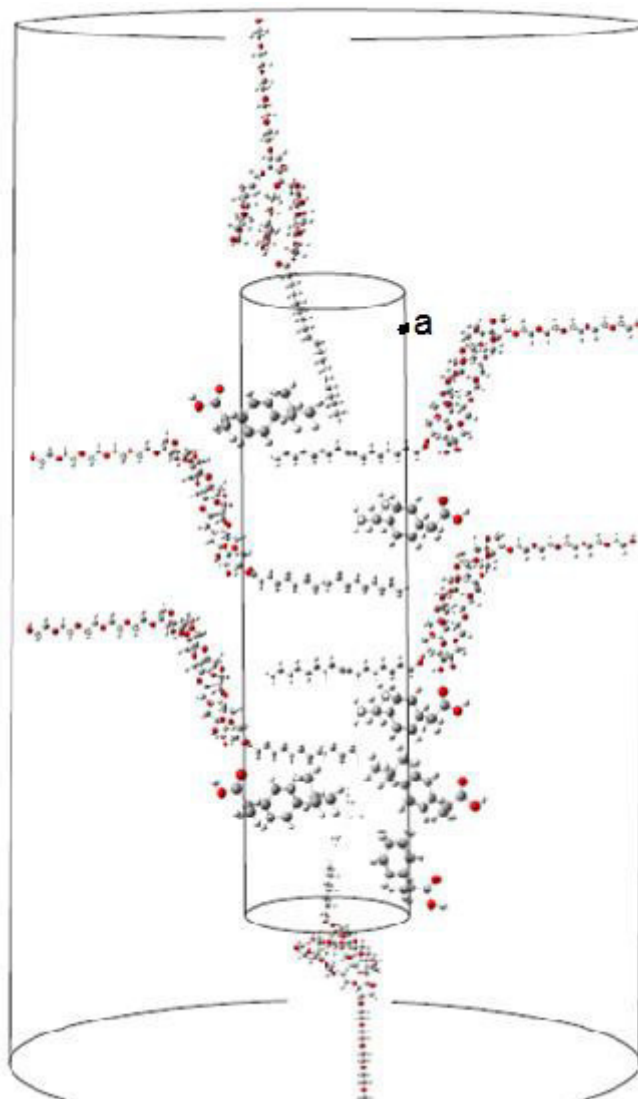
Tabela 11: Modelamento das curvas de tween 80 na concentração de 30 mM e em pH 9, interagindo com o ibuprofeno sódico.

Sistema/Forma Micela de tween 80_pH 9	R: Raio do núcle o (Å)	ΔR : Espessur a da casca (Å)	L: Compriment o do cilindro (Å)	Eta_cor e ($e/\text{Å}^3$)	Eta_sh ell ($e/\text{Å}^3$)	ε
Sem fármaco/forma (ellcylshell2)	19,0	24,0	35,6	0,21	0,35	0,50
Ibuprofeno sódico 5 mM (cylshell2)	17,4	24,0	36,3	0,20	0,35	0,52
Ibuprofeno sódico 10 mM (ellcylshell2)	14,6	25,7	33,3	0,19	0,35	0,65
Ibuprofeno sódico 20 mM (ellcylshell2)	13,4	23,9	32,8	0,16	0,35	0,64
Ibuprofeno sódico 30 mM (ellcylshell2)	13,3	23,9	32,7	0,16	0,35	0,66

As repulsões ocorridas na interface polar-apolar fizeram com que aumentasse o valor da excentricidade da micela, pois quando temos grupos com cargas iguais e opostas muito próximas, prevalecem-se as interações de repulsão sobre as de atração. Conseqüentemente, a estrutura da elipse interna contida nesse modelo sofreu um alongamento com o objetivo de reduzir os efeitos das repulsões, reduzindo assim, a energia interna da micela (prevalência das forças repulsivas em curtas distância).

Podemos notar por meio da Figura 30 um esquema de representação genérico do sistema micelar interagindo com os fármacos.

Figura 30: Esquema de representação genérico da micela formada por tween 80. O ponto **a** representa a interface polar-apolar da micela.

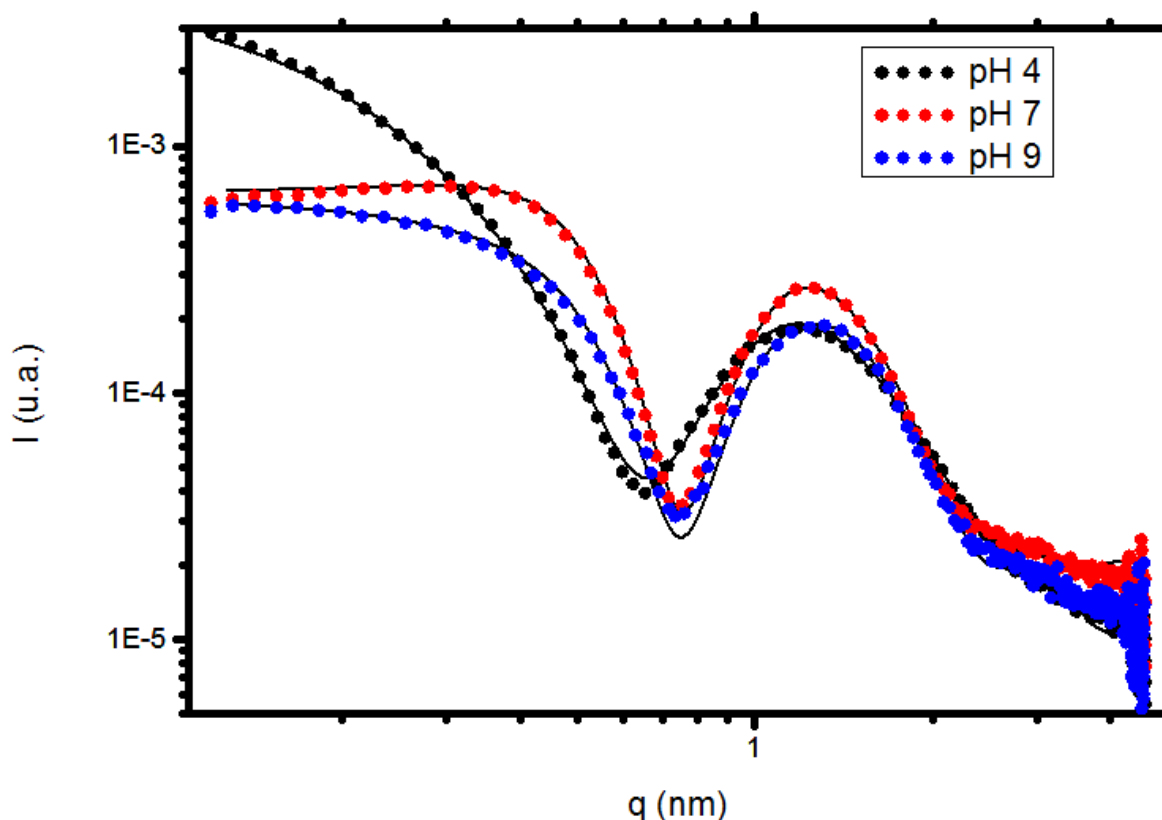


Vale ressaltar neste momento que o valor teórico obtido com o método semi-empírico PM3, na seção 6.2., está muito próximo do valor experimental obtido pelo fit das curvas de SAXS, pois o valor teórico do comprimento da região polar do tensoativo foi de 30,2 Å e a espessura da casca obtida pelo espalhamento de raios X a baixo ângulo foi de 25,4 Å, quando a micela não tinha nenhum fármaco encapsulado e em pH 7, corroborando com a ideia de que os valores teóricos obtidos naquela seção tem uma boa representatividade dos dados experimentais.

6.3.3. Influência do pH

Para facilitar o entendimento da discussão realizada no item 6.3.2, a Figura 25 apresenta a relação da modificação das micelas com a interação do ibuprofeno sódico, ao variar o pH. É possível compreendermos que no pH 4 as micelas com ibuprofeno sódico apresentaram um carácter atrativo, se compararmos com o pH 7 e 9, tendo em vista que nestes houve redução da intensidade a baixo ângulo. O tamanho das micelas não apresentou diferenças tão significativas nos pH 7 e 9. Em pH 4, ocorreu um significativo deslocamento da curva de SAXS para menores ângulos, indicando um aumento no diâmetro máximo, como já mostrado anteriormente.

Figura 31: Curva de SAXS do tween 80 interagindo com concentração constante de ibuprofeno, variando o pH.



7. CONCLUSÕES

A CMC do tween 80 foi obtida por meio da técnica de UV-vis, utilizando o ibuprofeno como molécula sonda e seu valor está compreendido entre $1 \cdot 10^{-4}$ e $2 \cdot 10^{-4}$ mM, o que está de acordo com a literatura. A união das técnicas de UV-vis e SAXS com o método do DFT para a construção da molécula de carisoprodol mostrou que este fármaco não conseguiu solubilizar-se no interior das micelas formadas por tween 80 e isso deve-se à pouca expressão da característica apolar existente na sua estrutura molecular.

Os métodos teóricos (PM3 e DFT) contribuíram bastante para a elucidação da interação dos fármacos com as micelas, uma vez que pôde ser determinado os comprimentos polares e apolares das moléculas desta pesquisa, bem como o valor das cargas parciais contidos em cada átomo, além das configurações espaciais de menor energia.

Por meio do SAXS, foi possível entendermos como os fármacos interagem com as micelas, seja pelo aumento da concentração destes no meio ou pela variação do pH. Em pH 4, tanto o ibuprofeno quanto o ibuprofeno sódico aumentaram o R_g , o diâmetro máximo das micelas e a sua atração. Entretanto, em pH 7, somente as micelas com ibuprofeno conseguiram aumentar o R_g e a intensidade a baixo ângulo. Já em pH 9, tanto o ibuprofeno quanto o ibuprofeno sódico apresentaram dados muito semelhantes, evidenciando que ocorreu desprotonação do grupo ácido carboxílico presente na molécula de ibuprofeno e isso gerou um acúmulo de cargas negativas na camada polar das micelas, ocasionando um aumento da repulsão entre as mesmas.

Fizemos o modelamento das curvas de SAXS por meio do software SASfit através do qual verificamos que em pH 4 e 7 as micelas apresentaram-se na forma de um cilindro interno (núcleo) com ou sem seção transversal elíptica e externo (casca). Em pH 9, somente a forma da micela com seção transversal elíptica pôde ser identificada, a mudança da excentricidade pode ser explicado em decorrência das repulsões presentes na interface do núcleo-casca, provenientes das cargas negativas sobre os átomos de oxigênio ligados a carbonila e a carga positiva dos átomos de carbono desta carbonila (as forças repulsivas prevalecem em curtas distâncias), pois para minimizar a

energia do sistema, essas cargas tendem a se afastar gerando a elipse interna. Ainda com relação às alterações sofridas na micela, podemos destacar o aumento no comprimento do cilindro interno em pH 4, fato que evidencia com clareza a inserção do ibuprofeno e o ibuprofeno sódico no interior dessas micelas, conforme a figura 30. A densidade eletrônica do núcleo neste pH apresentou uma leve redução em decorrência do alongamento sofrido pela micela, principalmente na interação com o ibuprofeno sódico. Em pH 7, percebemos que o ibuprofeno provocou uma redução no raio apolar do núcleo e, com isso, um aumento na densidade eletrônica do núcleo. Contudo, neste mesmo pH, o ibuprofeno sódico promoveu alteração em todas as concentrações, tendo em vista que, na tentativa de minimizar as repulsões na interface núcleo-casca, o sistema passou de uma elipse interna para um círculo na seção transversal do núcleo.

O modelamento das curvas de SAXS em pH 9 revelou uma redução do núcleo apolar da micela, acompanhada de um aumento da excentricidade da seção transversal elíptica e, como consequência, uma redução significativa da densidade eletrônica nessa região. A casca da micela, por sua vez, não sofreu modificações.

8. PERSPECTIVAS DO TRABALHO

As metas futuras são:

1. Utilizar o tensoativo tween 80 como sistema de encapsulamento do ibuprofeno, do ibuprofeno sódico e da cisplatina. Caracterizar esses sistemas com SAXS, em amostras diversas da apresentada neste trabalho e testar a eficácia in vitro e in vivo contra o câncer de pulmão.

9. REFERÊNCIAS

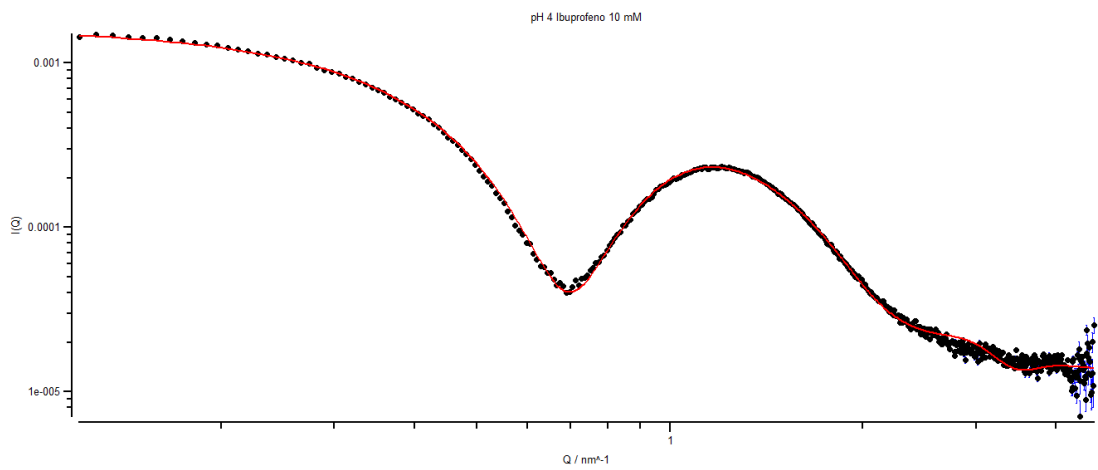
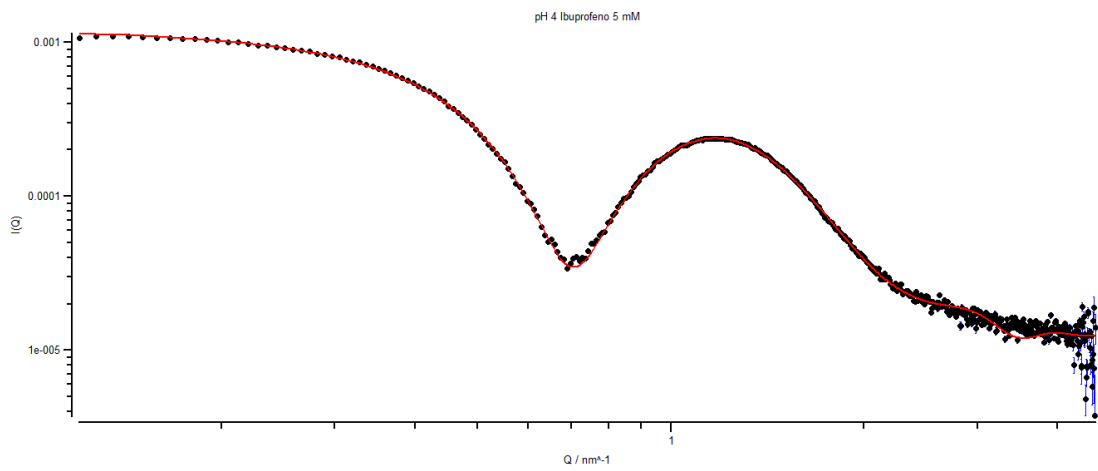
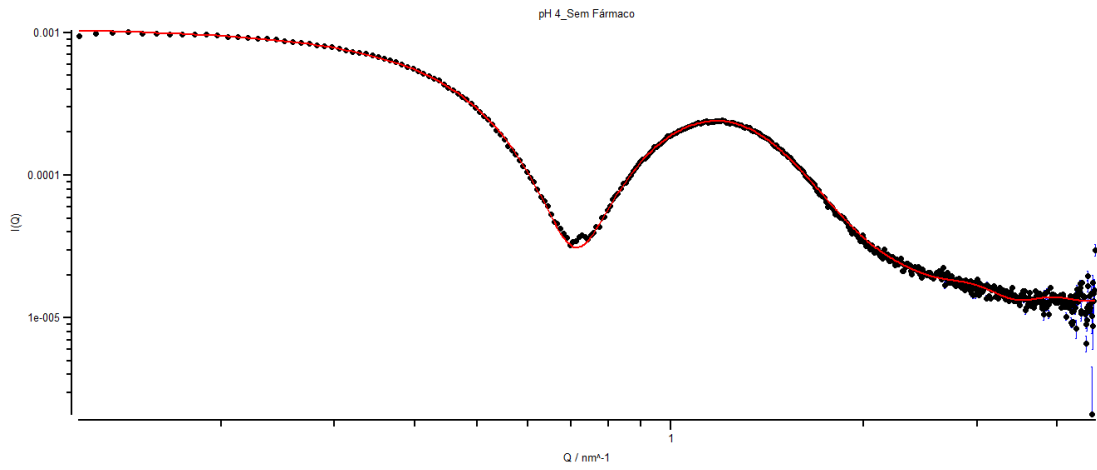
- [1] M.J. Rosen, J.T. Kunjappu, Surfactants and Interfacial Phenomena, John Wiley & Sons, **2012**.
- [2] Gomes, D. S. B. Formação e caracterização de micelas reversas de (EO)₁₃(PO)₃₀(EO)₁₃ em p-xileno. Dissertação, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2009.
- [3] Lima, M. G. O. L. B. Caracterização reológica e microestrutural de emulsões água em óleo para uso alimentar. 2014. Tese – Universidade de Évora, Portugal, 2014.
- [4] L.L. Schramm, E.N. Stasiuk, D.G. Marangoni, 2 Surfactants and their applications, Annu. Rep. Prog. Chem, Sect. C 99 (2003) 3–48.
- [5] Wolfrum, S.; Marcus, J.; Touraud, D.; Kunz, W. A renaissance of soaps? — How to make clear and stable solutions at neutral pH and room temperature. Elsevier. Advances in Colloid and Interface Science. **2016**, 0001-8686.
- [6] Souza, F. P.; Campos, G. R.; Packer, J. F. Determinação da atividade fotoprotetora e antioxidante em emulsões contendo extrato de *Malpighia glabra* L. – Acerola. Rev Ciênc Farm Básica Apl., **2013**, 34(1):69-77, 1808-4532.
- [7] Gomes, F. E. S., Anjos, G. C.; Dantas, T. N. C.; Maciel, M. A. M.; Esteves, A.; Echevarria, A. Obtenção de Nanoformulações do Tipo Microemulsão Objetivando a Biodisponibilização de Anacardium occidentale e sua Eficiência como Agente Antioxidante. Revista Fitos Vol.2 N°03 dezembro **2006**.
- [8] Akimoto, A.; Nakayama, M.; Okano, T. Temperature-responsive polymeric micelles for optimizing drug targeting to solid tumors Elsevier. Journal of Controlled Release 193, **2014**, 2–8.
- [9] Stephenson, B. C.; Rangel-Yagui, C. O.; Junior, A. P.; Tavares, L. C.; Beers, K.; Blankschtein, D.; Experimental and Theoretical Investigation of the Micellar-Assisted Solubilization of Ibuprofen in Aqueous Media. *Langmuir* **2006**, 22, 1514-1525.
- [10] K. Kato, K. Chin, T. Yoshikawa, K. Yamaguchi, Y. Tsuji, T. Esaki, K. Sakai, M. Kimura, T. Hamaguchi, Y. Shimada, Phase II study of NK105, a paclitaxel-incorporating micellar nanoparticle, for previously treated advanced or recurrent gastric cancer, Invest. New Drugs 30 (**2012**) 1621–1627.
- [11] R. Plummer, R. Wilson, H. Calvert, A. Boddy, M. Griffin, J. Sludden, M. Tilby, M. Eatock, D. Pearson, C. Ottley, A Phase I clinical study of cisplatin-incorporated polymeric micelles (NC-6004) in patients with solid tumours, Br. J. Cancer 104 (**2011**) 593–598.
- [12] “Surfactants and Polymers in aqueous solution”, Krister Holmberg, et al., John Wiley & Sons cop., **2003**, England, pp. 1-4, 10-24, 40-44, 338-342.

- [13] R. Wolf, D. Wolf, B. Tüzün, Y. Tüzün, Soaps, shampoos, and detergents, *Clin. Dermatol.* 19, **2001**, 393–397.
- [14] K. Ogino, M. Abe, *Mixed Surfactant Systems*, CRC Press, 1992.
- [15] S.K. Goel, Critical phenomena in the clouding behavior of nonionic surfactants induced by additives, *J. Colloid Interface Sci.* 212, **1999**, 604–606.
- [16] R.K. Mahajan, K.K. Vohra, N. Kaur, V.K. Aswal, Organic additives and electrolytes as cloud point modifiers in octylphenol ethoxylate solutions, *J. Surfactant Deterg.* 11, **2008**, 243–250.
- [17] G.V. Jensen; R. Lund; J. Gummel; T. Narayanan; J.S. Pedersen; From Spheres to Worms: Monitoring Transformation kinetics of Surfactant Micelles Using Time-resolved SAXS. *Angew. Chem. Int. Ed.* 53, 11524–11528 (2014).
- [18] Krister Holmberg, et al. *Surfactants and Polymers in aqueous solution*, John Wiley & Sons cop., **2003**, England, pp. 1-4, 10-24, 40-20, 338-342.
- [19] Itri, R.; *Estudo de Sistemas Micelares nos Estados Isotrópicos e Líquido-Cristalino*. Tese, Instituto de Física de São Paulo, 1991.
- [20] Wenneström, H.; Lindman, B.; *Phys. Rep*, 52(1), **1979**, 1-86.
- [21] Barbosa, L. R. S.; *Estudo de sistemas de relevância biológica por espalhamento de raios X a baixo ângulo*. Tese, Instituto de Física da Universidade de São Paulo, 2008.
- [22] S.P. Moulik, S. Ghosh, Surface chemical and micellization behaviours of binary and ternary mixtures of amphiphiles (Triton X-100, Tween-80 and CTAB) in aqueous medium, *J. Mol. Liq.* 72, **1997**, 145–161.
- [23] D.M. Cirin, M.M. Posa, V.S. Krstonosic, M.L. Milanovic, Conductometric study of sodium dodecyl sulfate-nonionic surfactant (Triton X-100, Tween 20, Tween 60, Tween 80 or Tween 85) mixed micelles in aqueous solution, *Hem. Ind.* 66, **2012**, 21–28.
- [24] Fu, J.; Cai, Z.; Gong, Y.; S.E. O'Reilly; Hao, X.; Zhao, D. A new technique for determining critical micelle concentrations of surfactants and oil dispersants via UV absorbance of pyrene. *Elsevier. Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* 484, **2015**, 1–8.
- [25] Sakai-Kato, K.; Nishiyama, N.; Kozaki, M.; Nakanishi, T.; Matsuda, Y.; Hirano, M.; Hanada, H.; Shigeru Hisada, S.; Onodera, H.; Harashima, H.; Matsumura, Y.; Kataoka, K.; Goda, Y.; Okuda, H.; Kawanishi, T.; General considerations regarding the in vitro and in vivo properties of block copolymer micelle products and their evaluation. *Journal of Controlled Release* 210, **2015**, 76–83.
- [26] Cabral, H.; Kataoka, K.; Progress of drug-loaded polymeric micelles into clinical studies. *Journal of Controlled Release* 190, **2014**, 465–476.

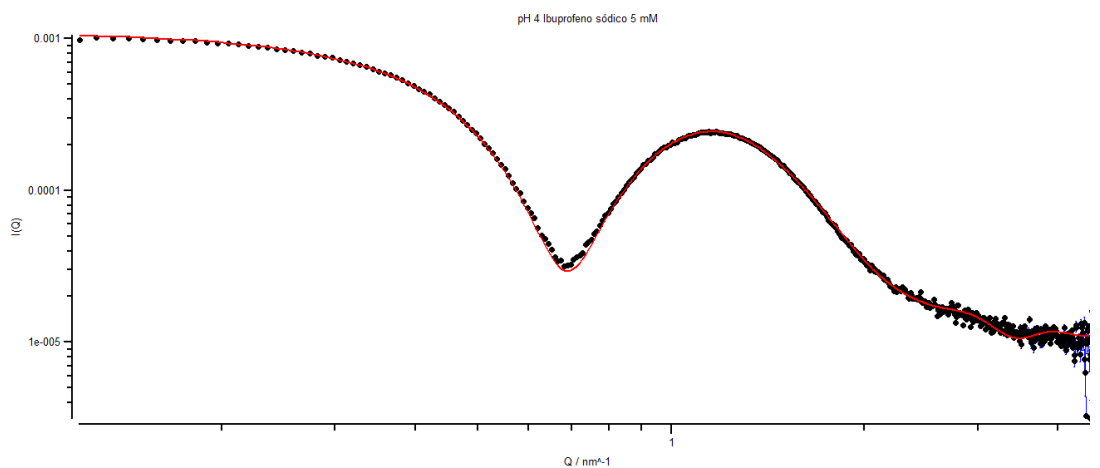
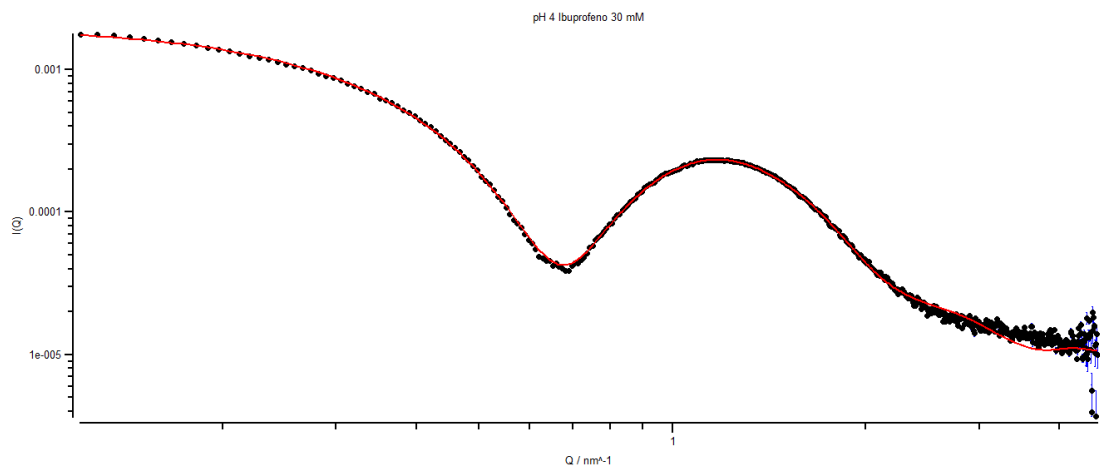
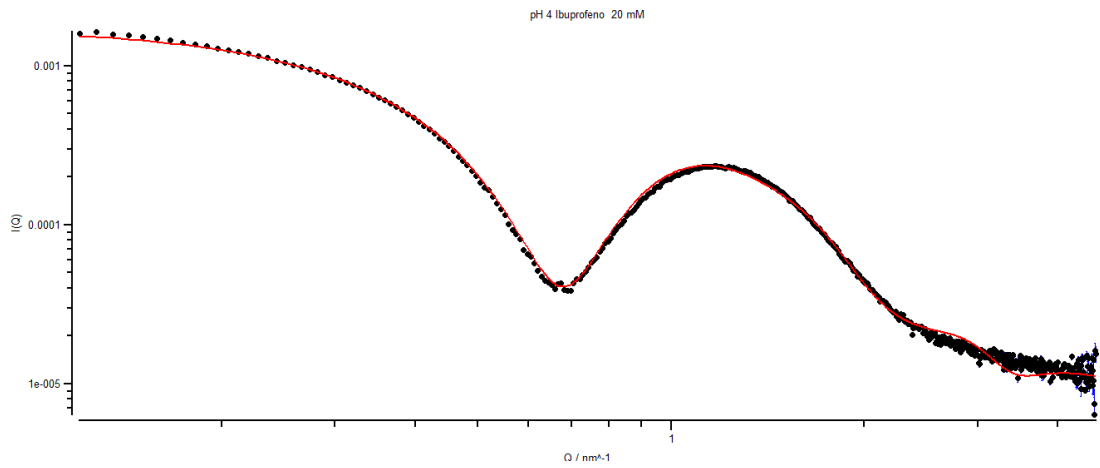
- [27] Sagar, M. D.; Shahidullah, M.; Basha, S. R.; Shahnaz, S.; Harish.G.; Development and evaluation of carisoprodol tablets with improved dissolution efficiency using solid dispersion technique, **2013**, 2320-3471.
- [28] Rohith, T.; Ananda, S.; Gowda, N. M. M.; Method Development and Validation of Carisoprodol and its Impurities by Ultra Violet-High Performance Liquid Chromatography, *Advances in Analytical Chemistry* **2013**, 3(2): 15-19.
- [29] J.R. Stanko, "A review of oral skeletal muscle relaxants for the cranio-mandibular disorder (CM D) practitioner", *Journal of craniomandibular Pract*, **1990**, 8(3), 234-43.
- [30] Goldberg, D.; Carisoprodol toxicity. *Mil Med*, **1969**, 134, 597.
- [31] Almeida, J. P. P. E. H. Preparação e caracterização de dispersões sólidas e micropartículas lipídicas contendo ibuprofeno. 2009. Dissertação (Mestrado em Controle de Qualidade) – Fundação Osvaldo Cruz, São Paulo, 2009.
- [32] Endo, H.; Yano, M.; Okumura, Y.; Kido, H.; Ibuprofen enhances the anticancer activity of cisplatin in lung cancer cells by inhibiting the heat shock protein 70. *Cell Death and Disease*. **2014**, 5, e 1027.
- [33] Tavaría, M.; Gabriele, T.; Kola, I.; Anderson, R. L. A hitchhiker's guide to the human Hsp70 family. *Cell Stress e Chaperones* (1966) 1 (1), 23-28, Pearson Professional Ltd, 1996.
- [34] Ogundeji, A. O.; Pohl, C. H.; Sebolai, O. M. The effects of aspirin and ibuprofen on cryptococcal cells. *American Society for Microbiology*, 2016.
- Hasegawa, U.; van der Vlies, A. J.; Wandrey, C.; Hubbell, J. A.; Preparation of Well-Defined Ibuprofen Prodrug Micelles by RAFT Polymerization. *ACS Biomacromolecules*. **2013**, dx.doi.org/10.1021/bm4009149.
- [35] Yazdanián, M.; Briggs, K.; Jankovsky, C.; Hawi, A. *Pharm. Res.* **2004**, 21, 293-299.
- [36] Jayawardena, S.; Leyva, R.; Kellstein, D.; Safety of a novel formulation of ibuprofen sodium compared with standard ibuprofen and placebo. *Journal Postgraduate Medicine*, vol. 127, **2015**, 33-37.
- [37] Repurposing
- [38] Glatter, O.; Kratky, O. *Small Angle X-ray Scattering*.; Academic Press: London, 1982.
- [39] Neto, M. O. Espalhamento de raios X a baixo ângulo aplicado ao estudo estrutural de proteínas. Tese, Instituto de Física de São Carlos, São Paulo, 2008.
- [40] Guinier, A.; Fournet, G. *Small-angle Scattering of X-rays*.; Chapman e Hall, Ltd: London, 1955.
- [39] Patterson, A. L. A direct method for the determination of the components of interatomic distances in crystals. *Zeitschrift für Kristallographie. A*, vol 90, p. 517-542, 1935.

- [41] Boldon, L.; Laliberte, F.; Liu, L. Review of the fundamental theories behind small angle X-ray scattering, molecular dynamics simulations, and relevant integrated application. *Nano Reviews* **2015**, *6*: 25661 - <http://dx.doi.org/10.3402/nano.v6.25661> (acessado em 10/12/2016).
- [42] Schnablegger H, Singh Y. *The SAXS guide: getting acquainted with the principles*, third ed. Austria: Anton Paar GmbH; **2013**.
- [43] G.B. Ray, I. Chakraborty, S.P. Moulik, Pyrene absorption can be a convenient method for probing critical micellar concentration (cmc) and indexing micellar polarity, *J. Colloid Interface Sci.* **294**, **2006**, 248–254.
- [44] Santos, D. M. Estudo baseado na teoria do funcional da densidade para a avaliação de algumas flavonas e flavonóis como inibidores de corrosão em superfícies metálicas. Dissertação, Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2016.
- [45] Carvalho, I.; Pupo, M. T.; Borges, Á. D. L.; Bernardes, L. S. C. Introdução a modelagem molecular de fármacos no curso experimental de química farmacêutica. *Quim. Nova*, Vol. 26, No. 3, 428-438, **2003**.
- [46] Sant'Anna, C. M. R.; *Quim. Nova* **2002**, *25*, 505.
- [47] Peixoto, P. H. R. Estrutura Eletrônica e Polarizabilidades de Betaínas. Dissertação, Departamento de Física da Universidade Federal de Pernambuco, 2002.
- [48] Lewars, E. *Computational Chemistry Introduction To The Theory And Applications Of Molecular And Quantum Mechanics*, Kluwer Academic Publishers: New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow, **2003**.
- [49] Homberg, P.; Kohn, W. *Phys. Rev.*, **1964**, *136*, B864.
- [50] Gaussian 03, Revision B.04, M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, J. A. Montgomery, Jr., T. Vreven, K. N. Kudin, J. C. Burant, J. M. Millam, S. S. Iyengar, J. Tomasi, V. Barone, B. Mennucci, M. Cossi, G. Scalmani, N. Rega, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, M. Klene, X. Li, J. E. Knox, H. P. Hratchian, J. B. Cross, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, P. Y. Ayala, K. Morokuma, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, V. G. Zakrzewski, S. Dapprich, A. D. Daniels, M. C. Strain, O. Farkas, D. K. Malick, A. D. Rabuck, K. Raghavachari, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, Q. Cui, A. G. Baboul, S. Clifford, J. Cioslowski, B. B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R. L. Martin, D. J. Fox, T. Keith, M. A. Al-Laham, C. Y. Peng, A. Nanayakkara, M. Challacombe, P. M. W. Gill, B. Johnson, W. Chen, M. W. Wong, C. Gonzalez, and J. A. Pople, Gaussian, Inc., Pittsburgh PA, 2003.

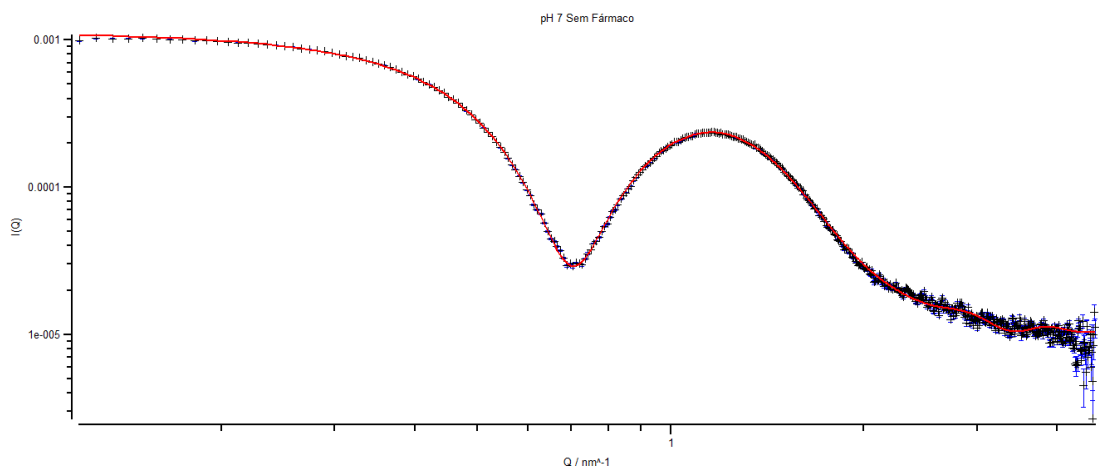
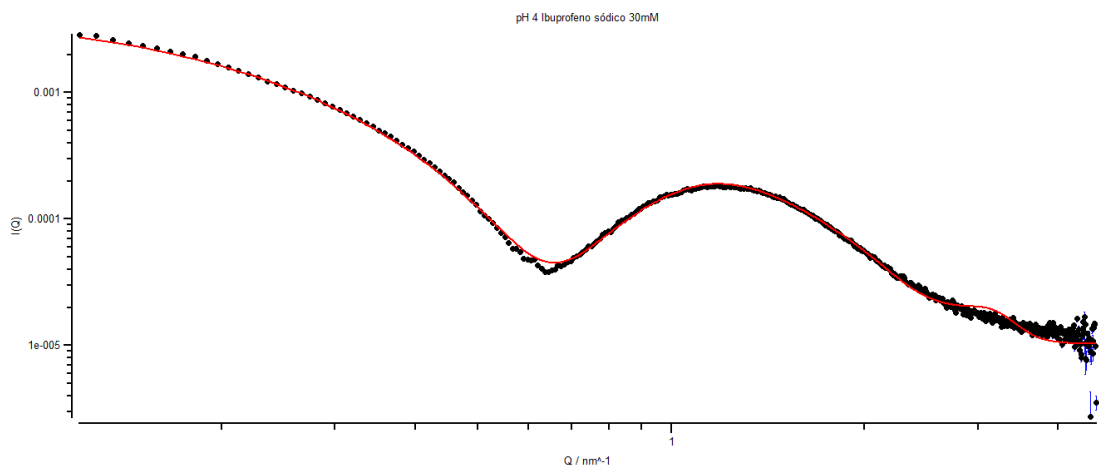
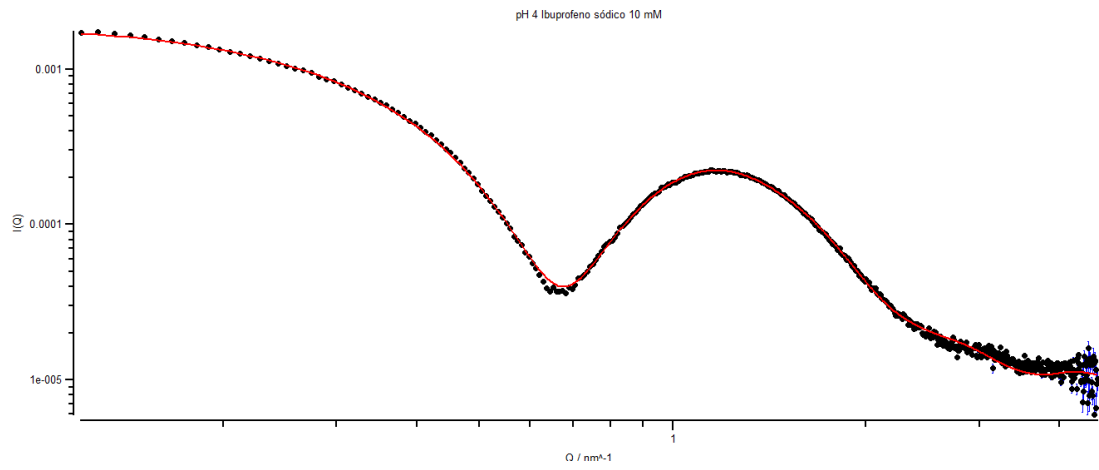
ANEXO II



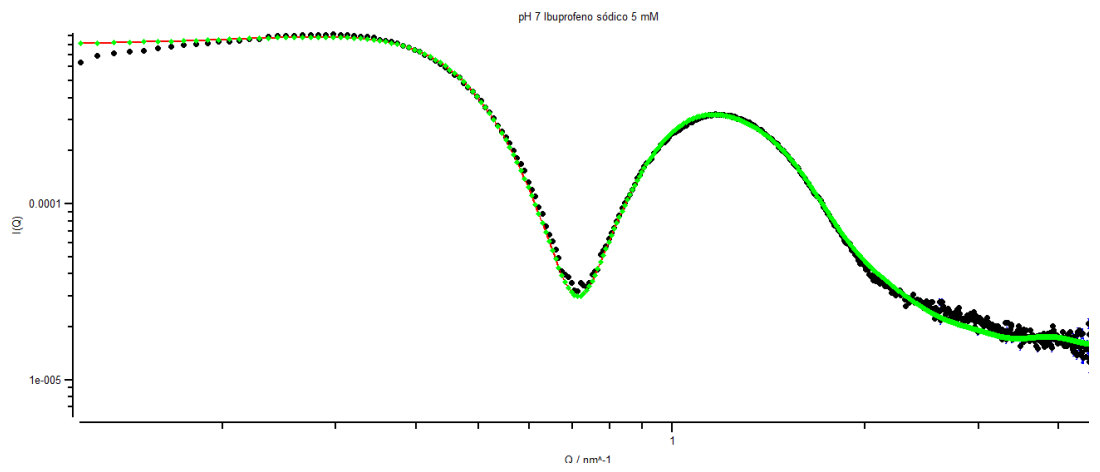
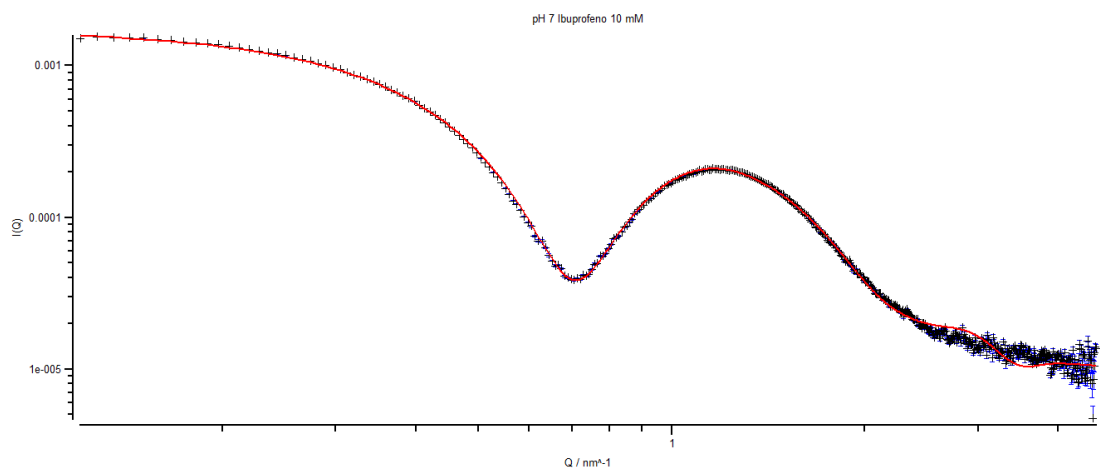
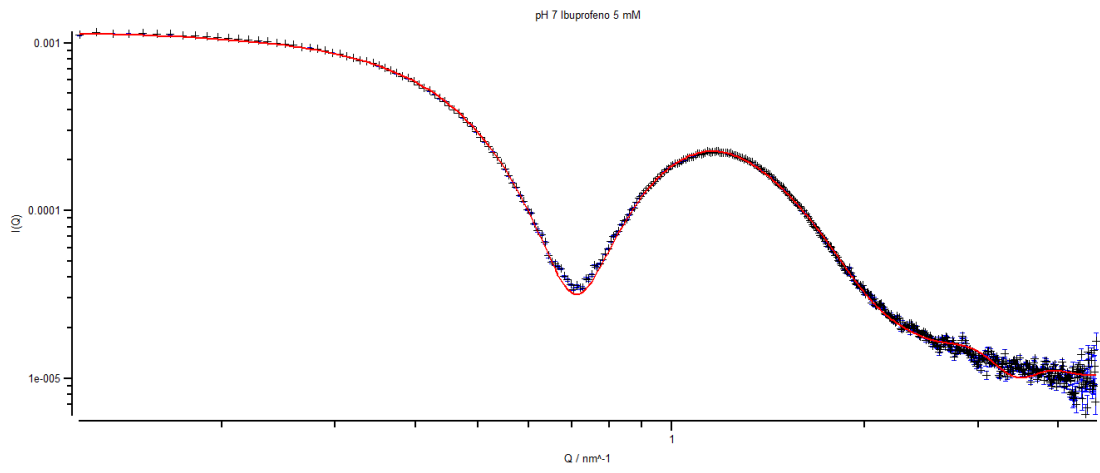
ANEXO II



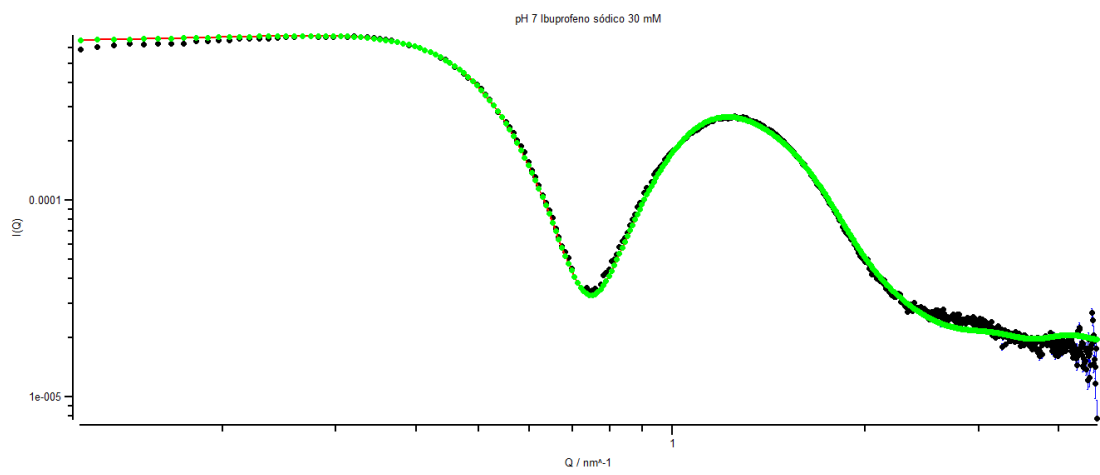
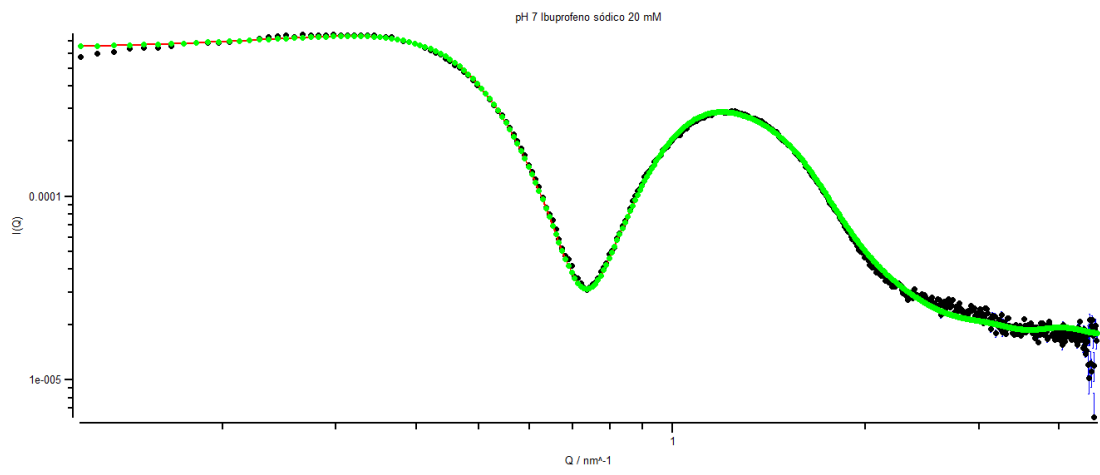
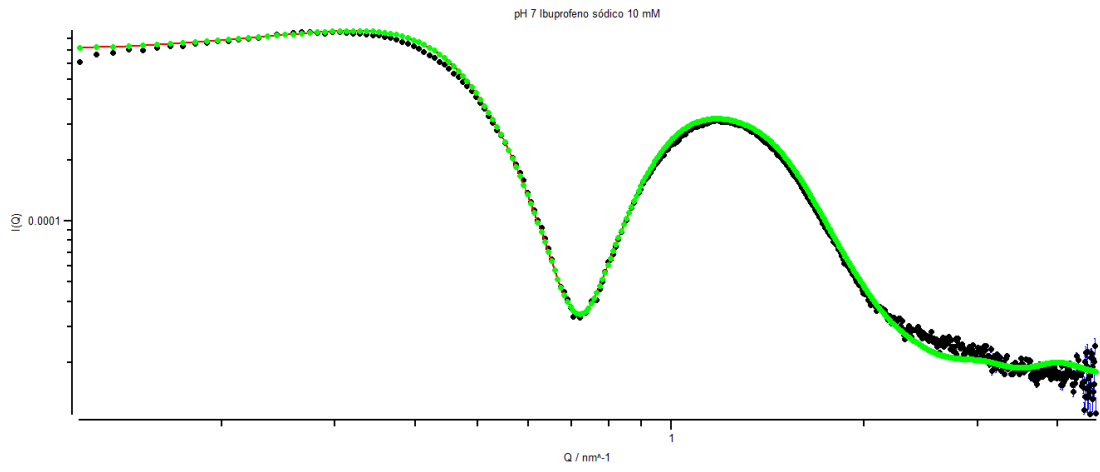
ANEXO II



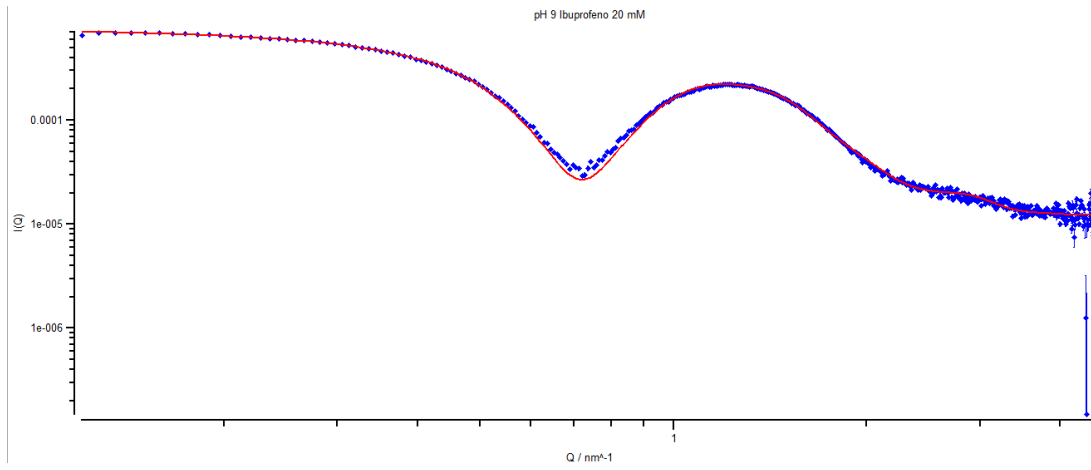
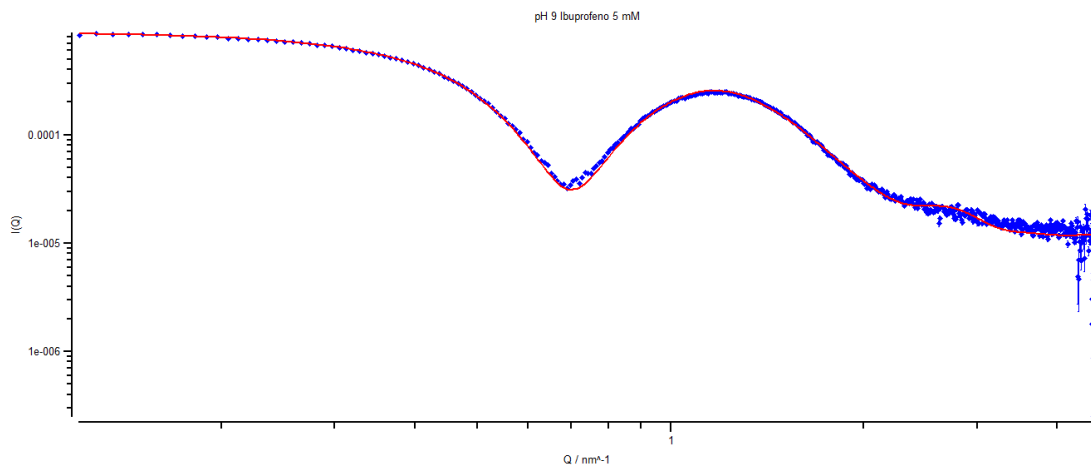
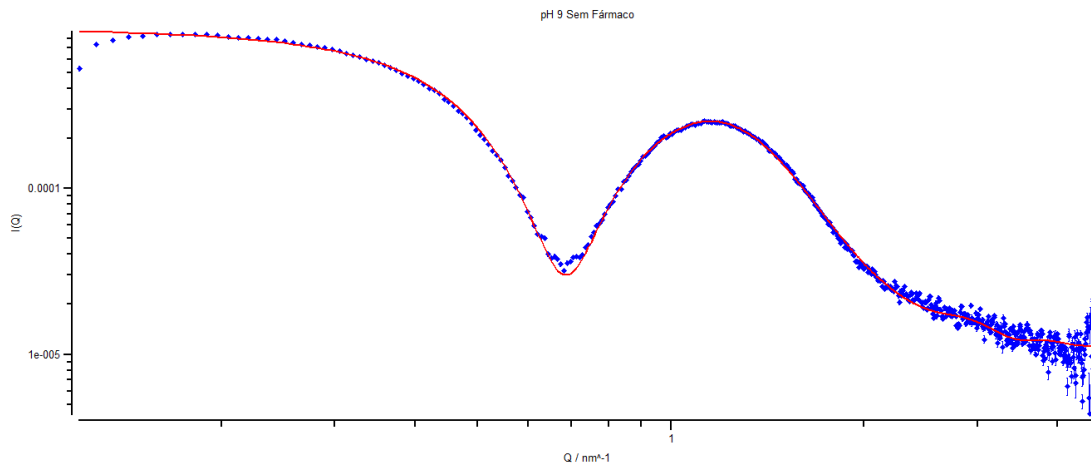
ANEXO II



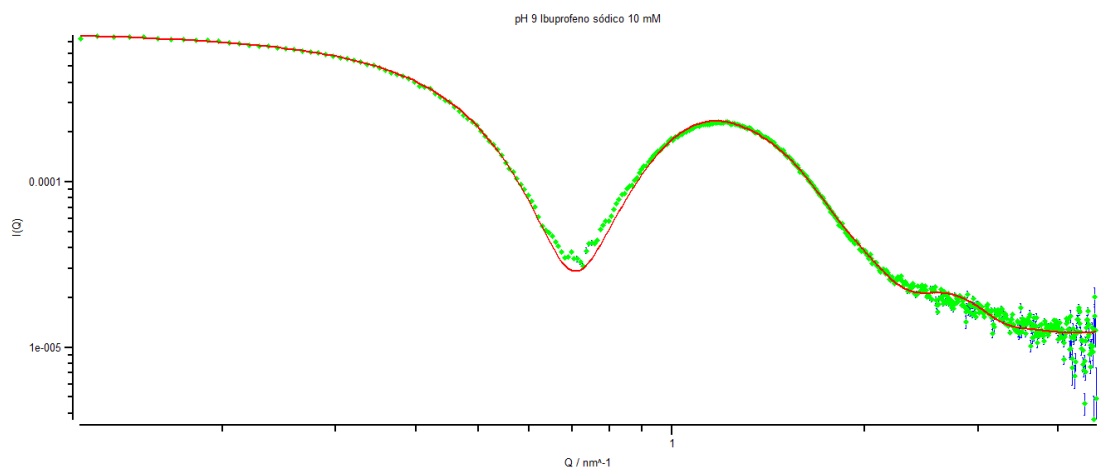
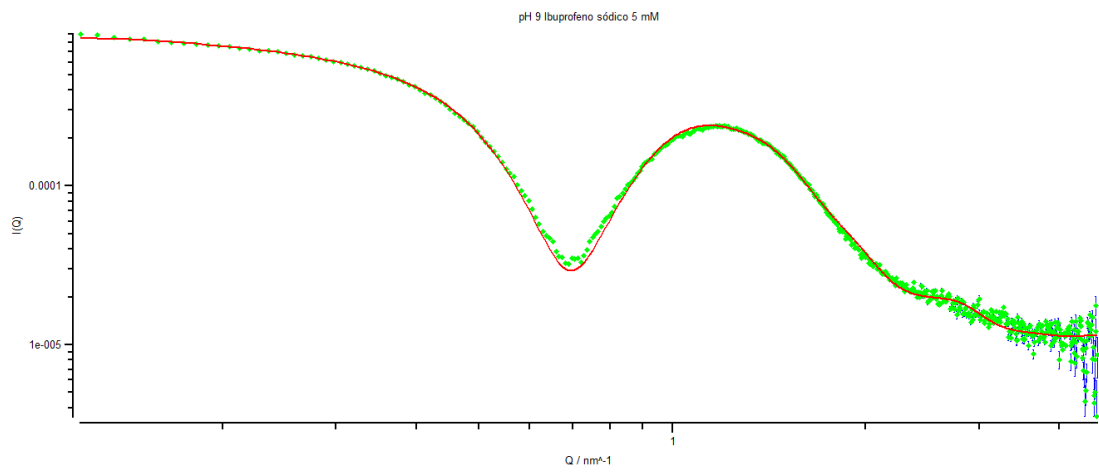
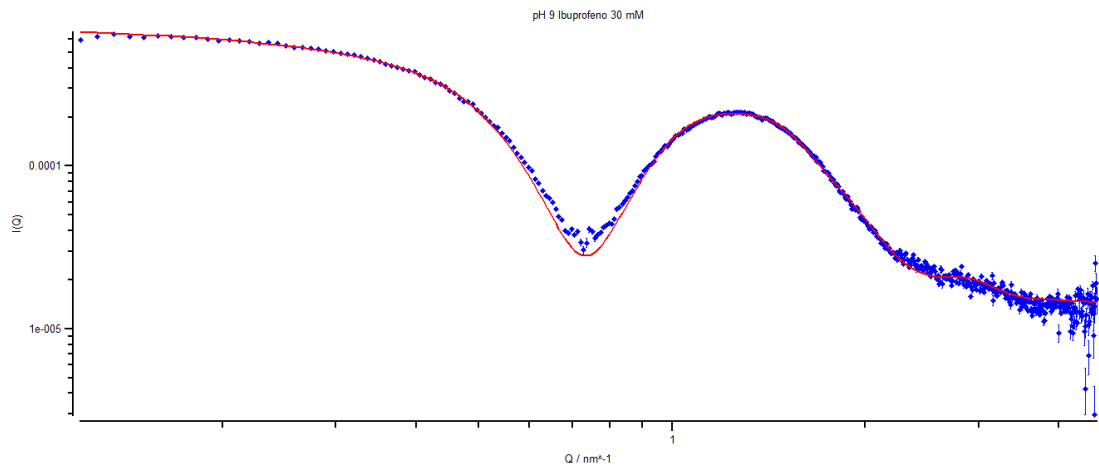
ANEXO II



ANEXO II



ANEXO II



ANEXO II

