


Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós-Graduação em Nanotecnologia Farmacêutica



**AVALIAÇÃO DE SISTEMAS LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS
UTILIZADOS COMO ESTRATÉGIA PARA MELHORAR AS PROPRIEDADES
BIOFARMACÊUTICAS DO PRAZIQUANTEL NO TRATAMENTO DA
ESQUISTOSSOMOSE**

Aluna: Fernanda Kolenyak dos Santos

Orientadora: Maria Palmira Daflon Gremião

Araraquara – SP

2014

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA**

**Avaliação de sistemas lipídicos nanoestruturados utilizados como
estratégia para melhorar as propriedades biofarmacêuticas do
praziquantel no tratamento da esquistossomose**

FERNANDA KOLENYAK DOS SANTOS

**Tese apresentada ao Programa
de Pós-Graduação
Nanotecnologia Farmacêutica, da
Faculdade de Ciências
Farmacêuticas, UNESP, como
parte dos requisitos para
obtenção do Título de Doutora
em Nanotecnologia
Farmacêutica.**

ORIENTADORA: Profa. Dra. Maria Palmira Daflon Gremião

**ARARAQUARA – SP
2014**

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

S237a Santos, Fernanda Kolenyak dos
Avaliação de sistemas lipídicos nanoestruturados utilizados como estratégia para melhorar as propriedades biofarmacêuticas do praziquantel no tratamento da esquistossomose / Fernanda Kolenyak dos Santos. – Araraquara, 2014
134 f.

Tese (Doutorado) – **Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas.** Programa de Pós Graduação Interinstitucional em Nanotecnologia Farmacêutica
Orientador: Maria Palmira Daflon Gremião

1. Praziquantel. 2. Nanopartículas lipídicas sólidas. 3. Carreadores lipídicos nanoestruturados. 4. Atividade biológica. I. Gremião, Maria Palmira Daflon, orient. II. Título.

CAPES: 40300005

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho aos meus pais,
com todo o meu carinho e gratidão, pela educação que me deram
através de seus preciosos conselhos que acrescentaram valores
fundamentais na minha vida, pelo apoio e por tornarem possível
a realização do meu sonho.*

Amo vocês.

AGRADECIMENTO

Glorifico à Deus, por todos os seus feitos em minha vida, pela minha saúde, e a capacidade de superação que me concedeu, juntamente com a oportunidade de cursar uma universidade, por toda a sua provisão em minha vida, agradeço ao meu Deus pela graça e pelo privilégio de desfrutar da convivência com todas as pessoas que amo.

Aos meus pais preciosos, Francisco e Ester, pelo amor, carinho, amizade e apoio demonstrados nos momentos mais difíceis desta jornada.

Aos meus irmãos queridos Fabio e Fabiana, cunhados Viviane e Paulo pela amizade, atenção e pela força que me proporcionaram quando mais precisei.

Aos meus familiares, minha avó, meus tios, minhas tias, primos e primas, pela nossa união, pelos conselhos e por demonstrarem que torcem por mim.

A todos meus irmãos na fé, que muito me ajudaram em todos os momentos em que precisei, demonstrando assim um grande carinho pela minha vida em sinal de uma amizade verdadeira.

Aos irmãos na fé Cleuza e seu esposo Antônio, Meire e seu esposo Abner, Prudência e seu esposo Mario pela amizade que fizemos, Maria e seu esposo Adão pela confiança e principalmente pelas orações que fizeram por mim. Este apoio me serviu de grande força para lutar nesta jornada.

A Neuda e toda sua família por terem me recebido de braços abertos em sua família, por me apoiarem sempre, por torcerem por mim. Tem sido como uma família para mim tem estado ao meu lado em todos os momentos desde os mais alegres aos mais difíceis demonstrando a verdadeira amizade. Algumas pessoas entram na nossa vida por acaso, mas não é por acaso que elas permanecem. Amo muito todos vocês.

A professora Dr^a Maria Palmira Daflon Gremião pela oportunidade, orientação, amizade, pelo incentivo, pela paciência, confiança e, principalmente, pelo exemplo de profissional, pelos conhecimentos adquiridos durante todo o período de desenvolvimento desta tese e pela ajuda com o meu crescimento profissional.

Ao professor Dr. Anselmo Gomes e a professora Dr^a Mara pelas sugestões dadas no meu exame de qualificação.

Aos professores Marlus Chorilli, Ana Dóris e Raul Cesar (*in memoriam*) pela amizade, pelos bons momentos e agradáveis conversas.

Agradeço em especial às minhas amigas Liliane Pedreiro, Jessica Bernegossi, Fabíola Prezotti, Roberta Rigon, Maíra Lima, Natalia Noronha, Fernanda Padilla, Gisela Rolfsen, Raphaela Pereira e Marcela Brito pelos ótimos momentos que passamos juntas, por tudo que tem me ensinado, por todo apoio que tem dado, pelos conselhos, pelos ótimos momentos de descontração, pela ajuda que me prestaram dentro e fora do laboratório, por todo carinho e atenção que tiveram comigo e pelo exemplo de profissionalismo, vocês têm sido como

verdadeiras irmãs para mim tem estado ao meu lado em todos os momentos desde os mais alegres aos mais difíceis demonstrando verdadeira amizade e carinho. Vocês são muito importantes na minha vida, amo muito todas vocês.

Agradeço em especial ao meu grande amigo Leonardo por todo carinho e paciência que me tratou, pela sincera amizade que temos, por todo auxílio e pelos grandes ensinamentos que me forneceu. Leo você é um grande irmão para mim, te amo muito meu amigo.

Fernanda Carbinatto, Hilris e Grazielle que foram minhas companheiras desde o primeiro dia que estive na UNESP e estão do meu lado até o presente momento.

Aos queridos colegas e amigos do Laboratório e de outros laboratórios Lilian Barbassa, Márcia Oyafuso, Cris Laignier, Cris Pissinato, Vanessa Meyagusku, Karisa Belloto, Priscileila, Flávio Campos, Jovan Duran, Flavia Chiva, Flavia Fiorentino, Lucélia, Lucas pelos agradáveis momentos que passamos juntos, pela diversão e pela ajuda que me deram sempre que precisei.

Ao amigo Douglas Cassimiro e ao professor Clóvis por toda ajuda com a interpretação dos dados de DSC.

A prof^a Silmara por toda ajuda que me ofereceu, por abrir as portas do laboratório e me ajudar com a interpretação dos resultados *in vivo* e *in vitro*, por aceitar a me supervisionar no projeto de pós-doutorado. A grande amiga Rosi, por toda ajuda, pela amizade, pelo carinho e por sempre estar ao meu lado em todos os momentos e ter me ajudado e ensinado toda a parte *in vivo* do trabalho.

A professora Marcela R. Longhi por ter aberto as portas do laboratório e ter me aceitado para realização do doutorado sanduíche, e por toda ajuda e apoio que me ofereceu enquanto estive na Argentina.

A Claudia Garnero pela ajuda oferecida enquanto estive na Argentina, à Julia, Alice, Flávia Bruno, ao Esteban e Carolina Kogawa e Carolina Aloisio pelos bons momentos que passamos juntos na Argentina.

A Faculdade de UNISO pela disponibilização do Laboratório de Pesquisa para realização do estudo de absorção *in vitro*, em especial ao Prof. Dr. Marco Vinícius Chaud pelo imprescindível auxílio no estudo de absorção intestinal.

Aos técnicos e funcionários do Departamento de Fármacos e Medicamentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP -Araraquara pelo auxílio e amizade, em especial à Nátalia, Margareth e a Fátima.

As funcionárias da Secretaria da Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP por toda dedicação e paciência.

Aos funcionários da Biblioteca da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP - Araraquara, pela ajuda e paciência.

*“Viver é enfrentar um problema atrás do outro.
O modo como você encara é o que faz a diferença”*

Benjamin Franklin

RESUMO

A esquistossomose é uma infecção causada por um parasito intravascular *Schistosoma*. No Brasil, são estimados em 2,5 milhões o número de pessoas infectadas pela doença. O praziquantel (PZQ) é o único fármaco utilizado para o tratamento da esquistossomose, sendo eficaz em todas as espécies de *Schistosomas*, porém apresenta algumas características que limitam o seu uso, como a baixa solubilidade em água e com isso possui uma biodisponibilidade errática ou baixa. As nanopartículas lipídicas sólidas (SLNs) são sistemas coloidais que foram desenvolvidos combinando as vantagens das emulsões, lipossomas e nanopartículas poliméricas, são compostas por uma matriz que é sólida à temperatura ambiente ou corpórea. Apesar de bastante descrita as SLNs apresentam algumas características que limitam o seu uso, como facilidade de expulsão do fármaco durante o armazenamento e a quantidade de fármaco encapsulado na matriz limitada. Para suprir essas limitações, uma nova classe de nanopartículas foi desenvolvida, denominada carreadores lipídicos nanoestruturados (NLCs), que são compostos por uma matriz contendo uma mistura de lipídeo sólido e líquido. O presente estudo propôs desenvolver ambos os sistemas, como uma estratégia de melhorar a eficácia do PZQ. Os sistemas foram desenvolvidos empregando o método de homogeneização em alta velocidade de cisalhamento e foram caracterizados avaliando o diâmetro médio das partículas, potencial zeta, índice de polidispersidade, eficiência de encapsulação, capacidade de carga, calorimetria diferencial exploratória (DSC), análise de termogravimetria (TGA), difração de raio-x, microscopia eletrônica de varredura (MEV), ressonância magnética nuclear (RMN), espectroscopia de infravermelho (IV). O perfil de segurança foi avaliado através de estudos de citotoxicidade, hemólises dos eritrócitos, atividade *in vitro* e *in vivo* de ambos os sistemas. Os resultados para todos os sistemas exibiram um diâmetro de 165 a 653nm, sendo o zeta entre -21 a -40mV e o índice de polidispersidade foi entre 0,385 a 694. Os sistemas apresentaram uma alta eficiência de encapsulação entre 83% a 92%. Para os resultados de RMN houve uma perda do sinal do PZQ, as análises de difração de raio-x também. Os resultados exibidos sugerem que ambos os sistemas interagem com o PZQ. Para as análises biológicas, os resultados mostraram que a encapsulação de PZQ em NLC2 ou NLC4 melhorou o perfil de segurança

do fármaco, sugerindo que estes sistemas podem ser uma plataforma promissora para a administração de PZQ no tratamento de esquistossomose.

Palavras chaves: Praziquantel, Nanopartículas lipídicas sólidas, carreadores lipídicos nanoestruturados, atividade biológica.

ABSTRACT

Schistosomiasis is an infection caused by an intravascular parasite *Schistosoma*. In Brazil is estimated at 2.5 million the number of people infected by the disease. Praziquantel (PZQ) is the only drug used for the treatment of schistosomiasis and is effective in all kinds of Schistosomes, but shows some features which limit their use, such as, low water solubility and low or erratic bioavailability. The solid lipid nanoparticles (SLNs) are colloidal systems which have been developed by combining the advantages of emulsions, liposomes and polymeric nanoparticles are composed of a matrix that is solid at room or body temperature. Despite the well-described SLNs have some characteristics that limit their use, such as, ease of expulsion of the drug during storage, and the amount of encapsulated drug in the matrix limited. To overcome these limitations, a new class of nanoparticles was developed, named nanostructured lipid carriers (NLCs), which are composed of a matrix containing a mixture of solid and liquid lipid. In This study we aimed to develop both systems as a strategy to improve the efficacy of PZQ. Systems have been developed employing the method of mixing in high shear rate and were characterized by average particle diameter, zeta potential, polydispersity index using photon correlation spectroscopy, encapsulation efficiency, differential scanning calorimetry (DSC), thermogravimetry analysis (TGA), x-ray diffraction, electron microscopy (SEM), nuclear magnetic resonance (NMR), infrared spectroscopy (IR). The safety profile was assessed through studies of cellular cytotoxicity, hemolysis of erythrocytes. The in vitro and in vivo activity of both systems (SLN and NLC) were evaluated. The results for all systems exhibited a diameter of 165 to 653nm, and the zeta between -21 to -40mV and the polydispersity index was between 0.385 to 694, the systems presented a high encapsulation efficiency between 83% to 92%, indicating that a large amount of drug incorporated in the system, the DSC analysis revealed that the melting point of the PZQ disappeared in the NLCs and decreased for SLNs indicating an interaction of the drug with the lipid matrix in both systems. For the NMR results was a loss of signal PZQ. The displayed results suggest that the PZQ can interact with both systems. For biological testing, the results showed that encapsulation in PZQ in the NLC2 or NLC4 improved drug safety profile, suggesting that these systems can be a promising platform for PZQ administration in the treatment of schistosomiasis.

Keywords: Praziquantel, solid lipid nanoparticles, nanostructured lipid carriers, biological activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Distribuição global da esquistossomose.....	23
Figura 2 Representação esquemática dos vermes adultos; casal (à esquerda), macho (centro) e fêmea (à direita).....	24
Figura 3 Morfologia dos ovos de <i>S. mansoni</i> em seus respectivos estágios (A); caramujo do gênero <i>Biophalaria glabrata</i> (B); Miracídio (C); Cercaria (D).....	26
Figura 4 Ciclo de vida das diferentes espécies de <i>Schistosoma mansoni</i>	28
Figura 5 Estrutura química do Praziquantel.....	30
Figura 6 Efeito de formulações lipídicas na absorção de fármacos. D - fármaco solubilizado no meio intestinal e M-estruturas coloidais (micelas ou vesículas).	34
Figura 7 Diferentes modelos de incorporação de fármacos no interior das SLNs, sendo: matriz de solução sólida homogênea; cápsula rica em fármaco e núcleo enriquecido com fármaco (Figura adaptada por Üner & Yener 2007).....	35
Figura 8 Tipos de NLCs tipo imperfeito (I); tipo amorfo (II); Múltiplo tipo (III). (Figura adaptada por Üner & Yener 2007).	38
Figura 9 Ilustração do método empregado no preparo dos diferentes sistemas.....	44
Figura 10- Estrutura química dos componentes utilizados no preparo das SLNs e NLCs.....	53
Figura 11 Curva DSC dos componentes utilizados no preparo das SLNs e dos NLCs: preto primeiro evento de aquecimento; roxo evento de resfriamento; vermelho segundo evento de aquecimento.	59
Figura 12 curvas de DSC das misturas binárias AO/PC, GMS/T60, AO/T60, AO/GMS e AO/P-407, em que preto é referente ao primeiro evento de aquecimento, roxo é o evento de resfriamento e vermelho é o segundo evento de aquecimento.	61
Figura 13 Curvas de DSC das misturas binárias GMS/PC, GMS/P407; PC/T60; PC/P407; em que preto é referente ao primeiro evento de aquecimento, roxo é o evento de resfriamento e vermelho é o segundo evento de aquecimento.	64
Figura 14 Curvas de DSC das misturas binárias: PZQ/GMS; PZQ/AO; PZQ/P407; PZQ/T60; PZQ/PC, em que preto é referente ao primeiro evento de aquecimento, roxo é o evento de resfriamento e vermelho é o segundo evento de aquecimento. ..	67
Figura 15 Curvas de DSC do PZQ (preto) das MF-SLN1 (vermelho), MF-SLN2 (verde), SLN1 (marrom) e SLN2 (azul).....	72
Figura 16 Curvas de DSC do PZQ (preto) das MF-SLN3 (vermelho), MF-SLN4 (verde), SLN3 (marrom) e SLN4(azul).....	74
Figura 17 Curvas de DSC do PZQ (preto) das MF-NLC1 (azul), MF-NLC2 (vermelho), NLC1 (rosa) e NLC2 (verde).	76
Figura 18 Curvas de DSC do PZQ (preto), das MF-NLC3 (vermelho), MF-NLC4 (verde), NLC3 (roxo) e NLC4 (azul claro).....	78
Figura 19 Curvas de TG do PZQ (verde), SLN1 (azul), SLN2 (vermelho), MF-SLN2 (preto).	80
Figura 20 Curvas de TG do PZQ (verde), SLN3 (azul), SLN4 (vermelho), MF-SLN4 (preto).	81

Figura 21 Curvas de TG do PZQ (verde), NLC1 (azul), NLC2 (vermelho), MF-NLC2 (preto).....	82
Figura 22 Curvas de TG do PZQ (verde), NLC3 (azul), NLC4 (vermelho), MF-NLC4 (preto).....	83
Figura 23 Estrutura química do PZQ exibindo os prótons numerados para os sinais dos espectros do RMN.....	84
Figura 24 Espectros de ¹ H RMN (a) P-407; (b) PZQ; (c) mistura física PZQ/P407.	85
Figura 25 Espectro ¹ H NMR para (a) PZQ, (b) mistura PZQ/P407, (c) SLN2.	85
Figura 26 Espectro de ¹ H NMR para (a) PZQ, (b) MF-PZQ/T60, (c) SLN4.....	86
Figura 27 Espectro de ¹ H RMN para (a) T60; (b) PZQ e (c) MF-PZQ/T60.....	88
Figura 28 Espectro ¹ H NMR para (a) PZQ, (b) mistura PZQ/P407, (c) NLC2.	89
Figura 29 Espectro de ¹ H NMR para (a) PZQ, (b) MF-PZQ/TW60, (c) NLC4.	89
Figura 30 Difratoograma dos componentes utilizados no preparo das SLNs e dos NLCs, em que PZQ (preto), GMS (rosa), AO (roxo), PC (verde), P-407 (azul) e T60 (vermelho).....	90
Figura 31 Difratoograma de raio-x das SLNs em que PZQ (preto); MF-SLN 1 (azul); SLN1 (vermelho); MF-SLN2 (verde) e SLN 2(roxo).....	92
Figura 32 Difratoograma de raio-x das SLNs em que PZQ (preto); MF-SLN 3 (azul); SLN3 (vermelho); MF-SLN4 (verde) e SLN 4(roxo).....	93
Figura 33 Difratoogramas de raio-x do PZQ (preto), MF-NLC1 (Azul), NLC1 (vermelho), MF-NLC2 (rosa) e NLCs 2 (verde).	94
Figura 34 Difratoograma de raio-x do PZQ (preto) das MF-NLC3 (azul), MF-NLC4 (verde) e dos NLC3 (vermelho) e NLC4 (roxo).....	95
Figura 35 Espectros de absorção na região do infravermelho PZQ, T60 e P-407.....	97
Figura 36 Espectro de absorção na região do infravermelho para GMS, AO, PC	98
Figura 37 Espectro de absorção na região do infravermelho para o PZQ (preto), NLC1 (azul), NLC2 (verde) e MF-NLC2 (rosa).	99
Figura 38 Espectro de absorção na região do infravermelho para PZQ (preto), NLC3(cinza), NLC4 (laranja) e MF-NLC4 (marrom).	100
Figura 39 Espectro de absorção na região do infravermelho para PZQ (preto), SLN1(azul), MF-SLN2 (verde) e SLN2 (rosa).....	101
Figura 40 Espectro de absorção na região do infravermelho para PZQ (preto), SLN3 (vermelho), MF-SLN4 (verde) e SLN4 (rosa).....	102
Figura 41 Morfologia das SLN analisadas por microscopia eletrônica de varredura, em que SLN1 (a); SLN (b); SLN3 (c); SLN4 (d).....	103
Figura 42 Morfologia das NLCs analisadas por microscopia eletrônica de varredura, em que NLC1 (a); NLC2 (b); NLC3 (c); NLC4 (d).	104
Figura 43 Viabilidade celular para PZQ livre, NLC1 e NLC3 e NLC2 e NLC4.	106
Figura 44 Efeito do PZQ e dos NLCs na atividade In vitro na separação dos casais de <i>S. mansoni</i> . Avaliação realizada no período de 72horas.	107
Figura 45 Efeito do PZQ e dos NLCs na atividade In vitro contra vermes adultos de <i>S. mansoni</i> . Avaliação realizada no período de 72horas.	108

Figura 46 Casal de <i>S. mansoni</i> incubado em meio RPMI, usado como grupo controle	
Avaliação in vitro do PZQ em cultura de <i>S. mansoni</i> , em que NLC1 (A) NLC1; NLC2	
(b); NLC3 (C) e NLC4 (D), na concentração 0,025mg/mL.....	111
Figura 47 Efeito das SLNs e NLCs sem PZQ na atividade contra vermes machos ..	113
Figura 48 Efeito das SLNs e NLCs sem PZQ na atividade contra vermes fêmeas ..	114
Figura 49 Efeito das SLNs e NLCs sem PZQ na atividade de separação de casais	115
Figura 50 Efeito das SLNs e NLCs sem PZQ na atividade sobre os ovos por grama	
de fezes (OPG).....	116
Figura 51 Efeito das SLNs e NLCs sobre os ovos nos diferentes estágios de	
maturidade.....	116
Figura 52 Efeito do PZQ nas doses de 112mg/Kg e 149mg/Kg incorporado nas SLNs	
e NLCs na atividade contra os vermes adultos machos	117
Figura 53 Efeito do PZQ nas doses de 112mg/Kg e 149mg/Kg incorporado nas SLNs	
e NLCs na atividade contra os vermes adultos fêmeas	118
Figura 54 Efeito do PZQ nas doses de 112mg/Kg e 149mg/Kg incorporado nas SLNs	
e NLCs na atividade de separação de casais	119
Figura 55 Efeito do PZQ nas doses de 112 mg/Kg e 149 mg/Kg incorporado nas	
SLNs e NLCs sobre os ovos por grama de fezes (OPG).....	122
Figura 56 Efeito do PZQ nas doses 112mg/Kg e 149mg/kg incorporado nas SLNs e	
NLCs sobre os ovos nos diferentes estágios de maturidade.....	123

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Distribuição geográfica mundial da Esquistossomose.....	22
Tabela 2. Nomenclatura das diferentes SLNs e dos NLCs.....	43
Tabela 3. Valores de diâmetro médio, índice de polidispersidade e potencial zeta dos diferentes sistemas contendo ou não PZQ.....	54
Tabela 4. Eficiência de encapsulação e capacidade de carga dos diferentes sistemas contendo PZQ.....	57
Tabela 5. Dados de DSC dos componentes isolados contendo o ponto de fusão, temperatura <i>onset</i> e os valores de entalpia.....	58
Tabela 6. Curvas de DSC das misturas binárias referentes AO/PC, AO/T60, AO/GMS, AO/P-407, GMS/T60.....	60
Tabela 7. Dados de DSC das misturas binárias GMS/PC, GMS/P-407, PC/T60, PC/P-407, T60/P407 contendo o ponto de fusão, temperatura <i>onset</i> e os valores de entalpia.	63
Tabela 8. Dados de DSC das misturas binárias PZQ/GMS, PZQ/AO, PZQ/P-407, PZQ/T60, PZQ/PC contendo o ponto de fusão, temperatura <i>onset</i> e os valores de entalpia.	66
Tabela 9 Dados de DSC das mistura binária PZQ/GMS com os valores de entalpias esperadas.....	68
Tabela 10 Dados de DSC das mistura binária PZQ/AO com os valores de entalpias esperadas.....	68
Tabela 11 Dados obtidos das curvas de DSC da mistura binária PZQ/P-407	69
Tabela 12 Dados das curvas de DSC das misturas binárias PZQ/T60.....	70
Tabela 13 Dados das curvas de DSC das misturas binárias PZQ/PC.....	71
Tabela 14 Dados de DSC das MF-SLN1, MF-SLN2, SLN1 e SLN2 contendo o ponto de fusão, temperatura <i>onset</i> e os valores de entalpia.	71
Tabela 15 Dados das curvas de DSC das MF-SLN2.....	73
Tabela 16 Dados das curvas de DSC das SLN2.....	73
Tabela 17. Dados de DSC das MF-SLN3, MF-SLN4, SLN3 e SLN4 contendo o ponto de fusão, temperatura <i>onset</i> e os valores de entalpia.	74
Tabela 18 Dados das curvas de DSC das MF-SLN4.....	75
Tabela 19 Dados das curvas de DSC das SLN4.....	75
Tabela 20. Dados de DSC das MF-NLC1, MF-NLC2, NLC1 e NLC2 contendo o ponto de fusão, temperatura <i>onset</i> e os valores de entalpia.	76

Tabela 21 Dados das curvas de DSC das MF-NLC2	77
Tabela 22 Dados da curva de DSC com valores de entalpia esperada para os NLC2	77
Tabela 23. Dados de DSC das MF-NLC3, MF-NLC4, NLC3 e NLC4 contendo o ponto de fusão, temperatura <i>onset</i> e os valores de entalpia.	78
Tabela 24 Dados da curva de DSC com valores de entalpia esperada para os MF-NLC4.....	79
Tabela 25 Dados da curva de DSC com valores de entalpia esperada para os NLC4	79
Tabela 26. Porcentagem de perda de massa das curvas de TG para PZQ, NLCs 1,2,3,4 e MF-NLC2 and 4.....	81
Tabela 27. ¹ HRMN dos deslocamentos químicos do PZQ, PZQ/T60, SLN2 e SLN486	
Tabela 28. ¹ HRMN dos deslocamentos químicos do PZQ, PZQ/T60, NLC2 e NLC4	87
Tabela 29. Ensaio de hemolises	106
Tabela 30 Efeito do PZQ incorporado nos NLCs na atividade in vitro contra os vermes adultos de <i>S. mansoni</i>	109
Tabela 31 Efeito do PZQ na dose de 112mg/kg incorporado nos diferentes sistemas sobre os vermes adultos.	120
Tabela 32 Efeito do PZQ na dose de 149 mg/kg incorporado nos diferentes sistemas sobre os vermes adultos.	121

LISTA DE ABREVIATURAS

- AO – Ácido oleico
- CC – Capacidade de carga
- CG – Grupo controle
- DSC – Calorimetria diferencial exploratória
- DMSO – Dimetil sulfóxido
- DRX – Difração de raio-x
- EE – Eficiência de encapsulação
- GMS – *glycerol monostearate* (monoestearato de glicerila)
- MF – Mistura física
- MEV – Microscopia eletrônica de varredura
- PC – Fosfatidilcolina de soja
- P-407 – Poloxamer 407
- PZQ – Praziquantel
- TGA - Análises de termogravimetria
- T60 – Tween 60
- T-onset – Temperatura *onset*
- SLN – *Solid Lipid Nanoparticle* (Nanopartículas lipídicas sólidas)
- NLC – *Nanostructured lipid carrirers* (Carreadores lipídicos nanoestruturados)
- RMN – Ressonância Magnética Nuclear
- IV-FT – Infravermelho
- WHO - Organização Mundial de Saúde,
- OPG – Ovos por grama de fezes
- PgP – Glicoproteína P
- O/A – óleo em água

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	18
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	22
2.1	Esquistossomose.....	22
2.2	Sistemas de liberação de fármacos	31
2.3	Nanopartículas lipídicas sólidas (SLN)	34
2.4	Métodos empregados na produção das SLNs e NLCs.....	38
2.4.1	Método de evaporação do solvente	39
2.4.2	Método de microemulsão a quente	39
2.4.3	Método de sonicação.....	40
2.4.4	Método de alta velocidade de cisalhamento à quente.....	40
3	OBJETIVOS.....	41
4	Material e Métodos	42
4.1	Materiais	42
4.1.1	Substâncias e Reagentes	42
4.1.2	Equipamentos.....	42
4.2	Métodos.....	43
4.3	Desenvolvimento e caracterização dos diferentes carreadores lipídicos.....	44
4.3.1	Desenvolvimento de carreadores lipídicos nanoestruturados e nanopartículas sólidas lipídicas empregando homogeneização e alta velocidade de cisalhamento	44
4.4	Caracterização Físico-Química dos Carreadores Lipídicos Nanoestruturados e das Nanopartículas sólidas lipídicas.....	45
4.5	Determinação do tamanho das partículas, índice de polidispersidade e potencial zeta	45
4.6	Determinação da eficiência de encapsulação e capacidade de carregamento	45
4.7	Calorimetria exploratória diferencial (DSC)	46
4.8	Análises de Termogravimetria (TGA).....	46
4.9	Ressonância magnética nuclear ¹ H	46
4.10	Difração de Raio-X.....	47

4.11	Espectroscopia na região do Infravermelho (IV)	47
4.12	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	47
4.13	Avaliação do perfil de segurança dos carreadores lipídicos nanoestruturados.	48
	O perfil de segurança dos NLCs foi avaliado através de ensaios de hemólises dos enterócitos e ensaio de citotoxicidade <i>in vitro</i>	48
4.13.1	Hemólises.....	48
4.13.2	Ensaio de citotoxicidade <i>in vitro</i>	48
4.13.3	Atividade esquistosomicida.....	49
4.13.3.1	Parasitas e Animais	49
4.13.3.2	Recuperação dos parasitas de <i>S. mansoni</i>	50
4.13.3.3	Avaliação <i>in vitro</i> da NLC/PZQ sobre vermes adultos de <i>S. mansoni</i>	50
4.13.3.4	Tratamento <i>in vivo</i> sobre <i>S. mansoni</i>	50
4.13.4	Análises dos Tratamentos <i>in vivo</i>	51
4.13.4.1	Avaliação da intensidade parasitária	51
4.13.4.2	Contagem de ovos nas fezes (OPG)	51
4.13.4.1	Oograma	51
5	RESULTADOS	53
5.1	Preparação e caracterização das SLNs e NLCs	53
5.2	Determinação do tamanho das partículas, índice de polidispersidade e potencial zeta.....	54
5.3	Determinação da eficiência de encapsulação e capacidade de carregamento	56
5.4	Calorimetria exploratória diferencial (DSC)	57
5.5	ESTUDOS DE TERMOGRAVIMETRIA PARA OS DIFERENTES SISTEMAS.....	80
5.6	RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)	84
5.7	Difração de Raio-X.....	90
5.8	ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO	96
5.9	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	103
5.10	Avaliação do perfil de segurança <i>in vitro</i>	105

5.10.1	HEMOLISES.....	105
5.10.2	Efeito do PZQ encapsulado nos NLC na atividade <i>in vitro</i> contra <i>S. mansoni</i>	107
5.11	Atividade <i>in vivo</i>	112
5.11.1	Estudo <i>in vivo</i> com camundongos Balb infectados por <i>Schistosoma mansoni</i> da linhagem BH.....	112
5.11.1.1	Efeito das SLNs e NLCs sem PZQ sobre a atividade contra os vermes adultos.....	112
5.11.1.2	Efeito do PZQ incorporado nos diferentes sistemas na dose de 112mg/Kg e 149mg/Kg sobre a atividade contra os vermes adultos	117
6	DISCUSSÃO.....	125
7	CONCLUSÃO.....	127
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	128

1 INTRODUÇÃO

As doenças parasitárias provocadas por protozoários ou helmintos são importantes, pois afetam em torno de 30% da população mundial. Além disso, as infecções parasitárias causam morbidade e podem provocar mortalidade (DATE *et al.*, 2007). As doenças parasitárias são distribuídas mundialmente, principalmente em locais de baixas condições sanitárias (ABDEL RAZEK *et al.*, 2011). Porém algumas delas têm se expandido geograficamente devido à imigração dos seres humanos e animais, fatores climáticos e geográficos. O aumento do movimento da população como viagens para regiões tropicais expandiram, levando a doença para áreas distantes das áreas endêmicas (CHAN *et al.*, 2012).

A esquistossomose, também conhecida como bilharziose, xistosa, doença do caramujo e barriga d'água é uma infecção causada por um parasito intravascular de vida longa do gênero *Schistosoma*, a qual apresenta diferentes espécies adaptadas ao parasitismo (KATZ,ALMEIDA 2003; KING 2009; CLERINX,VAN GOMPEL 2011; ROLLINSON *et al.*, 2013). É considerado um importante problema em saúde pública que afeta um pouco mais de 200 milhões de pessoas mundialmente (DE OLIVEIRA *et al.*, 2012; GARBA *et al.*, 2013). Somente no Brasil, são estimados em 2,5 milhões o número de pessoas infectadas pela doença, sendo o maior número de casos em estados do nordeste do país, como Sergipe, Pernambuco, Paraíba entre outros. Além desses as regiões norte, sul e sudeste também apresentam focos da doença (BRASIL 2005).

Até o presente momento, o praziquantel (PZQ) é o único fármaco para o tratamento da esquistossomose, o qual foi inicialmente estudado para uso veterinário contra cestódeos. Trata-se de um fármaco da classe das pirazinoisoquinolonas eficaz contra todas as espécies de *Schistosoma*, sendo eficaz na fase adulta do parasita (COURA, CONCEIÇÃO 2010; VOUTILAINEN 2011; DE OLIVEIRA *et al.*, 2012). Apesar de ser bastante utilizado, o PZQ apresenta algumas características que limitam o seu uso, por exemplo, a baixa solubilidade em água e com isso possui uma biodisponibilidade errática ou

Introdução

baixa (HAGAN *et al.*, 2004; MOURÃO *et al.*, 2005; GRYSEELS *et al.*, 2006). A biodisponibilidade de fármacos administrados pela via oral está relacionada às suas propriedades físico-químicas, como sua solubilidade em água e a fatores fisiológicos como motilidade intestinal, viscosidade, entre outros (BONLOKKE *et al.*, 2001; HÖRTER, DRESSMAN 2001; PORTER *et al.*, 2007).

Atualmente as pesquisas têm focado em desenvolvimento de alternativas tecnológicas que melhorem as limitações de fármacos com problemas como a baixa solubilidade, absorção baixa ou errática ou que apresentam metabolismo pré-sistêmico (CHAKRABORTY *et al.*, 2009). Sistemas nanoestruturados para liberação de fármacos têm sido empregados com sucesso na área farmacêutica por apresentarem a capacidade de compartimentalizar, de maneira eficiente, diversos grupos de agentes terapêuticos e de modificar as propriedades e o comportamento de substâncias ativas em meio biológico (SILER-MARINKOVIC *et al.*, 1997; NARVEKAR *et al.*, 2012; TAMJIDI *et al.*, 2013). Particularmente, os sistemas desenvolvidos à base lipídeos tem recebido considerável atenção devido aos problemas apresentados por alguns fármacos, tais como a solubilidade que pode ser limitada e também pode apresentar problemas de estabilidade (KANG *et al.*, 2004; CHAKRABORTY *et al.*, 2009).

Dentre os sistemas lipídicos que têm sido amplamente estudados encontram-se as nanopartículas lipídicas sólidas (*solid lipid nanoparticles*) (SLNs), que foram primeiramente descritas na década de 90 quando Lucks e Müller registraram a patente de produção pelo método de homogeneização e alta pressão (LUCKS, MÜLLER 1996; PARDEIKE *et al.*, 2009). As SLNs são sistemas coloidais desenvolvidas combinando as vantagens das emulsões, nanopartículas poliméricas e lipossomas e suprimindo suas limitações, tais como, a dificuldade de escalonamento e estabilidade físico-química. São partículas que possuem em sua matriz um lipídeo que é sólido à temperatura ambiente, acomodam assim mais facilmente os fármacos lipossolúveis (TEERANACHAIDEEKUL *et al.*, 2007; SILVA *et al.*, 2009; KOVACEVIC *et al.*, 2011; SILVA *et al.*, 2011).

Apesar de bastante descrita as SLNs apresentam algumas características que limitam o seu uso, por exemplo, o lipídeo sólido quando recristaliza, forma uma estrutura muito organizada e com isso facilita a expulsão

Introdução

do fármaco durante o armazenamento, além disso, a quantidade de fármaco encapsulado na matriz é limitada. Para suprir essas limitações, um novo tipo de nanopartículas foram desenvolvidas e denominadas carreadores lipídicos nanoestruturados (*nanostructured lipid carriers*) (NLCs). Os NLCs são considerados a segunda geração de SLNs, são compostos por uma matriz contendo uma mistura de lipídeo sólido e líquido (SILVA *et al.*, 2009; OBEIDAT *et al.*, 2010; TAN *et al.*, 2010). A presença do lipídeo líquido forma uma matriz mais desorganizada, o que favorece a acomodação do fármaco, podendo aumentar a eficiência de encapsulação e diminuir a taxa de expulsão durante o armazenamento (MÜLLER *et al.*, 2007; TEERANACHAIDEEKUL *et al.*, 2007; PARDEIKE *et al.*, 2009; CHEN *et al.*, 2010).

Em 2011 desenvolvi um projeto de pesquisa intitulado em “desenvolvimento e caracterização de carreadores lipídicos nanoestruturados contendo praziquantel” sob a orientação da Prof^a Dr^a Maria Palmira Daflon Gremião. Os NLCs foram preparados utilizando monoestearato de glicerila (GMS) e ácido oleico (AO) como lipídeo sólido e líquido respectivamente, dois de tensoativos foram utilizadas, sendo um contendo fosfatidilcolina (PC) e poloxamer (P-407) (NLC1 e 2) e outra combinação fosfatidilcolina (PC) e tween 60 (T-60) (NLC3 e 4), sendo os números ímpares sistemas sem PZQ e os números pares contendo PZQ.

Os resultados foram satisfatórios, pois mostram que ambos os sistemas apresentaram um diâmetro médio em escala nanométrica, sendo 414 e 281 para NLC1 e NLC2 respectivamente e 343 e 377 para NLC3 e NLC4 respectivamente. A eficiência de encapsulação foi alta, sendo 83% para os NLC2 (PC/P-407) e 88% para os NLC4 (PC/T60), para o estudo absorção intestinal o modelo de transporte saco intestinal invertido foi empregado. Os resultados mostraram que os NLC2 apresentaram um perfil de liberação semelhante ao PZQ livre, enquanto para os NLC4 a concentração de PZQ transportada foi significativamente menor. O trabalho apresentado me atribuiu o título de mestre em Ciências Farmacêuticas.

O presente estudo propôs avaliar o efeito de SLN e NLC como uma estratégia de melhorar a eficácia do PZQ na atividade contra o *S. mansoni*. A análise comparativa foi realizada para ambos os sistemas com o objetivo de

Introdução

avaliar a influência do lipídeo líquido e de diferentes combinações de tensoativos tanto nas propriedades físico-químicas, quanto na atividade biofarmacotécnica e biológica. Para isso avaliamos duas combinações diferentes de sistemas tensoativos, sendo uma composta por fosfadilcolina de soja e poloxamer 407 (PC/P-407) e outra com fosfatidilcolina de soja e tween 60 (PC/T60. Na preparação das SLNs foi utilizado o GMS como lipídeo sólido e para os NLC serão utilizados GMS e AO como lipídeos sólidos e líquidos respectivamente.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Esquistossomose

A esquistossomose é uma infecção parasitária causada pelo trematódeo do gênero *Schistosoma*, o qual apresenta várias espécies como, *Schistosoma haematobium*, *S. japonicum* e o *S. mansoni* entre outros e é classificada como doença tropical negligenciada (DE OLIVEIRA *et al.*, 2012; GARBA *et al.*, 2013). Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO), a esquistossomose ocorre em 77 países, porém o maior risco da doença encontra-se em 52 destes (WHO 2012; FREZZA *et al.*, 2013). A Tabela 1 mostra alguns países ou regiões onde há a doença.

Tabela 1. Distribuição geográfica mundial da Esquistossomose. Tipos de infecção, espécies dos parasitos.

Espécies	Tipo de infecção	Distribuição mundial
<i>Schistosoma mansoni</i>	Esquistossomose intestinal	África, Oriente Médio, Caribe, Brasil, Suriname, Venezuela
<i>Schistosoma japonicum</i>	Esquistossomose intestinal	China, Filipinas, Indonésia.
<i>Schistosoma mekongi</i>	Esquistossomose intestinal	Camboja e Lao.
<i>Schistosoma intercalatum</i> e <i>Schistosoma guineensis</i>	Esquistossomose intestinal	Zonas florestais da África Central
<i>Schistosoma haematobium</i>	Esquistossomose urogenital	África e Oriente Médio

Tabela adaptada da OMS, disponível em <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs115/es/>, acessado em 23/10/2012.

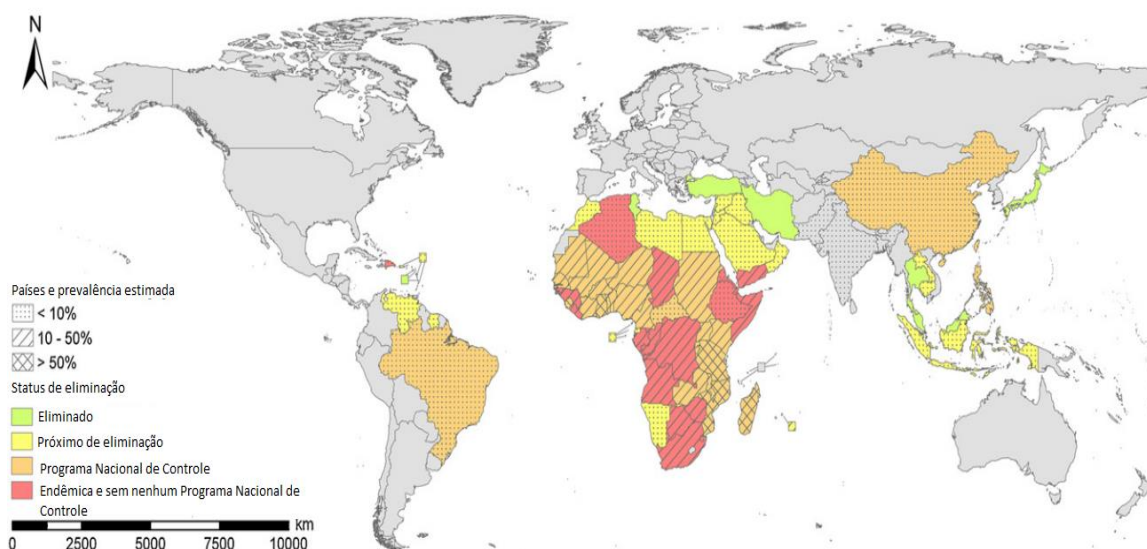
No Brasil, estima-se 2,5 milhões o número de pessoas infectado sendo o maior número de casos no nordeste do país. Dentre os estados acometidos encontram-se Alagoas, Bahia, Ceará, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte, Sergipe, Pará, Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São

Revisão da Literatura

Paulo, Paraná, entre outros. Possui baixa letalidade e alta morbidade e as principais causas de óbito estão relacionadas ao comprometimento de alguns órgãos (BRASIL 2005; VITORINO *et al.*, 2012). Devido à necessidade de um hospedeiro intermediário aquático, o caramujo, a infecção está relacionada com lagos e rios, colocando em risco cerca de 200 milhões de pessoas em todo o mundo, sendo 20 milhões de pessoas que apresentam a doença de forma grave. Afeta cerca 201,5 milhões na África e mais de 90% dos casos são encontrados na África Subsaariana (TENDLER, SIMPSON 2008; ROLLINSON *et al.*, 2013). Apesar de a eliminação ser considerada nacional, pode haver áreas com baixa prevalência dentro de alguns países.

A Figura 1 apresenta a distribuição global e a prevalência estimada para os casos de esquistossomose em que se observa que em poucos países a doença foi eliminada, em alguns países a doença é endêmica e apresenta baixo índice de prevalência (>10%), ou prevalência entre (10-50%) ou acima de 50% de casos, sendo que alguns apresentam programa nacional de controle e em outros não apresentam nenhum programa de controle (ROLLINSON *et al.*, 2013).

Figura 1 Distribuição global da esquistossomose (Fonte ROLLINSON *et al.*, 2013).

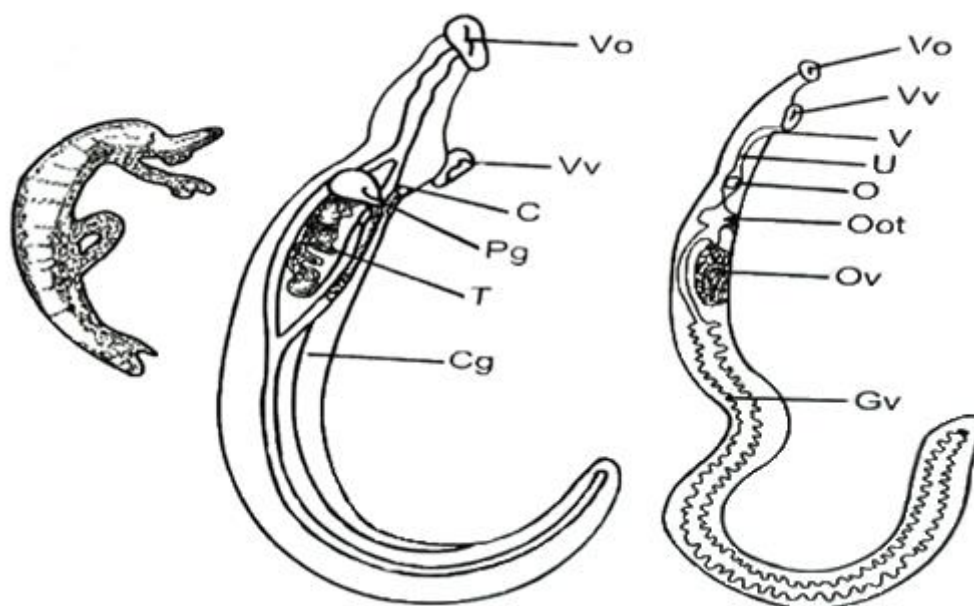


Diferentemente de outros trematódeos, os *Schistosoma* possuem sexos separados (Figura 2). O verme macho adulto mede cerca de 1cm com o corpo em formato achatado e coloração branca, apresenta duas ventosas terminais (sendo uma ventosa oral e a outra ventral), um tegumento complexo, trato digestivo, órgãos reprodutores e canal ginecóforo que detêm a fêmea. A fêmea também apresenta

Revisão da Literatura

formato cilíndrico, mede cerca de 1,5cm de comprimento, além disso, é mais fina que o macho e possui coloração branca. Possui um tegumento mais liso, uma ventosa oral, acetábulo, vulva, útero e ovário e na metade posterior se encontra as glândulas vitelogênicas e o ceco. Produz cerca de 350 ovos por dia, dependendo da espécie. O ovo apresenta larvas de miracídeos, o qual secretam enzimas proteolíticas que ajudam os ovos a migrarem para dentro do lúmen da bexiga ou do intestino, dependendo da espécie, alimentam-se de sangue e globulinas através de glicólise anaeróbica (KUNZ 2001; GRYSEELS *et al.*, 2006; MATTOS *et al.*, 2007; DEWALICK *et al.*, 2012)

Figura 2 Representação esquemática dos vermes adultos; casal (à esquerda), macho (centro) e fêmea (à direita)



Representação esquemática Vo- ventosa oral; Vv- ventosa ventral; C- ceco ramificado; Pg- poro genital; T- testículos; Cg – canal ginecóforo; V- vulva; U- útero; O- ovo; Oot- oótipo; O ovário; Gc – glândulas vitelinas (NEVES 1995).

Os ovos do *Schistosoma* medem aproximadamente 150 micras de comprimento e 60 micras de largura, possuindo um formato oval. Na parte mais larga apresenta um espículo que é voltado para trás (NEVES 1995). São classificados em cinco estágios de maturidade (Figura 3), sendo que o primeiro um embrião que mede um terço do diâmetro do ovo, o segundo estágio mede a metade do diâmetro do ovo, já no terceiro estágio os embriões apresentam aproximadamente dois terços do comprimento do ovo, no quarto estágio os

embriões ocupam praticamente todo o ovo, e no quinto estágio os embriões são considerados plenamente desenvolvidos e são então, chamados miracídios (Figura 3C) (PELLEGRINO, FARIA 1965).

A maturação do ovo recém-produzido pelo parasita consiste simplesmente de uma casca reticulada em torno do óvulo e de células vitelínicas, essa formação leva cerca de uma semana, neste período as células vitelínicas proporcionam nutrientes para o desenvolvimento do miracideo e também obtém nutrientes do hospedeiro. A casca do ovo é formada pelo ootipo e reforçada através da atividade da tirosinase que provoca a reticulação das proteínas precursoras, durante o desenvolvimento de uma nova camada (DEWALICK *et al.*, 2012).

Alguns estudos têm demonstrado que a casca do ovo contém numerosas proteínas e algumas glicoproteínas que são conhecidos como antígenos do *Schistosoma*, tais como p40, fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK) e tioredoxina peroxidase. Estas proteínas são responsáveis por induzir uma resposta imune, além disso, a presença das células T helper (Th-2) são responsáveis pela formação dos granulomas o que pode resultar em fibroses e hipertensão portal (KANSE *et al.*, 2005; GRYSEELS *et al.*, 2006; ANTHONY *et al.*, 2010; DEWALICK *et al.*, 2012).

Normalmente metade dos ovos produzidos pelas fêmeas são lançados para o lúmen intestinal, a outra metade fica retida nos tecidos ou atingem a corrente sanguínea e migram para outros órgãos, principalmente fígado e pulmões gerando os granulomas (EL-GAREM 1998).

Revisão da Literatura

Figura 3 Morfologia dos ovos de *S. mansoni* em seus respectivos estágios (A); caramujo do gênero *Biophalaria glabrata* (B); Miracídio (C); Cercária (D).

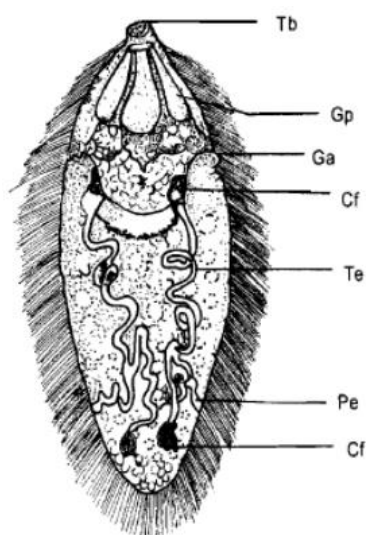
A



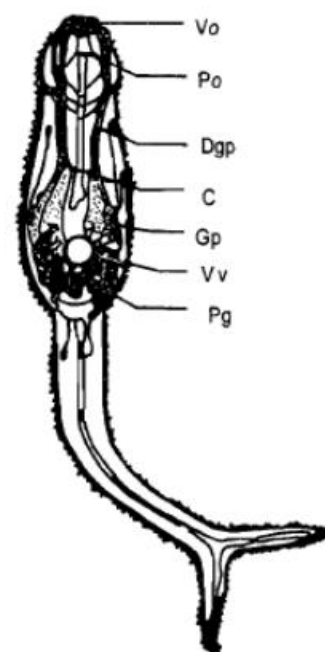
B



C



D



O ciclo de vida dos esquistossomos é complexo e alterna as gerações, envolvendo uma fase de reprodução assexuada no hospedeiro intermediário, o caramujo (Figura 3B) (sendo que esta fase dura em torno de 40 dias), e uma nos hospedeiros definitivos, conforme ilustrado na Figura 4 (KATZ, ALMEIDA 2003; GRYSEELS *et al.*, 2006). Os miracídios são liberados quando o ovo entra em contato com água, sendo este o primeiro estágio de vida livre do parasita. Os miracídios são atraídos pelos caramujos devido às sinais químicos emitidos pelos mesmos (VAN HELLEMOND *et al.*, 2006; REY 2008; OLIVEIRA *et al.*, 2013).

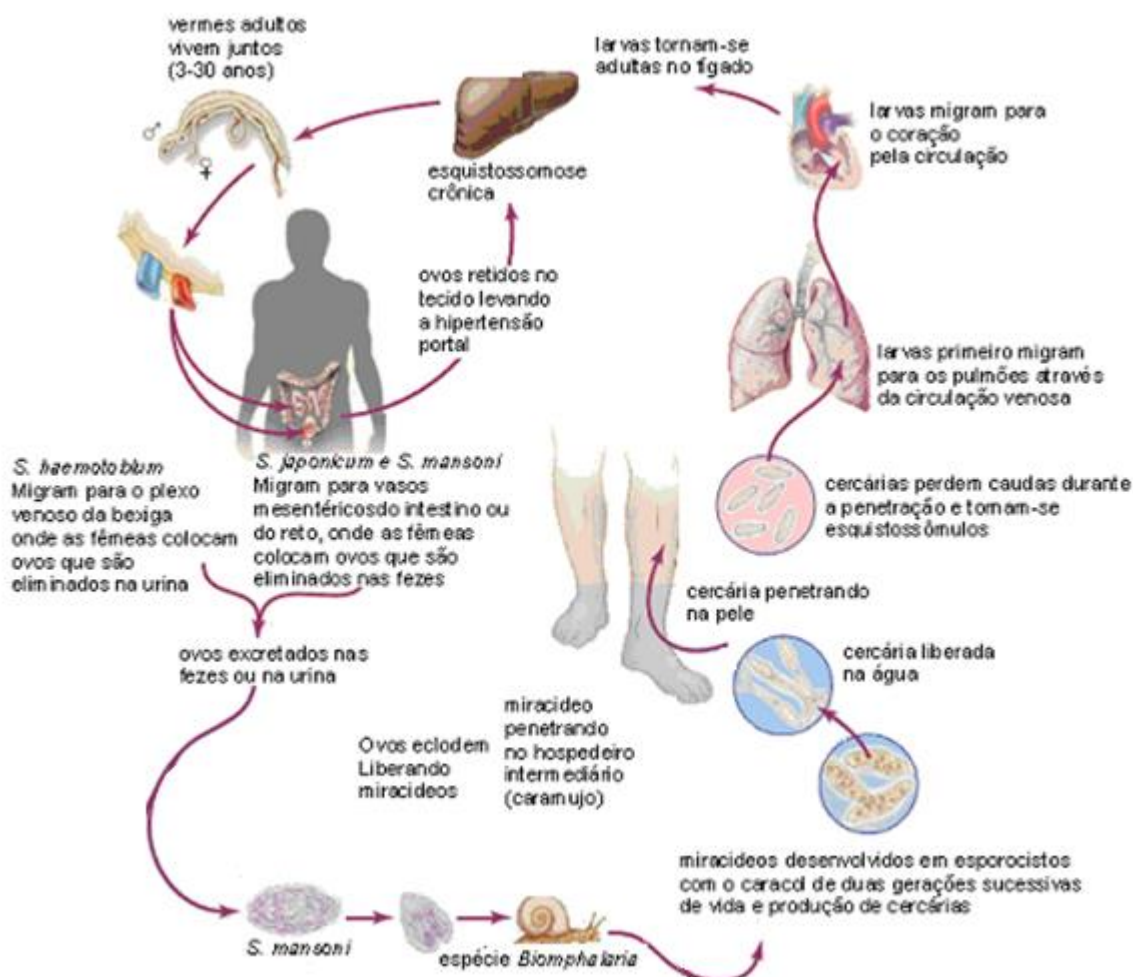
Os miracídios de *S. mansoni* respondem a compostos como: aminoácidos, peptídeos, ácidos graxos de cadeia curta, ácido N-acetilneuroamínico, glutatona, glucose, além desses, respondem a sinais de íons de magnésio, cálcio, hidrogênio e amônia. Acredita-se que os miracídios de *S. mansoni* são atraídos pelos caramujos exclusivamente pelas glicoproteínas que apresentam ligação O-glicosídica, provavelmente entre treonina ou serina e N-acetil-galactosamina (MEHLHORN 2001). Após a penetração pelas partes moles do caramujo, o miracídio perde os cílios. Após a reorganização das células, que ocorre em aproximadamente 48 horas, se multiplica de forma assexuada em esporócitos primários multicelular, depois em esporócitos secundários e por fim em cercarias (MEHLHORN 2001; WU *et al.*, 2009; ANTHONY *et al.*, 2010).

A cercaria que é considerada a segunda fase da vida livre do parasito, começa a se multiplicar 4-6 semanas após a infecção no caramujo. A partir deste período, as cercarias saem do hospedeiro intermediário e podem sobreviver até 72 horas antes de encontrar o hospedeiro definitivo (GRYSEELS *et al.*, 2006). As dermatites cercarianas ocorrem comumente em áreas endêmicas. Durante a penetração que ocorre pela pele, por ação lítica e mecânica devido aos seus movimentos (ação que pode durar até 15 minutos), as cercarias perdem suas caudas, transformando-se em esquistossômulos, atingem a corrente sanguínea ou vasos linfáticos e migram para o coração, pulmões, onde se transformam em vermes jovens (KATZ,DIAS 2001; GRYSEELS *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2007).

Após 4-6 semanas, os casais atingem a veia portal unindo-se, em seguida migram para as veias mesentéricas. Os vermes adultos migram para os vasos mesentéricos do hospedeiro e iniciam a oviposição. Esses ovos saem com as fezes e são lançados em rios ou lagos dando sequência ao ciclo (NEVES 1995; KATZ, ALMEIDA 2003; GRYSEELS *et al.*, 2006).

Revisão da Literatura

Figura 4 Ciclo de vida das diferentes espécies de *Schistosoma mansoni* (adaptado de KING, 2009).



A fase aguda da esquistossomose é debilitante, os sintomas podem aparecer antes mesmo da eliminação de ovos pelas fezes e normalmente entre 6 e 8 semanas após a infecção. Tais sintomas podem ser: febre, mialgia, fadiga, eosinofilia, transtornos abdominais (PEARCE, MACDONALD 2002; GRYSSELS *et al.*, 2006). Na fase aguda, há níveis mensuráveis de Fator de Necrose Tumoral (FNT) e células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) no plasma. As PBMCs são responsáveis por produzir altas quantidades de TNF, interleucinas 1 e 6 (IL-1 e IL-6), no organismo após estimulado com o antígeno do parasita, a produção de citocinas por PBMC reflete na ativação das células T Helper 1 (Th1) (CORRÊA-OLIVEIRA *et al.*, 2000; PEARCE,MACDONALD 2002). À medida que a doença progride, com o desenvolvimento de ovos pela fêmea, inicia-se a produção de T Helper 2 (Th2) que respondem aos ovos do parasita, há também a produção de IL-10 que

Revisão da Literatura

parece desenvolver um papel muito importante nesse processo (PEARCE,MACDONALD 2002).

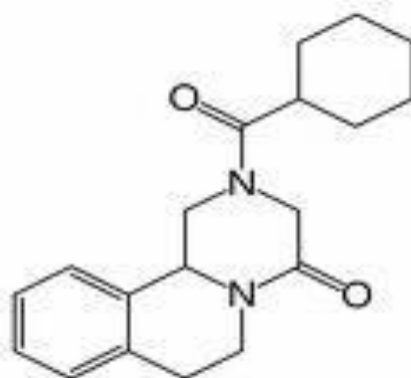
O tegumento do *S. mansoni* é formado por várias lamelas, estando em processo contínuo de renovação, permitindo a passagem de nutrientes, principalmente íons inorgânicos. Além disso, foi demonstrado que o tegumento de *S. mansoni* é capaz de ativar a resposta imune inata e com isso induz a uma imunidade protetora contra vacinas ou fármacos. Estudos também têm demonstrado que o tegumento do *S. Mansoni* possui uma glicoproteína que auxilia no seu mecanismo de defesa. A glicoproteína P (PgP) do parasita é capaz de expulsar substâncias ou microrganismos que possam afetar o parasita (KATZ,DIAS 2001; MESSERLI *et al.*, 2009; KASINATHAN *et al.*, 2010; ARAUJO *et al.*, 2012).

Uma das alternativas no controle da esquistossomose seria o combate do caramujo, além da educação sanitária e boas condições de saneamento básico, porém há uma grande dificuldade devido aos custos associados com tais implementações e como não existe vacinas para o tratamento da esquistossomose, outra alternativa é o uso de medicamentos para combater esta doença (COURA,AMARAL 2004; COURA,CONCEIÇÃO 2010; UTZINGER *et al.*, 2011).

O Praziquantel (PZQ) foi descoberto no ano de 1972 pelo laboratório Bayer na Alemanha. Foi desenvolvido primeiramente para uso veterinário contra cestódeos e em seguida para tratamento da esquistossomose humana, sendo o primeiro anti-helmíntico a atender os requisitos da OMS (COURA,CONCEIÇÃO 2010; WHO 2012).

O PZQ é comumente encontrado como uma mistura racêmica, em que o enantiômero *levo*, é ativo, enquanto que o *S-(+)*-enantiômero, ou *dextro*, é inativo. Desta forma, a atividade anti-helmíntica está relacionada principalmente ao enantiômero *R (-)*. Quimicamente, o PZQ é a 2-(ciclohexilcarbonil)-1,2,3,6,7,11b-hexahidro-4H-pirazino[2,1a] isoquinolin-4-ona; possui como fórmula química $C_{19}H_{24}N_2O_2$, e o peso molecular (PM) é 312,41 g/mol. As especialidades farmacêuticas disponíveis comercialmente são Cestox[®] e Cisticid[®] e sua fórmula estrutural está ilustrada na Figura 5 (XIAO 2005).

Figura 5 Estrutura química do Praziquantel.



O PZQ é efetivo contra as cinco espécies de *Schistosoma*, tem pouco ou nenhum efeito adverso e nos últimos anos, seu preço tem sido reduzido substancialmente (GREENBERG 2005; XIAO 2005; 2006; SHAOHONG *et al.*, 2006).

Apesar do mecanismo de ação do PZQ não estar totalmente esclarecido, sabe-se que alterações de resíduos de aminoácidos individuais mesmo em regiões críticas podem provocar mudanças significativas na sensibilidade farmacológica e propriedades funcionais dos receptores. O PZQ interrompe a homeostase de Ca^{+2} no verme adulto. Em poucos segundos de exposição ao fármaco, dois efeitos principais se tornam aparentes, a contração muscular rápida e o rompimento do tegumento. Canais de cálcio são formados por proteínas compostas por várias subunidades, dentre elas: $\alpha 1$, β , $\alpha 2 -\gamma$. A subunidade $\alpha 1$ contém quatro domínios homólogos, ligado por laços intracelulares, que formam os lados da membrana (JEZIORSKI, GREENBERG 2006). As subunidades β dos canais de cálcio modulam a subunidade $\alpha 1$, a fim de manter as concentrações de cálcio em equilíbrio. Uma provável ação do PZQ seria o rompimento desta interação $\alpha 1 / \beta$ culminando na perda do efeito modulatório da subunidade $\alpha 1$, pela β (JEZIORSKI, GREENBERG 2006; BURAEI, YANG 2010; CHAN *et al.*, 2013). O PZQ estimula uma rápida absorção de Ca^{+2} nos machos de *Schistosoma* bem como um fluxo mais lento de Na^{+} . A contração da musculatura e decomposição do tegumento do verme são processos dependentes de Ca^{+2} , tal efeito é importante, pois os vermes perdem a capacidade de fixação devido ao relaxamento da ventosa ventral. A deformação do tegumento pode ser observada após a exposição do parasita ao

PZQ (PAX *et al.*, 1978; GREENBERG 2005; JEZIORSKI, GREENBERG 2006; CHAN *et al.*, 2013; GREENBERG 2013).

Apesar de bastante utilizado, o PZQ apresenta algumas características que limitam o seu uso, tais como, uma taxa de dissolução baixa, e com isso, uma biodisponibilidade incompleta ou errática. Além disso, o PZQ é susceptível a ação da SMDR2 que é um homólogo da PgP do *Schistosoma*, favorecendo assim a resistência do parasita ao PZQ devido ao mecanismo de efluxo promovido pela PgP (MESSERLI *et al.*, 2009; KASINATHAN *et al.*, 2010; GREENBERG 2013).

2.2 Sistemas de liberação de fármacos

Muitas alternativas têm sido focadas no desenvolvimento de sistemas nanoestruturados, como os lipossomas, as nanopartículas lipídicas sólidas, as micro e nanopartículas poliméricas, as microemulsões, as dispersões sólidas e os cristais líquidos.

Ao longo dos últimos anos nosso grupo de pesquisa tem se dedicado ao desenvolvimento e avaliação de sistemas de liberação para administração de PZQ. Inicialmente foi demonstrado que a incorporação de PZQ em lipossomas de fosfatidilcolina de soja melhorou a solubilidade do fármaco em meio aquoso sem, contudo, alterar sua eficácia *in vitro*. Em estudos *in vivo*, o PZQ na dose de 40mg/kg incorporado em lipossomas de fosfatidilcolina (PC) reduziu significativamente o número de ovos e vermes de *S. mansoni* da linhagem LE em camundongos quando comparado com o PZQ disperso em meio aquoso (MOURÃO *et al.*, 2005).

Diante os resultados apresentados por Mourão *et al.*, 2005 surgiram novas perspectivas através de estudos *in vivo* e *ex vivo* de estabelecer uma melhora na biodisponibilidade do PZQ incorporados a lipossomas. Na sequência dos estudos, Cinto 2005 avaliou a permeação intestinal do PZQ incorporados a lipossomas de fosfatidilcolina de soja empregando o modelo do saco intestinal invertido. Para o desenvolvimento do estudo, diferentes concentrações de PZQ foram testadas e os resultados mostraram um aumento linear de PZQ transportado através da membrana intestinal, até a concentração

de 250µg/mL. A partir desta, Cinto (2005) observou que não ocorreu diferença de permeação na medida em que aumentada a quantidade de PZQ, assim selecionou-se a concentração de 250µg/mL. Neste estudo, comparou o PZQ disperso em meio aquoso, uma mistura física contendo PZQ (MF-PZQ) e os lipossomas (L-PZQ), os resultados mostraram que a absorção do PZQ incorporado aos lipossomas foi significativamente menor quando comparado com a MF-PZQ e o PZQ livre (CINTO *et al.*, 2009).

Em estudos *in vivo*, PZQ na dose de 40mg/kg incorporado em lipossomas de PC reduziram significativamente o número de ovos e vermes de *S. mansoni* LE em camundongos quando comparados com o PZQ disperso em meio aquoso. Com os resultados apresentados, surgiu o interesse de avaliar a influência do PC no mecanismo de transporte do PZQ através da membrana intestinal. Neste sentido, Souza, 2008 avaliou a influência do PC na absorção intestinal. Os resultados mostraram que o transporte do fármaco foi reduzido com o aumento da quantidade de PC. Com isso levantou-se a hipótese de que o PZQ estaria retido na membrana intestinal devido à interação com a vesícula lipídica formada com o PC.

Com o objetivo de avaliar a eficácia do PZQ em dispersões lipídicas, Frezza 2007 e Souza 2008 avaliaram a eficácia *in vivo* empregando cepas da linhagem BH, 300mg/kg de PZQ incorporado a lipossomas, os resultados mostraram que a oviposição foi menor uma vez que foram encontrados ovos de primeiros estágios em menores quantidades. O PZQ incorporado aos lipossomas (L-PZQ) na concentração de 300mg/kg mostrou ser mais eficaz quando comparado com as demais formulações, uma vez que se observou a diminuição de ovos maduros (FREZZA *et al.*, 2007; SOUZA 2008).

Outro sistema que tem sido amplamente investigado para a incorporação de fármacos lipofílicos são as nanopartículas lipídicas que podem ser denominadas nanopartículas lipídicas sólidas (SLN) ou carreadores lipídicos nanoestruturados (NLC). Como o PZQ apresenta uma natureza lipofílica, sugere-se que o fármaco esteja incorporado aos domínios lipofílicos de sistemas lipídicos.

Em 2011 Souza desenvolveu SLN utilizando como fase lipídica o ácido esteárico e como tensoativo o poloxamer 188. A absorção intestinal foi avaliada

empregando o modelo do saco intestinal invertido, os resultados mostraram que o transporte do PZQ incorporado nas SLNs foi menor quando comparado com o fármaco livre (SOUZA 2011).

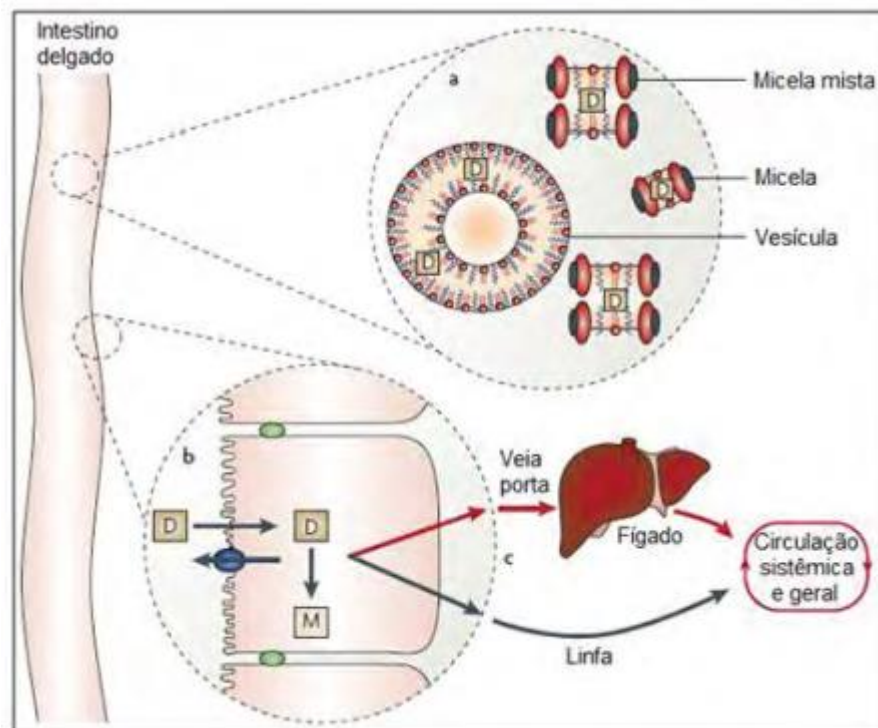
Santos (2011) desenvolveu NLC utilizado monoestearato de glicerila e ácido oleico como lipídeo sólido e líquido respectivamente, dois de tensoativos foram utilizadas, sendo um contendo fosfatidilcolina e poloxamer P-407 (NLC2) e outra combinação fosfatidilcolina e tween 60 (NLC4) ambos contendo PZQ, no estudo absorção intestinal o modelo de transporte saco intestinal invertido foi empregado. Os resultados mostraram que os NLC2 apresentaram um perfil de liberação semelhante ao PZQ livre, enquanto para os NLC4 a concentração de PZQ transportada foi significativamente menor (SANTOS 2011).

Sistemas nanoestruturados para liberação de fármacos têm sido empregados com sucesso na área farmacêutica por apresentarem a capacidade de compartimentalizar, de maneira eficiente, diversos grupos de agentes terapêuticos e de modificar as propriedades e o comportamento de substâncias ativas em meio biológico (SILER-MARINKOVIC *et al.*, 1997; MOURÃO *et al.*, 2005). Em particular, sistemas contendo carreadores lipídicos têm sido desenvolvidos para aumentar a biodisponibilidade de fármacos lipofílicos através do aumento da solubilização do fármaco no trato gastrintestinal, e podem contribuir, também, para estudo dos mecanismos de transporte através de membranas biológicas (LJUSBERG-WAHREN *et al.*, 2005; BROGÅRD *et al.*, 2007).

Embora o mecanismo do transporte intestinal de fármacos lipofílicos não seja completamente entendido, Porter *et al.*, 2007 em seu trabalho sugerem que os fármacos podem ser transportados para a circulação sistêmica pela veia porta, entretanto o sistema linfático pode ser o caminho importante de absorção de fármacos altamente lipofílicos ou incorporados em nanopartículas lipídicas, evitando o metabolismo pré-sistêmico. Conforme ilustrado na Figura 6, Porter, *et al.*, 2007 apresentam os possíveis mecanismos de absorção de fármacos.

Revisão da Literatura

Figura 6 Efeito de formulações lipídicas na absorção de fármacos. D - fármaco solubilizado no meio intestinal e M—estruturas coloidais (micelas ou vesículas).



Neste trabalho Porter *et al.*, 2007 discutem as vantagens da utilização de sistemas lipídicos na absorção de fármacos lipofílicos e os mecanismos pelos quais os lipídeos ou excipientes lipofílicos podem afetar a absorção, biodisponibilidade e eliminação do fármaco após a administração oral. São eles: a alteração do meio intestinal, o transporte linfático e o transporte através dos enterócitos. Fármacos administrados por via oral podem se difundir através dos enterócitos e serem absorvidos pelos capilares da veia porta, passar pelo do fígado e assim, serem absorvidos para a circulação sistêmica. Os fármacos altamente lipofílicos, no entanto, podem associar-se com a lipoproteína da linfa no enterócito e ter acesso ao sistema linfático intestinal e passar para circulação sistêmica, evitando a passagem pelo fígado (PORTER *et al.*, 2007).

2.3 Nanopartículas lipídicas sólidas (SLN)

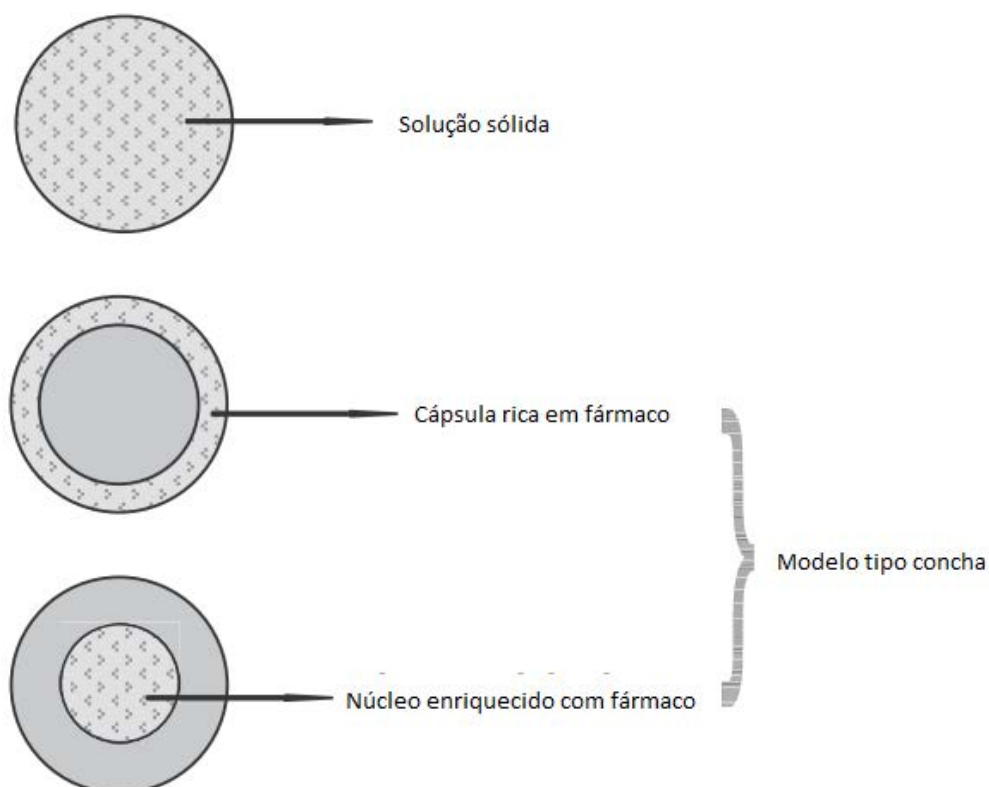
As nanopartículas lipídicas sólidas (SLNs) consideradas a primeira geração de nanopartículas lipídicas, foi introduzida na literatura em 1991 por Lucks e Müller quando descreveram a patente de produção pelo método de homogeneização e alta pressão. As SLNs são partículas de tamanho entre 50 a 1000nm o qual é composto por uma matriz que é sólida a temperatura ambiente

Revisão da Literatura

ou corpórea (PARDEIKE *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2009). Essas SLNs são sistemas coloidais que foram desenvolvidos combinando as vantagens das emulsões, lipossomas e nanopartículas poliméricas (PARDEIKE *et al.*, 2009; MARTINS *et al.*, 2012).

Existem três diferentes tipos de SLNs descritos na literatura (Figura 7) que variam conforme a incorporação do fármaco no interior da matriz lipídica. O primeiro modelo ocorre quando o fármaco está disperso na matriz lipídica. Normalmente essa situação ocorre quando as SLNs são produzidas por homogeneização a frio e o fármaco não é facilmente solúvel nos tensoativos utilizados. O segundo modelo é chamado de tipo concha, em que a matriz é formada na temperatura de recristalização do lipídeo. O terceiro, ocorre quando o sistema é resfriado e precipitado, aumentando a concentração do fármaco devido à sua saturação por causa da recristalização do lipídeo (UNER, YENER 2007; KHAN 2012; PRIYANKA 2012).

Figura 7 Diferentes modelos de incorporação de fármacos no interior das SLNs, sendo: matriz de solução sólida homogênea; cápsula rica em fármaco e núcleo enriquecido com fármaco (Figura adaptada por Üner & Yener 2007).



As SLNs são produzidas dispersando o lipídeo em um meio aquoso, estabilizados por tensoativos ou combinações de tensoativos (PARDEIKE *et al.*,

2009), os lipídeos utilizados para produzir as SLNs podem ser mono, di, ou triglicerídeos, ácidos graxos ou ceras, além disso, os tensoativos podem ser iônicos ou não iônicos com diferentes massas moleculares (MÜLLER *et al.*, 2002; SOUTO, DOKTOROVOVA 2009).

Diferentes métodos podem ser utilizados no preparo das nanopartículas, tais como, homogeneização em alta pressão a quente e a frio, microemulsão, emulsificação e evaporação do solvente, emulsificação por dupla emulsão, “spray drying”, homogeneização em alta velocidade de cisalhamento entre outras (PARDEIKE *et al.*, 2009; KHAN 2012; PRIYANKA 2012). As SLNs apresentam muitas vantagens, como boa tolerabilidade, possibilidade de escalonamento, proteção ao fármaco contra degradação química, a utilização de lipídeos biodegradáveis e biocompatíveis, a utilização de excipientes baratos, boa estabilidade, além disso, podem ser utilizadas por diferentes vias de administração, tais como, a via cutânea, ocular, parenteral, vaginal, retal e oral (HU *et al.*, 2005; PARDEIKE *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2009; CHEN *et al.*, 2010; MARTINS *et al.*, 2012).

O uso das SLNs como sistema de liberação controlada de fármacos pela via oral tem atraído considerável interesse, pois esses sistemas podem melhorar a biodisponibilidade de fármacos pouco solúveis em água (UNER, YENER 2007; YUAN *et al.*, 2007). Yuan *et al.*, 2007, sintetizaram um composto chamado otcadecilamina-isotiocianato (ODA-FITC) e incorporaram nas SLNs. Os autores realizaram estudos farmacocinéticos com as SLNs e observaram a presença de dois picos diferentes, sendo que o primeiro surgiu entre 1-2 horas, sugerindo um “burst effect”, enquanto o segundo pico surgiu entre 6-8 horas. Com estes resultados os autores sugeriram que a SLN poderia liberar e redistribuir o fármaco após a absorção, exibindo assim o segundo pico (YUAN *et al.*, 2007).

Yang *et al.*, 2009 desenvolveram SLNs contendo como tensoativo o compritol 888 ATO, butil acetato como lipídeo e o PZQ e compararam a farmacocinética do sistema com a do fármaco em comprimido (PZQ-TAB). Neste estudo, eles observaram dois picos, sendo o primeiro atribuído pelo fármaco livre absorvido na membrana e o segundo pico os autores sugerem que foi devido a liberação do fármaco encapsulado para do trato

gastrointestinal, Yang e colaboradores concluíram que as SLNs melhoraram significativamente a biodisponibilidade do PZQ quando comparado com PZQ-TAB (YANG *et al.*, 2009).

Apesar de serem bastante descritas e bem utilizadas, as SLNs apresentam algumas limitações para seu uso, tais como, a capacidade de encapsulação do fármaco, expulsão do fármaco durante armazenamento devido a transformações polimórficas durante a vida útil destes sistemas e alta quantidade de água nas dispersões SLNs (70-95%). Estes problemas são devido à presença dos lipídeos sólidos (MÜLLER *et al.*, 2002).

Os carreadores lipídicos nanoestruturados (NLC) são sistemas coloidais que foram também desenvolvidos na década de 1990 para melhorar as limitações das SLNs, como a baixa eficiência de encapsulação, a expulsão do fármaco devido à formação de cristais perfeitos. São considerados a segunda geração dessas nanopartículas e são compostos por uma mistura de lipídeos sólidos e líquidos em sua matriz (MÜLLER *et al.*, 2007; SILVA *et al.*, 2009; OBEIDAT *et al.*, 2010; TAN *et al.*, 2010; KOVACEVIC *et al.*, 2011).

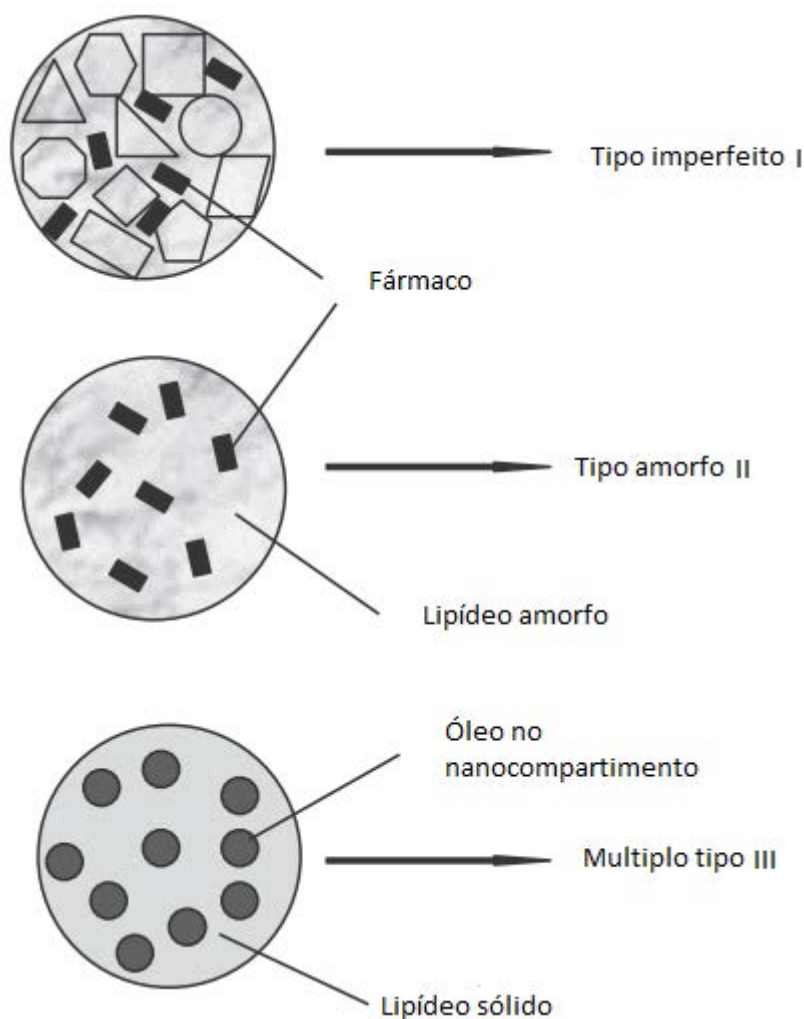
A mistura do lipídeo sólido e líquido forma uma matriz mais desorganizada, o que facilita a acomodação dos compostos ativos, aumentando assim a concentração de compostos desses compostos, além disso, a expulsão do fármaco é dificultada durante o período de armazenamento, devido à presença do lipídeo líquido, por outro lado, eles são utilizados para fármacos que são mais solúveis em lipídeos líquidos do que em lipídeos sólidos (MÜLLER *et al.*, 2007; TEERANACHAIDEEKUL *et al.*, 2007; CHEN *et al.*, 2010).

Dependendo da natureza dos lipídios utilizados na preparação dos NLCs, diferentes tipos de matrizes podem ser formados (WISSING *et al.*, 2004; SILVA *et al.*, 2011), como ilustrado na Figura 8:

- Tipo I se refere ao tipo de cristal imperfeito, devido à formação de uma matriz única, que podem acomodar o fármaco
- Tipo II é chamado de sistema amorfo, quando a mistura de lipídios não é recristalizada após o resfriamento, e estes obtêm partículas sólidas contendo sua estrutura amorfa.

➤ Tipo III também chamado de tipo múltiplo ocorre com certos números de fármacos que são mais solúveis no lipídio líquido do que no lipídio sólido (WISSING *et al.*, 2004; TAMJIDI *et al.*, 2013).

Figura 8 Tipos de NLCs tipo imperfeito (I); tipo amorfo (II); Múltiplo tipo (III). (Figura adaptada por Üner & Yener 2007).



Os NLCs também podem ser utilizados por diferentes vias de administração como pulmonar, ocular, parenteral, oral entre outras (PARDEIKE *et al.*, 2009; KHAN 2012; PRIYANKA 2012).

2.4 Métodos empregados na produção das SLNs e NLCs

Semelhantemente as SLNs, os NLCs podem ser produzidos por diferentes métodos, como homogeneização em alta pressão a quente ou a frio, microemulsão, emulsificação e evaporação do solvente, emulsificação por dupla emulsão, “spray drying”, homogeneização em alta velocidade de cisalhamento.

Diferentes métodos podem ser empregados na preparação das SLNs e NLCs descritos na literatura, como: método de alta pressão e homogeneização, método de

microemulsão, emulsificação e evaporação do solvente, sonicação, entre outros (WISSING *et al.*, 2004; PARDEIKE *et al.*, 2009).

2.4.1 Método de evaporação do solvente

Sjöström e Bergenståhl descreveram um método de produção para preparar dispersões de SLN de emulsão O/A baseado na emulsificação e evaporação do solvente (MEHNERT, MÄDER 2001; PARDEIKE *et al.*, 2009). Este método consiste na solubilização da fase lipídica em um determinado solvente orgânico imiscível em água, esta fase é emulsionada em uma fase aquosa contendo tensoativo ou combinações tensoativos, empregando a agitação mecânica, e após a evaporação do solvente as nanopartículas são formadas pela precipitação da fase lipídica no meio aquoso (CORTESI *et al.*, 2002; MÜLLER-GOYMANN 2004; TEERANACHAIDEEKUL *et al.*, 2007). Uma importante vantagem deste método consiste na baixa temperatura utilizada durante o preparo das SLNs e NLCs, sendo um método útil para o encapsulamento de fármacos termosensíveis. Apresenta como desvantagem a possível presença de solvente residual na dispersão final (MÜLLER *et al.*, 2007).

2.4.2 Método de microemulsão a quente

Este método foi desenvolvido por Gasco *et al.* 1990 para o preparo das SLN e NLCs, tem sido adaptado e/ou modificado por vários grupos de pesquisadores (LIPPACHER *et al.*, 2004). A produção das nanopartículas pela técnica de microemulsão consiste em fundir a matriz lipídica e adicionar o tensoativo e/ou co-tensoativo na água até atingir uma região de microemulsão (Müller *et al.*, 2004). Para a precipitação das partículas, a microemulsão é dispersa em água fria sob agitação. De acordo com a literatura a estrutura das gotículas das microemulsões, atingem tamanhos de partículas em escala nanométrica não necessitando, desta forma, do uso energia (MEHNERT, MÄDER 2001; KOVACEVIC *et al.*, 2011). Uma vantagem que este método apresenta é a possibilidade de encapsular fármacos lipofílicos e hidrofílicos. Porém apresenta como desvantagem a necessidade de altas concentrações de tensoativo. Pois altas concentrações de tensoativos podem diminuir o potencial zeta dos sistemas devido a redução da espessura da camada difusa (UNER, YENER 2007; TAN *et al.*, 2010), com isso o

sistema pode apresentar baixa estabilidade. Outra desvantagem é a necessidade de remoção do excesso de água (UNER, YENER 2007).

2.4.3 Método de sonicação

A sonicação gera gotículas através de vibrações mecânicas dirigidas por ultrassom, o ciclo de compressão da sonicação gera bolhas de vapor que aumenta com o tempo, quando essas bolhas atingem certo tamanho elas se rompem violentamente, gerando energia. A turbulência e a alta velocidade fazem com que a fase oleosa seja dispersa na fase aquosa (GUPTA 2006). Este método consiste em dissolver quantidade determinada de fase lipídica em um solvente orgânico. Após a evaporação do solvente, a fase aquosa é vertida na fase oleosa seguida de agitação por sonicação durante tempo determinado (LUO *et al.*, 2006; SHARMA *et al.*, 2009).

2.4.4 Método de alta velocidade de cisalhamento à quente

Este método consiste em aquecer a fase lipídica e sistema tensoativo na mesma temperatura (de 5 a 10°C acima do ponto de fusão do lipídio sólido), verter a fase aquosa na fase oleosa e agitar (Ultra-Turrax[®]) por velocidade e tempo determinado. Em seguida é adicionada água gelada à esta pré-emulsão formada, para a solidificação do lipídio sólido sob agitação (Ultra-Turrax[®]) (SILVA *et al.*, 2009; MARTINS *et al.*, 2012).

3 OBJETIVOS

Avaliar o efeito das nanopartículas lipídicas sólidas (*solid lipid nanoparticles* (SLN)) e carreadores lipídicos nanoestruturados (*nanostructured lipid carriers* (NLC)) como uma estratégia de melhorar a eficácia do PZQ na atividade contra o *S. mansoni*. A análise comparativa foi realizada para ambos os sistemas na intenção de avaliar a influência do lipídeo líquido e de diferentes combinações de tensoativos tanto nas propriedades físico-químicas, quanto na atividade biofarmacotécnica e biológica.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Materiais

4.1.1 Substâncias e Reagentes

Ácido clorídrico, teor 37% (Quimis[®]);
Ácido oléico (Synth[®]);
Água purificada Milli-Q;
Álcool etílico absoluto (Synth[®]);
Fosfatidilcolina de soja (Lipoid[®]100);
Hidróxido de sódio (Grupo Química[®]);
Monoestearato de Glicerila (Henrifarma[®]);
Poloxamer – 407 (Pluronic- F127) (Sigma[®]);
Polissorbato 60 (Tween 60) (Sigma[®]);
Praziquantel (Henrifarma[®]);
Água deuterada (D₂O) Aldrich[®];
Tampão Tris pH 7,4;

4.1.2 Equipamentos

Agitador Ultra-Turrax[®] (IKA, mod. TC 25 basic);
Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments, UK);
Espectrofotômetro UV-VIS (Hewlett Packard-Kayak XA);
Liofilizador (Edwards Modulyo[®]);
Ultra centrífuga (Biofuge Strato).
Espectroscópio infravermelho (Madison, WI, USA)
Espectroscópio ressonância magnética nuclear alta resolução (Bruker[®]).
DSC 1 STAR[®] (Mettler Toledo)

4.2 Métodos

Para facilitar a identificação das SLNs e NLCs, foram usadas siglas relacionadas com as formulações. Os sistemas apresentados na Tabela 2 exibem as nomenclaturas dos diferentes sistemas, em que, SLN são as nanopartículas lipídicas sólidas e NLC são carreadores lipídicos nanoestruturados, para ambos, os que possuem os números ímpares, indica que o sistema não possui PZQ, enquanto as numerações pares representam os sistemas contendo o fármaco. Ambos os sistemas estão numerados de 1 a 4, em que 1 e 2 são sistemas que possuem PC/P-407 como sistema tensoativos, e os números 3 e 4 são sistemas que possuem PC/T60 como sistema tensoativo.

Tabela 2. Nomenclatura das diferentes SLNs e dos NLCs.

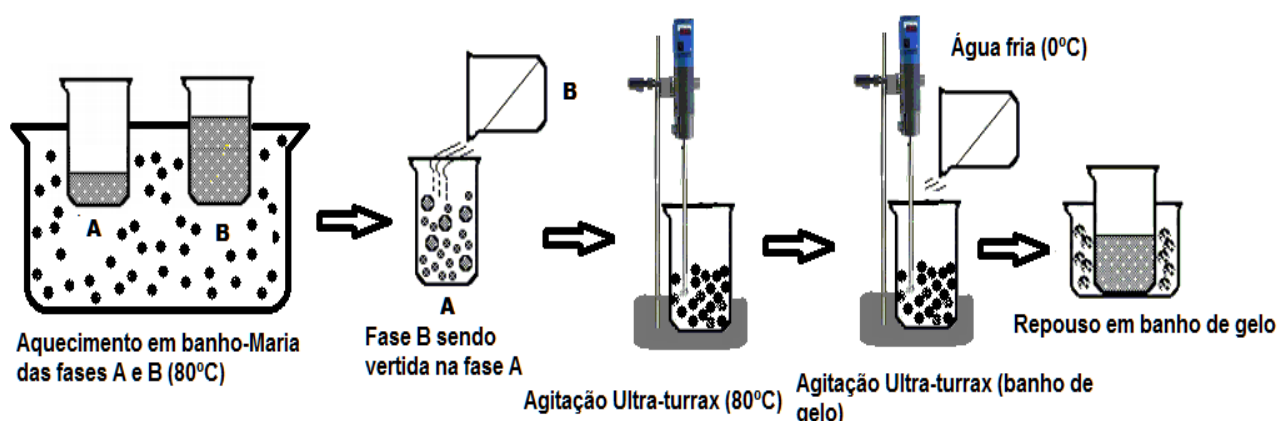
Nomenclatura	Composição						
	GMS (%)	AO (%)	PC (%)	T60 (%)	P-407 (%)	PZQ (%)	ÁGUA (%)
SLN1	3	–	1	–	1	–	95
SLN2	3	–	1	–	1	1	94
SLN3	3	–	1	1	–	–	95
SLN4	3	–	1	1	–	1	94
NLC1	2,1	0,9	1	–	1	–	95
NLC2	2,1	0,9	1	–	1	1	94
NLC3	2,1	0,9	1	1	–	–	95
NLC4	2,1	0,9	1	1	–	1	94

4.3 Desenvolvimento e caracterização dos diferentes carreadores lipídicos

4.3.1 Desenvolvimento de carreadores lipídicos nanoestruturados e nanopartículas sólidas lipídicas empregando homogeneização e alta velocidade de cisalhamento

Os NLCs e as SLNs foram preparados utilizando o método de homogeneização em alta velocidade de cisalhamento a quente, em que as fases lipídicas contendo PC/GMS para SLNs e PC/GMS/AO para os NLCs foram aquecidas a 80°C. A fase aquosa contendo os tensoativos T60 ou P-407 na mesma temperatura foi vertida na fase oleosa e agitada com o auxílio de um Ultra-Turrax[®], na velocidade de 11000 rpm por 10 minutos. A solidificação de ambos os sistemas foi obtida dispersando a emulsão formada em água gelada (temperatura próxima de 0°C) empregando a mesma velocidade de agitação por 1 minuto em banho de gelo, os sistemas permaneceram em repouso no banho de gelo por 5 minutos. A Figura 9 ilustra o método utilizado no preparo das SLNs e NLCs. Na preparação de NLCs e das SLNs contendo PZQ (SLN2, SLN4; NLC2 e NLC4), o fármaco foi dissolvido na fase lipídica. As etapas subsequentes do processo de obtenção foram às mesmas empregadas na preparação de ambos os sistemas.

Figura 9 Ilustração do método empregado no preparo dos diferentes sistemas.



Fase A - GMS/PC e GMS/PC/PZQ para SLN ou GMS/AO/PC e GMS/PC/PZQ para NLC
 Fase B - ÁGUA/P-407 para SLN e NLC 1 e 2 ou ÁGUA/T60 para SLN e NLC 3 e 4

4.4 Caracterização Físico-Química dos Carreadores Lipídicos Nanoestruturados e das Nanopartículas sólidas lipídicas

A caracterização físico-química foi realizada nas amostras contendo ou não fármaco. Os NLCs e SLNs foram caracterizados através de espectroscopia de correlação de fótons, capacidade de carga, eficiência de encapsulação, calorimetria exploratória diferencial (DSC), difração de raios-X, ressonância magnética nuclear (RMN) e microscopia eletrônica de varredura.

4.5 Determinação do tamanho das partículas, índice de polidispersidade e potencial zeta

O diâmetro médio, índice de polidispersidade e potencial zeta de todos os SLNs e NLCs (com e sem praziquantel) foram determinados por espectroscopia de correlação de fótons usando Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments, UK). As preparações foram previamente filtradas em membranas de polycarbonato (Millipore) com poros de 0,25 µm de diâmetro para que não houvesse interferência de impurezas na leitura. A temperatura do sistema foi mantida a 25°C. Para realização dos ensaios, 30 µL de amostra foram diluída em 970 µL de água Milli'Q. A diluição do meio é importante, pois em dispersões concentradas as partículas desenvolvem um movimento Browniano mais lento, o que leva ao cálculo do diâmetro da partícula maior do que o real (CHORILLI, 2004).

4.6 Determinação da eficiência de encapsulação e capacidade de carregamento

A eficiência de encapsulação (E.E.) e a capacidade de carregamento (C.C.) foram determinadas pela medida da concentração do fármaco livre no meio aquoso. Para tanto, a amostra foi ultracentrifugada na velocidade de 45000 g por 1 hora à temperatura de 8°C, em seguida separou-se o sobrenadante e este foi filtrado e diluído em etanol absoluto e quantificado por espectrofotometria no ultravioleta em 264nm. A eficiência de encapsulação e a capacidade de carregamento foram calculadas a partir das equações (1 e 2):

$$E.E. = \frac{\text{Quantidade de PZQ encapsulado}}{\text{Quantidade teórica de PZQ}} \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

$$C.C. = \frac{\text{Quantidade de PZQ encapsulado}}{\text{Quantidade total de lipídeo}} \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

4.7 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

Utilizou-se um módulo DSC 1 STAR^e da Mettler Toledo capaz de operar de -80 a 450°C, acoplado a um módulo de resfriamento por N₂ (IntraCooler). Precisão e exatidão de temperatura igual a ± 0,02 °C e ± 0,2 °C respectivamente. A calibração do sistema foi realizada com padrões de Índio e Zinco, conforme as recomendações fornecidas pelo fabricante.

As curvas DSC foram obtidas em atmosfera de N₂ (50 mL min⁻¹). Como suporte de amostra, empregou-se cadinho de alumínio (sem tampa) e como referência um similar vazio. As razões de aquecimento e resfriamento utilizadas foram de 10 °C min⁻¹. Para a investigação dos eventos térmicos, foram pesados cerca de 4,0mg, os sistemas foram aquecidos de 25°C a 160°C, resfriados até -50°C e reaquecido até 160°C.

4.8 Análises de Termogravimetria (TGA)

As curvas TGA foram realizadas num TG AT 2920. As amostras foram colocadas em recipientes herméticos de alumínio e foram analisadas sob um fluxo de nitrogênio gasoso, a uma taxa de aquecimento de 10°C/min, ao longo de um intervalo de temperatura de 25-350°C.

Os experimentos de TG foram realizados no período do doutorado sanduiche no Grupo de Investigación de Calidad de los Medicamentos, no Departamento de Farmácia, da Faculdade de Ciências Químicas, da Universidad Nacional de Córdoba, (UNC) em Córdoba, Argentina, sob supervisão da Prof^a. Dr^a. Marcela Raquel Longhi.

4.9 Ressonância magnética nuclear ¹H

Os espectros de RMN ¹H foram realizados em H₂O deuterada a 400, 16 MHz. Os sinais químicos (δ) foram analisados em ppm e o sinal do solvente residual (4.80 ppm) foi usado como referência interna.

Todos os experimentos foram executados no equipamento Bruker® Avance II, espectrofotometro de alta resolução equipado com uma sonda inversa de banda larga (BBI) e uma unidade de temperatura variável (VTU). Todos os experimentos foram executados a 298 K, usando tubos de 5 mm para cada amostra. Os dados de RMN foram processados utilizando o software Bruker TOPSPIN 2.0.

Os experimentos de RMN foram realizados no período do doutorado sanduíche no Grupo de Investigación de Calidad de los Medicamentos, no Departamento de Farmácia, da Faculdade de Ciências Químicas, da Universidad Nacional de Córdoba, (UNC) em Córdoba, Argentina, sob supervisão da Prof^a. Dr^a. Marcela Raquel Longhi.

4.10 Difração de Raio-X

O grau de cristalinidade ou o estado amorfo dos componentes, das misturas físicas, NLCs e SLNs foram analisados através de difratômetro de Raios-X Siemens D5000, com radiação de cobre monocromatizada por cristal de grafite. A velocidade de varredura foi de 0,1 segundos a cada 0,05° com $2\theta^\circ$ variando de 4° a 70°.

4.11 Espectroscopia na região do Infravermelho (IV)

Para análise de IV, as amostras foram liofilizadas (Freeze Dye 4.5 Labconco corp., Kansas City, MI). Prepararam-se pastilha de brometo de potássio para SLN 1, SLN2, SLN3, SLN4, NLC1 NLC2, NLC3 e NLC4; para a mistura física (MF-SLN2, MF-SLN4, MF-NLC 2 e NLC4) e uma pastilha de brometo de potássio como branco. As leituras foram realizadas em um espectrofotômetro Nicolet 5 SXC FT-IR (Madison, WI, USA).

Os experimentos de IV foram realizados no período do doutorado sanduíche no Grupo de Investigación de Calidad de los Medicamentos, no Departamento de Farmácia, da Faculdade de Ciências Químicas, da Universidad Nacional de Córdoba, (UNC) em Córdoba, Argentina, sob supervisão da Prof^a. Dr^a. Marcela Raquel Longhi.

4.12 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As análises foram medidas em Microscópio Eletrônico de Varredura JEOL JSM 7500F em modo Alto Vácuo. O estudo foi feito após secagem da amostra em temperatura ambiente (25°C), que foi colocada sobre pino de alumínio e fixada em cola

de carbono. Seguidamente, tornou-se a amostra condutora por deposição de uma camada de ouro.

4.13 Avaliação do perfil de segurança dos carreadores lipídicos nanoestruturados.

O perfil de segurança dos NLCs foi avaliado através de ensaios de hemólises dos enterócitos e ensaio de citotoxicidade *in vitro*.

4.13.1 Hemólises

O sangue, recentemente colhido (O positivo), foi lavado três vezes com 0,01 M de Tris-HCl a pH 7,4 contendo NaCl 0,15 M (solução salina) antes da utilização. Uma suspensão de 1% (v / v) de eritrócitos foi feita e ressuspensas em solução salina. PZQ livre ou encapsulado (NLC2 ou NLC4) foram dispersos em solução salina numa concentração final de 27 μ M. Como um controle positivo (100% de lise), foi utilizado bis (v/v) de Triton X-100 a 1% solução. Após incubação durante 1 hora a 37°C, as amostras foram centrifugadas a 3000 x g durante 2 min. Alíquotas de 100 μ l de sobrenadante foram transferidos para microplacas de 96 poços, e a absorvância foi determinada a 405 nm num leitor de microplacas BioRad 3550-UV Modelo (EUA). O ensaio foi realizado em triplicata. Os resultados foram expressos em% de lise.

4.13.2 Ensaio de citotoxicidade *in vitro*

A citotoxicidade das formulações foi estudada a cultura de células *in vitro* utilizando macrófagos 774-J de rato como o modelo celular. As células foram semeadas a uma microplacas (Nunclon) de densidade de 2,5-10,0 x 10⁵ células/poço em placas de 96 poços de fundo plano e incubadas durante 48 horas a diferentes doses da NLC e PZQ livre (18,6, 10, 5 μ M e1) ou veículo de controle. Após o tratamento, os sobrenadantes foram retirados e as células lavadas uma vez com PBS. A viabilidade celular foi então avaliada por colorimetria medindo a redução mitocondrial dependente de MTT. Para esse efeito, as células e MTT (0,4 mg/mL-1) foram incubadas em ar a 37°C durante 3h. Após o período de incubação, o sobrenadante foi removido e os

cristais de formazan foram dissolvidos com DMSO (180 mL). As placas foram agitadas durante 10 minutos e as densidades ópticas foram medidas a 560nm num espectrofotómetro. Cada concentração foi testada três vezes e seis controles adicionais (as células em meio) foram usadas em cada ensaio. Os dados são apresentados como % da viabilidade celular.

4.13.3 Atividade esquistosomicida

4.13.3.1 Parasitas e Animais

Nesse estudo utilizou-se a linhagem BH de *S. mansoni* (oriunda de Belo Horizonte, MG, Brasil) mantida em moluscos, planorbídeos *Biomphalaria glabrata*, no departamento de Biologia Animal, IB, UNICAMP. Fêmeas de camundongos (*Mus musculus*), linhagem Swiss- SPF com 30 dias de idade pesando 20± 25g, foram previamente infectadas percutaneamente, para a manutenção rotineira da cepa de *S. mansoni*.

Os camundongos (n=30) foram expostos a uma suspensão contendo 70 cercárias de *S. mansoni* (BH), a infecção ocorreu de acordo com a técnica de imersão caudal conforme descrito por (Oliver e Stirewalt, 1952). Em seguida, os animais foram mantidos em estantes ventiladas (Alesco®) (temperatura entre 20 ° C e 22 ° C), por 60 dias. Os animais foram fornecidos pelo Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) da Unicamp. Os experimentos *in vitro* e *in vivo* foram aprovados pela Comissão de Ética na Experimentação Animal da Unicamp (número do protocolo 2170-1).

4.13.3.2 Recuperação dos parasitas de *S. mansoni*

Após 60 dias da infecção, os camundongos foram eutanasiados por deslocamento cervical e os vermes adultos (machos e fêmeas) foram recuperados por meio da perfusão do sistema porta hepático e das veias mesentéricas de acordo com Smithers e Terry (1965). Os vermes foram lavados três vezes em meio RPMI-1640 (Nutricell®) composto por 0,05 g / L de estreptomicina, 10.000 UI / mL de penicilina, 0,3 g / L de L-glutamina, 2,0 g / L de D-glucose, 2,0 g / L de NaHCO₃ e 5,958 g / L de Hepes.

4.13.3.3 Avaliação *in vitro* da NLC/PZQ sobre vermes adultos de *S. mansoni*

Após a lavagem dos vermes, os casais foram transferidos para cada poço de uma placa de cultura de 24 poços contendo o meio RPMI-1640. Para avaliação *in vitro*, foram adicionadas as placas 25 µg /mL de veículos lipídicos nanoestruturados (NLC1, NLC2, NLC3, NLC4). O volume final em cada poço foi de 2 mL. O grupo de controle positivo foi tratado com uma concentração (25 µg / mL) do PZQ. O grupo controle negativo foi mantido em meio RPMI-1640 sem adição de fármacos. Sequencialmente, as placas foram incubadas em uma estufa de CO₂ a 5% e 37° C (Xiao et al., 2007). Todos os experimentos foram realizados em cinco réplicas. As placas de cultura foram observadas através de um microscópio óptico invertido DM-500 (Leica ®) nos tempos de 2, 6, 24, 48 e 72 h. Este estudo avaliou a motilidade dos vermes, a taxa de mortalidade, oviposição e alterações no tegumento do *S. mansoni* de acordo com de Oliveira et al., 2012. Os ensaios biológicos foram realizados no Laboratório de Cultura *in vitro* de *S. mansoni*, no Departamento de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), sob supervisão da professora Dra. Silmara Marques Allegretti.

4.13.3.4 Tratamento *in vivo* sobre *S. mansoni*

Para realização dos ensaios *in vivo*, foram utilizados camundongos Balb/C após 45 de infecção por *S. mansoni*. Foram avaliadas duas concentrações, 112 e 149 mg/kg. Para a realização dos tratamentos, os animais foram divididos em 10 grupos experimentais (n= 6) Todos os grupos foram tratados em dose única, através de tubagem esofágica. Foram administradas 0,3 mL de cada amostra. As

concentrações foram calculadas de acordo com o peso do animal e expressas em mg/kg para cada grupo experimental. Foram avaliadas as SLNs e NLCs com e sem PZQ. O grupo 1 (controle positivo) foi tratado com a dose de 112 mg/kg do PZQ, disperso em Tampão Tris 20mM pH 7,5. O grupo 2 (Controle negativo) recebeu solução tamponada PBS. Os grupos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 foram tratados com as SLN1, SLN2, SLN3, SLN4, NLC1, NLC2, NLC3 e NLC4 respectivamente. O mesmo procedimento foi seguido para os animais tratados na dose de 149mg/Kg.

4.13.4 Análises dos Tratamentos *in vivo*

4.13.4.1 Avaliação da intensidade parasitária

Para avaliar a redução da intensidade parasitária, duas semanas após a realização dos tratamentos, os camundongos foram eutanasiados por meio do deslocamento cervical e submetidos à perfusão do sistema porta-hepático de acordo com PELLEGRINO & SIQUEIRA, (1956). Os vermes recuperados foram colocados em placa de Petri contendo solução salina NaCl 0,85%, estes foram quantificados e identificados segundo o sexo e vermes acasalados bem como a localização em que se encontravam (veia porta ou mesentérica). As porcentagens de redução dos vermes (RV) foram calculadas de acordo com (FREZZA *et al.*, 2013) usando a fórmula:

$$\% \text{ da redução dos vermes} = \frac{\text{Grupo controle} - \text{Grupo teste}}{\text{Grupo controle}} \times 100 \quad \text{Equação 3}$$

4.13.4.2 Contagem de ovos nas fezes (OPG)

Para avaliar a quantidade de ovos eliminados por grama de fezes, foi realizado o método quantitativo de Kato Katz após 15 dias dos tratamentos de acordo com (KATZ *et al.*, 1972).

4.13.4.1 Oograma

Para avaliar do efeito dos tratamentos, sobre a distribuição e o estágio de desenvolvimentos de ovos do *S. mansoni* nos tecidos intestinais, um fragmento de

Material e Métodos

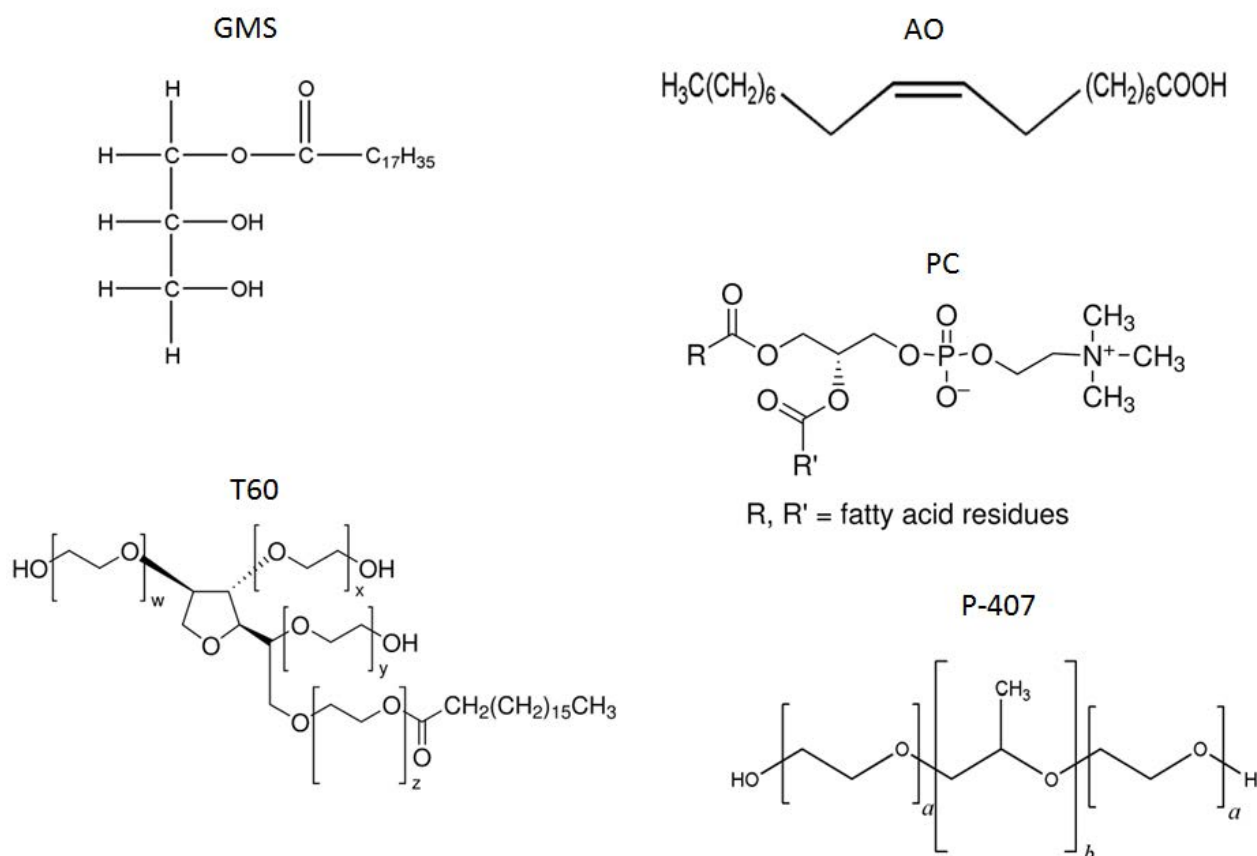
0,5 cm do intestino delgado foi retirado para realização do oograma. Foram analisados 10 campos aleatórios, em microscópio óptico com aumento de 100x e quantificados os ovos de acordo com seus diferentes estágios de maturidade -1º ao 5º estágio e ovos mortos-conforme descrito por (PELLEGRINO,FARIA 1965).

5 RESULTADOS

5.1 Preparação e caracterização das SLNs e NLCs

As SLNs e NLCs foram preparados empregando o método de homogeneização e alta velocidade de cisalhamento. Tanto as SLN1 e SLN2 quanto os NLC1 e NLC2 são nanopartículas que contêm PC/P-407 como sistema tensoativo, sendo SLN1 e NLC1 sem PZQ e SLN2 e NLC2 contendo PZQ. As SLN3, SLN4, NLC3 e NLC4 são nanopartículas que contêm PC/T60 como sistema tensoativo, sendo SLN3 e NLC3 sistemas sem PZQ e SLN4 e NLC4 sistemas contendo PZQ. Para facilitar a interpretação dos resultados a Figura 10 exibe a estrutura química dos componentes utilizados no preparo das SLNs e NLCs.

Figura 10- Estrutura química dos componentes utilizados no preparo das SLNs e NLCs



Todos os sistemas foram caracterizados avaliando diâmetro médio das partículas, potencial zeta, índice de polidispersidade, difração de raio x, ressonância magnética nuclear (RMN), calorimetria diferencial exploratória (DSC), espectroscopia na região do infravermelho (IV).

Resultados

O perfil de segurança dos NLCs foi avaliado através de ensaios de hemólises dos enterócitos e ensaio de citotoxicidade *in vitro*. A atividade esquistomicida foi avaliada através de ensaios *in vitro* e *in vivo*.

5.2 Determinação do tamanho das partículas, índice de polidispersidade e potencial zeta.

A Tabela 3 exibe os valores dos diâmetros médios, índice de polidispersidade e potencial zeta dos diferentes sistemas contendo ou não PZQ.

Tabela 3. Valores de diâmetro médio, índice de polidispersidade e potencial zeta dos diferentes sistemas contendo ou não PZQ.

Amostra	Diâmetro médio (nm)	Índice de polidispersidade	Potencial zeta (mV)
SLN1	653	0,497	-23,1
SLN2	318	0,423	-21,0
SLN3	265,1	0,516	-32,0
SLN4	1217	0,403	-35,6
NLC1	238,9	0,694	-30,7
NLC2	165,9	0,385	-32,6
NLC3	252,4	0,503	-34,8
NLC4	345,6	0,443	-40,0

Para mantermos a mesma proporção lipídica em ambos os sistemas reduzimos a concentração de GMS para os NLCs e suprimos com o AO, sendo assim temos uma maior concentração de lipídeo sólido para as SLNs quando comparados aos NLCs. Quando comparamos as SLNs com os NLCs é possível observar que todos os NLCs apresentaram diâmetro médio, o índice de polidispersidade e o potencial zeta menor que as SLNs. A redução do diâmetro e do índice de polidispersidade pode ter ocorrido com a redução da viscosidade da matriz lipídica e com isso o aumento da fluidez do sistema, devido à presença do lipídeo líquido. A redução do valor de potencial zeta pode ser atribuída pela presença do ácido carboxílico presente na estrutura química do AO.

Andalib *et al.*, 2012, prepararam NLCs, testaram dois diferentes lipídeos líquidos (octanol e ácido oleico) e verificaram também diferentes concentrações de

Resultados

ambos os lipídeos. Os autores observaram que com o aumento da concentração do lipídeo líquido houve uma diminuição de diâmetro médio. Os autores atribuíram o evento ao aumento da concentração de lipídeo líquido presente nos NLCs e sugerem a uma redução da viscosidade dos NLCs, aumentando assim a fluidez do sistema. Isso se deve a redução da tensão superficial e com isso a diminuição no tamanho da partícula (ANDALIB *et al.*, 2012).

Resultados semelhantes foram encontrados para os valores de potencial zeta, os autores observaram que quando os NLC continham AO como lipídeo líquido o sistema apresentava valores mais negativo quando comparado com os NLCs contendo octanol como lipídeo líquido (ANDALIB *et al.*, 2012).

Hu *et al.*, 2005, fizeram uma comparação entre as SLNs e NLCs, e observaram resultados semelhantes, ou seja, os NLC apresentaram menor tamanho, menor índice de polidispersidade e um potencial zeta mais negativo quando comparados as SLNs. Os autores também sugerem que a presença do lipídeo líquido reduz a viscosidade no interior dos NLCs, reduzindo assim a tensão superficial e com isso diminui o tamanho das partículas (HU *et al.*, 2005).

Quando comparados ambos os sistemas, é possível observar que para as SLNs 2 e os NLCs 2 (contendo PC/P-407 como sistema tensoativo) a adição do PZQ levou a diminuição do diâmetro médio das partículas e do índice de polidispersidade, provavelmente a presença do PZQ modifica a região lipofílica e influência na organização da matriz lipídica dessas partículas, levando assim a diminuição de seus diâmetros. Com tais valores sugere-se que os NLCs são mais estáveis que as SLNs, pois de acordo com a teoria de DLVO (1983) as forças repulsivas tendem a evitar a agregação em função das colisões ocasionais (DLVO 1983).

A adição do PZQ levou ao aumento do tamanho das partículas para SLN4 e NLC4 (contendo PC/T60 como sistema tensoativo) o que pode ser justificado pela combinação de tensoativos utilizadas. Dados semelhantes foram encontrados por Chen *et al.*, 2010 que analisou o efeito dos tensoativos em NLCs contendo lovastatina, os autores observaram que a adição do fármaco levou a um aumento no tamanho das partículas e uma diminuição no índice de polidispersidade, com os dados apresentados os pesquisadores sugerem uma pequena instabilidade do sistema com a adição da lovastatina (CHEN *et al.*, 2010).

Os valores de Pdl para ambos os sistemas contendo ou não PZQ foram altos, indicando uma ampla distribuição dos diâmetros das partículas. Valores altos de Pdl também foram reportados por outros autores (VITORINO *et al.*, 2011; KOLENYAK-SANTOS *et al.*, 2014), o processo de solidificação pode ter levado à obtenção de partículas com uma distribuição de tamanho maior. Por outro lado, a incorporação do PZQ reduziu a Pdl, indicando que o fármaco contribuiu para a estabilização dos diferentes sistemas.

Com os resultados apresentados, podemos sugerir que a presença do lipídeo líquido contribuiu para a diminuição no diâmetro médio das partículas, pois os NLCs apresentaram menores diâmetros se comparados com as SLNs tanto com os sistemas utilizando PC/P407 quanto para PC/T60 como sistema tensoativo.

5.3 Determinação da eficiência de encapsulação e capacidade de carregamento

A eficiência de encapsulação (E.E.) corresponde à quantidade de fármaco que foi incorporado pelo sistema (TAMJIDI *et al.*, 2013). A capacidade de carregamento (C.C) é definida como sendo a proporção de fármaco encapsulado na fase lipídica do sistema (TAMJIDI *et al.*, 2013). A Tabela 4 exhibe os valores de eficiência de encapsulação e a capacidade de carregamento (C.C.) para os diferentes sistemas.

Resultados

Tabela 4. Eficiência de encapsulação e capacidade de carregamento dos diferentes sistemas contendo PZQ.

Amostra	E.E. (%)	C.C. (%)
NLC 2	83,00	27,63
NLC 4	88,20	29,40
SLN 2	87,85	29,28
SLN 4	92,10	30,70

Os resultados exibidos na Tabela 4 mostram os valores da E.E e C.C, em que é possível observar uma grande quantidade de fármaco encapsulado para ambos os sistemas. Comparando as SLN 2 com os NLCs 2 e SLN 4 com NLC4 observa-se que as SLNs apresentaram uma maior eficiência de encapsulação. Se compararmos os sistemas tensoativos observamos que ambos os sistemas apresentaram comportamento semelhantes, ou seja, tanto SLN2 quanto as NLC2 que são os sistemas que contem PC/P-407 como sistemas tensoativos apresentaram uma maior eficiência de encapsulação se comparados com SLN4 e NLC4 que contem PC/T60 como sistema tensoativo respectivamente.

5.4 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

A calorimetria diferencial exploratória (DSC) é um método de análise térmica, muito importante para caracterização de compostos farmacêuticos, pois fornece as informações sobre o estado físico da amostra em análise através do comportamento térmico (SOUZA 2011). Geralmente o processo envolve a aplicação de aquecimento, resfriamento e reaquecimento e com isso é possível verificar comportamentos como ponto de fusão, cristalização, transição vítrea e reações de decomposição (OLIVEIRA *et al.*, 2011). Os componentes isolados, as misturas binárias, misturas físicas e amostras foram aquecidos, resfriados e reaquecidos novamente a fim de verificar variações durante o processo de preparo para ambos os sistemas. A Tabela 5 mostra os dados de fusão, temperatura *onset* (T-*onset*) e as curvas de DSC obtidas das matérias primas utilizadas no preparo das SLNs e dos NLCs, em que, 1 segmento indica o primeiro evento de aquecimento, 2 segmento é o resfriamento e 3 segmento representa o segundo evento de aquecimento.

Resultados

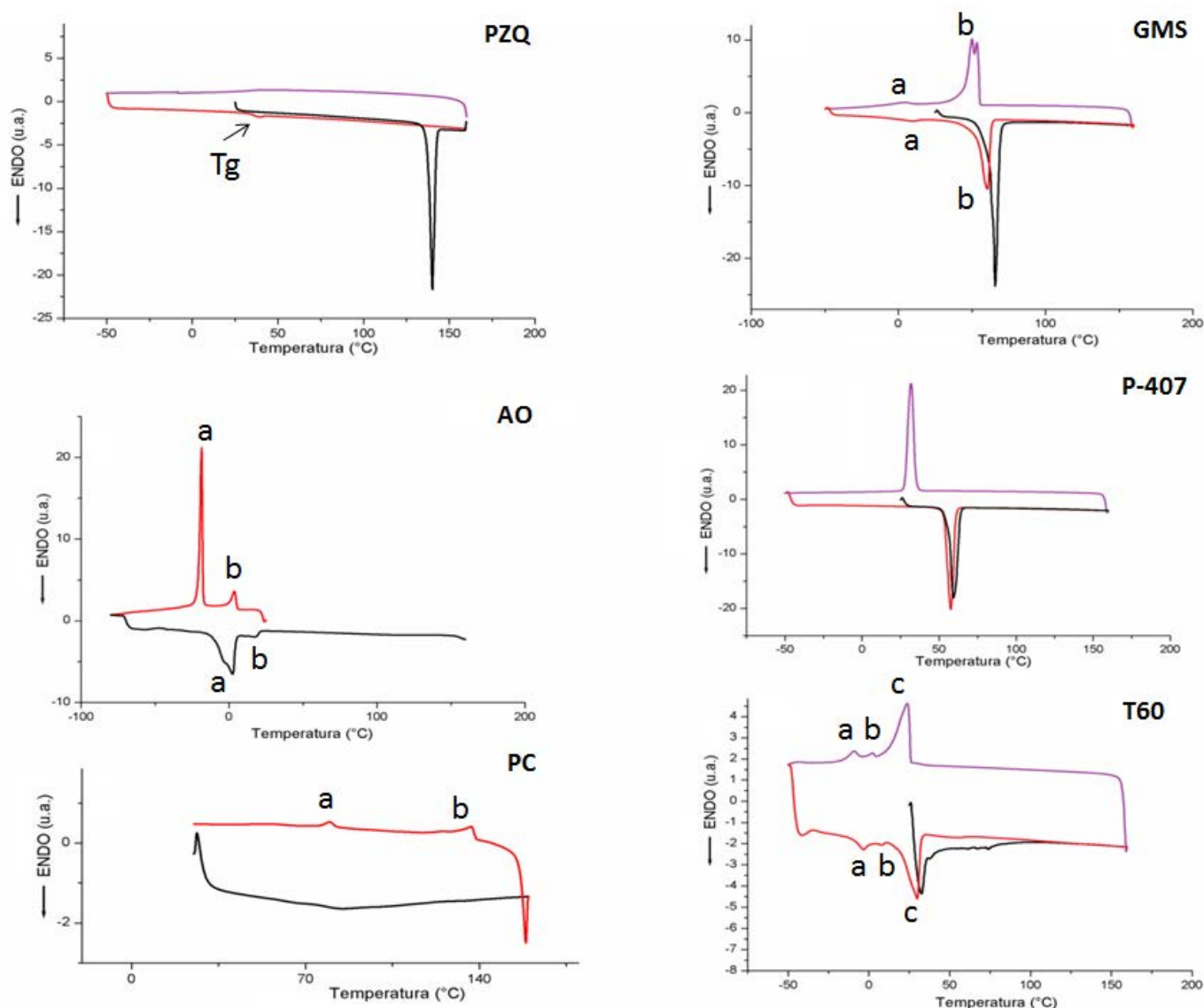
Tabela 5. Dados de DSC dos componentes isolados contendo o ponto de fusão, temperatura *onset* e os valores de entalpia.

Componentes	Fusão (°C)			Onset (°C)			Entalpia J/g ⁻¹		
	1 segmento	2 segmento	3 segmento	1 segmento	2 segmento	3 segmento	1 segmento	2 segmento	3 segmento
PZQ	140,21	–	–	137,39	–	–	90,83	–	–
GMS	65,73	50,13	60,67	62,78	55,32	53,72	171,56	99,75	83,85
AO	-18,61	2,52	–	-17,48	-9,91	–	58,20	60,46	–
PC	–	136,68	–	–	138,70	–	–	2,77	–
P-407	59,27	31,73	57,54	56,06	34,92	53,14	124,42	120,52	115,52
T60	32,38	23,95	29,88	26,97	25,89	19,92	29,63	26,45	25,59

A Figura 11 exibe as curvas de DSC dos componentes utilizados no preparo das SLNs e NLCs, em que, preto representa o primeiro evento de aquecimento, roxo é o resfriamento e vermelho está relacionado ao segundo evento de aquecimento.

Resultados

Figura 11 Curva DSC dos componentes utilizados no preparo das SLNs e dos NLCs: preto primeiro evento de aquecimento; roxo evento de resfriamento; vermelho segundo evento de aquecimento.



A Figura 11 exhibe os dados do comportamento térmico dos componentes utilizados para a produção das SLNs e dos NLCs. É possível observar a temperatura de fusão dos componentes. No primeiro evento de aquecimento (preto), o PZQ apresenta um pico único e endotérmico, na temperatura de 140,21°C (T_{onset} 137,39°C). Para o evento de resfriamento (roxo), não é observado pico exotérmico, demonstrado que o PZQ não recristaliza. Na curva de reaquecimento (vermelho) o pico de fusão na temperatura de 141°C não é observado, porém, observa-se uma transição vítrea (T_g) em 34,75°C indicando que o PZQ está em um estado amorfo. O GMS apresenta um pico de fusão de 55°C no primeiro evento de aquecimento (preto), a presença de polimorfismo não pode ser descartada para o GMS, o que pode justificar os picos de

Resultados

fusão e cristalinidade. O ácido oleico apresentou picos de fusão na faixa de -5°C a 4°C . Tais eventos podem ter ocorridos pela presença de outros ácidos insaturados presentes no AO comercial, por exemplo, o ácido linoleico, que funde em -5°C e o AO funde em 4°C , provavelmente ambos fundiram juntos.

Os componentes, exceto o AO, PC e T60, exibiram um pico fino endotérmico, o qual caracteriza substâncias cristalinas; conforme ilustrados na Figura 11, o PZQ foi o único que apresentou um pico em $140,21^{\circ}\text{C}$, os demais componentes fundiram em torno de 60°C .

A análise térmica de misturas binárias é importante, pois nos fornecem uma ideia do comportamento dos componentes no sistema. A Tabela 6 exibe os dados de temperatura de fusão, *T-onset* e entalpia enquanto a Figura 12 e as curvas de DSC das seguintes misturas binárias: AO/PC; AO/T60; AO/GMS; AO/P-407 e GMS/T60, em que 1 segmento é o primeiro evento de aquecimento, 2 segmento é o evento de resfriamento e 3 segmento está relacionado com o segundo evento de aquecimento. Além disso, as letras a, b ou c ilustradas no evento de resfriamento (roxo) são referentes às mesmas letras no segundo evento de aquecimento (vermelho).

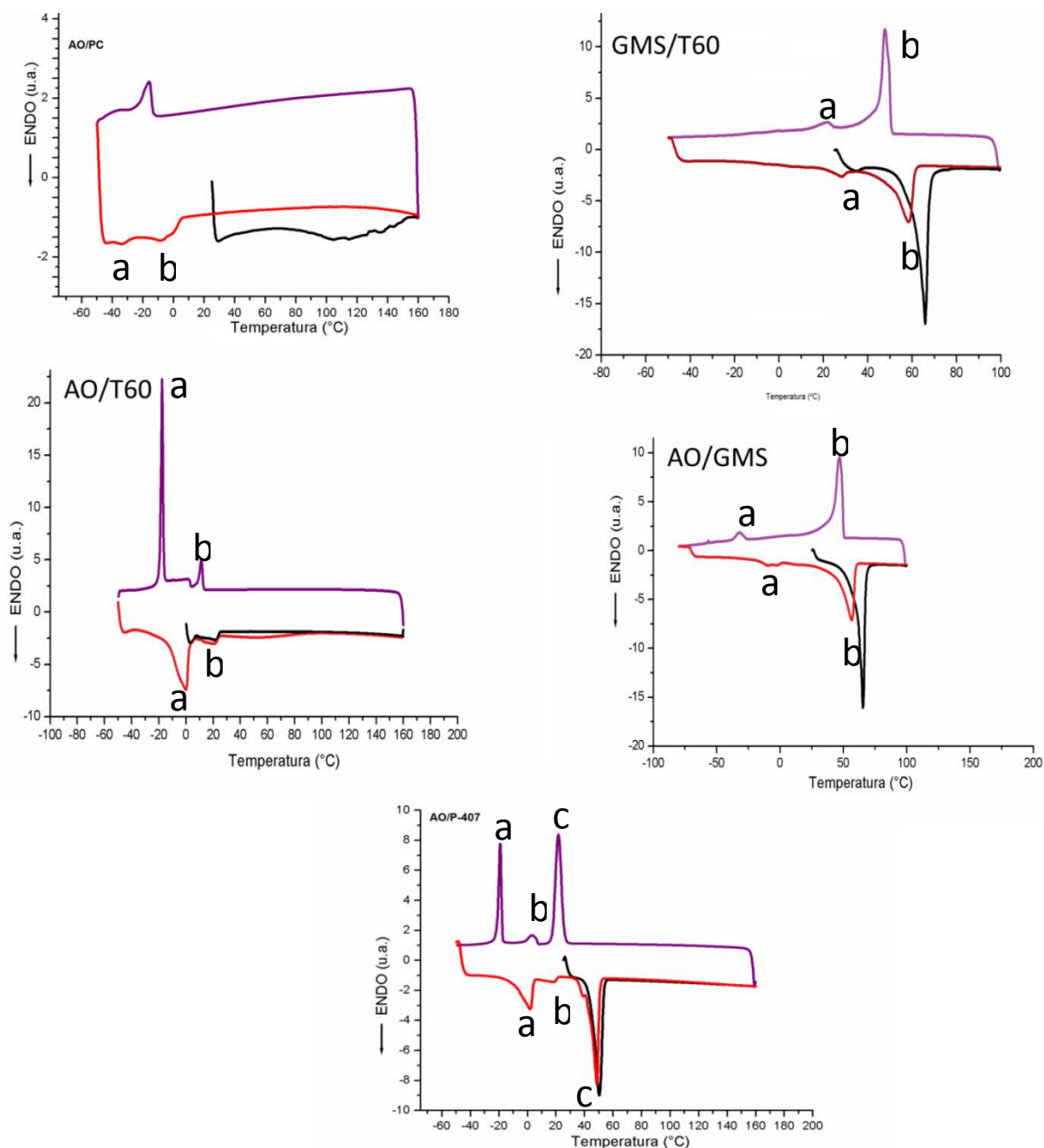
Tabela 6 . Curvas de DSC das misturas binárias referentes AO/PC, AO/T60, AO/GMS, AO/P-407, GMS/T60.

Componentes	Fusão			<i>Onset</i>			Entalpia		
	1 segmento	2 segmento	3 segmento	1 segmento	2 segmento	3 segmento	1 segmento	2 segmento	3 segmento
AO/PC	114,27	15,79		88,20	13,41		25,82	6,82	
AO/T60	-	-17,26	0,32	-	-16,28	12,99	-	-39,67	54,19
AO/GMS	64,82	-47,11	56,45	61,07	-50,25	47,26	120,58	-76,14	62,80
AO/P-407	50,07	-21,92	48,42	44,83	-25,66	42,58	63,73	-58,14	52,77
GMS/T60	65,29	-48,01	58,12	60,72	-50,66	50,78	108,50	-61,25	43,48

Foi possível observar que todas as misturas binárias apresentaram picos endotérmicos e exotérmicos, demonstrando a natureza cristalina dos componentes na mistura.

Resultados

Figura 12 curvas de DSC das misturas binárias AO/PC, GMS/T60, AO/T60, AO/GMS e AO/P-407, em que preto é referente ao primeiro evento de aquecimento, roxo é o evento de resfriamento e vermelho é o segundo evento de aquecimento.



O evento de resfriamento (roxo) apresentou um pico exotérmico em 15,79°C (*onset* 13,41°C) o que pode ser atribuído à recristalização do AO, o segundo evento de aquecimento (vermelho) exibiu dois picos (a, b) entre -40 °C a -10 °C que podem ser atribuídos à fusão do AO.

A mistura binária contendo GMS/T60 apresentou um pico endotérmico agudo pronunciado em 65,29°C (*T-onset* 60, 72°C) no primeiro evento de aquecimento (preto)

Resultados

que é atribuído ao GMS, o valor da entalpia foi $108,50 \text{ J/g}^{-1}$. O evento de resfriamento (roxo) observa-se picos exotérmicos em $21,73^\circ\text{C}$ ($T\text{-onset } 24,69^\circ\text{C}$) (a) e outro em $-48,01^\circ\text{C}$ ($T\text{-onset } 50,66^\circ\text{C}$) (b) que podem ser atribuídos à recristalização do GMS. O segundo evento de aquecimento (vermelho) exibiu dois picos endotérmicos menos pronunciados, sendo o menos intenso em $28,27^\circ\text{C}$ ($T\text{-onset } 22,84^\circ\text{C}$) (a) e o mais intenso em $58,12^\circ\text{C}$ ($T\text{-onset } 50,78^\circ\text{C}$) (b) que podem ser atribuídos ao GMS. É possível observar que a mistura GMS/T60 não modificou as propriedades físicas do GMS, pois os mesmos eventos são observados no componente isolado (Figura 11), porém é possível observar que as propriedades físicas do T60 foram alteradas, pois os eventos de fusão e cristalinidade não são observados, com o desaparecimento de tais picos, sugerimos que o mesmo esteja fundido passando assim para o estado amorfo.

Para a mistura binária contendo AO/T60 observa-se que o primeiro evento de aquecimento (preto), apresenta um pico endotérmico não pronunciado, em que a amostra começa a fundir imediatamente, sugerindo que seja a fusão do AO, pois um evento semelhante é observado para o componente isolado. O evento de resfriamento (roxo) observa-se dois picos exotérmicos, sendo um em $-17,26$ ($T\text{-onset } -16,28$) (a) e o outro pico em $-11,28$ $^\circ\text{C}$ ($T\text{-onset } -12,84^\circ\text{C}$) (b) são atribuídos à recristalização AO. O segundo evento de aquecimento (vermelho) observa-se um pico endotérmico pronunciado em $-0,32^\circ\text{C}$ ($T\text{-onset } -12,99^\circ\text{C}$, $\Delta H 54,19 \text{ J/g}$) que pode ser atribuído AO.

As misturas binárias compostas por AO/GMS, no primeiro evento de aquecimento (preto) apresentam um pico endotérmico intenso pronunciado em $64,82^\circ\text{C}$ ($T\text{-onset } 61,07^\circ\text{C}$) que é atribuído à fusão do GMS, observa-se que a entalpia da mistura foi menor para a mistura binária ($\Delta H 120 \text{ J/g}$) se comparada ao GMS isolado ($\Delta H 171,56 \text{ J/g}$), indicando que a mistura precisou de menor energia para promover a fusão. O evento de resfriamento (roxo) exibiu dois picos exotérmicos, sendo em $-32,30^\circ\text{C}$ ($T\text{-onset } -26,30^\circ\text{C}$) (a) e outro em $47,11^\circ\text{C}$ ($T\text{-onset } 50,25^\circ\text{C}$) (b) referente à recristalização do GMS, a entalpia da mistura foi $\Delta H 74,14 \text{ J/g}$. O segundo evento de aquecimento (vermelho) exhibe dois picos endotérmicos sendo em $-9,36^\circ\text{C}$ ($T\text{-onset } -16,11^\circ\text{C}$) (a), e outro em $56,45^\circ\text{C}$ ($T\text{-onset } 47,26^\circ\text{C}$) (b) que é atribuída à fusão do GMS, tal evento apresentou um valor de entalpia de $62,80 \text{ J/g}$. Tais eventos são atribuídos ao GMS devido a característica do pico de fusão e cristalinidade. Observa-se o desaparecimento dos picos referentes ao AO, sugerindo que a dispersão modifica as

Resultados

propriedades físicas do AO sugerindo a mudança para o estado amorfo, o mesmo não ocorre para o GMS, que apresenta a natureza cristalina.

O primeiro evento de aquecimento (preto) da mistura binária composta por AO/P-407 exibiu um pico endotérmico intenso agudo em 50,07°C (T-onset 44,83°C) atribuído à fusão do P-407, o valor de entalpia foi 63,73 J/g. O evento de resfriamento (roxo) exibiu três picos exotérmicos, sendo em -18,99 °C (a) (T-onset -17,61 °C), outro menos intenso em 3,54°C (b) (T-onset 7,49°C) que são atribuídos ao AO, e o pico em 21,92 °C (c) (T-onset 25,66 °C) que é atribuído à cristalização do P-407, os valores de entalpia foram -26,32 J/g, -5,20J/g e -58,14 J/g respectivamente.

O segundo evento de aquecimento (vermelho) exibiu um pico mais largo e menos intenso em 1,93°C (a) (T-onset -8,28, entalpia 18,99 J/g) que pode ser atribuído à fusão do AO e outro mais intenso em 48, 42°C (T-onset 42, 58°C, entalpia 52,77J/g) atribuído à fusão do P-047 (c) referente ao pico de fusão do P-407. Com os eventos apresentados é possível observar que AO e P-407 formam uma mistura heterogênea, pois não houve alteração nos eventos de fusão e cristalização de ambos os componentes.

A Tabela 7 exhibe os dados de DSC das misturas binárias: GMS/PC, GMS/P-407, PC/T60, PC/P407 E T60/P-407, sendo o 1 segmento referente ao primeiro evento de aquecimento, o 2 segmento ao evento de resfriamento e o 3 segmento referente ao segundo evento de aquecimento.

Tabela 7 Dados de DSC das misturas binárias GMS/PC, GMS/P-407, PC/T60, PC/P-407, T60/P407 contendo o ponto de fusão, temperatura onset e os valores de entalpia.

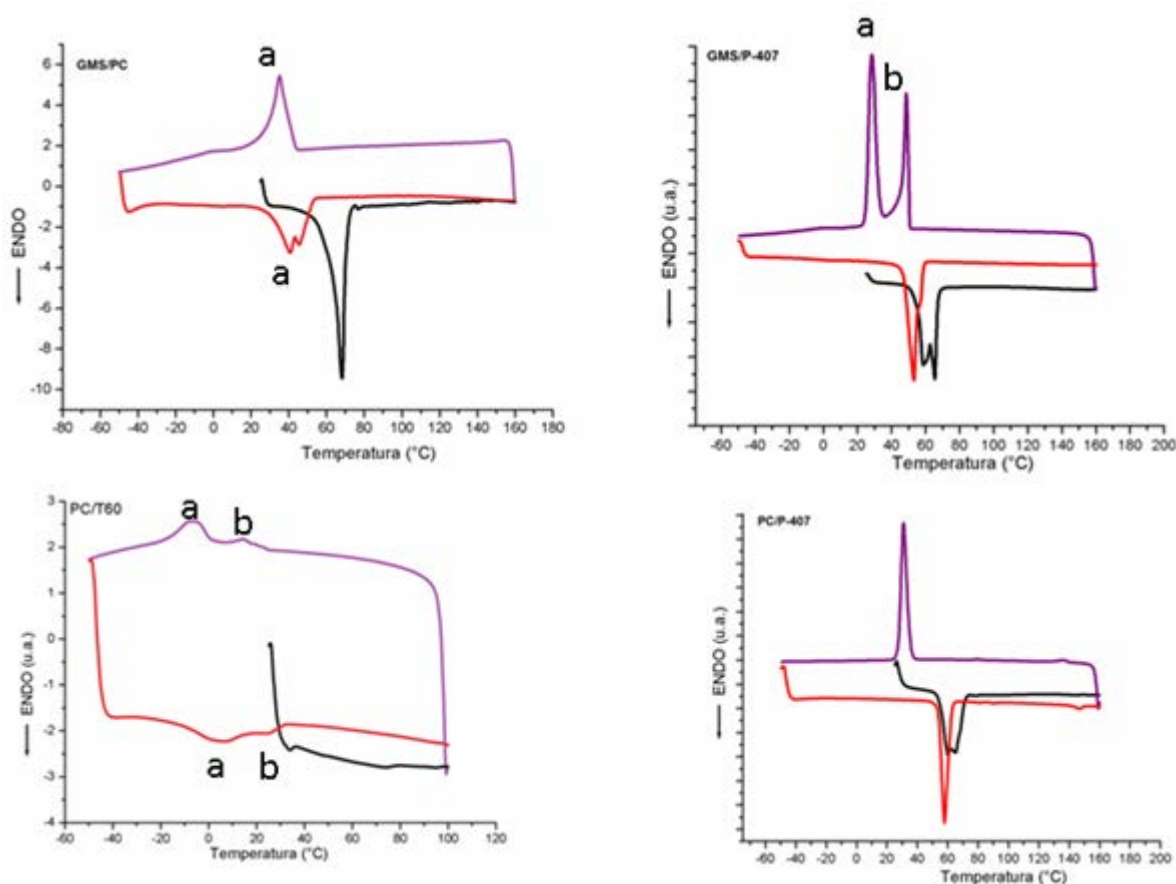
Componente	Fusão			Onset			Entalpia		
	1 Segmento	2 segmento	3 segmento	1 segmento	2 segmento	3 segmento	1 segmento	2 segmento	3 segmento
GMS/PC	67,87	34,98	40,75	62,77	41,69	30,20	77,47	-46,92	45,68
GMS/P407	64,89	48,77	52,55	58,70	50,67	46,84	147,69	-37,41	109,76
PC/T60	-	14,55	4,45	-	20,80	9,04	-	-2,0	3,42
PC/P407	59,99	31,16	57,31	54,88	35,03	53,78	59,72	-69,95	66,72
T60/P407	52,82	24,11	49,57	49,59	27,78	44,64	71,79	-66,05	64,04

Resultados

Observa-se que os valores de entalpia foram maiores no segundo evento de aquecimento quando comparado com o primeiro evento, o maior gasto de energia para romper a cristalinidade dos materiais.

Na mistura binária GMS/PC observa-se no primeiro evento de aquecimento (preto), um pico endotérmico intenso agudo em 67,87°C (T_{onset} 62,77°C) que é atribuído à fusão do GMS, neste evento é possível observar a redução do valor de entalpia (77,475 J/g). No evento de resfriamento (roxo) observa-se um pico exotérmico intenso em 34,98°C (T_{onset} 41,69°C) atribuído à cristalização do GMS. Para o segundo evento de aquecimento (vermelho) é possível observar a mudança no pico de fusão do GMS que correu em 40,75°C (T_{onset} 30,20°C, entalpia foi 45,68 J/g), sugerindo que a mistura modifica a estrutura cristalina do GMS.

Figura 13 Curvas de DSC das misturas binárias GMS/PC, GMS/P407; PC/T60; PC/P407; em que preto é referente ao primeiro evento de aquecimento, roxo é o evento de resfriamento e vermelho é o segundo evento de aquecimento.



A mistura binária P-407/GMS apresentou dois picos de fusão endotérmicos no primeiro evento de aquecimento (preto) em 64, 89 °C, (T_{onset} 58, 70 °C), sendo (a)

Resultados

atribuído à fusão do P-407 e (b) está relacionado com a fusão do GMS, observa-se também que o valor de entalpia 147,69 J/g. O evento de resfriamento (roxo) exibiu dois picos exotérmico sendo mais intenso em 28, 63^oC (a) (T-onset 32,63^oC) que é atribuído à recristalização do P-407 e outro o menos intenso em 48, 77 ^oC (b) (T-onset 50,67 ^oC) que é atribuído à recristalização do GMS.

O segundo evento de aquecimento (vermelho) observa-se dois picos de fusão em 52, 55 ^oC (T-onset 46,48^oC, entalpia 109,76 J/g) sendo (a) atribuído à fusão do P-407 e (b) à fusão do GMS. Como é possível observar, o GMS apresentou um pico de fusão menor quando comparado ao P-407, sugerindo que o GMS ainda está em seu estado líquido, enquanto o P-407 apresenta partes cristalizadas, com os dados apresentados, hipotetizamos que os componentes formam uma mistura homogênea após o segundo evento de aquecimento.

A mistura binária PC/T60 não apresenta o pico de fusão característico do T60 no primeiro evento de aquecimento (preto) sugerindo uma interação entre ambos. O evento de resfriamento (roxo) apresentou dois picos exotérmicos (a e b), sendo o menos intenso em 14, 55 ^oC (T-onset 20, 80 ^oC) e outro maior em -7, 11 ^oC (T-onset 0,43 ^oC) ambos podem ser atribuídos ao deslocamento do pico de cristalização do T60 (23, 95 ^oC e -9, 29 ^oC). O segundo evento de aquecimento (vermelho) observa-se evento de fusão em 4, 45 ^oC (T-onset -9, 04 ^oC, entalpia 3, 42 J/g.) contendo dois picos (a e b), assim sugerimos que o PC esteja solubilizado no T60.

A curva DSC das misturas binárias PC/P-407 exhibe dois picos em 59,99^oC (T-onset 54,88 ^oC) e a entalpia 59,72 J/g que é atribuído ao P-407. O evento de resfriamento apresentou um pico exotérmico intenso em 31, 16^oC (T-onset 35,03^oC) que é atribuído a recristalização do P-407, e o valor de 69,955 J/g. O segundo evento de aquecimento (vermelho) apresenta um único pico endotérmico intenso agudo em 57,31^oC (T-onset 53,78^oC) atribuído à fusão do P-407. O pico apresenta a mesma característica que o P-407 isolado, e a entalpia foi 66,72J/g.

A Tabela 8 exhibe os dados de fusão, T-onset e entalpia e a Figura 14 estão apresentadas as curvas de DSC referentes ao aquecimento, resfriamento e reaquecimento das misturas binárias contendo PZQ/GMS; PZQ/AO; PZQ/P-407; PZQ/T60; PZQ/PC.

Resultados

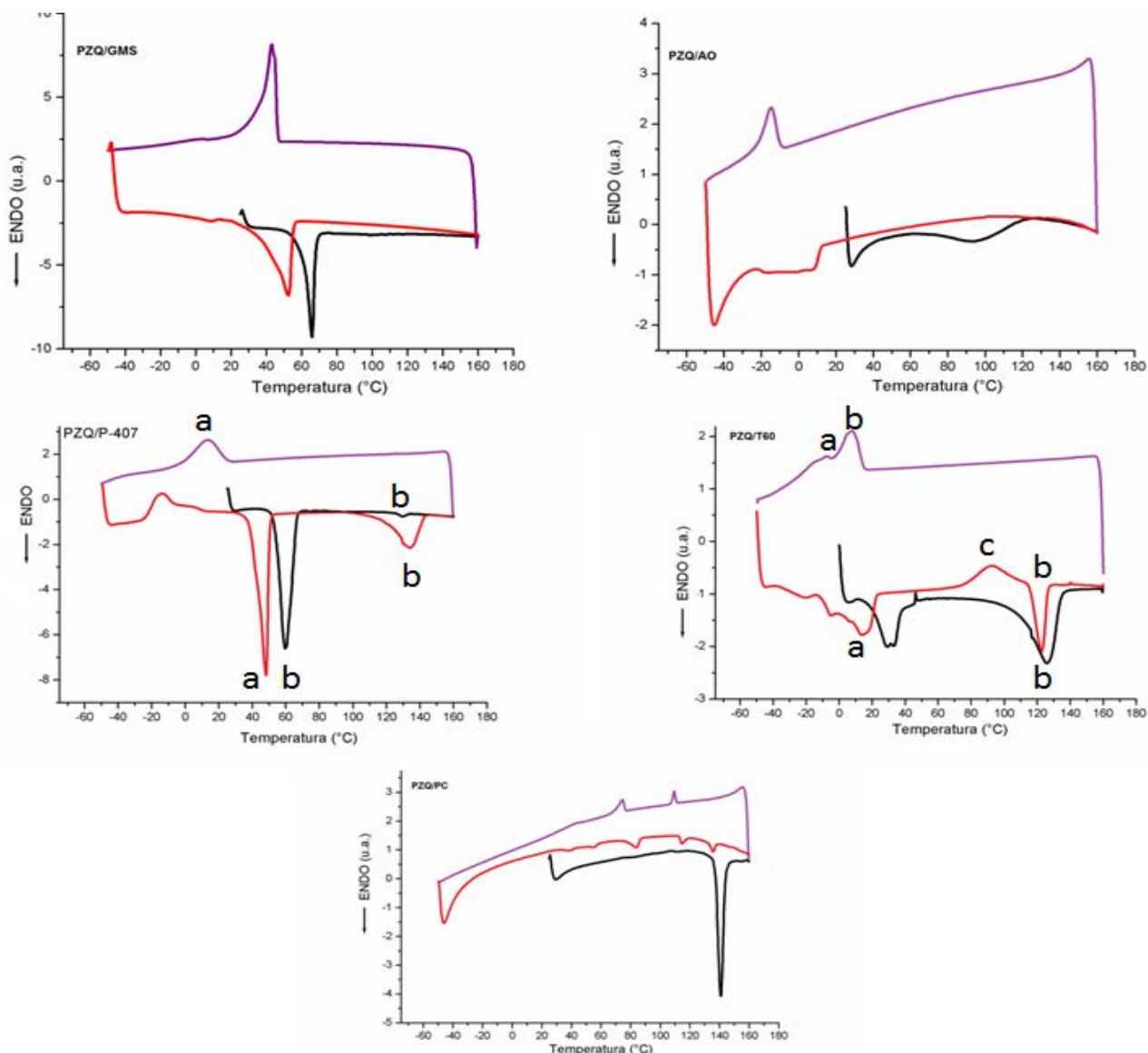
Tabela 8. Dados de DSC das misturas binárias PZQ/GMS, PZQ/AO, PZQ/P-407, PZQ/T60, PZQ/PC contendo o ponto de fusão, temperatura *onset* e os valores de entalpia.

Componente	Fusão			Onset			Entalpia		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
	Segmento	segmento	segmento	segmento	segmento	segmento	segmento	segmento	segmento
PZQ/GMS	65,25	43,23	52,13	60,67	46,36	42,47	120,19	62,64	50,33
PZQ/AO	94,49	14,79	-	73,85	10,04	-	9,82	8,64	-
PZQ/P-407	59,30	13,23	49,95	53,83	25,0	40,77	63,67	21,53	60,96
PZQ/T60	125,90	7,38	122,41	113,36	14,81	115,60	28,59	21,58	11,89
PZQ/PC	140,66	109,45	135,54	137,08	110,90	132,65	29,18	1,22	1,27

A Figura 14 exibe as curvas de DSC das misturas binárias contendo PZQ, em que preto se refere ao primeiro evento de aquecimento, roxo é o segundo evento de resfriamento e vermelho está relacionado ao segundo evento de aquecimento.

Resultados

Figura 14 Curvas de DSC das misturas binárias: PZQ/GMS; PZQ/AO; PZQ/P407; PZQ/T60; PZQ/PC, em que preto é referente ao primeiro evento de aquecimento, roxo é o evento de resfriamento e vermelho é o segundo evento de aquecimento.



É possível observar que a mistura PZQ/GMS no primeiro evento de aquecimento (preto) apresenta um pico endotérmico agudo intenso em $65,25^{\circ}\text{C}$ ($T\text{-onset } 60,67^{\circ}\text{C}$) que pode ser atribuído à fusão do GMS e o valor de entalpia $120,19 \text{ J/g}$. O evento de resfriamento (roxo) apresentou um pico exotérmico em $43,23^{\circ}\text{C}$ ($T\text{-onset } 46,36^{\circ}\text{C}$) e a entalpia de $62,64 \text{ J/g}$. O segundo evento de aquecimento (vermelho) apresentou um pico endotérmico menos pronunciado em $52,13^{\circ}\text{C}$ ($T\text{-onset } 42,47^{\circ}\text{C}$), a entalpia para esse evento foi $50,33 \text{ J/g}$.

A Tabela 9 exibe os dados do ΔH obtido e ΔH esperado da mistura binária PZQ/GMS.

Resultados

Tabela 9 Dados de DSC das mistura binária PZQ/GMS com os valores de entalpias esperadas

Parâmetro	1º aquecimento	Resfriamento	2º aquecimento
T- pico (°C)	65,25	43,23	52,13
T-onset (°C)	60,67	46,36	42,47
ΔH obtido (J g ⁻¹)	120,19	62,64	50,33
ΔH esperado (J g ⁻¹)	132,32	68,96	55,41

Como é possível observar na Tabela 9 houve uma redução nos valores de ΔH obtidas em relação às esperadas para os diferentes eventos apresentados nas curvas de DSC, assim, podemos sugerir uma interação entre o fármaco e o lipídeo.

No primeiro evento de aquecimento (preto), a mistura binária de PZQ/AO apresentou um pico endotérmico em 94,49°C (T-onset 73,85°C) correspondente à fusão do PZQ (ΔH 9,82 J/g). O evento de resfriamento (roxo) apresentou um pico exotérmico em 14,79°C (T-onset 10,04°C) que pode ser atribuído à recristalização do AO, também apresentou o valor de ΔH 8,64 J/g. O segundo evento de aquecimento (vermelho) apresentou um evento endotérmico diferente dos componentes isolados, sugerindo a solubilização do PZQ no AO.

Tabela 10 Dados de DSC das mistura binária PZQ/AO com os valores de entalpias esperadas

Parâmetro	1º aquecimento	Resfriamento
T- pico (°C)	94,49	14,79
T-onset (°C)	73,85	10,04
ΔH obtido (J g ⁻¹)	9,82	8,64
ΔH esperado (J g ⁻¹)	10,81	9,51

Observa-se na Tabela 10 que houve uma redução nos valores de ΔH obtidas em relação às esperadas para os diferentes eventos apresentados nas curvas de DSC, sugerindo uma interação entre o PZQ e AO.

Resultados

O primeiro evento de aquecimento (preto) do PZQ/P-407 apresentou um pico endotérmico intenso em 59,95°C (a) (*T-onset* 53,83°C) que é atribuído ao P-407 e outro pico menos intenso em 129,47°C (b) (*T-onset* 125,88°C) que é atribuído a cristais de PZQ que não solubilizou, os ΔH foram 63,67J/g e 26,79J/g respectivamente. O evento de resfriamento (roxo) exibiu um pico exotérmico em 13,23 °C (*T-onset* 25,00°C), que pode ser atribuído à recristalização do P-407. O segundo evento de aquecimento (vermelho) exibiu um pico exotérmico em -14,00°C (a) (*T-onset* -24,04°C) seguido de uma transição vítrea (b), tais eventos podem ser atribuídos a uma mudança de estrutura do PZQ, pois parte dessa deixa de ser amorfa e volta ao seu estado cristalino, tal evento pode ser confirmado pelo aumento do pico endotérmico em 133,91°C (d) (*T-onset* 124,60°C, entalpia 26,79 J/g). Outro pico mais intenso ocorreu em 47,97°C (b) (*T-onset* 40,77°C, entalpia 60,96 J/g) que é atribuído à fusão do P-407. Com os eventos apresentados, sugerimos que o P-407 e PZQ separaram durante o reaquecimento.

Tabela 11 Dados obtidos das curvas de DSC da mistura binária PZQ/P-407

Parâmetro	1º aquecimento	Resfriamento	2º aquecimento
T- pico (°C)	59,30	13,23	49,95
T-onset (°C)	53,83	25,00	40,77
ΔH obtido (J g ⁻¹)	63,67	21,53	60,96
ΔH esperado (J g ⁻¹)	70,1	23,70	67,11

Como é possível observar na Tabela 11 houve uma redução nos valores de ΔH obtidas em relação às esperadas para os diferentes eventos apresentados nas curvas de DSC, porém, observa-se na curva a presença de ambos os picos, sugerindo pouca interação entre ambos os componentes.

O primeiro evento de aquecimento (preto) do PZQ/T60 apresentou um pico endotérmico em (a) 29,11°C (*T-onset* 20,21°C, ΔH 13,30 J/g) que é atribuído ao T60 e outro pico 125,90°C (*T-onset* 113,36°C, ΔH 28,59 J/g), (b) (*T-onset* 125,88°C) que é atribuído a cristais ao PZQ. O evento de resfriamento (roxo) exibiu um pico exotérmico em 7,38°C (*T-onset* 14,81°C, ΔH -21,58J/g), que pode ser atribuído à recristalização do T60. O segundo evento de aquecimento (vermelho) exibiu um pico endotérmico em 13,79°C (a)

Resultados

(*T-onset* 61,32e⁻³°C) atribuído à fusão do T60, outro evento ocorreu com um pico exotérmico em 92,32°C (b) (*T-onset* 77,74°C, ΔH -7,20 J/g), seguido de uma fusão (c) em 122,41°C (*T-onset* 115,60°C, ΔH 11,89 J/g), tais eventos podem ser atribuídos a uma mudança de estrutura do PZQ, pois parte dessa deixa de ser amorfa e volta ao seu estado cristalino, tal evento pode ser confirmado pelo pico de fusão mais definido do PZQ. Com os eventos apresentados, sugerimos que o P-407 e PZQ separaram durante o reaquecimento.

Tabela 12 Dados das curvas de DSC das misturas binárias PZQ/T60

Parâmetro	1º aquecimento	Resfriamento	2º aquecimento
T- pico (°C)	125,90	7,38	122,41
<i>T-onset</i> (°C)	113,36	14,81	115,60
ΔH obtido (J g ⁻¹)	28,59	21,58	11,89
ΔH esperado (J g ⁻¹)	31,47	23,75	13,09

Como é possível observar na Tabela 12 houve uma redução nos valores de ΔH obtidas em relação às esperadas para os diferentes eventos apresentados nas curvas de DSC, porém, observa-se na curva a presença dos picos de PZQ e T60, sugerindo pouca interação entre ambos os componentes.

O primeiro evento de aquecimento (preto) da mistura binária PZQ/PC apresentou um pico endotérmico agudo em 140,66°C (*T-onset* 137,08°C) que pode ser atribuído à fusão do PZQ (ΔH 29,18J/g). O evento de resfriamento (roxo) apresentou dois picos exotérmicos em 109,45°C (*T-onset* 110,90°C) e outro em 74,42°C (*T-onset* 76,51°C) que podem ser atribuídos à recristalização do PC e os valores de ΔH foram 1,22J/g e 2,62J/g respectivamente. O segundo evento de aquecimento (vermelho) apresentou diferentes picos endotérmicos em 55,70 (*T-onset* 51,83°C e ΔH 0,39 J/g), 83,87°C (*T-onset* 76,85°C e ΔH 2,48J/g), 114,55°C (112,56°C e ΔH 1,13J/g) e 135,54°C (*T-onset* 132,65°C e ΔH 1,27J/g).

Resultados

Tabela 13 Dados das curvas de DSC das misturas binárias PZQ/PC

Parâmetro	1º aquecimento	Resfriamento	2º aquecimento
T- pico (°C)	140,66	109,45	135,54
T-onset (°C)	137,08	110,90	132,65
ΔH obtido (J/g)	29,18	1,22	1,27
ΔH esperado (J/g)	32,12	1,34	1,40

Como é possível observar na Tabela 13 houve uma redução nos valores de ΔH obtidas em relação às esperadas para os diferentes eventos apresentados nas curvas de DSC, na curva, observa-se a presença de picos endotérmicos, sugerindo que há presença de cristais de PZQ.

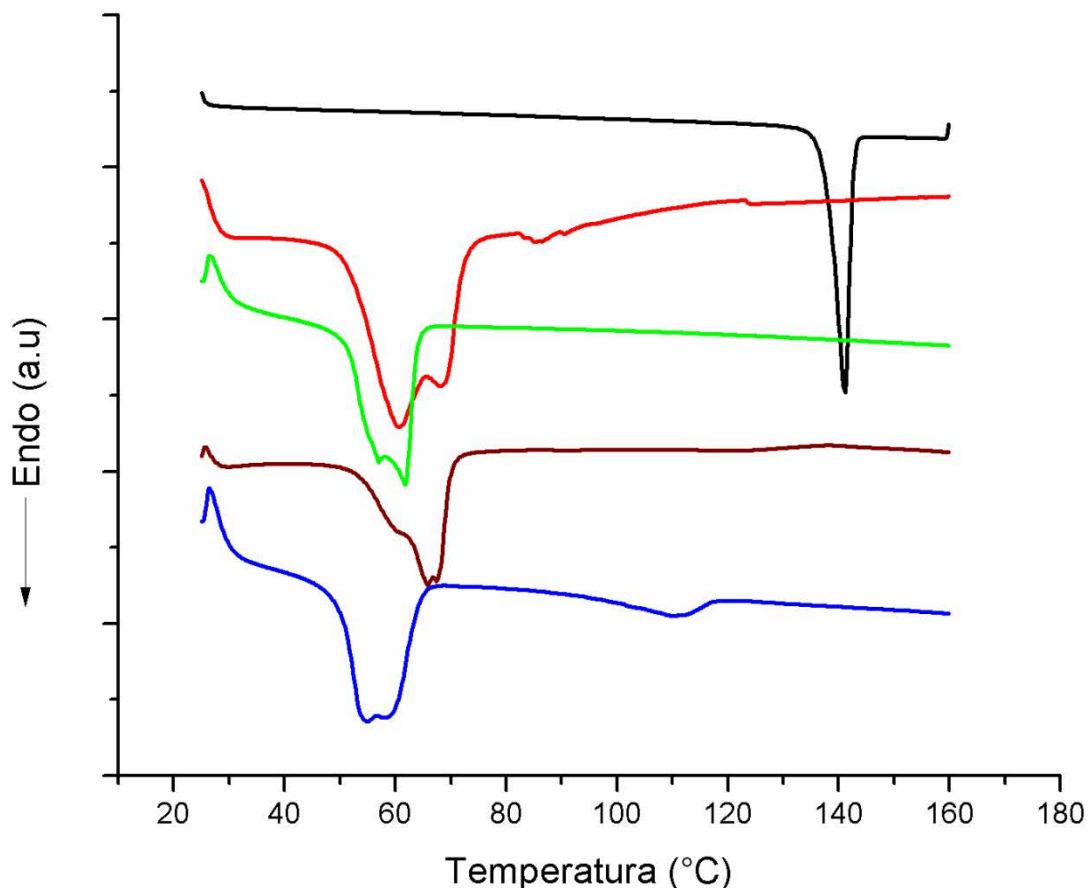
Na Tabela 14 está apresentada os valores do ponto de fusão, T-onset e entalpia e na Figura 15 estão apresentadas às curvas de DSC referentes ao aquecimento, resfriamento e reaquecimento das MF-SLN1, MF-SLN2, SLN 1 e SLN2.

Tabela 14 Dados de DSC das MF-SLN1, MF-SLN2, SLN1 e SLN2 contendo o ponto de fusão, temperatura onset e os valores de entalpia.

Componente	Ponto de fusão (°C)	Onset (°C)	Entalpia (J/g)
MF-SLN1	60,51	51,37	82,21
MF-SLN2	65,67	58,92	83,58
SLN1	61,35	49,57	93,47
SLN2	54,63	38,39	67,88

Resultados

Figura 15 Curvas de DSC do PZQ (preto) das MF-SLN1 (vermelho), MF-SLN2 (verde), SLN1 (marrom) e SLN2 (azul).



Conforme demonstrado na Figura 14, a MF-SLN1 apresentou dois picos endotérmicos em 60,51°C (T_{onset} 51,37°C) que pode ser atribuídos à fusão do P-407 e ao GMS, pois o pico coincide com os picos de fusão relacionados com ambos os componentes na mistura binária (Figura 13), o valor de entalpia foi ΔH 82,21J/g.

A MF-SLN2 apresentou dois picos endotérmicos em 65,67°C (T_{onset} 58,92°C, ΔH 83,58 J/g) atribuídos ao P-407, GMS e outro atribuído à fusão do PZQ.

Resultados

Tabela 15 Dados das curvas de DSC das MF-SLN2

Parâmetro	Aquecimento
T- pico (°C)	65,67
T-onset (°C)	58,92
ΔH obtido (J g ⁻¹)	83,58
ΔH esperado (J g ⁻¹)	92,01

As SLN1 apresentaram um pico endotérmico em 61,35°C (T-onset 49,57°C) no primeiro evento de aquecimento entalpia 93,47J/g. Para as SLN2 apresentou dois picos endotérmicos em 54,63°C (T-onset 38,39°C e ΔH 67,88 J/g) que pode ser atribuído ao pico de fusão do GMS e P-407, pois o evento se aproxima da temperatura de fusão apresentado pela mistura binária. O outro evento endotérmico ocorreu em 110,03°C (T-onset 108,25°C e ΔH 1,47J/g), que pode ser atribuído ao PZQ que não solubilizou na matriz. Dados semelhantes foram observados na mistura binária (PZQ/P-407), sugerindo que o evento observado nas SLN2 ocorreu devido à interação do PZQ com P-407.

A Tabela 16 apresenta os dados das SLN2 das entalpias esperadas e obtidas.

Tabela 16 Dados das curvas de DSC das SLN2

Parâmetro	Aquecimento	
T- pico (°C)	54,63	110,04
T-onset (°C)	38,39	98,94
ΔH obtido (J g ⁻¹)	67,88	8,24
ΔH esperado (J g ⁻¹)	74,73	9,072

Como é possível observar na Tabela 16 Dados das curvas de DSC das SLN2 houve uma redução nos valores das entalpias obtida em relação às esperadas para os diferentes eventos apresentados nas curvas de DSC.

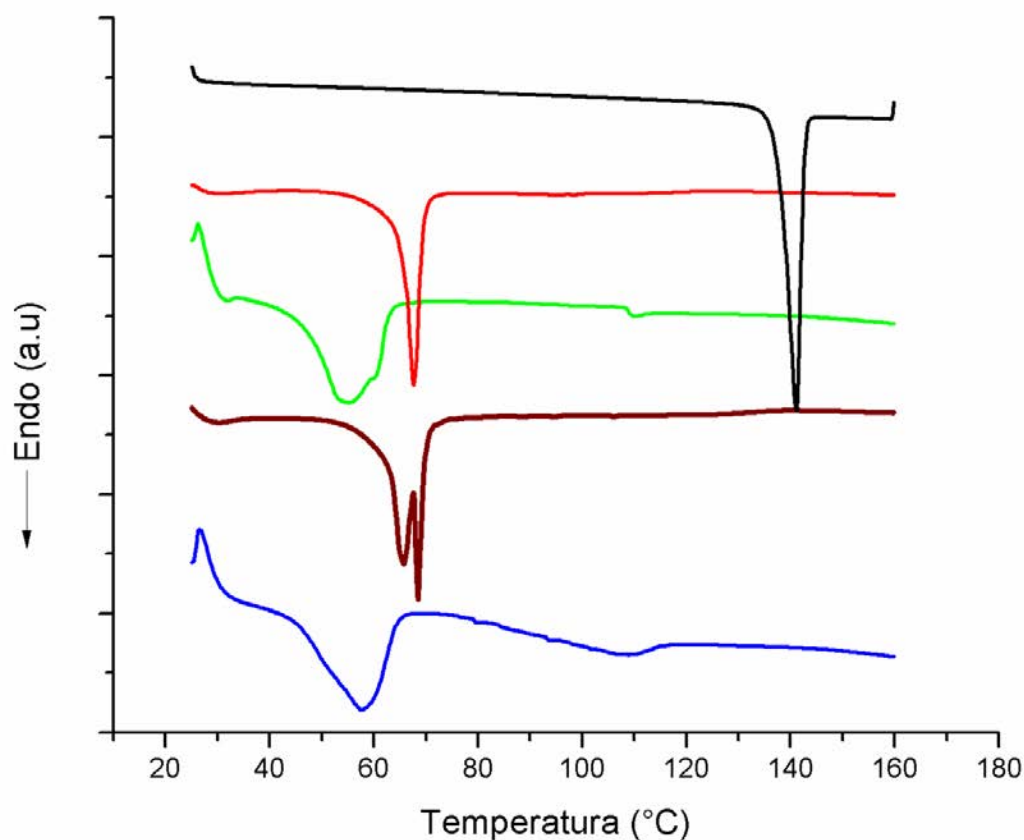
Resultados

A Tabela 17 apresenta os dados de fusão, *T-onset* e entalpia enquanto a Figura 16 exibe as curvas de DSC das misturas físicas e das nanopartículas preparadas utilizando PC/T60 como sistema tensoativo, contendo ou não PZQ.

Tabela 17. Dados de DSC das MF-SLN3, MF-SLN4, SLN3 e SLN4 contendo o ponto de fusão, temperatura *onset* e os valores de entalpia.

Componentes	Ponto de fusão (°C)	<i>Onset</i> (°C)	Entalpia (J/g)
MF-SLN3	66,89	64,98	112,11
MF-SLN4	68,18	66,88	95,65
SLN3	55,29	47,08	61,69
SLN4	57,49	44,75	53,35

Figura 16 Curvas de DSC do PZQ (preto) das MF-SLN3 (vermelho), MF-SLN4 (verde), SLN3 (marrom) e SLN4(azul).



Resultados

Conforme demonstrado na Figura 16 a MF-SLN3 apresentou um pico endotérmico em 66,89°C (*T-onset* 64,98°C, ΔH 122,11J/g) que pode ser atribuídos à fusão do GMS, pois o pico coincide com o pico de fusão relacionado ao GMS. A MF-SLN4 apresentou um pico endotérmico em 68,18°C (*T-onset* 66,88°C, ΔH 95,55J/g) que pode ser atribuído ao GMS.

Tabela 18 Dados das curvas de DSC das MF-SLN4

Parâmetro	Aquecimento
T- pico (°C)	68,18
T-onset (°C)	66,88
ΔH obtido (J g ⁻¹)	95,65
ΔH esperado (J g ⁻¹)	105,31

As SLN3 apresentaram um pico endotérmico em 55,29°C (*T-onset* 47,08°C, ΔH 61,69J/g). Para as SLN4 evento de aquecimento apresentou dois picos endotérmicos em 57,49°C (*T-onset* 44,75°C e ΔH 53,35 J/g) e outro evento endotérmico que ocorreu em 106,69°C (*T-onset* 91,40°C e ΔH 14,89J/g), que pode ser atribuído ao deslocamento do pico de fusão do PZQ.

Tabela 19 Dados das curvas de DSC das SLN4

Parâmetro	1º aquecimento
T- pico (°C)	57,49
T-onset (°C)	44,75
ΔH obtido (J g ⁻¹)	53,35
ΔH esperado (J g ⁻¹)	58,74

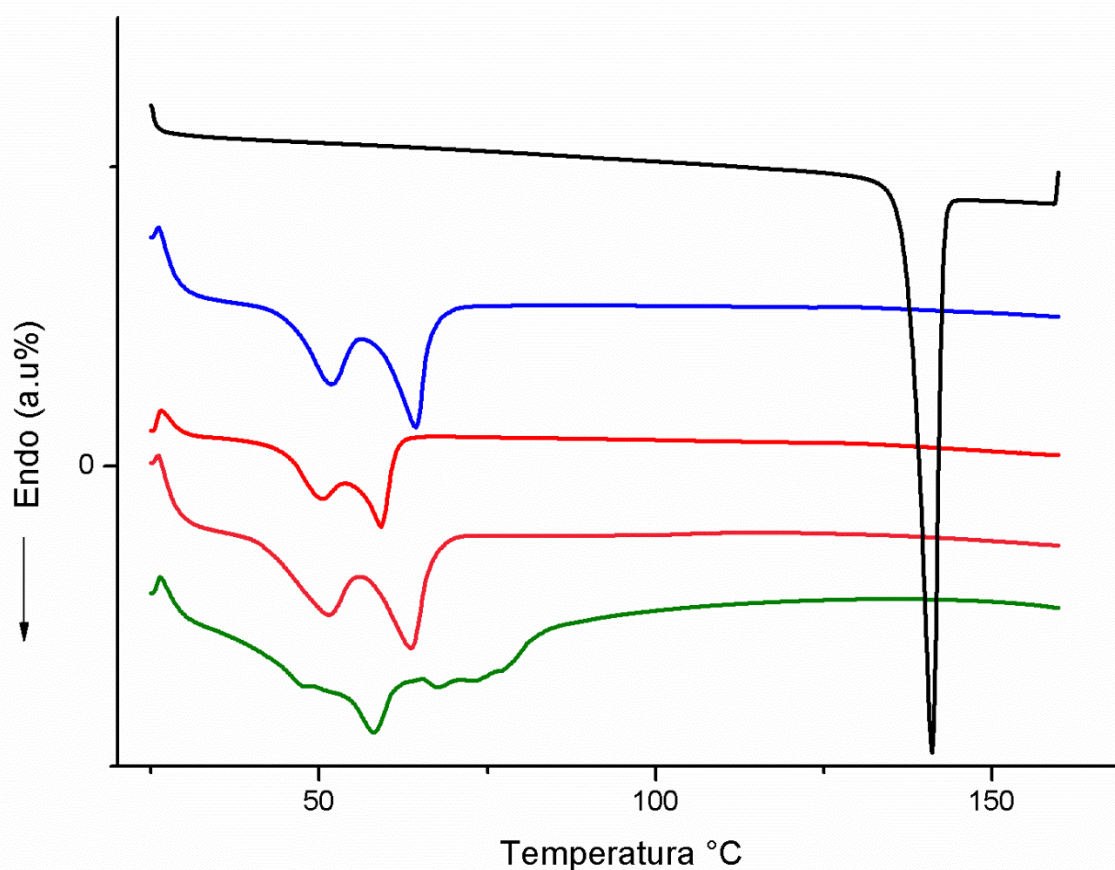
A Tabela 20 exibe os dados de fusão, *T-onset* e entalpia e a Figura 17 apresenta dos dados das curvas de DSC das misturas físicas e das nanopartículas preparadas utilizando PC/P-407 como sistema tensoativo, contendo ou não PZQ.

Resultados

Tabela 20. Dados de DSC das MF-NLC1, MF-NLC2, NLC1 e NLC2 contendo o ponto de fusão, temperatura *onset* e os valores de entalpia.

Componentes	Ponto de fusão (°C)	<i>Onset</i> (°C)	Entalpia (J/g)
MF-NLC1	64,12	57,75	55,38
MF-NLC2	63,46	55,69	56,53
NLC1	59,07	53,25	80,30
NLC2	58,01	50,93	75,30

Figura 17 Curvas de DSC do PZQ (preto) das MF-NLC1 (azul), MF-NLC2 (vermelho), NLC1 (rosa) e NLC2 (verde).



Conforme demonstrado na Figura 17, a MF-NLC1 apresentou um pico endotérmico em 64,12°C (T_{onset} 57,75°C, ΔH 55,38J/g). A MF-NLC2 apresentou um pico endotérmico em 63,46°C (T_{onset} 55,69°C, ΔH 56,53J/g).

Resultados

Tabela 21 Dados das curvas de DSC das MF-NLC2

Parâmetro	Aquecimento
T- pico (°C)	63,46
T-onset (°C)	55,69
ΔH obtido ($J g^{-1}$)	56,53
ΔH esperado ($J g^{-1}$)	62,24

As NLC1 apresentaram um pico endotérmico em 59,07°C (T-onset 53,25°C, ΔH 80,30J/g). Para os NLC2 apresentou um pico endotérmico em 58,01°C (T-onset 50,93°C e ΔH 75,30 J/g).

Tabela 22 Dados da curva de DSC com valores de entalpia esperada para os NLC2

Parâmetro	1º aquecimento
T- pico (°C)	58,01
T-onset (°C)	50,93
ΔH obtido ($J g^{-1}$)	75,30
ΔH esperado ($J g^{-1}$)	82,90

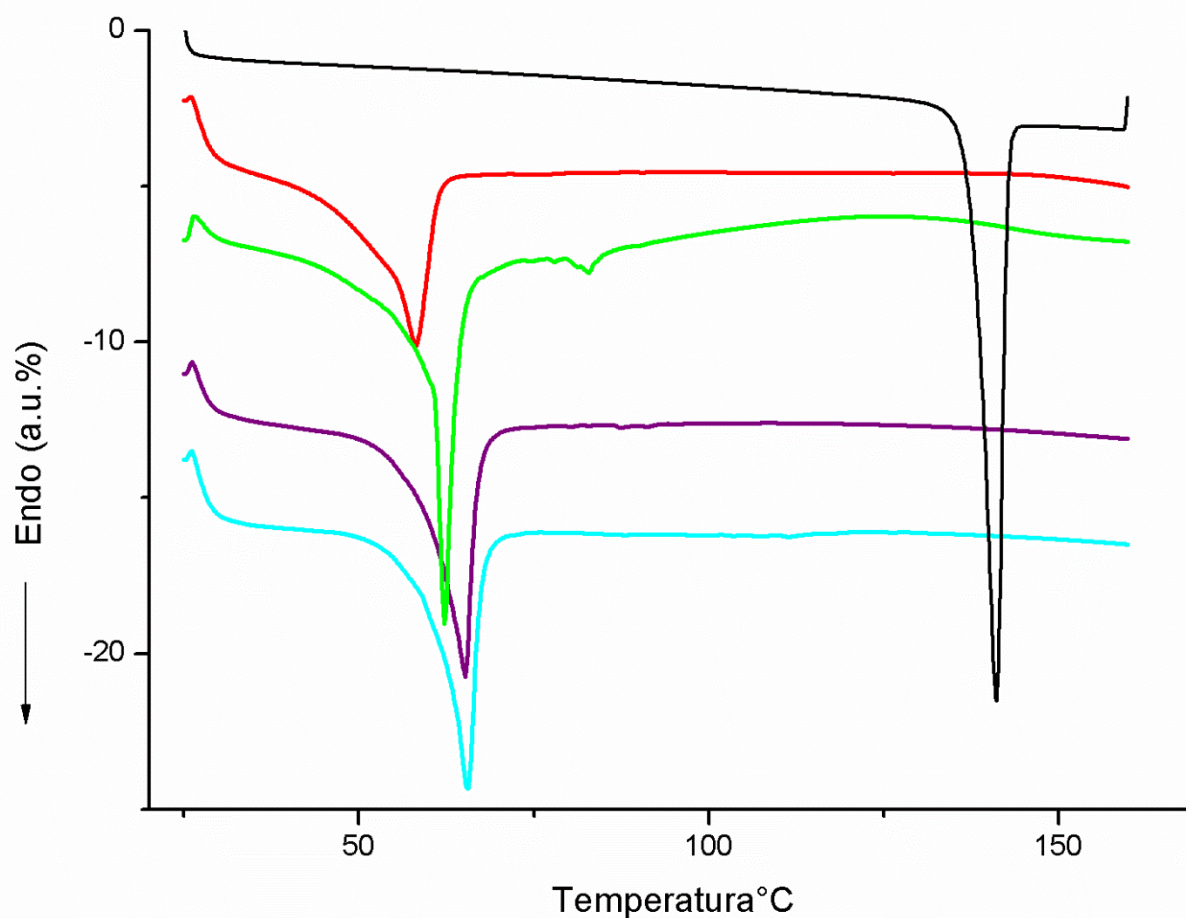
A Tabela 23 apresenta os dados de fusão, T-onset e entalpia e a Figura 18 apresenta dos dados das curvas de DSC das misturas físicas e das nanopartículas preparadas utilizando PC/T60 como sistema tensoativo, contendo ou não PZQ.

Resultados

Tabela 23. Dados de DSC das MF-NLC3, MF-NLC4, NLC3 e NLC4 contendo o ponto de fusão, temperatura *onset* e os valores de entalpia.

Componentes	Ponto de fusão (°C)	Onset (°C)	Entalpia (J/g)
MF-NLC3	65,16	60,88	64,99
MF-NLC4	64,85	59,23	64,19
NLC3	61,77	79,51	59,98
NLC4	57,75	52,39	56,49

Figura 18 Curvas de DSC do PZQ (preto), das MF-NLC3 (vermelho), MF-NLC4 (verde), NLC3 (roxo) e NLC4 (azul claro).



Conforme demonstrado na Figura 18 a MF-NLC3 apresentou um pico endotérmico intenso em 65,16°C (T_{onset} 60,88°C, ΔH 64,99J/g) que pode ser

Resultados

atribuídos à fusão do GMS, pois o pico coincide com o pico de fusão relacionado ao GMS. A MF-NLC4 apresentou um pico endotérmico em 64,85°C (*T-onset* 59,23°C, ΔH 64,19J/g).

Tabela 24 Dados da curva de DSC com valores de entalpia esperada para os MF-NLC4

Parâmetro	1º aquecimento
T- pico (°C)	64,85
T-onset (°C)	59,23
ΔH obtido (J g ⁻¹)	64,19
ΔH esperado (J g ⁻¹)	70,67

As NLC3 apresentaram dois picos endotérmicos, sendo o pico mais intenso em 61,77°C (*T-onset* 60,16°C, ΔH 59,98J/g) e o segundo menos intenso em 82,79°C (*T-onset* 79,51°C e ΔH 2,72). Para as NLC4 apresentou dois picos endotérmicos em 57,75°C (*T-onset* 52,39°C e ΔH 56,49 J/g).

Tabela 25 Dados da curva de DSC com valores de entalpia esperada para os NLC4

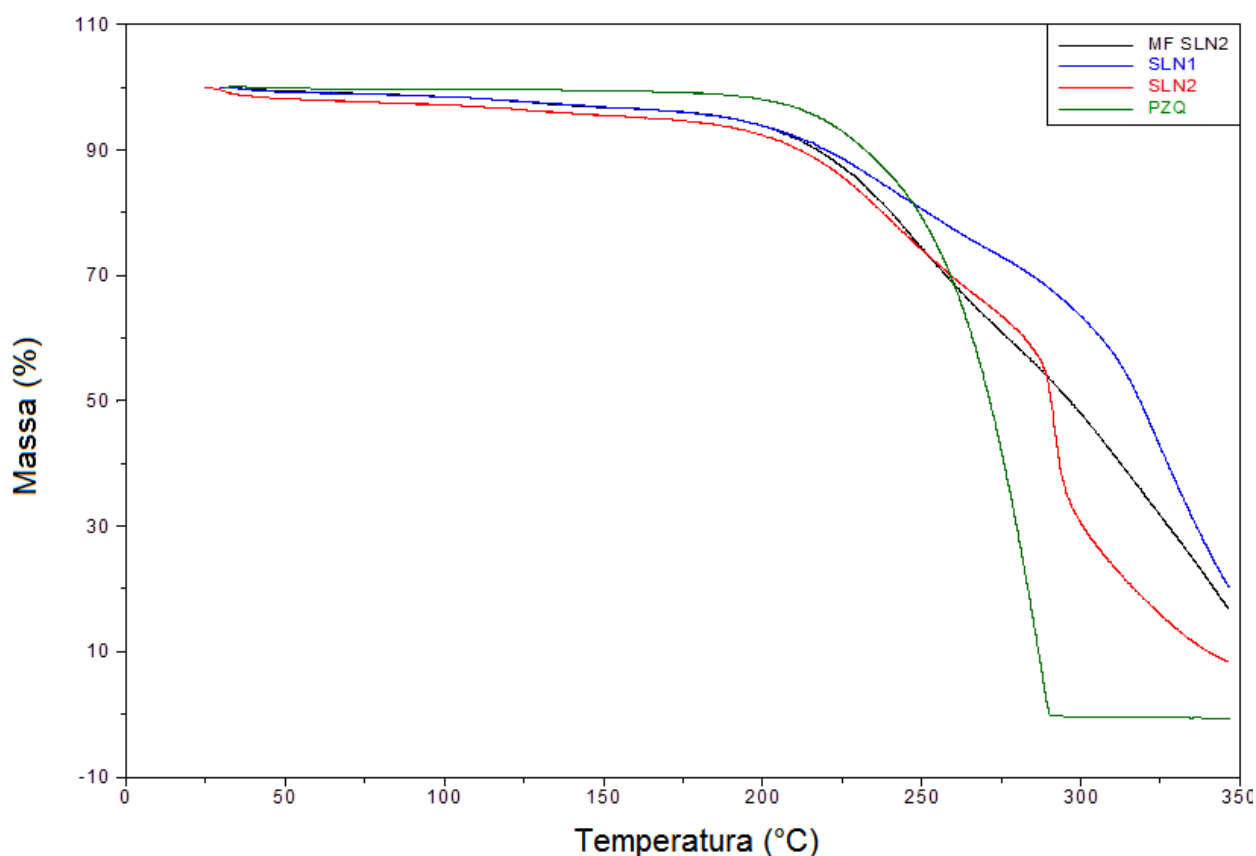
Paramêtro	1º aquecimento
T- pico (°C)	57,75
T-onset (°C)	52,39
ΔH obtido (J g ⁻¹)	56,49
ΔH esperado (J g ⁻¹)	62,19

Com os resultados de análise térmica apresentados, observamos que as SLN2 e SLN4 apresentam pequenos picos de fusão que podem ser atribuídos a pequenos cristais de PZQ que provavelmente não solubilizou na matriz lipídica. Os NLC2 apresentaram alguns picos de fusão próximos, sugerindo que os componentes fundiram juntos aos poucos, enquanto os NLC4 apresentaram apenas um pico endotérmico, sugerindo que o PZQ está solubilizado na matriz lipídica.

5.5 Estudos de termogravimetria para os diferentes sistemas

Os estudos de análises termogravimétricas (TGA) podem ser utilizados para investigar e medir a estabilidade física e térmica devido a informações quantitativas nas alterações na perda de massa (LIN e WANG, 2012; CRAIG e READING 2007; GABBOTTI, 2008). A Figura 19 exibe as curvas de TG para as SLN contendo ou não PZQ e para a MF-SLN2.

Figura 19 Curvas de TG do PZQ (verde), SLN1 (azul), SLN2 (vermelho), MF-SLN2 (preto).

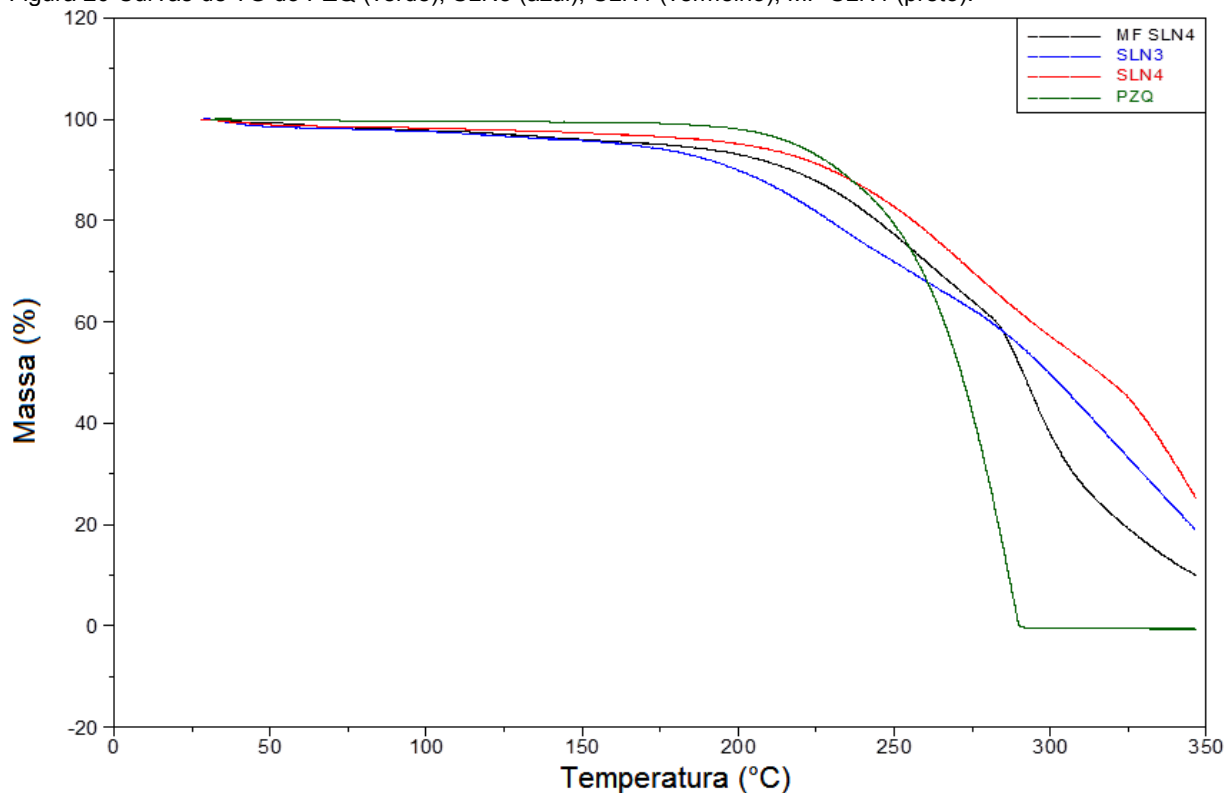


Conforme ilustrado na Figura 19 é possível observar que os sistemas apresentaram uma menor estabilidade térmica quando comparada com o PZQ livre, observa-se que as SLNs 2 apresentaram um comportamento semelhante ao PZQ na perda de massa do ultimo evento, com esse resultado, sugerimos que o PZQ está interagindo com a matriz das SLNs. Apesar de apresentarem uma menor estabilidade térmica as SLN1 apresentaram um comportamento semelhante a MF-SLN2 de perda de massa semelhante.

Resultados

A Figura 20 mostra as curvas de TG das SLN 3, SLN4 , MF-SLN4. A SLN é menos estável que o PZQ livre. Observa-se que quando adicionado o PZQ ocorre um aumento na estabilidade das nanopartículas. Sendo estas mais estáveis que as misturas físicas.

Figura 20 Curvas de TG do PZQ (verde), SLN3 (azul), SLN4 (vermelho), MF-SLN4 (preto).



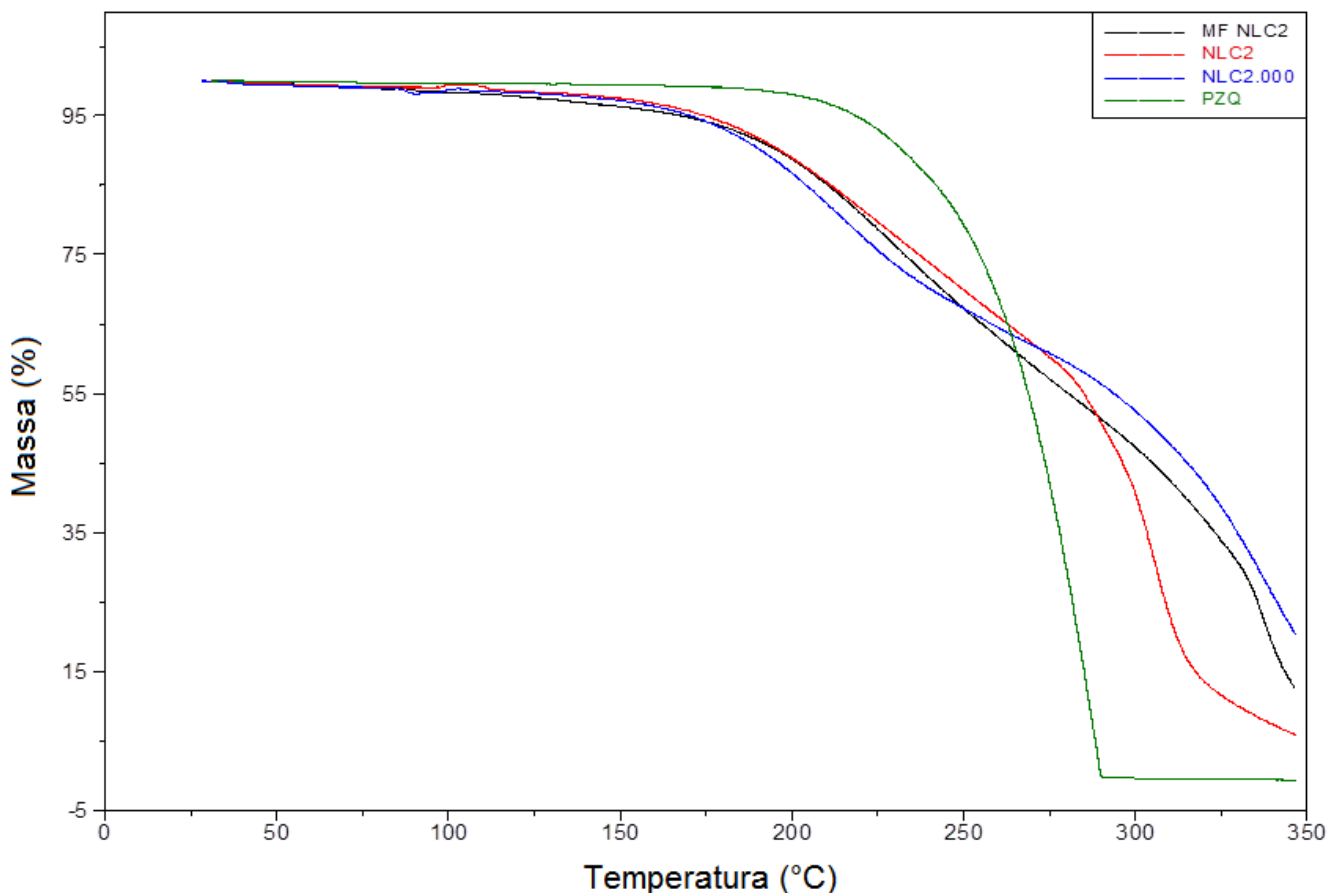
Os NLCs 1, 2 e MF-NLC2 (Figura 21) apresentaram uma perda de massa com uma temperatura inferior à do PZQ livre, o que sugere que os nanocarreadores não aumentam a estabilidade térmica do PZQ.

Tabela 26. Porcentagem de perda de massa das curvas de TG para PZQ, NLCs 1,2,3,4 e MF-NLC2 and 4.

Componentes	T°C	Perda de massa (%)	T°C	Perda de massa (%)	T°C	Perda de massa (%)
PZQ	198	98%	294.5°C	-	-	-
NLC1	147	97.3	239	70.6	345	21.0
NLC2	147	97.6	260	66.0	346	5.9
MF-NLC2	130	97.3	335	25.8	346	12.7
NLC3	137	97.9	238	76.9	346	22.6
NLC4	121	97.9	293	48.2	346	10.7
MF-NLC4	115	98.0	288	53.4	345	8.0

Resultados

Figura 21 Curvas de TG do PZQ (verde), NLC1 (azul), NLC2 (vermelho), MF-NLC2 (preto).

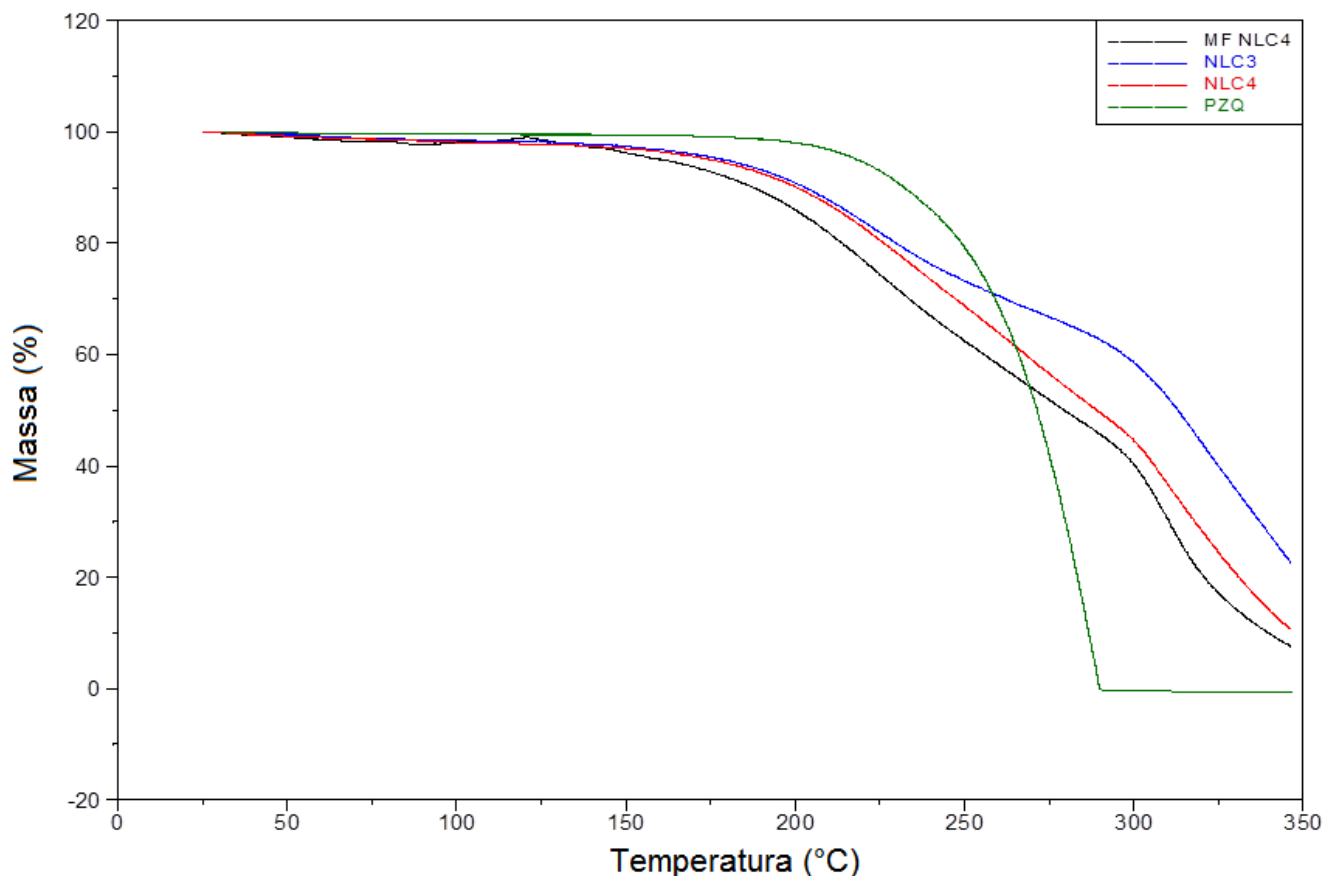


A Figura 21 exibe as curvas de TG, em que é possível observar uma diferença entre a NLC2 quando comparada ao NLC1 e a MF-NLC2, pois ocorre uma modificação no último evento de perda de massa dos NLC2, sendo esse evento muito semelhante a do PZQ livre. O que indica que o PZQ está interagindo com a matriz da nanopartícula, foi possível observar também que apesar de uma menor estabilidade térmica os NLC2 apresentaram um comportamento semelhante ao PZQ livre, e a MF-NLC2 apresentou um comportamento de perda de massa semelhante aos NLC1.

A Figura 22 ilustra as curvas de TG do PZQ, NLC3, NLC4 e MF-NLC4. Observa-se um comportamento semelhante entre NLC-PZQ e MF, no evento de perda de peso.

Resultados

Figura 22 Curvas de TG do PZQ (verde), NLC3 (azul), NLC4 (vermelho), MF-NLC4 (preto).



Pode-se dizer que o NLC4 é mais estável termicamente quando comparado com a MF-NLC4 e para os NLC3 observa-se um comportamento diferente no evento de perda de peso, o que sugere que o PZQ está incorporado na NLC. Se observarmos os eventos dos NLC2 e NLC4 é possível reconhecer que os NLC2 apresentaram uma maior semelhança ao PZQ em relação o evento de perda de massa, isso pode sugerir que o PZQ está interagindo de forma mais organizada com a matriz lipídica nos NLC2 do que nos NLC4.

Ao fazer uma análise comparativa entre os diferentes sistemas podemos observar que tanto as SLN2 quanto os NLC2 apresentaram o decaimento com a perda de massa semelhante ao PZQ livre, o mesmo não ocorreu para as SLN4 e NLC4. Como já informado anteriormente, entre as SLN e os NLC a diferença é a adição do AO nos NLCs, e a diferença tanto para SLN2 e SLN4 quanto para NLC2 e NLC4 é a combinação do sistema tensoativo. Como ambos os sistemas apresentaram o mesmo comportamento em relação à perda de massa no último evento, sugerimos que a

Resultados

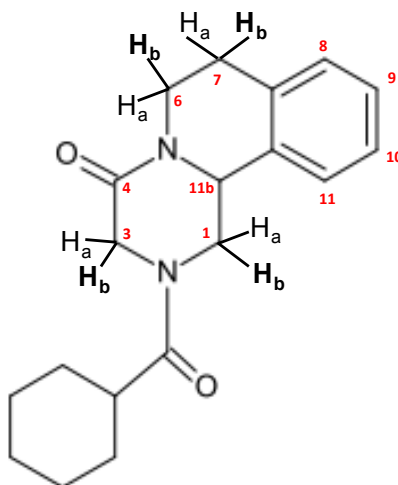
combinação de sistema tensoativo utilizada para as SLN2 e NLC2 apresenta uma maior organização da matriz lipídica quando comparados as SLN4 e NLC4.

Com os dados apresentados nas curvas de TG, observa-se que tanto o PZQ quanto os diferentes sistemas degradaram em temperaturas acima de 200°C, demonstrando que a temperatura que utilizamos para o preparo das partículas (80°C) não degrada nenhum componente da formulação.

5.6 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

¹HRMN é uma técnica adequada para analisar a estrutura de domínios de líquido no interior da matriz do lípido sólido (GARNERO *et al.*, 2010; KOLENYAK-SANTOS *et al.*, 2014). Para avaliar a interação do PZQ com os tensoativos P-407 e T60, o fármaco e cada tensoativo foram fisicamente misturados e analisados por RMN.

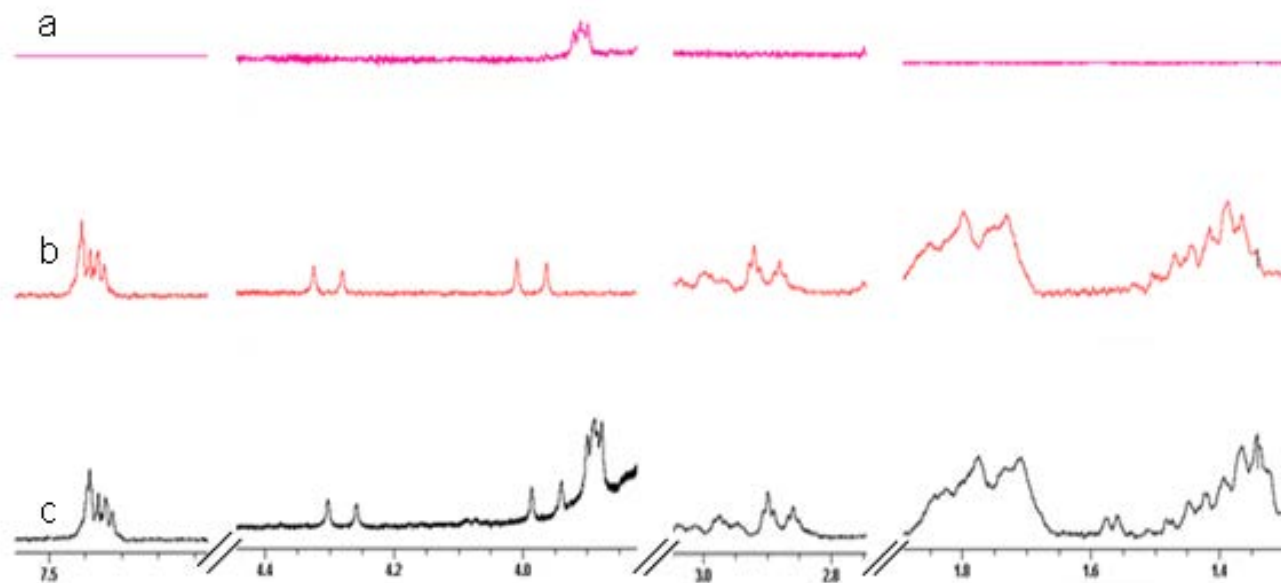
Figura 23 Estrutura química do PZQ exibindo os prótons numerados para os sinais dos espectros do RMN.



Os sinais do PZQ livre em água deuterada foram comparados com os dos PZQ encapsulados nos NLCs e para as misturas PZQ/P-407 e PZQ/T60, e as mudanças correspondentes nos desvios químicos ($\Delta \delta$) do PZQ são apresentados na Tabela 28 (ver prótons numerados na Figura 23). O ¹H-RMN mostrou que todos os prótons de PZQ foram afetados na presença dos tensoativos e dos NLCs. A interpretação dos resultados PZQ para a atribuição dos sinais está de acordo com a literatura (HI,AA 1998; BISPO DE JESUS M *et al.*, 2006).

Resultados

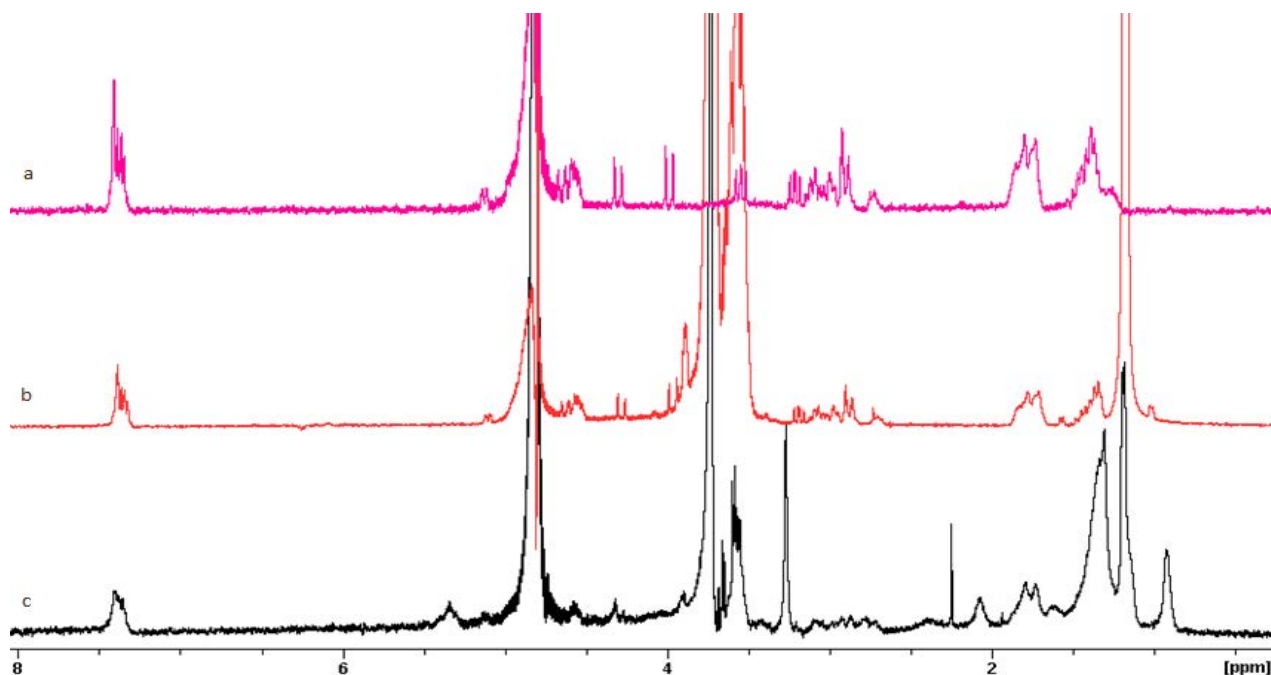
Figura 24 Espectros de ^1H RMN (a) P-407; (b) PZQ; (c) mistura física PZQ/P407.



Os espectros das SLNs mostram o efeito de desproteção para 1- H_b , 6- H_b e 7- H_{ab} . Os resultados mostraram o efeito de proteção dos prótons que desapareceram para o ciclo-hexilo e aromáticos e CH-ciclo-Hexilo.

A Figura 25 mostra os espectros de ^1RMN do PZQ (a), PZQ/PLU (b) e SLN2 (c).

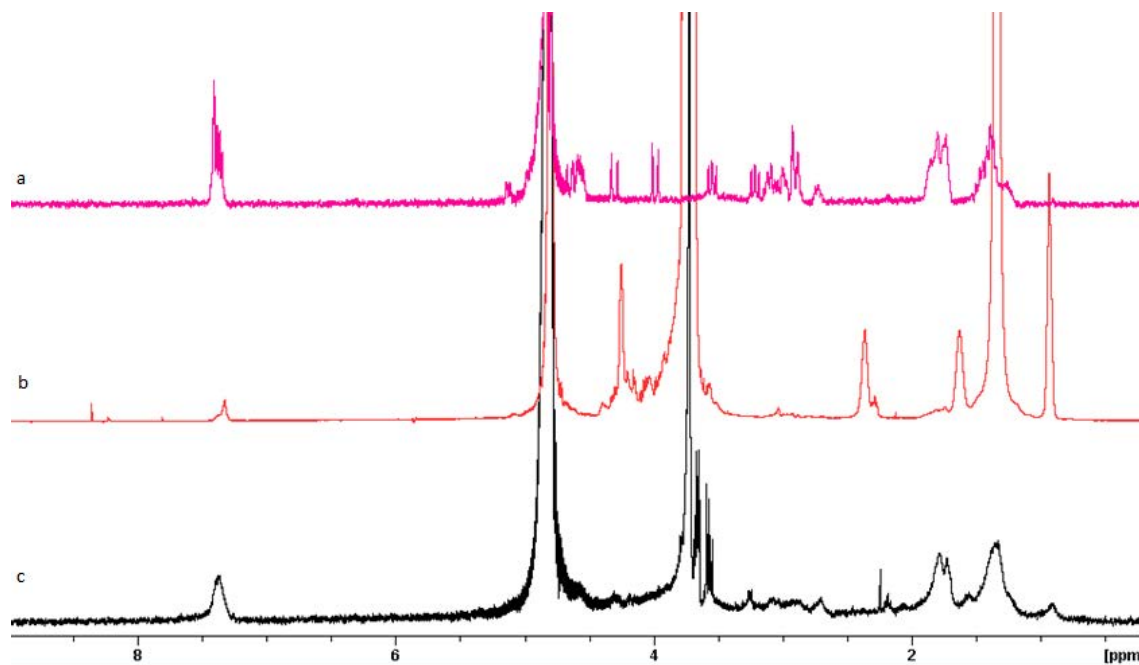
Figura 25 Espectro ^1H NMR para (a) PZQ, (b) mistura PZQ/P407, (c) SLN2.



Resultados

A Figura 26 mostra os espectros para as SLN4 em que (a) é o PZQ; (b) mistura PZQ/T60 e (c) as SLN4.

Figura 26 Espectro de ^1H NMR para (a) PZQ, (b) MF-PZQ/T60, (c) SLN4.



No espectro de SLN4 (Figura 26) foi observada desproteção para 1- H_b , H_b -6, 7- H_c e prótons aromáticos, ao passo que mostrou efeitos de proteção prótons ciclohexilo, e CH-ciclo-hexilo e 3- $\text{H}_{a,b}$, sinais dos prótons b desapareceram.

Tabela 27. ^1H RMN dos deslocamentos químicos do PZQ, PZQ/T60, SLN2 e SLN4

Atribuição	PZQ	PZQ:PLU		PZQ:TW		SLN2		SLN4	
	δ_L	δ_C	$\Delta\delta$	δ_C	$\Delta\delta$	δ_C	$\Delta\delta$	δ_C	$\Delta\delta$
Cyclohexyl	1.4026	1.3518	-0.0508	-	-	1.3420	-0.0606	1.3266	-0.0760
	1.7922	1.7391	-0.0531	-	-	1.7609	-0.0313	1.7505	-0.0417
CH (cyclohexyl)	2.9099	2.8799	-0.03	Sup.	-	-	-	-	-
1- H_b , 6- H_b , 7- H_{ab}	3.5434	Sup.	-	Sup.	-	3.5741	0.0307	3.5737	0.0303
3- H_b	3.9858	3.9636	-0.0222	3.9588	0.027	-	-	-	-
3- H_a	4.3018	4.2804	-0.0214	4.1407	0.1611	4.2915	-0.0103	-	-
Aromatic H	7.3738	7.3619	-0.0119	8.3631	-0.9893	7.3707	-0.0031	7.3791	0.0053

Resultados

A perda dos sinais pode ser atribuída à força de interação do PZQ com a matriz lipídica das SLNs, particularmente aos prótons do ciclo hexilo que revelou um deslocamento em ambas as SLNs.

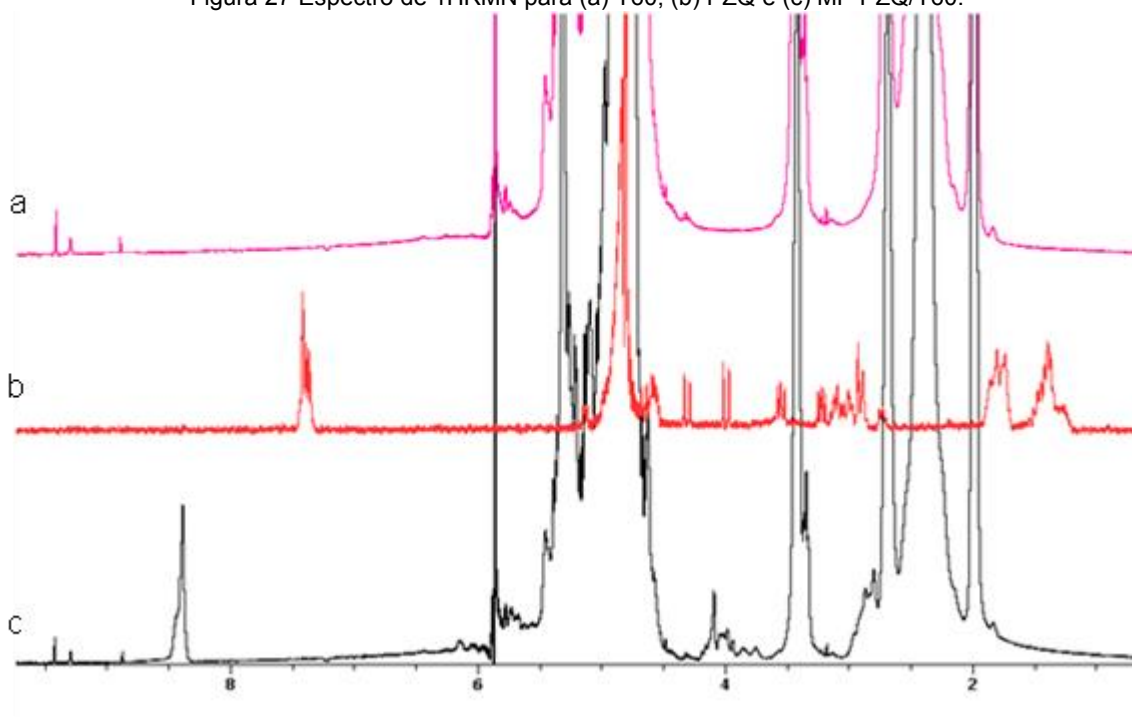
Tabela 28. ¹ HRMN dos deslocamentos químicos do PZQ, PZQ/T60, NLC2 e NLC4

Atribuição	PZQ			PZQ/P-407			PZQ/T60			NLC2		NLC4	
	δ_L	δ_C	$\Delta\delta$	δ_C	$\Delta\delta$	δ_C	$\Delta\delta$	δ_C	$\Delta\delta$	δ_C	$\Delta\delta$		
Cyclohexyl	1.4026	1.3518	-0.0508	-	-	1.3385	-0.0641	1.3618	-0.0408				
	1.7922	1.7391	-0.0531	-	-	1.7727	0.0195	1.7615	0.0307				
CH (cyclohexyl)	2.9099	2.8799	-0.03	Sup.	-	2.8832	0.0267	3.2507	0.3408				
1-H _b , 6-H _b , 7-H _{ab}	3.5434	Sup.	-	Sup.	-	Sup.	-	3.5657	-0.0223				
3-H _b	3.9858	3.9636	-0.0222	3.9588	0.027	3.9670	0.0188	-					
3-Ha	4.3018	4.2804	-0.0214	4.1407	0.1611	4.2838	0.018	4.2881	0.0137				
Aromatico H	7.3738	7.3619	-0.0119	8.3631	-0.9893	7.3564	0.0174	7.3690	0.0048				

O espectro da MF-PZQ/P407 Tabela 28 exibiu efeito de proteção para a ciclohexilo, 3-Ha, b e prótons aromáticos. Em contraste, no espectro da MF-PZQ/T60 Tabela 28 foi observada para desproteção 3-Ha, b prótons, enquanto prótons aromáticos mostraram efeitos de proteção e os sinais dos prótons do ciclo-hexilo desapareceram. É de suma importância notar que os prótons de ciclo-hexilo apresentaram o maior deslocamento na MF-PZQ/P-407 quando comparado ao livre PZQ, indicando que este grupo estava envolvido na interação. Enquanto que para os prótons aromáticos da MF-PZQ/T60 revelaram o maior deslocamento, o que sugere que o anel benzeno foi envolvido na interação. Esses comportamentos demonstraram diferentes interações entre PZQ e cada tensoativo, o que se refletiu no modo de interação dos NLCs.

Resultados

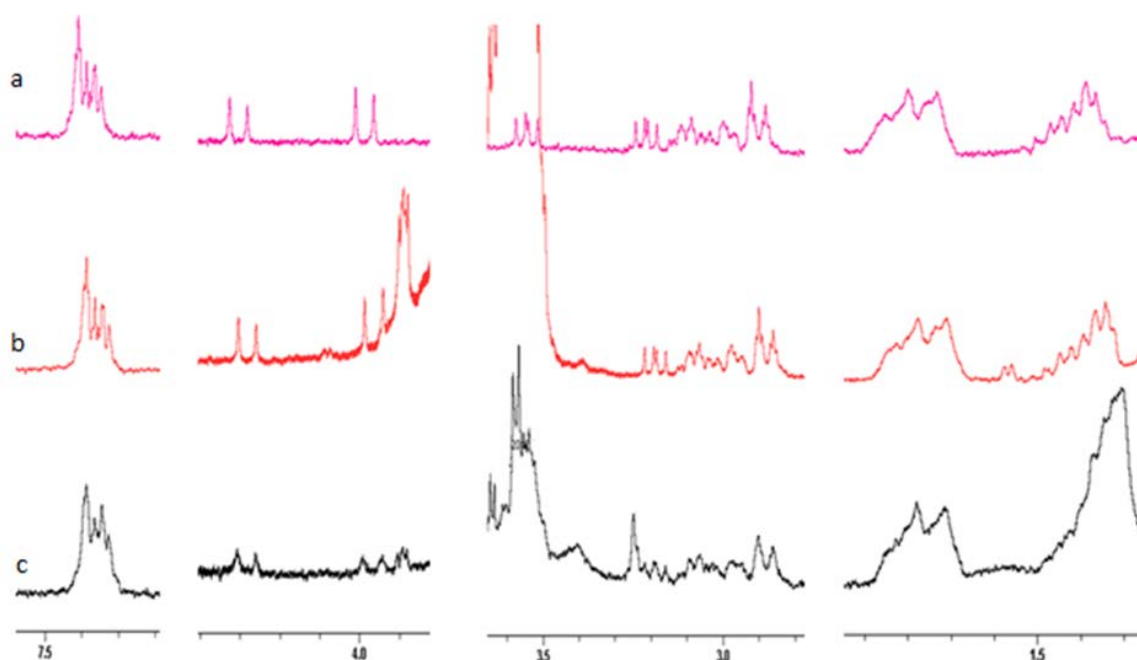
Figura 27 Espectro de 1HRMN para (a) T60; (b) PZQ e (c) MF-PZQ/T60.



O espectro de NLC2 (Figura 28) mostrou efeito de proteção para 3-Ha, b e prótons aromáticos. Em contraste, no espectro de NLC4 Figura 29 foi observada uma desproteção para 3-Ha e prótons aromáticos, enquanto que os prótons 1-Ha, 6-Hb e 7-Hab mostraram efeitos de proteção e os sinais dos 3 prótons Hb desapareceram. A Perda do pico pode ser atribuída à força de interação com os lípidos PZQ sólidos no interior da matriz.

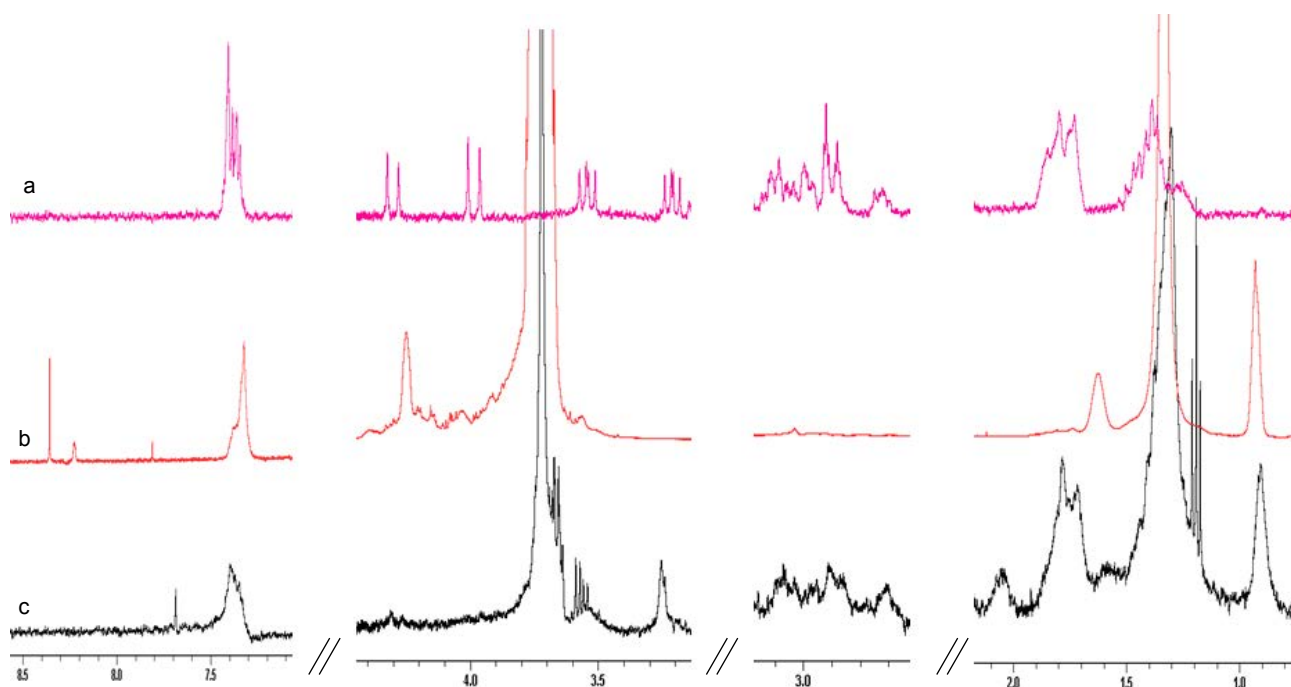
Resultados

Figura 28 Espectro ^1H NMR para (a) PZQ, (b) mistura PZQ/P407, (c) NLC2.



Particularmente, os prótons de ciclo-hexilo revelaram o deslocamento em ambos os NLCs. Este comportamento indica que este grupo foi implicado na interação entre PZQ e o NLCs/PZQ.

Figura 29 Espectro de ^1H NMR para (a) PZQ, (b) MF-PZQ/TW60, (c) NLC4.



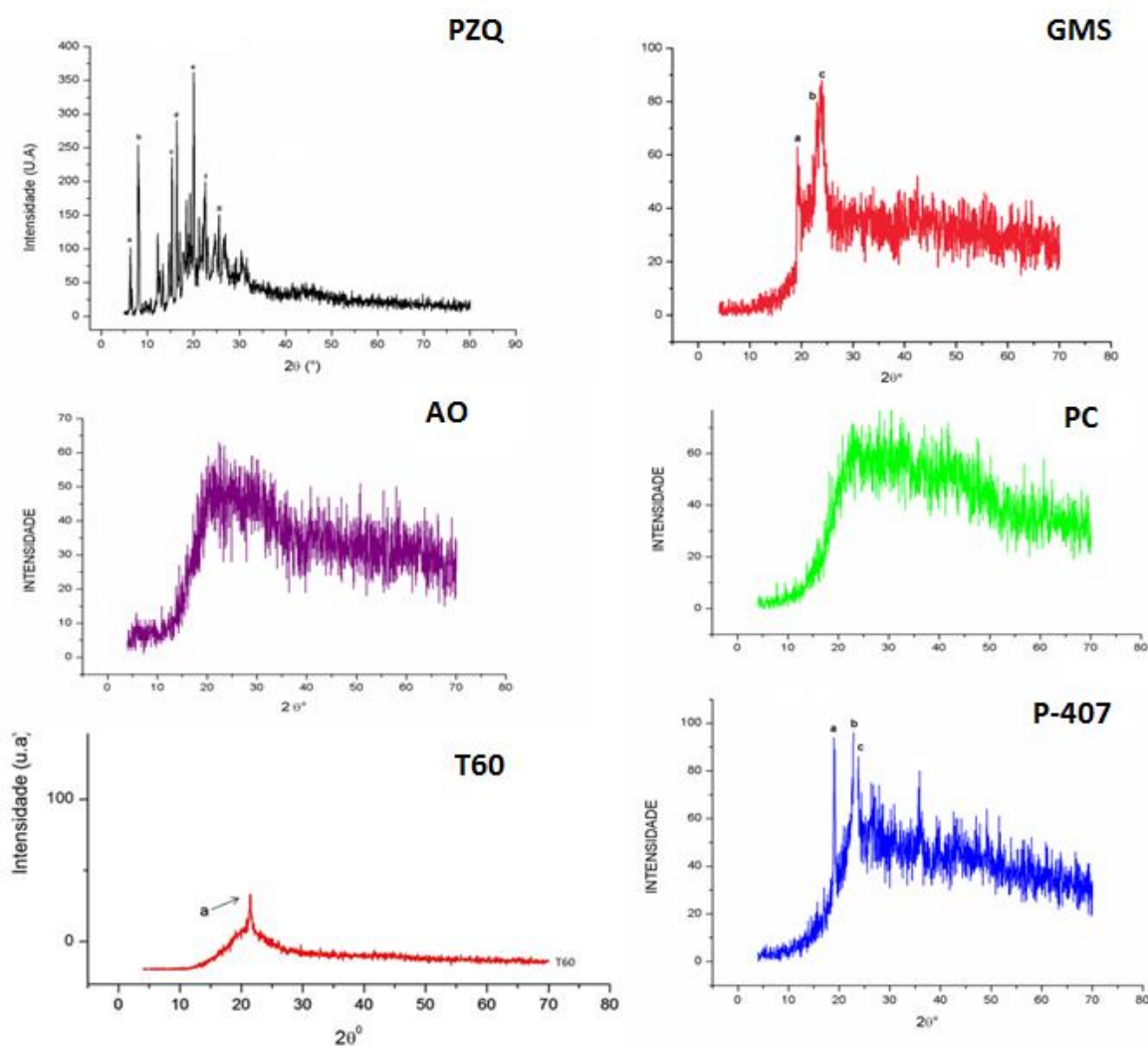
Quando foram comparados os sinais de PZQ, as misturas e PZQ/P-407 PZQ/T60, NLC2 e NLC4, os espectros de NLCs apresentaram picos mais largos. Poder-se explicar por uma diminuição na mobilidade dos prótons do PZQ na matriz sólida.

Resultados

5.7 Difração de Raio-X

A difração de raios X (DRX) é uma técnica importante na caracterização de materiais cristalinos, em que baseia-se na utilização de raios x monocromáticos de comprimento de onda λ e está fundamentada na condição de interferência construtiva estabelecida pela lei de Bragg (GERWARD *et al.*, 2005). A mudança do estado cristalino para o amorfo pode ser avaliada tanto pelos pontos de fusão quanto pela intensidade dos picos (CHAUD *et al.*, 2010).

Figura 30 Difratograma dos componentes utilizados no preparo das SLNs e dos NLCs, em que PZQ (preto), GMS (rosa), AO (roxo), PC (verde), P-407 (azul) e T60 (vermelho).



A Figura 30 ilustra o difratograma de raios x dos componentes utilizados no preparo das SLNs e NLCs, observa-se que o PZQ (preto) apresenta diversos picos, sendo $6,53^\circ$ (a), $7,91^\circ$ (b), $15,02^\circ$ (c), $16,33^\circ$ (d), $20,07^\circ$ (e), $22,48^\circ$ (f) e

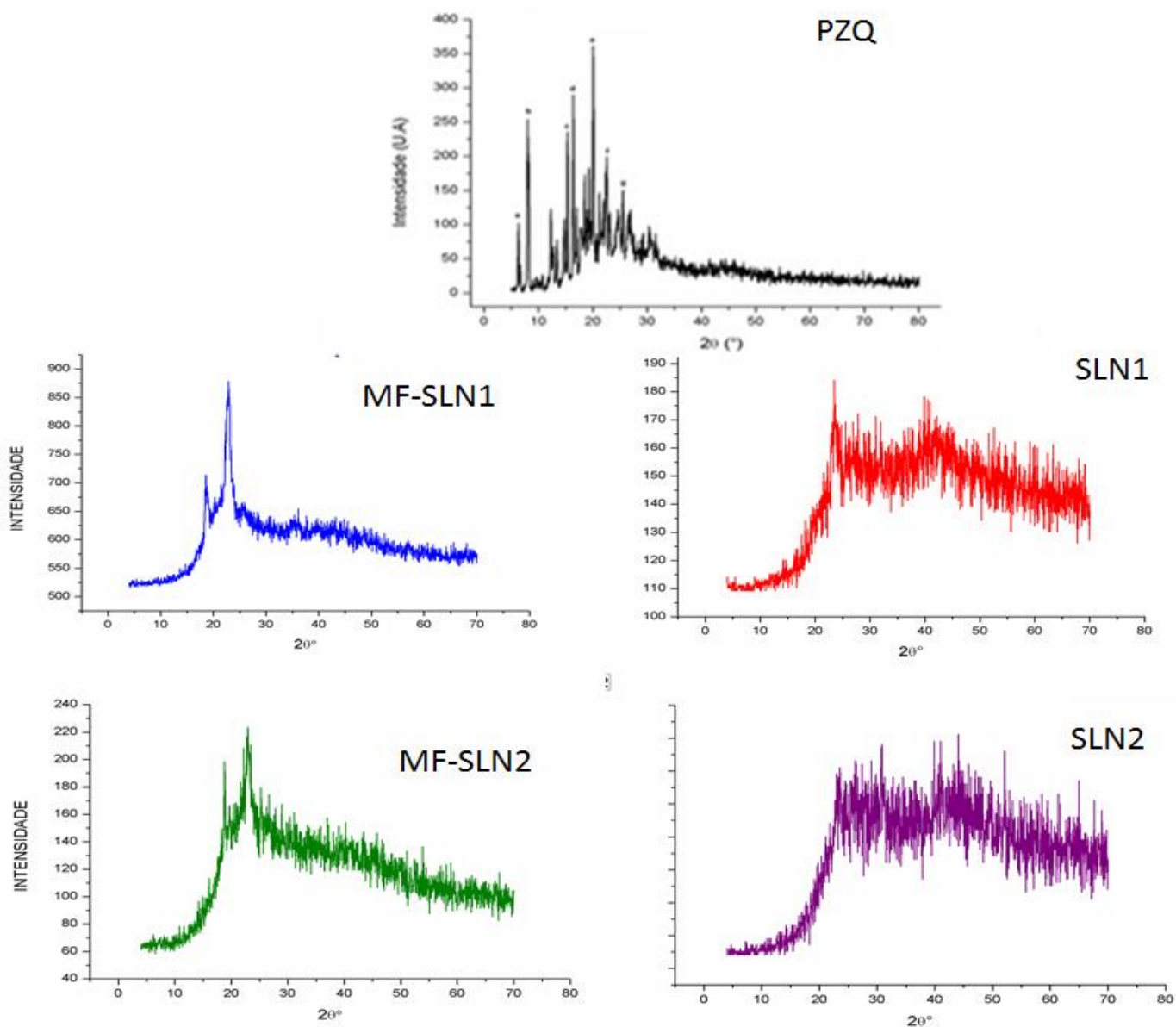
Resultados

25,06°(g) (2 θ), GMS (rosa) apresenta os picos em 19,10° (a), 23,15° (b) e 23,96° (c) (2 θ), P-407 (azul) apresenta picos em 19,10° e 23,43° (2 θ) e T60 (vermelho) apresenta pico característico em 21,53° (2 θ), tais picos caracterizam a estrutura cristalina de ambas as matérias-primas. De acordo com a literatura, o PZQ é um sólido cristalino que pode ser encontrado em uma mistura racêmica (1:1) na forma enantiomérica sendo R-(-) PZQ e S-(\pm) PZQ. Conforme o sugerido por Liu et al., 2004 o pico do PZQ mais largo e com menores intensidades são referentes a forma (\pm)PZQ e os picos mais estreitos com alta intensidade são pela presença da forma (-)PZQ (LIU *et al.*, 2004). Os demais componentes AO e PC apresentaram halos alargados e pouco intensos representando estruturas amorfas.

Os resultados apresentados na Figura 31 exibem as características das MF-SLN1, MF-SLN2, SLN1 e SLN2 contendo PC/P-407 como sistema tensoativo. A MF-SLN 1 (azul) apresentou dois picos intensos em 18,66° e 22,71° 2(θ) indicando a cristalinidade do material. Com os resultados apresentados, sugerimos que houve um deslocamento dos picos do P-407 (18,08° e 23,43° 2(θ)) e GMS (19,10° e 22,33° 2(θ)) devido a uma sobreposição entre ambos os componentes. Também é possível observar que a MF-SLN1 apresentou a mesma característica cristalina dos materiais isolados (GMS e P-407), o qual reforça a hipótese de sobreposição entre ambos.

Resultados

Figura 31 Difratograma de raio-x das SLNs em que PZQ (preto); MF-SLN 1 (azul); SLN1 (vermelho); MF-SLN2 (verde) e SLN 2(roxo).



Para as SLN 1 (vermelho) é possível observar o desaparecimento do pico de $18,66^\circ$ (2θ) que está presente na MF-SLN1 (azul). As SLN 1 apresentaram dois picos intenso em $23,38^\circ$ (2θ), o qual pode ser atribuído ao picos de GMS ($23,15^\circ 2\theta$) e P-407 ($23,43^\circ 2\theta$) respectivamente.

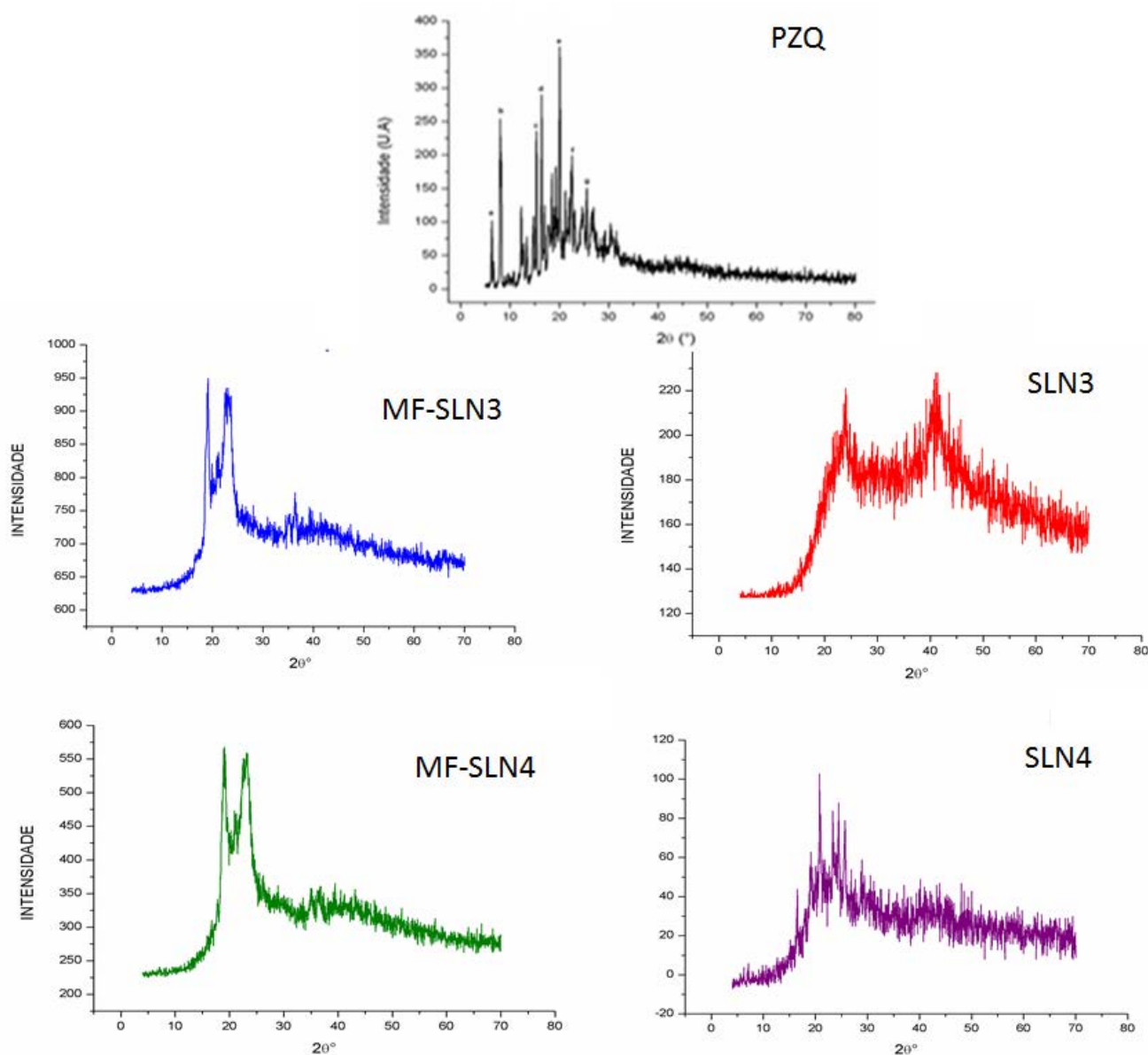
A MF-SLN 2 (verde) apresentou picos intensos em $18,66^\circ$ (a); $22,12^\circ$ (b); $22,92^\circ$ (c) indicando a cristalinidade da mistura. Tais picos podem ser atribuídos ao pico do GMS e P-407 ($18,08^\circ$ e $23,43^\circ$ 2θ) e GMS ($19,10^\circ$ e $22,33^\circ$ 2θ). Os difratogramas de raio-x são semelhantes entre MF-SLN1 e MF-SLN2, assim

Resultados

sugerimos que nas misturas físicas ocorreu uma sobreposição dos picos do GMS e P-407.

As SLN 2 (roxo) apresentaram picos menos intensos em $22,87^\circ$ e $23,618^\circ$ $2(\theta)$ com isso podemos sugerir, que a diminuição da cristalinidade pode indicar a solubilização do PZQ na matriz lipídica.

Figura 32 Difrátograma de raio-x das SLNs em que PZQ (preto); MF-SLN 3 (azul); SLN3 (vermelho); MF-SLN4 (verde) e SLN 4(roxo).



Com os resultados apresentados na Figura 32, foi possível observar que a MF-SLN3 (vermelho) apresentou dois picos intensos, sendo em $19,45^\circ$ e $23,03^\circ$ $2(\theta)$. As SLN3 (vermelho) apresentaram picos alargados e pouco intensos. Os picos próximos a

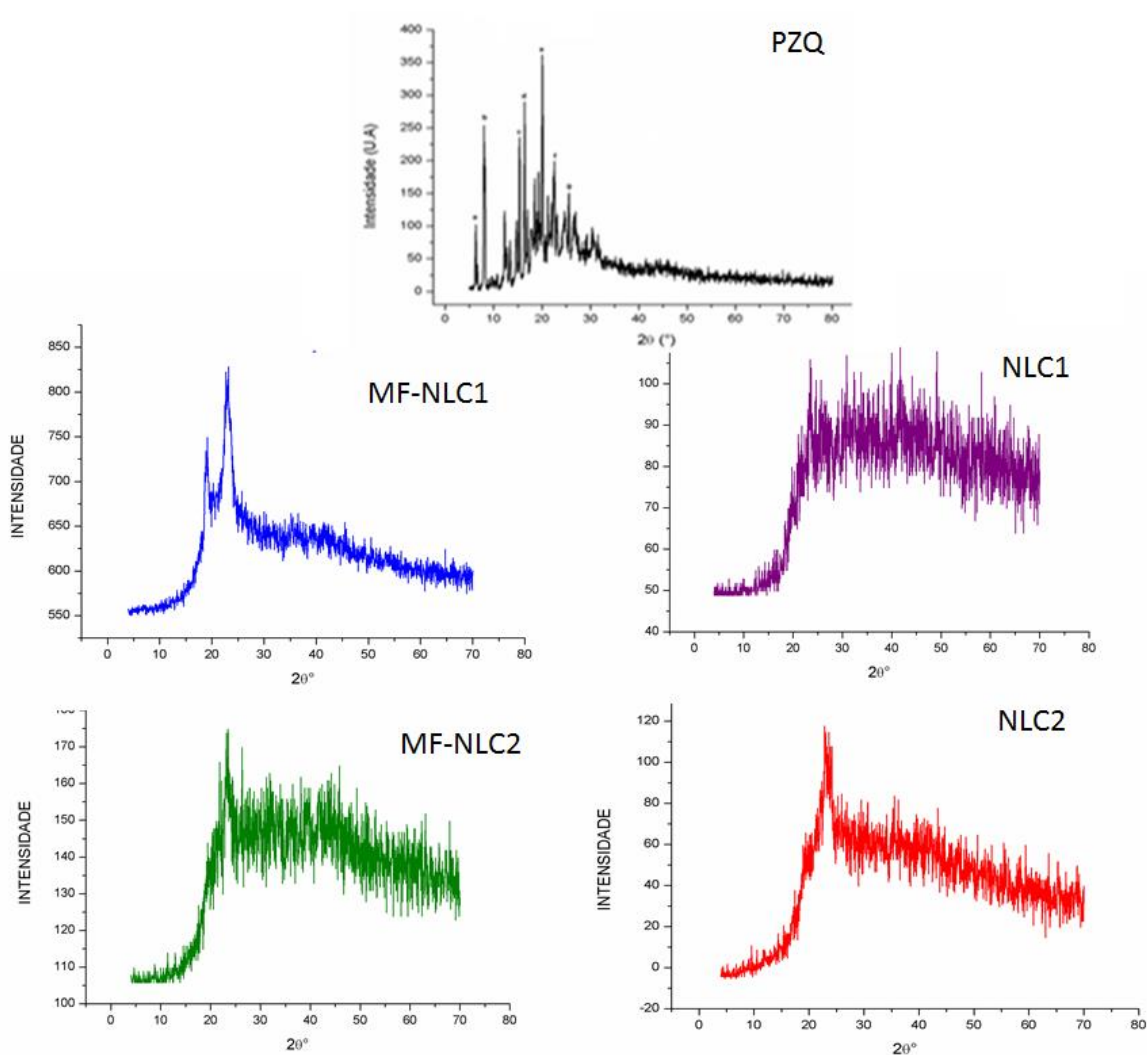
Resultados

$19^\circ 2(\theta)$ não são observados para as SLN3, porém observa-se um pico menos intenso em $24,06 2(\theta)$, o qual sugere-se uma diminuição da cristalinidade e um aumento das regiões amorfas.

A MF-SLN4 (verde) apresentou 3 picos intensos de cristalinidade em $19,18^\circ$; $22,38^\circ$ e $23,08^\circ 2(\theta)$, o qual pode ser atribuído ao GMS ($19,10^\circ$ e $23,15^\circ 2(\theta)$) e T60 ($21,53^\circ 2(\theta)$).

Para as SLN4 vários picos de cristalinidades foram observados, sendo em $16,45^\circ$ (a); $19,18^\circ$ (b); $20,80^\circ$ (c); $23,22^\circ$ (d); $24,61^\circ$ (e); $25,54^\circ$ (f) $2(\theta)$, o qual pode ser atribuídos aos referentes ao PZQ ($16,33^\circ 2(\theta)$); GMS ($19,10^\circ 2(\theta)$); T60 ($21,53^\circ 2(\theta)$); GMS ($23,15^\circ 2(\theta)$); PZQ ($25,06^\circ 2(\theta)$) respectivamente.

Figura 33 Difratogramas de raio-x do PZQ (preto), MF-NLC1 (Azul), NLC1 (vermelho), MF-NLC2 (rosa) e NLCs 2 (verde).



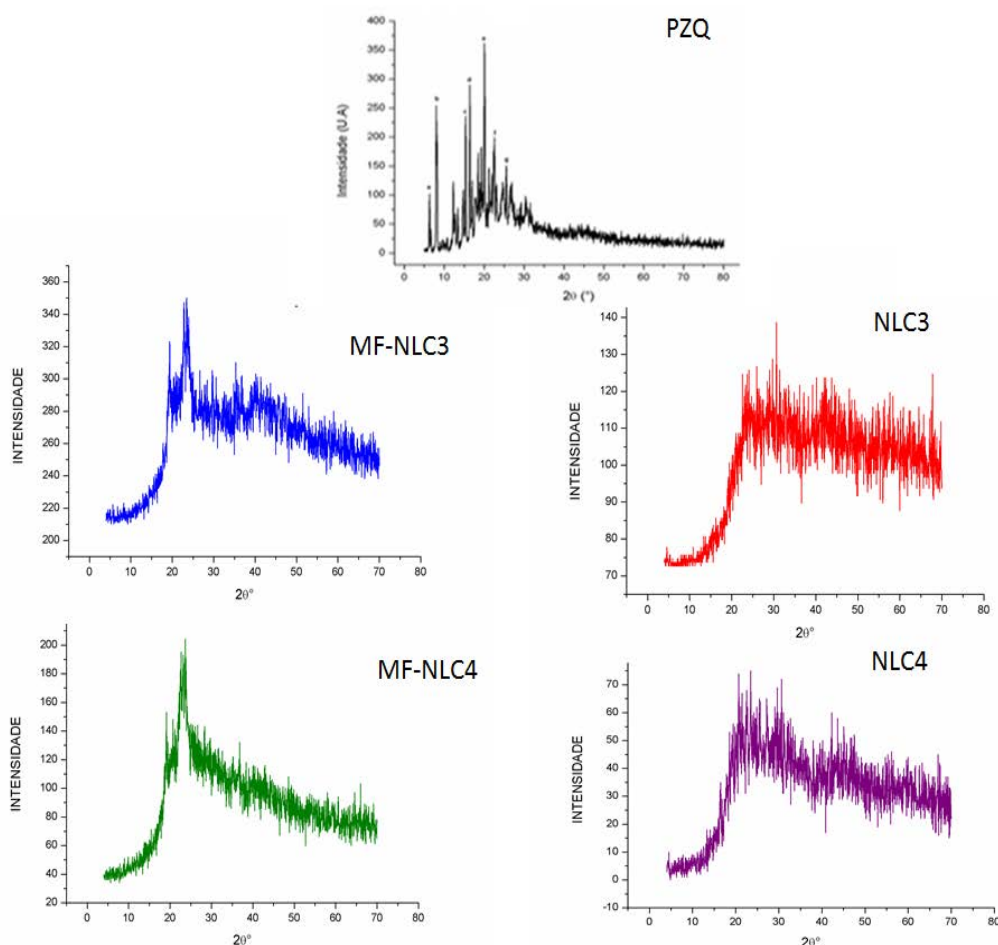
Resultados

A Figura 33 exibe os difratogramas de raio-x do PZQ (preto), MF-NLC 1 (azul), NLC1 (vermelho), MF-NLC2 (verde) e NLC2 (vermelho). Para a MF-NLC1 (azul) é possível observar três picos em $19,19^\circ$, $22,63^\circ$ e $23,10^\circ$ $2(\theta)$ indicando a cristalinidade do sistemas. Para os NLC1 (azul) é possível observar o desaparecimento do primeiro pico. Observou-se também a presença de dois pequenos picos em $21,90^\circ$ e $23,36^\circ$ $2(\theta)$, com isso, podemos sugerir que ocorreu um deslocamento.

A MF-NLC 2 (verde) apresentou três picos de cristalinidade em $22,87^\circ$, $23,63^\circ$ e $24,02^\circ$ $2(\theta)$ que podem ser atribuídos ao GMS ($23,15^\circ 2(\theta)$), P-407 ($23,43^\circ 2(\theta)$). Com o desaparecimento dos picos referentes ao PZQ, podemos sugerir que o mesmo está solubilizado na matriz lipídica do sistema.

Os NLC2 apresentaram picos em $19,09^\circ$, $22,54^\circ$ e $24,01^\circ$ $2(\theta)$, os quais podem ser atribuídos a deslocamentos dos picos referentes ao GMS ($19,10^\circ 2(\theta)$) e PZQ ($22,54^\circ$ e $24,01^\circ 2(\theta)$).

Figura 34 Difratograma de raio-x do PZQ (preto) das MF-NLC3 (azul), MF-NLC4 (verde) e dos NLC3 (vermelho) e NLC4 (roxo).



Resultados

O difratograma de raio-x ilustrado na Figura 34 exibe os resultados do PZQ (preto), MF-NLC3 (azul), NLC3 (vermelho), MF-NLC4 (verde) e NLC4 (roxo).

Os resultados mostraram que todas as misturas físicas apresentaram uma característica mais cristalina com picos mais intensos quando comparadas com as nanopartículas, além disso, apresentaram as mesmas características do GMS, P-407 e T60 isolados, o que sugere que a simples mistura não modifica a estrutura cristalina dos componentes, com isso sugerimos que a formação de partículas pode modificar a estrutura cristalina do sistema devido a uma maior interação entre os componentes utilizados no preparo. Tanto as misturas físicas quanto os sistemas apresentaram um alo amorfo, o que pode ser justificado pela presença do PC, uma vez que o tensoativo está presente em todos os sistemas. Tanto para as SLN2 quanto para as NLC2 foi possível observar a redução da intensidade do pico de cristalinidade característico do PZQ, o mesmo evento foi observado para os NLC4, porém não foi observado para as SLN4. Assim podemos sugerir que o PZQ está solubilizado na matriz de todos os sistemas, exceto para SLN4. Com os resultados apresentados, podemos sugerir que a presença do lipídeo líquido e a combinação dos diferentes tensoativos não interferiu na cristalinidade dos NLCs já que estes apresentaram as mesmas características cristalinas das SLNs.

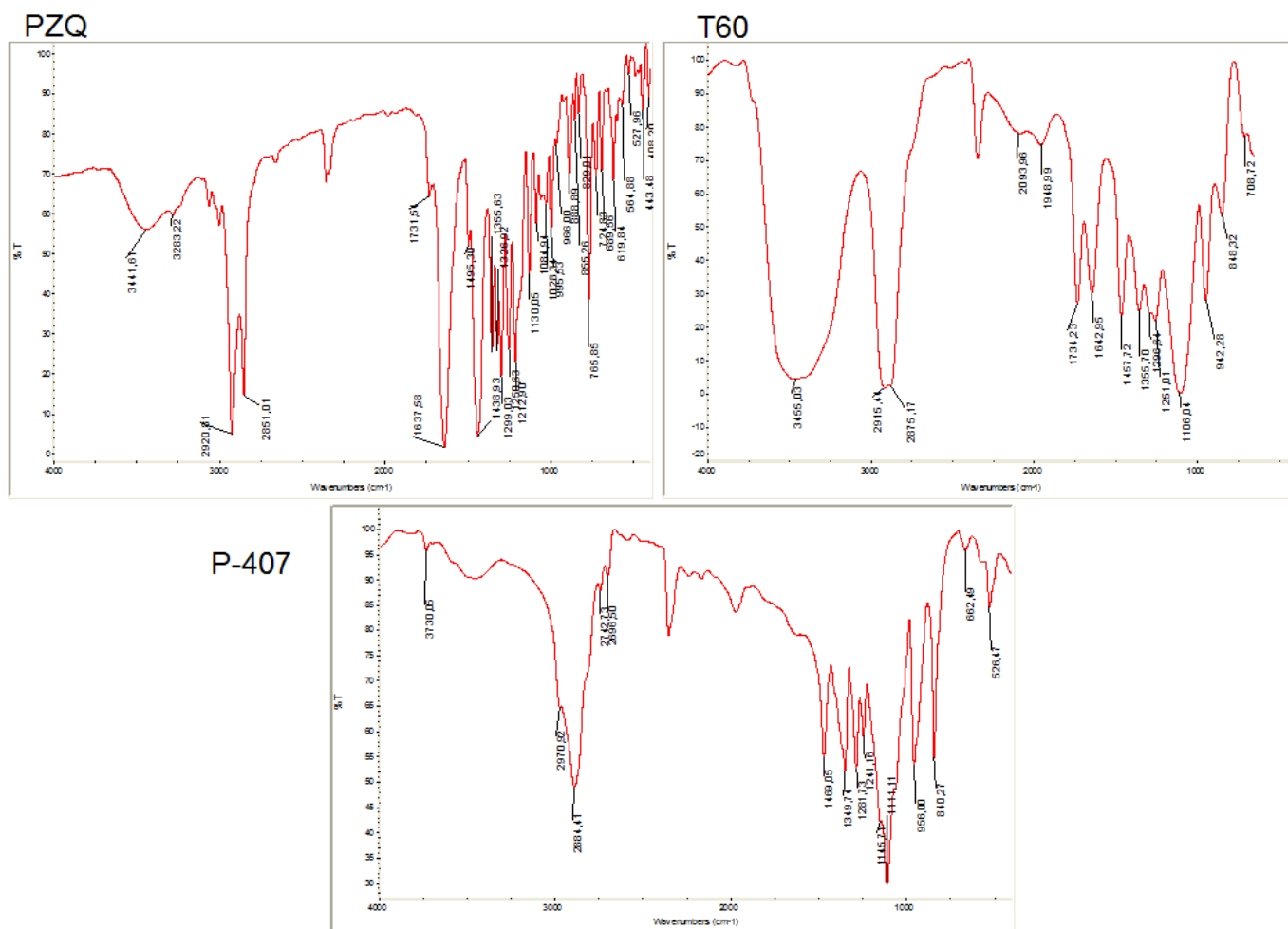
5.8 Espectroscopia da região do infravermelho

A espectroscopia de infravermelho trata-se de uma das mais importantes técnicas utilizadas para identificar compostos químicos orgânicos e inorgânicos, tal identificação está baseada na vibração de átomos de uma molécula (GARNERO *et al.*, 2010; KOLENYAK-SANTOS *et al.*, 2014).

A Figura 35 e Figura 36 exibem os espectros dos componentes utilizados no preparo das SLNs e NLCs.

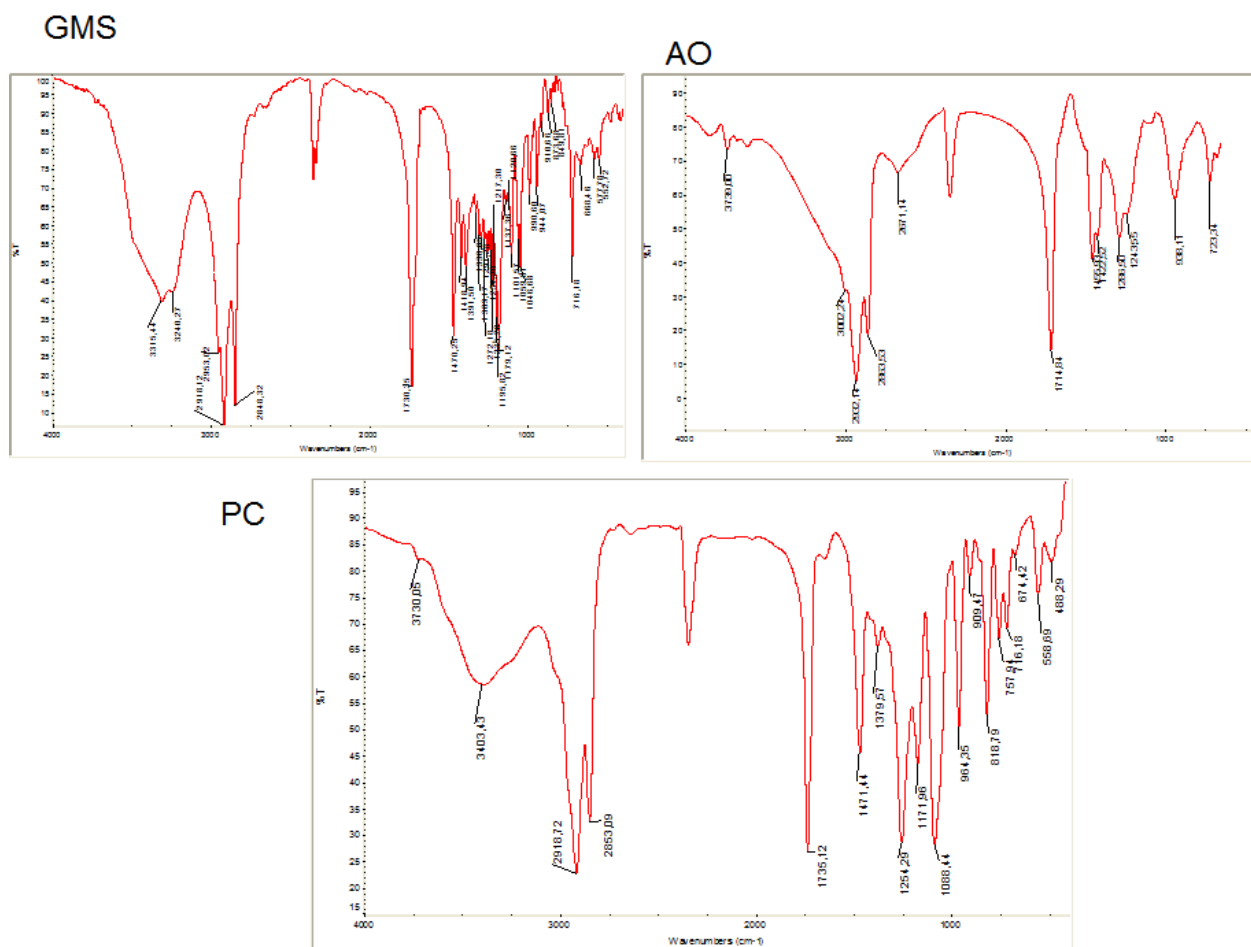
Resultados

Figura 35 Espectros de absorção na região do infravermelho PZQ, T60 e P-407.



Resultados

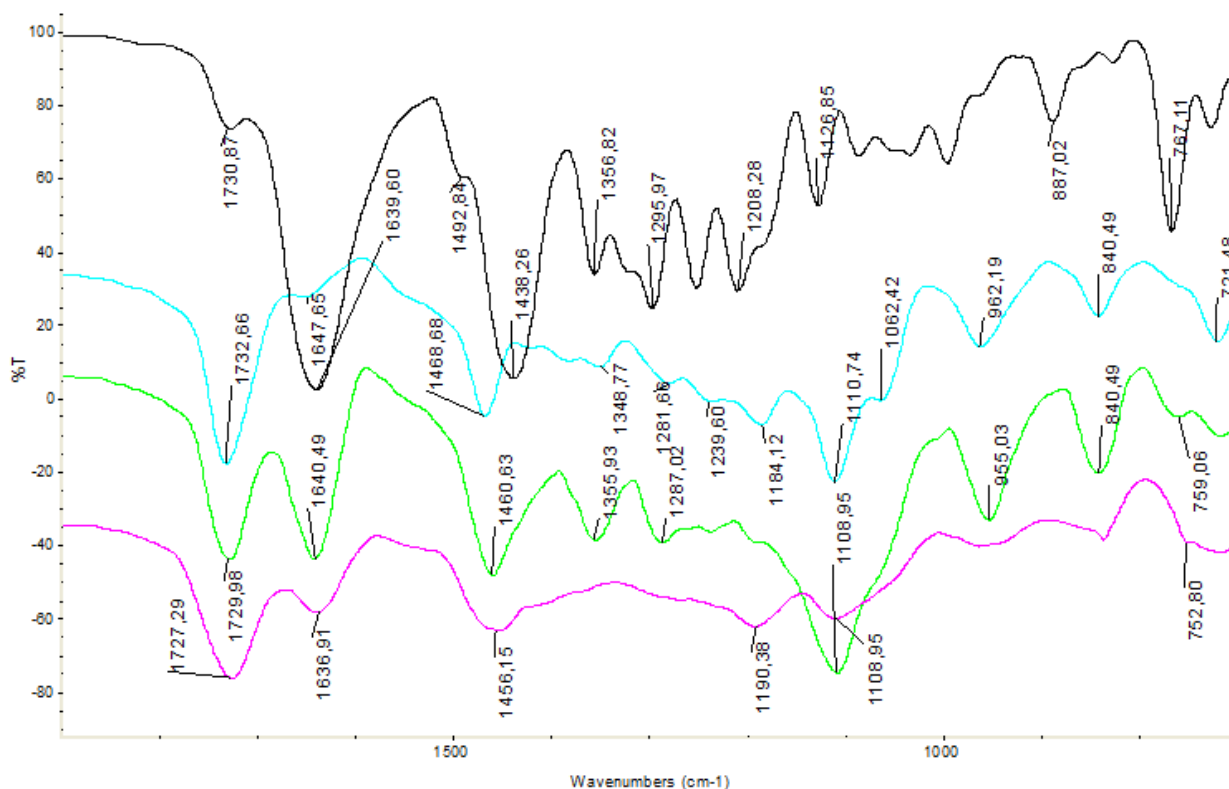
Figura 36 Espectro de absorção na região do infravermelho para GMS, AO, PC



A Figura 37 mostra os espectros de infravermelho para PZQ (preto), NLC1(azul), NLC2 (verde) e MF-NLC2 (rosa).

Resultados

Figura 37 Espectro de absorção na região do infravermelho para o PZQ (preto), NLC1 (azul), NLC2 (verde) e MF-NLC2 (rosa).



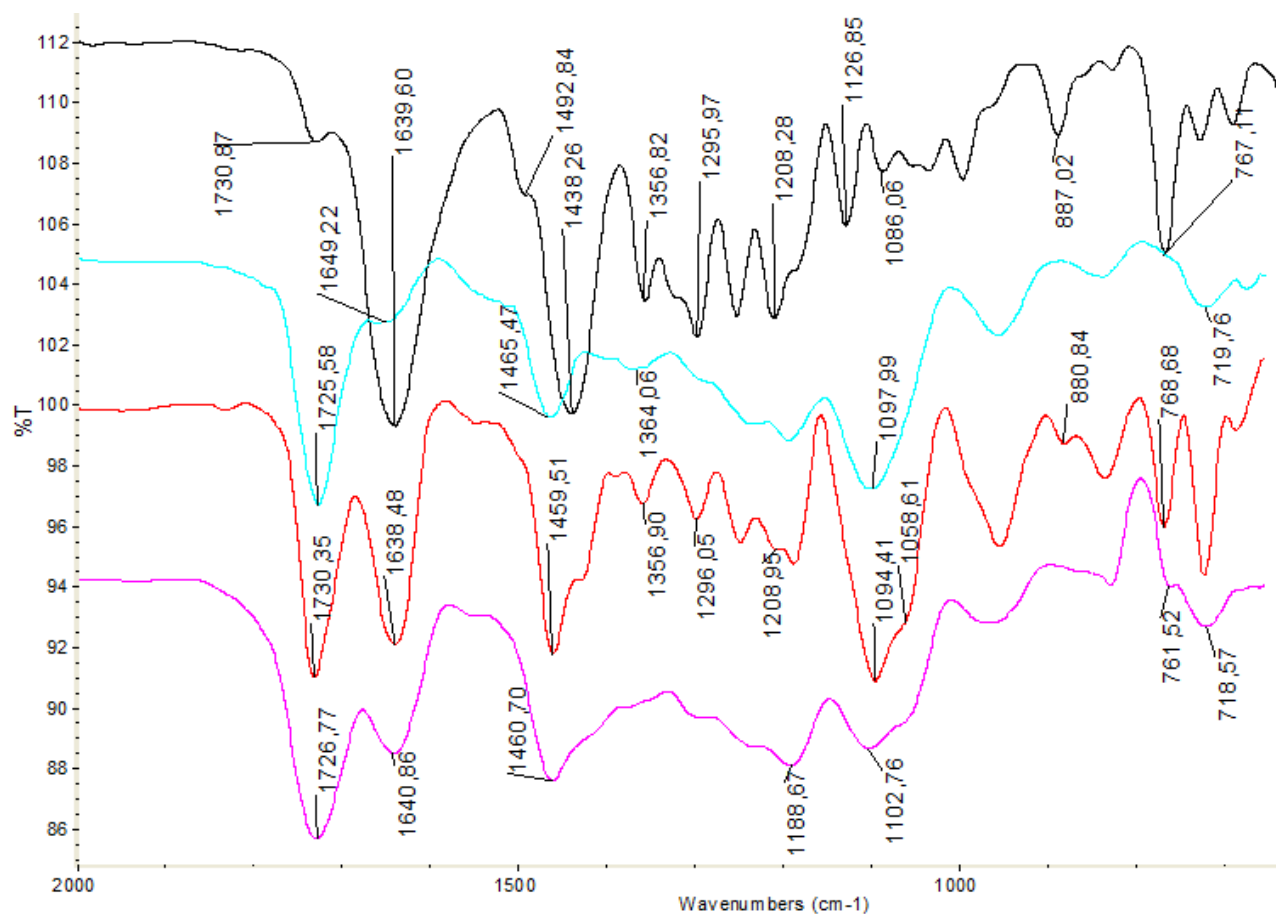
O espectro de absorção no infravermelho mostrou as características do PZQ (preto) em que observa-se os sinais em 1639,60; 1492,84; 1438,26 cm^{-1} que são atribuídos ao anel aromático, o sinal em 1126,86 cm^{-1} que pode ser atribuído a ligação C-N e outro sinal em 767,11 cm^{-1} atribuído ao grupamento pirazino.

Nos NLC2 observa-se o desaparecimento do sinal em 1062,42 cm^{-1} presente no NLC1, além disso, os sinais do PZQ deslocaram para frequências mais baixas de 1126,85 cm^{-1} para 1108,95 cm^{-1} e outro para 767,11 cm^{-1} para 759,06 cm^{-1} . Tal interação pode ser confirmada pelo RMN 1H em que observa-se o desaparecimento dos sinais de 1-H_b, 6-H_b e 7-H_{ab}, que estão na região pirazino da estrutura química do PZQ, assim, sugerimos que ocorra uma interação do grupamento pirazino com a matriz lipídica do sistema

A Figura 38 mostra os espectros de infravermelho para PZQ, NLC3, NLC4 e MF-NLC4.

Resultados

Figura 38 Espectro de absorção na região do infravermelho para PZQ (preto), NLC3(cinza), NLC4 (laranja) e MF-NLC4 (marrom).

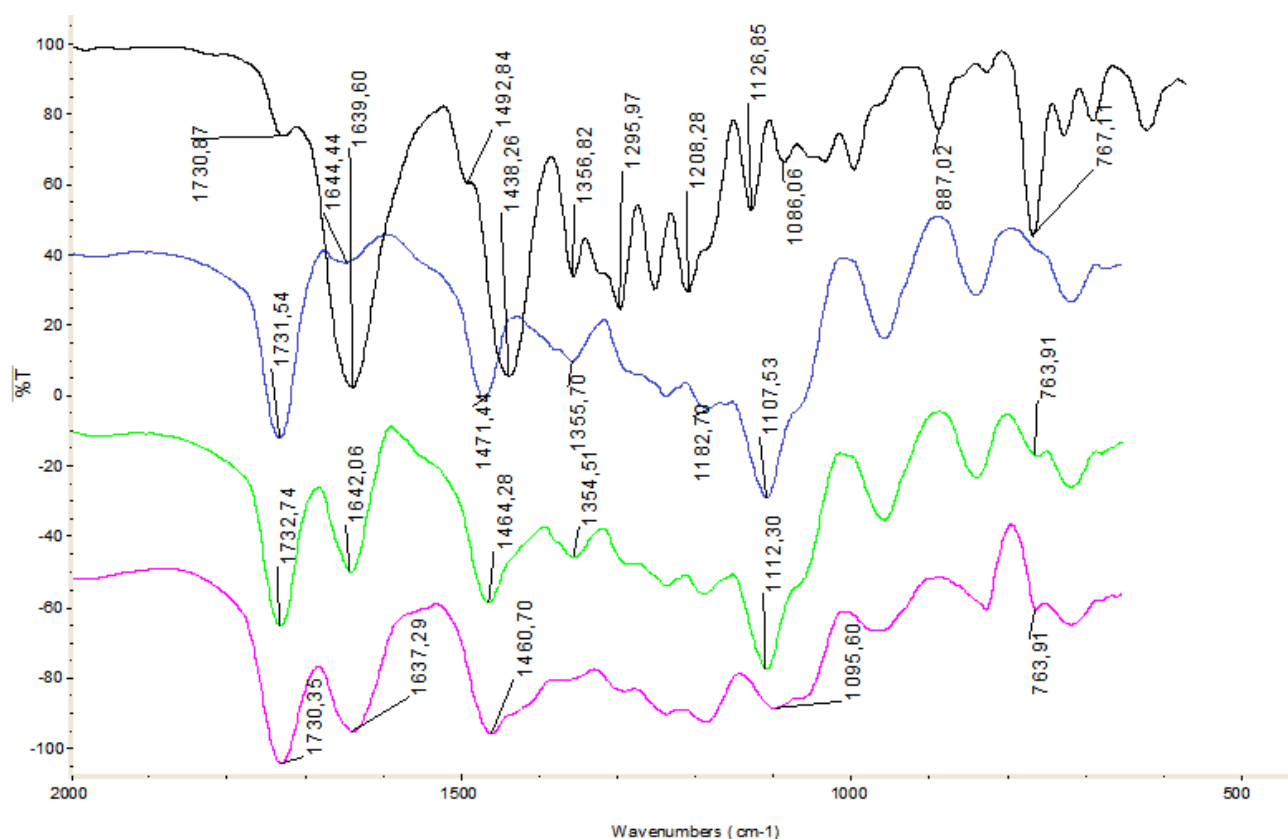


A Figura 38 apresenta os espectros de infravermelho para o PZQ (preto), NLC3 (azul), MF-NLC4 (vermelho) e NLC4 (rosa). O espectro de absorção no infravermelho mostrou as características do PZQ em que observa-se os sinais em 1639,60; 1492,84; 1438,26 cm^{-1} que são atribuídos ao anel aromático, o sinal em 1126,86 cm^{-1} que pode ser atribuído a ligação C-N.

Nos NLC4 observa-se o desaparecimento dos sinais do PZQ em 1356,82 cm^{-1} , 1295,97 cm^{-1} e 1208,28 cm^{-1} , que podem ser atribuídos a deformação axial de C-N, além disso, os sinais do PZQ deslocaram para frequências mais baixas de 1126,85 cm^{-1} para 1094,41 cm^{-1} e outro para 767,11 cm^{-1} para 761,52 cm^{-1} . Os resultados mostraram um comportamento semelhante quando comparado com os espectros apresentados na Figura 37, uma vez que o espectro para os NLC4 e MF-NLC4 apresentaram uma diminuição na intensidade da banda correspondente C-N.

Resultados

Figura 39 Espectro de absorção na região do infravermelho para PZQ (preto), SLN1(azul), MF-SLN2 (verde) e SLN2 (rosa).



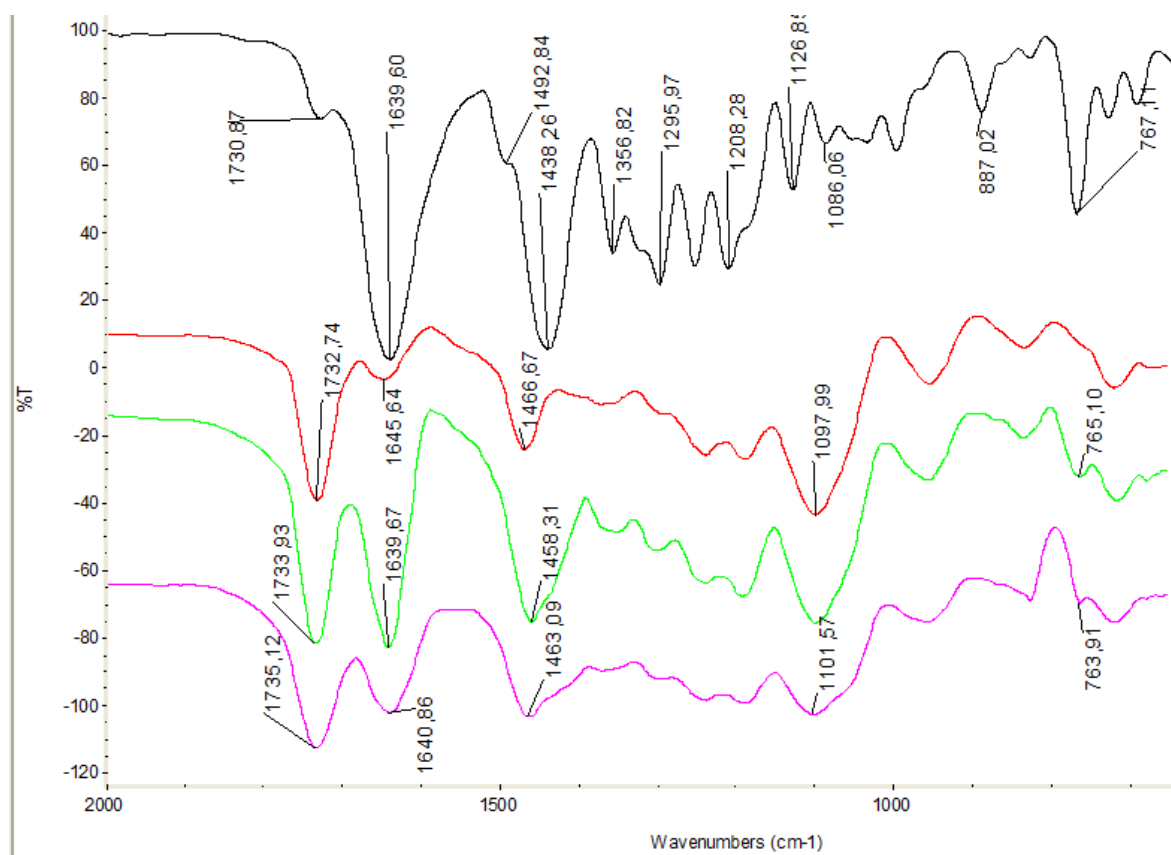
O espectro de absorção no infravermelho mostrou as características do PZQ (preto) em que observa-se os sinais em 1639,60; 1492,84; 1438,26 cm⁻¹ que são atribuídos ao anel aromático, o sinal em 1126,86 cm⁻¹ que pode ser atribuído a ligação C-N.

Nas SLN2 observa-se o desaparecimento dos sinais do PZQ em 1356,82 cm⁻¹, 1295,97 cm⁻¹ e 1208,28 cm⁻¹, que podem ser atribuídos a deformação axial de C-N. Os resultados mostraram um comportamento semelhante quando comparado com os espectros apresentados na Figura 37.

A Figura 40 mostra os espectros de infravermelho para PZQ (preto), SLN3 (vermelho), SLN4 (verde) e MF-SLN4 (rosa).

Resultados

Figura 40 Espectro de absorção na região do infravermelho para PZQ (preto), SLN3 (vermelho), MF-SLN4 (verde) e SLN4 (rosa).



O espectro de absorção no infravermelho mostrou as características do PZQ (preto) em que observa-se os sinais em 1639,60; 1492,84; 1438,26 cm^{-1} que são atribuídos ao anel aromático, o sinal em 1126,86 cm^{-1} que pode ser atribuído a ligação C-N.

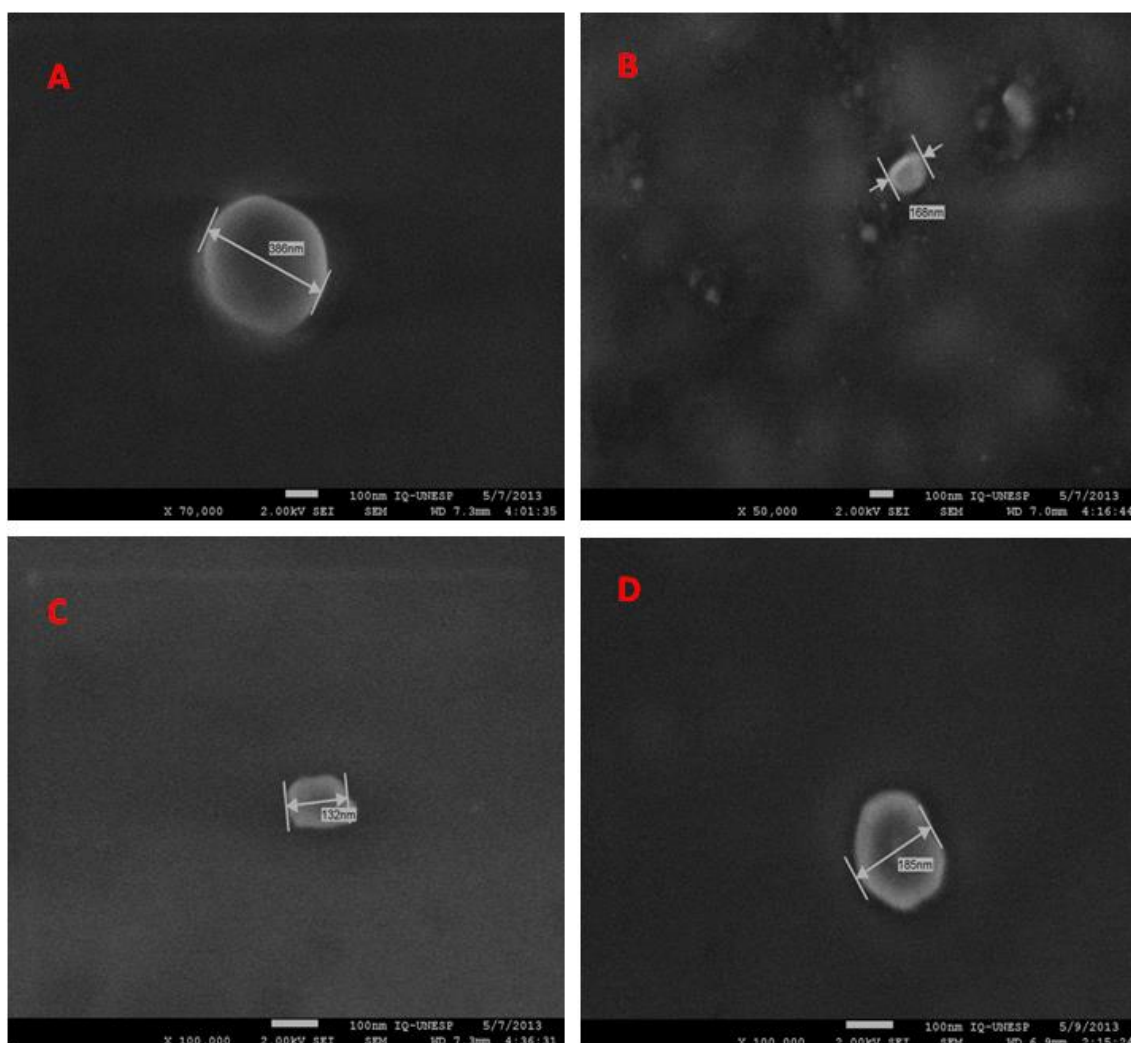
Nas SLN4 observa-se a diminuição da intensidade dos sinais do PZQ em 1356,82 cm^{-1} , 1295,97 cm^{-1} e 1208,28 cm^{-1} , que podem ser atribuídos a deformação axial de C-N. Os resultados mostraram um comportamento semelhante quando comparado com os espectros apresentados na Figura 40.

Com os resultados apresentados, podemos sugerir que o PZQ está interagindo com a matriz lipídica de ambos os sistemas (SLNs e NLCs), observa-se também que a presença do lipídeo líquido e as diferentes combinações de tensoativos (PC/P407 e PCT60), não modificaram a região de interação do PZQ com a matriz lipídica.

5.9 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

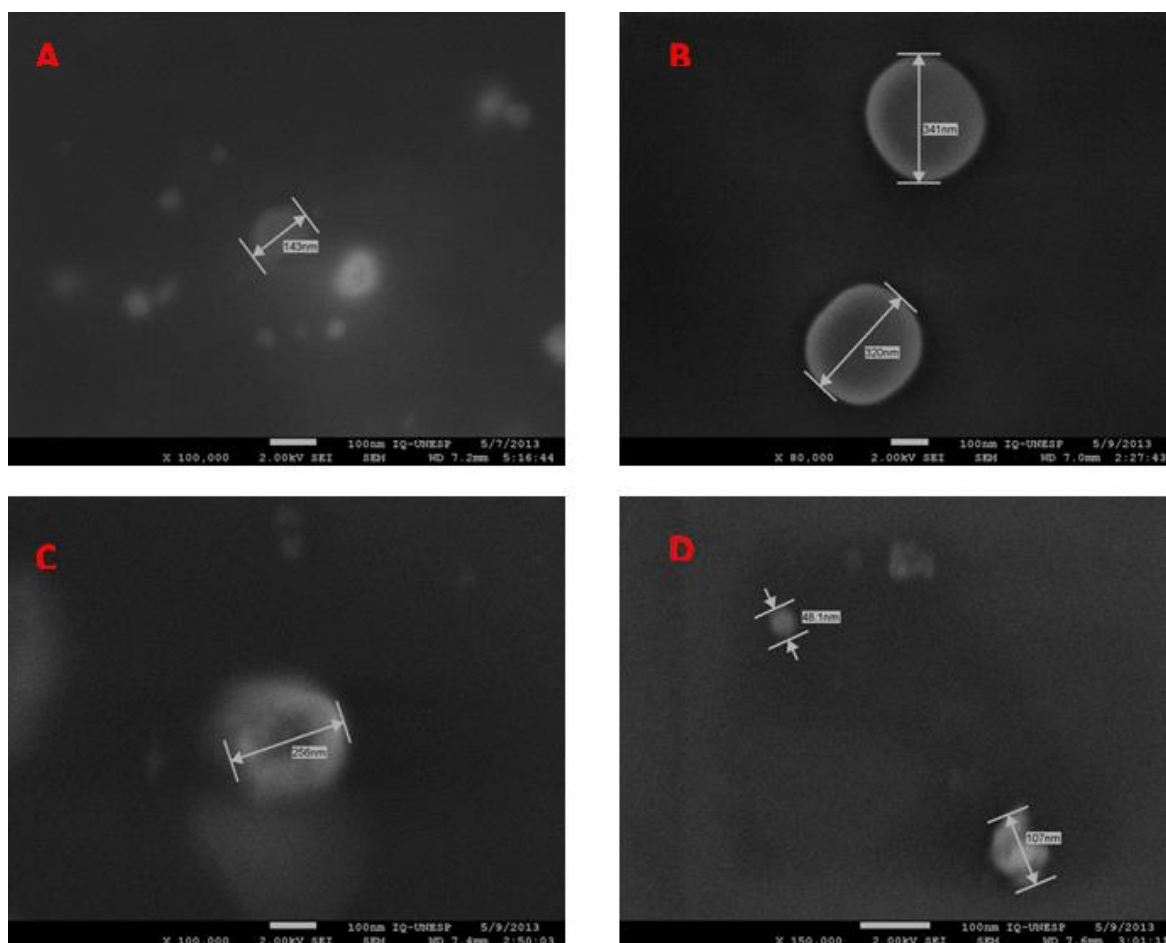
Conforme ilustrado na Figura 41 todas as SLNs apresentaram uma morfologia esférica e um tamanho em escala nanométrica, tais resultados condizem com os descritos na literatura (SHAH *et al.*, 2007). Como é possível observar nas imagens as SLN1 apresentaram um maior diâmetro médio quando comparado com as SLN2 que são sistemas que contem o PZQ. A adição do PZQ levou a diminuição do diâmetro médio o que confirma os dados apresentados na Tabela 3. As imagens apresentadas pela Figura 41 para as SLN3 e SLN4 também confirmam o que foi apresentado na Tabela 3, para esses sistemas contendo PC/T60 como sistema tensoativo a adição do PZQ levou a um aumento no diâmetro médio das partículas, o que sugere que para esses sistemas a combinação de tensoativos pode aumentar o diâmetro das partículas possivelmente devido a uma desorganização da matriz lipídica.

Figura 41 Morfologia das SLN analisadas por microscopia eletrônica de varredura, em que SLN1 (a); SLN (b); SLN3 (c); SLN4 (d).



Resultados

Figura 42 Morfologia das NLCs analisadas por microscopia eletrônica de varredura, em que NLC1 (a); NLC2 (b); NLC3 (c); NLC4 (d).



Conforme ilustrado na Figura 42 os NLC semelhante as SLNs apresentaram uma morfologia esférica e um tamanho em escala nanométrico, tais dados estão em conformidade com os descritos pela literatura.

Tanto para as SLN quanto para os NLCs, é possível observar uma grande variação no diâmetro médio das partículas, tais resultados confirmam a heterogeneidade das partículas, sendo assim, condizem com os dados de PDI que foram apresentados na Tabela 3.

5.10 Avaliação do perfil de segurança *in vitro*

O perfil de segurança dos NLCs foi avaliado através de ensaios de hemólises dos enterócitos e ensaio de citotoxicidade *in vitro*.

5.10.1 Hemolises

O perfil de segurança foi avaliado através da hemólise e em ensaios de citotoxicidade *in vitro*. Membranas de eritrócitos têm sido estudadas desde que as células podem ser obtidas por meio de punção venosa e as membranas são facilmente isoladas por meio de centrifugação. Assim, os eritrócitos são um bom modelo para a interação fármaco-membrana, fornecendo informações sobre as mudanças na composição lipídica, enzimas ou outras proteínas de membrana (Malheiros et al., 2000; Huang et al., 2008).

A Tabela 29 mostra os resultados do teste de hemólise. De acordo com os resultados ocasionados PZQ livres causados $6,8 \pm 1,2\%$ da lise da membrana de eritrócitos. Observou-se que, sem PZQ NLC - NLC1 e NLC3 - lise causada de $1,12 \pm 0,5\%$ e $1,89 \pm 0,77\%$ na membrana dos eritrócitos, respectivamente. Também é possível observar que o encapsulamento de PZQ em NLC - NLC2 e NLC4 ($3,42 \pm 1,54\%$ e $3,54 \pm 2,23\%$, respectivamente) reduziu a lise de eritrócitos, em relação ao fármaco livre. Assim, todos os sistemas apresentaram hemólise de eritrócitos menor que o PZQ. Triton X-100, um conhecido agente hemolítica atuou como um controle positivo no estudo e mostrou 100% de hemólise de eritrócitos, validando assim a experiência.

Os resultados gerais do estudo indicam que o tratamento com os NLCs apresentaram uma menor atividade hemolítica quando comparado ao PZQ livre.

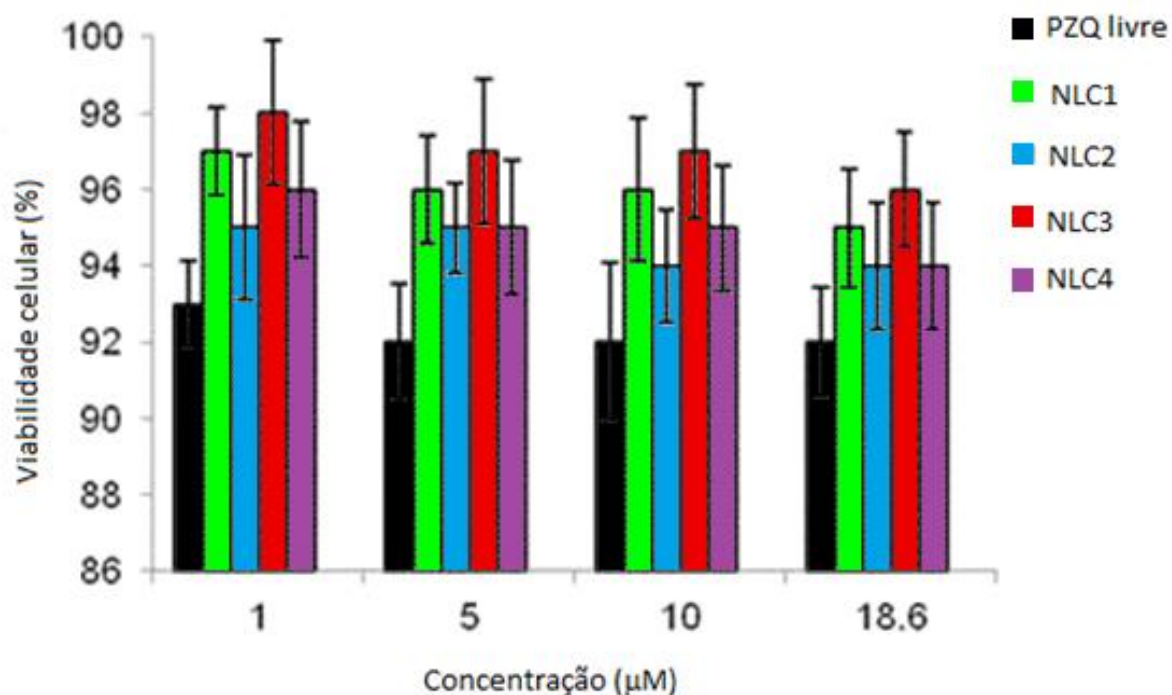
Resultados

Tabela 29. Ensaio de hemolises

Amostras	Lises (%)
PZQ livre	6.08±1.2%
NLC1	1.12±0.5%
NLC2	3.42±1.54%
NLC3	1.89±0.77%
NLC4	3.54±2.23%
Triton X-100	100±1.23%

A citotoxicidade *in vitro* foi realizada utilizando macrófagos de rato J-774 como o modelo celular. Os dados foram exibidos em % de viabilidade celular.

Figura 43 Viabilidade celular para PZQ livre, NLC1 e NLC3 e NLC2 e NLC4.



Resultados da viabilidade celular mostrou que o PZQ livre não foi capaz de matar células de macrófagos normais, exibiram viabilidade celular superior que 93%. Além disso, o NLC sem PZQ também não apresentou atividade toxicidade, nem quando o fármaco foi incorporado nas formulações (NLC2 e NLC4). Os resultados indicam a

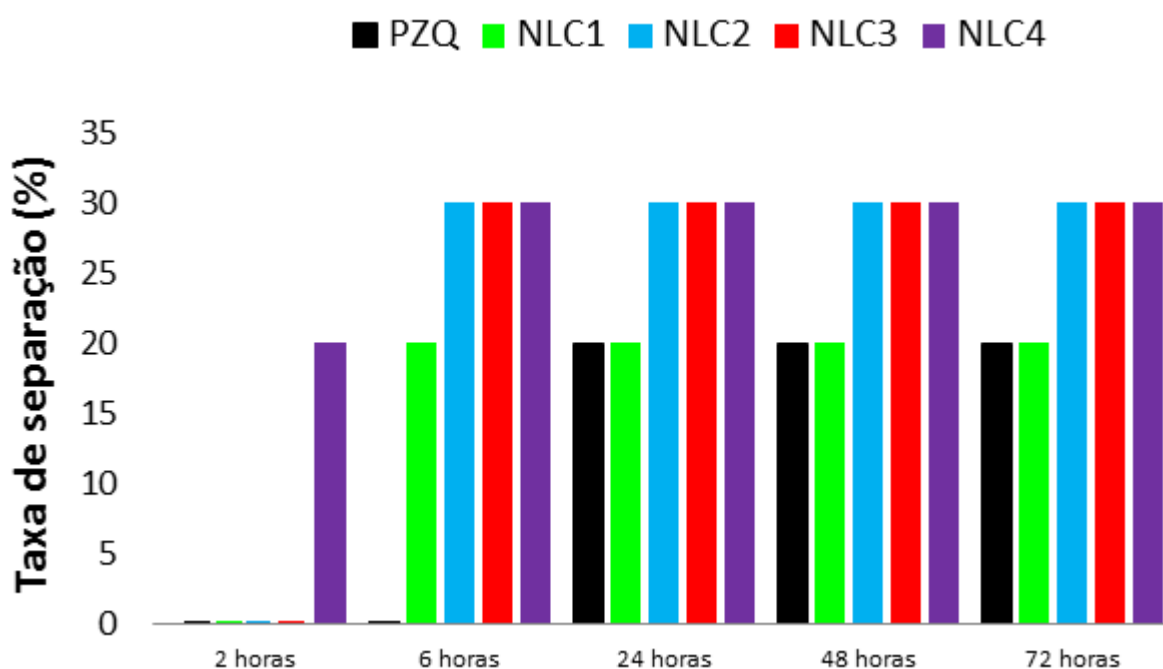
Resultados

segurança e biocompatibilidade das formulações e PZQ livres para as células eucarióticas.

5.10.2 Efeito do PZQ encapsulado nos NLC na atividade *in vitro* contra *S. mansoni*

Para o desenvolvimento de novos fármacos/formulações, aspectos biofarmacotécnicos devem ser conhecidos (BALDRICK 2000; CUSTODIO *et al.*, 2008). A triagem por meio de ensaios *in vitro* torna-se uma importante base, na busca de uma nova substância, que possa ser posteriormente utilizada em ensaios pré-clínicos. Além disso, ensaios *in vitro* são capazes de fornecer diversos parâmetros iniciais, para abordagens posteriores, visando à avaliação e viabilidade de alvos terapêuticos (Dias *et al.*, 2009, Ginai *et al.*, 2013) Com o objetivo de verificar o efeito *in vitro* do PZQ incorporado aos NLC, sobre vermes adultos de *S. mansoni*, alguns parâmetros como, separação dos casais, oviposição alterações tegumentares e mortalidade dos vermes foram avaliados neste estudo por um período de até 72 horas conforme descrito nas Figura 44, 45 e Tabela 30.

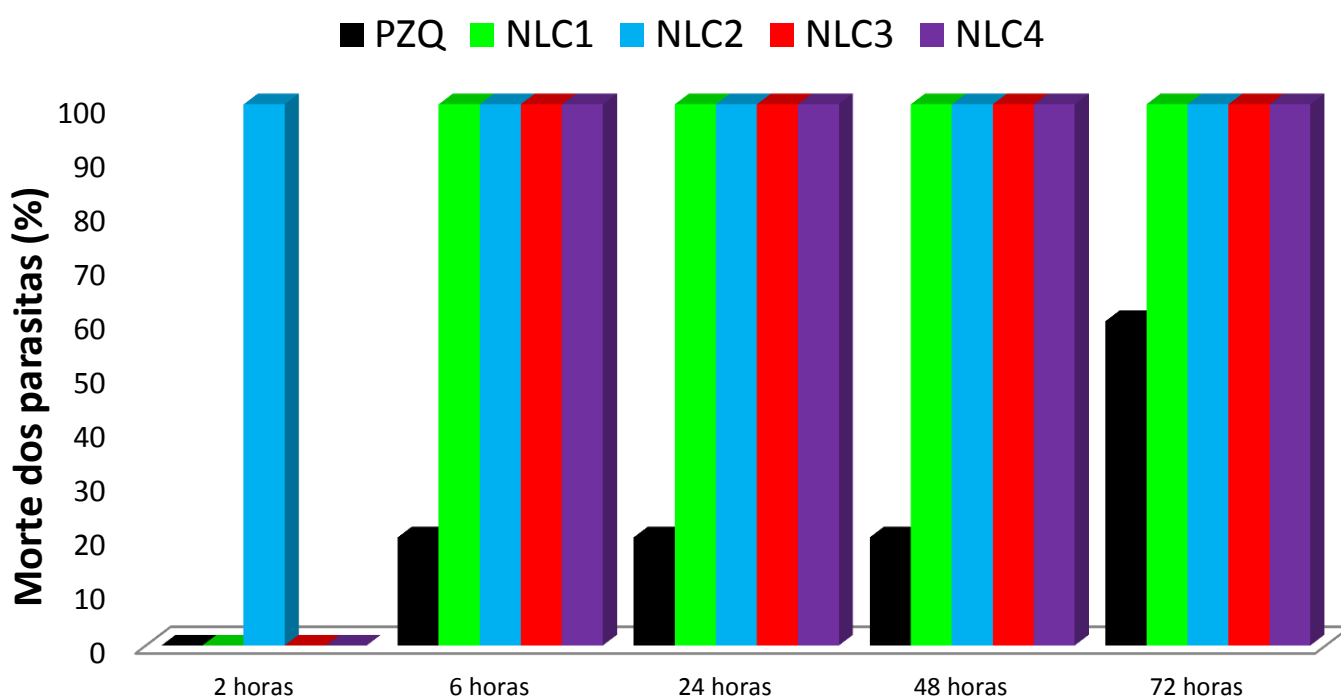
Figura 44 Efeito do PZQ e dos NLCs na atividade *In vitro* na separação dos casais de *S. mansoni*. Avaliação realizada no período de 72horas.



Resultados

Conforme ilustrado na Figura 44, os NLC4 foram capazes de separar 20% dos casais em 2 horas após a exposição dos parasitas ao sistema. Todos os NLCs exceto NLC1 provocaram separação de 30% dos casais 6 horas após a exposição, o PZQ livre apresentou atividade apenas 24 horas após a exposição dos parasitas ao fármaco, demonstrado que os sistemas foram mais efetivos na separação dos casais quando comparado ao PZQ livre devido ao menor tempo necessário para promover efeito.

Figura 45 Efeito do PZQ e dos NLCs na atividade *In vitro* contra vermes adultos de *S. mansoni*. Avaliação realizada no período de 72 horas.



A

Figura 45 exhibe os resultados para a morte dos parasitas, em que observa-se que os NLC2 foram mais efetivos que os demais sistemas em relação ao tempo necessário para provocar a morte dos parasitas (2 horas após a exposição dos parasitas ao sistema), os demais sistemas foram capazes de produzir 100% de morte após 6 horas de contato com os parasitas, o mesmo não ocorreu com PZQ que após 72 horas provocaram apenas 60% de morte.

Todos os sistemas apresentaram atividade *in vitro* e é possível observar que os sistemas sem PZQ apresentaram atividade na separação dos casais e morte dos parasitas, resultados semelhantes foram descritos por Mourão *et al.*, 2005 que demonstraram que lipossomas sem PZQ apresentaram atividade *in vitro* contra *S.*

Resultados

mansoni. Os autores sugerem que a composição lipídica dos lipossomas poderiam ter modificado a composição do tegumento e alterar a sua fluidez. Sugestão semelhante foi descrito por Brouwers *et al.*, 1998 que em seu trabalho informaram que o *S. mansoni* é capaz captar lipídeos e metaboliza-lo do meio externo por um processo ativo de absorção. Assim, nós sugerimos que os sistemas (lipídicos) podem ter sido absorvidos pelo *S. mansoni*, e provocaram uma alteração do tegumento.

Tabela 30 Efeito do PZQ incorporado nos NLCs na atividade in vitro contra os vermes adultos de *S. mansoni*.

Amostras ($\mu\text{g/mL}$)	Período de incubação (h)	Oviposição	Alterações nos tegumentos dos parasitas (72h)
Controle (RPMI-1640)	2	+	N.O
	6	+	N.O
	24	+	N.O
	48	+	N.O
	72	+	N.O
PZQ ($25 \mu\text{g mL}^{-1}$)	2	-	O
	6	-	O
	24	-	O
	48	-	O
	72	-	O
NLC1	2	-	O
	6	-	O
	24	-	O
	48	-	O
	72	-	O
NLC2 ($25 \mu\text{g mL}^{-1}$)	2	-	O
	6	-	O
	24	-	O
	48	-	O
	72	-	O
NLC3	2	-	O
	6	-	O
	24	-	O
	48	-	O
	72	-	O
NLC4 ($25 \mu\text{g mL}^{-1}$)	2	-	O
	6	-	O
	24	-	O
	48	-	O
	72	-	O

N.O – não observada; O – observada

Estudos *in vitro* realizados com o PZQ livre, a fim de avaliar a taxa de mortalidade do *S. mansoni*, linhagem Porto Rico, frente a diferentes concentrações - 40

Resultados

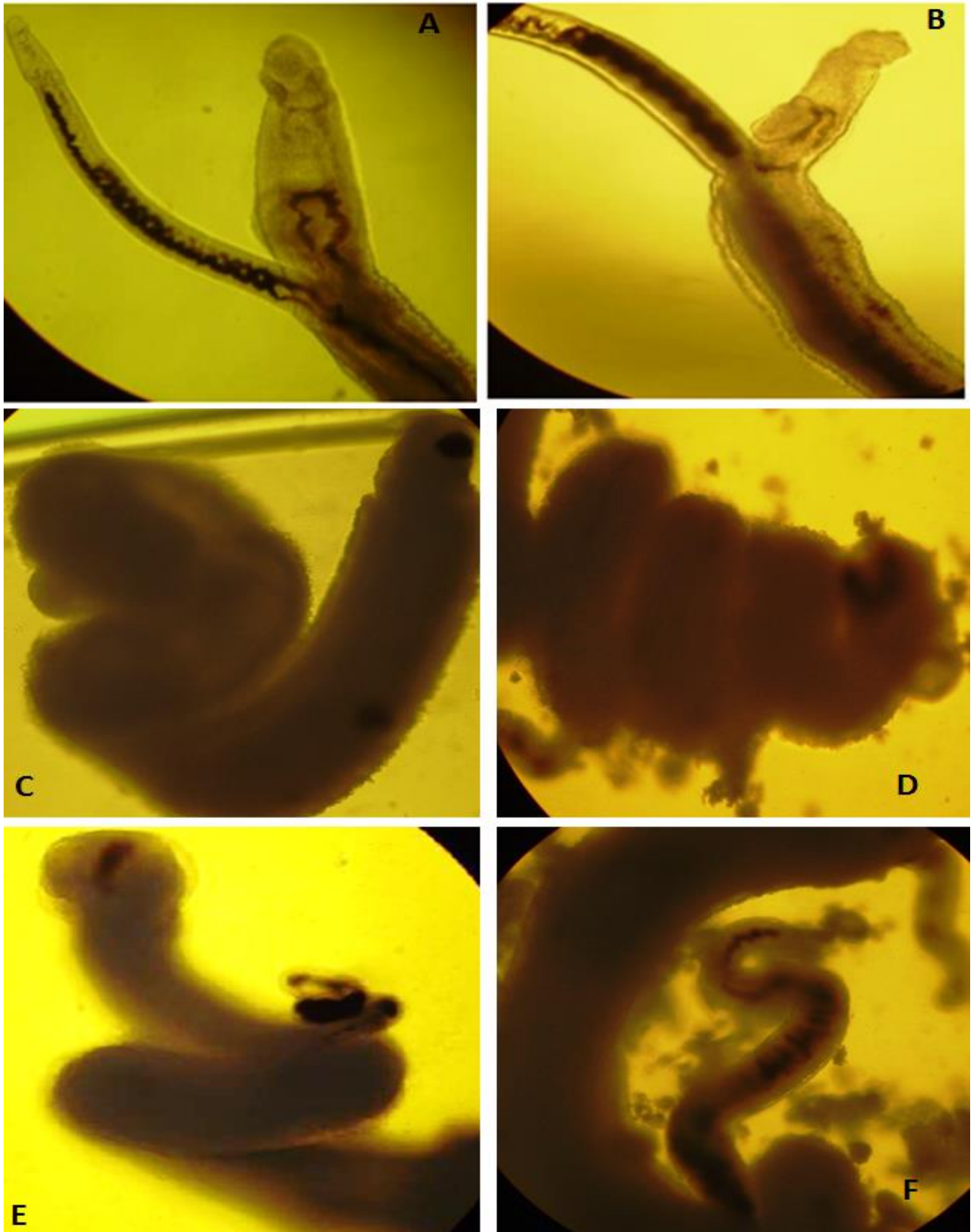
e $80 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$, demonstraram taxas de mortalidade de 25% quando os vermes foram expostos por 08 dias de incubação (Pica-Mattoccia & Cioli, 2004). No presente trabalho, observou-se taxas de 60%, para a linhagem BH de *S. mansoni*, quando os vermes foram expostos a concentração de $25 \mu\text{g}/\text{mL}$, por um período de 03 dias de incubação.

Essa variação de susceptibilidade, encontrada na resposta aos tratamentos com PZQ, está relacionada a linhagem estudada. De acordo com Martinez et al. (2003) diferentes linhagens do parasita apresentam diferenças na infectividade, patogenicidade, cinética de eliminação de ovos, diferenças morfológicas entre os adultos, além de responderem diferentemente aos fármacos. Além da mortalidade, todos os vermes sofreram alterações significativas no tegumento seguida de contrações musculares. Sabe-se que dentre os efeitos do PZQ sobre o *S. mansoni*, incluem contração e paralisia muscular seguido da destruição do tegumento, podendo resultar na despolarização da membrana e influxo extracelular de cálcio. Acredita-se que esse influxo ocorre devido a ativação dos receptores de adenosina, conhecidos como moduladores dos canais de cálcio, existentes no parasita (Doenhoff et al., 2008; Becker et al., 1980). O tegumento do *S. mansoni* é extremamente importante para o sucesso da infecção e sobrevivência no hospedeiro. Por essa razão vem sendo vastamente estudado desde o final da década de 1940 até os dias atuais como um alvo terapêutico (VAN HELLEMOND et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2013).

A Figura 46 (A e B) exhibe a imagem do casal de *S. mansoni* incubado em meio RPMI, sendo esse usado como grupo controle.

Resultados

Figura 46 Casal de *S. mansoni* incubado em meio RPMI, usado como grupo controle Avaliação in vitro do PZQ em cultura de *S. mansoni*, em que NLC1 (A) NLC1; NLC2 (b); NLC3 (C) e NLC4 (D), na concentração 0,025mg/mL.



Resultados

Como é possível observar na Figura 46 (A e B) os casais colocados em meio de cultura (RPMI), não sofreram alterações no tegumento, além disso, não ocorreu a separação e morte dos parasitas. É possível observar um casal de parasita, e também não houve alterações no tegumento do parasita e sem a separação do casal.

Conforme ilustrado na Figura 46 (C e D) para a separação dos casais de *S.mansoni*, observou-se que o sistema NLC2 apresentou menor influência na separação dos casais de vermes, quando comparadas com os demais sistemas. A separação dos casais de *S. mansoni* expostos a fármacos é importante, de acordo com Barth et al. (1996) essa exposição pode ocasionar mudanças na capacidade reprodutiva, alterações nas células vitelínicas da fêmea e, por consequência, uma diminuição da produção de ovos. Além da separação dos casais, foi possível observar a morte do parasita e total destruição do tegumento da musculatura.

5.11 Atividade *in vivo*

5.11.1 Estudo *in vivo* com camundongos Balb infectados por *Schistosoma mansoni* da linhagem BH

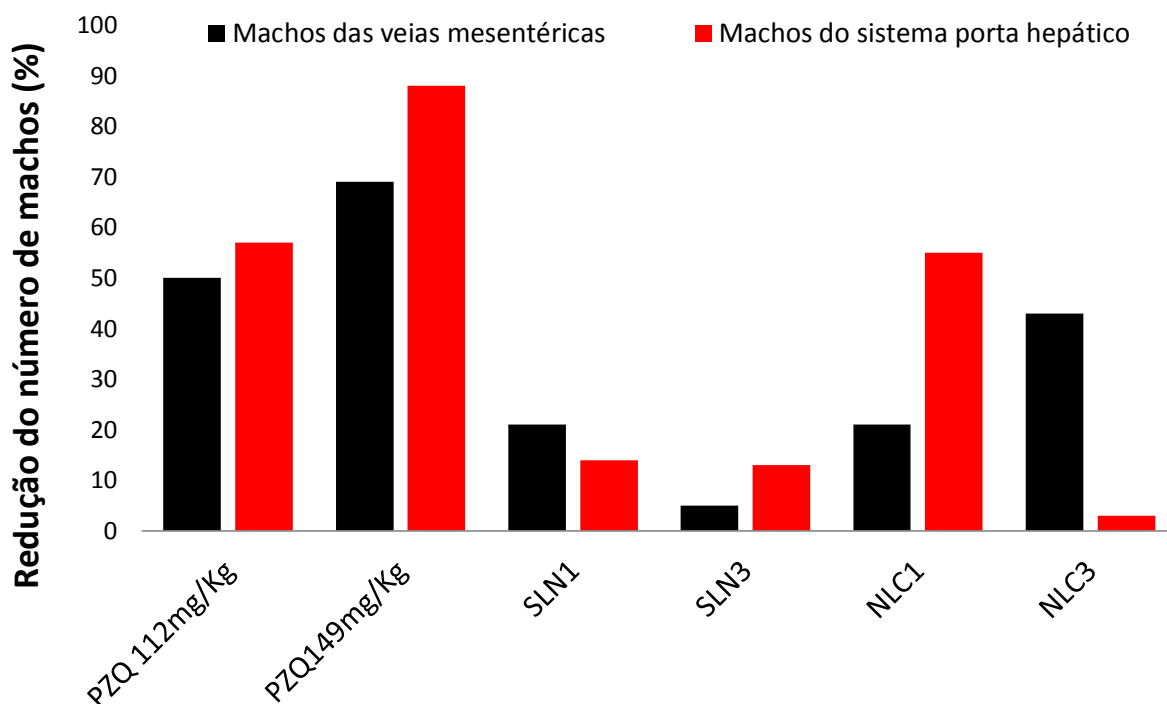
O efeito da atividade do esquistomicida do PZQ incorporado nos diferentes sistemas (SLNs e NLCs) foi avaliado em camundongos Balb por meio da administração oral em diferentes doses (112mg/Kg e 149,33 mg/Kg) através de gavagem. Também avaliou-se o efeito dos sistemas sem PZQ.

5.11.1.1 Efeito das SLNs e NLCs sem PZQ sobre a atividade contra os vermes adultos

A Figura 47 mostra os dados das quantidades de parasitas machos, recuperados das veias mesentéricas e sistema porta hepático, em que, grupo controle (GC) refere-se aos animais tratados com solução salina, PZQ é o fármaco livre, sendo as SLN1 e NLC1 sistemas que contém PC/P-407 como sistema tensoativo, e SLN3 e NLC3 são sistemas que contém PC/T60 como sistema tensoativo.

Resultados

Figura 47 Efeito das SLNs e NLCs sem PZQ na atividade contra vermes machos

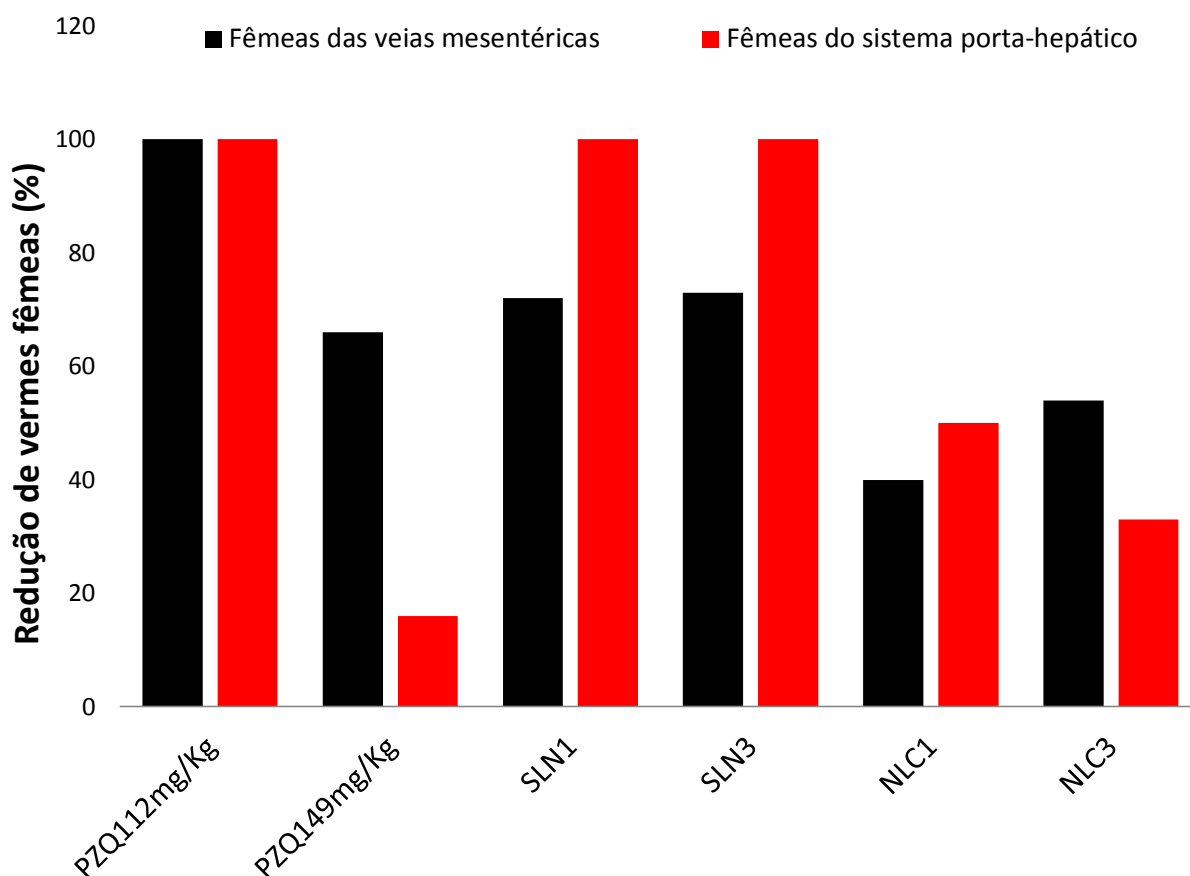


Conforme apresentado na Figura 47, as duas doses de PZQ demonstraram serem mais eficazes na morte de machos quando comparados aos sistemas sem PZQ. Observa-se que os animais tratados com NLC1 e NLC3 foram mais eficazes que SLN1 e SLN3 devido a menor quantidade de parasitas recuperados tanto nas veias mesentéricas quanto no sistema porta hepático. O PZQ (112 mg/Kg) apresentou redução no número de machos significativa ($p < 0,05$) se comparado as SLN1 e SLN3, já quando comparados os sistemas entre si, os NLC1 reduziram significativamente a quantidade de machos quando comparados as SLN1 nas veias mesentéricas. Apesar de não haver diferença estatisticamente significativa, observa-se uma nítida redução do número de machos (exceto SLN3) quando estes foram expostos aos sistemas em relação ao grupo controle negativo.

A Figura 48 mostra os dados das quantidades de parasitas fêmeas, recuperados das veias mesentéricas e sistema porta hepático, em que, grupo controle (GC) refere-se aos animais tratados com solução salina, PZQ é o fármaco livre, sendo as SLN1 e NLC1 sistemas que contém PC/P-407 como sistema tensoativo, e SLN3 e NLC3 são sistemas que contém PC/T60 como sistema tensoativo.

Resultados

Figura 48 Efeito das SLNs e NLCs sem PZQ na atividade contra vermes fêmeas

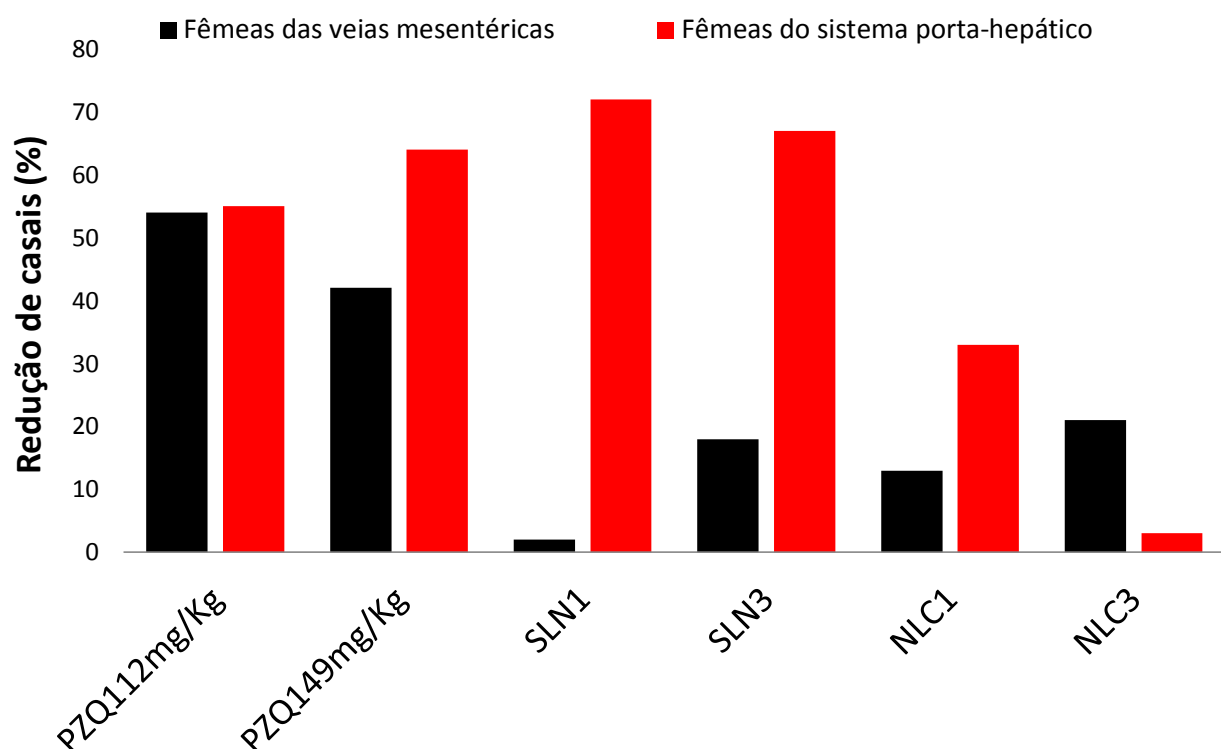


Conforme apresentado na Figura 48, as duas doses de PZQ demonstraram serem mais eficazes na morte das fêmeas quando comparados aos sistemas sem PZQ e GC. É possível observar que os animais tratados com SLN1 e SLN3 demonstraram ser mais efetivos que NLC1 e NLC3, devido a menor quantidade de parasitas recuperados tanto nas veias mesentéricas quanto no sistema porta hepático.

A Figura 49 mostra os dados das quantidades de casais, recuperados das veias mesentéricas e sistema porta hepático, em que, grupo controle (GC) refere-se aos animais tratados com solução salina, PZQ é o fármaco livre, sendo as SLN1 e NLC1 sistemas que contém PC/P-407 como sistema tensoativo, e SLN3 e NLC3 são sistemas que contém PC/T60 como sistema tensoativo.

Resultados

Figura 49 Efeito das SLNs e NLCs sem PZQ na atividade de separação de casais

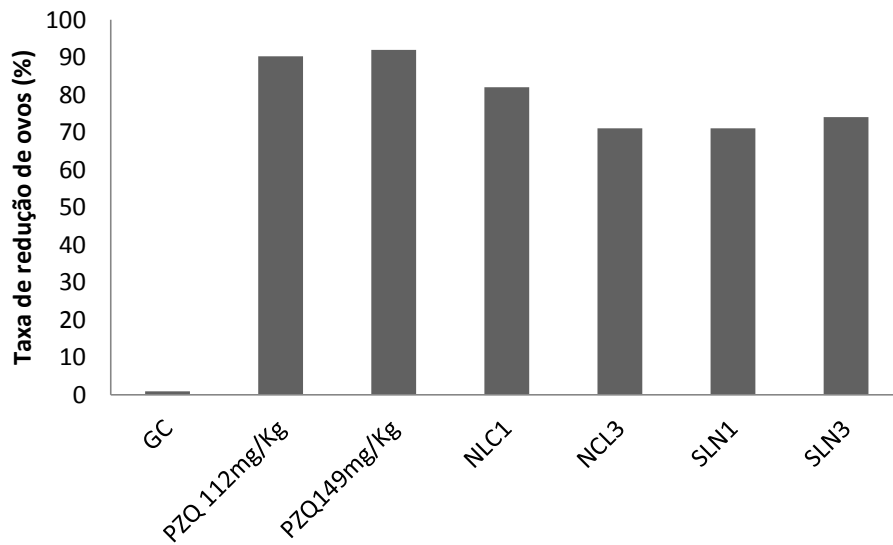


De acordo com a Figura 49, as SLN1 e SLN3 demonstraram ser mais eficazes na separação dos casais no sistema porta hepático quando comparado ao grupo tratado com PZQ em ambas as doses, já nas veias mesentéricas as SLN3 e NLC3 demonstraram serem mais efetivos quando comparados os PZQ (149mg/Kg).

Conforme apresentado nas Figuras 47, 48 e 49 os sistemas demonstraram apresentar efeito em machos, fêmeas e na separação de casais mesmo sem o PZQ incorporado. Estes dados podem ser justificados pelo fato dos sistemas serem lipídicos, pois de acordo com o descrito por Brouwers *et al.*, 1998 o *S. mansoni* absorve lipídeos do meio externo e Mourão *et al.*, 2005 em seu trabalho sugerem que a composição lipídica de lipossomas poderiam altera a fluidez do tegumento do parasita.

Resultados

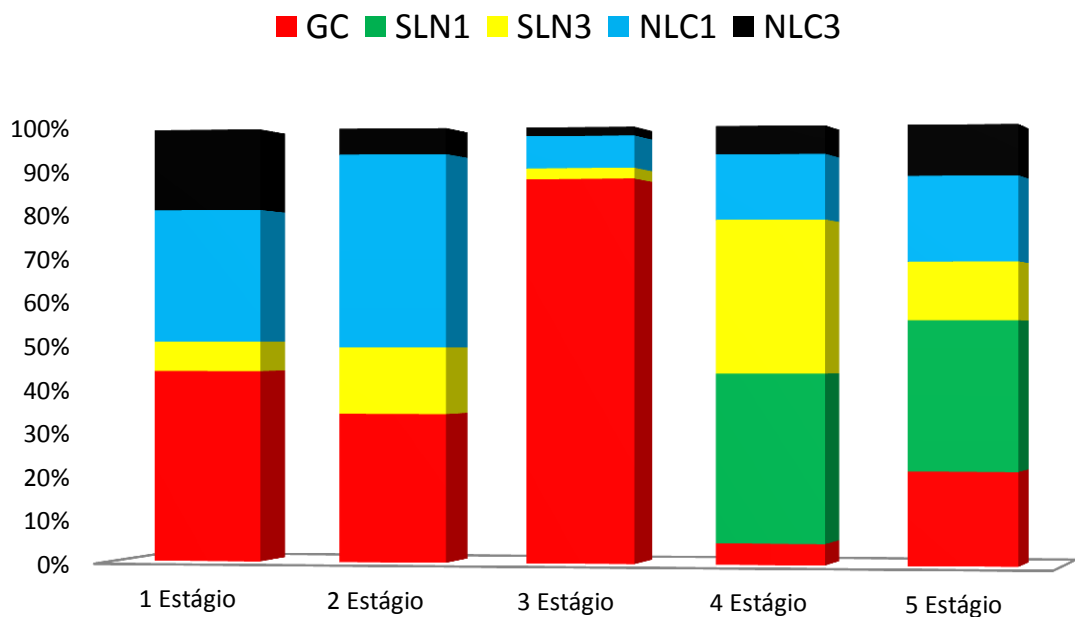
Figura 50 Efeito das SLNs e NLCs sem PZQ na atividade sobre os ovos por grama de fezes (OPG)



Os sistemas sem PZQ demonstraram apresentar atividade sobre os ovos dos parasitas, quando comparados ao GC. A redução no número de ovos pode ter ocorrido devido à redução na quantidade de fêmeas e separação dos casais.

Figura 51 Efeito das SLNs e NLCs sobre os ovos nos diferentes estágios de maturidade

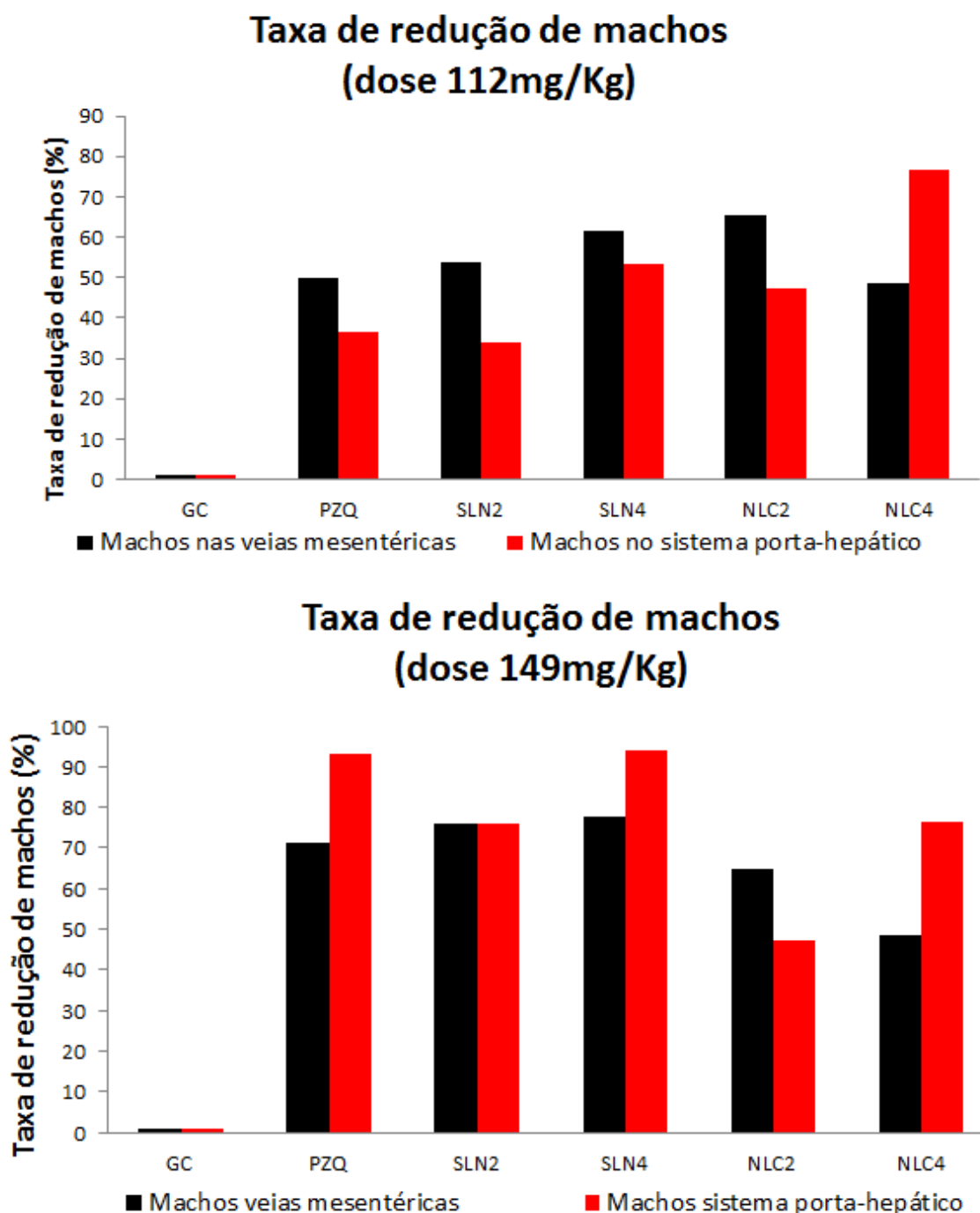
Oograma para os sistemas sem PZQ



Resultados

5.11.1.2 Efeito do PZQ incorporado nos diferentes sistemas na dose de 112mg/Kg e 149mg/Kg sobre a atividade contra os vermes adultos

Figura 52 Efeito do PZQ nas doses de 112mg/Kg e 149mg/Kg incorporado nas SLNs e NLCs na atividade contra os vermes adultos machos

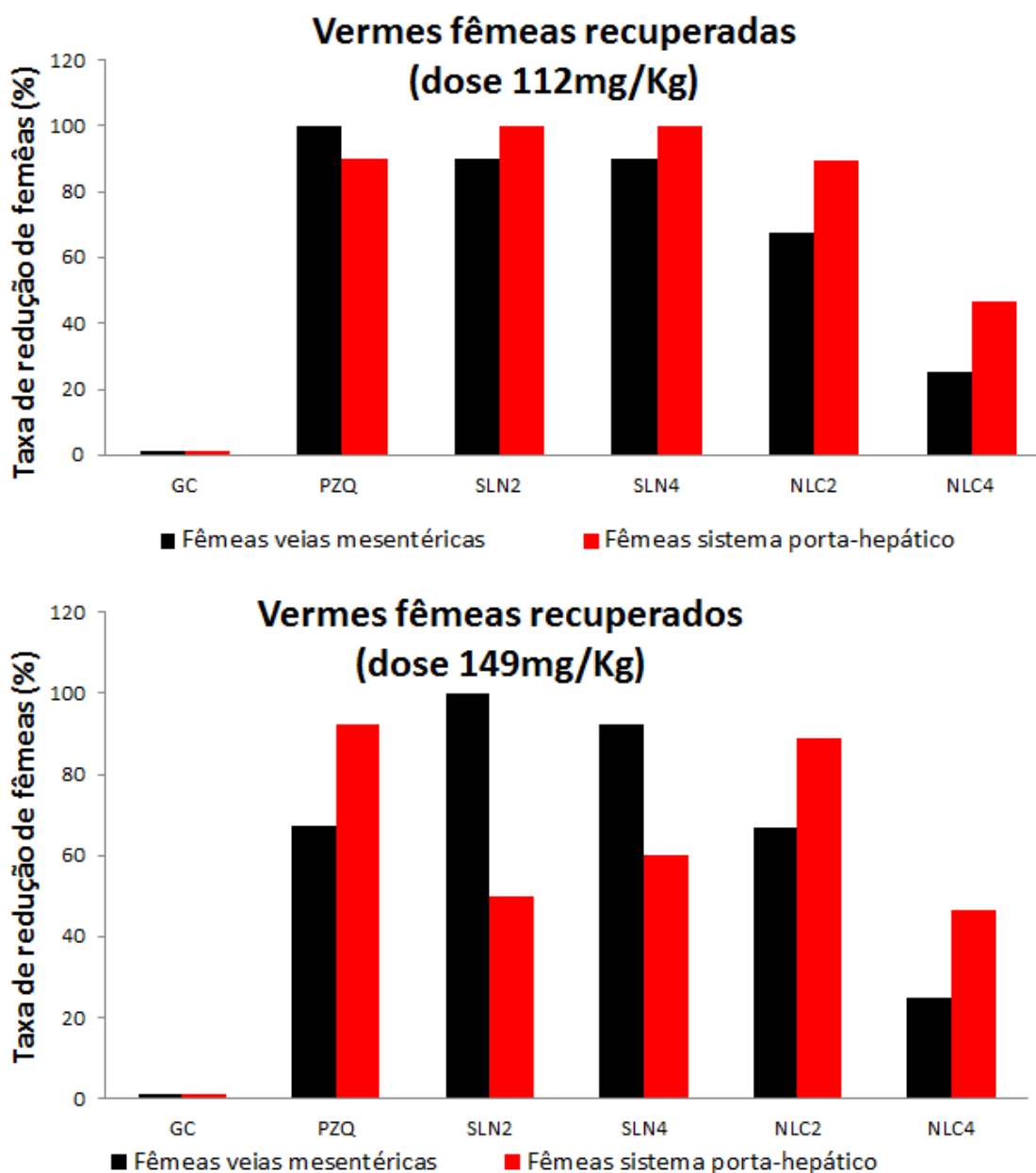


Conforme ilustrado na Figura 52, observa-se que tanto os sistemas quanto o PZQ nas doses de 112mg/Kg e 149mg/kg foram mais efetivos na redução de machos nas veias mesentéricas quando comparados com o sistema porta hepático. As SLN4 e NLC2 foram mais efetivos na redução de machos pelas veias mesentéricas quando

Resultados

comparado as SLN2 e NLC4, para o sistema porta hepático as SLN4 e NLC4 demonstraram serem mais efetivos que as SLN2 e NLC2.

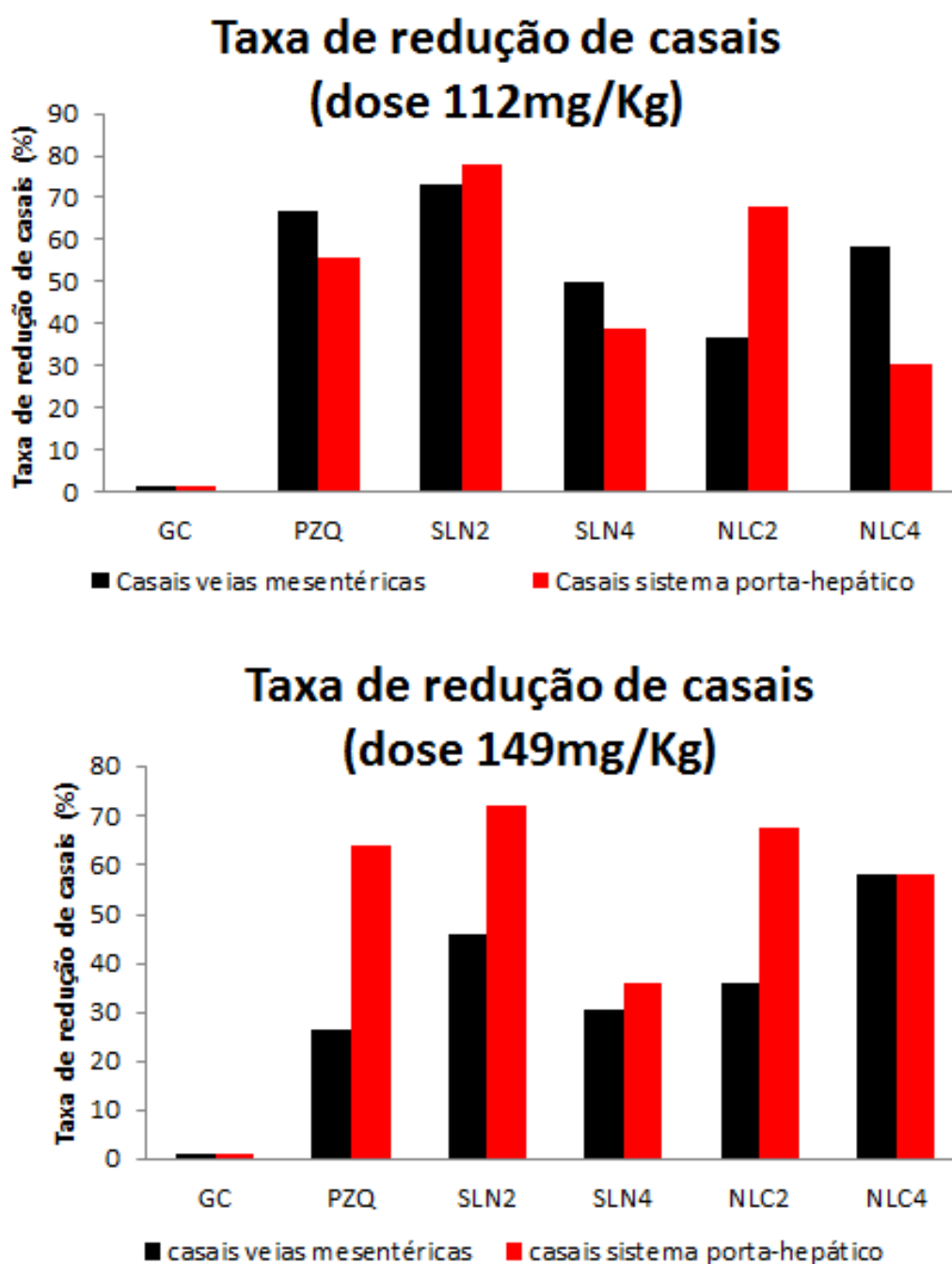
Figura 53 Efeito do PZQ nas doses de 112mg/Kg e 149mg/Kg incorporado nas SLNs e NLCs na atividade contra os vermes adultos fêmeas



Conforme apresentado na Figura 53, observa-se que as SLNs foram mais eficazes na redução das fêmeas nas veias mesentéricas e nos sistema porta hepático quando comparadas aos NLCs. O PZQ livre demonstrou ser mais efetivo na morte das fêmeas nas veias mesentéricas quando comparado as SLNs e NLCs.

Resultados

Figura 54 Efeito do PZQ nas doses de 112mg/Kg e 149mg/Kg incorporado nas SLNs e NLCs na atividade de separação de casais



Conforme apresentado na Figura 54, tanto os sistemas (SLNs e NLCs) quanto o PZQ demonstraram serem efetivos na separação de casais pelo sistema porta do que nas veias mesentericas nas diferentes doses (112mg/Kg e 149mg/Kg).

Para os animais que foram tratados com a dose de 112mg/kg, observa-se que as SLN2 e NLC2 apresentaram a maior atividade contra a separação de casais pelo

Resultados

sistema porta, quando comparadas as SLN4 e NLC4 em ambas as doses (112mg/Kg e 149mg/Kg).

A Tabela 31 exhibe os dados sobre a razão relativa ao sexo (R.R.S) dos sistemas sem PZQ (SLN1, SLN3, NLC1 e NLC3) e para os sistemas contendo PZQ na dose de 112mg/Kg (SLN2, SLN4, NLC2 e NLC4).

Tabela 31 Efeito do PZQ na dose de 112mg/kg incorporado nos diferentes sistemas sobre os vermes adultos.

Tratamento	VEIAS MESENTÉRICAS					SISTEMA PORTA HEPÁTICO				
	Macho \bar{X}	Fêmea \bar{X}	Casais	Total \bar{X}	R.R.S	Macho \bar{X}	Fêmea \bar{X}	Casal	Total \bar{X}	R.R.S
GC	5,2	4,0	4,4	13,6	1,0	9,0	0,4	3,6	13,0	1,0
PZQ	2,1	0,8	3,0	5,9	2,02	12,3	0,6	1,3	14,2	15,77
SLN1	6,2	1,2	4,7	12,1	3,97	9,2	0	1	10,2	-
SLN2	2,4	0,4	1,6	4,6	4,61	9,4	0	0,8	10,2	-
SLN3	5,4	1,2	3,8	10,4	3,46	14,8	0	1,2	16	-
SLN4	2,0	0,4	3,0	5,4	3,85	6,6	0	2,2	8,8	-
NLC1	3,8	2,4	5,0	11,2	1,22	4,0	0,2	4,8	9,0	15,38
NLC2	1,8	1,3	3,8	6,9	1,0	7,5	0,17	1,17	8,8	33,9
NLC3	4,2	2,8	3,6	10,6	1,15	9,2	1,0	3,5	13,7	7,1
NLC4	2,7	3,0	2,5	8,2	0,69	3,3	1,5	1,5	6,3	1,69

R.R.S (Razão Relativa ao Sexo)- valores maiores que 1 indicam que os sistemas foram mais efetivos sobre as machos e menores que 1 foram mais efetivas contra as fêmeas.

Conforme apresentado na Tabela 31, as SLNs demonstraram atuarem mais sobre as fêmeas pelo sistema porta hepático quando comparadas aos NLCs. Apenas os NLC4 demonstraram serem mais efetivos sobre as fêmeas pelas veias mesentéricas.

A Tabela 32 exhibe os dados sobre a razão relativa ao sexo (R.R.S) dos sistemas sem PZQ (SLN1, SLN3, NLC1 e NLC3) e para os sistemas contendo PZQ na dose de 149mg/Kg (SLN2, SLN4, NLC2 e NLC4).

Resultados

Tabela 32 Efeito do PZQ na dose de 149 mg/kg incorporado nos diferentes sistemas sobre os vermes adultos.

Tratamento	VEIAS MESENTÉRICAS					SISTEMA PORTA HEPÁTICO				
	Macho X	Fêmea X	Casais	Total X	R.R.S	Macho X	Fêmea X	Casal	Total X	R.R.S
GC	5,2	4,0	4,4	13,6	1,0	9,0	0,4	3,6	13,0	1,0
PZQ	1,5	1,3	4,4	7,2	0,89	1,0	0,3	1,3	2,6	2,56
SLN1	6,2	1,2	4,7	12,1	3,97	9,2	0	1	10,2	-
SLN2	1,25	0	3,25	4,5	-	1,25	0,75	1,0	3	1,28
SLN3	5,4	1,2	3,8	10,4	3,46	14,8	0	1,2	16	-
SLN4	1,16	0,3	4,16	5,62	2,97	0,83	0,6	2,3	3,73	1,06
NLC1	3,8	2,4	5,0	11,2	1,22	4,0	0,2	4,8	9,0	15,38
NLC2	1,83	1,33	3,83	6,99	1,06	7,2	0,17	1,17	8,54	32,58
NLC3	4,2	2,8	3,6	10,6	1,15	9,2	1,0	3,5	13,7	7,1
NLC4	2,67	3,0	2,5	8,17	0,68	3,33	1,5	1,5	1,48	1,71

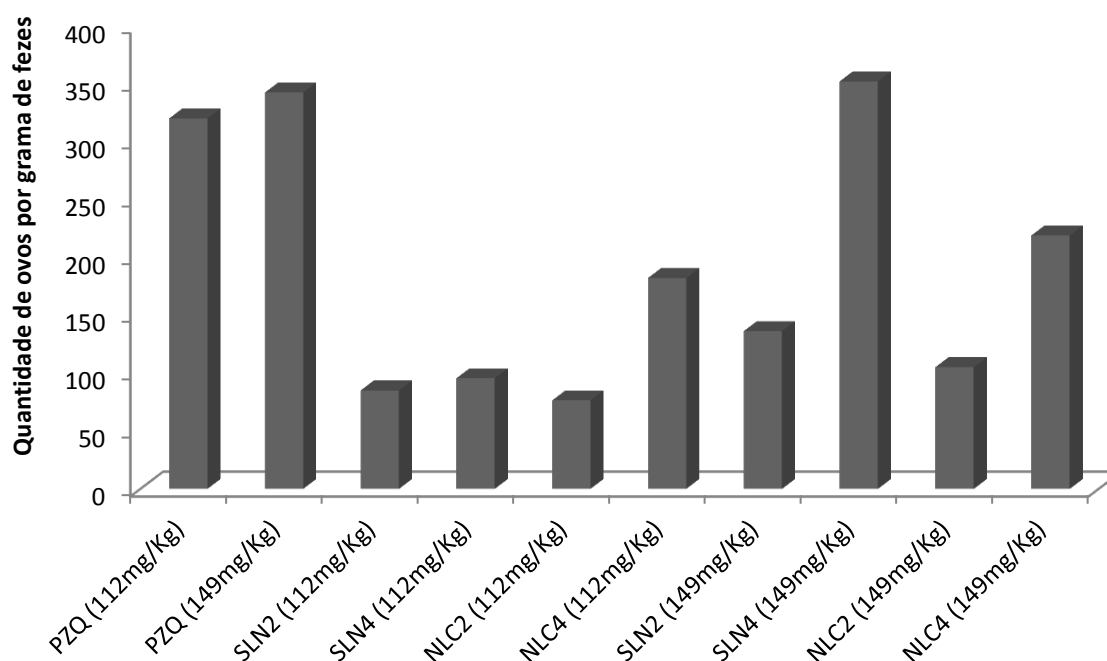
R.R.S (Razão Relativa ao Sexo)- valores maiores que 1 indicam que os sistemas foram mais efetivos sobre as machos e menores que 1 foram mais efetivas contra as fêmeas.

Para a dose de 149mg/Kg de PZQ incorporado nas SLNs e NLCs, apenas os NLC4 demonstraram apresentar maior atividade contra as fêmeas pelas veias mesentéricas, os demais sistemas (SLN2, SLN4, NLC2) demonstraram serem mais efetivos contra os machos.

As Figura 55 exibe os dados de OPG para os animais que foram tratados com a dose de 112mg/Kg e 149mg/Kg, em que observa-se que as SLN2 demonstraram serem mais eficazes quando comparados as SLN4. Para os NLC2 observou-se resultado semelhante, ou seja, foram mais eficazes sobre a OPG se comparados aos NLC4. As SLN2 foram mais o sobre a OPG quando comparadas aos NLC2.

Resultados

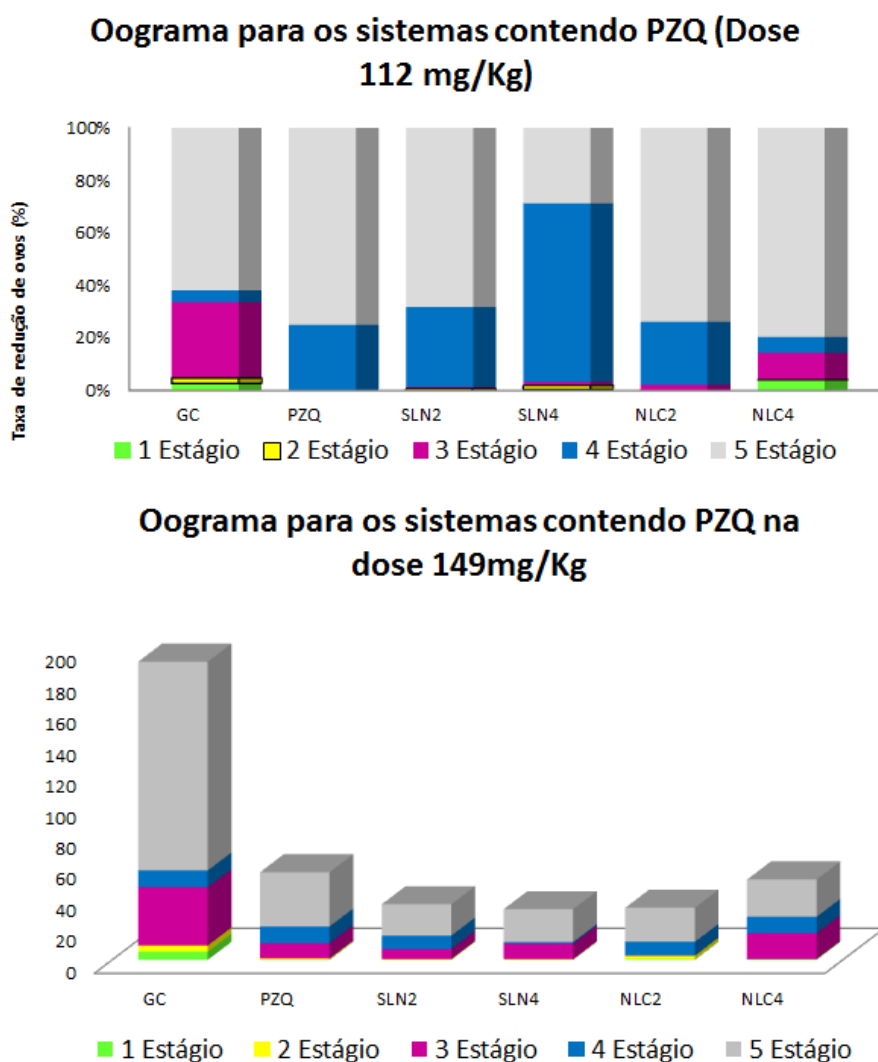
Figura 55 Efeito do PZQ nas doses de 112 mg/Kg e 149 mg/Kg incorporado nas SLNs e NLCs sobre os ovos por grama de fezes (OPG).



A Figura 56 exibe os dados do oograma para os animais que foram tratados com a dose de 112mg/Kg e 149mg/Kg, em que observa-se que as SLN2 demonstraram serem mais eficazes sobre os ovos imaturos (1^o e 4^o estágio). Para os NLC2 observou-se resultado semelhante, ou seja, foram mais eficazes sobre os ovos imaturos (1^o e 3^o estágio). Quando se compara as SLNs com os NLCs, observa-se que tanto as SLN2 quanto as SLN4 foram mais eficazes sobre os ovos imaturos (1^o a 3^o estágio), maduros (5^o estágio).

Resultados

Figura 56 Efeito do PZQ nas doses 112mg/Kg e 149mg/kg incorporado nas SLNs e NLCs sobre os ovos nos diferentes estágios de maturidade.



Para os animais que foram tratados com a dose de 112mg/Kg observa-se que as SLN2 apresentaram a maior atividade contra a separação de casais, enquanto as SLN4 foram mais efetivas contra os vermes machos, em relação as fêmeas. Os NLC2 demonstraram serem mais efetivos contra machos e fêmeas, enquanto os NLC4 foram mais eficazes na separação dos casais. Se compararmos as SLNs com as NLCs, é possível observar que as SLN2 foram mais efetivos na separação de casais e contra as fêmeas, já os NLC2 foram mais eficazes na atividade contra os machos. As SLN4 demonstraram serem mais eficazes contra os machos e fêmeas, enquanto os NLC4 foram mais efetivos contra a separação de casais.

Resultados

Os resultados apresentados demonstraram que ambos os sistemas (SLNs e NLCs) contendo PC/P-407 como sistema tensoativo demonstraram serem mais eficazes na ação sob os ovos imaturos e OPG quando comparados aos sistemas contendo PC/T60 como sistema tensoativo. Como as SLNs e NLCs apresentaram ação contra as fêmeas tanto no sistema porta hepático quando nas veias mesentéricas, sugerimos que as fêmeas que permaneceram vivas podem ter sofrido alguma alteração no canal reprodutor dificultando a oviposição.

Com os resultados apresentados, podemos sugerir que ambos os sistemas demonstraram serem efetivos na ação contra os vermes adultos machos e fêmeas nas diferentes doses de PZQ incorporado. De modo geral, as SLNs demonstraram serem mais eficazes nas diferentes doses de PZQ incorporado quando comparadas aos NLCs, além disso, demonstraram serem mais efetivas na redução de fêmeas e separação de casais no sistema porta hepático quando comparadas ao PZQ livre. Exceto para a atividade contra os vermes machos, os sistemas demonstraram atuarem mais pelo sistema porta hepático do que pelas veias mesentéricas.

6 DISCUSSÃO

O presente estudo propôs avaliar ambos os sistemas (SLNs e NLCs), como uma estratégia de melhorar a eficácia do PZQ na atividade contra o *S. mansoni*. Inicialmente desenvolvemos os sistemas contendo GMS/PC (para SLNs) e GMS/AO/PC (para NLCs) como fase lipídica e como tensoativo utilizou-se o P-407 e T60, caracterizou-se empregando quanto ao diâmetro médio, potencial zeta, índice de polidispersidade em que foi possível observar que os sistemas apresentaram um pequeno diâmetro, o índice de polidispersidade em torno de 0,3 a 0,6 mostrando uma heterogeneidade na distribuição das partículas, porém observou-se que a adição de PZQ levou a uma diminuição nos valores de Pdl indicando que o fármaco contribuiu para a estabilização dos diferentes sistemas (SLNs e NLCs). Resultados semelhantes foram observados pelo nosso grupo de pesquisa, sugerimos que o processo de solidificação pode ter levado à obtenção de partículas com uma distribuição de tamanho maior (KOLENYAK-SANTOS *et al.*, 2014).

Os sistemas tensoativos levaram a comportamentos diferentes nas análises de DRX, podemos sugerir que a adição do PZQ deixou os sistemas mais amorfos para as SLNs e NLCs contendo PC/P-407 quando comparados com as SLNs e NLCs contendo PC/T60 como sistema tensoativo, sugerindo que o principal interferente são os tensoativos (P-407 e T60) e não a presença do AO.

As análises de DSC demonstraram diferenças nos valores de entalpias, foi possível observar que tanto para as misturas binárias, misturas físicas e ambos os sistemas, os valores de ΔH obtidos foram menores que os esperados, sugerindo que para ambos os sistemas analisados, houve um gasto de energia menor que o esperado para romper a estrutura cristalina do PZQ. As análises de MEV exibiram a morfologia dos sistemas, em que observa-se que todos os sistemas apresentaram um morfologia esférica. O espectro de absorção no infravermelho mostrou as características do PZQ, nos espectros observados, as bandas referentes as ligações C-H do aromático e C-N diminuíram de intensidade tanto para as SLNs quanto para os NLCs, nas diferentes combinações de sistemas tensoativos (PC/P-407 e PC/T60).

Para a avaliação do perfil de segurança, os resultados mostraram que o PZQ livres causou $6,8 \pm 1,2\%$ da lise da membrana de eritrócitos. Observou-se que, sem PZQ, os NLC1 e NLC3, causaram lises de $1,12 \pm 0,5\%$ e $1,89 \pm 0,77\%$ na membrana

Discussão

dos eritrócitos, respectivamente. Também foi possível observar que o encapsulamento de PZQ (NLC2 e NLC4) reduziu a lise de eritrócitos, em relação ao fármaco livre ($3,42 \pm 1,54\%$ e $3,54 \pm 2,23\%$, respectivamente). Assim, todos os sistemas apresentaram hemólise de eritrócitos menores que o PZQ livre.

Para os ensaios *in vitro* observou-se que o sistema NLC2 apresentou menor influência na separação dos casais de vermes. Além da separação dos casais, foi possível observar a morte do parasita e total destruição do tegumento da musculatura.

Os resultados demonstrados nos permitem sugerir que ambos os sistemas podem ser promissores na atividade esquistomicida, pois todos apresentaram eficácia contra os vermes adultos e na OPG, os sistemas (SLNs e NLCs) contendo PC/P-407 como sistema tensoativo, demonstraram apresentar maior atividade na separação de casais e redução do número de fêmeas quando comparados aos sistemas (SLNs e NLCs) contendo PC/T60 pelo sistema porta hepático.

7 CONCLUSÕES

Foi possível concluir que o tensoativo pode interferir na interação do praziquantel com a matriz lipídica;

A presença do AO nos NLCs diminuiu os valores de diâmetro médio e potencial zeta quando comparados com as SLNs.

A incorporação de PZQ nos NLCs reduziu a lise dos eritrócitos, quando comparados com o PZQ livre;

Os ensaios *in vitro* na atividade contra *S. mansoni* mostraram que os diferentes sistemas forma capazes de matar os parasitas e, além disso, promover alterações no tegumento;

Os resultados *in vivo* demonstrados nos permitem sugerir os sistemas (SLNs e NLCs) atuaram mais pelo sistema porta hepático do que pelas veias mesentéricas, exceto na atividade contra os vermes adultos machos.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL RAZEK, AHMED ABDEL KHALEK, ARVEMAS WATCHARAKORN, MAURICIO CASTILLO. *Parasitic Diseases of the Central Nervous System. Neuroimaging clinics of North America*, v.21, p. 815-841, 2011.
- ANDALIB, S., J. VARSHOSAZ, F. HASSANZADEH, H. SADEGHI. *Optimization of Ldl Targeted Nanostructured Lipid Carriers of 5-Fu by a Full Factorial Design. Adv Biomed Res*, v.1, p. 2277-9175, 2012.
- ANTHONY, BARRIE, WILLIAM MATHIESON, WILLIAM DE CASTRO-BORGES, JEREMY ALLEN. *Schistosoma Mansoni: Egg-Induced Downregulation of Hepatic Stellate Cell Activation and Fibrogenesis. Experimental Parasitology*, v.124, p. 409-420, 2010.
- ARAUJO, JULIANO MICHEL, TATIANE TEIXEIRA DE MELO, ISABELA CAMPOS DE SENA, CLARICE CARVALHO ALVES, NEUSA ARAUJO, FERNANDA DO VALLE DURÃES, SERGIO COSTA OLIVEIRA, CRISTINA TOSCANO FONSECA. *Schistosoma Mansoni Schistosomula Tegument (Smtteg) Immunization in Absence of Adjuvant Induce Il-10 Production by Cd4+ Cells and Failed to Protect Mice against Challenge Infection. Acta Tropica*, v.124, p. 140-146, 2012.
- BALDRICK, P. *Pharmaceutical Excipient Development: The Need for Preclinical Guidance. Regulatory Toxicology and Pharmacology*, v.32, p. 210-218, 2000.
- BISPO DE JESUS M, MATOS ALVES PINTO L, FERNANDES FRACETO L, LINO A TAKAHATA Y, PAULA E JAIME C. *Theoretical and Experimental Study of a Praziquantel and B-Cyclodextrin Inclusion Complex Using Molecular Mechanic Calculations and 1h-Nuclear Magnetic Resonance. Journal Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v.41, p. 1428-1432, 2006.
- BONLOKKE, L., L. HOVGAARD, H. G. KRISTENSEN, L. KNUTSON, H. LENNERNAS. *Direct Estimation of the in Vivo Dissolution of Spironolactone, in Two Particle Size Ranges, Using the Single-Pass Perfusion Technique (Loc-I-Gut) in Humans. Eur J Pharm Sci*, v.12, p. 239-250, 2001.
- BRASIL. *Esquistossomose Doenças Infeciosas E Parasitárias. Ministério da Saúde*, p. 122-124, 2005.
- BROGÅRD, M., E. TROEDSSON, K. THURESSON, H. LJUSBERG-WAHREN. *A New Standardized Lipolysis Approach for Characterization of Emulsions and Dispersions. Journal of Colloid and Interface Science*, v.308, p. 500-507, 2007.
- BURAEI, Z., J. YANG. *The Ss Subunit of Voltage-Gated Ca²⁺ Channels. Physiol Rev*, v.90, p. 1461-1506, 2010.
- CHAKRABORTY, SUBHASHIS, DALI SHUKLA, BRAHMESHWAR MISHRA, SANJAY SINGH. *Lipid – an Emerging Platform for Oral Delivery of Drugs with Poor Bioavailability. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v.73, p. 1-15, 2009.
- CHAN, JOHN D., MAGDALENA ZAROWIECKI, JONATHAN S. MARCHANT. *Ca²⁺ Channels and Praziquantel: A View from the Free World. Parasitology International*, v.62, p. 619-628, 2013.
- CHAN, W. W., A. SHOWLER, A. K. BOGGILD. *Parasitic Liver Disease in Travelers. Infect Dis Clin North Am*, v.26, p. 755-780, 2012.
- CHAUD, MARCO VINICIUS, POLLYANNA TAMASCIA, ANDRÉA CRISTINA DE LIMA, MARIA ONDINA PAGANELLI, MARIA PALMIRA DAFLON GREMIÃO, OSVALDO DE FREITAS. *Solid Dispersions with Hydrogenated Castor Oil Increase Solubility, Dissolution Rate and Intestinal Absorption of Praziquantel. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.46, p. 473-481, 2010.

Referências Bibliográficas

- CHEN, C. C., T. H. TSAI, Z. R. HUANG, J. Y. FANG. *Effects of Lipophilic Emulsifiers on the Oral Administration of Lovastatin from Nanostructured Lipid Carriers: Physicochemical Characterization and Pharmacokinetics*. *Eur J Pharm Biopharm*, v.74, p. 474-482, 2010.
- CINTO, PRISCILAO, ANALUIZARIBEIRO SOUZA, ANDRÉAC LIMA, MARCOV CHAUD, MARIAPALMIRAD GREMIÃO. *Lc Evaluation of Intestinal Transport of Praziquantel*. *Chroma*, v.69, p. 213-217, 2009.
- CLERINX, J., A. VAN GOMPEL. *Schistosomiasis in Travellers and Migrants*. *Travel Med Infect Dis*, v.9, p. 6-24, 2011.
- CORRÊA-OLIVEIRA, RODRIGO, IRAMAYA RODRIGUES CALDAS, GIOVANNI GAZZINELLI. *Natural Versus Drug-Induced Resistance in Schistosoma Mansoni Infection*. *Parasitology Today*, v.16, p. 397-399, 2000.
- CORTESI, RITA, ELISABETTA ESPOSITO, GIOVANNI LUCA, CLAUDIO NASTRUZZI. *Production of Lipospheres as Carriers for Bioactive Compounds*. *Biomaterials*, v.23, p. 2283-2294, 2002.
- COURA, J. R., M. J. CONCEIÇÃO. *Specific Schistosomiasis Treatment as a Strategy for Disease Control*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v.105, p. 598-603, 2010.
- COURA, JR, RS AMARAL. *Epidemiological and Control Aspects of Schistosomiasis in Brazilian Endemic Areas*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.99, p. 13-19, 2004.
- CUSTODIO, J. M., C. Y. WU, L. Z. BENET. *Predicting Drug Disposition, Absorption/Elimination/Transporter Interplay and the Role of Food on Drug Absorption*. *Adv Drug Deliv Rev*, v.60, p. 717-733, 2008.
- DATE, A. A., M. D. JOSHI, V. B. PATRAVALE. *Parasitic Diseases: Liposomes and Polymeric Nanoparticles Versus Lipid Nanoparticles*. *Adv Drug Deliv Rev*, v.59, p. 505-521, 2007.
- DE OLIVEIRA, ROSIMEIRE NUNES, VERA LÚCIA GARCIA REHDER, ADRIANA S. SANTOS OLIVEIRA, ÍLIO MONTANARI JÚNIOR, JOÃO ERNESTO DE CARVALHO, ANA LÚCIA TASCA GOIS DE RUIZ, VERONICA DE LOURDES SIERPE JERALDO, ARÍCIO XAVIER LINHARES, SILMARA MARQUES ALLEGRETTI. *Schistosoma Mansoni: In Vitro Schistosomicidal Activity of Essential Oil of Baccharis Trimeria (Less) Dc*. *Experimental Parasitology*, v.132, p. 135-143, 2012.
- DEWALICK, SASKIA, ALOYSIUS G. M. TIELENS, JAAP J. VAN HELLEMOND. *Schistosoma Mansoni: The Egg, Biosynthesis of the Shell and Interaction with the Host*. *Experimental Parasitology*, v.132, p. 7-13, 2012.
- EL-GAREM, A. A. *Schistosomiasis. Digestion*, v.59, p. 589-605, 1998.
- FREZZA, T. F., R. R. MADI, T. M. BANIN, M. C. PINTO, A. L. R. SOUZA, M. P. D. GREMIÃO, S. M. ALLEGRETTI. *Efeito Do Praziquantel Incorporado a Lipossomas Nos Diferentes Estágios De Desenvolvimento Dos Ovos De Schistosoma Mansoni*. *Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences*, v.28, p. 209-214, 2007.
- FREZZA, TARSILA FERRAZ, MARIA PALMIRA DAFLON GREMIÃO, ELIANA MARIA ZANOTTI-MAGALHÃES, LUIZ AUGUSTO MAGALHÃES, ANA LUIZA RIBEIRO DE SOUZA, SILMARA MARQUES ALLEGRETTI. *Liposomal-Praziquantel: Efficacy against Schistosoma Mansoni in a Preclinical Assay*. *Acta Tropica*, v.128, p. 70-75, 2013.
- GARBA, AMADOU, MARIAMA S. LAMINE, NOUHOU BARKIRÉ, ALI DJIBO, BOUBACAR SOFO, ANOUK N. GOUVRAS, RABIOU LABBO, HANNATOU SEBANGOU, JOANNE P. WEBSTER, ALAN FENWICK, JÜRIG UTZINGER. *Efficacy and Safety of Two Closely Spaced Doses of Praziquantel against Schistosoma Haematobium and S. Mansoni and Re-Infection Patterns in School-Aged Children in Niger*. *Acta Tropica*, v.128, p. 334-344, 2013.

Referências Bibliográficas

- GARNERO, CLAUDIA, ARIANA ZOPPI, DIEGO GENOVESE, MARCELA LONGHI. *Studies on Trimethoprim:Hydroxypropyl-B-Cyclodextrin: Aggregate and Complex Formation. Carbohydrate Research*, v.345, p. 2550-2556, 2010.
- GERWARD, L., J. Z. JIANG, J. STAUN OLSEN, J. M. RECIO, A. WAŚKOWSKA. *X-Ray Diffraction at High Pressure and High or Low Temperature Using Synchrotron Radiation: Selected Applications in Studies of Spinel Structures. Journal of Alloys and Compounds*, v.401, p. 11-17, 2005.
- GREENBERG, R. M. *Are Ca²⁺ Channels Targets of Praziquantel Action? Int J Parasitol*, v.35, p. 1-9, 2005.
- GREENBERG, ROBERT M. *Abc Multidrug Transporters in Schistosomes and Other Parasitic Flatworms. Parasitology International*, v.62, p. 647-653, 2013.
- GRYSEELS, B., K. POLMAN, J. CLERINX, L. KESTENS. *Human Schistosomiasis. Lancet*, v.368, p. 1106-1118, 2006.
- GUPTA, RAM B. *Polymer or Protein Stabilized Nanoparticles from Emulsions. Nanoparticle Technology for Drug Delivery*, 85-102, 2006.
- HAGAN, PAUL, CHRISTOPHER C. APPLETON, GERALD C. COLES, JOHN R. KUSEL, LOUIS-ALBERT TCHUEM-TCHUENTÉ. *Schistosomiasis Control: Keep Taking the Tablets. Trends in parasitology*, v.20, p. 92-97, 2004.
- HI, EL-SUBBAGH, AL-BADR AA. *Praziquantel. Praziquantel Analytical Profiles of Drug Substances and Excipients*, v.25, p. 463-500, 1998.
- HÖRTER, D., J. B. DRESSMAN. *Influence of Physicochemical Properties on Dissolution of Drugs in the Gastrointestinal Tract. Advanced Drug Delivery Reviews*, v.46, p. 75-87, 2001.
- HU, FU-QIANG, SAI-PING JIANG, YONG-ZHONG DU, HONG YUAN, YI-QING YE, SU ZENG. *Preparation and Characterization of Stearic Acid Nanostructured Lipid Carriers by Solvent Diffusion Method in an Aqueous System. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v.45, p. 167-173, 2005.
- JEZIORSKI, M. C., R. M. GREENBERG. *Voltage-Gated Calcium Channel Subunits from Platyhelminths: Potential Role in Praziquantel Action. Int J Parasitol*, v.36, p. 625-632, 2006.
- KANG, B. K., J. S. LEE, S. K. CHON, S. Y. JEONG, S. H. YUK, G. KHANG, H. B. LEE, S. H. CHO. *Development of Self-Microemulsifying Drug Delivery Systems (Smedds) for Oral Bioavailability Enhancement of Simvastatin in Beagle Dogs. Int J Pharm*, v.274, p. 65-73, 2004.
- KANSE, SANDIP M., OLIN LIANG, UWE SCHUBERT, HELMUT HAAS, KLAUS T. PREISSNER, MICHAEL J. DOENHOFF, ROGER D. DENNIS. *Characterisation and Partial Purification of Schistosoma Mansoni Egg-Derived Pro-Angiogenic Factor. Molecular and Biochemical Parasitology*, v.144, p. 76-85, 2005.
- KASINATHAN, R. S., W. M. MORGAN, R. M. GREENBERG. *Schistosoma Mansoni Express Higher Levels of Multidrug Resistance-Associated Protein 1 (Smmrp1) in Juvenile Worms and in Response to Praziquantel. Mol Biochem Parasitol*, v.173, p. 25-31, 2010.
- KATZ, N., K. ALMEIDA. *Esquistossomose, Xistosa, Barriga D'água. Ciência E Cultura. Ciência e Cultura*, v.55, p. 38-43, 2003.
- KATZ, N., A CHAVES, J. PELLEGRINO. *A Simple Device for Quantitative Stool Thick-Smear Technique in Schistosomiasis Mansoni. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v.14, p. 397-400, 1972.
- KATZ, N., L. C. D. S DIAS (2001). Parasitologia Humana E Seus Fundamentos Gerais. São Paulo: Atheneu, Cimerman, B.

Referências Bibliográficas

- Cimerman, S.
- KHAN, S. *Solid Lipid Nanoparticles: A Review. World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, v.1, p. 95-115, 2012.
- KING, CHARLES H. *Toward the Elimination of Schistosomiasis. New England Journal of Medicine*, v.360, p. 106-109, 2009.
- KOLENYAK-SANTOS, FERNANDA, CLAUDIA GARNERO, ROSIMEIRE N. DE OLIVEIRA, ANA L. R. DE SOUZA, MARLUS CHORILLI, SILMARA M. ALLEGRETTI, MARCELA R. LONGHI, MARCO V. CHAUD, MARIA P. D. GREMIÃO. *Nanostructured Lipid Carriers as a Strategy to Improve the in Vitro Schistosomiasis Activity of Praziquantel. Journal Nanoscience Nanotechnology*, v.14, p. 1-12, 2014.
- KOVACEVIC, A., S. SAVIC, G. VULETA, R. H. MULLER, C. M. KECK. *Polyhydroxy Surfactants for the Formulation of Lipid Nanoparticles (Sln and Nlc): Effects on Size, Physical Stability and Particle Matrix Structure. Int J Pharm*, v.406, p. 163-172, 2011.
- KUNZ, W. *Schistosome Male-Female Interaction: Induction of Germ-Cell Differentiation. Trends Parasitol*, v.17, p. 227-231, 2001.
- LIPPACHER, A., R. H. MÜLLER, K. MÄDER. *Liquid and Semisolid Sln™ Dispersions for Topical Application: Rheological Characterization. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v.58, p. 561-567, 2004.
- LIU, Y., X. WANG, J. K. WANG, C. B. CHING. *Structural Characterization and Enantioseparation of the Chiral Compound Praziquantel. J Pharm Sci*, v.93, p. 3039-3046, 2004.
- LJUSBERG-WAHREN, HELENA, FLEMMING SEIER NIELSEN, MATTIAS BROGÅRD, EMMA TROEDSSON, ANETTE MÜLLERTZ. *Enzymatic Characterization of Lipid-Based Drug Delivery Systems. International Journal of Pharmaceutics*, v.298, p. 328-332, 2005.
- LUCKS, J. S., R. H. MÜLLER. *Medication Vehicles Made of Solid Lipid Particles (Solid Lipid Nanospheres - Sln). European Patent EP 0000605497.*, 1996.
- LUO, YIFAN, DAWEI CHEN, LIXIANG REN, XIULI ZHAO, JING QIN. *Solid Lipid Nanoparticles for Enhancing Vinpocetine's Oral Bioavailability. Journal of Controlled Release*, v.114, p. 53-59, 2006.
- MARTINS, S., S. COSTA-LIMA, T. CARNEIRO, A. CORDEIRO-DA-SILVA, E. B. SOUTO, D. C. FERREIRA. *Solid Lipid Nanoparticles as Intracellular Drug Transporters: An Investigation of the Uptake Mechanism and Pathway. Int J Pharm*, v.430, p. 216-227, 2012.
- MATTOS, A. C., G. C. PEREIRA, L. K. JANNOTTI-PASSOS, J. R. KUSEL, P. M. COELHO. *Evaluation of the Effect of Oxamniquine, Praziquantel and a Combination of Both Drugs on the Intramolluscan Phase of Schistosoma Mansoni. Acta Trop*, v.102, p. 84-91, 2007.
- MEHLHORN, H. *Encyclopedic Reference of Parasitology: Biology, Structure, Function. Verlag Berlin Heidelberg New York, Springer.*, v.1, p. 678, 2001.
- MEHNERT, W., K. MÄDER. *Solid Lipid Nanoparticles: Production, Characterization and Applications. Adv Drug Deliv Rev*, v.47, p. 165-196, 2001.
- MEHNERT, WOLFGANG, KARSTEN MÄDER. *Solid Lipid Nanoparticles: Production, Characterization and Applications. Advanced Drug Delivery Reviews*, v.47, p. 165-196, 2001.
- MESSERLI, S. M., R. S. KASINATHAN, W. MORGAN, S. SPRANGER, R. M. GREENBERG. *Schistosoma Mansoni P-Glycoprotein Levels Increase in Response to Praziquantel Exposure and Correlate with Reduced Praziquantel Susceptibility. Mol Biochem Parasitol*, v.167, p. 54-59, 2009.

Referências Bibliográficas

- MOURÃO, S. C., P. I. COSTA, H. R. SALGADO, M. P. GREMIÃO. *Improvement of Antischistosomal Activity of Praziquantel by Incorporation into Phosphatidylcholine-Containing Liposomes*. *Int J Pharm*, v.295, p. 157-162, 2005.
- MÜLLER-GOYMANN, C. C. *Physicochemical Characterization of Colloidal Drug Delivery Systems Such as Reverse Micelles, Vesicles, Liquid Crystals and Nanoparticles for Topical Administration*. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v.58, p. 343-356, 2004.
- MÜLLER, R. H., M. RADTKE, S. A. WISSING. *Solid Lipid Nanoparticles (Sln) and Nanostructured Lipid Carriers (Nlc) in Cosmetic and Dermatological Preparations*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v.54, Supplement, p. S131-S155, 2002.
- MÜLLER, R. H., R. D. PETERSEN, A. HOMMOSS, J. PARDEIKE. *Nanostructured Lipid Carriers (Nlc) in Cosmetic Dermal Products*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v.59, p. 522-530, 2007.
- NARVEKAR, M., H. Y. XUE, H. L. WONG. *A Novel Hybrid Delivery System: Polymer-Oil Nanostructured Carrier for Controlled Delivery of Highly Lipophilic Drug All-Trans-Retinoic Acid (Atra)*. *International Journal of Pharmaceutics*, v.436, p. 721-731, 2012.
- NEVES, D.P. (1995). *Parasitologia Humana*. São Paulo
- OBEIDAT, W. M., K. SCHWABE, R. H. MULLER, C. M. KECK. *Preservation of Nanostructured Lipid Carriers (Nlc)*. *Eur J Pharm Biopharm*, v.76, p. 56-67, 2010.
- OLIVEIRA, C. N. F. D., R. N. D. OLIVEIRA, T. F. FREZZA, V. L. C. G. REHDER, S. M. ALLEGRETTI. *Tegument of Schistosoma Mansoni as a Therapeutic Target*. *Parasitic Diseases - Schistosomiasis*, p. <http://www.intechopen.com/books/howtoreference/parasitic-diseases-schistosomiasis/tegument-of-schistosoma-mansoni-as-a-therapeutic-target>, 2013.
- OLIVEIRA, MARCELO ANTONIO DE, MARIA IRENE YOSHIDA, ELIONAI CASSIANA DE LIMA GOMES. *Análise Térmica Aplicada a Fármacos E Formulações Farmacêuticas Na Indústria Farmacêutica*. *Química Nova*, v.34, p. 1224-1230, 2011.
- PARDEIKE, JANA, AIMAN HOMMOSS, RAINER H. MÜLLER. *Lipid Nanoparticles (Sln, Nlc) in Cosmetic and Pharmaceutical Dermal Products*. *International Journal of Pharmaceutics*, v.366, p. 170-184, 2009.
- PAX, R., J. L. BENNETT, R. FETTERER. *A Benzodiazepine Derivative and Praziquantel: Effects on Musculature of Schistosoma Mansoni and Schistosoma Japonicum*. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, v.304, p. 309-315, 1978.
- PEARCE, E. J., A. S. MACDONALD. *The Immunobiology of Schistosomiasis*. *Nat Rev Immunol*, v.2, p. 499-511, 2002.
- PELLEGRINO, J., J. FARIA. *The Oogram Method for the Screening of Drugs in Schistosomiasis Mansoni*. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, v.14, p. 363-369, 1965.
- PORTER, C. J., N. L. TREVASKIS, W. N. CHARMAN. *Lipids and Lipid-Based Formulations: Optimizing the Oral Delivery of Lipophilic Drugs*. *Nat Rev Drug Discov*, v.6, p. 231-248, 2007.
- PRIYANKA, P. E. A. A. H. S. K. . *Solid Lipid Nanoparticles: A Review*. *Scientific Reviews & Chemical Communication*, v.2, p. 80-102, 2012.
- REY, L. *Schistosoma Mansoni E Esquistossomíase: O Parasito*. *Parasitologia. Guanabara Koogan*, p. 856, 2008.
- ROLLINSON, DAVID, STEFANIE KNOPP, SARAH LEVITZ, J. RUSSELL STOTHARD, LOUIS-ALBERT TCHUEM TCHUENTÉ, AMADOU GARBA, KHALFAN A. MOHAMMED, NADINE SCHUR, BOBBIE PERSON, DANIEL G. COLLEY, JÜRGEN UTZINGER. *Time to Set the Agenda for Schistosomiasis Elimination*. *Acta Tropica*, v.128, p. 423-440, 2013.

Referências Bibliográficas

- SANTOS, F.K. *Desenvolvimento E Caracterização De Carreadores Lipídicos Nanoestruturados Contendo Praziquantel. Dissertação (Mestrado) – Faculdade De Ciências Farmacêuticas De Araraquara, Universidade Estadual Paulista, Araraquara.*, p. 83, 2011.
- SHAH, K. A., A. A. DATE, M. D. JOSHI,V. B. PATRAVALE. *Solid Lipid Nanoparticles (Sln) of Tretinoin: Potential in Topical Delivery. International Journal of Pharmaceutics*, v.345, p. 163-171, 2007.
- SHAOHONG, L., T. KUMAGAI, A. QINGHUA, Y. XIAOLAN, H. OHMAE, Y. YABU, L. SIWEN, W. LIYONG, H. MARUYAMA,N. OHTA. *Evaluation of the Anthelmintic Effects of Artesunate against Experimental Schistosoma Mansoni Infection in Mice Using Different Treatment Protocols. Parasitol Int*, v.55, p. 63-68, 2006.
- SHARMA, PUNEET, SRINIVAS GANTA, WILLIAM A. DENNY,SANJAY GARG. *Formulation and Pharmacokinetics of Lipid Nanoparticles of a Chemically Sensitive Nitrogen Mustard Derivative: Chlorambucil. International Journal of Pharmaceutics*, v.367, p. 187-194, 2009.
- SILER-MARINKOVIC, SLAVICA, LJILJANA MOJOVIC, VIOLETA DAVINIC,BRANKO BUGARSKI. *Liposomes as Carriers of Antimicrobial Drugs. Drug Development and Industrial Pharmacy*, v.23, p. 483-488, 1997.
- SILVA, A. C., D. SANTOS, D. C. FERREIRA,E. B. SOUTO. *Minoxidil-Loaded Nanostructured Lipid Carriers (Nlc): Characterization and Rheological Behaviour of Topical Formulations. Die Pharmazie - An International Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.64, p. 177-182, 2009.
- SILVA, A. C., E. GONZALEZ-MIRA, M. L. GARCIA, M. A. EGEA, J. FONSECA, R. SILVA, D. SANTOS, E. B. SOUTO,D. FERREIRA. *Preparation, Characterization and Biocompatibility Studies on Risperidone-Loaded Solid Lipid Nanoparticles (Sln): High Pressure Homogenization Versus Ultrasound. Colloids Surf B Biointerfaces*, v.86, p. 158-165, 2011.
- SILVA, C. S., S. H. SILVA, O. S. PEREIRA-JUNIOR, F. J. CABRAL, J. M. COSTA-CRUZ,V. RODRIGUES. *Schistosoma Mansoni: Gene Expression of the Nucleotide Excision Repair Factor 2 (Nef2) During the Parasite Life Cycle, and in Adult Worms after Exposure to Different DNA-Damaging Agents. Acta Trop*, v.104, p. 52-62, 2007.
- SOUTO, E. B.,S. DOKTOROVOVA. *Chapter 6 - Solid Lipid Nanoparticle Formulations Pharmacokinetic and Biopharmaceutical Aspects in Drug Delivery. Methods Enzymol*, v.464, p. 105-129, 2009.
- SOUZA, A. L. R. . *Avaliação Do Efeito Do Praziquantel Veiculado Em Dispersões Lipídicas No Tratamento De Camundongos Infectados Com Schistosoma Mansoni. Dissertação (Mestrado) – Faculdade De Ciências Farmacêuticas De Araraquara, Universidade Estadual Paulista, Araraquara.* p. 79, 2008.
- SOUZA, A. L. R. . *Desenvolvimento De Nanopartículas Lipídicas Sólidas Contendo Praziquantel Tese (Doutorado) – Faculdade De Ciências Farmacêuticas De Araraquara, Universidade Estadual Paulista, Araraquara.* p. 92, 2011.
- TAMJIDI, FARDIN, MOHAMMAD SHAHEDI, JALEH VARSHOSAZ,ALI NASIRPOUR. *Nanostructured Lipid Carriers (Nlc): A Potential Delivery System for Bioactive Food Molecules. Innovative Food Science & Emerging Technologies*, v.19, p. 29-43, 2013.
- TAN, S. W., N. BILLA, C. R. ROBERTS,J. C. BURLEY. *Surfactant Effects on the Physical Characteristics of Amphotericin B-Containing Nanostructured Lipid Carriers. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v.372, p. 73-79, 2010.

Referências Bibliográficas

- TEERANACHAIDEEKUL, V., R. H. MÜLLER, V. B. JUNYAPRASERT. *Encapsulation of Ascorbyl Palmitate in Nanostructured Lipid Carriers (Nlc)--Effects of Formulation Parameters on Physicochemical Stability. International Journal of Pharmaceutics*, v.340, p. 198-206, 2007.
- TENDLER, M., A. J. SIMPSON. *The Biotechnology-Value Chain: Development of Sm14 as a Schistosomiasis Vaccine. Acta Trop*, v.108, p. 263-266, 2008.
- UNER, M., G. YENER. *Importance of Solid Lipid Nanoparticles (Sln) in Various Administration Routes and Future Perspectives. Int J Nanomedicine*, v.2, p. 289-300, 2007.
- UTZINGER, J., K. N'GORAN E, C. R. CAFFREY, J. KEISER. *From Innovation to Application: Social-Ecological Context, Diagnostics, Drugs and Integrated Control of Schistosomiasis. Acta Trop*, v.120, p. 8, 2011.
- VAN HELLEMOND, J. J., K. RETRA, J. F. BROUWERS, B. W. VAN BALKOM, M. YAZDANBAKHS, C. B. SHOEMAKER, A. G. TIELENS. *Functions of the Tegument of Schistosomes: Clues from the Proteome and Lipidome. Int J Parasitol*, v.36, p. 691-699, 2006.
- VITORINO, C., F. A. CARVALHO, A. J. ALMEIDA, J. J. SOUSA, A. A. PAIS. *The Size of Solid Lipid Nanoparticles: An Interpretation from Experimental Design. Colloids Surf B Biointerfaces*, v.84, p. 117-130, 2011.
- VITORINO, R. R., F. P. C. D. SOUZA, A. D. P. COSTA, F. C. D. FARIA JÚNIOR, L. A. SANTANA, A. GOMES. *Schistosomiasis Mansoni: Diagnosis, Treatment, Epidemiology, Prophylaxis and Control Rev Bras Clin Med*, v.10, p. 39-45, 2012.
- VOUTILAINEN, ARI. *In Vivo Efficacy of Praziquantel against Echinoparyphium Aconiatum (Trematoda: Echinostomatidae) Parasitizing the Great Pond Snails Lymnaea Stagnalis (Gastropoda: Lymnaeidae). Experimental Parasitology*, v.129, p. 72-74, 2011.
- WHO World Health Organization, Place published, 2012
- WISSING, S. A., O. KAYSER, R. H. MÜLLER. *Solid Lipid Nanoparticles for Parenteral Drug Delivery. Advanced Drug Delivery Reviews*, v.56, p. 1257-1272, 2004.
- WISSING, S. A., O. KAYSER, R. H. MULLER. *Solid Lipid Nanoparticles for Parenteral Drug Delivery. Adv Drug Deliv Rev*, v.56, p. 1257-1272, 2004.
- WU, X. J., G. SABAT, J. F. BROWN, M. ZHANG, A. TAFT, N. PETERSON, A. HARMS, T. P. YOSHINO. *Proteomic Analysis of Schistosoma Mansoni Proteins Released During in Vitro Miracidium-to-Sporocyst Transformation. Molecular and Biochemical Parasitology*, v.164, p. 32-44, 2009.
- XIAO, S. H. *Development of Antischistosomal Drugs in China, with Particular Consideration to Praziquantel and the Artemisinin. Acta Trop*, v.96, p. 153-167, 2005.
- YANG, L., Y. GENG, H. LI, Y. ZHANG, J. YOU, Y. CHANG. *Enhancement the Oral Bioavailability of Praziquantel by Incorporation into Solid Lipid Nanoparticles. Pharmazie*, v.64, p. 86-89, 2009.
- YUAN, H., J. CHEN, Y. Z. DU, F. Q. HU, S. ZENG, H. L. ZHAO. *Studies on Oral Absorption of Stearic Acid Sln by a Novel Fluorometric Method. Colloids Surf B Biointerfaces*, v.58, p. 157-164, 2007.